

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

Vliv kosmotropních a chaotropních činidel na separační
dynamiku glykosidů v HILIC

Bakalářská práce

Autor: Tereza Doležalová
Studijní program: B1407/Chemie
Studijní obor: 1407R005/Chemie
Vedoucí práce: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Hradec Králové

červenec 2020



Zadání bakalářské práce

Autor: Tereza Doležalová

Studium: S17CH106BP

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Název bakalářské práce: **Vliv kosmotropních a chaotropních činidel na separační dynamiku glykosidů v HILIC**

Název bakalářské práce AJ: Effect of cosmotropic and chaotropic agents on separation dynamics of glycosides in HILIC

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Předmětem této bakalářské práce je studium vlivu různých kosmotropních a chaotropních činidel na separaci vybraných glykosidů v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii (HILIC). Pro analýzu budou zvoleny například srdeční glykosidy vyskytující se v náprstníku červeném (*Digitalis purpurea*), které ovlivňují transport vápenatých iontů v srdečních svalových buňkách, a proto se využívají v léčbě srdeční slabosti. Kromě rostlinných glykosidů budou analyzovány např. glykosidy produkované bakteriemi.

Buszewski, B., Noga, S.:Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem*, 2012, 402:231-247.

Ikedo, Y. et al.: Quantitative HPLC analysis of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves, *J. Nat. Prod.*, 1995, 58(6):897-901.

Garantující pracoviště: Katedra chemie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Oponent: Mgr. Helena Řehulková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 27.6.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Tereza Doležalová

24. 7. 2020

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat **doc. Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D.**, za odborné vedení, ochotu, pomoc a čas, který mi věnoval při zpracování mé bakalářské práce a experimentálního výzkumu.

Také děkuji CBV Fakultní nemocnici HK za poskytnutí laboratoře a jejího vybavení.

Anotace

DOLEŽALOVÁ, T. *Vliv kosmotropních a chaotropních činidel na separační dynamiku glykosidů v HILIC*. Hradec Králové, 2020. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D. 81 s.

Předmětem této bakalářské práce je studium vlivu různých kosmotropních a chaotropních činidel na separaci vybraných glykosidů v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii (HILIC). Pro analýzu budou zvoleny například srdeční glykosidy vyskytující se v náprstníku červeném (*Digitalis purpurea*), které ovlivňují transport vápenatých iontů v srdečních svalových buňkách, a proto se využívají v léčbě srdeční slabosti. Kromě rostlinných glykosidů budou analyzovány např. glykosidy produkované bakteriemi.

Klíčová slova: Glykosidy, HILIC, HPLC, kosmotropy, chaotropy.

Annotation

DOLEŽALOVÁ, T. *Effect of cosmotropic and chaotropic agents on separation dynamics of glycosides in HILIC*. Hradec Králové, 2020. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D., 81 p.

Glycosides are substances which consist of a steroid aglycone and a carbohydrate. The subject of this bachelor thesis is study of the influence of various cosmotropic and chaotropic agents on the separation of selected glycosides in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). For the analyses, there will be included cardiac glycosides that occur in the foxglove (*Digitalis purpurea*). They are affecting calcium ion transport in cardiac muscle cells and are therefore used in the treatment of cardiac weakness. Other glycosides that will be selected are produced by actinomycetes as their secondary metabolites.

Keywords: Glycosides, HILIC, HPLC, kosmotropes, chaotropes.

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	10
1.1.1 Mobilní fáze	13
1.1.2 Stacionární fáze	14
1.1.3 Gradientová a isokratická eluce	15
1.1.4 Chromatografické veličiny a parametry v HPLC.....	16
1.1.5 Typy chromatografických systémů.....	21
1.1.6 Hmotnostní spektrometr (MS) a spojení s HPLC (LC-MS).....	28
1.2 Kosmotropní a chaotropní efekty	30
1.2.1 Iontová chaotropní a kosmotropní činidla.....	31
1.2.2 Neiontová kosmotropní a chaotropní činidla	33
1.2.3 Použití kosmotropních a chaotropních činidel v HILIC	33
1.2.4 Hydrotopy	34
1.3 Glykosidy.....	35
1.3.1 Kardiotonické glykosidy.....	35
1.3.2 Fenylobenzopyronové glykosidy	38
2 Cíl a metodologie práce.....	41
3 Praktická část	43
3.1 Použité chemikálie	43
3.2 Použité přístroje, pomůcky a počítačové programy	43
3.3 Příprava mobilních fází	45

3.4	Návrh analytických metod	46
3.5	Ověření čistoty a identity vzorků metod	46
3.6	Analýza vzorků glykosidů na koloně typu HILIC.....	47
3.7	Analýza vzorků glykosidů na koloně typu Luna-NH2 HILIC.....	50
3.8	Analýza vzorků glykosidů na koloně typu C18	61
4	Diskuze	70
	Závěr.....	73
	Seznam použitých zkratk.....	74
	Bibliografie	76

Úvod

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium vybraných glykosidů, jimiž jsou kardioglykosidy – digoxin a digitoxin, fenylobenzopyronové glykosidy – diosmin a quercitrin a glykosid produkovaný bakterií *Streptomyces niveus* – novobiocin.

Pro jejich analýzu byla využita hydrofilní kapalinová chromatografie a chromatografie na reverzní fázi za použití kolony C18. Tyto dva systémy byly mezi sebou porovnávány. Dále byl zkoumán vliv chaotropních a kosmotropních činidel se zaměřením na kvalitu separace a ovlivňování retenčních časů glykosidů.

Srdeční glykosidy digoxin a digitoxin byly na CBV Fakultní nemocnice Hradec Králové zkoumány v rámci výzkumu vývoje potenciálních léčiv rakoviny a Alzheimerovy nemoci. Byly identifikovány jako možné inhibitory cathepsinu B, který se podílí na tvorbě patologické formy amyloidu beta a je nadměrně exprimován v tumorech. Odborníci v CBV zamýšleli pomocí analytické metody HDX ověřit vazebný mód glykosidů digoxinu a digitoxinu a cathepsinu B. Proto byly tyto glykosidy do bakalářské práce zahrnuty, s cílem blíže prostudovat jejich analytické vlastnosti. Ostatní glykosidy byly zahrnuty do těchto studií jako strukturní analoga uvedených srdečních glykosidů.

Systém HILIC byl zvolen, protože se jedná o poměrně novou techniku kapalinové chromatografie a z důvodu polárního charakteru glykosidů byla předpokladem jejich účinná separace právě touto metodou. Mechanismus a vliv kosmotropních a chaotropních činidel na separaci v kapalinové chromatografii stále nebyl plně objasněn, a proto byla také podstatná část analýz v bakalářské práci věnována studiu jejich působení na vybrané glykosidy.

Práce je členěna do dvou částí – teoretické a experimentální. V teoretické části je popsána vysokoúčinná kapalinová chromatografie, její charakteristika, typy chromatografických systémů, jejich výhody a nevýhody, volba vhodných mobilních a stacionárních fází a princip gradientové a isokratické eluce. Tato část se zabývá také problematikou kosmotropních a chaotropních činidel s bližším zaměřením na jejich působení v HILIC. Následuje kapitola o glykosidech obecně a jejich klasifikaci se zacílením na konkrétních pět glykosidů použitých při analýze.

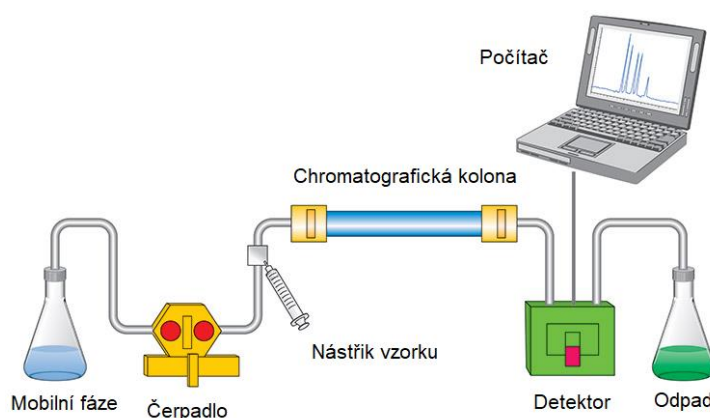
Experimentální část je zaměřena na tvorbu vhodných metod pro separaci glykosidů, porovnání systémů HILIC a RP-LC při analýze a vliv kosmotropních a chaotropních činidel na retenční časy studovaných látek. Součástí této části práce jsou tabulky s výsledky a chromatografy jednotlivých analýz.

1 Teoretická část

1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli High Performance Liquid Chromatography (HPLC)¹ je převládající separační technikou v moderní farmaceutické a biomedicínské analýze [1], která využívá odlišného rozdělování látek ze směsi mezi dvěma fázemi – mobilní, kapalnou fází (MF) a stacionární fází (SF), kterou tvoří buď pevná látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. U tohoto typu kapalinové chromatografie je MF přiváděna do kolony za vysokého tlaku prostřednictvím čerpadla [2]. Kapalinová chromatografie je používána pro analýzu pevných a kapalných látek či roztoků, které jsou rozpustné v MF, a nesmí se nevratně vázat na SF [3]. Je vhodná například pro netěkavé organické látky, léčiva, metabolity nebo toxická residua [1].

Základními komponenty kapalinového chromatografického systému jsou (viz. Obr. 1): zásobníky mobilní fáze, odplyňovač, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku – autosampler či manuální dávkovací ventil, chromatografická kolona, termostat, detektor a počítač se softwarem pro vyhodnocení dat [4].

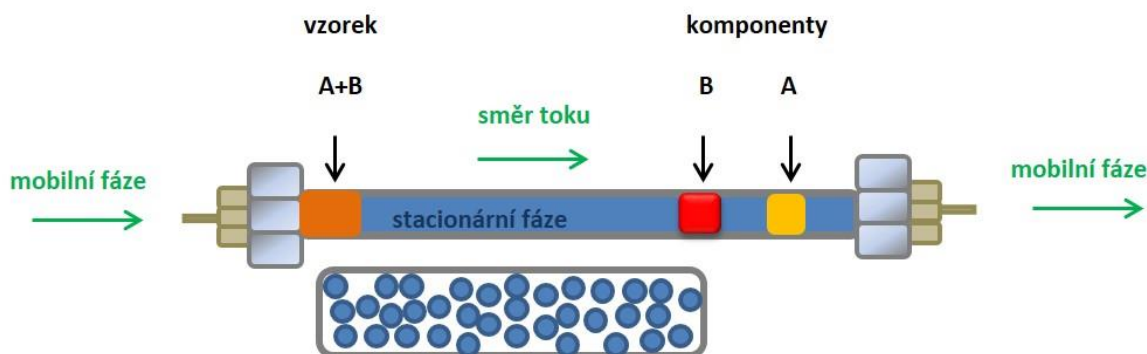


Obr. 1 Schématické zobrazení nejdůležitějších částí HPLC. Převzato z internetu a upraveno [5].

Složky vzorku pro HPLC analýzu musí mít rozdílnou chemickou strukturu a odlišnou afinitu k mobilní a stacionární fázi, díky čemuž jsou rozdílně distribuovány mezi oddělené fáze, a tím dochází k separaci. Látka s vyšší afinitou k SF je při průtoku mobilní fáze více zadržována v chromatografické koloně, má relativně vyšší retenci

¹ V současné době se pro označení vysokoúčinné kapalinové chromatografie používají různé zkratky, které buď zdůrazňují vysokou účinnost této metody na HPLC přístrojích poslední generace (např. UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography), nebo se omezují jen na vyjádření typu chromatografie (např. LC, Liquid Chromatography).

a vychází z analytického systému tedy za delší dobu. Při postupu kolonou jsou mezi vzorkem, stacionární fází a mobilní fází vzájemně ustanovovány dynamické rovnováhy na základě různých ne vazebných interakcí – hydrofobní, elektrostatické, vodíkové vazby, halogenové vazby nebo interakce s přenosem náboje (např. π - π interakce) [6]. Tyto rovnováhy se v odborné literatuře charakterizují např. Freundlichovou nebo Lugmuirrovou adsorpční isothermou, ačkoli jsou prouděním mobilní fáze narušeny a složky vzorku jsou uvolněny ze stacionární do mobilní fáze [3]. (Obr. 2 níže)



Obr. 2 Separace vzorků na koloně. Převzato z internetu [7].

K separaci látek dochází uvnitř chromatografické kolony. Ta je složena z těla kolony a z koncovek s fritami. Vyrábí se nejčastěji z nerezové oceli, popřípadě může být použito speciálně tvrzené sklo nebo polyetherketon [2]. Rozměry kolony se pohybují okolo 3 až 25 cm délky, s průměrem 4 až 8 mm [3]. Musí být odolná vůči chemickému působení mobilních fází, vůči vysokému tlaku, a její vnitřní povrch musí být pro rychlejší tok MF co nejhladší. [2] V současné době existuje celá řada různých materiálů a technologických postupů pro výrobu stacionárních fází. O stacionárních fázích bude více pojednáno v dalších kapitolách.

Protože chromatografická kolona má pro funkci HPLC zásadní důležitost, bývá chráněna předkolonou, která představuje krátkou kolonu se stejnou SF, jako má hlavní kolona [3]. K ochraně chromatografické kolony před mechanickým poškozením lze rovněž použít in-line filtr s kovovou fritou.

Za chromatografickou kolonou se nachází detektor. Ten zaznamenává rozdíl v odezvě při průchodu čisté MF a při průchodu MF s analytem. Detektory můžeme dělit několika způsoby:

1) Na koncentrační a hmotnostní detektory.

U koncentračního detektoru (např. spektrofotometrický detektor) dochází k odezvě detektoru **R** v závislosti na změně koncentrace solutu, resp. analytu, v eluátu.

Odezva není závislá na rychlosti MF při vstupu do detektoru a může být matematicky vyjádřena jako (1):

$$R = k_1 c_M \quad (1)$$

(k_1 je konstantou úměrnosti)

Hmotnostní detektor (např. detektor rozptylu světla) je závislý na změně hmotnostního toku do detektoru a jeho odezvu lze vyjádřit vztahem (2). Při změně rychlosti MF dochází pouze ke změně výšky píku, plocha píku je stejná.

$$R = k_2 \left(\frac{dm}{dt} \right) \quad (2)$$

2) Na destrukční a nedestrukční systémy. U destrukčních detektorů dochází k nevratné chemické změně analytu. Zařadit do této skupiny můžeme třeba hmotnostně spektrometrický detektor nebo plamenový fotometrický detektor.

3) Na univerzální a selektivní detektory. Univerzální detektory mají nižší citlivost a patří k nim refraktometrický detektor, ELSD (odpařovací detektor rozptylu světla) a CAD (detektor nabitého aerosolu). K selektivním detektorům patří UV-VIS detektor, fluorescenční detektor nebo vodivostní detektor.

Také využíváme tzv. spojené techniky, kdy je k HPLC připojena nezávislá analytická technika, mezi níž patří MS (hmotnostní spektrometr, viz. podkapitola 1.1.6), infračervený detektor a NMR (spektroskopie nukleární magnetické resonance) [2].

Mezi nejpoužívanější detekční systémy v kapalinové chromatografii patří ty se spektrometrií snímající oblast ultrafialového (190-400 nm) a viditelného světla (400-800 nm). Může jím být dvoupraprskový UV-VIS detektor s monochromátorem a filtry u něhož je výhodou, že podmínky detekce mohou být optimalizovány přímo pro danou látku, podle jejího absorpčního maxima.

Dalším druhem je DAD detektor (detektor s diodovým polem), který látky detekuje pomocí fotodiod, z nichž každá je nastavena na konkrétní vlnovou délku použitého rozsahu. Zaznamenává tedy jak absorbanci na jednotlivých vlnových délkách, tak celé absorpční spektrum najednou. K snímání signálu tak dochází velmi rychle [8].

Spojení LC/UV-VIS umožňuje látky identifikovat, ověřovat účinnost separace chromatografických píků a zjišťovat případnou koeluci látek v jednu píku pomocí spektrální analýzy. Výsledné spektrogramy mohou být porovnány s knihovnou spekter.

Citlivost detektoru je snížena kolísáním odezvy detektoru, tzv. šumem, který je způsoben více faktory, například nestabilitou detektorové lampy, kolísáním teploty, nebo změnami elektrického signálu [2].

Detektor	selektivita	citlivost
Refraktometrický (RID)	neselektivní univerzální	malá
spektrofotometrický (UV, UV/VIS)	selektivní	dosti vysoká
fluorimetrický (FLD)	velmi selektivní	velmi vysoká
amperometrický (elektrochemický, ECD)	velmi selektivní	velmi vysoká
vodivostní	neselektivní	vysoká
hmotnostní spektrometr (MS)	univerzální a velmi selektivní	velmi vysoká

Obr. 3 Přehled druhů detektorů používaných v LC. Převzato z internetu [9].

1.1.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze (MF) je uložena v zásobníku s filtry, které zachytí případné tuhé částice a nečistoty před vstupem do systému [2]. Je tvořena čistým rozpouštědlem, nebo směsí polárnějšího a méně polárního rozpouštědla, které jsou vzájemně mísitelné. Právě polarita MF ovlivňuje retenci jednotlivých složek vzorku, a tím i jejich separaci [3]. Podle míry schopnosti mobilní fáze oddělit analyt za daných podmínek od stacionární fáze lze rozpouštědla seřadit do tzv. eluční řady. Rozpouštědla s různou eluční silou se během vývoje HPLC metody kombinují tak, aby bylo dosaženo co nejvýhodnější separace látek ve zkoumaném vzorku.

Aby separace analytů v HPLC proběhla správně, je potřeba mobilní fázi odplynit. V opačném případě může dojít ke kolísání tlaku v systému a k ovlivnění signálu detektoru uvolněnými bublinkami plynu (např. vzduchu). Odplynění se může provést probubláváním heliem v zásobníku MF, vložením láhve s mobilní fází do ultrazvukové lázně nebo vakuovým degaserem, kdy MF prochází přes polopropustnou kapiláru uloženou ve vakuové komoře, která propouští pouze plyny [2; 3]

Mobilní fáze je v HPLC systému transportována vysokotlakým čerpadlem, které musí zajistit plynulý průtok MF v rozmezí 0,01 až 10 ml/min [3]. Běžná jsou čerpadla s vysokotlakým a nízkotlakým mícháním složek mobilních fází. V současné praxi se dále používají speciální čerpadla, která jsou schopná regulovat průtok mobilní fáze v řádu nanolitrů za minutu (např. chromatografické LC systémy pro proteomické analýzy).

1.1.2 Stacionární fáze

Jedná se o nepohyblivou složku v podobě tuhé látky nebo filmu kapaliny na tuhé matici, tzv. nosiči [2]. Stacionární fáze, takzvaný sorbent, se nachází v podobě drobných částic uložených v chromatografické koloně, kterou protéká kapalná mobilní fáze [10]. Musí být chemicky i tepelně stabilní a nesmí být mísitelná s MF, aby nedocházelo k jejímu vymývání z kolony [11].

Stacionární fáze se dříve dělily podle skupenství na kapalnou a tuhou. V dnešní době existuje vícero dělení. Člení se například na fáze polární, nepolární a obojetné (amfoterní, zwitterionty) nebo podle použitého módu separace, na fáze normální, reverzní, stacionární fáze pro hydrofilně interakční kapalinovou chromatografii (HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography), stacionární fáze pro hydrofobní interakční chromatografii (HIC, hydrophobic interaction chromatography), ionexy, gely, afinitní a chirální. Dále mohou být tříděny podle svého chemického složení na anorganické oxidy (např. silikagel), na fáze chemicky vázané na bázi silikagelu, polymerní fáze, hybridní stacionární fáze a fáze na bázi grafitového uhlíku [2].

Kvůli snahám, o co nevyšší zefektivnění separace, došlo k vývoji nových stacionární fází. V současnosti se proto SF člení také na core-shell, poro-shell a monolitické kolony. Monolitické kolony jsou tvořeny stacionární fází z jednoho kusu porézního materiálu s určitou velikostí pórů.

Částicové SF se potom mohou skládat z monodisperzních částic (pore shell), u kterých snaha o jejich zmenšení velikosti může přinést vyšší účinnost separace, ale spolu s tím dochází ke zvýšenému zpětnému tlaku. Aby se docílilo rychlé separace, je možné zvýšit průtok MF, čímž tento tlak poklesne. Za tímto účelem byla vyvinuta ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), u které jsou však, kvůli velmi vysokému provoznímu tlaku kladeny, mnohem přísnější požadavky na čerpací a průtokový systém.

Proto byly vyvinuty tzv. core-shell částice (povrchově porézní částice), viz Obr. 4 níže. Jsou to částice s pevným jádrem a pórovitým nebo s povrchově porézním obalem. Tím, že se skládají z pevného jádra a obalu, mají větší velikost, a proto tvoří menší protitlak, zatímco jejich porézní obal a malé pevné jádro poskytují větší povrch pro separaci. Se ztenčující se vrstvou porézního pláště dochází k rychlejšímu přenosu hmoty a ke zlepšené účinnosti kolony [12].



Obr. 4 Částice Kinetex™ s pevným jádrem. Převzato z internetu a upraveno [13].

Částicové stacionární fáze jsou charakterizovány několika parametry, mimo jiné jsou to: tvar částic, průměrná velikost částic d_p [μm], efektivní plocha povrchu [m^2/g], obsah uhlíku, průměrná hodnota velikosti pórů [Å] a rozsah pH, při kterém je fáze stabilní [2; 14].

1.1.3 Gradientová a isokratická eluce

Složení mobilní fáze může být v průběhu separace konstantní, kdy se jedná o tzv. isokratickou eluci, nebo se její složení může během analýzy měnit, a potom hovoříme o eluci gradientové.

Pokud mají separované složky podobné chemicko-fyzikální vlastnosti, tzn. podobné hodnoty K_D , (viz. Podkapitola 1.1.4) je vhodné použít metodu isokratickou. V opačném případě je výhodnější metoda gradientová, kdy se složení MF mění v průběhu eluce ve prospěch „silnějšího“ eluentu, a dochází tak k narůstání eluční síly a zrychlení pohybu analytu vzhledem ke stacionární fázi [2].

Instrumentace HPLC pro gradientovou eluci je komplexnější v porovnání s isokratickou elucí, ale má také řadu výhod. Základním principem gradientové eluce je kombinace dvou a více mobilních fází, jejichž vzájemný poměr se v čase mění podle uživatelem nastaveného gradientového programu. Často se také používá chemický modulátor (popř. aditivum) přidávaný do MF k úpravě síly eluentu pro lepší výsledky separací. Oproti isokratické eluci dochází ke zvyšování nebo snižování eluční síly mobilní fáze, popř. i koncentrace modulátoru, v čase, a proto lze gradientovou eluci použít pro separaci složek s širokou škálou retence, aniž by došlo ke ztrátě rozlišení [1]. Při aplikaci isokratické eluce dochází s rostoucí retencí k rozšiřování píků, zatímco při gradientové eluci zůstává šířka píků téměř

konstantní pro všechny analyzované složky [2]. Gradientová eluce tedy umožňuje dosáhnout vysoké separační účinnosti a citlivosti, a zároveň realizovat analýzu za relativně krátkou dobu. Nejběžnějším případem gradientové eluce je lineární gradientový program. V menší míře se dále využívají nelineární gradientové programy (např. konvexní, konkávní) nebo vícestupňové gradientové programy.

Gradientová eluce tedy tvoří v porovnání s isokratickou elucí vyšší píky v kratším separačním cyklu. Z těchto důvodů se gradientová eluce široce používá v HPLC pro separaci různých analytů, ať jsou to makromolekuly, jako jsou například proteiny, nebo komplikované směsi malých molekul a vícesložkové vzorky, které pokrývají široký rozsah retence.

