

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Dvourozměrná separace měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů
kapalinovou chromatografií s fokusační modulací

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Dušková**
Osobní číslo: **C23263**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Dvourozměrná separace měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů kapalinovou chromatografií s fokusační modulací**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části diplomové práce podejte přiměřený úvod do problematiky porfyrinových barviv s důrazem na měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů. Dále rozeberte publikované metody stanovení a rovněž tak se zaměřte na využití uvedených barviv v potravinářství.
2. Provedte experimenty s dvourozměrnou kapalinovou chromatografií s fokusační modulací. Zaměřte se na studium podmínek separace, zejména složení mobilní fáze, a dále otestujte různé módy dvourozměrné separace a modulačních podmínek.
3. Získaná experimentální data 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
Konzultanti diplomové práce: **Ing. Michal Kašpar, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Mgr. Barbora Tošovská
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Dvourozměrná separace měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů kapalinovou chromatografií s fokusační modulací 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 9.5. 2025

Bc. Veronika Dušková v.r.

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D za cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala Ing. Michalu Kašparovi, za pomoc při provádění experimentální části diplomové práce, a Mgr. Barboře Tošovské. V neposlední řadě mé obrovské díky patří rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována analýze porfyrinových barviv, v tomto případě měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů, dvoudimenzionální (dvourozměrnou) kapalinovou chromatografií s fokusační modulací. V rámci teoretické části byla v první části zpracována rešerše zabývající se obecně porfyriny – jejich strukturou, názvoslovím, vlastnostmi, syntézou (a možnými deriváty), možnostmi stanovení a jejich využitím. Druhá část se věnuje dvoudimenzionální kapalinové chromatografii, a to z hlediska možných separačních režimů a modulací. Experimentální část zahrnuje optimalizaci jednorozměrné i dvourozměrné analýzy kapalinovou chromatografií standardů sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu a Chlorinu e4 a e6.

KLÍČOVÁ SLOVA

dvourozměrná kapalinová chromatografie, porfyriny, chlorofyliny, separace, přírodní barviva, UV/Vis detekce, fokusační modulace, aktivní modulace rozpouštědlem, sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu, Chlorin e4, Chlorin e6

ANNOTATION

The thesis is devoted to the analysis of porphyrin dyes, in this case copper complexes of chlorophylls and chlorophyllins, by two-dimensional liquid chromatography with focusing modulation - ASM. In the first part of the theoretical part, porphyrins are reviewed in general - their structure, nomenclature, properties, synthesis (and possible derivatives), possibilities of determination and their applications. The second part is devoted to two-dimensional liquid chromatography, in terms of possible separation modes and modulations. The experimental part includes the optimization of one- and two-dimensional analysis by liquid chromatography of sodium salt standards of the chlorophyllin-copper complex and Chlorin e4 and e6.

KEYWORDS

two-dimensional liquid chromatography, porphyrins, chlorophyllins, separation, natural dyes, UV/Vis detection, focusing modulation, active solvent modulation, sodium salt of the chlorophyllin-copper complex, Chlorin e4, Chlorin e6

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	10
SEZNAM ROVNIC	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Porfyriny	16
1.1.1 Struktura porfyrinů.....	16
1.1.2 Názvosloví.....	17
1.1.3 Vlastnosti.....	18
1.2 Syntéza základního skeletu porfyrinů.....	19
1.3 Deriváty porfyriu.....	21
1.3.1 Chlorofyly (Chl)	22
1.3.2 Bakteriochlorofyly (bChl).....	24
1.3.3 Další deriváty.....	26
1.4 Možnosti stanovení porfyrinů	27
1.4.1 Stanovení chlorofylu a feofytinu v zeleném čaji	27
1.4.2 Analýza E141 v oleji pomocí HPLC	28
1.4.3 Stanovení porfyrinů v bakteriích ústní dutiny	28
1.4.4 Stanovení porfyrinového pigmentu v parmské šunce.....	29
1.4.5 Stanovení metaloporfyrinů (Fe, Ni a V) v ropě nechromatografickou metodou.....	30
1.5 Využití porfyrinů	32
1.5.1 Potravinářská barviva.....	32
1.5.1.1 E140 - chlorofyly a chlorofyliny	32
1.5.1.2 E141 - měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů.....	33
1.5.2 Porfyriny jako detekční látky/sloučeniny.....	34
1.5.2.1 Senzorové filmy pro sledování kažení potravin	34
1.5.2.2 Selektivní papírové analytické zařízení pro stanovení mědi (II)	35
1.5.3 Antibakteriální fotodynamická terapie.....	36
1.6 Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie	37
1.6.1 Separáční režimy 2D-LC.....	38
1.6.1.1 Off-line režim vs. on-line režim vs. stop-flow režim.....	38
1.6.1.2 Heart-cutting režim vs. komplexní režim.....	38

1.6.2	Modulace	39
1.6.2.1	Jednoduchá „pasivní“ modulace založená na ventilech	39
1.6.2.2	Modulace ventilů pomocí asistenční technologie	40
1.6.3	Pokroky v oblasti modulačních technik	40
1.6.3.1	Stacionární fázově asistovaná modulace (SPAM)	41
1.6.3.2	Modulátor s aktivním rozpouštědlem (ASM)	42
1.6.3.3	Odpařovací membránový modulátor (EMM)	44
1.6.3.4	Modulátor ředění na koloně (ve sloupci) (ACD)	44
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
2.1	Přístroje a zařízení	46
2.2	Chemikálie	47
2.2.1	Mobilní fáze	47
2.2.2	Alkylbenzeny + aceton	47
2.2.3	Standardy	48
2.3	Pracovní postup	49
2.3.1	Příprava standardů	49
2.3.2	Příprava směsi alkylbenzenů	49
2.4	Podmínky měření	50
2.4.1	Stanovení zpoždění gradientu	50
2.4.2	Jednorozměrná analýza HPLC	50
2.4.3	Dvourozměrná analýza 2D-HPLC	52
2.5	Vyhodnocení dat	53
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
3.1	Zpoždění gradientu	54
3.2	Výběr a hodnocení kolon pro první dimenzi	55
3.2.1	Analýza testovací směsi alkylbenzenů	55
3.2.2	Analýza standardů	58
3.3	Analýzy ve dvoudimenzionálním módu	61
4	ZÁVĚR	72
5	POUŽITÁ LITERATURA	74
	PŘÍLOHY	84

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: a) pyrrolová podjednotka – pyrrol; b) cyklický porfin; c) lineární bilin	16
Obrázek 2: Tučně vyznačený 18 π -elektronový systém porfyriu.	16
Obrázek 3: Schéma číslování a) dle Fischera; b) IUPAC	17
Obrázek 4: UV-Vis spektra porfyrinů s různými substituovanými skupinami	18
Obrázek 5: Absorpční a fluorescenční spektra meso-tetrafenylporfyriu v toluenu.....	19
Obrázek 6: Rothemundova metoda pro syntézu meso-substituovaných porfyrinů	19
Obrázek 7: Přeměna meso-substituovaného chloru na porfyrin.....	20
Obrázek 8: Syntéza dle MacDonald a spol. (1960).....	20
Obrázek 9: Dvoustupňová syntéza porfyrinů v jedné baňce při pokojové teplotě	21
Obrázek 10: Q pásma v kovových komplexech porfyrinů	22
Obrázek 11: Chemické struktury chlorofylu (Chl) s číslováním atomů uhlíku podle IUPAC/IUBMB s tabulkou substituentů	23
Obrázek 12: Struktura bakteriochlorofylů a, b, c, d, e, f a g.....	25
Obrázek 13: a) chlorin; b) fosfin; c) bakteriochlorin	26
Obrázek 14: Základní struktura ftalocyaninu (Pcs)	26
Obrázek 15: Průměrné množství pigmentů rozpustných v tucích v pěti značkách čaje	27
Obrázek 16: Typický denzitogram extraktu parmské šunky se separovanými porfyriny	30
Obrázek 17: Emulze pro frakcionaci ropy.....	31
Obrázek 18: 1) Různé fáze výroby sensorové fólie; 2) Spektra nezreagovaný a zreagovaný sensorových fólií.....	35
Obrázek 19: Generování excitovaných stavů a reaktivních forem kyslíku (ROS)	37
Obrázek 20: Schematické znázornění technik 2D-LC a jejich hybridních implementací.	39
Obrázek 21: Obecné schéma pasivně-modulačního rozhraní – osmiportový ventil.....	40
Obrázek 22: Možné tvary píků v důsledku nesouladu síly rozpouštědla	41
Obrázek 23: Schéma dvou poloh rozhraní stacionární fázově asistované modulace (SPAM). 42	
Obrázek 24: Schéma aktivní modulace rozpouštědla (ASM) pro spojení dvou dimenzí separace v systému 2D-LC	43
Obrázek 25: Jednotlivé vrstvy odpařovacího modulátoru s membránou	44
Obrázek 26: Schéma systému LC \times LC s tradičním standardním modulátorem a modulátorem s ředěním na koloně (ACD)	45
Obrázek 27: Schéma zapojení ventilů pro 2D-LC s ASM modulátorem	52
Obrázek 28: Nastavení v softwaru Eval2D Ver2.71 Lite	53

Tabulka 1: Chlorofyly – molekulární vzorce a výskyt	24
Tabulka 2: Bakteriochlorofyly – výskyt a absorpční vlnové délky [29].	25
Tabulka 3: Kolony	46
Tabulka 4: Zpoždění gradientu – koncentrační gradient	50
Tabulka 5: Standardy: I. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.	51
Tabulka 6: Standardy: II. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.	51
Tabulka 7: Standardy: III. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.	51
Tabulka 8: Směs alkylbenzenů – koncentrační gradient.....	51
Tabulka 9: Standardy: Koncentrační gradient pro 2D-LC – první dimenze	52
Tabulka 10: Standardy: Koncentrační gradient pro 2D-LC – druhá dimenze.....	53
Tabulka 11: Zpoždění gradientu	54

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Reakce vzniku metaloporfyrinů	21
Rovnice 2: Logaritmus retenčního času k	55
Rovnice 3: Účinnost kolony – počet teoretických pater N	56
Rovnice 4: Píková kapacita (n_p).....	57
Rovnice 5: Průměrná píková kapacita ($n_{p, \text{průměr}}$).....	57

SEZNAM ZKRATEK

2D-LC	dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (two-dimensional liquid chromatography)
ADI	Akceptovatelný denní příjem (Acceptable daily intake)
ACN	Acetonitril
APCI-MS	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-pressure chemical ionization)
aPDT	antibakteriální fotodynamická terapie (Antimicrobial photodynamic therapy)
ASM	aktivní modulace rozpouštědlem (Active Solvent Modulation)
bChl	bakteriochlorofyly (Bacteriochlorophyll)
Chl	chlorofyl (Chlorophyll)
CPE	extrakce v zákalu (Cloud point extraction)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
E140	E-kód chlorofylů a chlorofylinů
E141	E-kód měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů
E252	E-kód dusičnanu draselného
E250	E-kód dusitanu sodného
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EMM	odpařovací membránový modulátor (Evaporative Membrane Modulation)
ESI+	elektrosprejová ionizace v pozitivním módu (Electrospray Ionization - positive ion mode)
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
FAB-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací pomocí bombardování rychlými atomy (Fast atom bombardment mass spectrometry)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FIR	vzdálené infračervené spektrum (Far InfraRed)
FSM	pevná modulace rozpouštědlem (Fixed Solvent Modulation)
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared spectroscopy)
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPLC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid chromatography – mass spectrometry)
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively coupled plasma mass spectrometry)
IUB	Mezinárodní unie pro biochemii (International Union of Biochemistry)
IUBMB	Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LC-LC	heart-cutting režim s převodem jedné frakce (single heart-cutting two-dimensional liquid chromatography)
LCxLC	úplný komplexní režim (comprehensive two-dimensional liquid chromatography)
LED	elektroluminiscenční dioda (Light-Emitting Diode)
mLC-LC	vícenásobný heart-cutting režim (multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry)
Pcs	ftalocyaniny (Phthalocyanine)
PDI	fotodynamická inhibice (Photodynamic inhibition)
PE	polyethylen
Phe	feofytin (Pheophytin)
Phy	fytolový řetězec (C ₂₀ H ₃₉)
PLS	metoda nejmenších čtverců (Partial least squares)
PS	fotosenzitizér (Photosensitizer)
PTFE	polytetrafluorethylen
RP(LC)	chromatografie na reverzní fázi (Reversed-phase chromatography)
ROS	reaktivní forma kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SARA	nasycené látky (Saturate compounds), aromatické látky (Aromatic compounds), pryskyřice (Resin), asfaltény (Asphaltene compounds)

SIMAAS	simultánní atomová absorpční spektrometrie v grafitové peci (Simultaneous graphite furnace atomic absorption spectrometry)
sLCxLC	selektivní komplexní režim (selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography)
SPAM	modulace s asistencí (podporou) stacionární fáze (Stationary-Phase-Assisted Modulation)
SRM	monitoring vybraných reakcí (Selected Reaction Monitoring)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
μPAD	mikrofluidní analytické zařízení na bázi papíru (microfluidic Paper-Based Analytical Device)
UV-Vis	ultrafialovo-viditelné spektrum (UltraViolet-Visible spectrum)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

ÚVOD

Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofilinů patří do skupiny organických sloučenin, které jsou označovány jako porfyriny. Základní skelet těchto látek se nazývá porfín, jež je tvořen čtyřmi modifikovanými pyrrolovými podjednotkami. Jejich název byl odvozen z řeckého slova *porphura*, označující fialovou barvu, jelikož se jedná o intenzivně barevné sloučeniny. Mezi základní deriváty patří metaloporfyriny, tedy komplexy porfyrinů a kationtů kovů. Do této skupiny patří například chlorofyl, jakožto jeden z nejrozšířenějších přírodních pigmentů, bakteriochlorofyl, nacházející se u anaerobní skupině bakterií, či syntetické ftalocyaniny. Od objevu porfyrinů bylo vyvinuto mnoho metod jejich separace a detekce, mimo jiné využívající jejich charakteristické elektronické absorpční vzory v UV/Vis oblasti spektra, jako je Soretovo pásmo a Q (pod)pásma. Porfyriny jsou známé především jako zelená potravinářská barviva E140 a E141, které jsou získávána průmyslovou extrakcí z přírodních zdrojů, jež jsou často součástí běžné lidské stravy. Postupně se přichází na další možnosti využití těchto sloučenin, a to například jako součást senzorových materiálů.

V této diplomové práci byly sodné soli měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofilinů analyzovány pomocí dvourozměrné kapalinové chromatografie s UV/Vis detekcí. Pro stanovení parametrů separace, jako například zpoždění gradientu, účinnost kolony či píková kapacita kolony, byla analyzována testovací směs alkylbenzenů s acetonem. Pro analýzy byl zvolen mód s reverzní mobilní fází, a to ve složení redestilovaná voda/acetonitril, případně redestilovaná voda/methanol. Separace ve dvoudimenzionálním módu byla provedena jak v klasickém módu, tak v módu s aktivní modulací rozpouštědlem, tedy s fokusační modulací.

1 TEORETICKÁ ČÁST

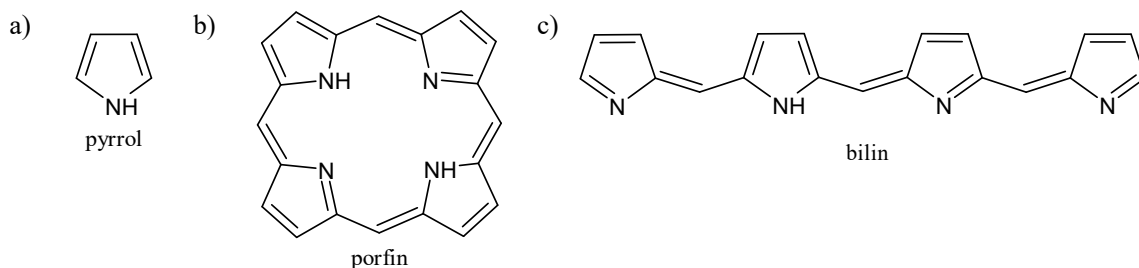
1.1 Porfyriny

1.1.1 Struktura porfyrinů

Porfyriny jsou definovány jako skupina hetero-makrocyclických organických sloučenin, jejichž základní strukturu tvoří čtyři modifikované pyrrolové podjednotky (Obrázek 1a), které jsou propojené přes atomy uhlíku pomocí methinových (či methenylových [1]) můstků (=CH–) [1] [2] [3].

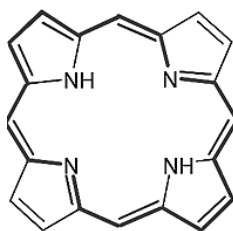
Základní, nesubstituovaný porfyrinový kruh se nazývá porfin ($C_{20}H_{14}N_4$) (Obrázek 1b) – při pokojové teplotě tvoří stabilní, pevnou, tmavě červenou krystalickou látku, která je rozpustná v některých polárních rozpouštědlech, jako je pyridin a dioxan. Mimo jiné ji lze zahřát až na $360\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez roztavení [2] [3].

Pokud se rozštěpí methinový most mezi dvěma pyrrolovými podjednotkami, vzniknou takzvané biliny, tedy tetrapyrroly s otevřeným řetězcem (Obrázek 1c) [2] [4].



Obrázek 1: a) pyrrolová podjednotka – pyrrol; b) cyklický porfin; c) lineární bilin

Z 22 konjugovaných π -elektronů v mateřské porfyrinové struktuře se pouze 18 π -elektronů účastní aromatického systému, čímž se řídí Hückelovým zákonem pro aromaticitu ($4n + 2$). Zbylé 4 π -elektrony mají charakter dvojné vazby a nejsou zapojeny do aromatického systému (Obrázek 2) [2] [5].



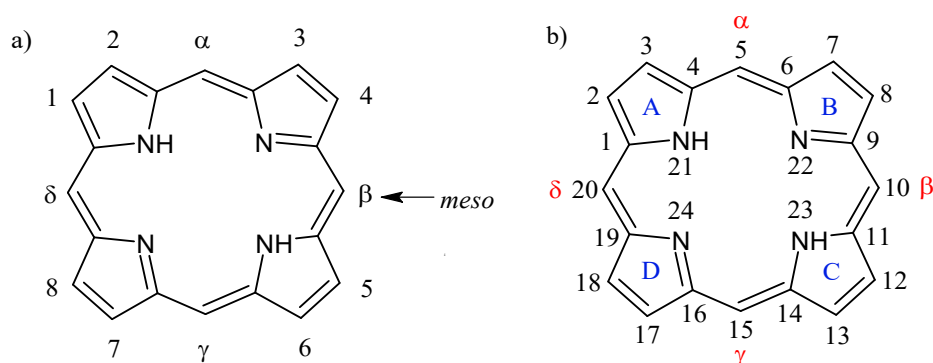
Obrázek 2: Tučně vyznačený 18 π -elektronový systém porfyrinu.

1.1.2 Názvosloví

Název této skupiny intenzivně barevných sloučenin vychází z řeckého slova *porphura*, které se v dávných dobách používalo k popisu fialové barvy, přičemž ho poprvé použil Hoppe-Seyler při pojmenování hematoporfyrinu v letech 1877-1878 [5].

Ve 20. a 30. letech 20. století se vyvíjela Fischerova nomenklatura, která zahrnovala velmi velké množství triviálních názvů a schéma číslování (Obrázek 3a), které bylo jednoduché, avšak neúplné [6] [7]. Atomy uhlíku tvořící můstek mezi dvěma pyrrolovými podjednotkami byly označovány jako „*meso*“ uhlíky (pozice) a osm atomů uhlíku β -pyrrolu bylo očíslováno od 1 do 8 [5].

Současný systém nomenklatury porfyrinů a příbuzných sloučenin je založen na doporučeních IUPAC-IUB z roku 1986 (Obrázek 3b) [5]. Prstence pyrrolu jsou označeny písmeny od A do D. Uhlíkové můstky spojující prstence pyrrolu se nazývají *meso*-pozice a někdy jsou označovány jako α -, β -, δ -, a γ -pozice. Často se vyskytují izomery, které jsou identifikovány přidáním římských číslic na konec názvu [2]. Uhlíky makrocyklu jsou očíslovány od 1 do 20, čtyři vnitřní dusíky jsou na pozicích N21–N24, přičemž dusíky na pozicích N21 a N23 jsou vázány na vodíky, které vystupují směrem k vnitřku makrocyklu [3]. Avšak ani tento systém nomenklatury není dostatečný, a to především z důvodu explozivního růstu expandovaných, izomerních a makrocyclicky modifikovaných systémů. Proto se ve skutečnosti používá kombinace oficiálních a neformálních systémů pojmenování porfyrinů [5].



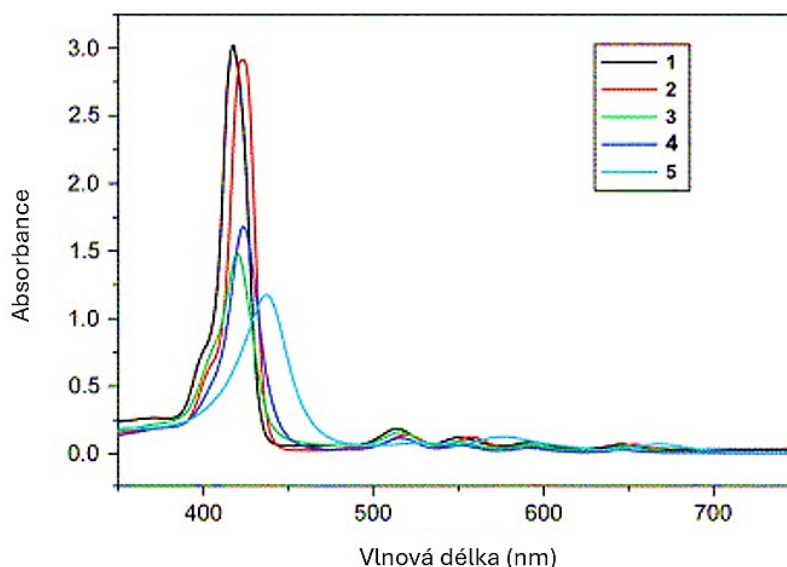
Obrázek 3: Schéma číslování a) dle Fischera; b) IUPAC

1.1.3 Vlastnosti

Volné porfyriny mají v UV-Vis oblasti spektra charakteristický elektronický absorpční vzor, ve kterém se nachází jedno Soretovo pásmo (Soretův pruh [1]) a několik Q absorpčních pásem (Obrázek 5) [8] [9] [10].

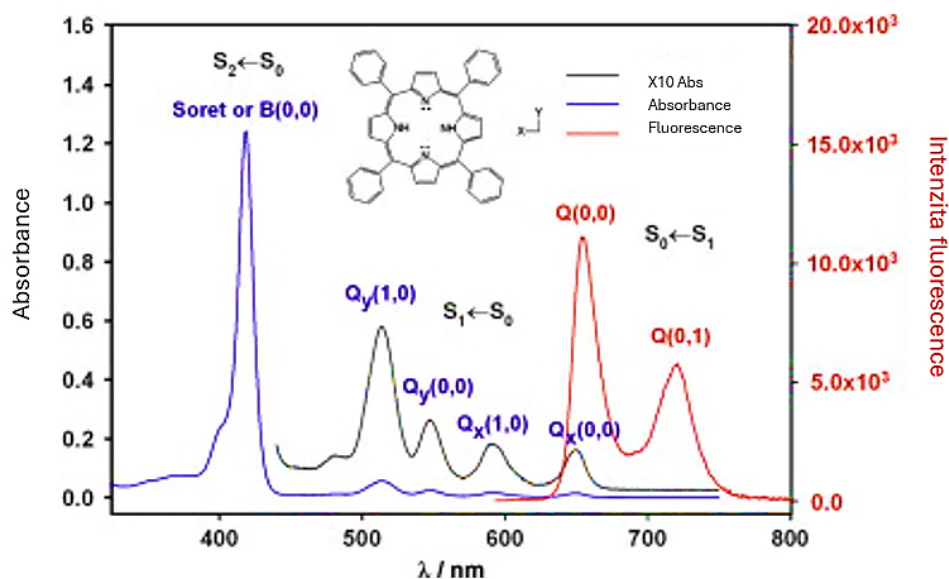
Mezi ultrafialovým a viditelným spektrem (410–440 nm; při 420 nm [8]; okolo 400 nm [1]) se vyskytuje v podstatě ostré intenzivní Soretovo pásmo (S pásmo) [8] [9] [10], které bylo pojmenováno po svém objeviteli – francouzském fyzikovi Charlesi Soretovi, a které je charakteristické pro veškeré sloučeniny s porfyrinovým kruhem, a to bez ohledu na typ postranního řetězce [1].

V roztocích při pokojové teplotě jsou v oblasti mezi 500 a 660 nm (450–700 nm [9]; 515–650 nm [8]) pozorována nejméně čtyři (pod)pásma střední intenzity, která bývají označována jako Q pásma [11]. Tato pásma jsou pojmenována jako I, II, III a IV, přičemž jejich hodnoty vlnových délek jsou určeny strukturami porfyrinových makrocyclů [9](Obrázek 4).



Obrázek 4: UV-Vis spektra porfyrinů s různými substituovanými skupinami:
1. *meso*-Tetrafenylporfín; 2. *meso*-Tetra(*p*-hydroxyfenyl)porfín; 3. *meso*-Tetra(*p*-karboxyfenyl)porfín; 4. *meso*-Tetra(*p*-nitrofenyl)porfín; 5. *meso*-Tetra(*p*-aminofenyl)porfín.
Převzato a upraveno z: [9].

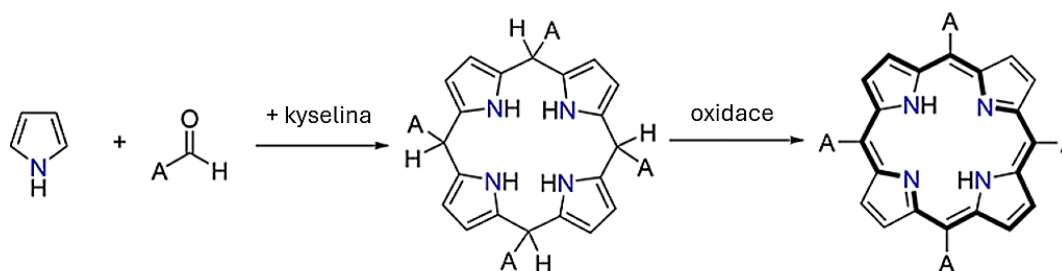
Co se týče fluorescenčních spekter (Obrázek 5), porfyriny vykazují dva typy fluorescence, tj. S1-fluorescenci a S2-fluorescenci. První typ S1-fluorescence v rozsahu 550-800 nm je relativně silný a více prostudovaný. Slabá luminiscence byla pozorována také při 400-550 nm při excitaci v Soretově pásmu [12].



Obrázek 5: Absorpční a fluorescenční ($\lambda_{ex} = 418 \text{ nm}$) spektra meso-tetrafenylporfyrinu v toluenu. Převzato a upraveno z: [13].

1.2 Syntéza základního skeletu porfyrinů

První syntéza porfyrinu (meso-tetramethylporfyrinu [14]; tetrafenylporfyrinu [15]; D_{4h} -symetrického porfyrinu [16]) byla provedena v roce 1935 chemikem Paulem Wilhelmem Karlem Rothemundem. Tato Rothemundova metoda (Obrázek 6) spočívala v reakci aldehydů (benzaldehydu [15]; acetaldehydu [14]) a pyrrolu v pyridinu v uzavřené tlakové nádobě při $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ($110\text{-}220 \text{ }^\circ\text{C}$ [14]) po dobu 24 h [15].



