

Využití HPLC v analýze vybraných makrocyclických sloučenin

Lenka Průchová

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka Průchová
Osobní číslo: T21166
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Chemie a analýza potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Využití HPLC v analýze vybraných makrocyclických sloučenin

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

- Obecný popis HPLC.
- Charakteristika vybraných makrocyclických sloučenin a jejich aplikace v potravinářství.
- Aplikace HPLC v analýze makrocyclických sloučenin používaných v potravinářství.

II. Praktická část

- Optimalizovat podmínky pro analýzu vybraných makrocyclických sloučenin pomocí HPLC.
- Optimalizovat podmínky pro analýzu směsí makrocyclických sloučenin pomocí HPLC.
- Získané výsledky vyhodnotit a vhodným způsobem interpretovat.

Forma zpracování bakalářské práce: **tisková/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Matencio, A. a kol. Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *104*, 132-143.
2. Liu, Y. a kol. Application of cyclodextrin in food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *62*, 2627-2640.
3. Skoog, D. A. a kol. Analytická chemie. 2021, VŠCHT Praha, 984 s., ISBN: 978-80-7592-043-0
4. Robinson, J. W. a kol. Undergraduate Instrumental Analysis, 7th Edition, 2014 CRC Press.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Zuzana Barbušáková**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

Příloha č. 2 – Prohlášení autorky BP

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Supramolekulární chemie zasahuje do mnohých odvětví, mimo jiné i do potravinářství, kde supramolekulární komplexy nacházejí mnoho uplatnění. Cílem této práce byla proto teoretická sumarizace poznatků o supramolekulární chemii a její využití, zejména v potravinářství. Další často využívanou metodou v praxi je HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie). Proto jak teoretická, tak praktická část práce je soustředěna na seznámení se s HPLC metodou a její využití při analýze supramolekulárních komplexů.

Klíčová slova: HPLC, cyklodextrin, cucurbituril, hostitel – host chemie, supramolekulární chemie

ABSTRACT

Supramolecular chemistry has many applications in many industries, including the food industry, where supramolecular complexes find many applications. The aim of this thesis was therefore to summarize the theoretical knowledge of supramolecular chemistry and its applications, especially in the food industry. Another frequently used method in practice is HPLC (high performance liquid chromatography). Therefore, both the theoretical and practical part of the thesis is focused on the introduction to the HPLC method and its application in the analysis of supramolecular complexes.

Keywords: HPLC, cyclodextrin, cucurbituril, host – guest chemistry, supramolecular chemistry

Nejdříve bych ráda touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Zuzaně Barbuščákové za její ochotu, čas a přínosné rady poskytované v průběhu vedení této bakalářské práce.

Současně bych chtěla poděkovat Ing. Petrovi Janovskému za jeho odbornou pomoc při zpracování mé práce, rady a poskytnutí chemických látek pro analýzu.

Dále bych ráda poděkovala přáteli, rodině a přátelům za jejich velkou podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE	11
1.1 HISTORIE SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE	12
2 HOST – HOSTITEL (HOST – GUEST)	14
3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	16
3.1 INSTRUMENTACE	16
3.1.1 Zásobníky mobilní fáze a odplyňovač	17
3.1.2 Čerpadla	18
3.1.3 Dávkování vzorku	18
3.1.4 Chromatografické kolony a předkolony	18
3.1.5 Detektory	20
3.1.6 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatografické analýzy	22
3.2 OPTIMALIZACE MOBILNÍ FÁZE	23
3.3 APLIKACE A VYUŽITÍ HPLC	23
4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MAKROCYKlickÝCH SLOUČENIN (CYKLODEXTRINY, CUCURBITURULY) A JEJICH VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ	24
4.1 CYKLODEXTRINY	24
4.1.1 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů	24
4.1.3 Využití cyklodextrinů	25
4.2 CUCURBIT(N)URILY	28
4.2.1 Struktura a vlastnosti cucurbiturilů	28
4.2.2 Syntéza cucurbiturilů	29
4.2.3 Využití cucurbiturilů	30
4.3 VYUŽITÍ VYBRANÝCH MAKROCYKlickÝCH SLOUČENIN V HPLC	31
4.3.1 Cyklodextriny	31
4.3.2 Cucurbiturily	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
5 CÍL PRÁCE	34
6 METODIKA	35
6.1 CHEMIKÁLIE	35
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	35
7 ANALÝZA KOMPLEXŮ POMOCÍ HPLC	37
7.1 PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ PRO ANALÝZU KOMPLEXŮ	37