V gradientové eluční chromatografii dochází smícháním dvou nebo více mobilních fází často k tvorbě vzduchových bublin, které se poté zachycují v uzavřeném směšovači, což může vést ke zkreslení tvaru gradientu. Mobilní fáze se tedy musí nejprve odplynit, například vakuovým odplyňovačem (degaserem). Při míchání složek mobilních fází může též docházet k výrazným změnám viskozity nebo se může uvolňovat teplo. Též je nutné vzít v úvahu, že některé typy složek mobilních fází je možné kombinovat jen do určitého poměru, aby mobilní fáze zůstala homogenní směsí.

Po ukončení předchozího gradientového cyklu musí být kolona před další injekcí vzorku znovu ekvilibrována počátečním složením mobilní fáze. V opačném případě by došlo k proměnlivé eluci a nereprodukovatelnému rozdělení složek vzorku v následujícím gradientovém cyklu [1]. Na rozdíl od isokratické eluce je nutné dbát na to, aby byl chromatografický systém před nástřikem vzorku při sekvenčních analýzách vždy uveden do stejného, rovnovážného stavu.

1.1.4 Chromatografické veličiny a parametry v HPLC

Detektor zaznamenává separované látky, které vycházejí z kolony a tyto signály jsou graficky vyjádřeny chromatogramem. Tento chromatografický záznam je v ideálním případě tvořen elučními křivkami gaussovského tvaru, tzv. píky [2].

Píky jsou charakterizovány několika parametry, k nimž v první řadě patří:

- retenční čas t_R a retenční objem V_R

t_R je kvalitativní charakteristikou látky a představuje čas uplynulý od nástřiku vzorku k dosažení maxima signálu píky v detektoru. V_R je objem, který za tento čas proteče kolonou. Tyto dvě veličiny lze vyjádřit vztahem $V_R = t_R F$, kde F představuje objemový průtok MF.

- mrtvý retenční čas t_M a mrtvý retenční objem, tzv. void volume V_M .

Mrtvý retenční čas je retenční čas látky, která se nezadržuje na koloně, protože prakticky nemá žádnou afinitu k SF. Pokud odečteme hodnotu V_M nezadržované látky změřené v přítomnosti kolony od V_M této látky naměřené bez kolony, která byla nahrazena kolonovou spojkou, získáme hodnotu mrtvého objemu kolony V_M , col.

- dwell time neboli čas zpoždění

Parametr definující zpoždění mezi naprogramovaným a reálným gradientem. Odpovídá mrtvému objemu mezi směšovačem MF a dávkovacím zařízením.

- šířka píku u základny w_b .

Šířku píku lze počítat na tzv. základní linii w_b , v polovině výšky píku $w_{0,5}$ nebo mezi inflexními body píku w_{infl} . Tato veličina má stejné jednotky jako retenční čas (sekundy nebo minuty), nebo je vyjádřena v jednotkách délky (milimetry, centimetry) [15].

- výška píku h_{max}

Představuje kvantitativní charakteristiku látky a jedná se o rozdíl mezi hodnotou signálu detektoru ve vrcholu píku na chromatogramu a hodnotou signálu základní linie v příslušném retenčním čase t_R .

- plocha píku

Tento parametr je nejužívanější kvantitativní charakteristikou látky v HPLC a v případě ideálního gaussovského píku je lineární matematickou funkcí výšky píku h_{max} . Dominantní využití tohoto parametru v praxi je dána především tím, že absolutní množství detekovaného analytu v průběhu času je dáno právě plochou píku v chromatogramu a tím, že chromatografické píky často nebývají dokonale gaussovské, aby bylo možné ke kvantifikaci jednoduše využít výšku píku. Plocha píku se určuje metodou numerické integrace okamžité hodnoty signálu detektoru vůči času, přičemž velikost dílčích integračních příspěvků je závislá na aktuální koncentraci sledovaného analytu v detektoru. V případě klasického

spektrofotometrického detektoru je hodnota signálu detektoru jakožto absorbance lineárně závislá na koncentraci analytu², jak udává Lambertův-Beerův zákon. [16].

- asymetrie píku

Je to veličina, která je ukazatelem charakteru chromatografické separace. Pík je symetrický, pokud je vztah koncentrace látky B ve stacionární fázi $c(B)_{SF}$ a v mobilní fázi $c(B)_{MF}$ lineární [3]. Jak zmiňuje Nováková ve své knize Moderní HPLC separace v teorii a praxi [2], asymetrii píků lze vyjádřit dvojitým způsobem – buď faktorem chvostování T_f , nebo faktorem asymetrie A .

T_f představuje podíl šířky píku v 5 % jeho výšky, ku dvojnásobku šířky vzestupné části píku (1):

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (1)$$

A je poměrem šířky sestupné části eluční křivky t a její vzestupné části f , nejčastěji v 5 nebo 10% výšky (2):

$$A = \frac{t}{f} \quad (2)$$

Pík má ideální symetrii, pokud je hodnota A rovna jedné. Pokud je $A > 1$, říkáme, že pík chvostuje a pokud je $A < 1$, pík frontuje. [2]

Mezi A a T_f platí vztah (3):

$$A = 2T_f - 1 \quad (3)$$

Kromě výše uvedených matematických definic se užívají i další varianty výpočtů asymetrie píku, které bývají dány např. autory různých chromatografických softwarů.

² Tyto jednoduché vztahy platí pro případ, kdy odezvu detektoru působí specificky jen sledovaný analyt. Pokud dochází např. ke koeluci analytů nebo se mění signál pozadí, jsou tyto vztahy složitější.

Vyjádření účinnosti kolony

Účinnost kolony lze kvantitativně vyjádřit 2 parametry, kterými jsou počet teoretických pater N a výška teoretického patra H [3]. Mají mezi sebou vztah definovaný (4):

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

L je délkou chromatografické kolony

- Počet teoretických pater je vyjádřen vztahem (5):

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 4 \left(\frac{t_R}{w_{infl}}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (5)$$

Takto vyjádřená účinnost je závislá na retenčním čase látky a ze vztahu je zřejmé, že s rostoucí šířkou píku klesá.

Účinnost separace může být negativně ovlivněna tzv. rozmýváním eluční zóny, které je způsobeno aditivními kinetickými ději – vířivou difúzí, podélnou molekulární difúzí a odporem proti přenosu hmoty v mobilní a stacionární fázi. Čím delší dobu setrvává látka ve SF, tím více je těmito ději ovlivňována.

Vířivá difúze je způsobena nehomogenní SF. Různé molekuly MF spolu se separovanými látkami protékají kolonou se stejnou rychlostí ale různými drahami, takže se vzájemně předbíhají a opožďují.

Podélná vířivá difúze je proces, při němž se molekuly solutu pohybují ve směru koncentračního spádu případně i proti toku MF. K tomuto jevu dochází spíše při nízkém průtoku mobilní fáze, ale při průtoku běžném pro HPLC je jeho příspěvek zanedbatelný.

Odpor proti přenosu hmoty je dán adsorpční kinetikou a převodem hmoty uvnitř částice. Je ovlivňován zejména druhem částic SF – jejich tvarem a velikostí. Převod hmoty mezi fázemi ovlivňuje především difúze látek různě hluboko do pórů částic SF a také rychlost proudění mobilní fáze, která se liší u stěny kolony a ve středu kapiláry [2].

Tyto kinetické vlivy jsou matematicky vyjádřeny rovnicemi dynamické van Deemterovy teorie. Tato teorie dokazuje, že tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H závisí na několika technických parametrech stacionární fáze a lineární rychlosti proudění MF. Součet jednotlivých příspěvků tedy ovlivňuje celkové rozmytí eluční zóny a můžeme jej vyjádřit souhrnnou rovnicí (6):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (6)$$

(**A** je faktorem vířivé difúze, **B** je faktor podélné vířivé difúze, **C** je faktor odporu proti přenosu hmoty a **u** je lineární rychlost MF)

Čím je veličina H vyšší, tím má chromatografický systém nižší účinnost separace, neboť v takovém případě jsou píky relativně široké a mají relativně vysoký retenční čas. Cílem optimalizace parametrů chromatografické metody je dosáhnout co nejnižší hodnoty H .

Popis selektivity a separace látek

- rozdělovací konstanta K_D

Distribuci složek mezi fáze (rovnováhu analytu s MF a SF) můžeme popsat rozdělovací (distribuční) konstantou K_D , která popisuje poměr koncentrace složky ve SF a v MF (7):

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (7)$$

Proto, aby bylo možné látky separovat pomocí kapalinové chromatografie, je potřeba, aby měly rozdílné hodnoty této konstanty. Z výše uvedeného vztahu plyne, že čím vyšší má daná látka hodnotu K_D , tím delší dobu setrvává ve SF, a má tedy vyšší retenci. V závislosti na použitých MF a SF může být konkrétní analyt charakterizován rozdílnými hodnotami K_D [17].

- Retence je vyjadřována pomocí retenčního (popř. kapacitního) faktoru k .

Pomocí tohoto faktoru můžeme vyjádřit retenční objem (čas) látek (8), (9):

$$V_R = V_M(1 + k) \quad (8)$$

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (9)$$

- separační faktor (selektivita) α

Je vyjádřen pomocí retenčních faktorů k jednotlivých složek (10):

$$\alpha = \frac{k(B)}{k(A)} \quad (10)$$

- rozlišení R

Je definováno pomocí retenčních časů a šířek píků u základny daných složek (11):

$$R = \frac{t_R(B) - t_R(A)}{0,5(w_b(A) + w_b(B))} \quad (11)$$

Pokud je hodnota $R \geq 1,5$ znamená to, že látky A a B byly kompletně odděleny. [3] Je-li R nižší než 1,5, píky nejsou oddělené k základní linii a dochází v různé míře k nežádoucí koeluci.

1.1.5 Typy chromatografických systémů

HPLC s normální fází - NP-HPLC

V tomto systému, který představoval hlavní separační techniku až do 70. let minulého století, je používána polární stacionární fáze (např. silikagel) a méně polární mobilní fáze. Se vzrůstající polaritou separovaných látek se zvyšuje jejich retence na koloně.

Na retenci polárního analytu na normální fází má vliv jak polarita analytu, tak i tvorba intermolekulárních vodíkových vazeb. Obecně lze říci, že retenci látky ovlivňuje dostupnost akceptorů a donorů vodíkových vazeb, pomocí kterých interagují separované analyty se stacionární a mobilní fází. Velmi důležité je geometrické rozložení funkčních skupin v molekule analytů a jejich ionizovatelnost. Tyto interakce mezi látkou a sorbentem působí na krátké vzdálenosti a dochází u nich k tvorbě vodíkových vazeb či elektrostatických sil. Na polaritu aromatických uhlovodíků navíc působí konjugační, indukční a mezomerní efekty mezi aromatickým jádrem a danou funkční skupinou [2].

Dalšími faktory ovlivňujícími retenci jsou sterické efekty. U polohových isomerů jsou silněji zadržovanými látkami isomery cis, v důsledku rozdílných adsorpčních energií. Objemné funkční skupiny naopak snižují retenci stíněním polárních skupin v molekule.

Používanými stacionárními fázemi pro NP-HPLC jsou silikagel, nebo jeho modifikace s navázanými polárními funkčními skupinami, např. diolová, kyanová, kyanopropylová, či nitroskupina [2].

Silikagel je polární anorganický sorbent amorfni formy $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$. Voda vázaná na silikagel tvoří silanolové SiOH skupiny umístěné na jeho povrchu. Za vysoké teploty může dojít k dehydrataci a k odstranění těchto silanolových skupin [18].

U mobilní fáze v NP-HPLC je důležitým faktorem obsah vody. S rostoucím podílem vody adsorbované na povrch sorbentu klesá jeho aktivita, protože voda se váže na nejaktivnější místa, a snižuje se tak retence látek. Tím dochází také k zhoršené selektivitě dělení. Obsah vody v mobilní fázi by tedy měl být minimální, aby došlo

k ustálení rovnováhy mezi obsahem H₂O v MF a obsahem vody adsorbované na povrchu. Nejčastěji jsou využívány dvousložkové mobilní fáze s různou polaritou [2].

Tento chromatografický systém je efektivní metodou pro separaci neiontových a středně polárních sloučenin, zejména pro lipofilní vzorky, které jsou na reverzní stacionární fázi (RP-LC) příliš zadržovány. Vhodná je také například pro separaci tříd fosfolipidů, za použití silikagelové stacionární fáze v kombinaci s mobilní fází chloroform-methanol-voda, acetonitril – methanol – voda, nebo hexan – isopropanol – voda [19]. Často také oproti RP-LC nabízí dokonalejší separaci polohových isomerů nebo stereoizomerů, a proto je NP-LC často používána pro separaci enantiomerů na chirálně vázaných stacionárních fázích (např. na bázi celulózy) [20].

HPLC s reverzní fází – RP-HPLC (HP-RPC)

Jak již bylo zmíněno výše, NP-HPLC byly omezeny na separaci relativně nepolárních vzorků, za použití nevodných mobilních fází. Také použití gradientových elucí touto metodou bylo obtížné, a kvůli problémům s udržení aktivity adsorbentu dané změnou polarity MF, obecně nereprodukovatelné.

Vývoj tzv. chemicky vázaných stacionárních fází reverzního chromatografického systému RP-LC umožnil eliminaci mnoha problémů spojených se separací pomocí NP-LC. U těchto stacionárních fází jsou na povrch nosiče navázány organické ligandy, díky nimž mají nepolární charakter.

K prvním stacionárním fázím pro RP-LC patřily silikagelové nosiče modifikované esterifikací silanolových skupin SiOH alkoholem přímo, nebo chlorací nosiče thionylchloridem a následnou reakcí s alkoholem. Tyto stacionární fáze však mají špatnou hydrolytickou stabilitu, a proto se v dnešní době používají kolony se stacionární fází založenou na siloxanech (SiOSiC).

Nejčastěji používané jsou kolony se stacionární fází s navázanými lineárními oktadecylsilanovými skupinami, tzv. C18. Tyto kolony jsou hydrolyticky stabilní a vykazují vysokou účinnost separace díky rychlému přenosu hmoty. Další výhodou SF s ligandem C18 je její vyšší stabilita při nízkém i vyšším pH v porovnání s ligandy kratších řetězců, která zajišťuje reprodukovatelnost separace.

SF s dlouhými alkylovými řetězci o velké hustotě (zejména C18 a delší) však mohou představovat problém při použití vysoce vodných mobilních fází, protože může dojít k tzv. fázovému kolapsu, kdy je významně snížena účinnost kolony a dochází k změnám v retenci a k tvorbě nesymetrických píků. [21].

RP-HPLC separuje sloučeniny na základě jejich relativní nepolarity respektive hydrofobicity. Nejakceptovanější teorie retenčního mechanismu je založena na

solvofobní teorii popisující hydrofobní interakce mezi nepolárním povrchem analytu a nepolární stacionární fází. Velmi užitečným prostředkem, kterým lze posoudit retenci analytů na RP-HPLC jsou veličiny $\log P$ a $\log D$. Je-li $\log P$ či $\log D$ látky vyšší, lze predikovat též její vyšší kapacitní faktor k při separaci v RP-HPLC režimu.

Mobilní fáze používaná v RP-HPLC má polární charakter a obsahuje vodnou i organickou složku. Organická složka podporuje eluci látky a používá se jako modifikátor povrchového napětí.

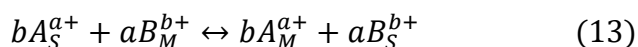
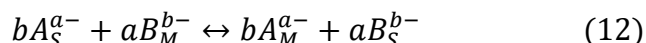
Použitá organická rozpouštědla musí být dokonale mísitelná s vodou, jako například metanol, etanol, acetonitril (ACN), *n*-propanol či tetrahydrofuran (THF). Také mohou být přidány další modifikátory a aditiva na úpravu pH či iontové síly.

Díky své univerzálnosti a flexibilitě lze RP-HPLC použít i pro složitější směsi molekul, například při separaci sekundárních metabolitů, jelikož většina sekundárních metabolitů je vždy do jisté míry hydrofobní povahy (glykosylované flavonoidy a další fenolové sloučeniny) [22].

Jako reverzní fázi můžeme také použít například fázi PFP neboli pentafluorfenylpropylovou fázi, která vykazuje vysokou selektivitu pro aromatické látky. Na této fázi dochází s vhodnou analyzovanou látkou k π -donorovým a π -akceptorovým interakcím. Separace se podobá té na fázi C18, pouze je potřeba použít mobilní fázi se slabší eluční silou. Její výhodou je, že může být použita i 100% vodná MF, aniž by došlo ke zhroucení SF a může být aplikována i pro HILIC separaci [2].

IEC (Iontově výměnná chromatografie, chromatografie na měničích iontů)

Tato separační metoda využívá silných elektrostatických interakcí mezi ionizovanými funkčními skupinami SF (měniče) a opačně nabitými ionty nacházejícími se v okolním prostředí roztoku. K separaci dochází rozdílnou mírou interakce látek se stacionární fází a je ovlivňována počtem a velikostí nábojů daných látek a funkčních skupin stacionární fáze. Mezi MF a SF probíhá výměna iontů, která je definována rovnicí iontové výměny pro anionty (12) a kationty (13):



(S – stacionární fáze, M – Mobilní fáze)

Separované látky mají rozdílnou afinitu k měniči, která je popsána rovnovážnou konstantou rovnice iontové výměny, tzv. koeficientem selektivity K_A^B (14):

$$K_A^B = \frac{[A^{a+}]_M^b + [B^{b+}]_S^a}{[A^{a+}]_S^b + [B^{b+}]_M^a} \quad (14)$$

U chromatografické separace systémem IEC je většinou aplikována gradientová eluce, kdy dochází ke vzrůstání koncentrace iontů v mobilní fázi a nastává postupná eluce látek podle jejich sílící afinity ke stacionární fázi.

Stacionární fáze mohou být děleny na katexy a anexy, podle funkční skupiny, která je vyměňována. U katexu dochází k uvolňování a výměně kationtů, u anexu jsou uvolňovány a vyměňovány anionty.

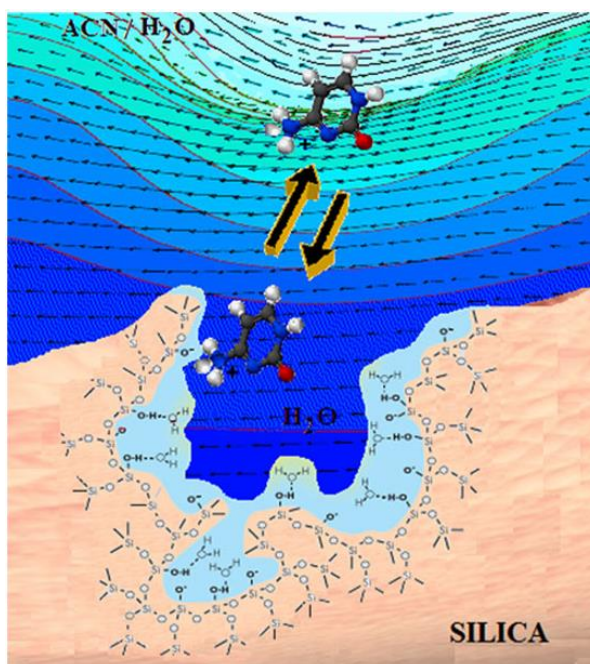
IEC je vhodná pro separaci iontů a polárních látek – separace iontů ve vodách, separace aminokyselin, nukleových kyselin, karboxylových kyselin a peptidů [2].

HILIC (Hydrofilní interakční chromatografie)

Hydrofilní interakční chromatografie je metoda umožňující separaci polárních látek a také iontových sloučenin. Využívá kombinace klasických hydrofilních stacionárních fází, které jsou používané v NP-LC – např. silikagel, aminové či nitrilové SF, s hydrofóbními binárními mobilními fázemi podobnými fázím v RP-LC. Zjednodušeně lze říci, že HILIC je specifickou variantou NP-LC, která má mnohem komplikovanější mechanismus separace.

HILIC má mnoho výhod oproti předchozím zmíněným metodám. Je vhodná pro analyty v komplexních systémech, u kterých v případě použití RP-LC dochází k eluci v mrtvém retenčním čase.

Dále překonává problém s rozpustností polárních vzorků v mobilní fázi, s kterým se často potýkáme u NP-LC, protože polární analyty vykazují dobrou rozpustnost ve vodné mobilní fázi, která je v HILIC módu používána.



Obr. 5 Schéma separačního mechanismu v HILIC.
Převzato z vědeckého článku [46].

HILIC je tedy separační metodou využívanou pro neutrální vysoce hydrofilní látky a pro látky amfifilní, které jsou příliš polární na to, aby mohl být využit chromatografický systém s reverzní stacionární fází a zároveň nesou pouze nepatrný náboj, který neumožňuje efektivní elektrostatickou retenci v případě použití iontově výměnné chromatografie. Hydrofilní interakční chromatografie tedy doplňuje tři hlavní metody kapalinové chromatografie – NP-LC, RP-LC a IC, a zvyšuje tak rozmezí možností chromatografické separace látek [23].

Systém HILIC může být použit například pro separaci sacharidů, peptidů, proteinů, nukleosidů, nukleotidů, aminokyselin, glykosidů, alkaloidů a polárních léčiv. U glykosidů byla například využita v kombinaci s MS/MS pro kvantitativní analýzu steviolových glykosidů, používaných jako přírodní sladidlo, u kterých reverzní fáze poskytovala pouze malou separační kapacitu [24].

Mobilní fáze HILIC chromatografie obsahuje malé množství vodné složky, nejméně 2,5 % [2] a vodou mísitelné aprotické organické rozpouštědlo, jakým je například acetonitril, tetrahydrofuran či dioxan. Preferován je zejména ACN, který svoji nízkou viskozitou zajišťuje vysokou účinnost separace a nezpůsobuje vysoký zpětný tlak na chromatografické koloně [25]. Jako organická složka může být použit i alkohol – methanol, ethanol, propanol apod. V tomto případě však musí být jejich koncentrace

v MF vyšší, aby došlo ke stejnému stupni retence jako při použití aprotického rozpouštědla [23]. Platí obecné pravidlo, že s rostoucí polaritou a schopností proton-donorových interakcí rozpouštědla, roste i jeho eluční síla [2].

Separace může probíhat buď isokratickou elucí s vysokým podílem organické složky v mobilní fázi, nebo pomocí gradientové eluce.

U gradientové eluce obsahuje mobilní fáze nejprve malý podíl polární vodné složky s vyšším procentem organického rozpouštědla a postupně dochází ke zvyšování poměru vodné fáze, čímž dochází k eluci polárního analytu. Gradientová eluce v HILIC chromatografii má tedy opačný průběh v porovnání s gradientovou elucí u RP-LC.

Co se týče stacionární fáze, může být použita jakákoliv fáze s polárním povrchem. Jako SF se využívá například klasický silikagel, silikagel s navázanými polárními funkčními skupinami, nebo polymerní stacionární fáze. V dnešní době existuje mnoho druhů stacionárních fází a mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin – neutrální polární SF a stacionární fáze s iontovým povrchem.

Silikagel může mít navázané různé skupiny, např. aminopropylovou, amidovou, diol atd. Stacionární fáze s diolovými skupinami patří do skupiny neutrálních stacionárních fází a vyznačují se vysokou polaritou a tvorbou vodíkových vazeb. Aminopropylové silikagely patří naopak k fázím vykazujícím silné elektrostatické interakce a jsou v HILIC módu velmi často používány.

Bazické látky jsou na silikagelové stacionární fázi velmi silně zadržovány kvůli vodíkovým vazbám a elektrostatickým interakcím, zatímco kyselé sloučeniny vykazují zvýšenou afinitu k silikagelu modifikovaném aminoskupinou, která může vést až k nevratné adsorpci analytu na stacionární fázi.