Obrázek 6: Rothemundova metoda pro syntézu meso-substituovaných porfyrinů. Převzato a upraveno z: [16].

Ve většině ranných prací se podpůrné analytické údaje skládaly pouze ze spektrografu a naměřeného HCl rozdělovacího koeficientu. Pečlivé zkoumání každého reakčního produktu však ukázalo přítomnost druhé porfyrinové látky na úrovni 10-20 % ve srovnání s porfyrinem. Tato kontaminující látka byla později izolována chromatografií a prokázalo se, že jde o chlorin, který lze přeměnit oxidací na odpovídající porfyrin (Obrázek 7) [14].

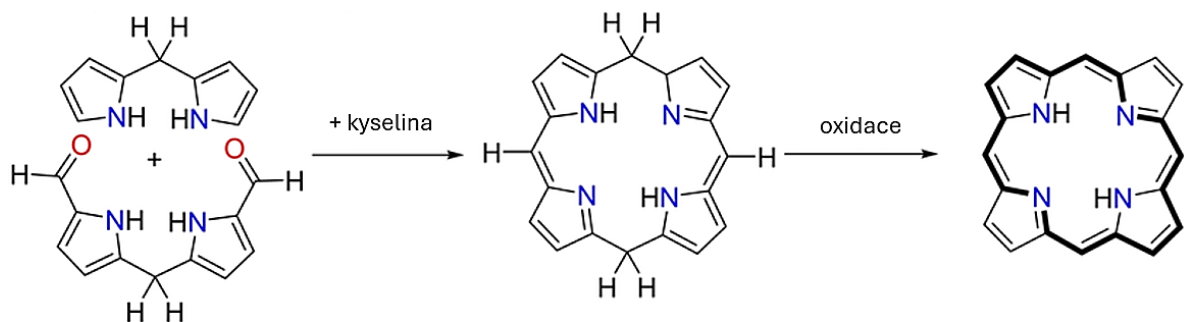


Obrázek 7: Přeměna *meso*-substituovaného chloru na porfyrin. Převzato a upraveno z: [14].

V 60. letech 20. století byla vyvinuta praktická verze Rothemundovy metody, a to metoda Adlera a Longa s jednou baňkou, kdy se jednalo o reakci pyrrolu a arylaldehydu v refluxní kyselině propionové ($t_v = 141\text{ }^\circ\text{C}$) v otevřené kádince po dobu 30 min [15] [17]. Po mírném ochlazení se filtrací tmavé směsi získal porfyrin ve formě třpytivých fialových krystalů [17].

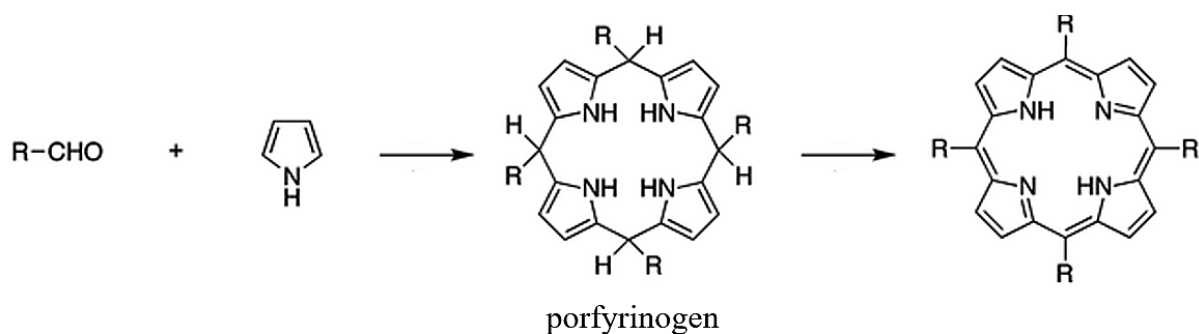
Tato metoda však měla dvě významná omezení: (1) tvrdé reakční podmínky omezující rozsah substituentů (a často i výtěžky) a (2) neexistence racionálního přístupu k porfyrinům nesoucím dva až čtyři různé *meso*-substituenty, jelikož takováto reakce v jedné baňce mohla poskytnout pouze vysoce symetrický porfyrin (např. obsahující arylový substituent v každé ze čtyř *mezo*-poloh) [17].

V roce 1960 MacDonald a spol. vyvinuli [2 + 2] dipyrrometanovou spojku k syntéze asymetrických porfyrinů (Obrázek 8) pomocí kondenzační reakce zprostředkované kyselinou s následnou oxidativní aromatizací [16].



Obrázek 8: Syntéza dle MacDonald a spol. (1960). Převzato a upraveno z: [16].

Na počátku 80. let Lindsey a kol. vyvinuli dvoustupňovou reakční strategii s jednou baňkou (Obrázek 9), čímž překonali první omezení (vynucující podmínky) předchozích metod. Tento přístup zahrnuje (1) kyselinou katalyzovanou kondenzací aldehydu a pyrrolu za vzniku porfyrinogenu a (2) přidavek oxidantu, který provede oxidativní dehydrogenaci porfyrinogenu, a tím vytvoří porfyrin [17].



Obrázek 9: Dvoustupňová syntéza porfyrinů v jedné baňce při pokojové teplotě.
Převzato a upraveno z: [17].

Od té doby se objevily zásadní práce o syntéze vysoce asymetrických ABCD-porfyrinů nesoucích čtyři různé substituenty v *meso*-poloze, přičemž se jedná především o strategie zahrnující (1) postupnou funkcionalizaci pyrrolu s následnou cyklizací a (2) palladiem katalyzované cross-couplingové reakce po halogenaci *meso*-polohy na porfyrinech. Zároveň většina postupů syntézy asymetrických a symetrických porfyrinů zahrnuje oxidační aromatizaci. Jedním z nejrobustnějších přístupů k přípravě porfyrinoidů je mimo jiné cyklizační reakce s využitím kovů, kdy ve všech sloučeninách hraje klíčovou roli afinita iontu kovu (II) ke čtvercové geometrii [16].

1.3 Deriváty porfyrinu

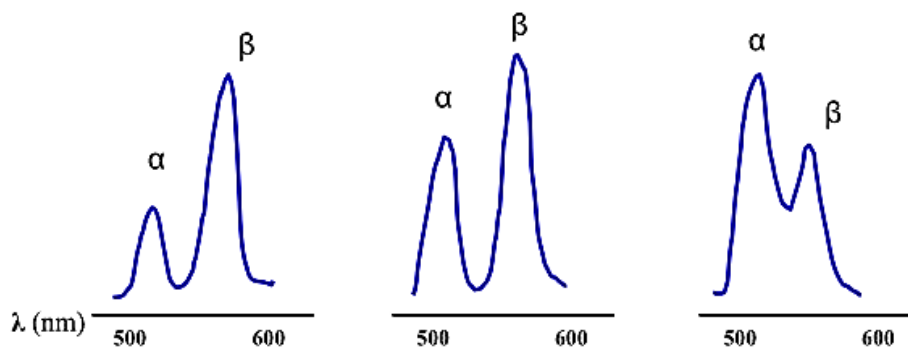
Základní strukturu porfyrinů podporuje vysoce stabilní konfigurace jednoduchých a dvojných vazeb s aromatickými vlastnostmi, které umožňují elektrofilní substituční reakce typické pro aromatické sloučeniny, jako je halogenace, nitrace, sulfonace, acylace, deuterace či formylace. V porfyrinu existují dvě různá místa na makrocyklu, kde může docházet k elektrofylické substituci s různou reaktivitou (Obrázek 3): pozice 5, 10, 15 a 20, nazývané *meso*- a pozice 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 a 18, nazývané β -pyrrolové pozice. První druh sloučenin je široce přítomen v přírodních produktech, zatímco druhý nemá v přírodě žádný protějšek a byl vyvinut jako funkční umělé deriváty [18].

Porfyriny snadno vytvářejí komplexy s kationty kovů, jako je železo (II/III), hořčík (II), měď (II) a zinek (II) za účelem získání tzv. metaloporfyrinů [2]. Při této reakci je kovový iont (M^{n+}) začleněn do porfyrinu (H_2P) za vzniku komplexu ($MP^{(n-2)+}$) a ztráty dvou aminových protonů pocházejících ze dvou pyrrolových skupin, jak je uvedeno níže (Rovnice 1) [18].

Rovnice 1: Reakce vzniku metaloporfyrinů



Při tvorbě metaloporfyrinů byly pozorovány výrazné barevné změny s transformací UV-Vis spektra, zejména v Q-zóně (Obrázek 5). Dva získané Q pásy se nazývají α a β . Relativní intenzity těchto pásů lze korelovat se stabilitou komplexu kovu (Obrázek 10); pokud totiž $\alpha > \beta$, kov tvoří s porfyrinem stabilní čtvercový komplex, v druhém případě, kdy $\beta > \alpha$ (např. Ni (II), Pd (II), Cd (II)), jsou kovy snadno vytěšňovány protony [18].



Obrázek 10: Q pásma v kovových komplexech porfyrinů. Převzato z: [18].

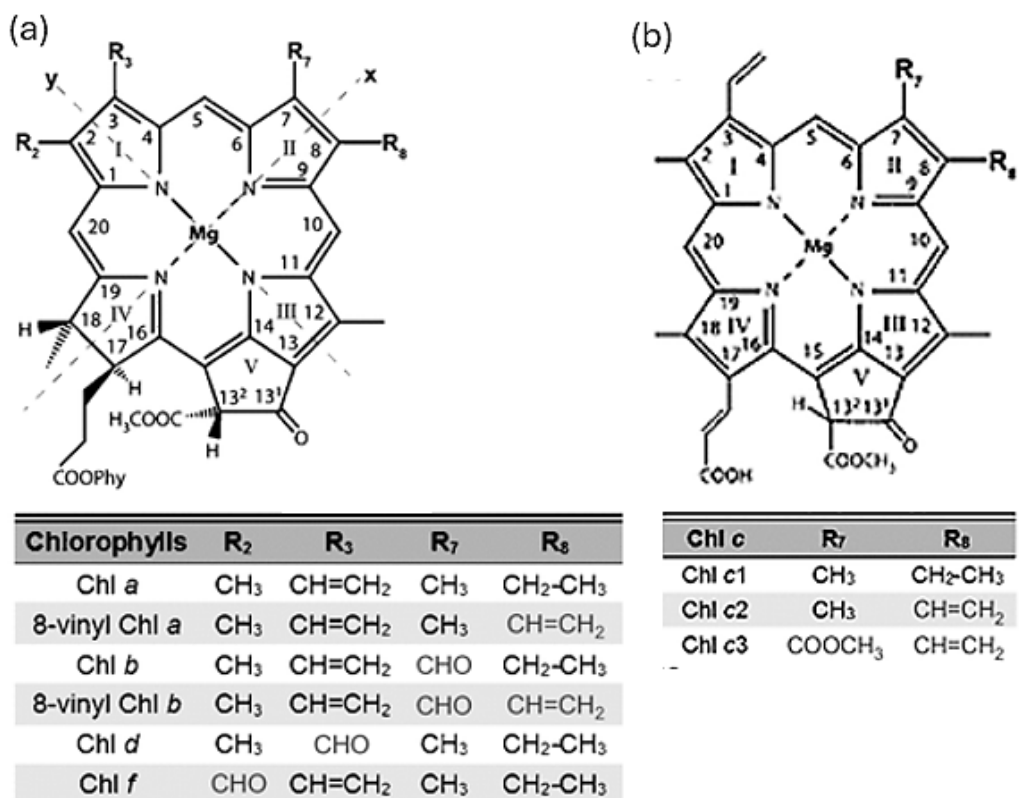
Dále bylo odhaleno, že naměřená UV-Vis spektra porfyrinů jsou závislá na teplotě roztoku barviva. Například při změně teploty z 50 °C na 10 °C může být posun spektrálního pásu metaloporfyrinových sestav až 15 nm [10].

1.3.1 Chlorofyly (Chl)

Jedná se o jeden z nejrozšířenějších přírodních pigmentů, který působí jako klíčová složka fotosyntézy a odbourávání tohoto pigmentu je důležitým katabolickým procesem stárnutí listů a zrání plodů. Chlorofyl lze rozdělit do pěti hlavních tříd, kterými jsou *a*, *b*, *c*, *d* a *f*. [19], přičemž byly pojmenovány dle pořadí jejich objevení [20].

Centrálním kovem v chlorofylech je hořčík. Ve struktuře chlorofylu je jeden okraj porfyrinového kruhu hydrofilní, zatímco postranní řetězec obsahující fytolový řetězec (Phy, C₂₀H₃₉ [20]) je silně hydrofobní. Tato struktura je výhodná pro uspořádání chlorofylu ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány [19].

Dle struktury lze chlorofyly rozdělit na dva typy (Obrázek 11): a) chlorinový typ – zahrnující chlorofyly *a*, *b*, *d* a *f*; b) porfyrinový typ – chlorofyly rodiny *c*, u kterých fytolový řetězec chybí [20].



Obrázek 11: Chemické struktury chlorofylu (Chl) s číslováním atomů uhlíku podle IUPAC/IUBMB s tabulkou substituentů; (a) chlorinový typ, (b) porfyrinový typ. Rozdíly ve struktuře jsou zvýrazněny šedou barvou. Převzato a upraveno z: [20].

Ve vyšších rostlinách se vyskytuje pouze chlorofyl *a* a *b*, přičemž jsou průmyslově používány při barvení potravin. Ostatní typy jsou přítomny v řasách a bakteriích [21]. Molekulární vzorce a výskyt základních chlorofylů je shrnuto níže (Tabulka 1).

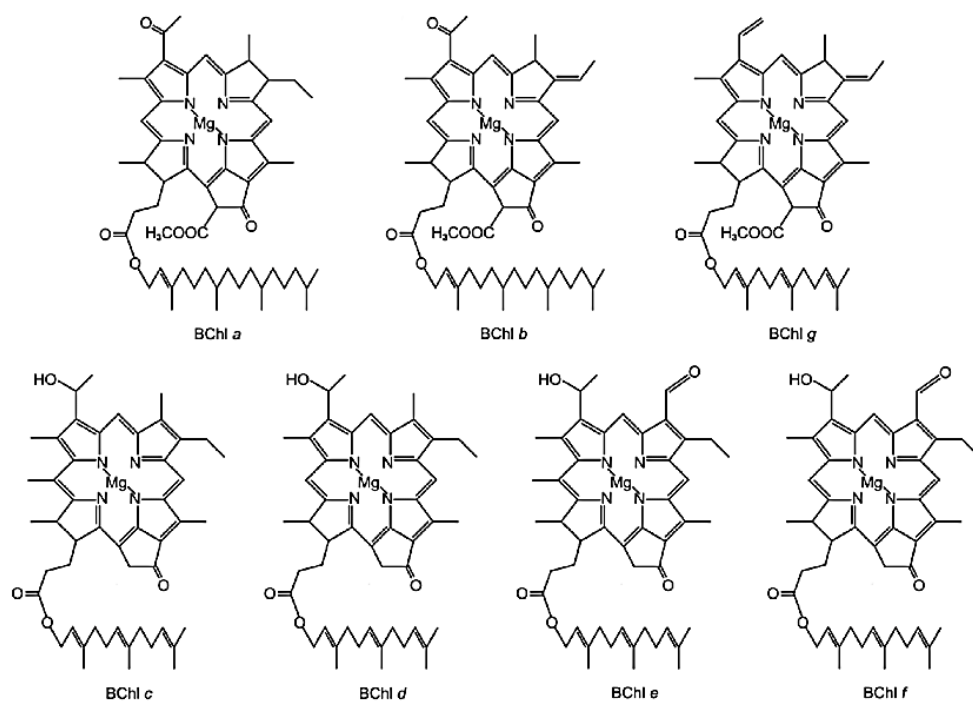
Tabulka 1: Chlorofyly – molekulární vzorce a výskyt

Chl	molekulární vzorec	výskyt [22]
<i>a</i>	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ [23]	- vyšší rostliny [21] - fotosyntetické eukaryotické organismy - sírné bakterie - sinice (prochlorofyty)
<i>b</i>	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$ [22] [24]	- vyšší rostliny [21]
<i>c</i>	$C_{35}H_{28}MgN_4O_5$ [22] [25]	- zlatohnědé eukaryotické řasy - mořské řasy - řasy obrněnky (dinoflageláty)
<i>d</i>	$C_{54}H_{70}MgN_4O_6$ [22] [26]	- některé červené řasy a sinice - hlubokomořské řasy
<i>f</i>	$C_{55}H_{69}MgN_4O_6$ [27]	- stromatolity
<i>e</i>	není znám [22]	- zlaté řasy, zejm. <i>Tribonema bombycinum</i> , <i>Vaucheria hamata</i>

Tyto fotosyntetické sloučeniny jsou citlivé na ošetření mikrovlnami, vůči vysokým teplotám a kyselému pH (3,5-5,0) [19] [28]. Vystavení chlorofylů kyselému prostředí vede k nahrazení hořčíku v jejich struktuře dvěma atomy vodíku, čímž vzniká feofytin, hnědé barvy, přičemž tuto reakci lze podpořit vysokými teploty [28].

1.3.2 Bakteriochlorofyly (bChl)

Bakteriochlorofyly (bChl) jsou přítomny v anaerobní skupině bakterií. Strukturálně se od chlorofylů liší v postranní skupině porfyrinového makrocyklu (Obrázek 12). Všichni zástupci této skupiny mají absorpční maximum v infračervené oblasti spektra. Absorpční spektrum bChl však závisí na jeho umístění v membránách, což znamená, že stejný pigment může absorbovat různé vlnové délky světla v různých organismech. Oblasti absorpce a výskyt základních bakteriochlorofylů je shrnuto níže (Tabulka 2) [29].



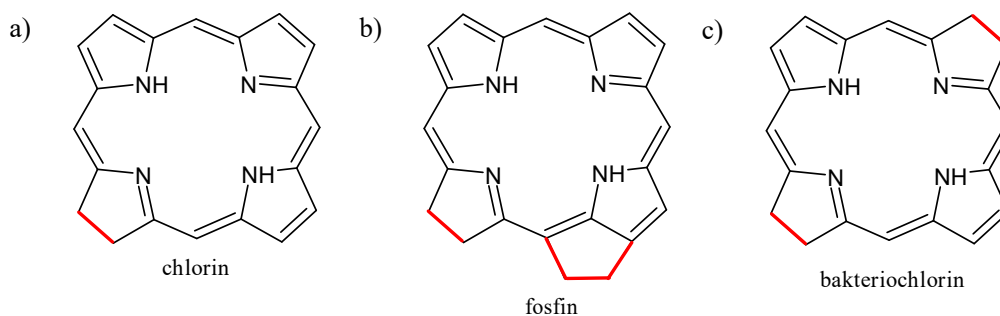
Obrázek 12: Struktura bakteriochlorofylů a, b, c, d, e, f a g. Převzato z: [30]

Tabulka 2: Bakteriochlorofyly – výskyt a absorpční vlnové délky [29].

bChl	výskyt	oblast absorpce [nm]
<i>a</i>	proteobakterie, purpurové bakterie, bakterie oxidující síru (<i>Chromatium</i> , <i>Ectothiorhodospir</i>)	800-1040
<i>b</i>	purpurové bakterie	770-795 [31]
<i>c</i>	zelené sírné bakterie	720-755 (FIR)
<i>d</i>		650-800 [32]
<i>e</i>		
<i>g</i>	<i>Heliobacteriaceae</i>	670 nebo 778

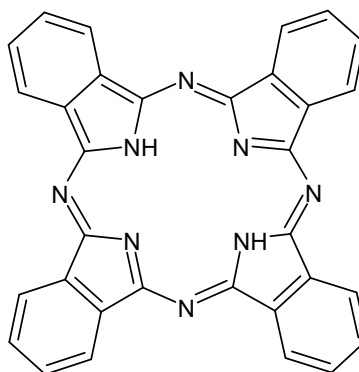
1.3.3 Další deriváty

Existují i sloučeniny příbuzné porfyrinům s nasycenými vazbami a/nebo extra kruhy (Obrázek 13), které zahrnují chlorin (a), fosfin (b), bakteriochlorin (c) a jejich deriváty. Chlorin je 17,18-dihydroporfin, zatímco fosfin je derivátem chlorinu obsahující extra isocyklický kruh mezi kruhy C a D. Bakteriochlorin představuje derivát 7,8,17,18-tetrahydroporfinu [2].



Obrázek 13: a) chlorin; b) fosfin; c) bakteriochlorin

Ftalocyaninové sloučeniny (Ftalocyaniny (Pcs)) (Obrázek 14) se v přírodě nevyskytují, i když mají analogickou strukturu jako porfyrinové sloučeniny [33]. Oficiálně došlo k syntéze ftalocyaninu náhodou, a to Fe-ftalocyaninu v roce 1928 při běžné výrobě ftalimidu z ftalanhydridu [34], avšak zmínky o syntéze ftalocyaninu jsou již od von Brauna (1907), který vyrobil ftalocyanin neobsahující kovy, či de Diesbach (1927), který připravil Cu-Pcs [35].



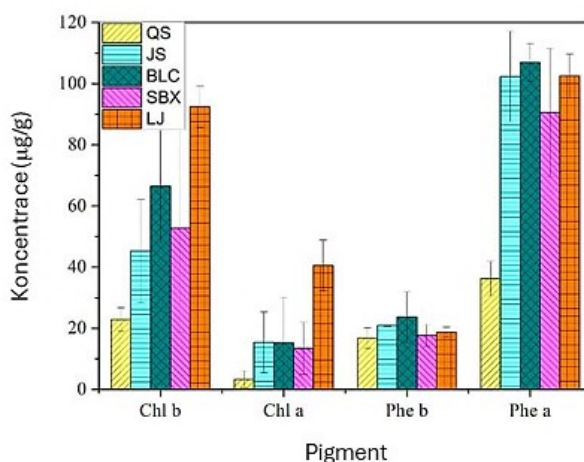
Obrázek 14: Základní struktura ftalocyaninu (Pcs)

Pcs tvoří koordinační komplexy s většinou prvků periodické tabulky. Tyto komplexy jsou také intenzivně barevné a používají se jako barviva nebo pigmenty – silně absorbují světlo mezi 600 a 700 nm, proto jsou tyto materiály modré nebo zelené [36]. Zároveň kovové komplexy vykazují intenzivnější absorpci Q-pásmo než Soretovo pásmo a jejich absorpční vlnové délky jsou posunuty k delším vlnovým délkám než u porfyrinových sloučenin [33].

1.4 Možnosti stanovení porfyrinů

1.4.1 Stanovení chlorofylu a feofytinu v zeleném čaji

Chlorofyl (Chl) je dominantním barvivem čerstvých listů zeleného čaje, avšak během skladování se zvyšuje kyselost, což způsobuje ztrátu hořečnatých iontů v chlorofylech a vzniká olivově hnědá pevná látka – feofytin (Phe). Jelikož existují výrazné rozdíly v množství základních čtyř pigmentů (Chl-*a*, Chl-*b*, Phe-*a*, Phe-*b*) (Obrázek 15), je jejich vzájemný poměr jedním z rozhodujících faktorů pro hodnocení sensorické kvality zeleného čaje [37].



Obrázek 15: Průměrné množství pigmentů rozpustných v tucích v pěti značkách čaje. Převzato a upraveno z: [37].

V čerstvých listech zeleného čaje je množství Chl-*b* je přibližně dvakrát vyšší než Chl-*a*, avšak ve výrobcích ze zeleného čaje je množství Phe-*a* přibližně třikrát vyšší než Phe-*b*. To dokládá, že Chl-*a* se během sklizně a zpracování čaje snáze rozkládala a přeměňovala na Phe-*a* ve srovnání s Chl-*b* [37] [38].

Li a kol. (2018) měli za cíl vytvořit účinnou metodu pro stanovení chlorofylu a feofytinu v zeleném čaji na základě infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR). FT-IR spektroskopie poskytuje informace o vnitřních složkách čaje v širokém rozsahu vlnových délek ($3583\text{--}689\text{ cm}^{-1}$), kdy tyto údaje o spektrech však mohou obsahovat nepodstatné informace, což často zhoršuje stabilitu a přesnost, proto byla použita metoda výběru vlnových čísel. Částečná regrese zde byla zprostředkována metodou nejmenších čtverců (PLS) ke stanovení kvantitativního modelu stanovení chlorofylu a feofytinu zeleného čaje. PLS je široce používaná metoda k nalezení základních vztahů mezi spektrálními daty a známými chemickými složkami. Jako referenční metoda byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s UV-viditelným detektorem pro detekci

acetanového extraktu z čaje. Pomocí FT-IR spektroskopie ve spojení s chemometrickými metodami lze tedy rychle stanovit chlorofyl a feofytin, což by mohlo poskytnout novou pomocnou metodu pro kontrolu kvality a monitorování procesů v průmyslu zeleného čaje [37].

1.4.2 Analýza E141 v oleji pomocí HPLC

Peréz-Galvéz a kol. (2015) použili k separaci a detekci měďnatého pyrofeofytinu *a* kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Pyrofeofytinu *a* je hlavní chlorofylový derivát, který je přítomný v potravinářském barvivu E141i, tedy směsi měďnatého chlorofylu. Jelikož jeho použití je v Evropě a Americe výjimečně zakázáno pro tuky a oleje, je jeho stanovení pomocí HPLC/MS rozhodující pro kontrolu falšování olivového oleje a také nezbytné pro detekci tohoto barviva v barvených potravinách. Strukturní přestavba měďnatého pyrofeofytinu *a* mění spektroskopické vlastnosti nativního chlorofylu, přičemž dochází k bathochromnímu a hypsochromnímu posunu. Kromě toho dochází také k modifikaci chromatografických vlastností. Všechny tyto vlastnosti umožňují předběžnou identifikaci měďnatého pyrofeofytinu *a* [39].

Chromatografická separace byla provedena pomocí elučního gradientu s mobilními fázemi (A) voda/1 M octan amonný ve vodě/methanol (1/1/8, v/v/v) a (B) methanol/aceton (1/1, v/v). Byla použita kolona z nerezové oceli s C18 částicemi a sekvenční detekce byla provedena pomocí detektoru s fotodiodovým polem při 430 nm. Co se týče hmotnostní spektrometrie, bylo použito APCI-MS v pozitivním režimu, což je technika měkké ionizace, která zabraňuje interferencím s matricí při FAB-MS a má zvýšenou citlivost pro analýzu stopových množství ve vzorcích [39].

1.4.3 Stanovení porfyrinů v bakteriích ústní dutiny

Biofilmy v ústní dutině lze vizualizovat pomocí fluorescence, kdy se předpokládá, že je způsobena endogenně produkovanými porfyriny u některých bakterií. Obsah porfyrinů v bakteriích v ústní dutině byl dosud zkoumán jen zřídka a často se používají neselektivní detekční techniky, jako je využití Soretova fluorescenčního pásu porfyrinů [40].

Fyrestam a kol. (2015) vyvinuli a ověřili kvantitativní a selektivní metodu stanovení porfyrinů v bakteriích ústní dutiny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byl použit program lineárního gradientu mobilní fáze (95 % acetonitril/5 % voda/0,1 % kyselina mravenčí (v/v/v)) (z 30 % na 50 % během prvních 10,0 min), následovaný lineárním zvyšováním mobilní fáze B až na 100 %. Detekce porfyrinů

byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem pro ionizaci v pozitivním módu (ESI+) a monitorováním vybraných reakcí (SRM) se třemi produktovými ionty specifickými pro každou sloučeninu porfyrinu. U ústních patogenů *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Porphyromonas gingivalis* a u pekařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byly identifikovány tyto porfyriny: uroporfyrin, 7-karboxylporfyrin, 6-karboxylporfyrin, koproporfyrin a protoporfyrin IX, přičemž bylo prokázáno, že porfyrinový profil se u jednotlivých zkoumaných mikroorganismů liší [40].