7.1.1	Příprava mobilní fáze pro měření komplexu 1: makrocyklu β – CD s ligandem kyselinou benzoovou	37
7.1.2	Příprava mobilní fáze pro měření komplexu 2: makrocyklu CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem	38
7.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ZÍSKÁNÍ KOMPLEXŮ.....	38
7.2.1	Příprava vzorku pro komplex 1: makrocyklus β – CD s ligandem kyselinou benzoovou	38
7.2.2	Příprava zásobního roztoku pro komplex 2: makrocyklus CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem	39
7.3	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ DANÝCH KOMPLEXŮ	40
7.4	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ DANÝCH KOMPLEXŮ.....	41
8	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	42
8.2	OPTIMALIZACE PODMÍNEK ANALÝZY	42
8.2.1	Optimalizace MF pro komplex 1.....	42
8.2.2	Optimalizace MF pro komplex 2.....	47
8.3	VYTVOŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK	50
8.3.1	Kalibrační křivka β – CD s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s methanolem v poměru 50:50	50
8.3.2	Kalibrační křivka β – CD s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s acetonitrilem v poměru 50:50	51
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	65
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK	68
	SEZNAM GRAFŮ.....	69

ÚVOD

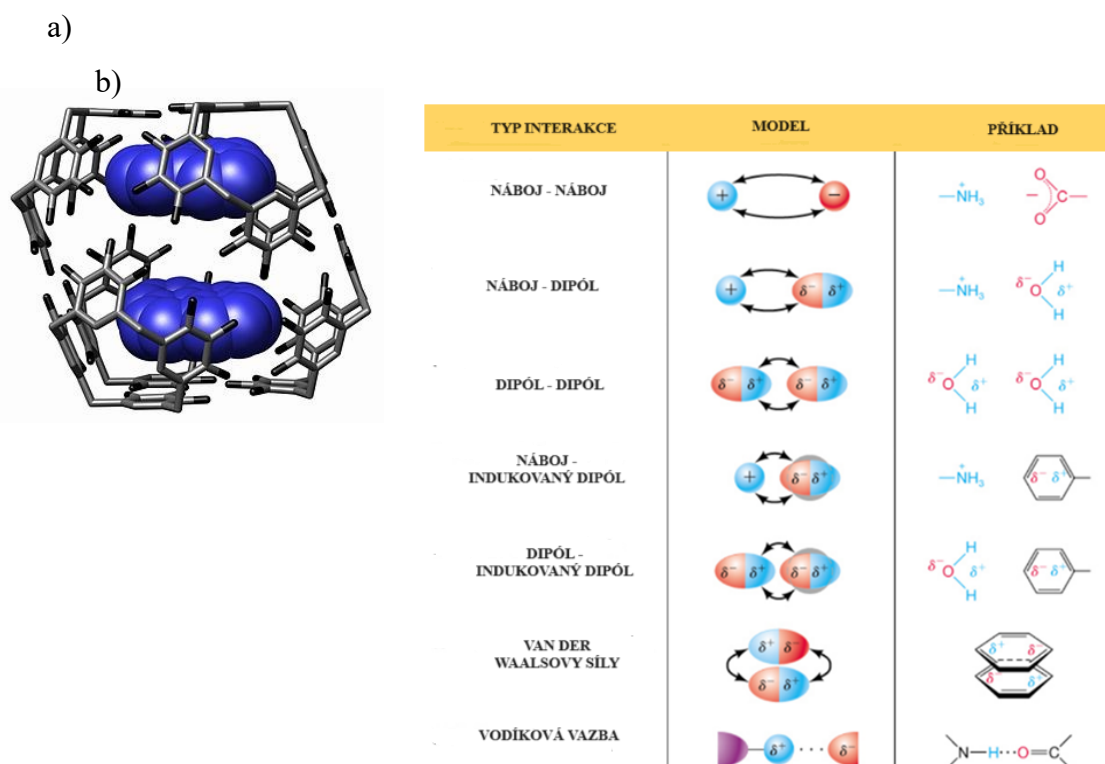
Potravinářský průmysl je v konstantním vývoji na cestě za lepšími a zdravějšími produkty. Jedním z nových směrů na dosažení tohoto cíle je aplikace supramolekulární chemie, konkrétně cyklodextrinů a cucurbiturilů jako makrocyclických sloučenin. Jejich schopnost vázat reverzibilně rozdílné látky do supramolekulárních komplexů se využívá ve více směřů od zlepšení chuťových vlastností až po vývoj „smart“ balení, kde prodlužují životnost potravin. Svoje uplatnění nachází i v jedné z nejvíc používaných analytických metod vůbec, a to v HPLC (angl. high-performance/pressure liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie), kde vystupují jako chirální separátory pro opticky aktivní látky.