Dále existují také zwitteriontové stacionární fáze, jako například sulfoalkylbetain, které nejspíše fungují na elektrostatických interakcích mezi analytem a SF [23].

Retence analytu je podobně jako u NP-LC snižována zvýšením polarity mobilní fáze, tzn. s rostoucím podílem vody. HILIC je v současnosti významné chromatografické téma jak pro teoretické studie, tak pro praktické využití v analytické chemii. Přesný mechanismus retence látek v HILIC není dokonale objasněn, ale existují základní separační modely vysvětlující tento proces.

Jednou z možností je rozdělování vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. SF, která je hydrofilnější, poutá z MF vodu a retence polárního analytu se tak zvyšuje ve srovnání s retencí na původní SF [25]. U tohoto mechanismu figuruje stacionární fáze jako „přenašeč“ a „stabilizátor“ vody. Polární molekuly stacionární fáze na sebe

adsorbují vodu, a na jejím povrchu tak vzniká vrstva vody, jejíž koncentrační gradient klesá směrem do průměrně méně polární MF [2].

Podle této teorie je separace ovlivňována mírou polaritativity látky a stupněm solvatace. Čím více je solut hydrofilní, tím více je rovnováha separace posunuta směrem k nepohyblivé vodní vrstvě u stacionární fáze a dochází k silnějšímu zadržování vzorku.

Pokud dojde ke vzrůstu koncentrace organického rozpouštědla v MF, voda se více adsorbuje na povrch SF. ACN, který se běžně užívá v mobilních fázích při HILIC, totiž nemůže tak dobře reagovat se silanolovými skupinami, které zůstaly na povrchu silikagelu, ty tak zůstávají nechráněné, a voda se na ně může navázat. Adsorbce vody na stacionární fázi tedy vzrůstá se zmenšujícím se podílem vodné složky v mobilní fázi, přičemž nejvyšší je, pokud se obsah vodné složky v binární mobilní fázi ACN-H₂O pohybuje okolo 20 % (v/v) a méně [23].

Další mechanismus, který se v HILIC uplatňuje zejména při separaci na SF s iontovým povrchem, je mechanismus iontové výměny, který ovlivňuje selektivitu separace [25]. Na modifikovaných silikagelových SF se nachází určitý podíl silanolových skupin, které se nedají odstranit nebo blokovat kvůli bránění způsobené sterickými efekty. Tyto zbytkové silanolové skupiny mají kyselý charakter a jsou částečně ionizované. Mimo tyto silanolové skupiny mohou být přítomny další iontové skupiny, které jsou na SF záměrně navázány.

Silanolové skupiny mají vliv zejména na bazické sloučeniny a biopolymery kvůli dipólovým interakcím a tvorbě vodíkových vazeb [23].

Retence může být také ovlivněna přidáním pufrů do MF, přičemž se zvyšující se koncentrací soli retence látky obecně klesá. pH prostředí má na retenci analytu také vliv, protože ovlivňuje protomérii jak solutu, tak silanolových skupin. Záleží potom na vlastnostech konkrétní analyzované látky – pokud při daném pH dochází k její disociaci, zvyšuje se retence na koloně v porovnání s neutrální formou analytu [25].

V HPLC existuje mnoho dalších chromatografických systémů – například SEC (molekulová vylučovací chromatografie), využívající separace látek podle jejich velikosti na SF ve formě pórovitého polymerního gelu, iontově párová chromatografie fungující na principu tvorby iontových asociátů mezi separovaným analytem a iontem opačného náboje obsahujícího velký podíl nepolární složky, micelární chromatografie využívající tenzidů pro tvorbu micel, a další [2].

Mezi látky, které mají speciální využití v chromatografii, náleží kosmotropy a chaotropy. Otázka účinku kosmotropních a chaotropních činidel na separaci v režimu HILIC je ale zatím prakticky neprostudované téma, ačkoli je jasné, že

modifikace dynamické sítě vodíkových vazeb vody může mít podstatnou roli v tomto mechanismu separace. Problematice účinku kosmotropních a chaotropních látek na separaci v HILIC se věnuje tato bakalářská práce.

1.1.6 Hmotnostní spektrometr (MS) a spojení s HPLC (LC-MS)

V praktické části této bakalářské práce byla využita hmotnostní spektrometrie pro identifikaci analyzovaných glykosidů. Proto zde budou velmi stručně shrnuty základní informace o této technice.

Hmotnostní spektrometrie je technika umožňující identifikaci molekul, zjištění složení a jejich molekulových hmotností. Existuje několik druhů hmotnostních spektrometrů, ale všechny se skládají z těchto základních částí:

- ionizační zdroj
- hmotnostní analyzátor
- detektor

V ionizačním zdroji je molekulám dodán elektrický náboj. Ionizace může probíhat několika mechanismy a podle toho zdroje dělíme na:

- EI – ionizace nárazem elektronu
- ESI – ionizace elektrosprejem
- MALDI – ionizace laserem za účasti matrice

Hmotnostní analyzátor rozděluje ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Analýza může probíhat v následujících typech zařízení:

- magnetický selektor
- time-of flight metoda (TOF)
- kvadrupól (Q)
- orbitrap

Rozdělené ionty jsou poté registrovány detektorem, který je vyhodnocuje jako píky při daných hodnotách poměru m/z . Jelikož je náboj většinou roven 1, poměr m/z konkrétního píku odpovídá hmotnosti iontu (m). Detekce látek může probíhat pomocí:

- fotonásobič
- elektronový násobič
- mikrokanálová deska
- orbitrap

Čárový graf hmotnostního spektra zobrazuje závislost poměru m/z na četnosti iontů o tomto poměru dopadajících na detektor.

Při analýze v této bakalářské práci byl použit hybridní hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus s ionizačním zdrojem HESI (heated electro-spray ionization), který pracuje za atmosférického tlaku, v kombinaci s hmotnostním analyzátozem a detektorem typu orbitrap. U metody ionizace HESI je vzorek, rozpuštěný v polárním rozpouštědle, převeden v kapilární trubici na sprej a poté vystaven vysokému napětí, které umožní nasměrovat ionty analytu do vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru. Protonaci analytů H^+ kationty u tohoto typu měkké ionizace zajišťuje kyselý modifikátor mobilní fáze, protože hmotnostní spektrometrie se většinou kombinuje s LC systémem. Těkavé rozpouštědlo je následně odpařeno a vzniknou tak různě protonované molekuly analytu $[M + H_n]^{n+}$. Molekulové ionty jsou poté v přístroji elektricky fokusovány do svazku, kterému je dodána energie elektrodou urychlovače. Každá molekula se začne pohybovat rychlostí, která závisí na její hmotnosti, přičemž lehčí molekuly se pohybují rychleji. Molekuly jsou pak u Q Exactivu Plus separovány podle hodnoty m/z v kvadrupólu [26]. Vybrané ionty mohou být fragmentovány nebo mohou být vpuštěny do orbitrapu, který pracuje simultánně jako analyzátor i detektor. Kromě výše uvedeného pozitivního modu hmotnostní spektrometrie je také možné analyzovat záporně nabitě ionty. Přístroj se jen musí vhodně nastavit a musí se zvolit vhodná mobilní fáze.

Iontový zdroj ESI, popř. HESI, není univerzální a je vhodný pouze pro polární látky. Jeho výhoda spočívá v tom, že je schopný ionizovat i vysokomolekulární látky, např. bílkoviny [3]. Zároveň je k analytům šetrný a nepůsobí dodáním tepelné a elektrické energie jejich rozklad.

Hmotnostní spektrometry mohou být v HPLC využity jako detektory. Jedná se o tzv. spojenou techniku, která mimo údajů z chromatografického záznamu poskytuje i spektrální informace o dané látce. V počátcích byly pro spojení používány složité převodníky, protože přímé spojení bylo limitováno vysokým průtokem MF a velkými rozdíly mezi separací za atmosférického tlaku a detekcí na hmotnostním spektrometru vyžadujícím prostředí vakua. Díky měkkým ionizačním technikám za atmosférického tlaku, jakým je například HESI, je již přímé spojení možné.

Kombinace kapalinové chromatografie s MS je zvláště vhodná pro komplexní vzorky s velkým počtem komponent, jelikož hmotnostní spektrometr dokáže jednotlivé fragmenty izolovat a určit relativní molekulové hmotnosti.

U LC-MS je třeba dát pozor na výběr MF, která se přímo účastní procesu ionizace. Vhodnými fázemi jsou tedy těkavá rozpouštědla jako například acetonitril nebo methanol. Do MF mohou být přidána i těkavá aditiva ($HCOOH$, CH_3COOH , CH_3COONH_4 a $HCOONH_4$), ale pouze v nízkých koncentracích, aby nedocházelo k poklesu signálu tím, že by tyto látky v procesu ionizace „soupeřily“ o náboj [2]. U hmotnostní spektrometrie není možné užívat v MF látky, které mají vysokou

teplotu tání (např. fosfátové pufrů), neboť by neprošly přístrojem, zanesly by ho a poškodily.

1.2 Kosmotropní a chaotropní efekty

Chaotropy označujeme molekuly, které ve vodném roztoku oslabují hydrofobní interakce solutů a zároveň zvyšují iontové síly roztoku, čímž umocňují rozpustnost látky, např. proteinu, ve vodných roztocích. V anglicky psané literatuře se tento jev označuje jako „salting-in“ [27; 28].

Rané teorie vysvětlovaly účinky chaotropu tak, že díky schopnosti tvořit silné vodíkové vazby s hlavním řetězcem (backbone) proteinu a nukleových kyselin narušuje intramolekulární vodíkové vazby těchto makromolekul, a tím i jejich terciární strukturu. To byl však chybný předpoklad zejména ze dvou důvodů. Tím prvním je fakt, že vodíkové vazby nejsou jedinými silami podílejícími se na stabilitě struktur biomakromolekul, na kterých se zpravidla ve vyšším měřítku podílejí slabší van der Waalsovy síly. Druhým faktorem vyvracujícím tuto teorii je fakt, že některé struktury narušené chaotropy, zejména fosfolipidové membrány, nemají vodíkové vazby, které by přispívaly k udržování struktury. Vysvětlením chaotropicity by tedy mohla být teorie uvažující termodynamiku systému: rozpouštědlo (voda) – makromolekula – chaotrop. Přidáním chaotropu vzroste kvůli zvýšené translační a rotační volnosti molekul vody entropie systému. Schopnost chaotropu narušovat vodíkové vazby molekul vody je tedy významnější než narušování těchto vazeb v solutu. Narušením struktury makromolekul a jejich rozbalením jsou hydrofobní skupiny ve vyšším měřítku vystaveny prostředí vody, která okolo nich vytváří svými molekulami klathrátové³ nebo klecové vodíkové struktury, což sníží entropii systému a stabilizuje dané uspořádání. Chaotropní činidlo naproti tomu naruší vodíkové vazby v obklopujících strukturách vody, zvýší entropii systému, a tak odstraní termodynamickou bariéru, která brání rozbalení proteinu. Ani tento mechanismus však nevysvětluje všechny jevy, s kterými se u chaotropů setkáváme [29].

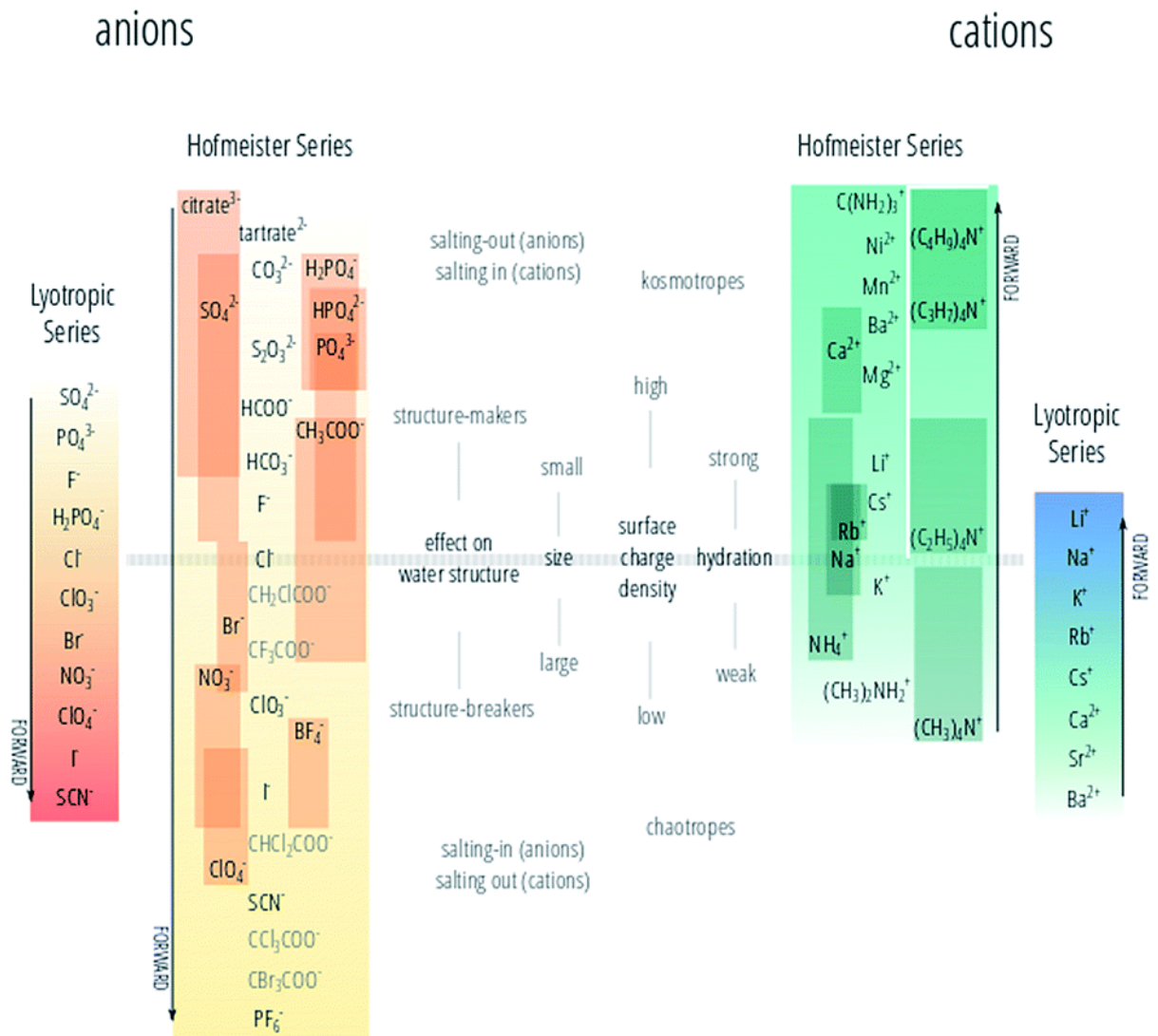
Kosmotrop ve srovnání s chaotropem naopak zesiluje hydrofobní účinek, snižuje rozpustnost hydrofobů, a proto pomáhá stabilizovat látky, např. proteiny. Tento jev se nazývá „salting-out“. Klasifikace kosmotropních a chaotropních činidel je obtížná, protože nemusí vždy působit stejným způsobem. Efekty se liší při různých koncentracích, při vysoké teplotě a tlaku atd. [28].

³ klathráty jsou „nekovalentní komplexy, v nichž jsou molekuly jedné látky obklopeny molekulami jiné látky tak, že nejsou v kontaktu s okolním prostředím“ [43]

Chaotropy a kosmotropy mohou mít povahu iontů nebo mohou být neutrálními sloučeninami. O jejich vlastnostech bude pojednáno v následující podkapitole.

1.2.1 Iontová chaotropní a kosmotropní činidla

Franz Hofmeister (1850, Praha – 1922, Würzburg), který působil mimo jiné jako profesor farmakologie na lékařské fakultě v Praze, se věnoval experimentální práci zkoumající vliv anorganických solí na srážení proteinů. Spolu se svými studenty publikoval řadu článků, ve kterých uváděli, že tyto soli mohou být podle svých účinků na srážení proteinů kategorizovány a že rozdíly mezi nimi jsou dány dle jejich schopností hydratace. Tato klasifikace iontových chaotropních a kosmotropních činidel je známa pod názvem Hofmeisterova řada nebo také jako Lyotropní řada [30].



Obr. 6 Hofmeisterova a lyotropní řada pro kationty a anionty ve vodě. Převzato z internetu [31].

Výše uvedený přehled (Obr. 6) pochází z vědeckého článku od Virginie Mazzini a Vincenta S. J. Craiga. U Hofmeisterovy řady naznačuje šipka „forward“ klesající

účinnost při srážení proteinů z roztoku, u lyotropní řady pak odpovídá rostoucímu lyotropnímu číslu. Na ionty, u kterých nebylo úplně jisté zařazení, byl použit šedý font písma. Šedá vodorovná čára značí relativní oblast předělu chaotropních a kosmotropních činidel.

Vlivy iontových činidel můžeme pozorovat například v jednoduchých vodných roztocích elektrolytů, u nichž v závislosti na složení a koncentraci přidané soli dochází k významným změnám v jejich vlastnostech jako je viskozita, hustota, index lomu, tepelná kapacita, bodu varu a tuhnutí a osmotický tlak. Soli také určují strukturu a funkci struktur v biologických systémech, kde se účastní osmotické regulace a hlavních biologických procesů.

Specifické iontové efekty činidel jsou dány kombinací hydratace, elektrostatických a kvantových mechanických sil. Hydratace a hydratační síla mezi molekulami způsobují asociace, které jsou někde na pomezí kovalentních vazeb a nevazebných stavů. Podle teorie hydratace, ionty přitahují a uspořádávají okolní molekuly rozpouštědla a vytvářejí tak okolo sebe hydratační obaly. V tomto procesu spolu ionty a neelektrolytové molekuly, včetně molekul rozpuštěného plynu, soutěží o tytéž molekuly rozpouštědla. Tím klesá hydratace a rozpustnost molekuly a dochází k vysrážení sloučeniny z roztoku [32].

Velké ionty s hodnotou náboje 1 (nebo -1), o nízké hustotě, jakými jsou například SCN^- , HSO_4^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ , K^+ , a $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ (tetramethylammonium) interagují s vodou slaběji než molekuly vody mezi sebou, takže zasahují jen relativně velmi málo do vodíkových vazeb a chovají se v roztoku jako chaotropy.

Malé ionty o velké hustotě nebo s vyšší hodnotou svého náboje silněji interagují s molekulami vody a jsou schopny narušit vodíkové vazby vody. Jedná se tedy kosmotropy. Patří mezi ně například SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Na^+ , H^+ , OH^- [28]

Účinek zvyšování nebo snižování rozpustnosti (tzv. salting effect) je charakterizován Setschenowou rovnicí (15):

$$\log(s_0/s) = kc_s \quad (15)$$

(s_0 a s jsou rozpustnosti neelektrolytu v čisté vodě (resp. v roztoku elektrolytu), c_s je koncentrace soli a k je iontová konstanta „salting“ efektu)

Kladná hodnota konstanty značí vysolování látky (salting-out) a záporné hodnoty znamenají zvýšení rozpustnosti molekuly v roztoku (salting-in). Protože odlišné kationty a anionty mají rozdílné konstanty, jejich vzájemnými kombinacemi dochází k různým tendencím ve vysolování. Účinek adice solí na roztoky neelektrolytů je velmi složitý kvůli existenci několika druhů intermolekulárních interakcí mezi ionty, rozpouštědlem a rozpuštěnými molekulami [32].

1.2.2 Neiontová kosmotropní a chaotropní činidla

Neiontové kosmotropy jsou dobře hydratovatelné molekuly, které mají malou tendenci agregovat. Jsou bez náboje a stabilizují strukturu makromolekul v roztoku tím, že silně interagují s molekulami vody za vzniku vodíkových vazeb. Snižují difúzi vody okolo proteinů a rychlost výměny amidových protonů tvořících základní řetězec. Tím dochází k dehydrataci povrchu proteinu, což způsobuje menší pružnost a nižší enzymatickou aktivitu. Kosmotropy mají tendenci bránit denaturačnímu procesu tím, že redukují objem vody, která by hydratovala odhalený povrch denaturovaného proteinu.

Dělí se do dvou skupin:

- polyhydroxy sloučeniny
- zwitterionty – jsou dobře rozpustné díky své rovnováze mezi hydrofobicitou a hydrofilitou, ale s okolní vodou interagují pouze slabě, jsou vhodné jako kryoprotektanty

Neutrálními kosmotropem je například glukosa a trehalosa.

Chaotropy narušují vodíkové vazby molekul vody, snižují jejich uspořádanost, zvyšují povrchové napětí a podněcují denaturaci proteinů [28].

1.2.3 Použití kosmotropních a chaotropních činidel v HILIC

Kosmotropní činidla okolo sebe tvoří silnou hydratační vrstvu a při jejich vysoké koncentraci v roztoku mohou proteinu odepřít dostatečné množství vody k vytvoření hydratovaného obalu. Může tak dojít k selektivním a nekovalentním intermolekulárním interakcím v rámci proteinu, a tím k jeho reverzibilní precipitaci neboli k procesu označovaném v anglickém jazyce jako „salting-out“ neboli vysolování [33].

Chaotropní činidla naopak rozrušují struktury vázaných molekul vod, čímž dochází k relativní expanzi proteinu do vody a současně k destabilizaci kompaktní struktury proteinu. Následkem těchto interakcí a pronikání chaotrofu a vody do proteinu dochází k denaturaci, a posléze též k nevratné precipitaci proteinu.

Octan amonný a mravenčan amonný se používají jako iontová aditiva do mobilních fází pro úpravu pH a iontové síly. V HILIC mohou přispívat k hydrataci solutu, která vede ke změnám v jeho retenci [23]. Ačkoli jsou mravenčany a octany jen slabými kosmotropy, v HILIC mohou působit výrazný efekt.

V poslední době byla původní Hofmeisterova koncepce doplněna o fyzikálně chemické vlastnosti iontů, jakými jsou chemický potenciál, Gibbsova volná energie a hydratace za různých podmínek. Pro zkoumání vlivu chaotropních

a kosmotropních činidel v HILIC chromatografii je zvláště důležitý stupeň hydratace iontu při jeho přenosu z vody do nemísitelného organického rozpouštědla [33].

Andrew J. Alpert ve své studii z roku 2018 [33], kde zkoumá vliv solí na retenci v hydrofilní iontové chromatografii, zmiňuje, že u analýz s použitím kosmotropních solí o koncentraci vyšší než 20 mM, došlo k poklesu retence vzorku. To je v souladu s efektem, který kosmotropy způsobují. Tím je již zmiňovaný „salting-out“ efekt, kdy na sebe kosmotrop v roztoku váže vodu, a způsobuje tak, že ostatní přítomné látky tvoří autoagregáty, nebo v případě přítomnosti nevodné fáze také podporují přechod látek do této fáze.

U chaotropů, které fungují na principu narušování vodíkových vazeb autor uvádí, že při použití stejného chaotropního činidla triethylammoniumchloristanu došlo v některých analýzách podle očekávání ke snižování retence s rostoucí koncentrací tohoto chaotropu, zatímco u jiných standardů retenční čas při vysoké koncentraci stoupal. To jen potvrzuje fakt, že mechanismus retence v HILIC je velmi komplexní a není ovlivňován pouze vodíkovými vazbami.

Ve své práci dospěl k závěru, že dobře hydratované protiionty⁴ podněcují separaci nabitých analytů do nepohyblivé hydratované vrstvy SF, zatímco málo hydratované protiionty mají opačný efekt. Vliv na neutrální soluty byl malý. V některých případech se retenční časy pouze trochu zvýšily s rostoucí koncentrací jakékoliv soli (kosmotropní i chaotropní).