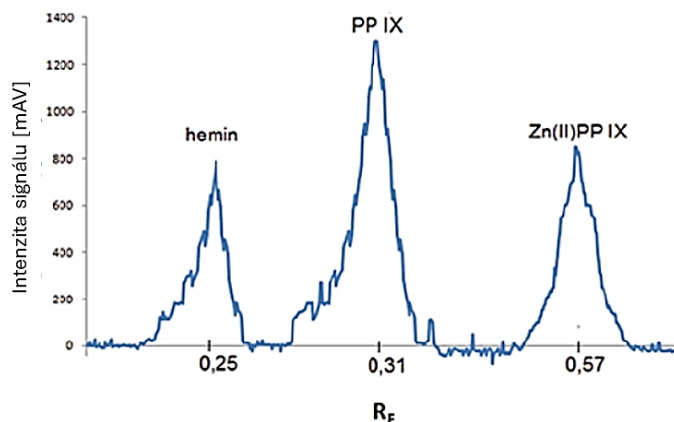
1.4.4 Stanovení porfyrinového pigmentu v parmské šunce

Bezpečnost potravin je nesmírně důležitá, avšak vedle tohoto aspektu jsou očekávání spotřebitelů, která jsou poměrně komplexní a zahrnují mnoho faktorů, jako je mimo jiné vzhled, chuť, vůně, původ atd. Právě tyto senzorycké aspekty jsou jedním z klíčových faktorů ovlivňujících nákupní chování spotřebitelů. Vzhledem k těmto dvěma (nesnadno splnitelným) cílům – bezpečnosti a smyslovým aspektům – je přítomnost chemických přísad v masných výrobcích obzvláště citlivou otázkou [41].

Dlouhou dobu byl nitrosylmyoglobin (vzniklý přidávkem dusitanu sodného (E250) a dusičnanu draselného (E252) do masných výrobků obsahujících myoglobin) považován za jedinou molekulu, která zajišťuje atraktivní červenou barvu zpracovaných masných výrobků. Přestože dusitany rovněž zvyšují trvanlivost a bezpečnost tematických masných výrobků, je jejich přídavek spíše považován za nežádoucí, neboť se podílejí na tvorbě karcinogenních N-nitrosaminů. V rozporu s tímto obecným přesvědčením bylo zjištěno, že červená barva parmské šunky (tradiční italské suché šunky) je způsobena červeným barvivotvorným pigmentem – zinečnatým protoporfyrinem IX (Zn(II)PPIX) [41].

Hannelore De Maere a kol. (2014) potvrdili výskyt nativního heminu, protoporfyrinu IX (PPIX) a zinečnatého protoporfyrinu IX (Zn(II)PPIX) ve vzorku parmské šunky, a to jednoduchou a rychlou metodu zahrnující tenkovrstvou chromatografií (TLC) s denzitometrickou detekcí (Obrázek 16), přičemž chromatogramy byly vyvíjeny s použitím čistého methanolu do vzdálenosti 15 cm. V průběhu vyvolávání chromatogramů byla chromatografická komora zabalena do hliníkové fólie za účelem ochrany chromatografických desek před přímým kontaktem se světlem. Poté byly desky sušeny, a nakonec vyhodnoceny pomocí denzitometrie. Koncentrační profily chromatografických zón byly zaznamenány ve fluorescenčním režimu s použitím rtuťové lampy při vlnové délce záření $\lambda = 400$ nm, tj. blízko maxim Soretova pásu pro všechny tři sledované porfyriny. Jako referenční metoda byla použita HPLC, přičemž

výsledky heminu a PPIX se u obou metod pohybovaly ve stejném číselném rozmezí, obsah Zn(II)PPIX byl v systému TLC o dva řády nižší než pomocí HPLC, což naznačuje mnohem vyšší rychlost rozkladu tohoto porfyrinu v TLC systému [41].



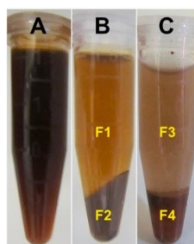
Obrázek 16: Typický densitogram extraktu parmské šunky se třemi separovanými porfyriny v něm obsažených. Převzato a upraveno z: [41].

1.4.5 Stanovení metaloporfyrinů (Fe, Ni a V) v ropě nechromatografickou metodou

Poprvé byly porfyriny nalezeny v ropných zbytcích německým chemikem Kellerem v roce 1879. Ten předložil fotografie absorpčních spekter extraktů z olejů, v nichž byly zaznamenány absorpční pásy těchto pigmentů, avšak jejich strukturu se mu objasnit nepodařilo [42]. Metaloporfyriny (V a Fe) v těžkých olejích poprvé popsal německý chemik A. Treibs v roce 1936 (1934 [42]) [43]. Jedná se o komplexy, které se nacházejí v rostlinách, bakteriích, řasách, chlorofylu, bakteriochlorofylu, hemových skupinách a příbuzných pigmentech původně přítomných v sedimentární organické hmotě, z níž vznikla fosilní paliva, přičemž během procesu zrání ropy dochází k dekarboxylačním a dehydrogenačním reakcím a nahrazování kovového centra porfyrinů [44] [45].

Tyto tak zvané petroporfyriny se využívají jako biomarkery, které si navzdory procesu zrání organické hmoty zachovávají tetrapyrrolové jádro svých prekurzorů, vykazují nízkou polydisperzitu, koncentraci a běžně se používají v geochemii k posouzení litologie ropy, oxidačně-redukčních podmínek, geotermálního zrání, konverze organické hmoty a hloubky uložení [46].

Luz a Oliveira (2019) pro separaci a stanovení porfyrinů Fe, Ni a V v ropě navrhli metodu kombinující ultracentrifugaci a extrakci v zákalu (CPE). Připravená emulze (surová ropa, Triton X-100™, chloroform a HCl) (Obrázek 17 A) se podrobila ultracentrifugaci a extrakci v zákalu (Obrázek 17 B, C), přičemž došlo k oddělení vrstvy (Obrázek 17 F4) porfyrinů, těžkých i lehkých organických sloučenin, lehkých organických látek a pevných částic. Ve vodné fázi (Obrázek 17F3) zůstaly pouze anorganické a iontové organokovové sloučeniny. Supernatant a vodná fáze byly následně analyzovány simultánní atomovou absorpční spektrometrií v grafitové peci (SIMAAS). Koncentrace stanovená v supernatantu byla odečtena od koncentrace stanovené ve vodné fázi, což umožnilo kvantifikovat Fe, Ni a V porfyrin v surovém vzorku. Přesnost navržené metody byla ověřena pomocí referenční metody SARA, kdy se frakce nasycených látek (S), aromatických látek (A), pryskyřic (R) a asfaltenuů (A) oddělují podle jejich rozpustnosti ve vhodných rozpouštědlech. Výsledky ukázaly, že přibližně 40 % Ni a 70 % V ve vzorku ropy je vázáno na porfyriny. Fe se ve frakcích aromatických látek a pryskyřic nevyskytovalo [45].



Obrázek 17: Emulze pro frakcionaci ropy: (A) výchozí emulze; (B) po ultracentrifugaci - (F1): rozpustné anorganické + rozpustné lehké organokovové + metaloporfyriny; - (F2): těžké organické + pevné částice; (C) po CPE - (F3): rozpustné anorganické + prvky slabě vázané na organické a (F4): kovy úzce vázané na organické + těžké organické + pevné částice + metaloporfyriny. Převzato z: [45].

1.5 Využití porfyrinů

1.5.1 Potravinářská barviva

1.5.1.1 E140 – chlorofyly a chlorofyliny

Jako potravinářské přídatné látky E140 jsou označovány chlorofyly a chlorofyliny. Toto potravinářské barvivo, zvané též jako přírodní zeleň [47] či „CI Natural Green 3“ [48], si získalo značnou pozornost díky svému přírodnímu původu a potenciálním zdravotním přínosům. Mezi hlavní zdroje E140 pro průmyslovou extrakci patří především řasy, špenát, petržel, vojtěška [47], kopřiva a další zelená listová zelenina – což jsou běžné složky lidské výživy [48].

Barva se může lišit od olivově zelené po tmavě zelenou, a to v závislosti na obsahu koordinovaného hořčíku, který se vztahuje k podílu chlorofylů *a* a *b* (obsahujících koordinovaný hořčík) a feofytinů *a* a *b* (bez koordinovaného hořčíku) v potravinářské přídatné látce [48].

Co se týče omezení používání tohoto barviva, Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) dospěl k závěru, že chlorofyly E140 jsou přirozené složky potravy, které jsou v řadě potravin přítomny v relativně vysokých koncentracích. Kromě toho je expozice vyplývající z používání E140 jako potravinářské přídatné látky nižší než expozice chlorofylům z běžné stravy. Závěr EFSA je, že při uváděných úrovních použití E140 nepředstavuje žádné bezpečnostní obavy, pokud jde o jeho současné používání jako potravinářské přídatné látky. Tato přídatná látka je povolena i v dětských potravinách, a to v rámci stanovených limitů [47] [48] [49] [50]. Také americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) uznává chlorofyly jako bezpečné pro použití v potravinách [49] [50].

Chlorofyly a chlorofyliny se používají k barvení polévek, omáček, olivového a sojového oleje, kečupů, limonád, dezertů, cukrovinek, likérů, různých pastilek (i žvýkaček) - zabraňují nepříjemnému pocitu v ústech. Pomocí nich se vyrábí také deodoranty, antiperspiranty, ústní vody apod. [47]. Přídavek chlorofylů a chlorofyllinů může být také alternativou při formulaci zrajících sýrů, především pro ošetření kůry během zrání [50].

1.5.1.2 E141 – měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů

Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů jsou označovány jako potravinářská přídatná látka E141. Komplexy mědi se tedy dělí na dva hlavní typy: E141(i) - chlorofyly a E141(ii) - chlorofylin. Hlavní rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že chlorofyly jsou rozpustné v oleji, zatímco chlorofylin je rozpustný ve vodě, což rozšiřuje jejich použití v různých potravinářských výrobcích [51]. Barva E141 může být v závislosti na zdroji od modrozelené až po tmavě zelenou [51] či olivově zelenou [52].

Panel EFSA pro potravinářské přídatné látky a zdroje živin přidávané do potravin, avšak ve své zprávě (z roku 2015) poznamenal, že název „měďnatý komplex chlorofylů“ je z chemického hlediska nesmyslný a měl by znít například jako „měďnatý komplex feofytinů“ [53], kdy feofytin je označení pro molekulu chlorofylu bez centrálního iontu Mg^{2+} [54]. Dále bylo zmíněno, že Cu-chlorofyly (E 141(i)) a Cu-chlorofylin (E 141(ii)) se získávají ze zdrojů, které nelze považovat za pro člověka jedlý rostlinný materiál nebo potravinu (tráva, vojtěška, kopřiva). Kromě toho nelze potravinářské přídatné látky Cu-chlorofyly E 141(i) a Cu-chlorofylin E 141(ii) vzhledem k jejich výrobnímu procesu považovat za přírodní sloučeniny [53], jelikož se získávají z přírodních zelených pigmentů, chlorofylů a chlorofinů, s následným nahrazením hořečnatého iontu měďnatým iontem [52], díky čemuž se sloučenina stává stabilnější, a to zejména vůči vystavení světla a tepla [51].

E 141 mají stejné použití jako chlorofyl (E 140), tzn. k barvení polévek, omáček, olivového a sójového oleje, kečupů, limonád, dezertů, cukrovinek, likérů a různých pastilek [52].

Bezpečnost přípravku E141 byla posouzena různými zdravotními orgány a orgány pro bezpečnost potravin. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) a Úřadu pro potraviny a léčiva Spojených států amerických (FDA) je E141 považován za bezpečný pro spotřebu v rámci regulovaných limitů. Pro zajištění bezpečnosti spotřebitelů, stanovily tyto úřady přijatelné denní dávky (ADI), a to $ADI = 15 \text{ mg/kg}$ (tělesné hmotnosti), přičemž E141 je bezpečný pro použití i v dětské výživě v rámci stanovených limitů [51].

1.5.2 Porfyriny jako detekční látky/sloučeniny

S využitím porfyrinů byla vyvinuta řada analytických metod pro stanovení organických sloučenin, jako například nukleové kyseliny, aminokyseliny a proteiny, sacharidy, fenoly a chlorofenoly, fenolové endokrinní sloučeniny, hormony, neiontové povrchově aktivní látky, fosfolipidy, uhlovodíky obsahující síru či výbušniny [55].

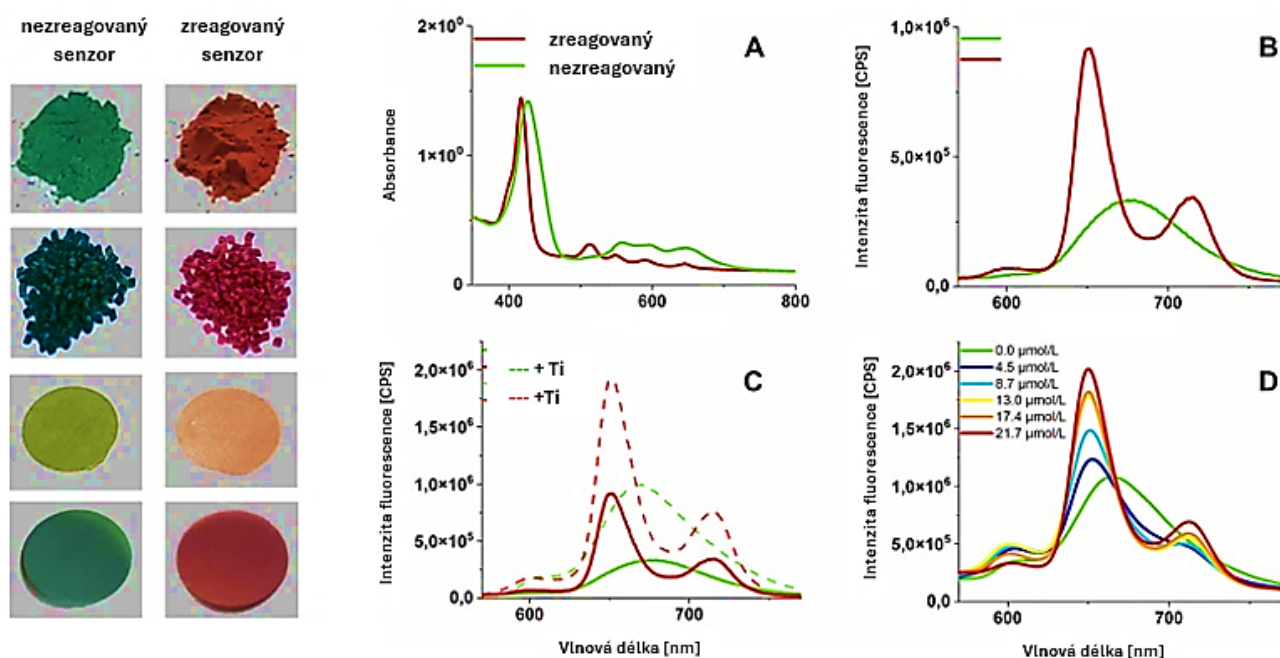
Porfyriny a jejich deriváty jsou nejsilněji světlo pohlcujícími materiály nejen v přírodě, proto je ultrafialově viditelná spektrofotometrie jednou z nejzákladnějších a zároveň nejinformativnějších spektroskopických metod v porfyrinové chemii, protože poskytuje informace o elektronické struktuře i chemických vlastnostech molekul i při velmi nízkých koncentracích [55]. Mimo jiné díky této vlastnosti se jedná o zajímavé molekuly vhodné pro optické senzory, a tak jsou široce používány jako sensorové materiály, katalyzátory, elektrochemické senzory, fotosenzitizátory (například pro opticky řízené uvolňování léčiv), pole senzorů s umělýmnosem, jakož i pro širokou škálu základních senzorů, jako jsou indikátory pH [56].

Kromě toho se porfyriny ve filmech a membránách široce používají pro detekci plynů: např. kyslíku, oxidů dusíku, oxidu uhelnatého, oxidu uhličitého, chlorovodíku a amoniaku. Současně lze provádět i stanovení kyslíku a oxidu uhličitého, kyslíku a teploty a kyslíku a peroxidu vodíku [55].

1.5.2.1 Sensorové filmy pro sledování kažení potravin

Pro zvýšení bezpečnosti potravin a minimalizaci plýtvání potravinami je pro potravinářský průmysl i spotřebitele zajímavé, aby bylo možné průběžně a nedestruktivně zjišťovat kazivost potravin. Při rozkladu potravin živočišného původu se uvolňují aminy jako produkty rozkladu bílkovin, které by mohly být využity ke sledování čerstvosti masa a ryb [56].

Altmann a kol. (2023) vyvinuli nový, citlivý a ekonomický biosenzor, který je schopen detekovat mikromolární množství aminů v plynné fázi. Jedná se o sensorovou fólii na bázi porfyrinů zaměřenou na detekci biogenních aminů. Senzor-porfyrin je vytvořen na mesoporézním oxidu křemičitém, který je zalitý v polyethylenu (PE), čímž se eliminovala reaktivita vůči mírné vlhkosti. Po vystavení aminům změní sensorová PE fólie nevratně svou barvu ze zelené na červenou (Obrázek 18), což je doprovázeno výrazným posunem fluorescenčního spektra. Tato detekovaná fluorescenční emise byla zvýšena částicemi oxidu titaničitého ve fólii [56].



Obrázek 18: 1) Různé fáze výroby sensorové fólie; 2) Spektra nezreagovaný a zreagovaný sensorových fólií: A) UV-Vis spektra, B) Fluorescenční emisní spektra, C) Fluorescenční emisní spektra (s (T) a bez příměsi TiO₂), D) Fluorescenční emisní spektra (s TiO₂-aditivem) po expozici daným množstvím triethylaminu. Převzato a upraveno z: [56].

1.5.2.2 Selektivní papírové analytické zařízení pro stanovení mědi (II)

Měď je jedním z několika stopových kovů, které jsou pro život nezbytné. V živých systémech hraje důležitou roli jako katalyzátor a/nebo kofaktor enzymů, buněčného metabolismu, přenosu kyslíku, redoxních reakcí a dalších procesů. Avšak abnormálně vysoké hladiny mědi jsou spojovány s řadou onemocnění, včetně neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba a prionová onemocnění. Vzhledem k tomu, že měď je v zemské kůře rozšířena všudypřítomně (~20 mg/kg), stanovila Světová zdravotnická organizace (WHO) a americká Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) maximální úroveň kontaminace mědi v pitné vodě na 2 mg/l, resp. 1,3 mg/l. Proto je monitorování Cu²⁺ ve vodných médiích, vzhledem k hojnému výskytu mědi v životním prostředí, průmyslu a zemědělství, důležité pro kontrolu potenciální chronické expozice [57].

Co se týče významu porfyrinů v této oblasti, jejich strukturní i spektroskopické a elektronické efekty, způsobené metalizací s volnou bází, umožňují vysoce citlivou detekci iontů kovů (10^{-7} - 10^{-5} M), a to především spektrofotometrickými, elektrochemickými nebo chromatografickými metodami [55].

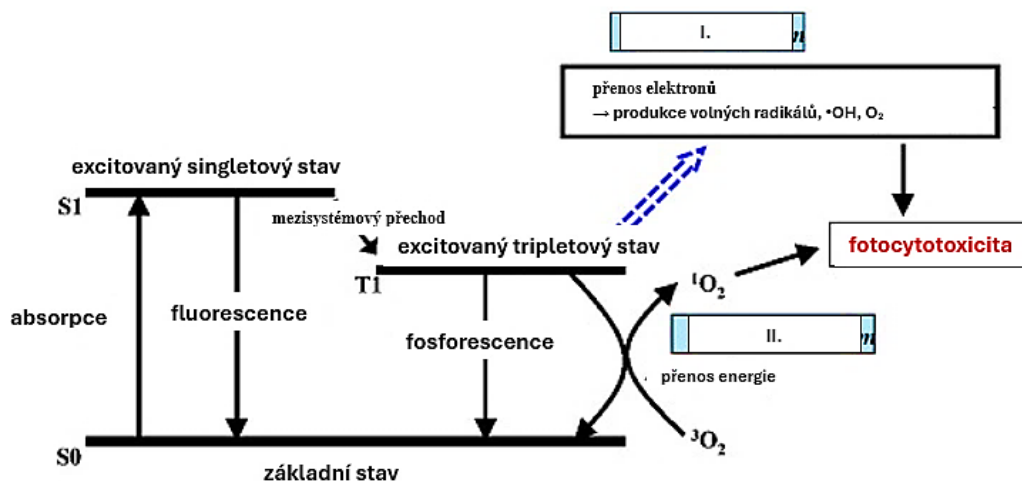
Pratiwi a kol. (2017) syntetizovali nový, ve vodě rozpustný derivát porfyriu (TDMPzP), který byl použit jako kolorimetrické činidlo pro detekci Cu^{2+} na mikrofluidním analytickém zařízení na bázi papíru (μPAD) s využitím kvantifikace na základě vzdálenosti. Kolorimetrická metoda, využívající specifická činidla k identifikaci a kvantifikaci analytů na základě intenzity barvy, je jedním z nejběžnějších detekčních motivů používaných v μPAD . Při detekci na základě vzdálenosti se kolorimetrické činidlo přidává podél kanálu, a jak analyt proudí kanálem, reaguje s činidlem, což způsobuje změnu barvy. V tomto případě byla po přidání Cu^{2+} k TDMPzP za kyselých podmínek (pH 2-4) pouhým okem pozorována změna barvy ze zelené na růžovou, přičemž nejnižší koncentrace mědi, kterou bylo možné změřit, byla 1 mg/l (1 ppm), což splňuje požadavky předpisů pro kontaminaci pitné vody podle americké Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) a směrnic Světové zdravotnické organizace (WHO) pro pitnou vodu. Pro potvrzení praktického použití tohoto systému byly analyzovány roztoky s případnými rušivými ionty a skutečné vzorky pitné vody, přičemž výsledky ukázaly dobrou shodu s údaji ICP-MS. Tento μPAD založený na vzdálenosti TDMPzP pro detekci Cu^{2+} je tedy vhodný a účinný pro analýzu pitné vody v reálném čase [57].

1.5.3 Antibakteriální fotodynamická terapie

Při antibakteriální fotodynamické terapii (aPDT) se využívá fotodynamické inhibice (PDI), což je neantibiotický proces, který způsobuje apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt, v přítomnosti fotosenzibilizujících léčiv, světelné energie vhodné vlnové délky a molekulárního kyslíku. Fotodynamická inhibice se tradičně používá proti rakovině u zhoubných i nezhoubných nádorů, přičemž návrh na využití PDI k destrukci mikrobů se stal skutečností v polovině 90. let 20. století, a to na základě podobné rychlosti replikace maligních a bakteriálních buněk [58] [59].

Při aPDT je fotosenzitizér (PS), tedy v tomto případě porfyrin, přidán k bakteriálnímu vzorku a tato směs se ozáří viditelným světlem o vlnové délce, která způsobí excitaci PS do singletového excitovaného stavu, který je nestabilní a trvá méně než 1 μs . Do základního stavu se může vrátit emisí sekundárního fotonu ve formě fluorescence. Singletový stav prochází mezisystémovým přechodem do excitovaného tripletového stavu, což vyvolává terapeutický účinek [58].

Tyto chemické změny v bakteriální buňce mohou být vyvolány dvěma konkurenčními cestami, nazvanými reakce typu I. a typu II. Podle níže znázorněnému mechanismu (Obrázek 19) vznikají při reakci typu I. volné radikály, zatímco reakce typu II., která vyžaduje přenos energie z tripletového stavu do singletového, vede k produkci O_2 . Všechny tyto reaktivní formy mohou vyvolat nevratné cílené poškození rakovinných buněk nebo mikrobiálního organismu, přičemž nepoškozují ostatní sousední zdravé buňky kvůli jejich omezené difúzi ve vodním prostředí [12] [58] [59].



Obrázek 19: Generování excitovaných stavů a reaktivních forem kyslíku (ROS).
Převzato a upraveno z: [60].

Definitivním aspektem PDI je tedy produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou pro buňky škodlivé. Patří mezi ně superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylové radikály ($HO\bullet$) a hydroperoxylové radikály ($HOO\bullet$). ROS pak způsobují oxidaci biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny v buňce, přičemž v případě mikrobiálních buněk jsou buněčné stěny narušeny do té míry, že dochází k úniku základních složek, jako je DNA [59].

1.6 Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie

Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie, zkráceně 2D-LC, je založena především na použití dvou ortogonálních (komplementárních) separačních mechanismů kapalinových chromatografií pro analýzu jednoho vzorku, aby se zvýšila separační schopnost. Vzorek se nadávkuje do první kolony (do prvního rozměru) (1D) a poté se jedna nebo více frakcí eluentu z 1D převede do druhé kolony (do druhého rozměru) (2D), kde se podrobí další separaci. Tímto způsobem mohou být sloučeniny, které nemohly být separovány v retenčním mechanismu 1D, rozlišeny v separaci 2D [61] [62] [63].

1.6.1 SeparáčnÍ režimy 2D-LC

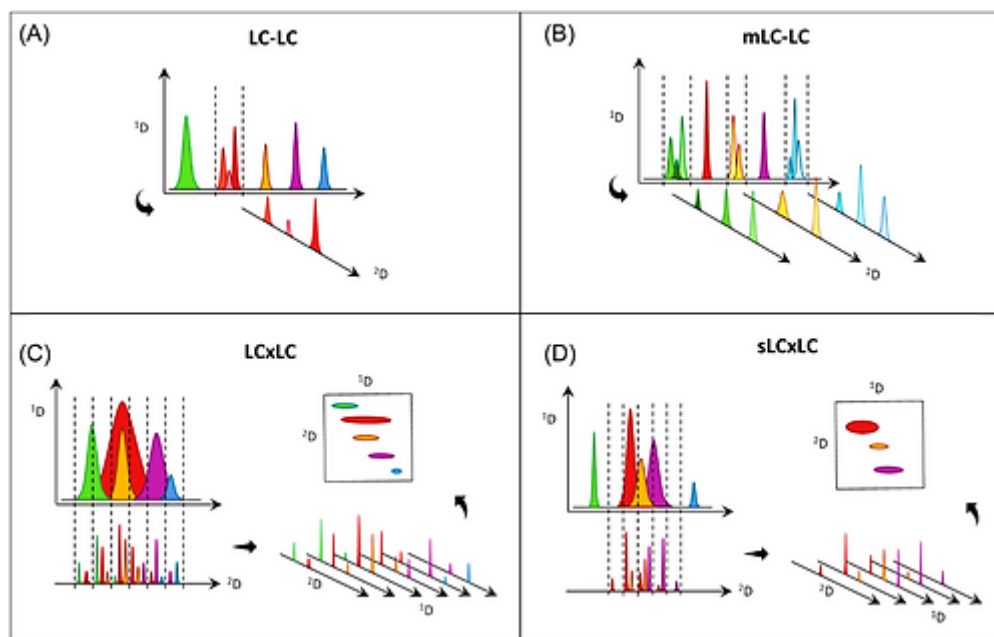
1.6.1.1 Off-line režim vs. on-line režim vs. stop-flow režim

2D-LC zahrnuje dvě po sobě jdoucí fáze chromatografické separace, které lze provádět „off-line“, „on-line“ [64] [65] či mezisystémem zvaným „stop-and-go“ [63] či „stop-flow“ [66]. V režimu „off-line“ je provedení velmi jednoduché, jelikož frakce mobilní fáze z první kolony se shromažďují, poté se v případě potřeby zahušťují a znovu se dávkuje do druhé kolony. Tato metoda však může být časově náročná, obtížně automatizovatelná a reprodukovatelná, náchylná ke ztrátě vzorku a kontaminaci. V režimu „on-line“ jsou kolony v obou rozměrech propojeny prostřednictvím vhodného rozhraní. Tento přístup je náročnější na implementaci a obsluhu, je však rychlejší a reprodukovatelnější [65]. Mezistupeň mezi off-line a on-line přístupem je známý jako „stop-and-go“. V tomto systému je průtok 1D zastaven, zatímco je shromážděná frakce převáděna do 2D kolony, a průtok 1D je obnoven až po ukončení 2D analýzy. Naopak, když probíhá 1D, průtok ve 2D koloně je zastaven. Výhodou tohoto přístupu je možnost použití vysokých průtoků v 1D i pomalých separací ve 2D [63] [67].