Tato práce se proto soustředí na seznámení se s metodou HPLC na teoretické i praktické úrovni. Praktická část je zaměřená na analýzu vybraných supramolekulárních komplexů a následné vytvoření kalibračních křivek z jejich koncentračních řad. Kalibrační křivky mají potencionálně sloužit na rychlou analýzu čistoty syntetizovaných makrocyclů na pracovišti Ústavu chemie UTB.

I. TEORETICKÁ ČÁST

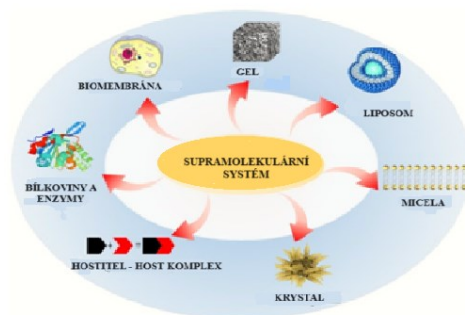
1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE

Supramolekulární chemie studuje vztahy mezi strukturou a funkcí souboru molekul spojených nekovalentními vazbami. Jinými slovy, supramolekulární útvar (supramolekula) se skládá ze dvou či více částí (molekul či iontů) spojenými nekovalentními interakcemi (Obr. 1, a)). Mezi nekovalentní interakce patří například vodíková vazba, π - π interakce, hydrofobní interakce, elektrostatické interakce a van der Waalsovy interakce (Obr. 1, b)). [1]



Obrázek 1 a) příklad supramolekulárního komplexu složeného ze dvou pyrenbutyrových kyselin (modrá struktura) navázaných pomocí vodíkových můstků uvnitř hexamerní nanokapsle složené ze 6 – hexylpyrogalloareňů [2]; b) Přehled nekovalentních interakcí [3]

Supramolekulární útvary jsou vysoce organizované entity, tvořené spontánním uspořádáním chemických individuů za pomoci nekovalentních interakcí do specifických makroskopických systémů jako například gely, lipozomy, micely, proteiny, biomembrány či host-guest komplexy s přesně definovanou mikroskopickou strukturou (Obr. 2). [4]

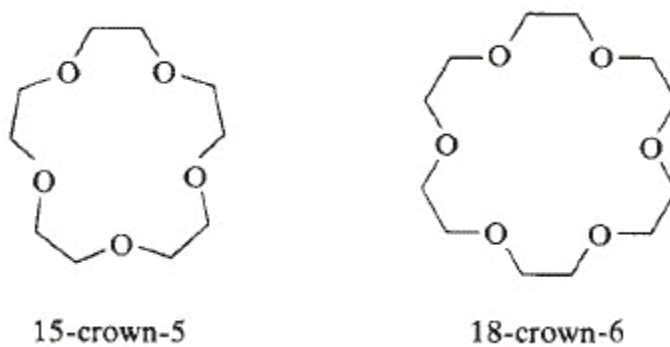


Obrázek 2 Specifické makroskopické systémy [4]