1.2.4 Hydrotopy

Za pokračování kosmotropní/chaotropní řady lze považovat tzv. hydrotopy, což jsou látky, které mohou zvýšit rozpustnost hydrofobních látek až o několik řádů. Při koncentracích menších než 0,5 M mají malý účinek, ale při vyšších koncentracích dochází k rychlému nárůstu koncentrace rozpuštěné hydrofobní látky v roztoku vody. Příkladem hydrotopu může být například benzoát sodný, či adenosintrifosfát (ATP), který je vykazuje hydrotopní účinek v milimolárních koncentracích, zatímco jako zdroj energie působí v mikromolárních koncentracích [34].

⁴ V tomto případě je protiiontem neboli counter-iontem myšlen ion opačného znaménka náboje než má ion analytu. Protiion však může být definován také jako ion, který nese opačný náboj, než má vnitřní vrstva elektrické dvojvrstvy [45], což je: „Nabitý povrch tuhé látky, který je buď součástí tuhé fáze, nebo jej tvoří na povrchu adsorbovaná vrstva o tloušťce jednoho iontu.“ [44]

1.3 Glykosidy

Jedná se o nejrozšířenější skupinu sekundárních metabolitů rostlin (tzv. alelochemikálie) [35], vyznačující se několika základními znaky. Jsou složeny ze dvou hlavních částí – ze sacharidu a z necukerné složky, tzv. aglykonu neboli geninu, který je tvořen organickou sloučeninou a je navázán na karbonylový atom uhlíku sacharidu. Jsou spojeny acetalovou neboli glykosidovou vazbou. Tyto dvě části se poměrně snadno hydrolyticky štěpí v kyselém prostředí, ale v alkalickém prostředí jsou až na jisté výjimky stabilní. Další jejich vlastností je fakt, že nejeví mutarotaci a neprobíhají u nich reakce typické pro aldehydové a ketonové skupiny.

Glykosidy dělíme podle kyslíkatého heterocyklu na furanosidy (pětičlenný cyklus) a pyranosidy (šestičlenný heterocyklus). Také je můžeme podle konfigurace anomerního centra dělit na α - a β - glykosidy. Furanosidní glykosidy se oproti pyranosidům tvoří rychleji, ale jsou méně stabilní v kyselém prostředí a rychleji hydrolyzují. Výjimku tvoří glykosidy, jejichž součástí je 2 - deoxycukr, které se štěpí velmi snadno, dokonce lépe než furanosidní glykosidy [36].

1.3.1 Kardiotonické glykosidy

Společným znakem této skupiny glykosidů je jejich struktura sacharidové i aglykonové složky. Mají tetracyklický steroidní aglykonový základ s pětičlenným nebo šestičlenným α/β -nenasyceným laktonovým cyklem, který je navázán v poloze C-17. Na rozdíl od ostatních přirozených steroidních sloučenin mají kardiotonické glykosidy na C a D kruhu steroidního skeletu konfiguraci *cis*. Podle nenasyceného laktonového kruhu se dále dělí na skupiny odvozené od:

- (21, 23)-lakton 14-isonorcholesten-(20,22)-ol-(21)-23 kyseliny – tento aglykon je podle nejdéle známého glykosidu označován jako digitaloidní aglykon
- (21, 24)-lakton 14-isocholestadien-(20, 21-22, 23)-ol-(21)-24 kyseliny – seiloidní aglykon

U většiny srdečních glykosidů je na 3. a 14. uhlíku aglykonu navázána β -orientovaná hydroxylová skupina a methylovou skupinu (C19) mívají oxidovanou na alkoholovou nebo aldehydovou skupinu. Kruhy A a B mohou mít *cis* – i *trans* – konfiguraci, ale častěji se vyskytuje konfigurace *cis*. Některé aglykony kardioglykosidů obsahují také ketoskupinu. Digitaloidní aglykony, které mají stejně orientovaný nenasycený laktanový kruh a -OH skupinu na 14. uhlíku, snadno podléhají isomeraci alkoholovými roztoky alkalických hydroxidů, kdy vznikají isogeniny, které mají kyslíkatý heterocyklus mezi 14. a 21. uhlíkem. Tato izomerace je nevratná a znamená ztrátu fyziologické aktivity.

V srdečních glykosidech jsou zpravidla *D*-monosacharidy vázány k aglykonu β -glykosidickou vazbou a *L*-monosacharidy α -glykosidickou vazbou. Sacharidová složka, která je vázaná na 3- β -OH skupinu aglykonu, je tvořena oligosacharidem nebo je složena z jednoho až čtyř monosacharidů, kterými může být sacharid ze skupiny [36]:

- aldopentosy (*D*-lyxosa)
- aldohexosy (*D*-glukosa)
- 5- methylpentosy (*L*-fukosa, *L*-rhamnosa, *D*-chinovosa) a 3-methylether-5-methylpentosy (*D*-thevetosa, *D*-digitalosa, a jiné)
- 2-deoxy-5-methylpentosy (*D*-digitoxosa, *D*-boivinosa) a 3-methylether-2-deoxy-5-methylpentosy (*D*-cymarosa, *D*-diginosa, apod.)
- uronové kyseliny (kyselina *D*-digikurunová)

Také se dělí podle počtu sacharidových jednotek na primární, které jsou přítomné v živých rostlinách a na sekundární, které mají odštěpenou koncovou sacharidovou jednotku a vyskytují se v usušených květinách [35].

Zřejmě všechny kardioglykosidy se v rostlinách vyskytují ve formě polyglykosidů. Obsahují je různé čeledi rostlin – jesencovité (*Celastraceae*), brukvovité (*Brassicaceae*) – např. trýzel (*Erysimum*), liliovité (*Liliaceae*), morušovníkovité (*Moraceae*), lípovité (*Tiliaceae*), jitrocelovité (*Plantaginaceae*) – náprstník (*Digitalis*) a další. Sušením rostlin obsahujících kardioaktivní glykosidy dochází k zvýšení obsahu těchto látek [35; 36].

Jejich kvalitativní i kvantitativní fyziologické působení se různí podle povahy aglykonu a sacharidové složky. Sacharidová část ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti látky a tím celkový terapeutický efekt – rychlost resorpce, dobu účinku. Necukerná část zajišťuje účinek na srdce [35].

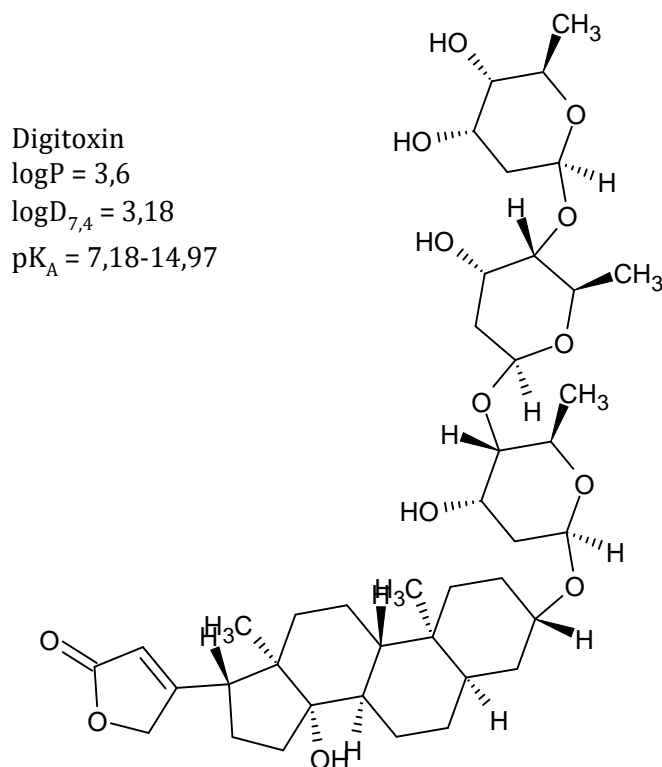
U digitaloidní skupiny je pro jejich účinnost nezbytná β -konfigurace laktonového kruhu a silnější biologické účinky všeobecně vykazují mono- a diglykosidy. U sciloidní skupiny je účinnější samotný aglykon [36].

Jak už název vypovídá, tyto glykosidy vykazují specifické účinky na činnost srdečního svalu. V nízkých dávkách zvyšují intenzitu stahů srdce, ale ve vyšších dávkách zastavují srdeční činnost v systole. Jejich mechanismus účinku je takový, že inhibují sodíkovou pumpu (Na^+/K^+ -ATPasu). Zabraňují pohybu draslíku z buňky a sodíku do buňky. Tím je ovlivňován i pohyb vápníku prostřednictvím výměnného transportu Na^+/Ca^+ . Intoxikace srdečními glykosidy se projevuje extrakardiálními a kardiálními příznaky. K extrakardiálním patří nevolnost, slinění, zvracení, zánět žaludku, průjem, bolesti hlavy, únava, nespavost a křeče. Kardiální příznaky se projevují poruchami srdečního rytmu, komorovou extrasystolou až smrtí způsobenou ventrikulární (komorovou) fibrilací [35].

Digitoxin

Tento sekundární metabolit patří do srdečních digitaloidních glykosidů. Jeho aglykonem je digitoxigenin a glykosidická část obsahuje 3 molekuly D-digitoxosy. Má bod tání při 263 °C [36]. Jeho letální dávka byla při perorálním podání u kočky domácí LD₅₀ = 180 µg/kg a u morčete LD₅₀ = 60mg/kg [35].

Je produkován rostlinou z čeledi jitrocelovité, náprstníkem červeným (*Digitalis purpurea* L.). Tato dvouletá rostlina kvetoucí od června do srpna je rozšířená v západní a střední Evropě ve vyšších nadmořských výškách a často se pěstuje i jako okrasná zahradní květina. Má vroubkované tupě špičaté listy a její květy jsou uspořádány v jednostranném hroznu na krátkých stopkách se zvonkovitou, purpurově červenou korunou. Jedná se o extrémně jedovatou rostlinu s kardiotoxickými účinky, která se využívala jako léčivo při onemocnění srdce [35]. Její terapeutické využití popsal jako první anglický lékař W. Withering roku 1785 ve své knize *An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses: with Practical Remarks on Dropsy, and other Diseases*, ve které popisoval indikace a dávkování náprstníkových listů [37]. Dnes se účinné látky získávají izolací z náprstníku vlnatého. I přesto, že i pouhé 2-3 sušené listy mohou být pro člověka letální, nejsou otravy touto rostlinou příliš časté, kvůli její extrémně hořké chuti. Intoxikace je provázána srdeční arytmií, nevolností, zvracením, které trvá i několik dní, celková slabost a centrálními příznaky jako jsou halucinace, poruchy vidění a delirium [35].

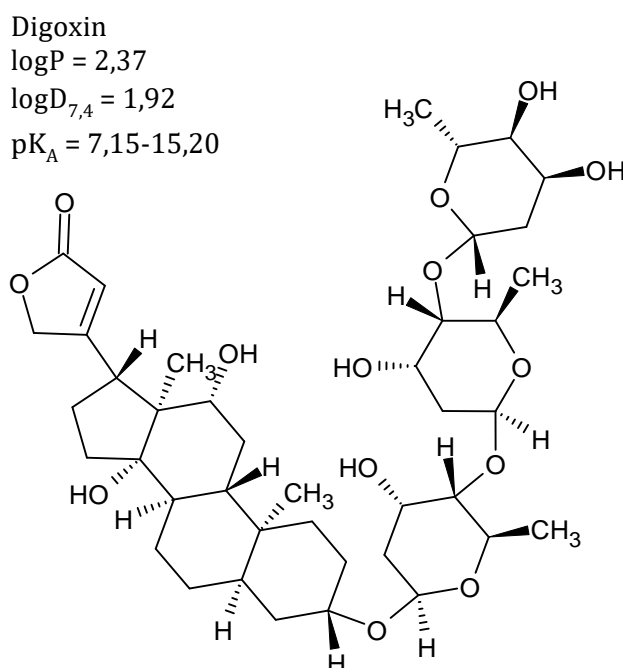


Obr. 7 Chemický vzorec digitoxinu. Vytvořeno v počítačovém programu ACD/ChemSketch.

Digoxin je srdečním glykosidem tvořeným digoxigeninovým aglykonem a 3 molekulami *D*-digitoxosu. Bod tání má při 265 °C [36]. Jako jediný ze srdečních glykosidů se v dnešní době využívá pro klinickou léčbu srdečních chorob. Produkuje ho rostlina náprstník vlnatý (*Digitalis Lanata*), která roste v jihovýchodní Evropě. Dorůstá výšky až 1 metru a jeho květy uspořádané do hroznu s trubkovitě zvonkovitými korunami mají bělavou barvu s hnědými žilkami. Má stejné příznaky otravy jako *Digitalis purpurea* [35].

Digitoxin a digoxin byly také zkoumány jako potencionální léčivo cystické fibrózy, což je recesivní genetické onemocnění, vyznačující se hlubokým zánětem plic, u něhož se předpokládá, že je způsoben nadměrnou produkcí zánětlivého proteinu IL-8. Ukázalo se, že digoxin má při koncentracích okolo 0,9 nM schopnost potlačit hypersekreci IL-8 o 50 %. Digoxin byl méně účinný. Mechanismem působení digitoxinu je blokování fosforylace inhibitoru NF-KB ($I\kappa B\alpha$), která je potřebná pro aktivaci signální dráhy NF-kB a následné exprese IL-8 [38].

Vzhledem k těmto vlastnostem digoxinu vyslovila Bette S. Pollard a spol ve svém článku [39] hypotézu o terapeutickém potenciálu digoxinu, jenž by potlačoval vysoce zánětlivou odpověď imunitních buněk při onemocnění chřipkou, ale také při infekci koronaviry.



Obr. 8 Chemický vzorec digoxinu. Vytvořeno v počítačovém programu ACD/ ChemSketch.

1.3.2 Fenylbenzopyronové glykosidy

Je to velmi početná skupina žlutě až oranžově zbarvených sloučenin vyskytující se v zejména v květech a listech třídy dvouděložných rostlin.

Jejich aglykony jsou odvozené od γ -benzopyronu a vznikají substitucí fenylovým radikálem ve druhé nebo třetí poloze. Podle toho je dělíme na :

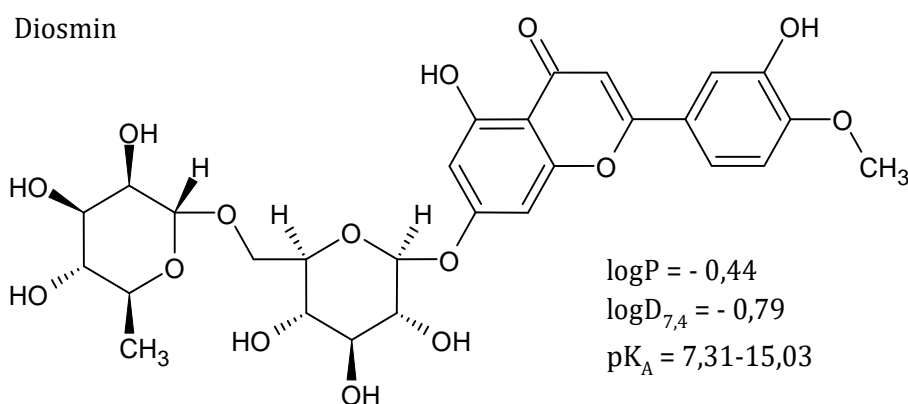
- flavonové (2-fenyl- γ -benzopyronové) deriváty
- isoflavonové (3-fenyl- γ -benzopyronové) deriváty

Početnější je skupina s flavonovými aglykony, od které jsou dále odvozené skupiny flavonolových, flavanonových, chalkonových a 2-benzalkumaranon-3-ových (auronových) aglykonů.

Cukerná složka je tvořena nejčastěji *D*-glukosou, popřípadě *D*-galaktosou, *L*-rhamnosou, *L*-arabinosou, kyselinou *D*-glukuronovou, nebo zcela výjimečně apiosou. Sacharid je navázán na aglykon prostřednictvím jeho -OH skupin, většinou v poloze 4, 5 nebo 7, u flavonolů potom ve 3. poloze.

V organismu byl u některých flavonolových a flavanonových glykosidů prokázán regulační vliv na funkci cévních kapilár. Některé isoflavony vykazují estrogení účinek [36].

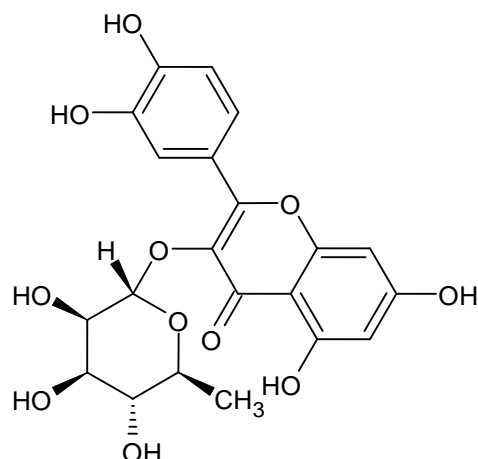
Diosmin patří do skupiny flavonových glykosidů. Je složený z aglykonové jednotky diosmetinu. Vyskytuje se v rostlinách: *Diosma crenata*, *Scrophularia nodosa*, *Hyssopus officinalis*, *Mentha crispa*, *M. pulegium* L. a *Dahlia variabilis* [36].



Obr. 9 Chemický vzorec diosminu. Vytvořeno v počítačovém programu ACD/ ChemSketch.

Quercitrin (kvercitrin) má flavonolový aglykon quercetin (kvercetin). Vyskytuje se v rostlinách *Quercus tinctoria* Mchx., *Vitis vinifera*, *Solidago virgaurea* L., *S. gigantea* Ait., *S. canadensis* L., *Forsythia suspensa*, *F. viridissima* a další [36].

Quercitrin
 $\log P = 0,9$
 $\log D_{7,4} = -0,25$
 $pK_A = 6,37-14,76$



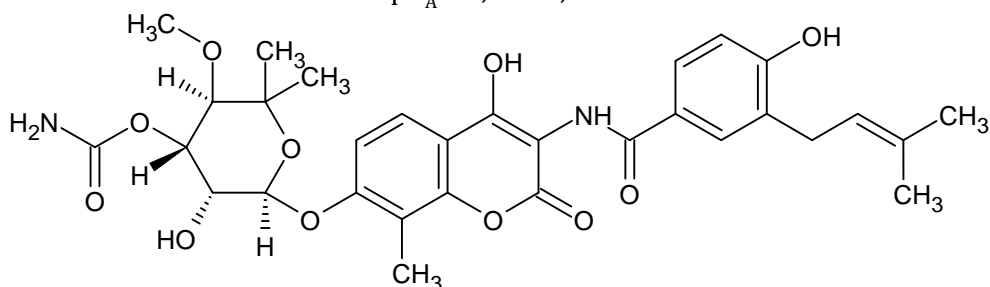
Obr. 10 Chemický vzorec quercitrinu. Vytvořeno v počítačovém programu ACD/ ChemSketch.

Novobiocin (jinými názvy albamycin nebo kathomycin), je aminokumarinové antibiotikum, které je produkováno aktinobakterií *Streptomyces niveus*. Je účinný proti bakterii *Staphylococcus epidermidis* a lze jej tedy použít k odlišení od *Staphylococcus saprophyticus*, který je vůči novobiocinu rezistentní. Novobiocin je také efektivním antistafylokokovým činidlem, používaným proti MRSA (multirezistentní zlatý stafylokok). Byl licencován v 60. letech 20. století pro klinické použití pod obchodním názvem Albamycin. Orální forma léčiva byla však již stažena z trhu, kvůli nedostatečné účinnosti. Novobiocin stejně jako jiná aminokumarinová antibiotika působí jako kompetitivní inhibitor bakteriálního enzymu DNA gyrázy, konkrétně její podjednotky GyrB [40].

DNA gyráza se skládá ze 2 podjednotek A a 2 B podjednotek, které jsou kódované pomocí genů *gyrA* a *gyrB*. Tento enzym katalyzuje tvorbu kliček na chromozomálních vláknkách. Jeho inhibicí dojde k blokaci replikace DNA a transkripce DNA do RNA. Tím se bakterie přestane množit [41].

Novobiocin

$\log P = 4,04$
 $\log D_{7,4} = 2,62$
 $pK_A = 8,31-14,78$



Obr. 11 Chemický vzorec Novobiocinu. Vytvořeno v počítačovém programu ACD/ ChemSketch.

2 Cíl a metodologie práce

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat dvě separačních analytické metody kapalinové chromatografie pro celkem 5 glykosidů a zjistit, jak některá vybraná kosmotropní a chaotropní činidla ovlivňují jejich separaci. Těmito analyzovanými látkami byly novobiocin, quercitrin, diosmin, digoxin a digitoxin. Vzhledem k polaritě vybraných glykosidů způsobené jejich cukernou složkou bylo předpokladem, že pro jejich analýzu bude výhodná hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). Pro srovnání byla jako druhá metoda zvolena klasická forma HPLC pracující v tzv. reverzním elučním režimu (RP-HPLC) za použití kolony C18, ve které má stacionární fáze nepolární charakter.

Jednotlivé dílčí cíle bakalářské práce lze vystihnout takto:

- provést odbornou literární rešerši dostupných informací o zkoumaných glykosidech a jejich chromatografických analýzách
- provést odbornou literární rešerši dostupných informací o chromatografickém systému HILIC a mechanismech působení chaotropních a kosmotropních činidel
- analyzovat zvolené glykosidy na chromatografické koloně v chromatografickém systému HILIC
- analyzovat zvolené glykosidy v chromatografickém systému RP-HPLC při použití analogických podmínek jako v HILIC
- vybrat kosmotropní a chaotropní činidla a prozkoumat jejich vliv na chromatografickou separaci zkoumaných látek
 - posoudit jejich ovlivňování chromatografické retence
 - popsat jejich vliv na tvar píků
- navrhnout isokratické eluční HPLC metody a analyzovat jejich výhody
- navrhnout a analyzovat vhodné gradientové eluční metody
- navrhnout a charakterizovat optimální metodu pro analýzu zvolených glykosidů (tj. vhodnou mobilní fázi a eluční program)
- porovnat systém HILIC a RP-HPLC a posoudit jejich vhodnost pro separaci daných analytů

Vliv kosmotropních a chaotropních činidel byl posuzován s cílem navrhnout optimální HPLC metodu pro separaci a stanovení zvolených glykosidů. Vedle prakticky motivovaného zaměření této bakalářské práce bylo ale také cílem provést základní výzkum chromatografického systému HILIC a jeho mechanismu separace, který je v současné době stále zdrojem různých otázek a zůstává otevřený pro inovativní vědecké uchopení. Principem výzkumu této bakalářské práce bylo především systematické studium mobilních fází s přídavkem různých činidel, které vykazují dle literatury kosmotropně-chaotropní efekty. Jelikož se s aplikací kosmotropně-chaotropních efektů v oblasti HILIC setkáváme v současné odborné

literatuře jen velmi vzácně, je cílem této bakalářské práce kriticky představit jak klady, tak možné zápory tohoto chromatografického systému a předložit čtenáři rovněž náměty pro jeho další výzkum.

3 Praktická část

3.1 Použité chemikálie

V této bakalářské práci byly používány následující látky, které byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich: diosmin, digoxin, digitoxin, quercitrin, novobiocin, acetonitril, methanol, kyselina mravenčí, kyselina octová, chloristan sodný, octan amonný, hexafluorofosforečnan amonný, 2-methylpropan-2-ol (*terc*-butanol), hydrogenuhlíčan amonný, trifluoroctan sodný. Rozpouštědla měla čistotu stupně LC-MS grade, ostatní látky měly čistotu stupně HPLC grade. Ultračistá voda, používaná na přípravu mobilních fází, byla získána přístrojem Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (ThermoFisher Scientific) ASTM I (18,2 M Ω .cm při 25 °C). Glykosidy byly přechovávány v lednici při 4 °C.