1.6.1.2 Heart-cutting režim vs. komplexní režim

Dvourozměrnou separaci lze provést buď přenosem pouze zkoumané části prvního rozměru, což se označuje jako chromatografie v režimu „heart-cutting“; nebo postupným přenosem celého objemu eluátu prvního rozměru v mnoha malých alikvotech do druhého rozměru; tento postup se označuje jako „komplexní“ chromatografie (comprehensive LC) [65].

Tyto dva základní režimy mohou být dále děleny na podrežimy, díky čemuž může být tedy online separace 2D-LC provedena čtyřmi separačními režimy (Obrázek 20): single heart-cutting (LC-LC), vícenásobný heart-cutting (mLC-LC), úplný komplexní režim (LCxLC) a selektivní komplexní režim (sLCxLC) [64] [68].



Obrázek 20: Schematické znázornění různých technik 2D-LC a jejich hybridních implementací. (A) Heart-cutting (LC-LC); (B) Vícenásobná heart-cutting (mLC-LC); (C) Komplexní (LCxLC); (D) Selektivní komplexní (sLCxLC). Převzato z: [63].

Režimy single heart-cutting (LC-LC) a multiple heart-cutting (mLC-LC) zahrnují přenos jedné frakce nebo několika frakcí mobilní fáze z kolony 1D do kolony 2D pro další separaci. Úplně komplexní (LCxLC) a selektivní komplexní (sLCxLC) režimy jsou, na rozdíl od režimů heart-cutting, holistické přístupy, které spočívají v odběru vzorku buď celého, nebo omezené části mobilní fáze 1D v malých objemech, které jsou pravidelně zasílány k separaci 2D [64].

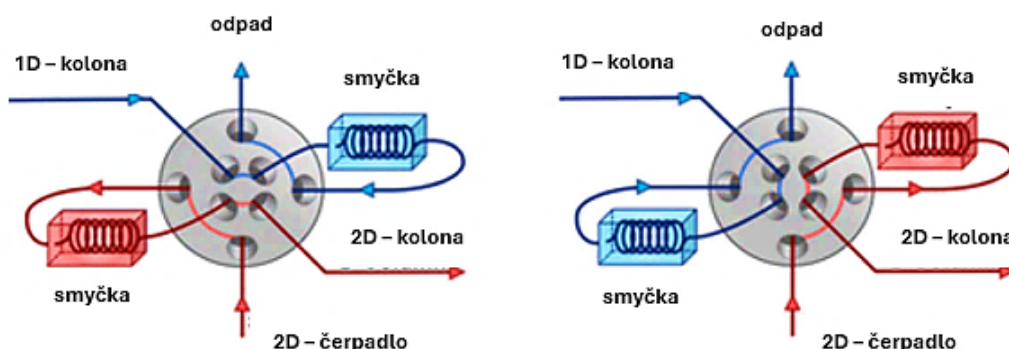
1.6.2 Modulace

Modulátor je hlavní součástí modulačního procesu a je zodpovědný za periodický převod shromážděné frakce z 1D do 2D. Každý modulační cyklus zahrnuje tři kroky, včetně izolace frakce, sběru a převodu 1D eluentů do 2D kolony. Jedním z klíčových faktorů úspěšného modulačního procesu je, zda lze převáděné frakce dobře separovat ve 2D [69].

1.6.2.1 Jednoduchá „pasivní“ modulace založená na ventilech

Při jednoduché ventilové modulaci (tvz. pasivní [62]) jsou frakce z 1D mobilní fáze často přímo dávkovány pomocí vzorkovacích smyček do 2D kolony [69], přičemž se jedná o celý eluent, jehož objem či koncentrace analytů nebyly změněny [70]. Modulátor má proto poměrně jednoduchou strukturu (Obrázek 21) – realizuje se připojením jednoho nebo více ventilů pomocí vzorkovacích smyček a ocelových kapilár. Výtok z 1D kolony se tak shromažďuje

vzorkovací smyčkou a poté se přepínáním dvoupolohového elektronického ventilu převádí do 2D kolony [69].



Obrázek 21: Obecné schéma pasivně-modulačního rozhraní – osmiportový ventil. Převzato a upraveno z: [62].

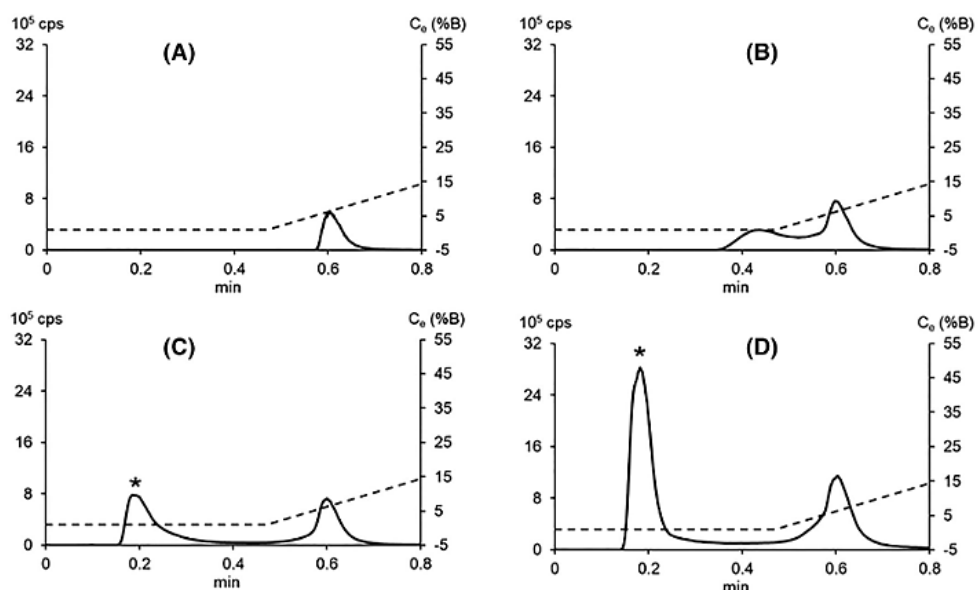
1.6.2.2 Modulace ventilů pomocí asistenční technologie

Velké úsilí je věnováno hledání mechanismů, které optimalizují fokusaci analytů a/nebo minimalizují odpad eluátu z 1D na 2D separaci. Doposud bylo ve 2D-LC systémech použito několik metod předúpravy, včetně ředění či dělení, odsolování, zachycování pomocí záchytných kolon a odpařování pomocí vakua. Ve srovnání s jednoduchou modulací jsou modulátory určené pro modulaci pomocí asistenční technologie složitější, kdy podle rozdílu složitosti lze uváděné modulátory rozdělit do dvou kategorií: systémy s jedním ventilem a systémy s více ventily. Proces předúpravy při modulaci s jedním ventilem je poměrně jednoduchý, jelikož ve většině případů se jedná pouze o přidání třetího čerpadla, které vytváří doplňující průtok [69].

1.6.3 Pokroky v oblasti modulačních technik

Jeden z nejvíce limitujících problémů LCxLC je spojen s nástřikem v druhém rozměru. Injekční rozpouštědlo je často mnohem silnější než mobilní fáze, zatímco dávkovaný objem je obvykle mnohem větší než u jednorozměrné kapalinové chromatografie (1D-LC) [71]. Tato nekompatibilita související se silou rozpouštědel může vést k deformovaným tvarům píků včetně jejich rozšíření, zkrácení a rozdělení, ke ztrátě rozlišení či citlivosti ve druhém rozměru. Proto se jedná o jednu z hlavních překážek mezi systémy rozpouštědel používanými v prvním a druhém rozměru [72].

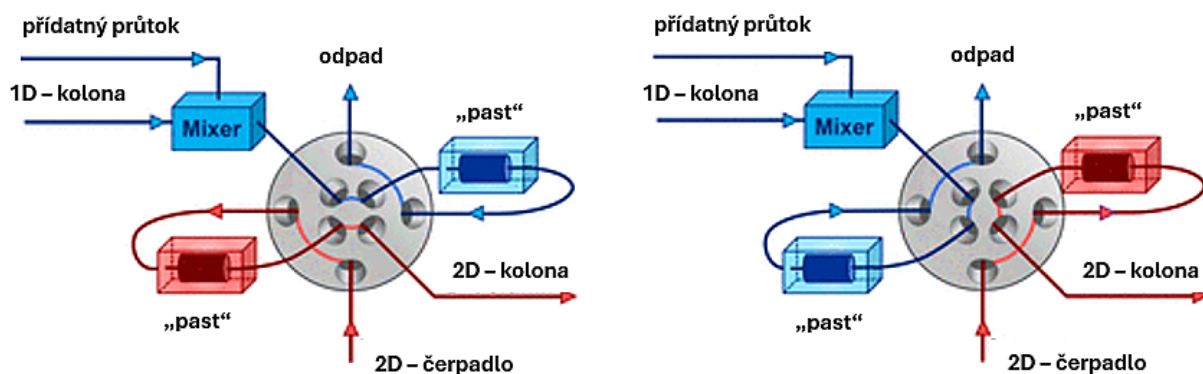
V některých případech dochází také k výskytu tzv. průlomového jevu (breakthrough phenomenon). K tomuto jevu dochází u dané sloučeniny, kdy je vstříkovaný objem tak velký, že část molekul eluuje s píkem rozpouštědla, zatímco druhá část opouští vstříkované rozpouštědlo, je zadržováno na koloně a poskytuje pík s dlouhým předním chvostem (Obrázek 22). Kromě zadržovaného píku se tak eluuje průlomový pík v blízkosti mrtvého času kolony [71] [73].



Obrázek 22: Možné tvary píků v důsledku nesouladu síly rozpouštědla. Objemy vzorku kyseliny salicylové vstříknuté do RPLC se silným injekčním rozpouštědlem (50% ACN): (A) 0,7 μ l; (B) 2,1 μ l; (C) 3,4 μ l; (D) 13 μ l. Průlomový pík je označen hvězdičkou. Převzato a upraveno z: [73].

1.6.3.1 Stacionární fázově asistovaná modulace (SPAM)

Techniku SPAM poprvé demonstrovali Vonk a spol. (2015), přičemž se jedná o stále populárnější strategii aktivní modulace, která spočívá v použití nízkoobjemových záchytných (nebo „obohacovacích“) kolon, často označovaných jednoduše jako „pasti“ (trap columns), namísto velkých zásobních smyček (Obrázek 23). Vonk a spol. propojili tento aktivně modulovaný systém s nanoelektrosprejovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením pro separaci tryptických peptidů směsi šesti proteinů a pro analýzu celého proteomu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledkem 24hodinové analýzy bylo vygenerování přibližně 20000 MS/MS spekter, což vedlo k identifikaci 701 proteinů [70].



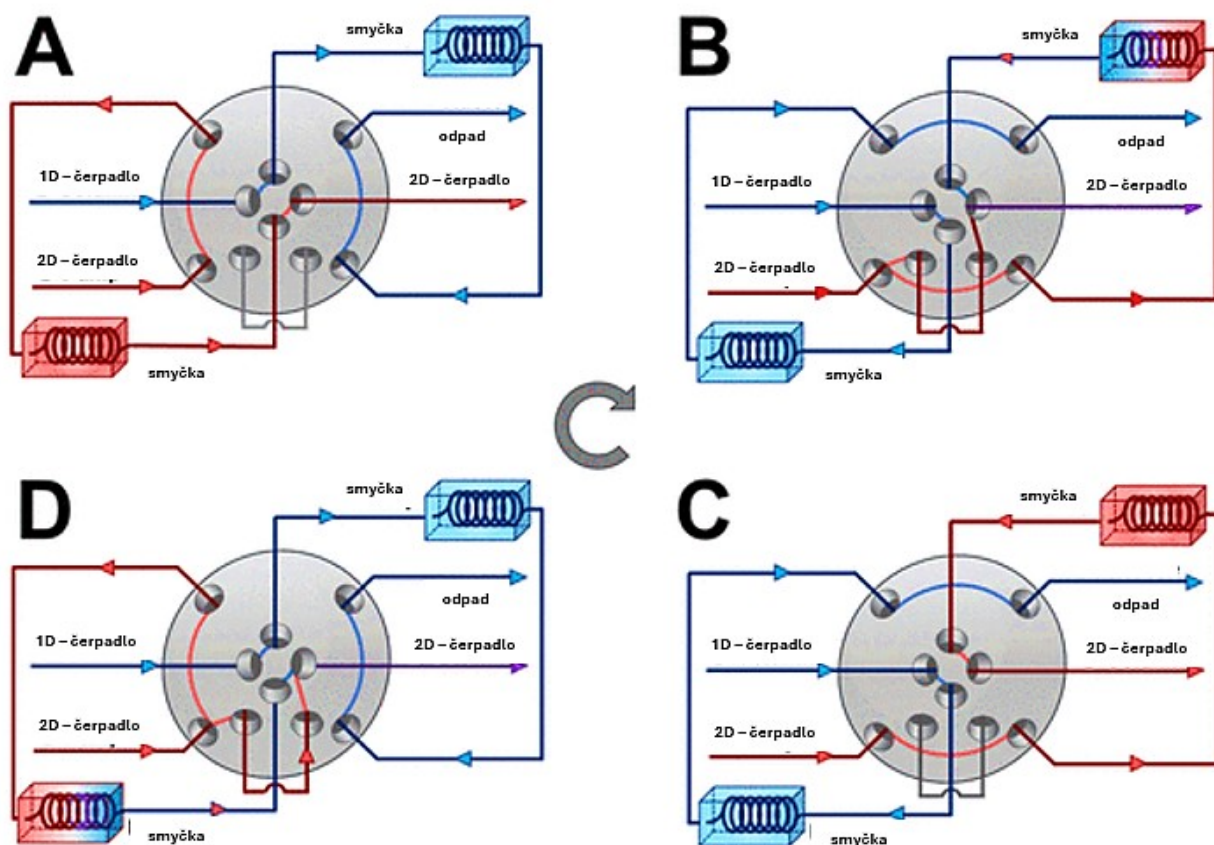
Obrázek 23: Schéma dvou poloh rozhraní stacionární fázově asistované modulační (SPAM).
Převzato a upraveno z: [62].

Jedná se o to, že 1D eluát je vzorkován modulátorem, přičemž se předpokládá, že analyty jsou zadržovány stacionární fází v pastech, zatímco rozpouštědlo prochází nezadrženo a opouští 1D chromatografický systém. Po přepnutí ventilu eluuje 2D mobilní fáze (gradientní program) zachycené analyty jako ostré, koncentrované pásy a zavádí je do kolony druhé dimenze [62].

Mezi výhody SPAM patří i) snížení problémů s nekompatibilitou rozpouštědel, jelikož dochází k odstranění většiny 1D mobilní fáze, ii) zlepšení citlivosti detekce v důsledku koncentrace analytu na zachytných kolonách, iii) snížení 2D injekčních objemů, což umožňuje použití krátkých 2D kolon bez ztráty účinnosti, a výrazně zkracuje celkovou dobu analýzy. Je nezbytné, aby všechny analyty z 1D frakce byly dostatečně zadržovány (a to po celou dobu trvání modulační), aby nedošlo ke ztrátě analytů, a aby se zabránilo diskriminačním účinkům. To může být náročné, pokud mají různé analyty značně odlišné chemické vlastnosti a ředící rozpouštědlo nemusí vždy zajistit úplné zachycení všech analytů [62].

1.6.3.2 Modulátor s aktivním rozpouštědlem (ASM)

Stoll a kol. (2017) představili přístup aktivní modulační rozpouštědlem (ASM) (Obrázek 24). Tento přístup umožňuje ředění 1D výtoku slabým rozpouštědlem před přenosem do 2D kolony, a to bez potřeby dalšího přístrojového vybavení. ASM je příbuzný konceptu tzv. pevné modulační rozpouštědlem (FSM), avšak důležitým rozdílem mezi těmito modulačními je to, že ASM umožňuje přepínání proudu slabé mobilní fáze během každého 2D separačního cyklu, což je jedna z výhod, kterou tato modulační, oproti FSM, poskytuje [72].



Obrázek 24: Schéma aktivní modulace rozpouštědla (ASM) pro spojení dvou dimenzí separace v systému 2D-LC. Převzato a upraveno z: [62].

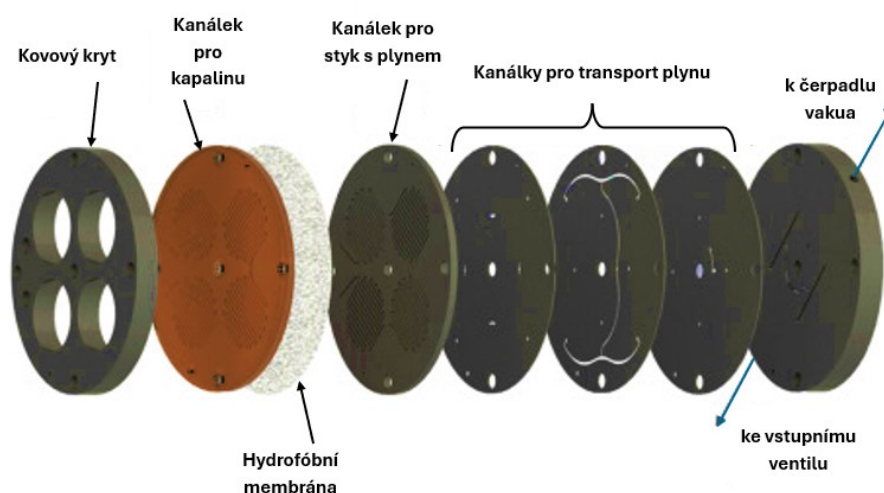
Výše zobrazený ventil má osm portů a čtyři polohy. Polohy A a C jsou funkčně shodné s polohami běžného osmiportového nebo desetiportového dvupolohového ventilu (Obrázek 21). V polohách B a D je však část průtoku z 2D čerpadla rozdělena a prochází obtokovou kapilárou. Tato část toku se připojí k proudu kapaliny vystupující ze smyčky vzorku předtím, než směs opustí ventil a vstoupí do 2D kolony. Tímto způsobem tato rozdělená část 2D toku ředí sebranou 1D frakci mobilní fázi ve 2D [62].

Přínos tohoto přístupu lze nejlépe ocenit na chromatografických příkladech. Jednou z nejnovějších prací, kde byla tato modulace využita, byla práce Stolla a kol. (2018), ve které použili ASM k účinnému spojení HILIC a RP pro separaci proteinů ve formátu online LC×LC, což je jinak poměrně obtížné kvůli nesouladu mezi silou rozpouštědla a podmínkami obvykle používanými pro tyto dva separační režimy [74]. Dále byla ASM zavedena pro separaci peptidů pomocí mLc-LC s RP separací v obou rozměrech, kvantitativní stanovení cílových molekul v polymerních maticích a separaci vitaminů rozpustných ve vodě a v tucích pomocí sLC×LC s využitím HILIC a RP separací [62].

1.6.3.3 Odpařovací membránový modulátor (EMM)

Fornells a kol. (2018) vyvinuli odpařovací membránový modulátor, který umožňuje o snížení objemu po 1D eluci on-line o předem stanovený faktor bez ohledu na separační gradient. Tato redukce objemu zajišťuje, že objem nástřiku ve 2D je vhodný pro druhou kolonu, čímž se zabrání účinkům přetížení 2D kolony. Kromě toho je složení rozpouštědla frakce konstantní po celou dobu separace, což zvyšuje reprodukovatelnost 2D separací [75].

Odpařovací modul (Obrázek 25) se skládá z hydrofobní polytetrafluorethylenové (PTFE) membrány umístěné mezi kapalinovým a plynovým kanálem. Horní kovový povrch má vstupní a výstupní armatury a čtyři velké otvory, umístěné přímo nad kanálem pro kapalinu, pro čtyři infračervené LED diody používané jako zdroj tepla pro odpařování kapaliny [75].



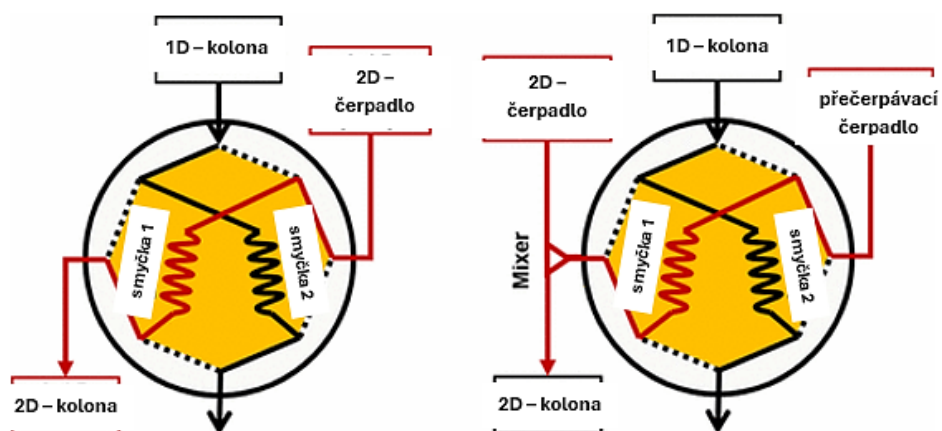
Obrázek 25: Jednotlivé vrstvy odpařovacího modulátoru s membránou. Převzato a upraveno z: [75].

1.6.3.4 Modulátor ředění na koloně (ve sloupci) (ACD)

Chen a kol. (2019) modifikovali běžné dvourozměrné rozhraní přidáním přečerpávacím čerpadlem, které realizuje ředění v koloně bez rozdělení průtoku během modulace. Ve srovnání s metodami ASM a FSM tato modulace umožňuje řízení přenosového toku a gradientového toku ve druhém rozměru, díky čemuž je možné přesně regulovat faktor ředění v koloně a pohodlně optimalizovat separační podmínky v obou rozměrech [76].

Ve srovnání s nastavením standardního dvourozměrného systému bylo pro přenos frakcí přidáno přečerpávací čerpadlo (Obrázek 26). Po této úpravě druhé binární gradientové čerpadlo již nečerpe mobilní fázi smyčkou pro vzorek, ale na místo toho se přenášena frakce a gradientový tok spojily pomocí T-konektoru a poté protékaly směšovačem, než dosáhly druhé

kolony. Přepnutím ventilu se přenášená frakce spojí se slabým elučním rozpouštědlem z druhého gradientového čerpadla ve směšovači, čímž se realizuje zakoncentrování na koloně [76].



Obrázek 26: Schéma systému $LC \times LC$ s tradičním standardním modulátorem (vlevo) a modulátorem s řaděním na koloně (ACD) (vpravo). Převzato a upraveno z: [76]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

- Kapalinový chromatograf - kompaktní modulární systém HPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
 - Autosampler [G7129B] (DEBA901196)
 - Termostat kolon [G7130A] (DEBA901196)
 - Čerpadlo mobilní fáze – první dimenze [G1312B] (DEACB10451)
 - Čerpadlo mobilní fáze – druhá dimenze [G7120A] (DEBAY01244)
 - Vícenásobný heart-cutting režim
 - Přepínací ventil A [G1170A] (DEBAD09382)
 - Přepínací ventil B [G1170A] (DEBAD09393)
 - Přepínací 2D ventil s ASM [G1170A] (DEBAD0228)
 - UV/VIS detektor [G7114B] (DEBAU00501)
 - Koncentrační smyčky – objem 40 μ l [G4242 – 64000]
- Kolony: Tabulka 3
- Analytické digitální váhy Sartorius (SARTALEX, spol. s r.o., Ústí nad Labem, ČR)

Tabulka 3: Kolony

č.	Název	Výrobce	Rozměry [mm]	Velikost částic [μ m]	Mobilní fáze	Použití [1D/2D]
1	Luna [®] C18 (00F-4251-Y0)	Phenomenex, Torrance, CA, USA	150 x 3	3	redestilovaná voda/acetonitril	1D
2	Kinetex F5 (00D-4723-AN)	Phenomenex, Torrance, CA, USA	100 x 2,1	2,6	redestilovaná voda/acetonitril; redestilovaná voda/methanol	1D
3	Arion [®] Biphenyl (ARI-5868-II21)	Chromservis, Praha, ČR	100 x 2,1	3	redestilovaná voda/acetonitril	1D

Tabulka 3: Kolony – pokračování

č.	Název	Výrobce	Rozměry [mm]	Velikost částic [μm]	Mobilní fáze	Použití [1D/2D]
4	Kinetex® Biphenyl (00B-4622-E0)	Phenomenex, Torrance, CA, USA	50 x 4,6	2,6	redestilovaná voda/acetonitril	2D
5	Raptor Biphenyl (9309A3E)	RESTEK, Bellefonte, PA, USA	30 x 3	2,7	redestilovaná voda/acetonitril	2D

2.2 Chemikálie

2.2.1 Mobilní fáze

- Redestilovaná voda – voda čištěná zařízením Milli-Q Reference (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- Acetonitril LC-MS CHROMASOLV (Merck Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- Methanol LC-MS CHROMASOLV (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)

2.2.2 Alkylbenzeny + aceton

- Benzen (C₆H₆)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 78,11 g/mol
 - CAS: 71-43-2
- Toluen (C₆H₅CH₃)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 92,14 g/mol
 - CAS: 108-88-3
- Ethylbenzen (C₆H₅C₂H₅)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 106,17 g/mol
 - CAS: 100-41-4

- Propylbenzen ($C_6H_5CH_2CH_2CH_3$)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 120,19 g/mol
 - CAS: 103-65-1

- Butylbenzen ($C_6H_5(CH_2)_3CH_3$)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 134,22 g/mol
 - CAS: 104-51-8

- Amylbenzen ($C_6H_5(CH_2)_4CH_3$)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 148,24 g/mol
 - CAS: 538-68-1

- Aceton (CH_3COCH_3)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 58,08 g/mol
 - CAS: 67-64-1

2.2.3 Standardy

- sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$)
 - Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA)
 - molekulová hmotnost: 724,15 g/mol
 - CAS: 11006-34-1

- Chlorin e4 ($C_{33}H_{36}N_4O_4$)
 - Frontier Scientific (Frontier Scientific Inc, Newark, DE, USA)
 - molekulová hmotnost: 552,663 g/mol
 - CAS: 550-52-7

- Chlorin e6 ($C_{34}H_{36}N_4O_6$)
 - Frontier Scientific (Frontier Scientific Inc, Newark, DE, USA)
 - molekulová hmotnost: 596,673 g/mol
 - CAS: 19660-77-6

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava standardů

Standard sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu byl připraven do 1,5 ml skleněné vialky, a to navážením 10,3 mg této soli a napipetováním 1 ml redestilované vody (výsledná přibližná koncentrace: 10,3 mg/ml). Standardy Chlorinu e4 a Chlorinu e6 byly připraveny navážením 1 mg standardů do samostatných 1,5 ml skleněných vialek s 1 ml redestilované vody (výsledné přibližné koncentrace: 1 mg/ml). Takto připravené standardy byly použity pro HPLC analýzy, a to jak v klasickém, tak i ve dvoudimenzionálním módu.