1.1 Historie supramolekulární chemie

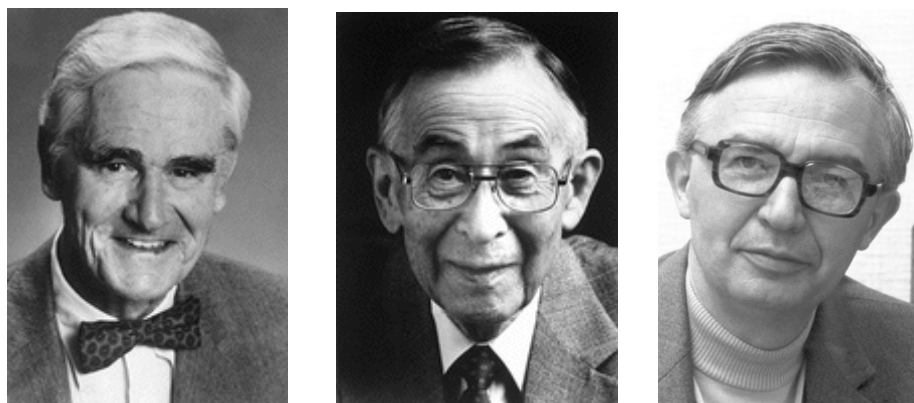
Historie supramolekulární chemie sahá až k roku 1873, kdy holandský fyzik Johannes Diderik van der Waals ukázal na základě studia plynů, že mezi molekulami existují slabé mezimolekulové síly.

V 60. letech 20. století byly syntetizovány první umělé supramolekulární makrocyclické sloučeniny – crown ethery (Obr. 3), které vážou alkalické kovy a kovy alkalických zemin. [1]



Obrázek 3 Crown ethery [5]

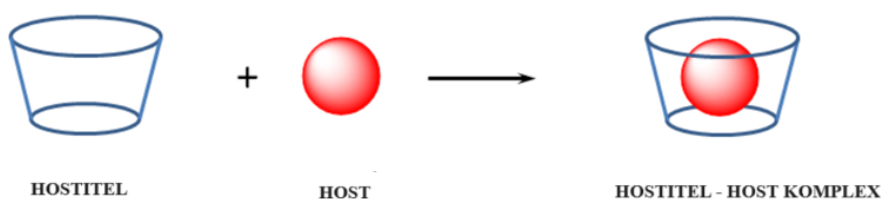
V roce 1987 se supramolekulární chemie stala uznávanou chemickou disciplínou, a to díky Donaldu J. Cramovi, Jean-Marie Lehnovi a Charlesi J. Pedersenovi (Obr. 4) za jejich vývoj selektivních komplexů tzv. host-guest. Za jejich dobře provedenou práci jim v tomto roce byla udělena Nobelova cena. [6]



Obrázek 4 Donald J. Cramov, Jean-Marie Lehnov a Charles J. Pedersen [7]

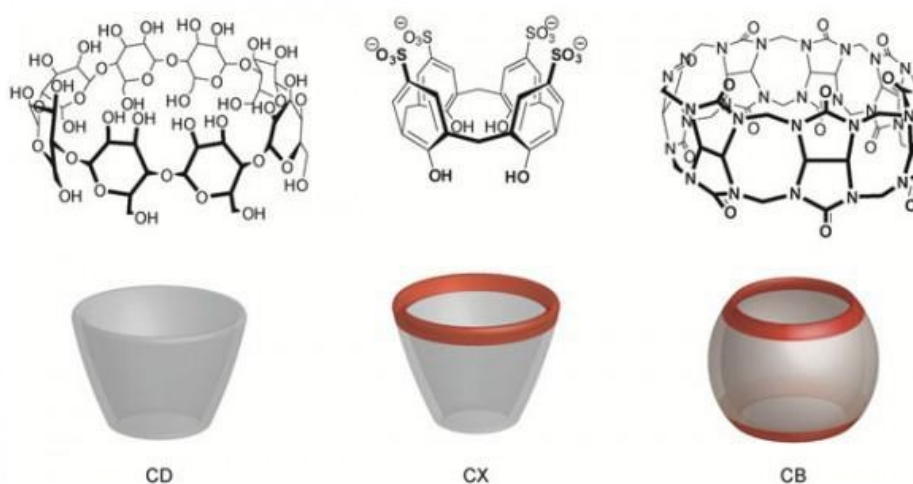
2 HOST – HOSTITEL (HOST – GUEST)