3.2 Použité přístroje, pomůcky a počítačové programy

Chromatografické analýzy byly provedeny na analytickém systému Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific). Přístroj se skládal z těchto částí: binární vysokotlaké čerpadlo HPG-3400RS s vakuovým odplyňovačem, kolonový termostát TCC-3000, automatického dávkovače WTS-3000 s šesticestným ventilem a nástřikovou smyčkou o objemu 25 μ l, UV-VIS detektoru s diodovým polem DAD-3000 pro sběr dat 100 Hz, 190-800 nm. Do vysokotlakého okruhu mobilní fáze za automatický dávkovač vzorků byl pro mechanickou ochranu chromatografické kolony vložen in-line filtr s kovovou fritou o porozitě 2 μ m (Vici Jour).

K ověření složení a čistoty vzorků glykosidů byl využit vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr (High Resolution Mass Spectrometr, HRMS) Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific) s iontovým zdrojem HESI (Heated ElectroSpray Ionization) a generátorem nosného plynu (Peak Scientific Genius 1022). Nosným i kolizním plynem byl dusík. HRMS bylo zapojené v systému LC-UV za DAD detektorem (Obr. 12). HRMS bylo před měření kalibrováno pomocí roztoku Pierce® LTQ Velos ESI (Thermofisher Scientific).



Obr. 12 Sestava chromatografu s hmotnostním spektrometrem použitým při analýze. Převzato z internetu [42].

K přípravě roztoků analytických vzorků a mobilních byly použity tyto pomůcky: analytické váhy Sartorius CPA225D-0CE, pipety Eppendorf® Reference (0,5 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 100 - 1 000 μ l), ultrazvuková lázeň Elma S 40, špičky k pipetám Eppendorf®, skleněné mikrozkrumavky neboli vialky (Fisher Scientific, ND9, V = 1,5 ml) s polypropylenovým víčkem a silikon-PTFE septem, špachtle, lihový popisovač, skleněné odměrné válce, laboratorní třepačka LabDancer, skleněná filtrační aparatura pro vakuovou filtraci mobilní fází, nylonové filtry s póry 0,45 μ m.

Chromatografické analýzy byly provedeny na těchto chromatografických kolonách:

1. Kinetex® 2,6 μ m HILIC 100 Å, 150 x 3 mm, P/N: 00F-4461-Y0, S/N: H19-163308, B/N: 5568-0422 (Phenomenex). Dále jen HILIC.
2. Luna® 3 μ m NH2 100Å, 100 x 2 mm, P/N: 00D-4377-BO, S/N: H19-1990090, B/N: 5377-0021 (Phenomenex). Dále jen Luna-NH2.
3. Kinetex® 2,6 μ m, C18 100Å, 100 x 2,1 mm, P/N: 00D-4462-AN, S/N: H16-218788, B/N: 5569-0213 (Phenomenex). Dále jen C18.
4. Kinetex® 2,6 μ m PFP 100Å, 150 x 3 mm, P/N: 00F-4477-40, S/N: H18-309486, B/N: 5576-0073 (Phenomenex). Dále jen PFP.
5. Kinetex® 2,6 μ m EVO C18 100 Å, 150 x 3 mm, P/N: 00F-4725-Y0, S/N: H18-316748, B/N: 5725-0032 (Phenomenex). Dále jen K-EVO-C18.

Pro zpracování dat, kreslení chemických vzorců a provádění výpočtů byly využity tyto počítačové programy: Chromeleon 6.80 SR13, Xcalibur 3.0.63, MarwinSketch 15.12.7, ChemSketch 2017.2.1, Microsoft Excel 2016.

3.3 Příprava mobilních fází

Pro analýzy byly používány čisté mobilní fáze, mobilní fáze s přidaným chaotropním či kosmotropním činidlem, a mobilní fáze s modifikátory pH, připravované do zásobních lahví o objemu 250 nebo 500 ml.

Při přípravě vodné fáze se používala ultračistá voda typu ASTM I, získaná přístrojem Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF. Organickou mobilní fází tvořil acetonitril o čistotě stupně LC-MS grade. Čisté zásobní láhve i odměrný válec se vymyly danou kapalinou, a ta byla následně odměřena a přelita do zásobníku. Pro odplynění mobilních fází posloužila ultrazvuková lázeň Elma S 40, do které byly vloženy zásobní lahve s MF na 10 minut. Poté byla skleněná filtrační aparatura pro vakuovou filtraci mobilních fází omyta ethanolem, vysušena a připevněna do zásobníků MF.

Při přípravě MF s kosmotropními či chaotropními činidly byla při analýzách použita různá koncentrace těchto činidel, nejčastěji však o koncentraci 20 mM nebo 50 mM, která byla odvažována na analytických vahách firmy Sartorius CPA225D-0CE. Poté byla navážená činidla kvantitativně převedena do roztoků mobilních fází a pro jejich rozpuštění a desonifikaci MF byly roztoky vloženy do ultrazvukové lázně.

Použitým pH modifikátorem byla octová nebo mravenčí kyselina. Pro jejich odměření byly použity pipety a špičky firmy Eppendorf®. Práce s kyselinou octovou probíhala v digestoři.

Glykosidy byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich o čistotě stupně HPLC grade a byly uchovávány v lednici při 4°C. Pro analýzu byly připraveny vzorky o různých koncentracích. Nejčastěji se jednalo o koncentraci 1 mg/ml. Vzorky byly naváženy na analytických vahách od firmy Sartorius do popsaných skleněných vialek (mikrozkumavek). K nim byl pomocí automatické pipety přidán vytvořený roztok mobilních fází v poměru 1:1. Mikrozkumavky byly uzavřeny polypropylenovým víčkem se silikon-PTFE septem a protřepány na laboratorní třepačce. Vzhledem ke špatnému rozpouštění některých glykosidů byly vzorky dány na pár minut do ultrazvukové lázně pro jejich úplné rozpuštění. Takto připravené vzorky byly použity pro analýzu.

3.4 Návrh analytických metod

V této práci bylo cílem vyzkoušet různé typy elučních metod na dvou chromatografických systémech – reverzním a hydrofilním interakčním, porovnat je a posoudit vliv přidaných činidel a modifikátorů na účinnost separace. Při realizaci experimentální části jsme tedy postupovali takto:

Analýzy byly rozděleny na metody s kolonou C18 a na systémy využívající kolonu s aplikovatelným HILIC režimem (kolona Luna-NH₂, kolona Kinetex HILIC).

Nejprve byla ověřena čistota a identita analyzovaných glykosidů pomocí LC-UV-MS systému. Poté byla aplikována gradientová a isokratická eluční metoda s použitím čistých mobilních fází v režimu HILIC a v RP-LC.

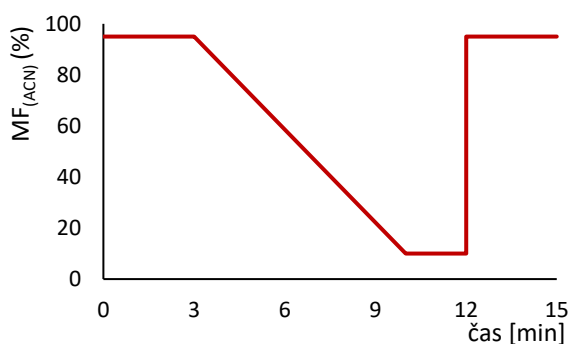
Z těchto analýz byl vybrán gradientový eluční program, který se jevil jako nejvhodnější a byl využit pro separaci glykosidů s použitím vybraných chaotropů a kosmotropů. Tato činidla byla volena s ohledem na jejich rozpustnost, jelikož mnoho z nich bylo omezeně rozpustných v organické mobilní fázi, kterou tvořil acetonitril.

Z aplikovaných metod byla vybrána činidla, která poskytovala zajímavé výsledky z hlediska změny retenčních časů a k nim byly přidávány modifikátory pH. Jednalo se o kyselinu mravenčí (HCOOH, v textu používaná zkratka FA) a o kyselinu octovou (CH₃COOH, zkratka AA).

U všech metod byly následně porovnávány výsledky a kvalita separace glykosidů v HILIC a RP-LC módu.

3.5 Ověření čistoty a identity vzorků metod

Roztoky vzorků glykosidů v 50 % acetonitrilu ve vodě o koncentraci $c = 1$ mg/ml byly nejprve analyzovány pomocí LC-UV-MS systému, abychom ověřili jejich čistotu a identitu. Jako mobilní fáze byla použita směs čistého acetonitrilu a vody, která byla kombinovaná lineárním gradientem popsáním v Tab. 1 a zobrazeným na Obr. 13.



Obr. 13 Gradientová křivka.

Tab. 1. Gradientový program.

Čas (min)	MF(ACN)%	MF(H ₂ O)%
0	95	5
3	95	5
10	10	90
12	10	90
12	95	5
15	95	5

Pro analýzu byla použita kolona K-HILIC (více informací lze nalézt v kapitole Použité pomůcky). Hmotnostní spektrometr byl ponechán v defaultním nastavení, přičemž zaznamenával přítomnost kladně a záporně nabitých iontů v rozsahu hodnot $m/z = 100 - 1500$. Data z UV-VIS byla pro tento případ zaznamenávána při vlnové délce 254 nm. Tato vstupní analýza potvrdila, že studované glykosidy diosmin, quercitrin, digoxin, digitoxin a novobiocin mají přepokládanou hodnotu m/z a v UV chromatogramu prokázaly více než 98 % nekalibrované čistoty při vlnové délce 254 nm.

3.6 Analýza vzorků glykosidů na koloně typu HILIC

Předpokladem našeho výzkumu bylo, že na separaci vybraných polárních molekul glykosidů bude výhodné použít moderní HPLC metodiku založenou na principu hydrofilních interakcí (HILIC), která je nástupcem klasické chromatografie na normální fázi. V rámci rešerše odborné literatury jsme objevili několik případů, kdy byl pro chromatografickou separaci rostlinných glykosidů režim HILIC, např. [24]. Proto jsme nejprve provedli analýzu všech vybraných glykosidů (tj. diosmin, quercitrin, digoxin, digitoxin a novobiocin) pomocí gradientové eluční metody s využitím kolony Kinetex HILIC, 150x3 mm / 2,6 μm , 100 Å (dále jen HILIC) a mobilní fáze složené z čistého acetonitrilu a vody bez modifikátorů. Gradientový program byl stejný, jak je uvedeno v Tab. 1 a graficky zobrazeno na Obr. 1. Analytický systém byl nastaven takto: průtokový objem = 0,4 ml/min, nástřikový objem = 0,1 μl , teplota v autosampleru = 10 °C, teplota na kolonového termostatu = 27 °C, vlnové délky u zaznamenávaných absorbancí: $\lambda = 210, 254, 275, 290$ nm a UV spektrum v rozsahu 200 - 350 nm (krom 2 nm).

Ze získaných chromatogramů byly v programu Chromeleon 6.8 a Microsoft Excel vypočítány hodnoty průměrných retenčních časů, asymetrií píků a šířek v polovině výšek píků. Hodnoty retenčních časů, asymetrií a šířek v polovině výšek píků jsou

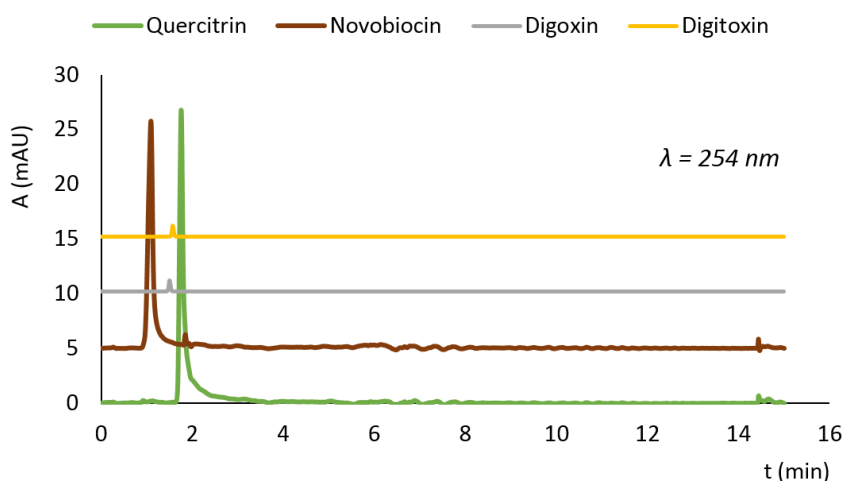
uvedeny v Tab. 2. Přeložené chromatogramy zaznamenané při vlnové délce 254 nm, od kterých byl odečten signál blankového vzorku, jsou uvedeny na Obr. 14.

Tab. 2. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony HILIC a gradientové eluce.

Látka	R _t [min] ^a	w _{0,5} [min] ^a	A ^a	Látka	R _t [min] ^a	w _{0,5} [min] ^a	A ^a
Quercitrin	1,84 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1.54 ± 0.02	Digoxin	1,73 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1.01 ± 0.00
Novobiocin	1,67 ± 0,00	0,04 ± 0,00	1.01 ± 0.00	Digitoxin	1,79 ± 0,01	0,7 ± 0,01	1.02 ± 0.00
Diosmin	n.a. ^b	n.a.	n.a.				

^a Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetické průměry 3 měření a jejich výběrová směrodatná odchylka.

^b Hodnoty nebyly dostupné (n.a. – not available)



Obr. 14 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu na koloně HILIC s využitím gradientové eluce.

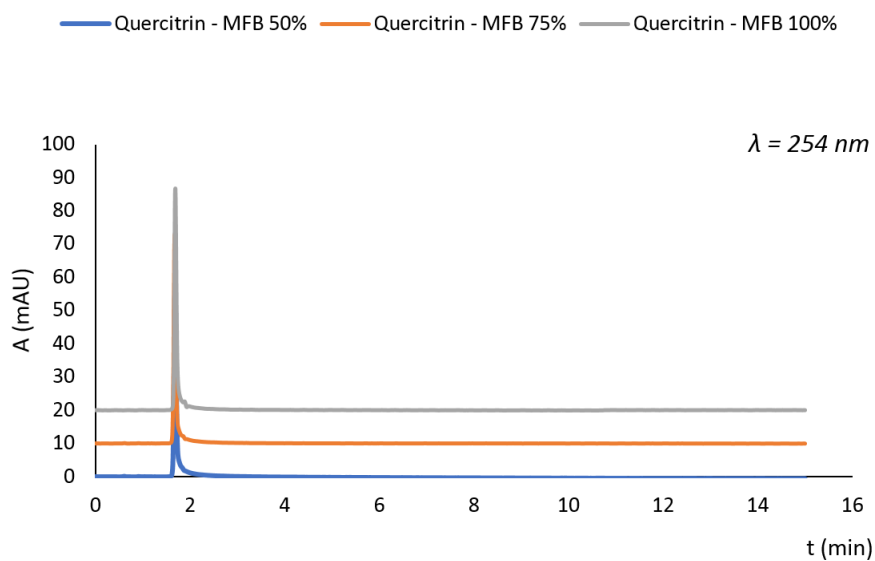
Kromě gradientové eluce bylo u kolony HILIC provedeno studium isokratické eluce, kdy jsme vycházeli nejprve z mobilní fáze složené z acetonitrilu (MFB) a vody (MFA) v poměru 1:1 (v/v) a poté jsme po 25 % procentech (v/v) zvyšovali obsah acetonitrilu až na 100 %. Nastavení analytického systému zůstalo shodné, jako v případě analýzy s gradientovou elucí. Chromatografické veličiny detekovaných píků glykosidů jsou uvedeny v Tab. 3. Jelikož se retenční časy zkoumaných glykosidů při studiu isokratické eluce příliš neměnily, uvádíme pouze přeložené chromatogramy pro analýzu quercitrinu (Obr. 15.), novobiocinu, u něhož docházelo k nejvýraznějším změnám chromatografických vlastností (Obr. 16.).

Tab. 3. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony HILIC a isokratické eluce.

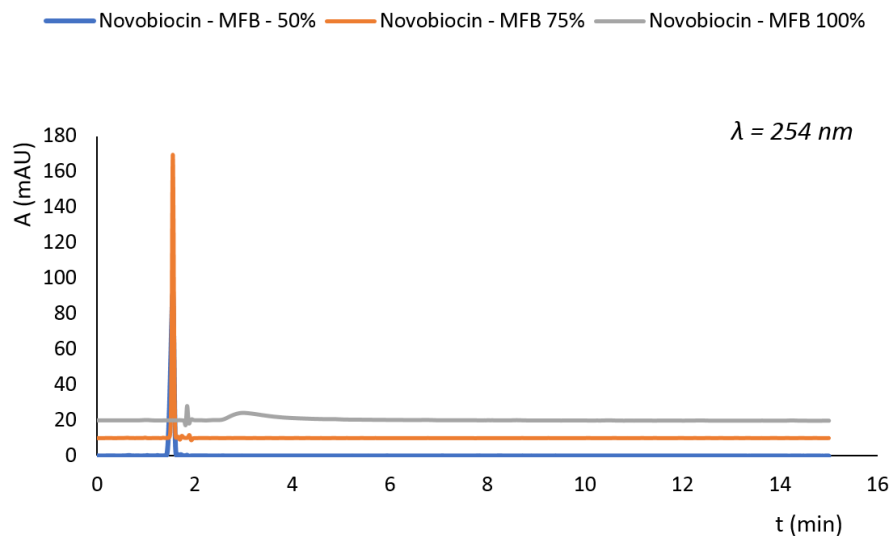
Látka	MF		R_t [min] ^a	$w_{0,5}$ [min] ^a	A^a
	B (%)	A (%)			
Diosmin	50	50	n. a. ^b	n. a.	n. a.
Quercitrin	50	50	1,68 ± 0.06	0,07 ± 0.02	0,95 ± 0.00
Digoxin	50	50	1,57 ± 0.05	0,09 ± 0.02	0,96 ± 0.00
Digitoxin	50	50	1,50 ± 0.05	0,03 ± 0.01	0,94 ± 0.00
Novobiocin	50	50	1,43 ± 0.04	0,05 ± 0.01	0,93 ± 0.00
Diosmin	75	25	n. a.	n. a.	n. a.
Quercitrin	75	25	1,69 ± 0.04	0,05 ± 0.02	1,82 ± 0.01
Digoxin	75	25	1,60 ± 0.03	0,09 ± 0.02	1,01 ± 0.00
Digitoxin	75	25	1,52 ± 0.02	0,03 ± 0.01	1,02 ± 0.00
Novobiocin	75	25	1,55 ± 0.03	0,05 ± 0.01	1,05 ± 0.01
Diosmin	100	0	n. a.	n. a.	n. a.
Quercitrin	100	0	1,72 ± 0.03	0,05 ± 0.04	1,20 ± 0.01
Digoxin	100	0	1,65 ± 0.02	0,16 ± 0.03	1,12 ± 0.01
Digitoxin	100	0	1,62 ± 0.03	0,15 ± 0.03	1,02 ± 0.00
Novobiocin	100	0	2,97 ± 0.02	0,56 ± 0.04	1,92 ± 0.02

^a Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetické průměry 3 měření a jejich výběrová směrodatná odchylka.

^b Hodnoty nebyly dostupné (n.a. – not available)



Obr. 15 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu quercitrinu na koloně HILIC s využitím isokratické eluce.



Obr. 16 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu novobiocinu na koloně HILIC s využitím isokratické eluce.

Na koloně HILIC jsme provedli ještě další experimenty s mobilní fází a měnili jsme výchozí a nejnižší koncentraci MFB v gradientu. Taktéž jsme zkoumali isokratickou eluci v rozsahu koncentrací MFB 90–100 % (v/v), avšak analýzy nepřinesly žádné pozitivní výsledky, pokud jde o uspokojivý retenční čas a asymetrii píků.

3.7 Analýza vzorků glykosidů na koloně typu Luna-NH2 HILIC

Protože vybrané glykosidy jsou ve většině případů slabými donory vodíkových vazeb i protonů, zvolili jsme pro další experimenty kolonu Luna® NH2 100 x 2 mm/3 μ m, 100Å (dále jen Luna-NH2), která by pravděpodobně mohla přinést v elučním režimu HILIC zlepšení chromatografických vlastností. Výrobce doporučuje tuto kolonu pro analýzu monosacharidů, komplexních sacharidů, cukerných alkoholů a podobných látek.

V prvním experimentu na této koloně jsme provedli gradientovou eluci s využitím čisté vody (MFA) a acetonitrilu (MFB). Gradientový program měl analogickou povahu jako gradient uvedený na Obr. 1, začínal však na nižší koncentraci MFB. Použitý gradient lze popsat stručně takto: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Analytický systém byl nastaven stejným způsobem, jako při analýzách na koloně HILIC (tj. průtokový objem = 0,4 ml/min, nástřikový objem = 0,1 μ l, teplota v autosampleru = 10 °C, teplota na kolonového termostatu = 27 °C, vlnové délky u zaznamenávaných absorbancí: λ = 210, 254, 275, 290 nm a UV spektrum v rozsahu 200-350 nm (krom 2 nm)), ale délka metody činila 19 minut.

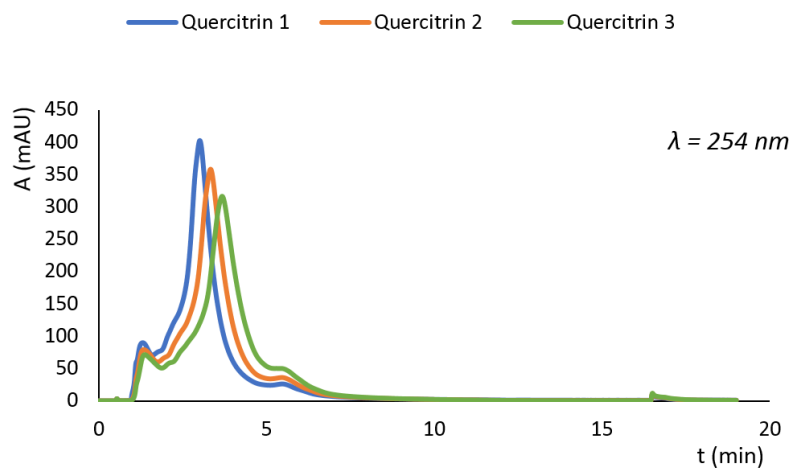
Při analýzách jsme zjistili, že dochází k nestabilní eluci, ačkoli přístroj byl mezi analýzami důkladně ekvilibrován průtokem mobilní fází o koncentraci odpovídající

počátečním podmínkám gradientového programu. Glykosidy, které se na koloně nezadržovaly a eluovaly při mrtvém retenčním čase, měly pochopitelně retenci stabilní. Výsledky analýz glykosidů na koloně Luna-NH2 jsou uvedeny v Tab. 3. Z důvodu lepší prezentace změn retence jsme v tomto případě neprováděli statistické zpracování dat.