2.3.2 Příprava směsi alkylbenzenů

Testovací směs alkylbenzenů pro byla připravena napipetováním 10 μ l jednotlivých alkylbenzenů (benzen (B); toluen (mB); ethylbenzen (eB); propylbenzen (pB); butylbenzen (bB); amylbenzen (aB)) a 30 μ l acetonu do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna acetonitrilem po rysku. Pro účely analýzy bylo následně napipetováno do skleněné 1,5 ml vialky 800 μ l této směsi a 200 μ l redestilované vody. Takto připravená směs byla použita pro HPLC analýzy v jednorozměrném módu.

2.4 Podmínky měření

2.4.1 Stanovení zpoždění gradientu

Zpoždění gradientu bylo stanovováno za použití mobilní fáze: redestilovaná voda (A)/0,2% aceton v redestilované vodě (B). Byly proměřovány následující tři průtoky: 0,06 ml/min; 0,2 ml/min; 0,4 ml/min, a to s koncentračním gradientem mobilní fáze viz Tabulka 4, a to při vlnové délce 280 nm.

Tabulka 4: Zpoždění gradientu – koncentrační gradient

ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
1	100	0
5	0	100
9	0	100
10	100	0
11 - STOP		
+ 5 (post-time)		

2.4.2 Jednorozměrná analýza HPLC

Analýzy směsi alkylbenzenů a standardů probíhaly na různých typech kolon, které jsou uvedeny v Tabulka 3:1D. Jako mobilní fáze byla použita redestilovaná voda (A)/acetonitril (B), v případě kolony č. 2 byla testována i mobilní fáze ve složení redestilovaná voda (A)/methanol (B). Co se týče analýz standardů, na kolony byly aplikovány různé koncentrace mobilních fází, a to v rámci tří koncentračních gradientů (Tabulka 5-6). Pro směs alkylbenzenů byl použit jak mód izokratický (mobilní fáze = 90 % (v/v) acetonitril/voda, doba analýzy: 15 minut pro kolony č. 1 a 3; mobilní fáze = 60 % (v/v) acetonitril (methanol) /voda, doba analýzy: 15 minut pro kolonu č. 2), tak i mód s koncentračním gradientem (Tabulka 8). Co se týče průtoků mobilní fáze, na koloně č. 1 byl 0,4 ml/min, a na kolonách č. 2 a 3 byl 0,13 ml/min. Dávkované množství vzorků bylo 5 μ l. Teplota termostatu kolon během analýzy byla 30 °C. Standardy byly proměřeny při vlnových délkách 280 a 400 nm, směs alkylbenzenů pouze při vlnové délce 280 nm.

Tabulka 5: Standardy: I. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.

I. koncentrační gradient		
ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
30	0	100
35	0	100
36	95	5
40 - STOP		

Tabulka 6: Standardy: II. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.

II. koncentrační gradient		
ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
20	0	100
25	0	100
26	95	5
30 - STOP		

Tabulka 7: Standardy: III. koncentrační gradient pro klasickou HPLC.

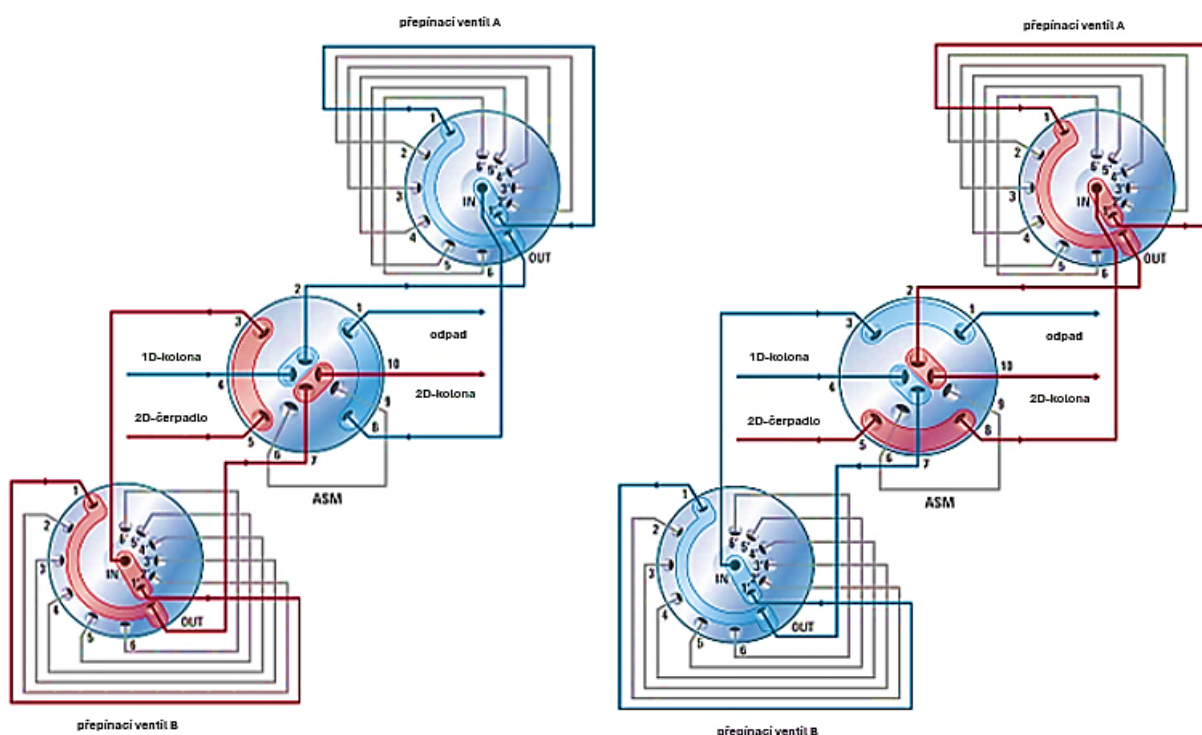
III. koncentrační gradient		
ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	85	15
30	0	100
35	0	100
36	85	15
40 - STOP		

Tabulka 8: Směs alkylbenzenů – koncentrační gradient

ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	50	50
10	0	100
15	0	100
16	50	50
20 - STOP		

2.4.3 Dvourozměrná analýza 2D-HPLC

Analýzy standardů probíhaly v komplexním režimu bez/s ASM modulátorem (Obrázek 27), a to na kolonách č. 1; 2; 4 a 5 viz Tabulka 3. Jako mobilní fáze byla použita redestilovaná voda (A)/acetonitril (B), v případě kolony č. 2 byla testována i mobilní fáze ve složení redestilovaná voda (A)/methanol (B). Na kolony v první dimenzi byl aplikován koncentrační gradient mobilních fází viz Tabulka 9, v druhé dimenzi byl použit gradient viz Tabulka 10. V první dimenzi byl průtok mobilní fáze 0,060 ml/min, ve druhé dimenzi byl 3,5 ml/min. Dávkované množství vzorku bylo 10 μ l. Teplota termostatu kolon během analýzy byla 30 °C. Standardy byly proměřeny při vlnové délce 400 nm.



Obrázek 27: Schéma zapojení ventilů pro 2D-LC s ASM modulátorem

Tabulka 9: Standardy: Koncentrační gradient pro 2D-LC – první dimenze

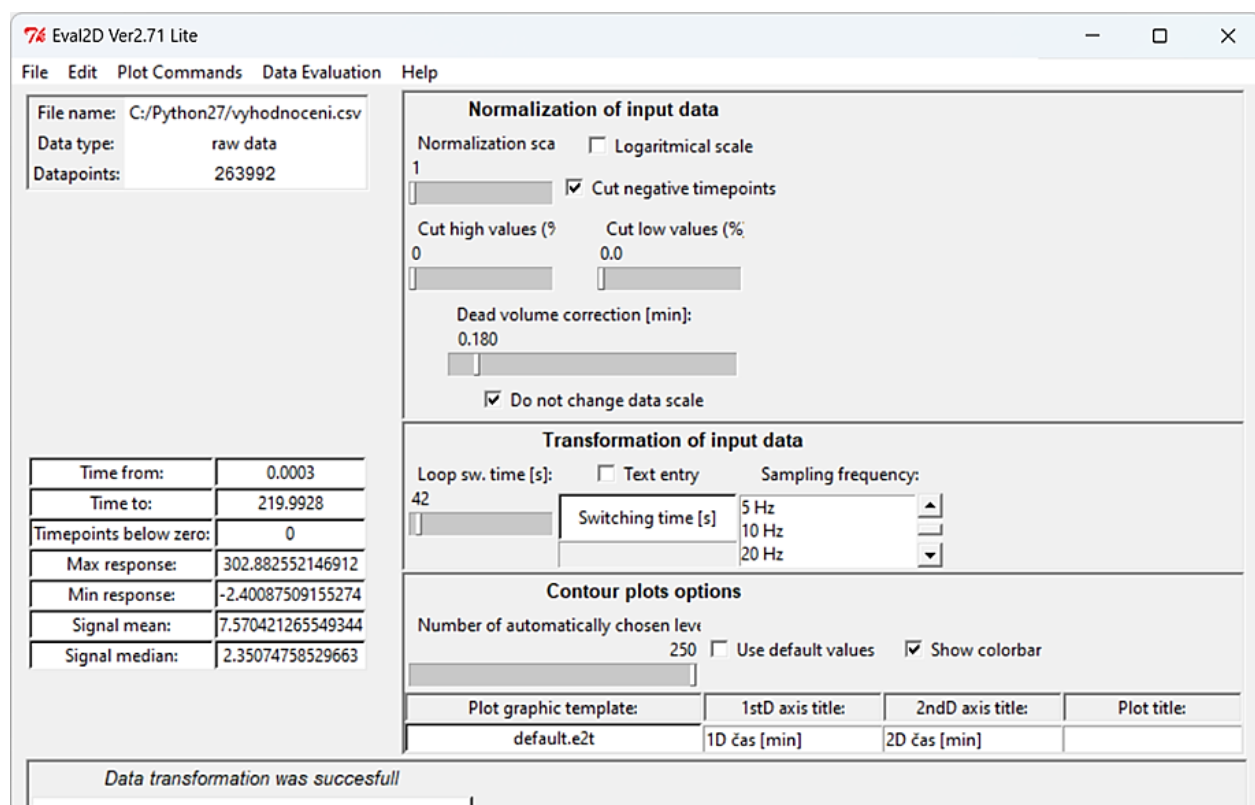
ČAS [min]	1D rozměr	
	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
180	0	100
200	0	100
201	95	5
220 - STOP		

Tabulka 10: Standardy: Koncentrační gradient pro 2D-LC – druhá dimenze

2D rozměr		
ČAS [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	85	15
0,65	0	100
0,70 – přepnutí ventilu		

2.5 Vyhodnocení dat

Data z chromatografických analýz byla zaznamenána a vyhodnocena v softwaru OpenLab ChemStation CDS 1.11. Chromatogramy byly dále převedeny ve formátu CSV do softwaru MS Excel, a to včetně záznamů stanovení zpoždění gradientu. 2D chromatogramy byly z formátu CSV importovány do softwaru Eval 2D, verze 2.71 (Obrázek 28), pro vyhodnocení 2D dat (autor doc. Ing. P. Česla, Ph.D., Univerzita Pardubice) a zpracovány ve formě vrstevnicových grafů.



Obrázek 28: Nastavení v softwaru Eval2D Ver2.71 Lite

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Zpoždění gradientu

Zpoždění gradientu (Tabulka 11) bylo stanovováno za použití mobilní fáze: redestilovaná voda (A)/0,2% aceton v redestilované vodě (B). Byly proměřovány tři průtoky s koncentračním gradientem mobilní fáze viz Tabulka 4, a to při vlnové délce 280 nm. Při měření byla, namísto kolony, použita ocelová spojka s nulovým vnitřním objemem. V příloze jsou vloženy grafy naměřených průběhů absorbance v závislosti na čase (Graf P1-3). Z uvedených závislostí bylo zpoždění gradientu odečteno jako zlom na průběhu signálu v časových jednotkách, a to od počátku změny složení mobilní fáze nastavené na čerpadle (1 min, Tabulka 4). Čas zpoždění byl pomocí nastaveného objemového průtoku přepočítán na hodnotu objemu zpoždění gradientu. Výsledné průměrné objemy jsou zaznamenány v Tabulce 11.

Tabulka 11: Zpoždění gradientu

Průtok [ml/min]	Průměrný objem zpoždění gradientu [ml]
0,06	0,339
0,2	0,356
0,4	0,397

Hodnoty objemu zpoždění gradientu naměřené při různých průtocích se mírně zvyšují, nicméně změny oproti průměru se pohybují do 10 %. Průměrná hodnota zpoždění je 0,364 ml.

3.2 Výběr a hodnocení kolon pro první dimenzi

Analýzy byly prováděny v systému reverzních fází s použitím kombinací redestilovaná voda/acetónitril a redestilovaná voda/methanol jako mobilní fáze. Kolony byly zvoleny na základě poznatků získaných z literatury a z předchozích diplomových prací, které byly zpracovány na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice, konkrétně se jedná o následující práce: Bc. Helena Láníková: Analýza porfyrinových potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie (2017) [77]; Bc. Barbora Blažíčková: Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace (2022) [78]; Bc. Kateřina Nováková: Dvourozměrné separace přírodních barviv kapalinovou chromatografií (2019) [79]; Bc. Karin Sokolová: Separace porfyrinových potravinářských barviv kapalinovou chromatografií (2020) [80].

Kolona č. 1 s C18 fází byla zvolena pro předpokládané a požadované nižší retence oproti kolonám s aromatickými fázemi, které byly užity v druhé dimenzi analýzy. Kolona č. 2 s pentafluorfenylpropylovou fází (F5) je oproti bifenylové fází polárnější a pokud použijeme mobilní fázi redestilovaná voda/acetónitril, dochází navíc ke snížení π - π interakcí, a to ve srovnání s mobilní fází redestilovaná voda/methanol. Kolona č. 3 s bifenylovou fází byla zvolena kvůli porovnání účinnosti C18 fází a aromatických fází, které byly použity v druhé dimenzi.

3.2.1 Analýza testovací směsi alkylbenzenů

Pro nalezení nejvhodnějších kolon byla použita testovací směs alkylbenzenů (benzen (B); toluen (mB); ethylbenzen (eB); propylbenzen (pB); butylbenzen (bB); amylbenzen (aB); aceton (Ac)), prostřednictvím které byla zjišťována jejich účinnost. Získané průměrné retenční časy (t_R), logaritmus retenčního faktoru ($\log k$) (Rovnice 2), šířky píků v polovině výšky ($w_{0,5h}$) a účinnosti kolony (N) (resp. počty teoretických pater) (Rovnice 3) jsou zaznamenány v Tabulce P1 pro izokratickou analýzu a v Tabulce P2 pro analýzu s koncentračním gradientem mobilní fáze.

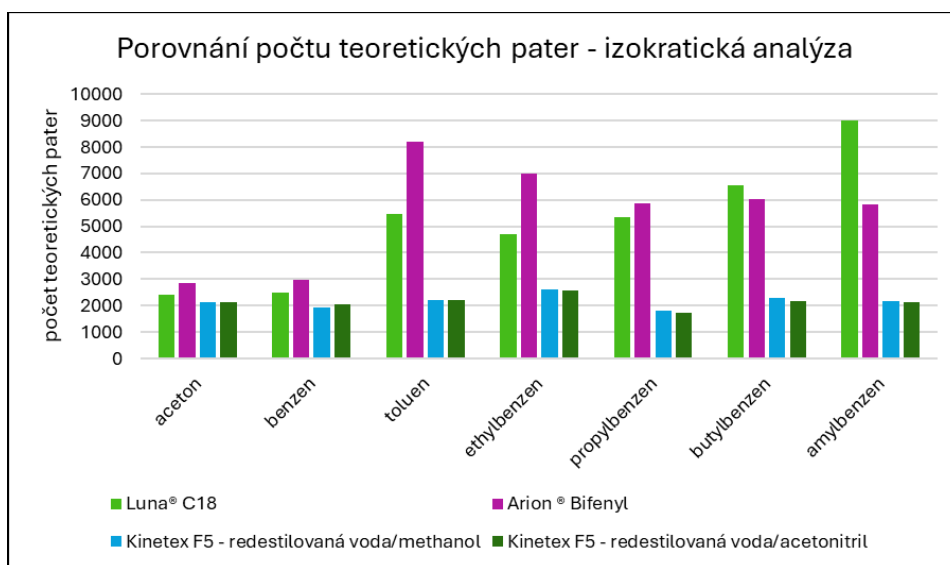
Rovnice 2: Logaritmus retenčního času k

$$\log k = \log\left(\frac{t_R}{t_{m(\text{aceton})}} - 1\right)$$

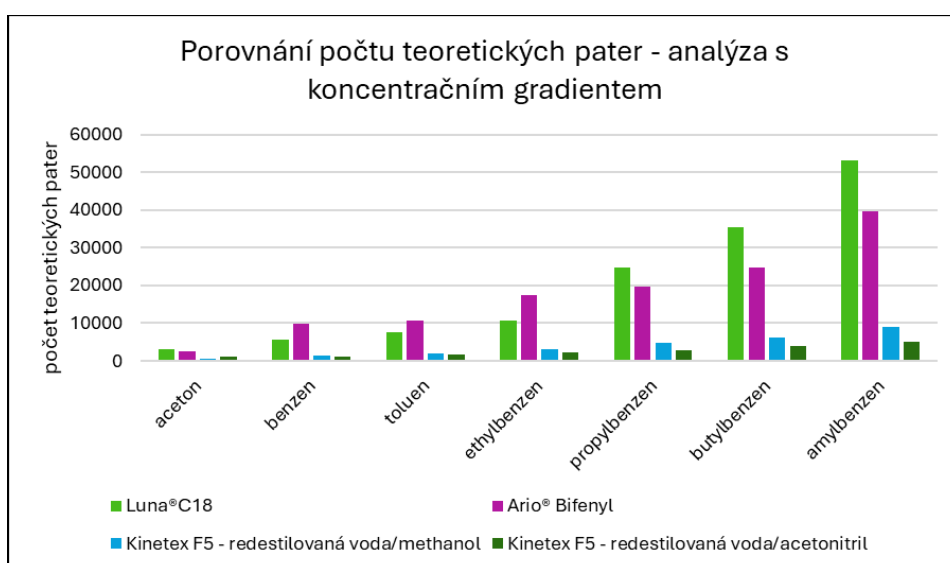
Rovnice 3: Účinnost kolony – počet teoretických pater N

$$N = 5,545 * \left(\frac{t_R}{W_{0,5h}}\right)^2$$

V Grafech 1 a 2 je porovnání počtu teoretických pater (N) jednotlivých alkybenzenů na kolonách, a to v izokratickém módu a v módu s koncentračním gradientem. Nejvyšší účinnost vykazovaly kolony č. 1 a č. 3. Naopak nejnižší účinnost vykazuje kolona č. 2, a to jak s použitím methanolu, tak s použitím acetonitrilu (v kombinaci s redestilovanou vodou) jako mobilní fáze.



Graf 1: Porovnání počtu teoretických pater – izokratická analýza



Graf 2: Porovnání počtu teoretických pater – analýza s koncentračním gradientem

Ze získaných retenčních časů (t_R) a šířek píků ($w_{0,5h}$) byly následně vypočítány píkové kapacity (n_p) (Tabulka P3) dle Rovnice 4 a Rovnice 5 – a to jak pro izokratickou, tak i pro analýzu s koncentračním gradientem.

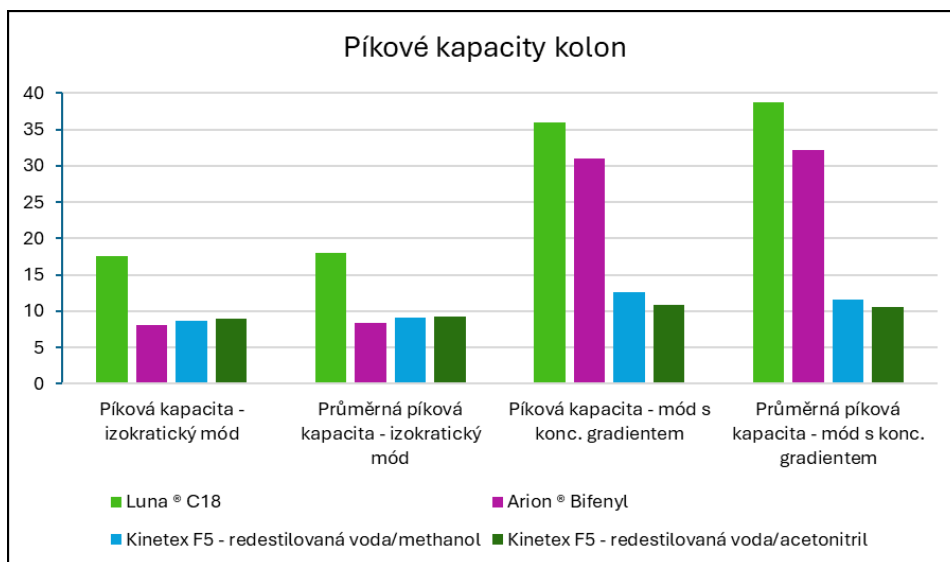
Rovnice 4: Píková kapacita (n_p)

$$n_p = 1 + \sum \frac{t_R - t_{R-1}}{w_{0,5h} * 1,699}$$

Rovnice 5: Průměrná píková kapacita ($n_{p,průměr}$)

$$n_{p,průměr} = 1 + \frac{t_{R,poslední} - t_m(aceton)}{w_{0,5h,průměr} * 1,699}$$

V Grafu 3 je porovnání píkových kapacit kolon, a to v izokratickém módu a v módu s koncentračním gradientem. V obou módech vykazoval největší píkovou kapacitu kolona č. 1. Kolona č. 3 vykazovala největší píkovou kapacitu pouze v módu s koncentračním gradientem, tedy společně s kolonou č. 1. Naopak nejmenší píkovou kapacitu vykazuje kolona č. 2, a to jak s použitím methanolu, tak s použitím acetonitrilu (v kombinaci s redestilovanou vodou) jako mobilní fáze. Dále je z porovnání píkových kapacit zjevné, že použití gradientové eluce vede k výrazně vyšší píkové kapacitě.

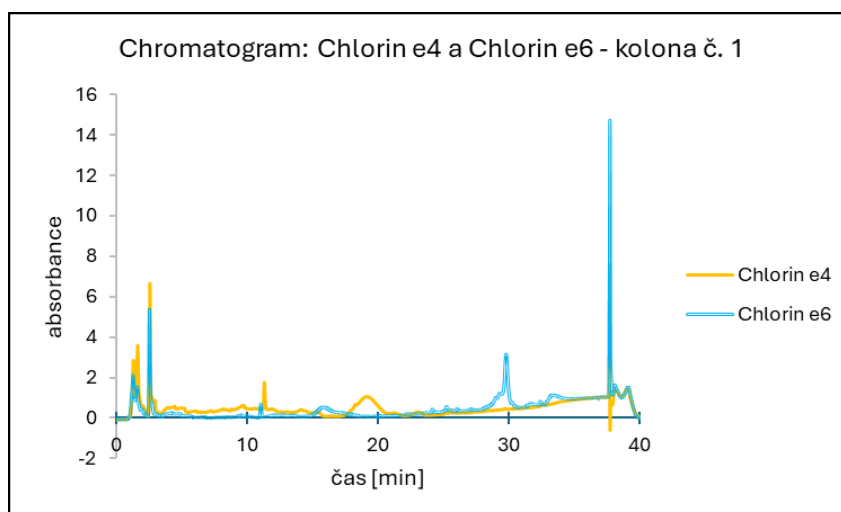


Graf 3: Píkové kapacity kolon

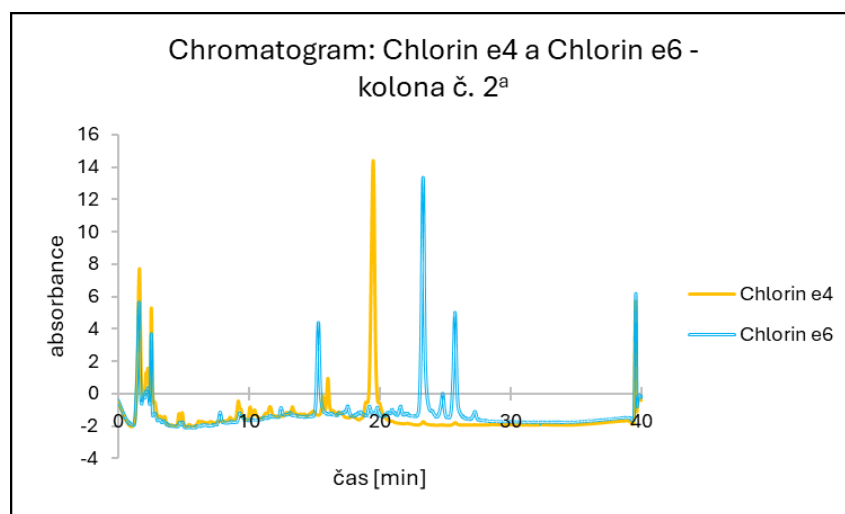
3.2.2 Analýza standardů

Analýzy standardu sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu, Chlorinu e4 a Chlorinu e6 byly prováděny v systému reverzních fází s použitím kombinací redestilovaná voda/acetonitril a redestilovaná voda/methanol jako mobilní fáze. Na zvolené kolony byly vkládány tři koncentrační gradienty mobilní fáze (Tabulka 5-6) a detekce probíhala při dvou vlnových délkách 280 a 400 nm.

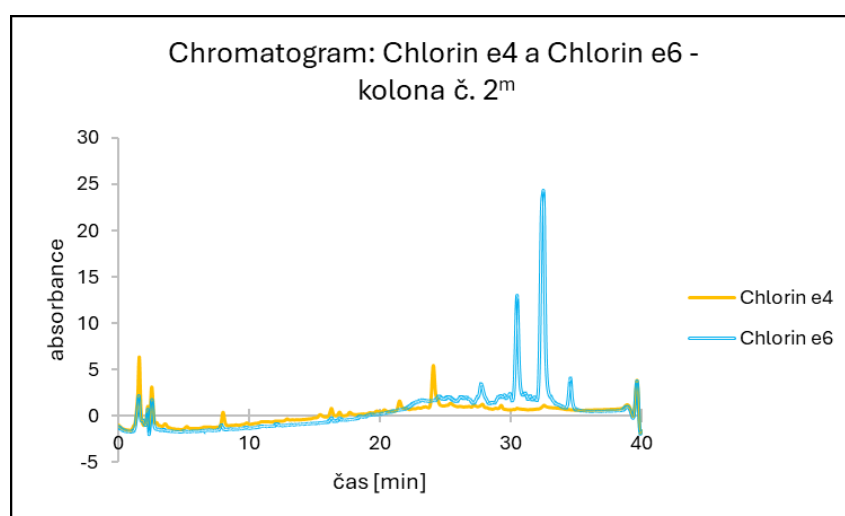
Níže jsou uvedeny analýzy Chlorinu e4 a Chlorinu e6 (Graf 4-7) na různých kolonách při vlnové délce 280 nm, a to v módu s III. koncentračním gradientem (Tabulka 7). Z provedených analýz vyplývá, že u III. koncentračního gradientu docházelo k nejlepšímu dělení chlorinů od dalších minoritních látek na záznamu. Protože majoritní složka obou chlorinů eluuje přibližně v polovině gradientové analýzy, byl profil III. koncentračního gradientu nejvhodnější také s ohledem na vyšší počáteční koncentrace acetonitrilu.