Jedna z hlavních oblastí výzkumu supramolekulární chemie je studium host-guest komplexů (Obr. 5), v překladu "hostitel-host". [1] Komplex host – hostitel představuje supramolekulární struktury složené z dvou a více částí, které jsou spolu udržovány pomocí nekovalentních vazeb. [8] Jinými slovy, velká molekula (hostitel) je schopná do sebe uzavřít menší molekulu (host) pomocí nekovalentních interakcí. [9] Hostitelé mají dutinu, která jim umožňuje chovat se jako primární hostitelské molekuly s velkou selektivitou a afinitou k molekulám hostů. [8]



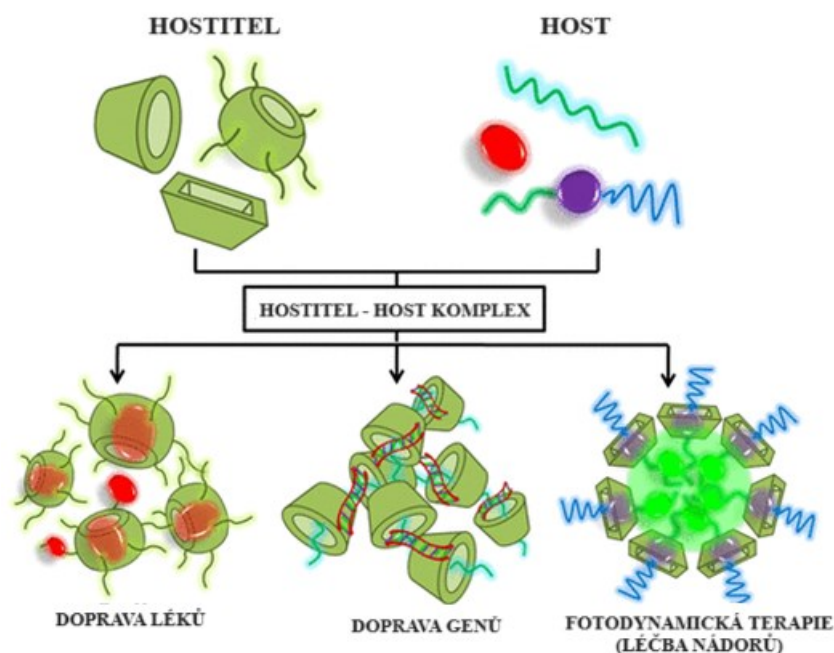
Obrázek 5 Princip hostitel – host [10]

Jako hostitelské molekuly se využívají makrocyclické sloučeniny. Mezi takové makrocykly patří například crown ethery (Obr. 3), cyklodextriny, cucurbiturily, kalixareny (Obr. 6), a další. [8]



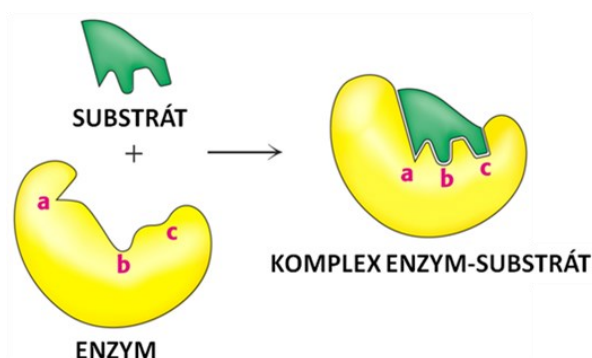
Obrázek 6 Vybraní zástupci hostitelských molekul (cyklodextriny, kalixareny, cucurbiturily) [11]

Dané komplexy nachází uplatnění v různých oborech, jako je například organické chemie, polymerní chemie, vědy o materiálech a medicína (Obr. 7). [6]



Obrázek 7 Využití v oboru [12]