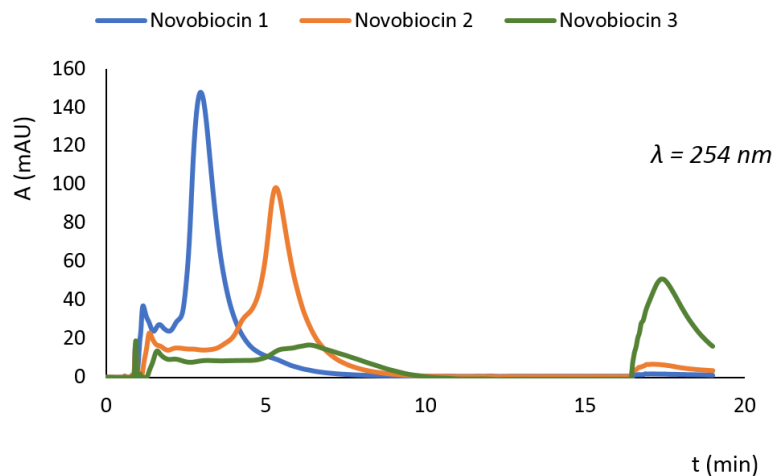
Tab. 4. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	2,96	0,79	1,46	Quercitrin	3,01	0,65	1,00
	5,32	0,96	1,07		3,33	0,73	0,96
	17,40	1,43	1,29		3,67	0,79	0,90
Digoxin	0,93	0,05	0,98	Digitoxin	0,88	0,05	1,31
	0,93	0,05	0,94		0,89	0,05	1,26
	0,93	0,05	0,92		0,89	0,05	1,30
Diosmin	0,95	0,03	0,93				
	0,95	0,03	0,96				
	0,95	0,03	0,92				

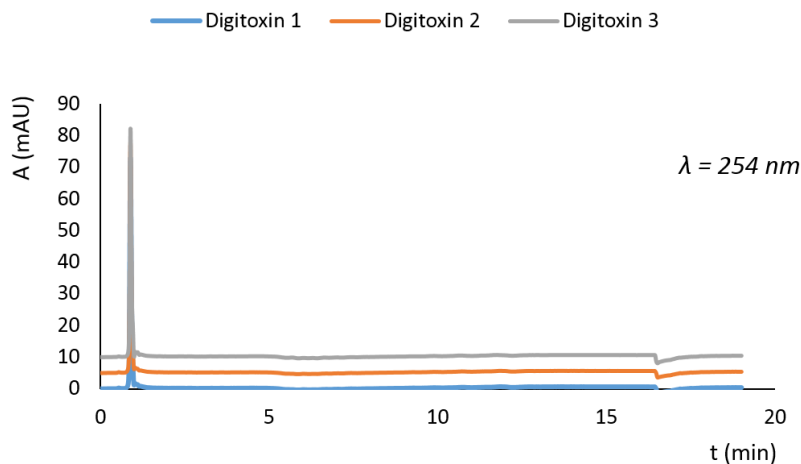
Chromatogramy glykosidů získané gradientovou elucí na koloně Luna-NH2, které neeluovaly v mrtvém retenčním čase, jsou prezentovány na Obr. 17–19.



Obr. 17 Přeložené chromatogramy zobrazující opakovanou LC-UV analýzu quercitrinu na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce.



Obr. 18 Přeložené chromatogramy zobrazující opakovanou LC-UV analýzu novobiocinu na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce.



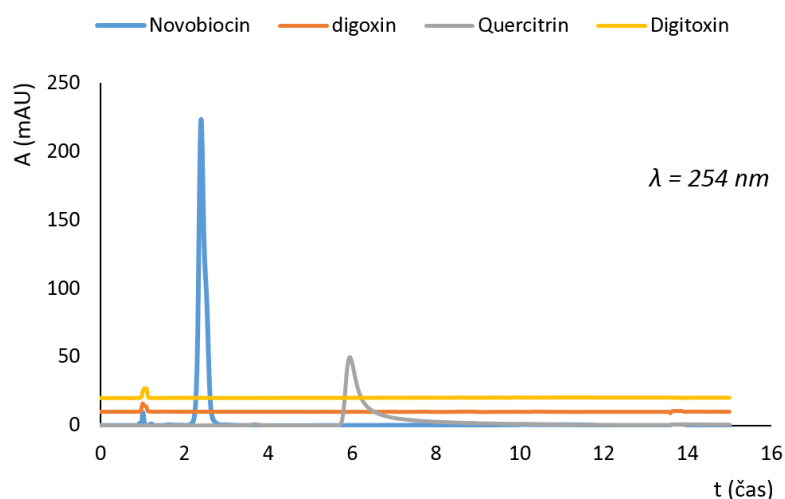
Obr. 19 Přeložené chromatogramy zobrazující opakovanou LC-UV analýzu digitoxinu na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce.

V další fázi výzkumu jsme se zaměřili na studium vlivu chaotropních a kosmotropních činidel. Jako kosmotropní činidlo jsme zvolili chloristan sodný, který jsme přidali do vody (MFA) a acetonitrilu (MFB) v množství 50 mM. Pro kombinování složek mobilních fází jsme zvolili následující gradientový program: 0 min - 50 % MFB, 3 min - 50 % MFB, 10 min - 0 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 12 min - 50 % MFB, 15 min - 50 % MFB. Chromatografické charakteristiky glykosidů získané touto metodou jsou uvedené v Tab. 5.

Tab. 5. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fáze s přídavkem 50 mM NaClO₄.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	2,35	0,15	1,32	Quercitrin	5,94	0,32	4,84
	2,36	0,16	1,31		6,12	0,33	4,50
	2,40	0,16	1,33		6,31	0,32	5,15
Digoxin	1,00	0,13	0,88	Digitoxin	1,02	0,07	1,18
	1,00	0,13	0,89		1,02	0,07	1,19
	1,00	0,13	0,90		1,02	0,07	1,18
Diosmin	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				

Chromatogramy získané elucí glykosidů na koloně Luna-NH2 pomocí mobilní fáze s přídavkem 50 mM chloristanu sodného jsou uvedeny na Obr. 20.

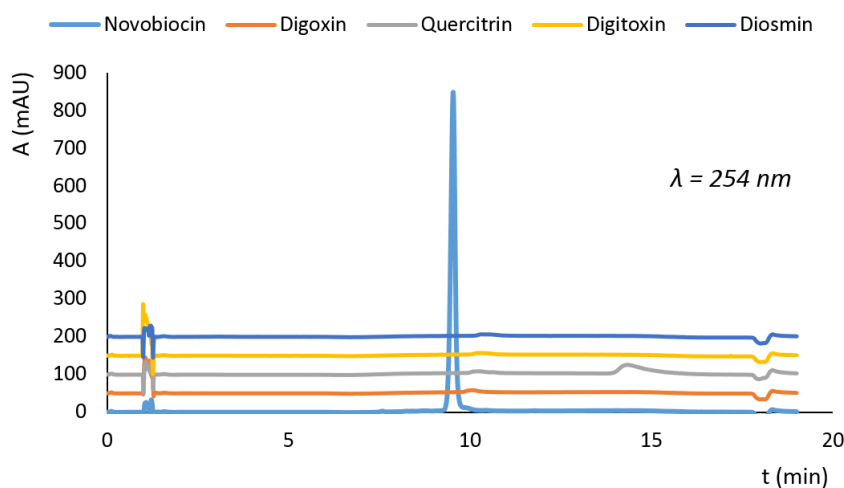


Obr. 20 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fáze s přídavkem 50 mM NaClO₄.

Pokud byla stejná analýza provedena pouze s 5 mM přídavkem chloristanu sodného do mobilní fáze a gradient měl vyšší počáteční koncentraci MFB, došlo převážně ke zvýšení retence. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6 a demonstrovány na Obr. 21.

Tab. 6. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím strmější gradientové eluce mobilní fází s přidavkem 5 mM NaClO₄.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	9,53	0,13	0,94	Quercitrin	14,46	2,83	2,35
	9,57	0,13	0,96		14,36	2,38	2,35
	9,61	0,13	0,96		14,33	2,30	2,56
Digoxin	1,25	0,03	0,89	Digitoxin	0,99	0,05	0,99
	1,25	0,03	0,88		0,99	0,04	0,89
	1,25	0,03	0,88		0,99	0,06	0,90
Diosmin	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				

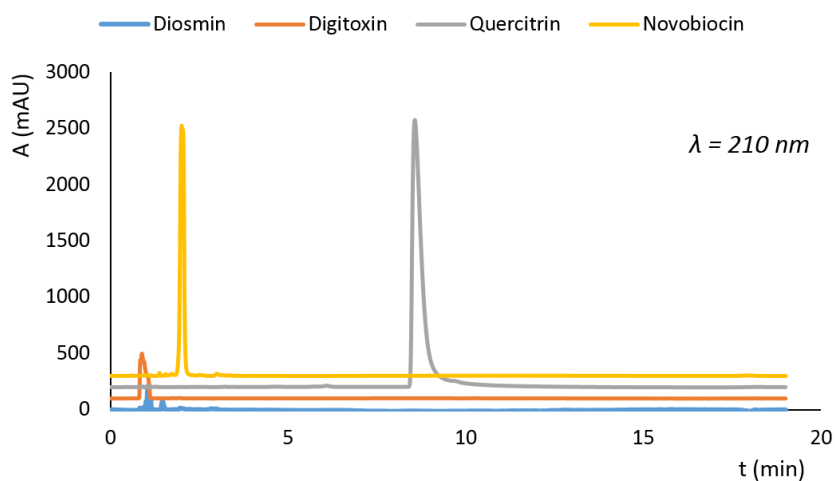


Obr. 21 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 5 mM NaClO₄.

Další experiment byl proveden úpravou mobilní fáze pomocí přidavku 14 mM hydrogenuhličitanu amonného. Protože se hydrogenuhličitan amonný rozpouští jen v omezené míře v čistém acetonitrilu, bylo nutné jako složku mobilní fáze MFB zvolit 80 % (v/v) vodný roztok acetonitrilu. Při eluci bylo využito následujícího lineárního elučního programu: 0 min – 90 % MFB, 3 min – 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Výsledky LC-UV analýzy jsou uvedeny v Tab. 7 a graficky prezentovány na Obr. 22.

Tab. 7. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fází s přídavkem 14 mM NH₄HCO₃.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	2,03	0,12	0,69	Quercitrin	8,56	0,271	1,69
	2,00	0,12	0,70		8,56	0,268	1,69
	2,06	0,13	0,68		8,56	0,266	1,68
Digoxin	0,96	0,01	0,98	Digitoxin	0,88	0,03	0,83
	0,99	0,03	0,98		0,89	0,02	0,89
	0,98	0,03	0,99		0,89	0,02	0,99
Diosmin	1,11	0,04	0,94				
	1,040	0,04	0,96				
	1,043	0,05	0,98				

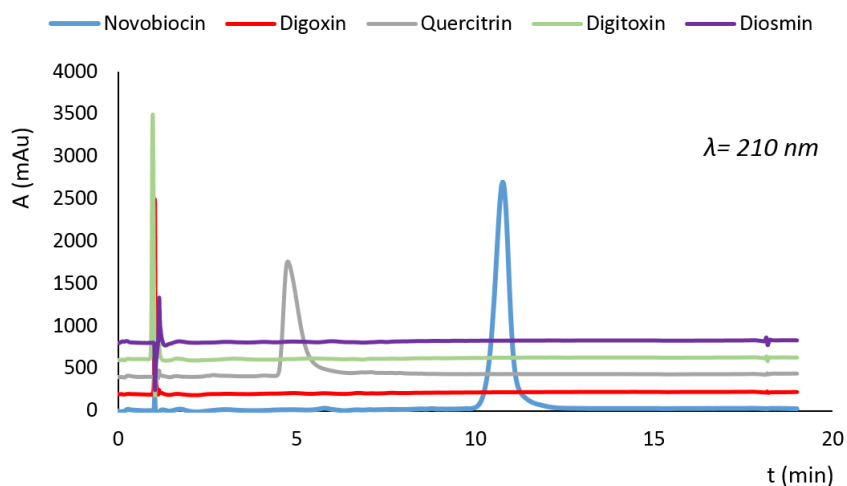


Obr. 22 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přídavkem 14 mM NH₄HCO₃.

Dále byl proveden experiment, kdy byl do mobilní fáze přidán trifluoroctan sodný v množství 20 mM, a to jak do vody (MFA), tak do čistého acetonitrilu (MFB) ve stejném množství. Pro eluci na koloně Luna-NH2 byl použit následující lineární gradient: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Chromatografické vlastnosti studovaných glykosidů jsou uvedeny v Tab. 8 a zobrazeny na Obr. 23.

Tab. 8. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fází s přidavkem 20 mM Na(CF₃COO).

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	10,76	0,92	0,76	Quercitrin	4,75	0,04	1,49
	10,76	0,95	0,68		4,75	0,04	1,48
	10,73	0,89	0,67		4,72	0,03	1,48
Digoxin	1,02	0,03	1,21	Digitoxin	0,97	0,05	0,99
	1,02	0,03	1,08		0,96	0,06	0,98
	1,02	0,03	1,19		0,97	0,06	0,98
Diosmin	1,15	0,02	0,99				
	1,15	0,03	0,96				
	1,15	0,04	0,98				

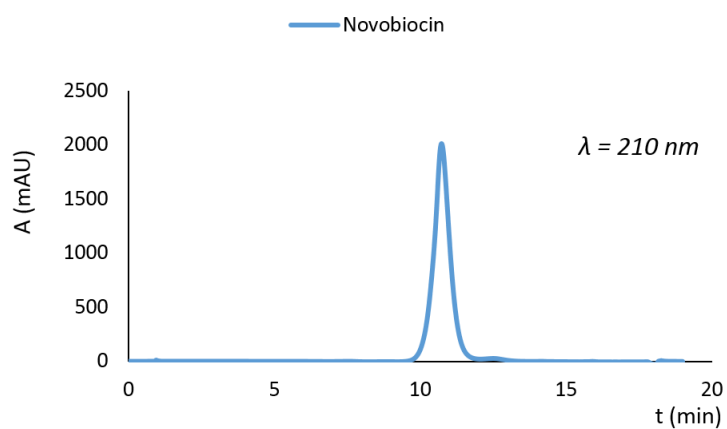


Obr. 23 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM Na(CF₃COO).

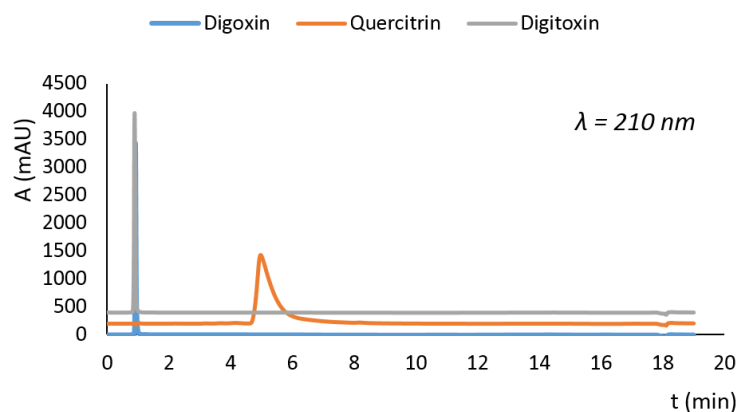
V sérii experimentů s chaotropními činidly byl dále testován vliv přidavku 20 mM NH₄PF₆ do obou složek mobilní fáze MFA a MFB. Použit byl následující gradientový program: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. U této analýzy docházelo v případě novobiocinu k velmi markantnímu nárůstu retence, díky které pík novobiocinu vycházel z chromatografické kolony až po druhé analýze. Výsledky LC-UV analýz na koloně Luna-NH2 s mobilní fází s přidavkem 20 mM NH₄PF₆ jsou uvedeny v Tab. 9. Chromatogram ukazující pík novobiocinu, který eluoval při druhém nástřiku vzorku, je uveden a na Obr. 24. Chromatogramy digoxinu, digitoxinu a quercitrinu jsou uvedeny na Obr. 25.

Tab. 9. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fáze s přidavkem 20 mM NH₄PF₆.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	n. a.	n. a.	n. a.	Quercitrin	4,97	0,51	3,92
	n. a.	n. a.	n. a.		4,58	0,46	3,20
	n. a.	n. a.	n. a.		4,25	0,43	3,24
Digoxin	0,91	0,03	1,07	Digitoxin	0,83	0,05	1,08
	0,91	0,03	1,02		0,88	0,05	1,05
	0,91	0,03	1,03		0,88	0,05	1,09
Diosmin	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				
	n. a.	n. a.	n. a.				



Obr. 24 Chromatogram LC-UV analýzy novobiocinu na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM NH₄PF₆. Pík eluoval až při druhém nástřiku vzorku.

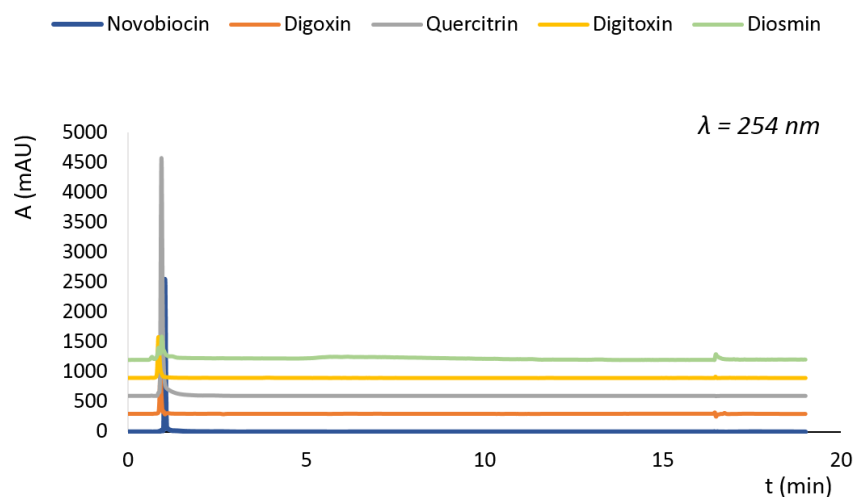


Obr. 25 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přísávkem 20 mM NH₄PF₆.

V následujícím experimentu jsme kromě přísávků chaotropu v množství 20 mM chloristanu sodného též změnili pH mobilní fáze přísávkem 20 mM kyseliny mravenčí. K eluci byl využit následující gradientový program: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Výsledky LC-UV analýz na koloně Luna-NH2 s mobilní fází s přísávkem 20 mM NaClO₄ a 20 mM HCOOH jsou uvedeny v Tab. 10 a vizualizovány na Obr. 26.

Tab. 10. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fází s přísávkem 20 mM NaClO₄ a 20 mM HCOOH.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	1,03	0,04	1,21	Quercitrin	0,93	0,05	1,54
	0,92	0,10	1,26		0,93	0,05	1,64
	0,82	0,07	1,53		0,93	0,05	1,63
Digoxin	0,90	0,05	0,96	Digitoxin	0,85	0,06	1,55
	0,90	0,05	0,95		0,85	0,06	1,57
	0,90	0,05	0,94		0,85	0,06	1,55
Diosmin	0,92	0,05	0,99				
	0,93	0,03	1,00				
	0,93	0,03	0,98				

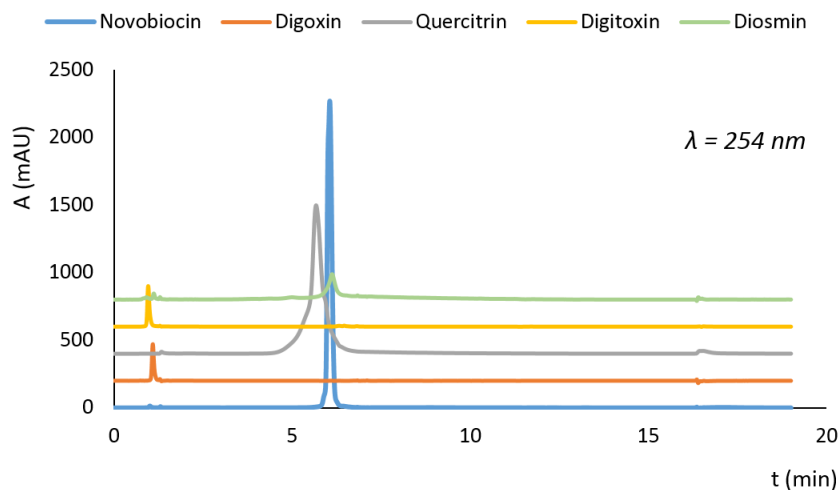


Obr. 26 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM NaClO₄ a 20 mM HCOOH.

Další LC-UV analýza byla provedena s mobilní fází, kterou jsme modifikovali přidavkem 20 mM octanu amonného + 20 mM kyseliny octové. Při eluci byl využit následující lineární gradient: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Výsledky LC-UV analýz na koloně Luna-NH2 s mobilní fází s přidavkem 20 mM octanu amonného + 20 mM kyseliny octové jsou uvedeny v Tab. 11 a vizualizovány na Obr. 27.

Tab. 11. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fází s přidavkem 20 mM octanu amonného + 20 mM kyseliny octové.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	6,05	0,14	1,03	Quercitrin	5,67	0,28	0,92
	6,05	0,14	1,05		5,67	0,28	0,93
	6,06	0,14	1,04		5,68	0,27	0,92
Digoxin	1,09	0,06	1,36	Digitoxin	0,96	0,06	1,03
	1,09	0,06	1,34		0,96	0,06	1,01
	1,09	0,06	1,35		0,96	0,06	1,02
Diosmin	6,12	0,20	0,98				
	6,13	0,20	0,82				
	6,12	0,21	1,09				

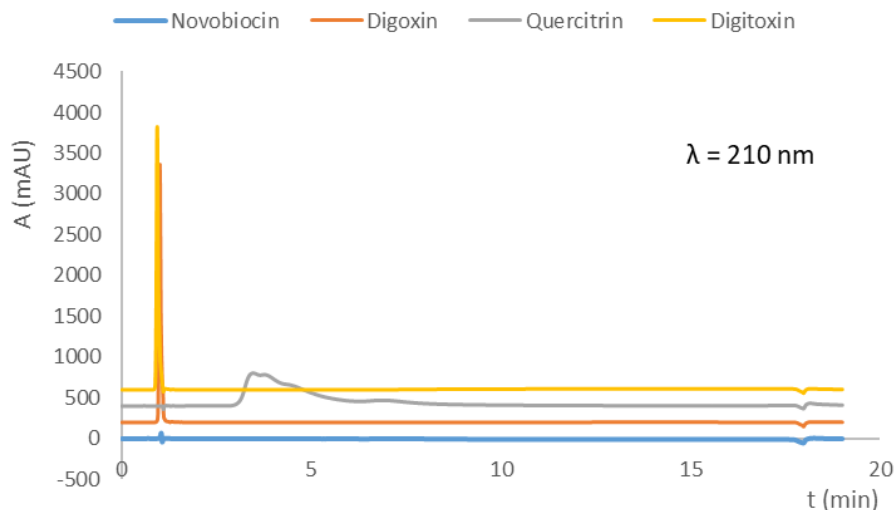


Obr. 27 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přídavkem 20 mM octanu amonného + 20 mM kyseliny octové.

Poslední analýzou, kterou jsme provedli na koloně Luna-NH2, byla gradientová eluce mobilní fází s přídavkem 20 mM *tert*-butanolu do obou složek, tj. voda i acetonitril. Při eluci byl využit následující lineární gradientový program: 0 min - 90 % MFB, 3 min - 90 % MFB, 12 min - 0 % MFB, 15 min - 0 % MFB, 15 min - 90 % MFB, 19 min - 90 % MFB. Výsledky LC-UV analýz na koloně Luna-NH2 s mobilní fází modifikovanou 20 mM *tert*-butanolu jsou uvedeny v Tab. 12 a graficky demonstrovány na Obr. 28.

Tab. 12. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí LC-UV analýzy na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce mobilní fází s přídavkem 20 mM *tert*-butanolu.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	1,04	0,04	n.a.	Quercitrin	3,46	n.a.	n.a.
	1,03	0,03	n.a.		3,72	n.a.	n.a.
	1,03	0,03	n.a.		4,03	n.a.	n.a.
Digoxin	1,00	0,05	1,55	Digitoxin	0,93	0,05	n.a.
	1,00	0,05	1,52		n.a.	n.a.	n.a.
	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Diosmin	n.a.	n.a.	n.a.				
	n.a.	n.a.	n.a.				
	n.a.	n.a.	n.a.				