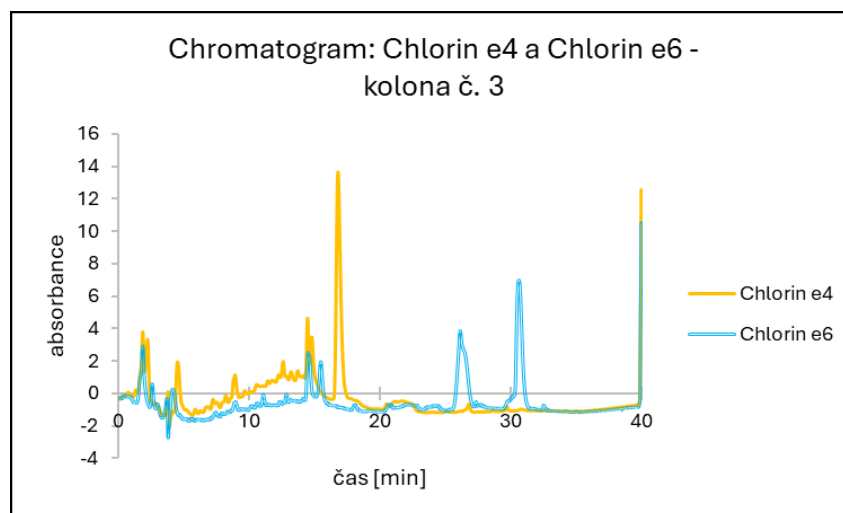
Graf 4: Chromatogram – Chlorin e4 a Chlorin e6; kolona: Luna ® C18; mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril; mód: III. koncentrační gradient; vlnová délka: 280 nm



Graf 5: Chromatogram – Chlorin e4 a Chlorin e6; kolona: Kinetex F5; mobilní fáze: redistilovaná voda/acetonitril (= ^a); mód: III. koncentrační gradient; vlnová délka: 280 nm



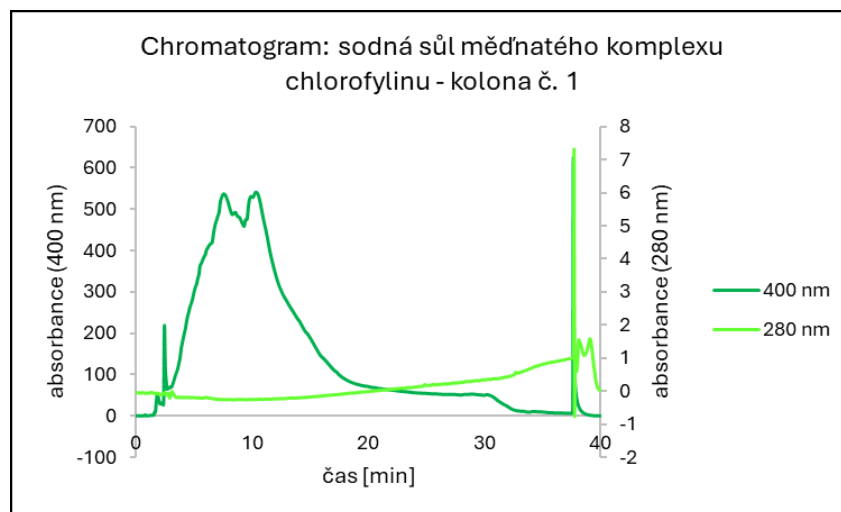
Graf 6: Chromatogram – Chlorin e4 a Chlorin e6; kolona: Kinetex F5; mobilní fáze: redistilovaná voda/methanol (= ^m); mód: III. koncentrační gradient; vlnová délka: 280 nm



Graf 7: Chromatogram – Chlorin e4 a Chlorin e6; kolona: Arion® Biphenyl; mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril; mód: III. koncentrační gradient; vlnová délka: 280 nm

Ze záznamů separací je patrný vliv typu mobilní fáze na retenci při použití kolony Kinetex F5. Protože se jedná o aromatickou fázi poskytující výrazné π - π interakce, vede použití acetonitrilu ke snížení retence díky interakci π -elektronů nitrilové skupiny (Graf 5 vs. Graf 6). Pro 2D separace byla do první dimenze zvolena kolona Luna® C18, která poskytuje nižší, ale dostatečnou retenci v porovnání s bifenylovou fází, která byla zvolena do druhé dimenze.

Dále je uveden chromatogram sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu, a to jako porovnání analýz při vlnových délkách 280 a 400 nm na koloně č. 1 (Graf 8), v módu s III. koncentračním gradientem.



Graf 8: Chromatogram – sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu; kolona: Luna ® C18; mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril; mód: III. koncentrační gradient; vlnová délka: 280 nm a 400 nm

Z grafu separace sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu je vidět, že tato směs vykazuje výrazně lepší absorbanci při vlnové délce 400 nm, kdy na rozdíl od chlorinů je absorpce záření při 280 nm minimální. Dále je vidět, že pro C18 kolonu je separace nedokonalá, a proto je výhodné použití 2D systému.

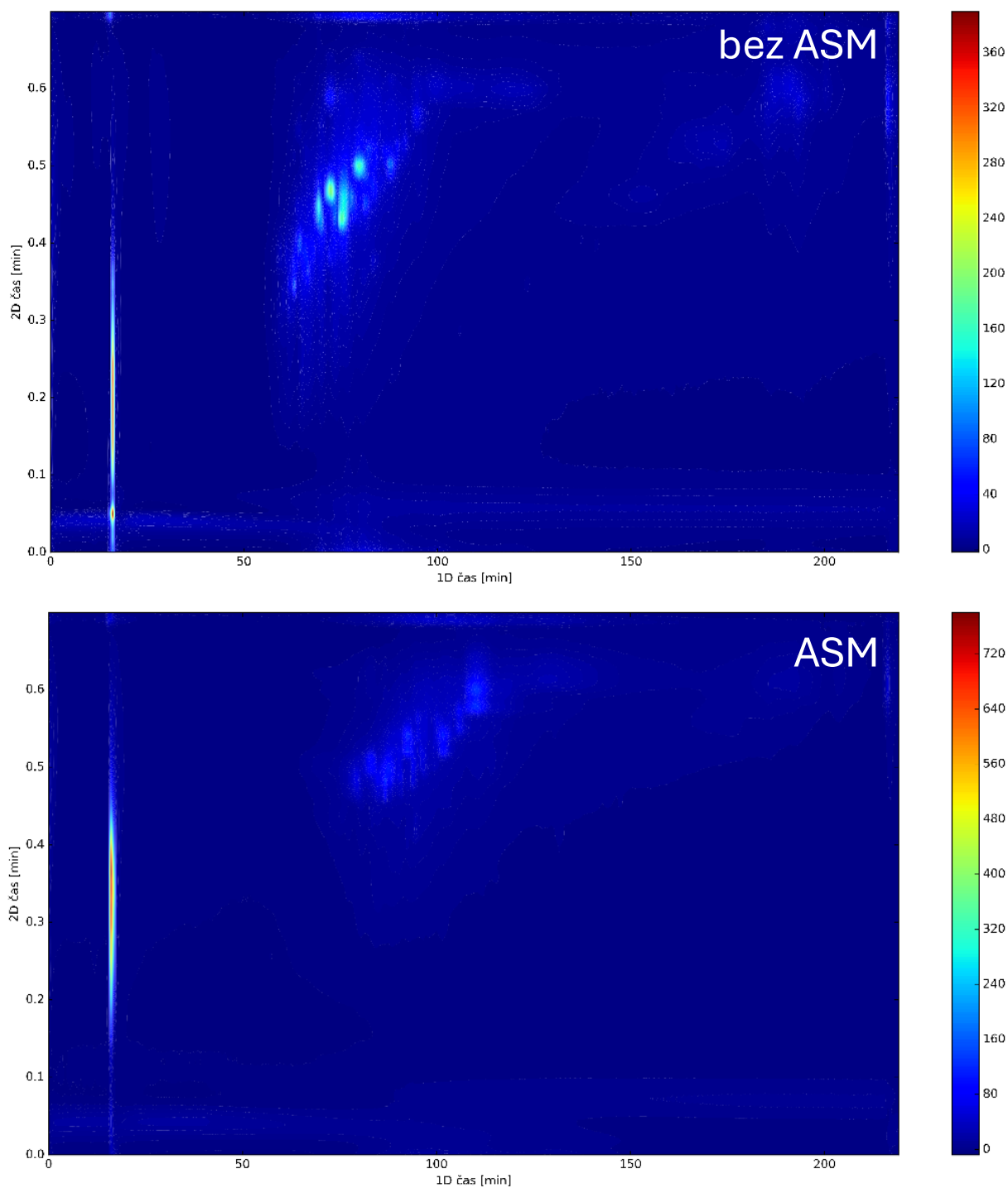
3.3 Analýzy ve dvoudimenzionálním módu

Analýzy byly prováděny v systému reverzních fází s použitím kombinací redestilovaná voda/acetonitril a redestilovaná voda/methanol jako mobilní fáze. Kolony byly zvoleny na základě poznatků získaných z literatury a z předchozích diplomových prací, které byly zpracovány na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice, konkrétně se jedná o následující práce: Bc. Helena Láníková: Analýza porfyrinových potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie (2017) [77]; Bc. Barbora Blažíčková: Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace (2022) [78]; Bc. Kateřina Nováková: Dvourozměrné separace přírodních barviv kapalinovou chromatografií (2019) [79]; Bc. Karin Sokolová: Separace porfyrinových potravinářských barviv kapalinovou chromatografií (2020) [80]. Dále byly aplikovány poznatky získané u 1D analýz v rámci této diplomové práce.

V první dimenzi byly použity následující kolony: kolona č. 1 s C18 částicemi byla zvolena pro předpokládané a požadované nižší retence oproti kolonám s částicemi s aromatickou fází, která byla užita v druhé dimenzi analýzy; dále kolona č. 2 s pentafluorfenylpropylovou fází (F5) je oproti bifenylové fází polárnější a při použití mobilní fáze redestilovaná voda/acetonitril, dochází navíc ke snížení π - π interakcí, a to ve srovnání s mobilní fází redestilovaná voda/methanol.

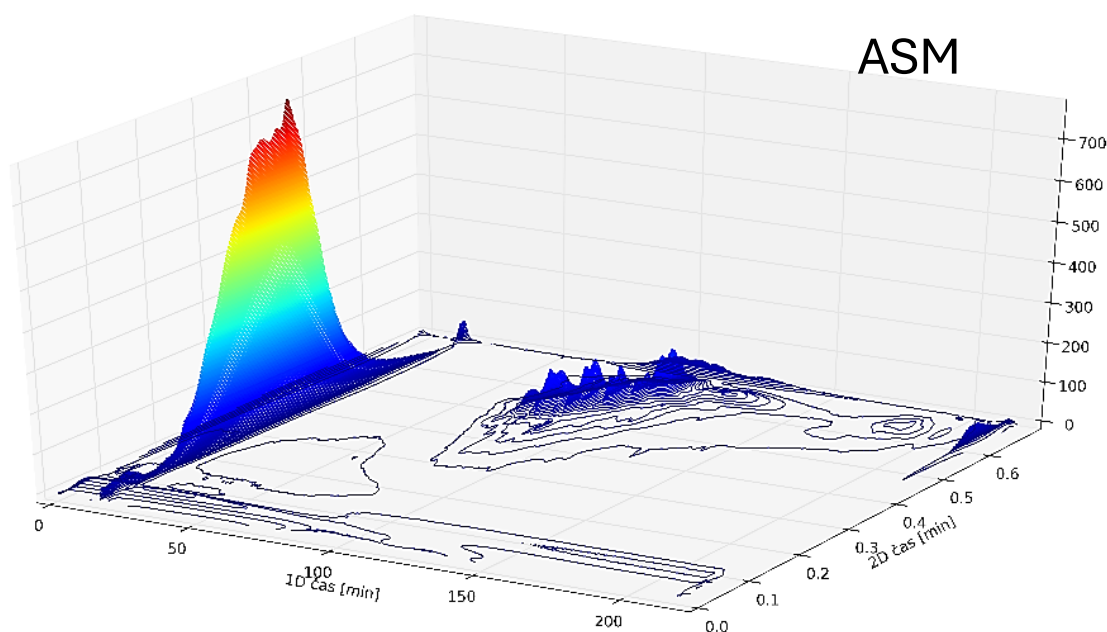
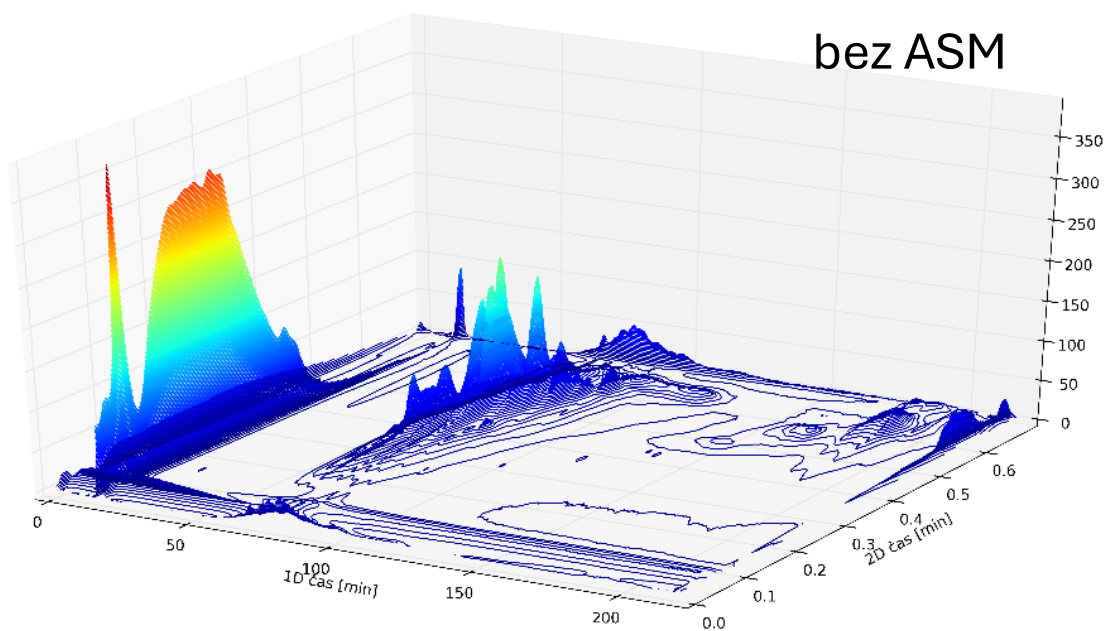
Pro druhou dimenzi byly zvoleny kolony č. 4 a 5 (viz Tabulka 3), přičemž se jedná o kolony s aromatickými fázemi. Analýzy standardů probíhaly v komplexním režimu, a to v analýzách s a bez ASM modulátoru (Obrázek 24). Na kolony v první dimenzi byl aplikován koncentrační gradient mobilních fází viz Tabulka 9, v druhé dimenzi byl použit gradient viz Tabulka 10.

Níže jsou uvedeny výsledné chromatogramy (Graf 9-16), které byly zpracovány pomocí softwarů OpenLab ChemStation CDS 1.11 a Eval 2D (verze 2.71, autor doc. Ing. P. Česla, Ph.D., Univerzita Pardubice), a to ve formě vrstevnicových grafů a izometrického 3D zobrazení.



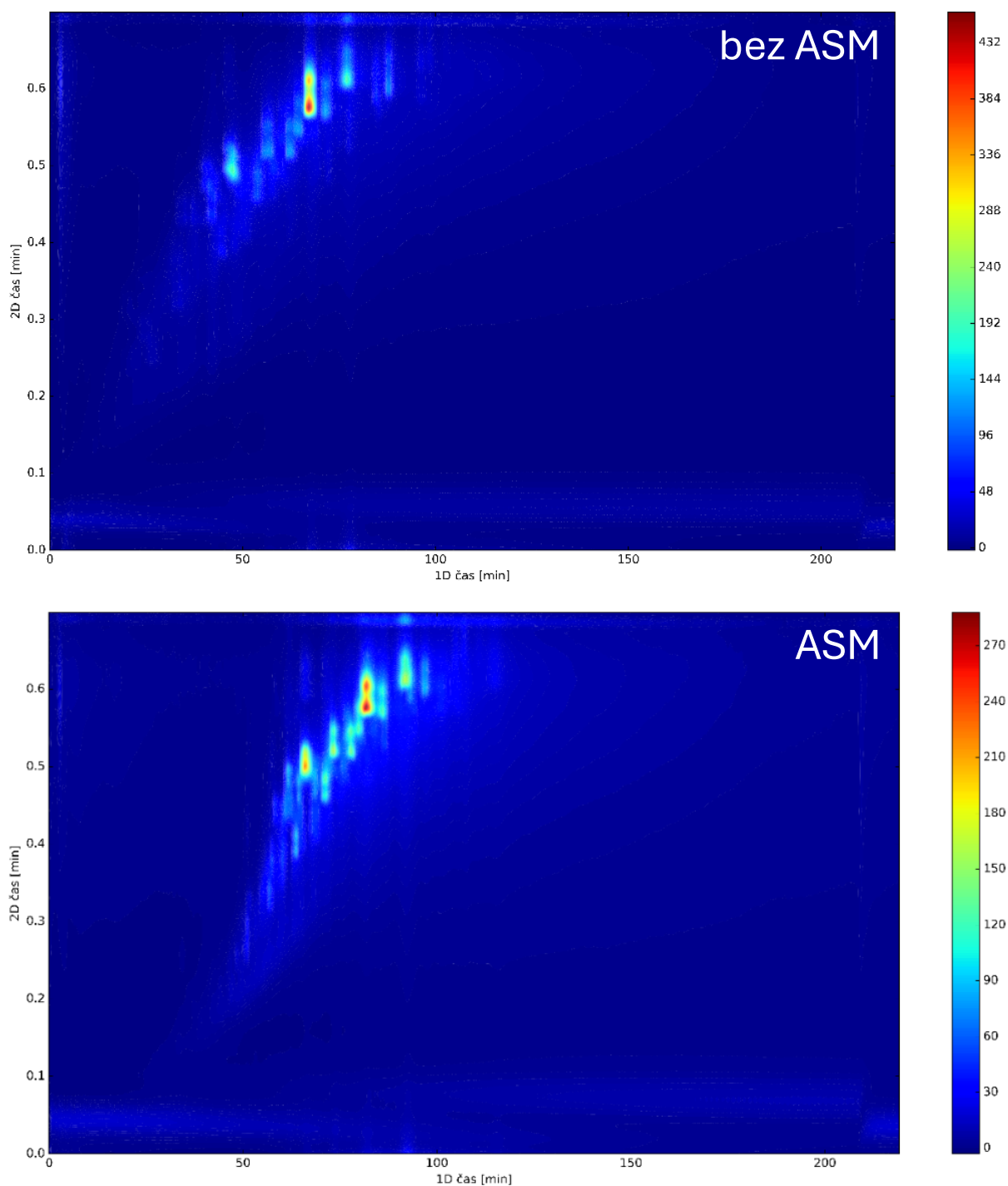
Graf 9: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě vrstevnicových grafů. Kolony: Luna®C18 v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; teplota termostatu kolon: 30 °C



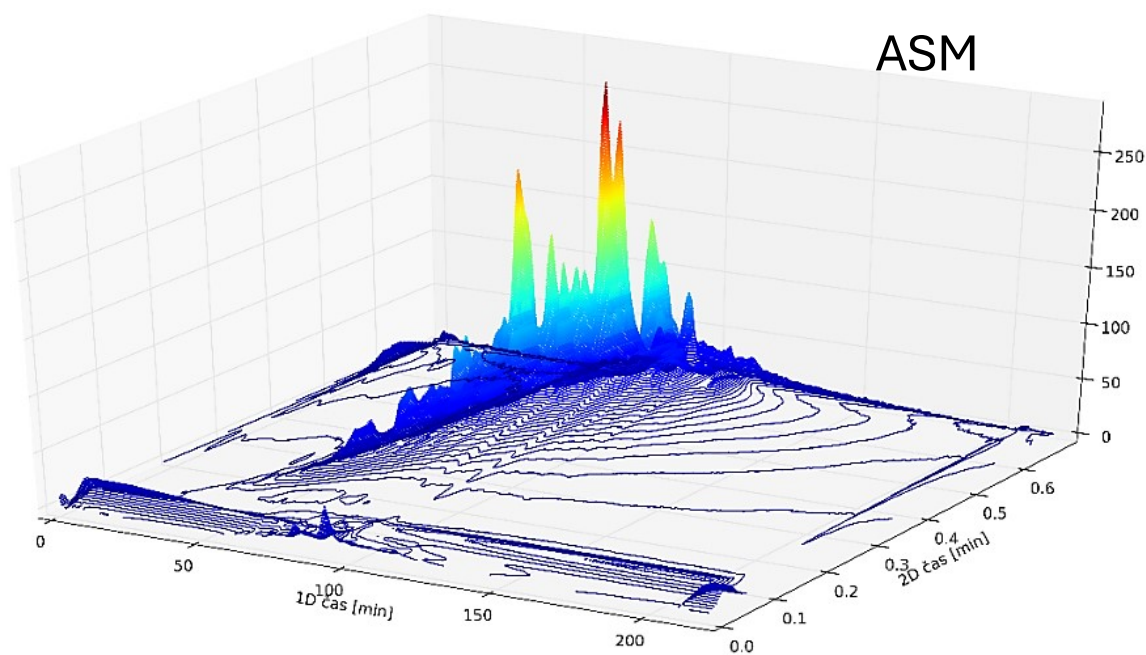
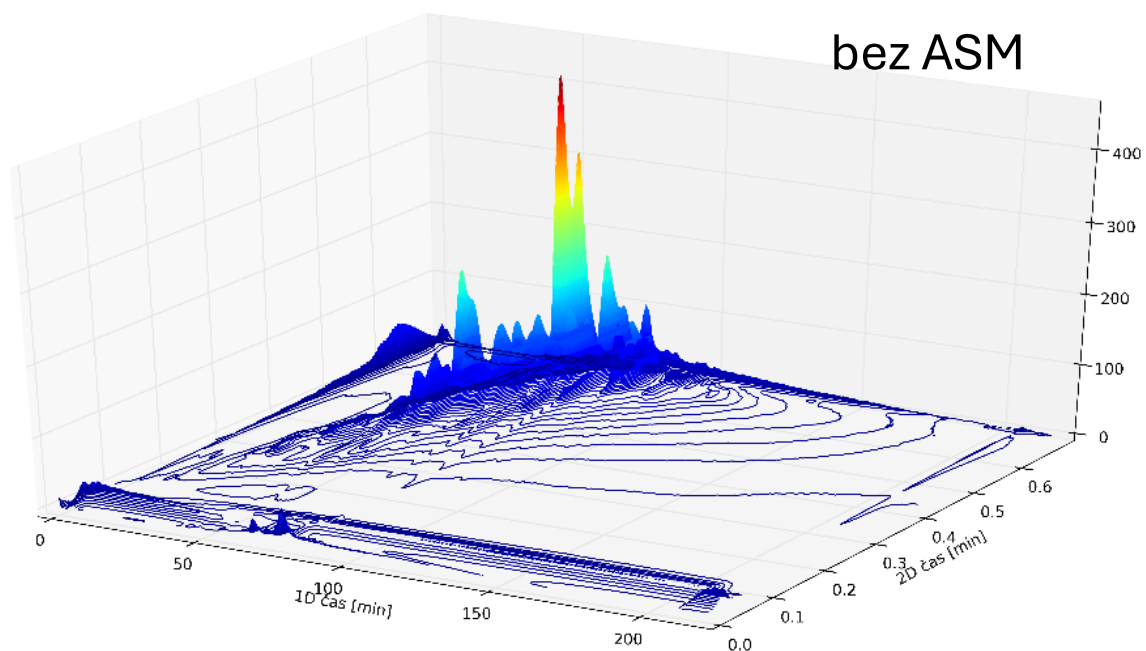
Graf 10: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě izometrického 3D zobrazení. Kolony: Luna® C18 v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; teplota termostatu kolon: 30 °C



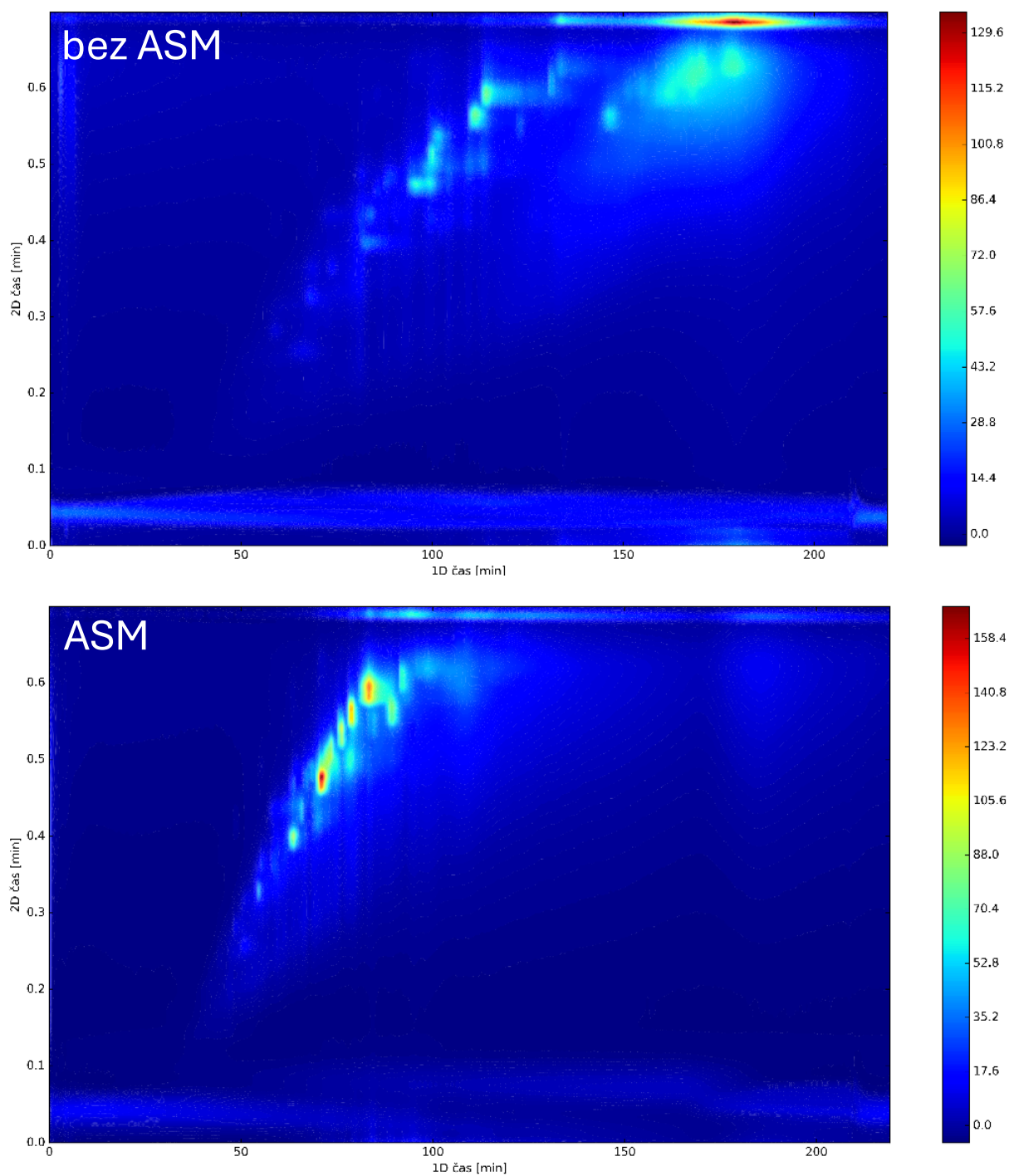
Graf 11: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě vrstevnicových grafů. Kolony: Kinetex F5^a v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril (= ^a), průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; Teplota termostatu kolon: 30 °C