V biologii se vazba host – guest se používá taky, avšak ne pod takovým termínem. Host – guest komplex je totiž obdobný způsobu, jakým dochází k mnoha reakcí mezi biomolekulou a substrátem. Jako příklad se jedná o protilátky, které vážou antigeny nebo navázání substrátu na receptor, což je využito u enzymů (Obr. 8). [8]



Obrázek 8 Interakce enzymu se substrátem [8]

3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

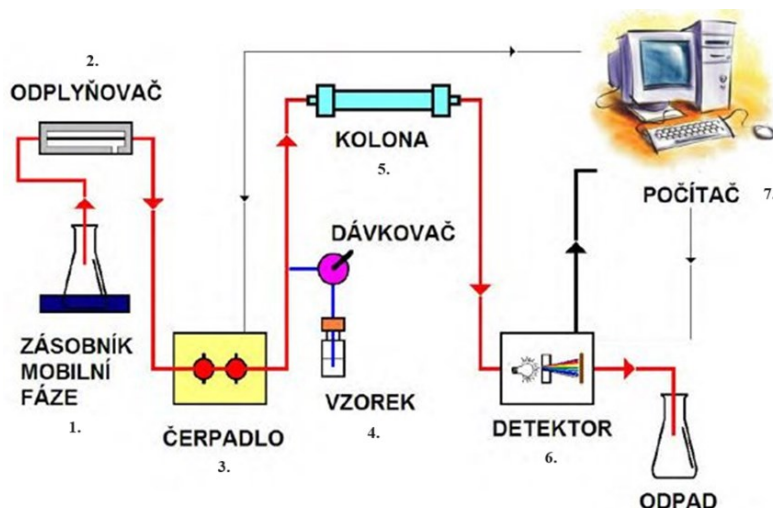
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je řazena mezi nejčastěji používané separační metody. Tato metoda se používá pro separaci a stanovení analytů, které jsou obsaženy v organických, anorganických a biologických materiálech. Každé chromatografická metoda se skládá z mobilní („pohyblivé“) a stacionární („nepohyblivé“) fáze.

Mobilní fáze v HPLC je kapalina, do které je dávkován kapalný vzorek obsahující rozpuštěné analyty. [13] Jako stacionární fáze (nepohyblivá fáze) se používají polární ne/modifikované adsorbenty jako je silikagel nebo méně častý oxid hlinitý. A jako mobilní fáze (pohyblivá fáze) se většinou využívá voda jako polární složka, a organická rozpouštědla nebo jejich směsi jako složka nepolární. [14] Módy HPLC jsou děleny podle separačních mechanismů na:

- 1) Rozdělovací chromatografii,
- 2) Adsorbční chromatografii,
- 3) Iontovou (iontově výměnnou) chromatografii,
- 4) Vylučovací chromatografii,
- 5) Afinitní chromatografii,
- 6) Chirální chromatografii. [13]

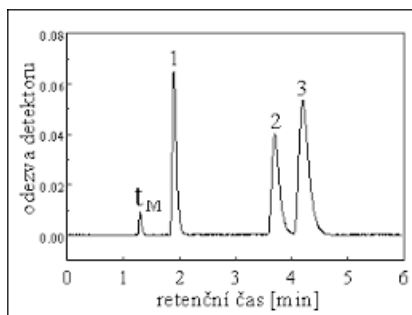
3.1 Instrumentace

Instrumentace HPLC probíhá v následujících krocích (Obr. 9, 1-7).



Obrázek 9 Schéma HPLC [16]

Mobilní fáze (MF) se při isokratické eluci (eluce probíhá při konstantním složení mobilní fáze) přivádí ze zásobníku (1.) přes odplyňovač (2.) do vysokotlakého čerpadla (3.), zatímco při gradientové eluci (v průběhu analýzy se mění složení mobilní fáze) se složky mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače, kde se programově mísí ve zvoleném poměru, a teprve poté postupují do čerpadla. Z čerpadla je MF s měřeným vzorkem (4.) vedena, přes tlumič pulzů čerpadla, do kolony (5.). Z kolony se MF se vzorkem přivádí přes detektor (6.), který je propojený se zařízením, vybavené s vyhodnocovacím softwarem (7.). Nejčastěji se jedná o počítač, který pomocí speciálních programů dokáže vyhodnotit průběh analýzy. [15] Každý analyt po detekci získává svůj retenční čas. Podle odezvy detektoru se stanoví intenzita každého analytu. Získává se tak spektrum – chromatogram, závislosti odezvy detektoru na retenčním čase (Obr. 10).