Obr. 28 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně Luna-NH2 s využitím gradientové eluce s mobilní fází s přídavkem 20 mM *tert*-butanolu.

3.8 Analýza vzorků glykosidů na koloně typu C18

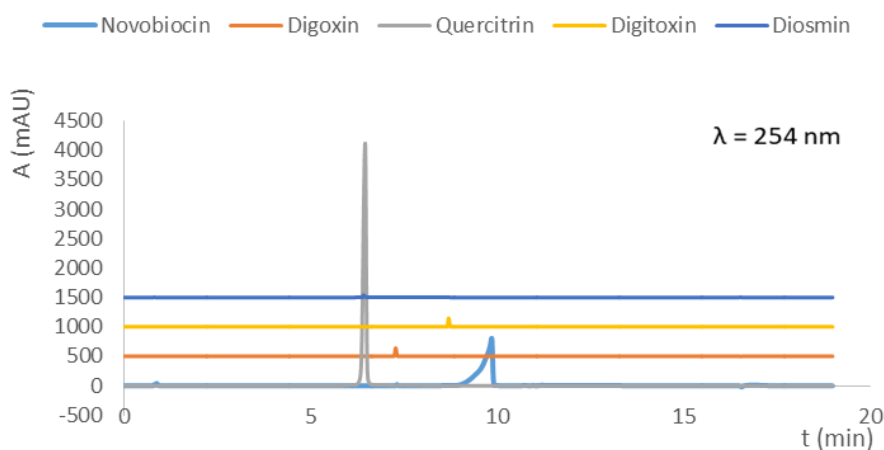
Protože cílem této práce bylo také porovnat metodu HILIC s chromatografií na reverzní fázi, aplikovali jsme korespondující metody na kolonu C18 Kinetex® 2,6 μm , C18 100Å, 100 x 2,1 mm, (dále jen C18).

Jako první byly využity mobilní fáze čistého ACN a H₂O bez přidaných modifikátorů. Vzorky glykosidů o koncentraci $c = 1\text{mg/ml}$: diosmin, quercitrin, novobiocin digitoxin a digoxin rozpuštěné v roztoku mobilních fází ACN+ H₂O (1:1), byly analyzovány použitím gradientové reverzní eluční metody, ve které se složení MF měnilo následovně:

MF_B (ACN) + MF_A (H₂O)

0 min - 10 % MF_B, 3 min - 10 % MF_B, 12 min - 100 % MF_B, 15 min - 100 % MF_B, 15 min - 10 % MF_B, 19 min - 10 % MF_B.

Metoda měla délku 19 min, průtokový objem byl nastaven na 0,3 ml/min, nástřikový objem na 5 μl , teplota v autosampleru = 10 °C a teplota na koloně: 27 °C. U absorbancí byly zaznamenávány na těchto vlnových délkách: $\lambda = 210, 254, 275, 290\text{ nm}$ a 3D UV spektrum v rozsahu 200 - 350 nm (se šířkou svazku 2 nm). Výsledné chromatogramy z programu Chromeleon 6.8, byly zpracovány v Microsoft Excel do tabulky s hodnotami retenčních časů, šířek v polovině výšky píku a asymetrií (viz Tab. 13 a Obr. 29). Přiložené chromatogramy jsou zaznamenány při vlnové délce $\lambda = 254\text{ nm}$.



Obr. 29 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 s využitím gradientové eluce s mobilní fází ACN+H₂O.

Tab. 13. Chromatografické veličiny stanovené pomocí kolony C18 gradientovou elucí.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	9,85	0,23	0,54	Quercitrin	6,46	0,09	0,76
	9,85	0,22	0,54		6,46	0,08	0,76
	9,85	0,22	0,54		6,46	0,09	0,76
Digoxin	7,28	0,04	1,05	Digitoxin	8,70	0,04	1,02
	7,28	0,04	1,06		8,70	0,04	1,10
	7,28	0,04	1,10		8,70	0,04	1,06
Diosmin	6,42	0,04	2,12				
	6,42	0,04	1,71				
	6,42	0,04	1,86				

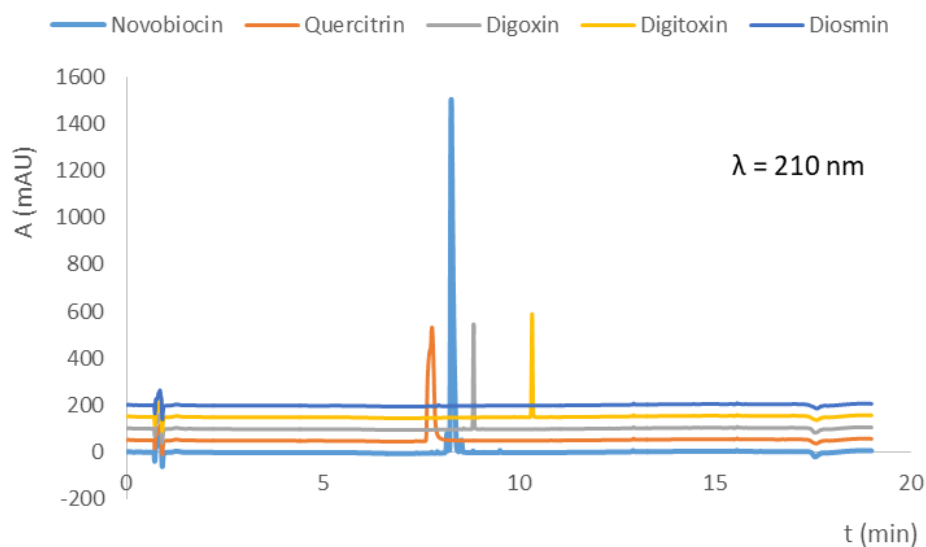
Byla taktéž provedena isokratická metoda na koloně Kinetex® EVO C18 2,6 μm 100 Å, 150 x 3 mm, v rozsahu koncentrací MFB 50–100 % (v/v), ale analýza neposkytla kvalitní výsledky. Docházelo k frontování píků, zejména u quercitrinu a látky se vymývaly v nízkém retenčním čase.

V další fázi výzkumu byl zkoumán vliv chaotropních a kosmotropních činidel na koloně C18. Prvním byl analogicky s analýzou na koloně typu HILIC vybráno kosmotropní činidlo chloristan sodný, přidaný do obou mobilních fází MF_A H₂O a MF_B ACN, o koncentraci 50 mM. Byl zvolen gradientový program s reverzním elučním režimem: 0 min - 10 % MFB, 3 min - 10 % MFB, 12 min - 100 % MFB, 15 min - 100 % MFB, 15 min - 10 % MFB, 19 min - 10 % MFB. Průtokový objem činil 0,3 ml/min, nástřikový objem byl nastaven na 5 μl, teplota v autosampleru na 10 °C a teplota na koloně na 27 °C.

U novobiocinu došlo ke snížení retenčních časů, zatímco u ostatních glykosidů byl retenční čas s přidavkem NaClO₄ vyšší. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 14 a chromatogramy uvedené na Obr. 30, byly detekovány při vlnové délce $\lambda = 210$ nm.

Tab. 14. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přidavkem 50 mM NaClO₄.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	8,28	0,06	0,71	Quercitrin	7,76	0,20	0,63
	8,31	0,08	0,86		7,78	0,23	0,66
	8,35	0,10	0,69		7,79	0,21	0,74
Digoxin	8,85	0,03	0,40	Digitoxin	10,34	0,03	0,04
	8,85	0,03	0,34		10,34	0,03	0,30
	8,85	0,03	0,16		10,34	0,03	0,26
Diosmin	7,95	0,05	1,01				
	7,96	0,04	0,41				
	7,96	0,04	0,44				



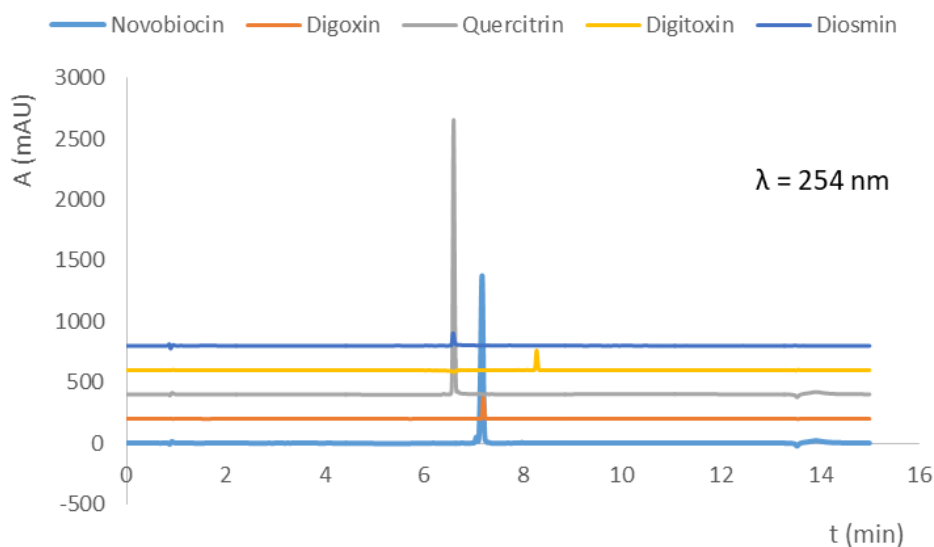
Obr. 30 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 s využitím gradientové eluce a mobilní fází s přidavkem 50 mM NaClO₄.

Dalším zvoleným modifikátorem bylo kosmotropní činidlo octan amonný (OA), který byl v koncentraci 20 mM přidán pouze do vodné mobilní fáze, vzhledem ke své špatné rozpustnosti v ACN. Byla zvolena 15minutová reverzní eluční metoda s gradientovým programem: 0 min - 3 % MFB, 3 min - 3 % MFB, 10 min - 100 % MFB, 12 min - 100 % MFB, 12 min - 3 % MFB, 15 min - 3 % MFB. Průtokový objem byl nastaven na 0,3 ml/min a nástřikový objem na 1 μ l. Oproti separaci s čistými MF

došlo ke snížení retenčních časů. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v Tab. 15 a znázorněny přiloženými chromatogramy na Obr. 31.

Tab. 15. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přídavkem 20 mM OA.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	7,17	0,05	0,92	Quercitrin	6,60	0,04	1,12
	7,17	0,05	0,89		6,61	0,04	1,14
	7,17	0,05	0,93		6,61	0,04	1,16
Digoxin	7,20	0,04	1,16	Digitoxin	8,27	0,04	1,15
	7,22	0,04	1,11		8,28	0,04	1,08
	7,22	0,04	1,19		8,27	0,04	1,14
Diosmin	6,59	0,04	1,93				
	6,59	0,04	1,99				
	6,58	0,04	1,89				



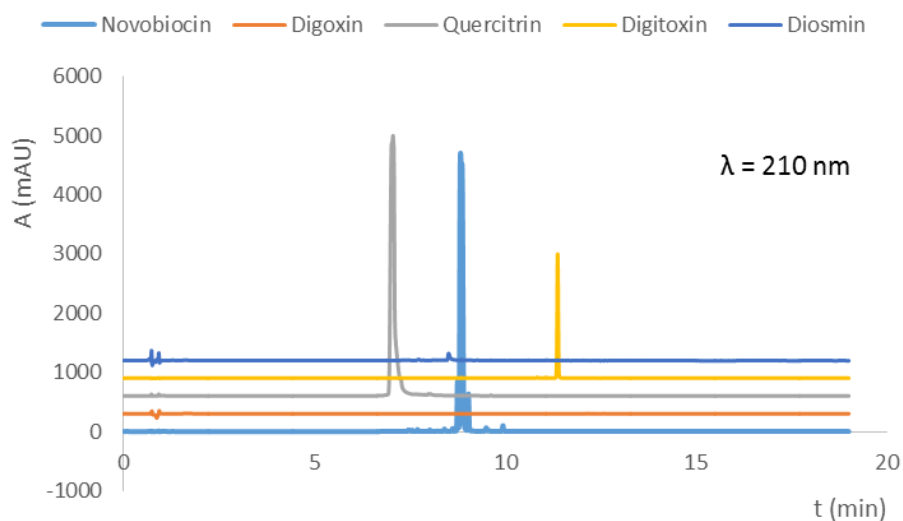
Obr. 31 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přídavkem 20 mM OA.

V následujících metodách byly vzorky analyzovány pomocí stejné gradientové eluční metody, jen byly měněny mobilní fáze a kosmotropní činidla. Byly použity vzorky rozpuštěné v roztoku methanolu a vody v poměru (1:1) o koncentraci $c = 1$ mg/ml: novobiocin, digoxin, quercitrin, digitoxin, diosmin. Metoda trvala 19 min, průtokový objem činil 0,3 ml/min, nástřikový objem: 5 μ l, teplota v autosampleru byla nastavena na 10 °C a teplota na koloně na 27 °C. Bylo využito následujícího lineárního elučního programu: 0 min - 10 % MFB, 3 min - 10 % MFB, 12 min - 100 % MFB, 15 min - 100 % MFB, 15 min - 10 % MFB, 19 min - 10 % MFB.

Do MF H₂O a ACN byl přidán 14 mM NH₄HCO₃. Byla zvolena nižší koncentrace z důvodu špatného rozpouštění látky v ACN při koncentraci vyšší. Výsledky jsou znázorněny v Tab. 16 a graficky prezentovány na Obr. 32.

Tab. 16. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přidavkem 14 mM NH₄HCO₃.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	8,82	0,09	0,47	Quercitrin	7,08	0,10	0,56
	8,83	0,08	0,24		7,05	0,11	0,71
	8,81	0,09	0,44		7,05	0,09	0,71
Digoxin	0,93	0,03	1,40	Digitoxin	11,37	0,03	0,93
	0,93	0,03	1,53		11,37	0,03	0,97
	0,93	0,03	1,36		11,37	0,03	0,93
Diosmin	8,51	0,05	0,62				
	8,17	0,05	0,63				
	8,51	0,06	0,67				

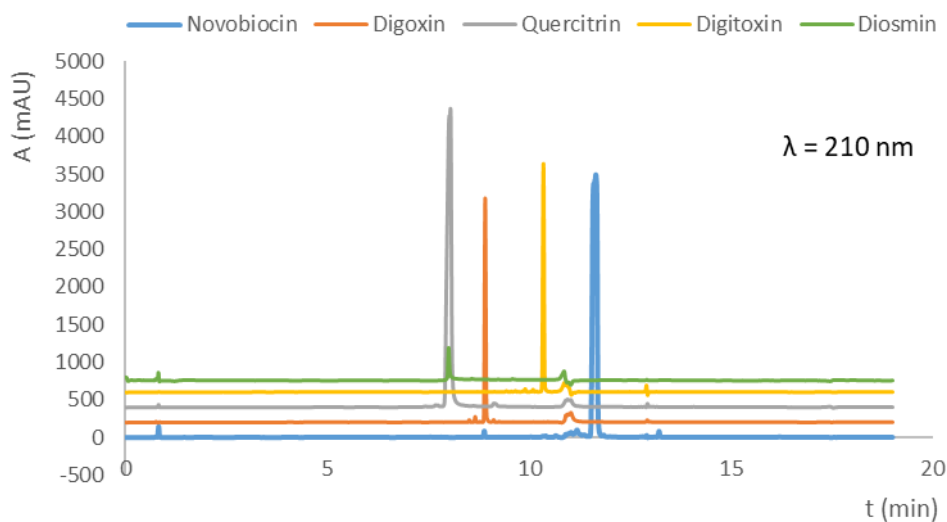


Obr. 32 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 14 mM NH₄HCO₃.

Dalším použitým kosmotropem byl NaCOOCF₃, přidáný do MFA i MFB v koncentraci 20 mM. Výsledky v Tab. 17 ukazují výrazné zvýšení retenčních časů, zejména u novobiocinu a digitoxinu. Grafické znázornění výsledků analýzy poskytuje Obr. 33.

Tab. 17. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přidavkem 20 mM NaCOOCF₃.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	11,64	0,23	0,68	Quercitrin	8,04	0,07	1,68
	11,64	0,22	0,59		8,02	0,08	1,68
	11,65	0,22	0,34		8,03	0,08	1,33
Digoxin	8,90	0,05	1,40	Digitoxin	10,35	0,04	0,90
	8,90	0,05	1,28		10,34	0,04	1,18
	8,90	0,06	1,40		10,34	0,04	1,14
Diosmin	8,00	0,05	0,62				
	8,00	0,05	0,63				
	8,00	0,06	0,67				

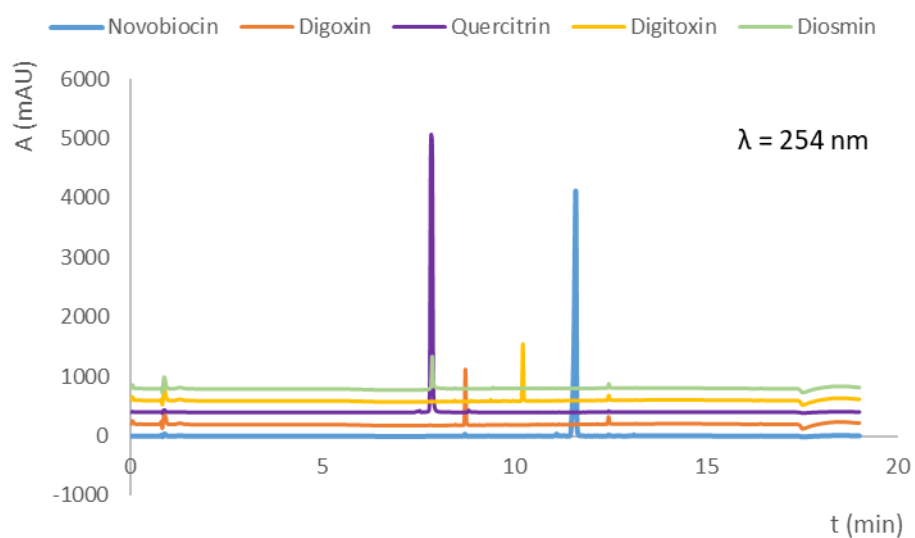


Obr. 33 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM NaCOOCF₃.

Ke zkoumaným kosmotropům také patřil hexafluoroctan amonný NH₄PF₆ v množství 20 mM ve vodné (MFA - H₂O) i organické fázi (MFB - ACN). Toto činidlo způsobilo zvýšení retenčních časů a metoda poskytla krásné úzké píky (viz. Tab. 18 a Obr. 34).

Tab. 18. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přidavkem 20 mM NH₄PF₆.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	
Novobiocin	11,60	0,05	0,65	Quercitrin	7,82	0,07	1,23	
	11,60	0,05	0,65			7,83	0,06	1,23
	11,59	0,05	0,66			7,83	0,07	1,22
Digoxin	8,87	0,03	1,04	Digitoxin	10,22	0,03	0,98	
	8,88	0,03	0,98			10,22	0,03	0,96
	8,87	0,03	0,96			10,22	0,03	1,05
Diosmin	7,86	0,04	n. a.					
	7,86	0,04	n. a.					
	7,86	0,04	n. a.					

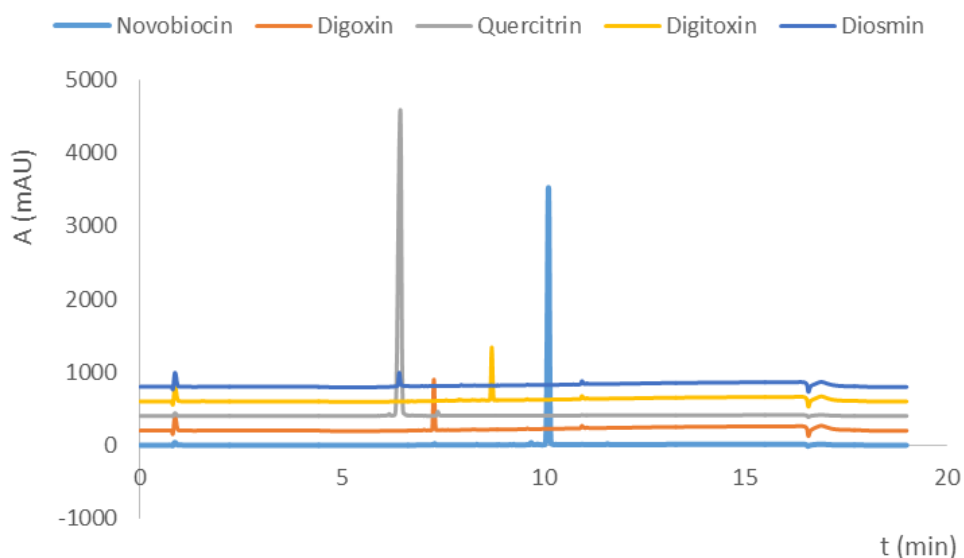


Obr. 34 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM NH₄PF₆.

V následující analýze bylo kromě přidaného činidla upraveno pH MF přidáním 20 mM kyseliny mravenčí (FA). Byla použit stejný gradientový program jako u předchozí analýzy. Použitým činidlem byl chaotropní chloristan sodný NaClO₄. U novobiocinu došlo oproti analýze s přidaným 50 mM NaClO₄ ke zvýšení retence, ale ostatní látky reagovaly na změnu pH snížením svého retenčního času (viz. Tab. 19 a Obr. 35).

Tab. 19. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přídavkem 20 mM NaClO₄ a 20 mM FA

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	10,12	0,05	0,93	Quercitrin	6,45	0,09	0,78
	10,12	0,05	0,93		6,45	0,09	0,76
	10,12	0,05	0,92		6,45	0,09	0,77
Digoxin	7,28	0,04	1,06	Digitoxin	8,71	0,04	1,08
	7,28	0,04	1,03		8,71	0,04	1,06
	7,28	0,04	1,06		8,71	0,04	1,06
Diosmin	6,42	0,04	1,29				
	6,42	0,04	1,07				
	6,42	0,04	1,49				

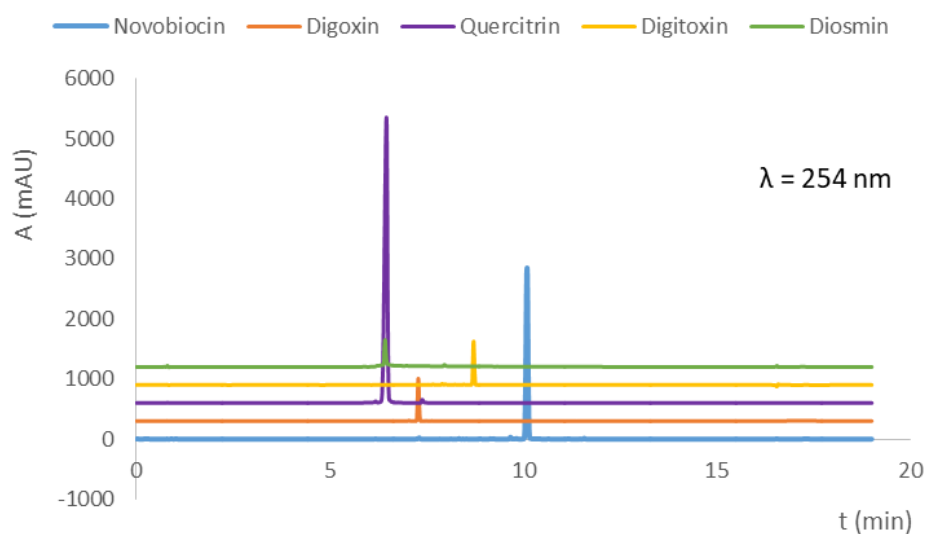


Obr. 35 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přídavkem 20 mM NaClO₄ a 20 mM FA.