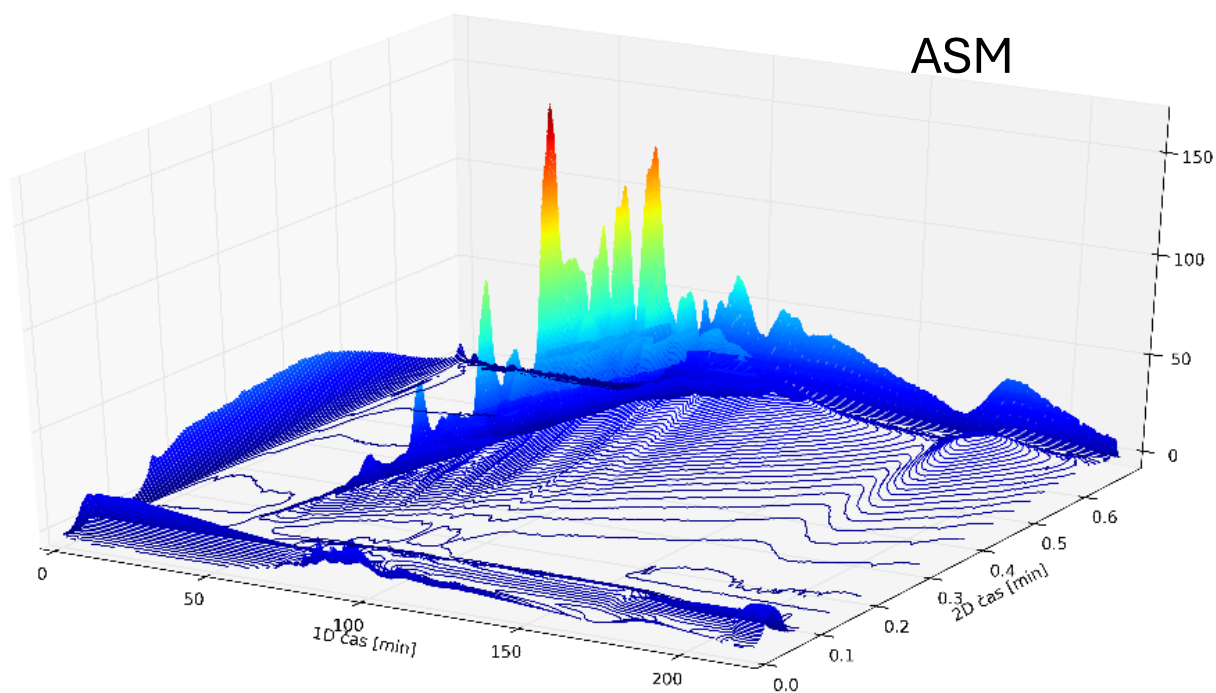
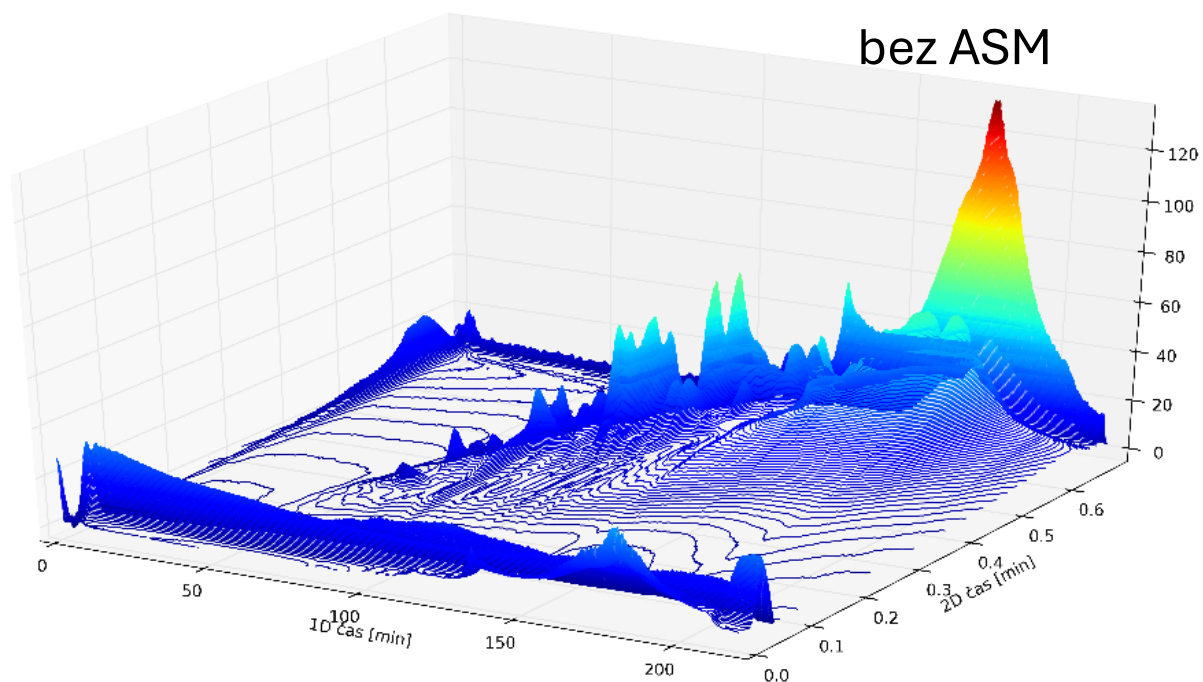
Graf 12: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě izometrického 3D zobrazení. Kolony: Kinetex F5^a v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril (= ^a), průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; Teplota termostatu kolon: 30 °C



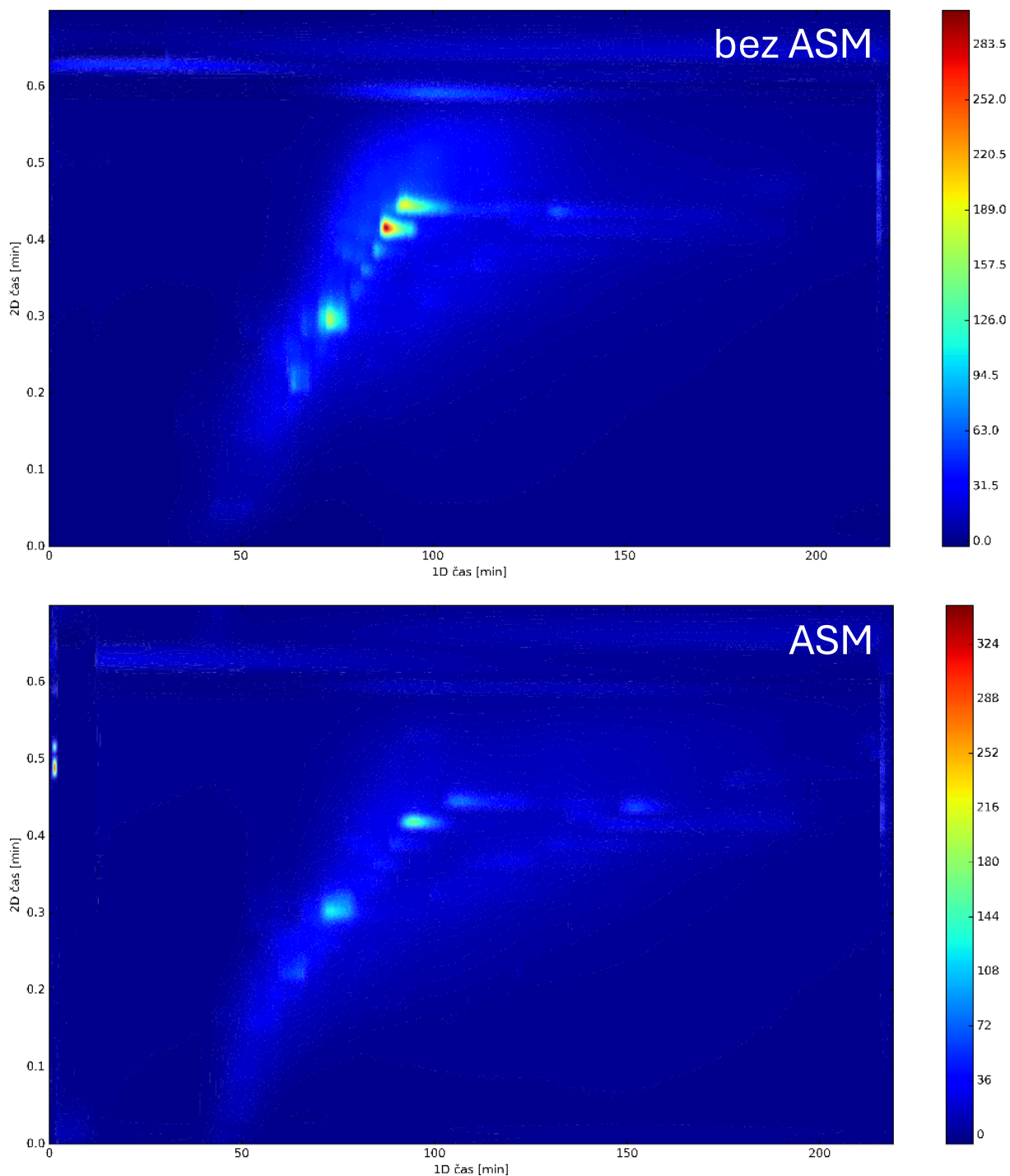
Graf 13: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě vrstevnicových grafů. Kolony: Kinetex F5^m v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/methanol (= ^m), průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; Teplota termostatu kolon: 30 °C



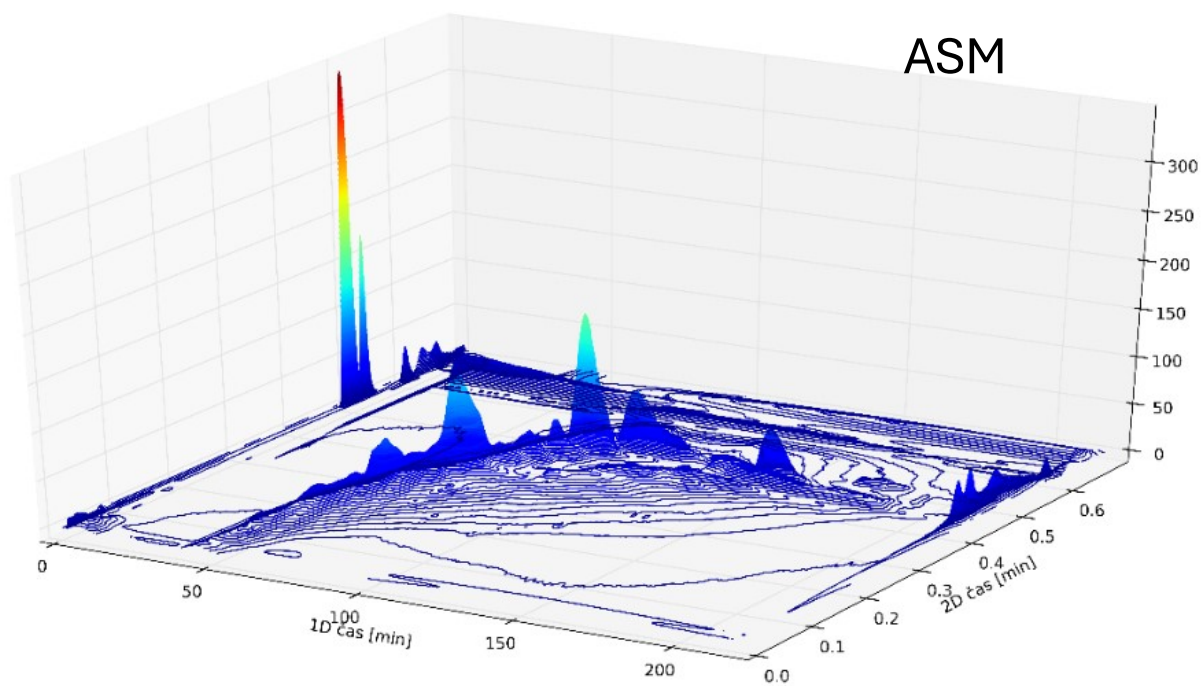
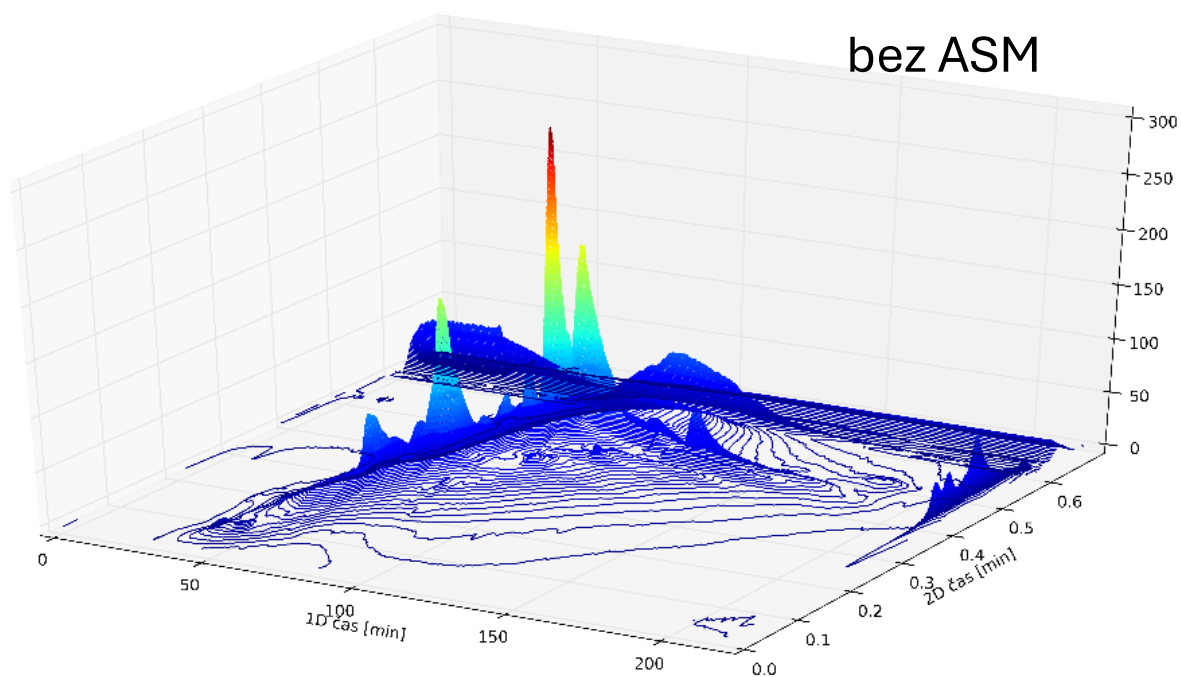
Graf 14: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě izometrického 3D zobrazení. Kolony: Kinetex F5^m v 1D + Kinetex® Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/methanol (= m), průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; teplota termostatu kolon: 30 °C



Graf 15: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě vrstevnicových grafů. Kolony: Luna® C18 v 1D + Raptor Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; teplota termostatu kolon: 30 °C



Graf 16: Porovnání 2D separace pro modulaci bez a s fokusací (ASM) ve formě izometrického 3D zobrazení. Kolony: Luna® C18 v 1D + Raptor Biphenyl v 2D

Podmínky: 1D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 0,060 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 8; 2D – mobilní fáze: redestilovaná voda/acetonitril, průtok mobilní fáze: 3,5 ml/min, koncentrační gradient viz. Tabulka 9; vlnová délka: 400 nm; teplota termostatu kolon: 30 °C

Z provedených 2D analýz a výsledných chromatogramů je vidět, že použitý RP x RP systém je, i přes rozdíly v retenci na kolonách v 1D a 2D, částečně korelovaný. Píky jsou rozmístěny v 2D chromatogramu z větší části podél diagonály a nezasahují do celé plochy.

Při porovnání dvou rozdílných kolon použitých ve 2D (Kinetex® Biphenyl a Raptor Biphenyl) je evidentní lepší rozdělení složek vzorku sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu pro kolonu Raptor Biphenyl (Graf 15 a Graf 16). U kolony Kinetex® Biphenyl (Graf 9 a Graf 10) eluují píky v druhé půlce gradientu v 2D, zatímco pro Raptor Biphenyl je využita téměř celá část času v 2D.

V první dimenzi byly porovnávány kolony Luna® C18 (Graf 9 a Graf 10) a Kinetex F5 (Graf 11 a Graf 12) v mobilních fázích s acetonitrilem. Kolona Kinetex F5 poskytuje obecně nižší retenci, nicméně píky jsou v rozsahu 2D analýzy rozděleny ve větším časovém okně, a celkově je tak dosaženo lepšího rozdělení. Píky na 2D chromatogramu jsou také posunuty v ose druhé dimenze k vyšším časům, což může být způsobeno převodem frakcí s nižším obsahem acetonitrilu, a tedy menším ovlivněním následné separace ve 2D.

Byly také porovnávány pro kolonu Kinetex F5 dvě mobilní fáze v 1D, a to redestilovaná voda/acetonitril (Graf 11 a Graf 12) a redestilovaná voda/methanol (Graf 13 a Graf 14). Podobně jako u jednorozměrné analýzy vede použití acetonitrilu k potlačení π - π interakcí, a tedy ke snížení retence a rozlišení v 1D. Pro methanol tak bylo dosaženo výrazně lepší separace a zároveň k největšímu využití plochy na dvourozměrném chromatogramu.

Všechny čtyři systémy dvourozměrné analýzy byly zároveň použity pro testování režimu převodu frakcí bez a s fokusační modulací (ASM). Obecně je z porovnaných záznamů vidět výrazný nárůst odezvy způsobený menším rozmytím píků zejména v 2D. Dále je pro některé kombinace patrné potlačení vlivu převodu rozpouštědla s vysokou eluční silou do druhé dimenze. Uvedený efekt je patrný zejména pro dělení minoritních píků, a to například pro kombinaci kolon Kinetex F5 s redestilovanou vodou/methanolem v 1D a Kinetex® Biphenyl s redestilovanou vodou/acetonitrilem v 2D (Graf 13 a Graf 14).

Závěrem je možné shrnout provedené experimenty a dosažené výsledky a konstatovat pozitivní vliv vybraných kombinací kolon a podmínek na zlepšení separace chlorofylinů, a to včetně použití techniky aktivní modulace rozpouštědlem. U budoucích pokračování výzkumu by bylo vhodné provést identifikaci složek a případnou kvantifikaci, což však přesahuje rámec a cíle této diplomové práce.

4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla analýza a separace měďnatých komplexů chlorofylů a chlorofylinů dvourozměrnou kapalinovou chromatografií. Před samotnými analýzami v 2D režimu byly u jednotlivých kolon stanoveny chromatografické/retenční parametry pomocí testovací směsi alkylbenzenů (s acetonem), a to konkrétně účinnost kolon (respektive počet teoretických pater) a píková kapacita. Nejvyšší počet teoretických pater byl naměřen u kolon Luna® C18 a Arion® Biphenyl, a to jak v izokratickém, tak v módu s koncentračním gradientem. Největší píkovou kapacitu vykazovala též kolona Luna® C18, a to opět v obou módech analýz. Kolona Arion® Biphenyl vykazovala srovnatelnou píkovou kapacitu s kolonou Luna® C18 pouze v módu s koncentračním gradientem. Z výsledků bylo zjevné, že použití gradientové eluce vedlo k výrazně vyšším píkovým kapacitám. Dále bylo stanoveno zpoždění gradientu za použití mobilní fáze redestilovaná voda/0,2% aceton v redestilované vodě, a to při třech průtocích s koncentračním gradientem. Parametr zpoždění gradientu byl stanoven s ohledem na využití tohoto čerpadla v první dimenzi 2D systému, kdy jsou používány nízké průtoky a zpoždění tak ovlivňuje podobu 2D analýzy.

Jednotlivé standardy porfyrinů byly analyzovány v 1D režimu při třech koncentračních gradientech s reverzní fází, konkrétně se jednalo o mobilní fázi redestilovaná voda/acetonitril, v případě kolony Kinetex F5 byla také zkoušena mobilní fáze redestilovaná voda/methanol, jelikož použití acetonitrilu vedlo ke snížení retence. Měření probíhalo při vlnové délce 280 nm, avšak u standardu sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu se ukázala jako vhodnější délka 400 nm, při které vykazovala výrazně lepší absorpenci.

Analýzy standardu sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu ve dvoudimenzionálním módu opět probíhaly v systému reverzních fází, přičemž do první dimenze byly zvoleny kolony Luna® C18 a Kinetex F5, a do druhé dimenze kolony s aromatickou fází, konkrétně Kinetex® Biphenyl a Raptor Biphenyl. Analýzy byly provedeny v komplexním režimu s mobilními fázemi, které byly taktéž použity pro jednorozměrnou analýzu. Kolona Kinetex F5 poskytovala nižší retenci, avšak díky rozdělení píků ve větším časovém okně bylo celkově dosaženo lepšího rozdělení. Při použití mobilní fáze redestilovaná voda/methanol, na koloně Kinetex F5, bylo oproti kombinaci redestilovaná voda/acetonitril dosaženo výrazně lepší separace. Co se týče druhé dimenze, evidentně lepší rozdělení složek standardu došlo na koloně Raptor Biphenyl.

Analýzy v 2D byly zároveň použity pro porovnání separací bez a s režimem s fokusační modulací (ASM), přičemž bylo zřejmé, že při použití režimu s ASM došlo k výraznému nárůstu odezev, což bylo mimo jiné způsobeno menším rozmytím píků.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Harperova ilustrovaná biochemie. In: MURRAY, Robert; BENDER, David; BOTHAM, Kathleen; KENNELLY, Peter; RODWELL, Victor et al. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, **2012**, s. 293-306. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [2] TAHOUN, Mariam; GEE, Carole; MCCOY, Victoria; SANDER, P. a MÜLLER, Christa. Chemistry of porphyrins in fossil plants and animals. online. *RSC Advances*. **2021**, roč. 11, č. 13, s. 7552-7563. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0RA10688G>. [cit. 2024-11-23].
- [3] COOK, Lawrence; BREWER, Greg a WONG-NG, Winnie. Structural Aspects of Porphyrins for Functional Materials Applications. online. *Crystals*. **2017**, roč. 7, č. 7. ISSN 2073-4352. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cryst7070223>. [cit. 2024-11-24].
- [4] 9 Barviva. In: VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, **2002**, s. 1-12. ISBN 80-86659-00-3.
- [5] SENGE, Mathias O.; BROTHERS, Penelope J. (ed.). *Fundamentals of Porphyrin Chemistry: A 21st Century Approach*. online. Wiley, **2022**. ISBN 9781119129301. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119129301>. [cit. 2024-11-23].
- [6] IUPAC. *Nomenclature of Tetrapyrroles: Preface and Introduction*. online. In: IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **2024**. Dostupné z: <https://iupac.qmul.ac.uk/tetrapyrrole/intro.html>. [cit. 2024-11-24].
- [7] DOLPHIN, David (ed.). *The Porphyrins V1 Structure and Synthesis, Part A*. online. 1. edition. Elsevier, **2012**. ISBN 9780323143738. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=J8gfuQEpVhAC&pg=PA1&hl=cs&source=gbs_toc_r&cad=2#v=onepage&q&f=false. [cit. 2024-11-23].
- [8] ZHENG, W; SHAN, N; YU, L a WANG, X. UV-visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. online. *Dyes and Pigments*. **2008**, roč. 77, č. 1, s. 153-157. ISSN 01437208. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.04.007>. [cit. 2024-11-26].
- [9] LAN, Minbo; ZHAO, Hongli; YUAN, Huihui; JIANG, Chengrui; ZUO, Shaohua et al. Absorption and EPR spectra of some porphyrins and metalloporphyrins. online. *Dyes and Pigments*. **2007**, roč. 74, č. 2, s. 357-362. ISSN 01437208. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.02.018>. [cit. 2024-11-27].

- [10] AROOJ, Q.; WILSON, G. J. a WANG, F. Shifting UV-vis absorption spectrum through rational structural modifications of zinc porphyrin photoactive compounds. online. *RSC Advances*. **2016**, roč. 6, č. 19, s. 15345-15353. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5RA25214H>. [cit. 2024-11-26].
- [11] 35. Structure, Spectroscopy, Photophysics, and Tautomerism of Free-Base Porphycenes and Other Porphyrin Isomers. In: *Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*. World Scientific Publishing, **2010**, s. 360-428. ISBN 978-981-4307-19-2.
- [12] IMRAN, Muhammad; RAMZAN, Muhammad; QURESHI, Ahmad Kaleem; KHAN, Muhammad Azhar a TARIQ, Muhammad. Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. online. *Biosensors*. **2018**, roč. 8, č. 4. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios8040095>. [cit. 2024-12-04].
- [13] UTTAMLAL, Mahesh a SHEILA HOLMES-SMITH, A. The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. online. *Chemical Physics Letters*. **2008**, roč. 454, č. 4-6, s. 223-228. ISSN 00092614. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.02.012>. [cit. 2024-12-04].
- [14] LINDSEY, Jonathan S. 2 Synthesis of meso-Substituted Porphyrins. online. In: KADISH, Karl M.; SMITH, Kevin M. a GUILARD, Roger (ed.). *The Porphyrin Handbook: Volume 1/ Synthesis and Organic Chemistry*. Academic Press, **2000**, s. 45-112. ISBN 978-0-12-393201-3. Dostupné z: https://www.google.cz/books/edition/The_Porphyrin_Handbook_Volume_1/MiV6UhtgX8C?hl=cs&gbpv=1&dq=The+Porphyrin+Handbook&printsec=frontcover. [cit. 2025-02-13].
- [15] LINDSEY, Jonathan S.; SCHREIMAN, Irwin C.; HSU, Henry C.; KEARNEY, Patrick C. a MARGUERETTAZ, Anne M. Rothemund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. online. *The Journal of Organic Chemistry*. **1987**, roč. 52, č. 5, s. 827-836. ISSN 0022-3263. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jo00381a022>. [cit. 2025-02-12].
- [16] INOUE, Ryo; YOKOYAMA, Momoka; MARUYAMA, Itsuki a MORISAKI, Yasuhiro. Direct Synthesis of ABCD-Porphyrin Platinum(II) Complexes via Dehydrative Aromatization. online. *Chemistry – A European Journal*. **2023**, roč. 29, č. 53. ISSN 0947-6539. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/chem.202301717>. [cit. 2025-02-13].
- [17] LINDSEY, Jonathan S. Synthetic Routes to meso -Patterned Porphyrins. online. *Accounts of Chemical Research*. **2010**, roč. 43, č. 2, s. 300-311. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ar900212t>. [cit. 2025-02-12].

- [18] GIOVANNETTI, Rita. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. online. In: UDDIN, Jamal (ed.). *Macro to Nano Spectroscopy*. InTech, **2012**, s. 87-108. ISBN 978-953-51-5660-4. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/267459858_MACRO_TO_NANO_SPECTROSCOPY_Macro_to_Nano_Spectroscopy_Edited_by_Jamal_Uddin_Publishing_Process_Manager_Marina_Jozipovic_Teodora_Smiljanic_Cover_Designer_InTech_Design_Team. [cit. 2024-12-01].
- [19] GHOSH, Susmita; SARKAR, Tanmay; DAS, Arpita a CHAKRABORTY, Runu. Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. online. *LWT*. **2022**, roč. 153. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>. [cit. 2025-01-10].
- [20] LI, Yaqiong a CHEN, Min. Novel chlorophylls and new directions in photosynthesis research. online. *Functional Plant Biology*. **2015**, roč. 42, č. 6. ISSN 1445-4408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1071/FP14350>. [cit. 2025-01-10].
- [21] NABI, Brera Ghulam; MUKHTAR, Kinza; AHMED, Waqar; MANZOOR, Muhammad Faisal; RANJHA, Muhammad Modassar Ali Nawaz et al. Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. online. *Food Bioscience*. **2023**, roč. 52. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>. [cit. 2025-01-10].
- [22] SAPKOTA, Anupama; ARYAL, Sagar (ed.). Chlorophyll- Definition, Structure, Types, Biosynthesis, Uses. online. In: *Microbe Notes*. **2025**. Dostupné z: <https://microbenotes.com/chlorophyll/>. [cit. 2025-02-03].
- [23] Chlorophyll A. online. In: *PubChem*. **2004**. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12085802>. [cit. 2025-02-03].
- [24] Chlorophyll B. online. In: *PubChem*. **2004**. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11593175>. [cit. 2025-02-03].
- [25] Chlorophyll c. online. In: *PubChem*. **2004**. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135926595>. [cit. 2025-02-03].
- [26] Chlorophyll d. online. In: *PubChem*. **2004**. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16070025>. [cit. 2025-02-03].
- [27] Chlorophyll f. online. In: *PubChem*. **2004**. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/146683892>. [cit. 2025-02-03].

- [28] RIBEIRO, Jéssica S. a VELOSO, Cristiane M. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. online. *Food Hydrocolloids*. **2021**, roč. 112. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>. [cit. 2025-01-10].
- [29] SINGH, Amit Kumar; RANA, Harvesh Kumar a PANDEY, Abhay K. 19. Analysis of chlorophylls. online. In: SILVA, Ana Sanches; NABAVI, Seyed Fazel; SAEEDI, Mina a NABAVI, Seyed Mohammad (ed.). *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, **2020**, s. 635-650. ISBN 978-0-12-817519-4. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpRANPA001/cid:kt012LEVP1/viewerType:khtml//root_slug:19-analysis-of-chlorophylls/url_slug:analysis-chlorophylls?b-toc-cid=kpRANPA001&b-toc-title=Recent%20Advances%20in%20Natural%20Products%20Analysis&b-toc-url-slug=analysis-chlorophylls&view=collapsed&zoom=1&page=1. [cit. 2024-12-02].
- [30] QIU, N.W.; JIANG, D.C.; WANG, X.S.; WANG, B.S. a ZHOU, F. Advances in the members and biosynthesis of chlorophyll family. online. *Photosynthetica*. **2019**, roč. 57, č. 4, s. 974-984. ISSN 03003604. Dostupné z: <https://doi.org/10.32615/ps.2019.116>. [cit. 2024-12-04].
- [31] CANNIFFE, Daniel P. a HUNTER, C. Neil. Engineered biosynthesis of bacteriochlorophyll b in *Rhodobacter sphaeroides*. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **2014**, roč. 1837, č. 10, s. 1611-1616. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.011>. [cit. 2025-04-29].
- [32] KHARCHEVA, Anastasia; ZHILTSOVA, Anna; EMELYANTSEV, Pavel; LUNINA, Olga; KRASNOVA, Elena et al. SPECTROPHOTOMETRIC QUANTIFICATION OF CHLOROSOMAL BACTERIOCHLOROPHYLL IN INTACT CELLS OF GREEN SULPHUR BACTERIA: MONOCULTURES AND NATURAL WATER. Online. *EARSeL eProceedings*. **2018**, roč. 1, č. 17, s. 7-15. Dostupné z: <https://doi.org/10.12760/01-2018-1-02>. [cit. 2025-04-18].
- [33] TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO. Phthalocyanine Dyes, Porphyrin Dyes. online. In: *TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO. TCI*. **2024**. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/OP/en/c/12996#>. [cit. 2024-12-02].
- [34] DE LA TORE, Gema; BOTTARI, Giovanni; HAHN, Uwe a TORRES, Thomas. Functional Phthalocyanines: Synthesis, Nanostructuration, and Electro-Optical Applications. online. In: JIANG, Jianzhuang (ed.). *Functional Phthalocyanine Molecular Materials*. Springer, **2010**, s. 1-44. ISBN 9783642047527. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=mo9rCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. [cit. 2025-02-14].

- [35] HAMAD, Othman Abdulrahman; KAREEM, Rebaz Obaid a OMER, Peshang Khdir. Recent Developments in Synthesize, Properties, Characterization, and Application of Phthalocyanine and Metal Phthalocyanine. online. *Journal of Chemical Reviews*. **2024**, roč. 6, č. 1, s. 39-75. ISSN 2676-6868. Dostupné z: <https://doi.org/10.48309/jcr.2024.412899.1250>. [cit. 2025-02-14].
- [36] Porphyrins : the Colors of Life. online. In: *PhysicsOpenLab*. **2024**. Dostupné z: <https://physicsopenlab.org/2016/07/04/porphyrins-the-colors-of-life/>. [cit. 2024-12-02].
- [37] LI, Xiaoli; ZHOU, Ruiqing; XU, Kaiwen; XU, Jie; JIN, Juanjuan et al. Rapid Determination of Chlorophyll and Pheophytin in Green Tea Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. online. *Molecules*. **2018**, roč. 23, č. 5. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23051010>. [cit. 2025-02-17].
- [38] LEE, Jinwook; HWANG, Young-Sun; KANG, In-Kyu a CHOUNG, Myoung-Gun. Lipophilic pigments differentially respond to drying methods in tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. online. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**, roč. 61, č. 1, s. 201-208. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.025>. [cit. 2025-02-17].
- [39] PÉREZ-GÁLVEZ, Antonio; RÍOS, José Julian a ROCA, María. A new probe for tracking the presence of E141i food colorant. online. *Food Control*. **2015**, roč. 51, s. 240-243. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.028>. [cit. 2025-05-01].
- [40] FYRESTAM, Jonas; BJURSHAMMAR, Nadja; PAULSSON, Elin; JOHANNSEN, Annsofi a ÖSTMAN, Conny. Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2015**, roč. 407, č. 23, s. 7013-7023. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8864-2>. [cit. 2025-02-16].
- [41] DE MAERE, Hannelore; JAROS, Marlena; DZIEWIĘCKA, Marta; DE MEY, Eveline; FRAEYE, Ilse et al. DETERMINATION OF HEMIN, PROTOPORPHYRIN IX, AND ZINC(II) PROTOPORPHYRIN IX IN PARMA HAM USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. online. **2014**, roč. 37, č. 20, s. 2971-2979. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10739149.2014.906995>. [cit. 2025-02-17].
- [42] MIRONOV, N. A.; MILORDOV, D. V.; ABILOVA, G. R.; YAKUBOVA, S. G. a YAKUBOV, M. R. Methods for Studying Petroleum Porphyrins. online. *Petroleum Chemistry*. **2019**, roč. 59, č. 10, s. 1077-1091. ISSN 0965-5441. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S0965544119100074>. [cit. 2025-02-18].

- [43] GAFUROV, M.R.; VOLODIN, M.A.; RODIONOV, A.A.; SOROKINA, A.T.; DOLOMATOV, M.Yu. et al. EPR study of spectra transformations of the intrinsic vanadyl-porphyrin complexes in heavy crude oils with temperature to probe the asphaltenes' aggregation. online. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. **2018**, roč. 166, s. 363-368. ISSN 09204105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.02.045>. [cit. 2025-02-16].
- [44] SUGIYAMA, I. a WILLIAMS-JONES, A.E. An approach to determining nickel, vanadium and other metal concentrations in crude oil. online. *Analytica Chimica Acta*. **2018**, roč. 1002, s. 18-25. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.040>. [cit. 2025-02-16].
- [45] LUZ, Maciel S. a OLIVEIRA, Pedro V. Non-chromatographic method for separation and determination of Fe, Ni and V porphyrins in crude oil. online. *Talanta*. **2019**, roč. 199, s. 147-154. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.096>. [cit. 2025-02-16].
- [46] GIRALDO-DÁVILA, Deisy; CHACÓN-PATIÑO, Martha L.; RAMIREZ-PRADILLA, Juan S.; BLANCO-TIRADO, Cristian a COMBARIZA, Marianny Y. Selective ionization by electron-transfer MALDI-MS of vanadyl porphyrins from crude oils. online. *Fuel*. **2018**, roč. 226, s. 103-111. ISSN 00162361. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.016>. [cit. 2025-02-17].
- [47] E140 - Chlorofyly a chlorofyliny. online. In: *FÉR POTRAVINA*. **2024**. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E140>. [cit. 2024-12-05].
- [48] Scientific Opinion on the re-evaluation of chlorophylls (E 140(i)) as food additives. online. *EFSA Journal*. **2015**, roč. 13, č. 5. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4089>. [cit. 2024-12-05].
- [49] NIŤU, Cosmina. E140 – Chlorophylls. online. In: *InfoCons*. **2024**. Dostupné z: <https://infocons.org/blog/2024/05/29/e140-chlorophylls/>. [cit. 2024-12-05].
- [50] SOUTELINO, Maria Eduarda Marques; VIEIRA, Gabrielle de Paiva; GOULART, Maria Barbatho; MIRANDA, Kevin Costa; DA CONCEIÇÃO, Ruan Pina et al. Natural food dyes on dairy products: A critical approach between 2012-2023 literature regarding the technological and functional aspects, health benefits and future trends. online. **2024**, roč. 146. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104370>. [cit. 2024-12-09].
- [51] NIŤU, Cosmina. E141 food additive – copper complexes of chlorophylls. online. In: *InfoCons*. **2024**. Dostupné z: <https://infocons.org/blog/2024/05/30/e141-food-additive-copper-complexes-of-chlorophylls/>. [cit. 2024-12-05].

- [52] E141 - Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů. online. In: *FÉR POTRAVINA*. **2024**. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E141>. [cit. 2024-12-05].
- [53] Scientific Opinion on re-evaluation of copper complexes of chlorophylls (E 141(i)) and chlorophyllins (E 141(ii)) as food additives. online. *EFSA Journal*. **2015**, roč. 13, č. 6. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4151>. [cit. 2024-12-05].
- [54] Pheophytin Molecule. online. In: *World of Molecules*. **2016**. Dostupné z: <https://www.worldofmolecules.com/colors/pheophytin.htm>. [cit. 2024-12-14].
- [55] VALICSEK, Zsolt a HORVÁTH, Ottó. Application of the electronic spectra of porphyrins for analytical purposes: The effects of metal ions and structural distortions. online. *Microchemical Journal*. **2013**, roč. 107, s. 47-62. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.07.002>. [cit. 2025-02-18].
- [56] ALTMANN, Alexander; EDEN, Michel; HÜTTMANN, Gereon; SCHELL, Christian a RAHMANZADEH, Ramtin. Porphyrin-based sensor films for monitoring food spoilage. online. *Food Packaging and Shelf Life*. **2023**, roč. 38. ISSN 22142894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101105>. [cit. 2025-02-18].
- [57] PRATIWI, Rimadani; NGUYEN, Michael P.; IBRAHIM, Slamet; YOSHIOKA, Naoki; HENRY, Charles S. et al. A selective distance-based paper analytical device for copper(II) determination using a porphyrin derivative. online. *Talanta*. **2017**, roč. 174, s. 493-499. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.041>. [cit. 2025-02-18].
- [58] AMOS-TAUTUA, Bamidele; SONGCA, Sandile a OLUWAFEMI, Oluwatobi. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. online. *Molecules*. **2019**, roč. 24, č. 13. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>. [cit. 2024-11-27].
- [59] JIANG, Lu; GAN, Ching Ruey Raymond; GAO, Jian a LOH, Xian Jun. A Perspective on the Trends and Challenges Facing Porphyrin-Based Anti-Microbial Materials. online. *Small*. **2016**, roč. 12, č. 27, s. 3609-3644. ISSN 1613-6810. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sml.201600327>. [cit. 2024-11-27].
- [60] YANO, Shigenobu; HIROHARA, Shiho; OBATA, Makoto; HAGIYA, Yuichiro; OGURA, Shun-ichiro et al. Current states and future views in photodynamic therapy. online. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. **2011**, roč. 12, č. 1, s. 46-67. ISSN 13895567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>. [cit. 2025-02-19].

- [61] STOLL, Dwight R. a CARR, Peter W. Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial. online. *Analytical Chemistry*. **2017**, roč. 89, č. 1, s. 519-531. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03506>. [cit. 2025-02-24].
- [62] PIROK, Bob W. J.; STOLL, Dwight R. a SCHOENMAKERS, Peter J. Recent Developments in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Fundamental Improvements for Practical Applications. online. *Analytical Chemistry*. **2019**, roč. 91, č. 1, s. 240-263. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04841>. [cit. 2025-02-25].
- [63] CAÑO-CARRILLO, Irene; GILBERT-LÓPEZ, Bienvenida; MONTERO, Lidia; MARTÍNEZ-PIERNAS, Ana B.; GARCÍA-REYES, Juan F. et al. Comprehensive and heart-cutting multidimensional liquid chromatography–mass spectrometry and its applications in food analysis. online. *Mass Spectrometry Reviews*. **2024**, roč. 43, č. 5, s. 936-976. ISSN 0277-7037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.21845>. [cit. 2025-03-31].
- [64] TIRAPELLE, Monica; DUANMU, Fanyi; CHIA, Dian Ning; BESENHARD, Maximilian O.; MAZZEI, Luca et al. Method development of comprehensive two-dimensional liquid chromatography: A new metric for preliminary column selection. online. *Journal of Chromatography A*. **2025**, roč. 1741. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465593>. [cit. 2025-02-24].
- [65] MARLOT, Léa a FAURE, Karine. Preparative two dimensional separations involving liquid–liquid chromatography. online. *Journal of Chromatography A*. **2017**, roč. 1494, s. 1-17. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.031>. [cit. 2025-02-24].
- [66] 5.6 Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (2D-LC). In: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. Hradec Králové ; Klatovy : Lucie Nováková ;, **2013**, s. 251-260. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [67] DUGO, Paola; FAWZY, Nermeen; CICHELLO, Filomena; CACCIOLA, Francesco; DONATO, Paola et al. Stop-flow comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection for phospholipid analysis. online. *Journal of Chromatography A*. **2013**, roč. 1278, s. 46-53. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.042>. [cit. 2025-03-31].

- [68] STOL, Dwight R. 7. Introduction to Two-Dimension...matography - Theory and Practice. online. In: HOLČAPEK, Michal a BYRDWELL, Wm. Craig (ed.). *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*. AOCs Press, **2017**, s. 227-287. ISBN 978-1-5231-1445-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpHACMST01/cid:kt011HAEM1/viewerType:khtml//root_slug:7-introduction-to-two-dimensional-liquid-chromatography---theory-and-practice/url_slug:introduction-two-dimensional?b-toc-cid=kpHACMST01&b-toc-title=Handbook%20of%20Advanced%20Chromatography%20Mass%20Spectrometry%20Techniques&b-toc-url-slug=introduction-two-dimensional&view=collapsed&zoom=1&page=1. [cit. 2025-02-24].
- [69] CHEN, Yingzhuang; MONTERO, Lidia a SCHMITZ, Oliver J. Advance in on-line two-dimensional liquid chromatography modulation technology. online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, roč. 120. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115647>. [cit. 2025-02-24].
- [70] VONK, Rudy J.; GARGANO, Andrea F. G.; DAVYDOVA, Ekaterina; DEKKER, Henk L.; EELTINK, Sebastiaan et al. Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography with Stationary-Phase-Assisted Modulation Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry Applied to Proteome Analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. online. *Analytical Chemistry*. **2015**, roč. 87, č. 10, s. 5387-5394. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00708>. [cit. 2025-02-25].
- [71] CHAPEL, Soraya; ROUVIÈRE, Florent; PEPPERMAN, Vincent; DESMET, Gert a HEINISCH, Sabine. A comprehensive study on the phenomenon of total breakthrough in liquid chromatography. online. *Journal of Chromatography A*. **2021**, roč. 1653. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462399>. [cit. 2025-02-26].
- [72] STOLL, Dwight R.; SHOYKHET, Konstantin; PETERSSON, Patrik a BUCKENMAIER, Stephan. Active Solvent Modulation: A Valve-Based Approach To Improve Separation Compatibility in Two-Dimensional Liquid Chromatography. online. *Analytical Chemistry*. **2017**, roč. 89, č. 17, s. 9260-9267. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02046>. [cit. 2025-02-26].
- [73] CHAPEL, Soraya a HEINISCH, Sabine. Strategies to circumvent the solvent strength mismatch problem in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography. online. *Journal of Separation Science*. **2022**, roč. 45, č. 1, s. 7-26. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.202100534>. [cit. 2025-04-07].

- [74] STOLL, Dwight R.; HARMES, David C.; STAPLES, Gregory O.; POTTER, Oscar G.; DAMMANN, Carston T. et al. Development of Comprehensive Online Two-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Using Hydrophilic Interaction and Reversed-Phase Separations for Rapid and Deep Profiling of Therapeutic Antibodies. online. *Analytical Chemistry*. **2018**, roč. 90, č. 9, s. 5923-5929. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00776>. [cit. 2025-02-26].
- [75] FORNELLS, Elisenda; BARNETT, Brett; BAILEY, Mike; HILDER, Emily F.; SHELLIE, Robert A. et al. Evaporative membrane modulation for comprehensive two-dimensional liquid chromatography. online. *Analytica Chimica Acta*. **2018**, roč. 1000, s. 303-309. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.053>. [cit. 2025-02-28].
- [76] CHEN, Yingzhuang; LI, Junjie a SCHMITZ, Oliver J. Development of an At-Column Dilution Modulator for Flexible and Precise Control of Dilution Factors to Overcome Mobile Phase Incompatibility in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. online. *Analytical Chemistry*. **2019**, roč. 91, č. 15, s. 10251-10257. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02391>. [cit. 2025-03-01].
- [77] LÁNÍKOVÁ, Helena. Analýza porfyrinových potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Pardubice: Univerzita Pardubice, **2017**.
- [78] BLAŽÍČKOVÁ, Barbora. Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Pardubice: Univerzita Pardubice, **2022**.
- [79] NOVÁKOVÁ, Kateřina. Dvourozměrné separace přírodních barviv kapalinovou chromatografií. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Pardubice: Univerzita Pardubice, **2019**.
- [80] SOKOLOVÁ, Karin. Separace porfyrinových potravinářských barviv kapalinovou chromatografií. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020.

PŘÍLOHY

Tabulka P1: Testovací směs alkylbenzenů – izokratická analýza. t_R = retenční čas látky; $w_{0,5h}$ = šířka piku látky v polovině výšky; N_{izo} = účinnost kolony; $\log k$ = logaritmus retenčního faktoru k

Látka	Luna ® C18				Arion ® Bifenyl			
	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{izo}	$\log k$	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{izo}	$\log k$
Ac	1,991	0,096	2400		2,6	0,114	2867	
B	2,429	0,115	2481	-0,658	3,002	0,130	2961	-0,811
mB	3,109	0,099	5455	-0,251	3,125	0,0812	8207	-0,695
eB	3,574	0,123	4692	-0,0997	3,272	0,092	7012	-0,588
pB	4,188	0,135	5327	0,0427	3,405	0,105	5859	-0,509
bB	4,999	0,145	6568	0,179	3,592	0,109	6049	-0,419
aB	5,501	0,137	8997	0,246	3,939	0,1217	5809	-0,288

Látka	Kinetex F5 (redestil. voda/methanol)				Kinetex F5 (redestil. voda/acetonitril)			
	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{izo}	$\log k$	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{izo}	$\log k$
Ac	2,337	0,119	2149		2,383	0,122	2118	
B	2,873	0,154	1942	-0,639	2,977	0,155	2039	-0,603
mB	3,12	0,157	2204	-0,475	3,243	0,162	2230	-0,443
eB	3,363	0,155	2607	-0,358	3,501	0,163	2555	-0,328
pB	3,715	0,206	1803	-0,229	3,883	0,219	1743	-0,201
bB	4,177	0,206	2284	-0,104	4,38	0,221	2172	-0,0767
aB	4,761	0,240	2177	0,0159	4,986	0,255	2126	0,0384

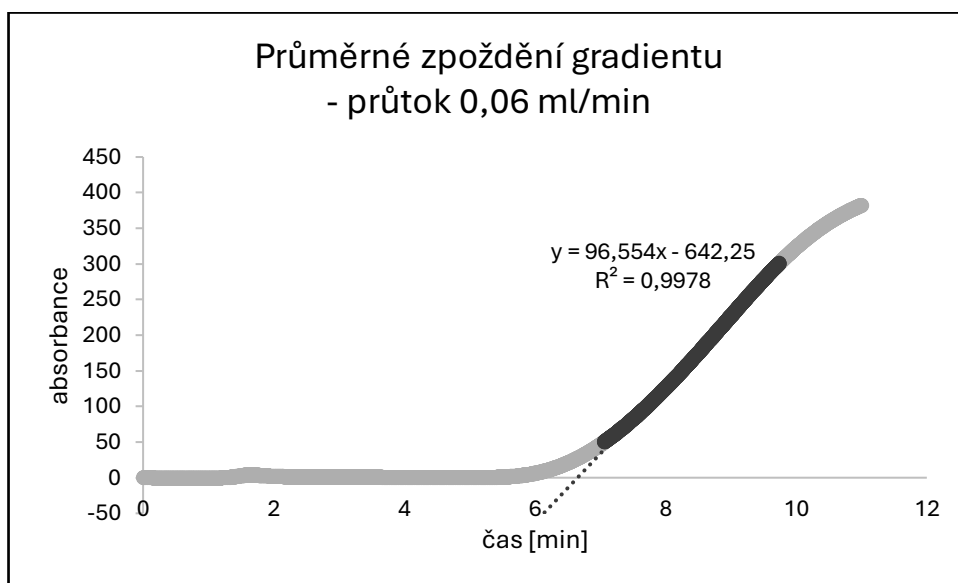
Tabulka P2: Testovací směs alkylbenzenů – analýza s koncentračním gradientem.
 t_R = retenční čas látky; $w_{0,5h}$ = šířka piku látky v polovině výšky; N_{grad} = účinnost kolony

Látka	Luna ® C18			Arion ® Bifenyl		
	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{grad}	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{grad}
Ac	2,191	0,093	3076	2,941	0,134	2655
B	5,147	0,162	5655	7,138	0,169	9951
mB	6,653	0,179	7678	8,009	0,183	10602
eB	7,719	0,177	10580	8,850	0,158	17329
pB	10,024	0,151	24676	9,621	0,162	19583
bB	11,008	0,139	35380	10,331	0,154	24890
aB	11,523	0,119	53146	11,222	0,133	39688

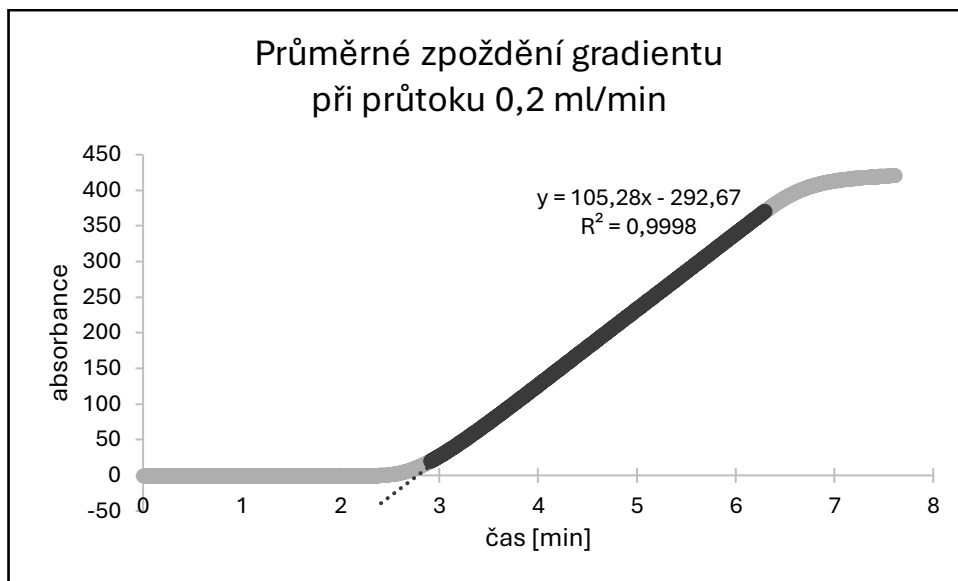
Látka	Kinetex F5 (redetil. voda/methanol)			Kinetex F5 (redetil. voda/acetonitril)		
	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{grad}	t_R [min]	$w_{0,5h}$ [min]	N_{grad}
Ac	4,226	0,424	551	2,5	0,314	978
B	4,998	0,305	1485	3,521	0,280	1073
mB	5,467	0,295	1911	3,995	0,26	1547
eB	6,533	0,278	3069	4,792	0,245	2244
pB	7,678	0,259	4858	5,404	0,240	2865
bB	8,713	0,264	6054	6,051	0,233	3956
aB	9,535	0,237	8998	6,652	0,223	4995

Tabulka P3: Píková kapacita kolon

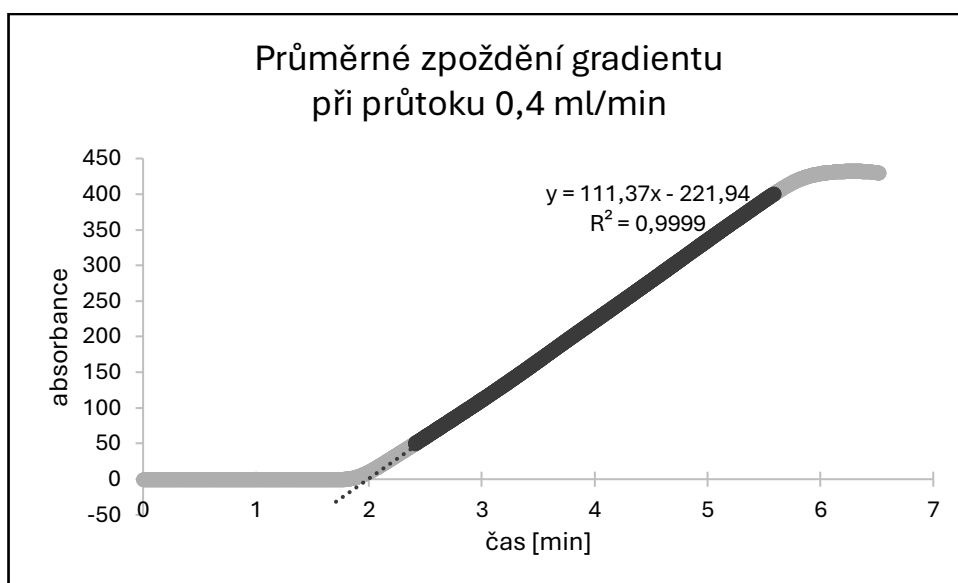
Kolona	Izokratický mód		Mód s koncentračním gradientem	
	Píková kapacita (n_p)	Průměrná píková kapacita (n_p , průměr)	Píková kapacita (n_p)	Průměrná píková kapacita (n_p , průměr)
Luna® C18	17,635	18,013	35,939	38,702
Arion® Bifenyl	8,086	8,327	31,009	32,215
Kinetex F5 (redestil. voda/methanol)	8,655	9,073	12,637	11,612
Kinetex F5 (redestil. voda/acetonitril)	8,903	9,269	10,864	10,536



Graf P1: Průměrné zpoždění gradientu při průtoku mobilní fáze: 0,06 ml/min; mobilní fáze: redestilovaná voda (A)/0,2% aceton v redestilované vodě; vlnová délka: 280 nm; koncentrační gradient: Tabulka 4



*Graf P2: Průměrné zpoždění gradientu při průtoku mobilní fáze: 0,2 ml/min;
mobilní fáze: redestilovaná voda (A)/0,2% aceton v redestilované vodě;
vlnová délka: 280 nm; koncentrační gradient: Tabulka 4*



*Graf P3: Průměrné zpoždění gradientu při průtoku mobilní fáze: 0,4 ml/min;
mobilní fáze: redestilovaná voda (A)/0,2% aceton v redestilované vodě;
vlnová délka: 280 nm; koncentrační gradient: Tabulka 4*