V následující analýze jsme pouze modifikovali pH MF, přidáním 20 mM FA do MFA (H₂O) i MFB (ACN). Retenční časy byly téměř identické jako u předchozí metody s použitím chaotropního činidla chloristanu sodného a kyseliny mravenčí. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 20 a graficky znázorněné na Obr. 36.

Tab. 20. Chromatografické veličiny glykosidů stanovené pomocí kolony C18 s využitím gradientové eluce mobilních fází s přidavkem 20 mM FA.

Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A	Látka	R _t [min]	w _{0,5} [min]	A
Novobiocin	10,09	0,06	0,96	Quercitrin	6,46	0,08	0,77
	10,09	0,05	0,92		6,45	0,09	0,78
	10,09	0,05	0,94		6,46	0,08	0,77
Digoxin	7,28	0,04	1,07	Digitoxin	8,71	0,04	1,03
	7,28	0,04	1,06		8,71	0,04	1,02
	7,28	0,04	1,08		8,71	0,04	1,03
Diosmin	6,42	0,05	1,83				
	6,42	0,05	1,14				
	6,42	0,05	0,91				



Obr. 36 Přeložené chromatogramy zobrazující LC-UV analýzu glykosidů na koloně C18 pomocí gradientové eluce s mobilní fází s přidavkem 20 mM FA.

4 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo blíže prostudovat chromatografické vlastnosti srdečních glykosidů digoxinu a digitoxinu, fenylobenzopyronových glykosidů quercitrinu a diosminu a novobiocinu, glykosidu produkovaného aktinobakterií *Streptomyces niveus*. Pracovní hypotézou bylo, že glykosidy jakožto polární látky s vyšší počtem hydroxylových skupin bude výhodné separovat v HILIC módu. Dalším zaměřením této práce byla analýza vlivu kosmotropních a chaotropních činidel na chromatografickou separaci a parametry chromatografických píků, jelikož jejich použití pro HPLC stále není plně prostudováno. Zvláštní pozornost v tomto ohledu vyžadují kosmotropní a chaotropní efekty při modulaci mechanismu HILIC, o kterých je v soudobé odborné literatuře publikováno ve srovnání s jinými chromatografickými studii velmi málo informací.

Před započítím LC-UV analýz byla nejprve ověřena identita a čistota glykosidů vybraných pro tuto bakalářskou práci. Toto ověření bylo provedeno pomocí hybridního hmotnostního spektrometru Q Exactive Plus, složeného z ionizačního zdroje HESI a hmotnostního analyzátoru s detektorem typu orbitrap. Hmotnostně spektrometrická analýza potvrdila identitu i čistotu vzorků glykosidů. Při LC-UV-MS analýze byla použita kolona HILIC a gradientové eluce kombinací čistého acetonitrilu a vody.

Následovaly samotné chromatografické LC-UV analýzy, v kterých byly primárně testovány následující 3 chromatografické kolony: HILIC, Luna-NH2 a C18 (detailní popis kolon je uveden v kapitole Použité přístroje, pomůcky a počítačové programy). Separace pomocí HILIC byla porovnávána s výsledky LC-UV analýz na koloně Luna-NH2 a reverzním chromatografickým systémem na oktadecylové stacionární fázi C18. Pro srovnávací účely bylo provedeno též několik LC-UV analýz vybraných glykosidů na kolonách PFP a EVO-C18. O analýzách na těchto dvou kolonách bude jen stručná zmínka, neboť nakonec nepřinesly žádné přínosné informace. Dále byl zkoumán vliv vybraných kosmotropních a chaotropních činidel na kvalitu separace a jejich ovlivňování retenčních časů glykosidů.

Glykosidy byly nejprve analyzovány gradientovými a posléze isokratickými metodami bez přidání modifikátorů s využitím dvou mobilních fází –acetonitrilu a ultračisté vody. Tyto analýzy měly za cíl vytvořit základní přehled chromatografických charakteristik zvolených glykosidů.

Jako první byla použita kolona HILIC se vzorky rozpuštěnými ve směsi acetonitrilu a vody. Jednalo se o 15minutovou metodu se sestupnou gradientovou elucí s počátečním složením 95 % ACN 5 % H₂O. Analýza prokázala relativní retenci quercitrinu na stacionární fázi HILIC, ale zároveň docházelo k jeho elučnímu rozmývání.

S využitím isokratické eluce byly na koloně HILIC testované 3 metody, kde organická část mobilní fáze (tj. ACN) činila 50 %, 75 % a 100 %. Ukázalo se, že při isokratické eluci většina studovaných glykosidů svůj retenční čas výrazně nemění, jen byl pozorovatelný malý vzrůstající trend retence při vyšším podílu ACN v mobilní fázi. Nejvýraznější změny byly pozorovány u novobiocinu, který při eluci 100 %-ním ACN dosáhl maximálního retenčního času $2,97 \pm 0.02$ min. Ale tato retence je relativně slabá. Z těchto důvodů jsme pro další analýzy zvolili kolonu Luna-NH₂, která je výhodnější pro separaci sacharidů a polyhydroxylovaných látek, které mohou s aminoskupinou vytvářet vodíkové můstky.

Jako další byla pro HILIC mód zvolena tedy kolona Luna-NH₂, na kterou byla aplikována 19minutová sestupná gradientová eluce s počátečním složením 90 % ACN 10 % H₂O. Vzorčky glykosidů, využité pro tuto analýzu, byly rozpuštěny v roztoku obou MF 1:1 (ACN:H₂O) Při této metodě docházelo u novobiocinu a quercitrinu opakovaním analýz k prodlužování retenčního času, ale látky, které eluovaly v mrtvém retenčním čase, měly retenční časy reprodukovatelné. Jak kolona HILIC, tak kolona Luna-NH₂ obsahuje plně porézní částice (tzv. poro-shell s vymezenými methylovými můstky mezi atomy křemíku), ale stacionární fáze Luna-NH₂ má vyšší podíl efektivního uhlíku. Při analýzách na koloně Luna-NH₂ zřejmě nedocházelo s užitím zvolené mobilní fáze k dokonalé ekvilibraci, což mohlo mít negativní dopad na stabilitu retence zadržovaných glykosidů, obzvláště novobiocinu, kde je posun v retenci extrémní.

Vliv chaotropních a kosmotropních činidel na separaci na koloně Luna-NH₂ byl sledován s využitím těchto látek: chloristan sodný, hydrogenuhličitan amonný, trifluorooctan sodný, hexafluorofosforečnan sodný a *terc*-butanol. Kromě těchto látek byly ověřeny i kombinace činidel s acidobazicky aktivními látkami: chloristan sodný a kyselina mravenčí, octan amonný a kyselina octová. Působením chloristanu docházelo k výraznému zvýšení retence, a to nejvíce u quercitrinu a dále pak u novobiocinu. Digoxin a digitoxin se nezdály být účinkem chloristanu ovlivněny a zachovaly si velmi slabou retenci ke stacionární fázi Luna-NH₂. Vyšší retence u quercitrinu však byla spojena s nárůstem šířky jeho píku v polovině výšky. Snížení koncentrace chloristanu a volba strmějšího elučního gradientu vedla ke zvýšení retence quercitrinu i novobiocinu, přičemž quercitrin byl ve větší míře elučně rozmýván. Použití hydrogenuhličitanu amonného též posílilo retenci studovaných glykosidů, ale zdá se, že jeho účinek na retenci není tak silný, jako u chloristanu. Na druhou stranu byla u píku quercitrinu pozorována relativní komprese, pokud ho srovnáme se s píkem quercitrinu při užití chloristanu. Quercitrin eluoval při nižším retenčním čase, ale byl méně rozmytý. Trifluorooctan sodný měl ještě slabší účinek na posílení retence než hydrogenuhličitan, ale za to způsobil změnu pořadí retence u novobiocinu a quercitrinu ve srovnání s předchozími analýzami, kde byl více zadržován na koloně Luna-NH₂ polárnější quercitrin. Při použití hexafluorofosforečnanu amonného došlo naopak k velmi silnému navýšení retence

u novobiocinu, který byl z kolony eluován až při druhém opakování analýzy. K tomu je nutné dodat, že pík novobiocinu i s takto silnou retencí byl zaznamenán v ne příliš rozmytém stavu. Digoxin a digitoxin zůstaly prakticky neovlivněné žádným ze zkoumaných činidel. Pokud byla přidána do mobilní fáze vedle chloristanu sodného také kyselina mravenčí, došlo k zániku retence a všechny studované glykosidy eluovaly v mrtvém retenčním čase. Když bylo užito jen přídatku ekvimolární směsi octanu amonného a kyseliny octové, došlo na koloně Luna-NH₂ k obnově retence. Při užití *tert*-butanolu byla retence též posílena, a to v podobné míře jako tomu bylo v případě trifluoroctanu sodného. Pokud bychom seřadily použitá činidla podle rostoucího účinku na posílení retence novobiocinu na koloně Luna-NH₂, získáme tuto posloupnost: *tert*-butanol, NH₄HCO₃, NH₄(CH₃COO) + CH₃COOH, NaClO₄, Na(CF₃COO), , NH₄PF₆. Uvažujeme-li retenci quercitrinu, je pořadí pro-retenčního účinku činidel následující: *tert*-butanol, Na(CF₃COO), NH₄PF₆, NH₄(CH₃COO) + CH₃COOH, NH₄HCO₃, NaClO₄. Lze tedy říci, že účinek chaotropních a kosmotropních činidel je velmi závislý na daných analytech. Též je zřejmé, že efekt kosmotropních a chaotropních činidel je závislý na jejich koncentraci, jak je vidět na případě chloristanu. Nedá se tedy zcela zobecnit, zda činidlo považované tradičně za kosmotrop nebo chaotrop bude v konkrétní metodě separace v režimu HILIC zvyšovat nebo snižovat retenci polárních analytů. Tyto efekty jsou velmi složité a jejich pochopení bude vyžadovat další studium.

Při pohledu na provedené analýzy je nutné komentovat problematiku, na kterou jsme narazili při analýze diosminu. Tento glykosid je nejvíce polární látkou ve zvoleném souboru glykosidů. Při jeho analýzách v režimu HILIC (jak na koloně HILIC, tak na koloně Luna-NH₂) však nebyl mnohokrát detekován žádný pík. Tento fakt jsme zatím nedokázali spolehlivě interpretovat.

Kritický závěr o metodice HILIC jsme museli zaujmout poté, co jsme provedli základní analýzy vybraných glykosidů na koloně C18. Ukázalo se, že moderní kolony typu Kinetex C18 s core-shell částicemi dokážou velmi dobře separovat všechny studované glykosidy, ačkoli u diosminu a quercitrinu docházelo ke koeluci ve stejném retenčním čase při užití klasického elučního režimu s využitím gradientové kombinace ACN a H₂O s přídatkem 0,1 % kyseliny mravenčí (v/v). Vliv kosmotropních a chaotropních činidel na separaci nebyl tak výrazný, jako tomu bylo u kolony Luna-NH₂. Praktický vývoj metody pro stanovení zvolených glykosidů by se tedy určitě ubíral cestou optimalizace analytické metody s kolonou C18.

Během výzkumné části této bakalářské práce jsme rovněž ověřili účinnost separace s využitím kolon PFP a EVO-C18. Obě kolony nepřinesly téměř žádná významná pozitiva, neboť se v drtivé většině případů studované glykosidy na těchto kolonách nezadržovaly.

Závěr

Smyslem této práce bylo přiblížit problematiku analyzování vybraných glykosidů pomocí HILIC a RP-LC módu a ovlivnění separace HPLC pomocí chaotropních a kosmotropních efektů.

Cílem tedy bylo analyzovat vybrané glykosidy na chromatografických kolonách dvou různých režimů – HILIC a RP-LC, posoudit vliv chaotropních a kosmotropních činidel a zjistit, zda jsou tyto metody pro separaci glykosidů vhodné.

Primárně byly testovány 3 chromatografické kolony: HILIC, Luna-NH2 a C18. Při porovnávání těchto kolon, představoval systém RP-LC s použitím kolony C18 lepší separaci všech studovaných glykosidů. U kolony v HILIC módu se látky vymývaly v nízkých retenčních časech a více také docházelo k jejich elučnímu rozmývání. Při použití kosmotropních a chaotropních činidel, docházelo všeobecně k většímu ovlivňování separace u kolony LunaNH2. Potvrdilo se, že vliv daných činidel se liší v závislosti na jejich koncentraci a na analytu, na který působí. S přihlédnutím k tomuto výzkumu, se jeví lepší volbou separace glykosidů na koloně C18 a pro budoucí praktický vývoj metody pro stanovení zkoumaných glykosidů by byla vhodná optimalizace separační metody na koloně C18.

Výzkumná část si vyžádala velké množství analýz, z nichž většina nemohla být do této práce zařazena z důvodu omezené kapacity bakalářské práce. Přesto byla snaha podat přehled všech důležitých poznatků, které jsme během dvouleté práce získali.

Seznam použitých zkratek

AA	Kyselina octová, CH ₃ COOH
C18	Oktadecylsilikagelová stacionární fáze
CAD	Detektor nabitého aerosolu
CBV	Centrum biomedicínského výzkumu
DAD	Detektor s diodovým polem
EI	Ionizace nárazem elektronu
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí, HCOOH
gyr A a B	Podjednotky A a B enzymu DNA gyrázy
HDX	Vodík-deuteriová výměna
HESI	Heated Electrospray Ionization
HIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HILIC	Hydrofilní kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IL – 8	Zánětlivý protein – neutrofilny aktivující peptid 1 (interleukin 8)
LC	Kapalinová chromatografie
LC – MS	Spojená technika kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem

LC – UV	Technika kapalinové chromatografie s detekcí pomocí ultrafialového záření
LC/UV – VIS	Technika kapalinové chromatografie s ultrafialovo - viditelnou detekcí
LD ₅₀	Letální dávka způsobující smrt 50 % testovaných jedinců
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MF	Mobilní fáze
MRSA	Multirezistentní zlatý stafylokok
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
n. a.	Nedostupné hodnoty
NA ⁺ /K ⁺ ATPasa	Sodno-draselná pumpa
NP – HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi
Nt – KB (Iκ Bα)	Nukleární faktor kappa B
PFP	Pentafluorfenylpropylová stacionární fáze
PTFE	Polytetrafluoretylen
Q	Kvadrupól
RP – LC	Kapalinová chromatografie s reverzní fází
SF	Stacionární fáze
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-of-Flight metoda
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/UF	Ultrafialové a viditelné spektrum
(V/V)	Objemová koncentrace

Bibliografie

- [1] *HPLC: Isocratic or Gradient Elution and Assessment of Linearity In Analytical Methods*. , 12-20. Dostupné také z: <https://pdfs.semanticscholar.org/aa92/60976433d7dab6c1caff026b5fbd1f4e6899.pdf>
- [2] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [3] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. 2016. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [4] LACOURSE, Margaret E. a William R. LACOURSE. *Chapter 17 - General instrumentation in HPLC**. Elsevier, 2017, s. 417-429. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>. ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053935000178>
- [5] Instrumentation of HPLC. In: *GPAT India* [online]. Rajasthan: Pharmacophore Edulabs India, 2020 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: <https://gpatindia.com/high-performance-liquid-chromatography-part-2/>
- [6] *Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidů modifikovaných genotoxickými látkami* [online]. Brno, 2007 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/141774/prif_b/Bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [7] Schéma analytické kolony. In: *ScienceZoom* [online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2015 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: http://test.sciencezoom.cz/apps/frov_2/images/schema-analiticke-kolony.jpg
- [8] SCHULZOVÁ, Věra. HPLC detektory. In: *Web.vscht* [online]. Praha: ICT Prague, 2018 [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202018%20detektory.pt>

- [9] Druhy detektorů používané v LC. In: *Web.vscht* [online]. Praha: ICT Prague, 2018 [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202018%20detektory.pdf>.
- [1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A ABSORPČNÍ UV SPEKTROFOTOMETRIE. 0] In: *Ústav analytické chemie* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2014 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: http://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/6_LC.pdf?redirected
- [1 BOSÁKOVÁ, Zuzana. Kapalinová chromatografie VI. In: *Fakulta - Přírodovědecká 1] fakulta UK* [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova, 2016 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc6.pdf>
- [1 HAYES, Richard, Adham AHMED, Tony EDGE a Haifei ZHANG. Core-shell 2] particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1357**, 36-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010>. ISSN 0021-9673. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314007304>
- [1 Inovace v technologii částic. In: *Chromservis* [online]. Praha: CHROMSERVIS, 3] 2020 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/core-shell-technology?lang=CZ>
- [1 Chromatografie / Stacionární fáze. *Chromservis* [online]. Praha: Chromservis 4] [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/stationary-phases?lang=CZ>
- [1 COUFAL, Pavel. HPLC. *Fakulta - Přírodovědecká fakulta UK* [online]. Praha: 5] Přírodovědecká fakulta UK, 1996 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [1 MATEMATICKÉ A ELEKTRONICKÉ ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU KAPALINOVÉHO 6] CHROMATOGRAFU [online]. Praha, 2010, s. 40 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: https://support.dce.felk.cvut.cz/mediawiki/images/a/a3/Diz_2010_pisa_pavel.pdf. Disertace. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta elektrotechnická, Katedra řídicí techniky. Vedoucí práce Ondřej Vysoký.
- [1 Chromatografické metody. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž 7] analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum,

2003, s. 149-150. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

[1 BENESI, H. A. a A. C. JONES. An Infrared Study of the Water-Silica Gel System. 8] *The Journal of Physical Chemistry*. American Chemical Society, 1959, **63**(2), 179-182. DOI: 10.1021/j150572a012. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/j150572a012>

[1 GORDON, M.H. LIPIDS | Polar Lipids. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2nd ed. 9] Oxford: Elsevier, 2005, s. 88-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00311-3>. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977003113>

[2 JANDERA, P. *LIQUID CHROMATOGRAPHY | Normal Phase*. Oxford: Elsevier, 0] 2005, s. 142-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00324-1>. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977003241>

[2 KIRKLAND, J.J. Development of some stationary phases for reversed-phase 1] HPLC. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1060**(1), 9-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.057>. ISSN 0021-9673. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304018928>

[2 BOYSEN, Reinhard I. a Milton T.W. HEARN. 9.02 - *High Performance Liquid 2] Chromatographic Separation Methods*. Oxford: Elsevier, 2010, s. 5-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00183-0>. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453828001830>

[2 BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid 3] chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **402**(1), 231-247. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>

[2 WELL, Caroline, Oliver FRANK a Thomas HOFMANN. Quantitation of Sweet 4] Steviol Glycosides by Means of a HILIC-MS/MS-SIDA Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**(47), 11312-11320. DOI: 10.1021/jf404018g. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf404018g>

- [2] DOUŠA, Michal. Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC. *HPLC* [online].
5] Douša, c1999-2020 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [2] MCMURRY, John. Určování struktury: hmotnostní spektrometrie a infračervená
6] spektroskopie. *Organická chemie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně,
nakladatelství VUTIUM, 2015, s. 361-369. Překlady vysokoškolských učebnic.
ISBN 978-80-214-4769-1.
- [2] Salting in. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA):
7] Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Salting_in
- [2] Kosmotropes and Chaotropes. *Water Structure and Science* [online]. London:
8] Chaplin, 2020 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z:
http://www1.lsbu.ac.uk/water/kosmotropes_chaotropes.html#def
- [2] TIMSON, David J. The roles and applications of chaotropes and kosmotropes in
9] industrial fermentation processes. *World Journal of Microbiology and
Biotechnology*. 2020, **36**(6), 89. DOI: 10.1007/s11274-020-02865-8. ISSN
1573-0972. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02865-8>
- [3] FRUTON, Joseph. Hofmeister, Franz. In: *Encyclopedia.com: Complete Dictionary
0] of Scientific Biography* [online]. Illinois: Encyclopedia, 2020 [cit. 2020-07-18].
Dostupné z: [https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-
thesauruses-pictures-and-press-releases/hofmeister-franz](https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/hofmeister-franz)
- [3] Fig.1 The Hofmeister and lyotropic series of ions in water. In: *RSC Publishing
1] [online]. London: Royal Society of Chemistry, 2020 [cit. 2020-07-19]. Dostupné
z: [https://pubs.rsc.org/image/article/2019/SC/c9sc90050k/c9sc90050k-
f1_hi-res.gif](https://pubs.rsc.org/image/article/2019/SC/c9sc90050k/c9sc90050k-f1_hi-res.gif)*
- [3] LO NOSTRO, Pierandrea a Barry W. NINHAM. Hofmeister Phenomena: An
2] Update on Ion Specificity in Biology: An Update on Ion Specificity in Biology.
Chemical Reviews. American Chemical Society, 2012, **112**(4), 2286-2288. DOI:
10.1021/cr200271j. ISSN 0009-2665. Dostupné také z:
<https://doi.org/10.1021/cr200271j>
- [3] ALPERT, Andrew J. Effect of salts on retention in hydrophilic interaction
3] chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1538**, 45-53. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.038>. ISSN 0021-9673. Dostupné
také z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967318300785>

- [3] Hydrophobic Hydration. *Water Structure and Science* [online]. London: Chaplin, 4] 2020 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: http://www1.lsbu.ac.uk/water/hydrophobic_hydration.html#hydrotrope
- [3] JAHODÁŘ, Luděk. *Rostliny způsobující otravy*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 5] nakladatelství Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-4050-1.
- [3] VYSTRČIL, Alois. *Rostlinné glykosidy*. 1. vyd. Praha: Československá akademie 6] věd, 1955.
- [3] Farmakognózia a chemická konštitúcia digitálistových glykosidov. ŠVEC, 7] František a Karel BERGMANN. *Srdeční glykosidy*. Praha: SPOFA, 1965, s. 7.
- [3] SRIVASTAVA, Meera, Ofer EIDELMAN, Jian ZHANG et al. Digitoxin mimics gene 8] therapy with CFTR and suppresses hypersecretion of IL-8 from cystic fibrosis lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, **101**(20), 7693. DOI: 10.1073/pnas.0402030101. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/content/101/20/7693.abstract>
- [3] POLLARD, Bette S., Jorge C. BLANCO, John R. POLLARD a Gregory A. PRINCE. 9] Classical drug digitoxin inhibits influenza cytokine storm, with implications for COVID-19 therapy. *BioRxiv*. 2020, , 20200409034983. DOI: 10.1101/2020.04.09.034983. Dostupné také z: <http://biorxiv.org/content/early/2020/05/15/2020.04.09.034983.abstract>
- [4] Novobiocin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): 0] Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Novobiocin>
- [4] TEJKALOVÁ, Renata. Základy antimikrobiální terapie 6. In: *Informační systém 1] Masarykovy univerzity* [online]. Brno: Mikrobiologický ústav LF MU, 2015 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2015/VSAT081/6_INT_Antimikrobiální_terapie_7.4_2015...chinolony_rifa.pdf
- [4] Sestava chromatografie UltiMate 3000. In: *Centrum biomedicínského výzkumu 2] [online]*. Hradec Králové: FN HK, 2020 [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/cbv/laboratore/analyticka-chemie-a-farmakologie>
- [4] Klathráty. *Centrum informačních služeb VŠCHT Praha* [online]. Praha: VŠCHT 3] Praha, 2014 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/klathraty.html

[4] Vnitřní vrstva elektrické dvojvrstvy. *Centrum informačních služeb VŠCHT Praha* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2014 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/vnitri_vrstva_elektricke_dvojvrstvy.html

[4] Protiion. *Centrum informačních služeb VŠCHT Praha* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2014 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/protiion.html

[4] Fig. 3 Schema of the separation mechanism in a HILIC system. In: [6] *Springerlink.com* [online]. Poland: Springer Nature, 2011 [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: DOI 10.1007/s00216-011-5308-5