Obrázek 10 Závislost odezvy detektoru na retenčním čase [28]

3.1.1 Zásobníky mobilní fáze a odplyňovač

HPLC je vybavena jedním nebo více zásobníky MF (Obr. 11), přičemž objem rozpouštědla v zásobnících se pohybuje v rozmezí 0,5 až 2,5 litru.

Přístroj pro HPLC má obvykle zabudován i tzv. odplyňovač, který slouží k odstraňování rozpuštěných plynů a prachů z kapalin. Rozpuštěné plyny totiž mohou způsobovat nereprodukovatelnost, a prachové částice mohou znehodnotit funkce detektoru. Odplynění se provádí pomocí vakua, destilací, kdy se kapalina zahřívá během promíchávání, nebo pomocí probublávání. V praxi se ale nejčastěji uplatňují vakuové odplyňovače. [13]



Obrázek 11 Zásobník MF [17]

3.1.2 Čerpadla

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. [18] Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. [15] Dobré a kvalitní čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od 0,1 až 10 ml/min při tlaku až 40 MPa. [13] Čerpadla jsou zhotovena z odolných materiálů (nerezová ocel, keramika, plast), které nesmí být narušovány mobilní fází a nesmí do MF uvolňovat cizorodé látky. [18]

3.1.3 Dávkování vzorku

Dříve se jako dávkovací zařízení používala injekční stříkačka, která přinášela několik nevýhod z hlediska těsnosti, udržení tlaku, a hlavně vnášení stop materiálu injekční stříkačky. [18] V současné době je dávkování injekční stříkačkou nahrazena dávkovací smyčkou. Tato smyčka dokáže volit dávkovací objem vzorku od 1 do 0,1 ml nebo i více. Nejnovější dávkovače jsou už zcela automatické. [13]

3.1.4 Chromatografické kolony a předkolony

3.1.4.1 Chromatografické kolony

Pro HPLC se používají kolony neboli tzv. trubice o délce 10–100 cm, nejčastěji 10–20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm, které jsou naplněny stacionární fází (Obr. 12). [15] Kolony jsou vyrobeny z nerezové oceli, v některých případech může být použito i trubice vyrobené ze skla nebo plastů (polyetheretherketon) [13] Pokud se jedná o dělení složitějších směsí se někdy kolony řadí za sebou.

V HPLC jsou využívány 2 druhy náplní kolon, a to s pelikulárními a porézními částicemi.

a) Kolona s pelikulárními částicemi

Původní pelikulární částice byly neporézní kuličky, vyrobené ze skla nebo polymeru. Povrch těchto kuliček, o velikosti 30–40 μm , byl pokrytý tenkou vrstvou oxidu křemičitého (SiO_2), aluminou (Al_2O_3) nebo polystyren-divinylbenzenovou pryskyřicí. Tyto větší pelikulární částice byly vytlačeny menšími porézními částicemi. Pelikulární částice jsou v dnešní době méně používané, uplatnění získaly pouze pro separaci bílkovin a velkých biomolekul.

b) Kolona s porézními částicemi

Porézní částice mají velikost v rozmezí 3–10 μm a tyto částice jsou tvořeny silikagelem (SiO_2), aluminou (Al_2O_3), syntetickou polystyren-divinylbenzenovou pryskyřicí [13] nebo florisilem ($\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)$). [15]

Nejvíce používaný je silikagel. Silikagel je adsorbent slabě kyselých vlastností, z tohoto důvodu dokáže silně zpomalovat zásadité látky. Silikagel má amorfni strukturu a snadno přijímá vodu. Před jeho použitím je nutná aktivace při 180 °C.

Druhým nejvíce používaným adsorbentem je alumina, který má narušil od silikagelu bazické vlastnosti, což lze využít pro oddělování slabě kyselých složek vzorku. Před jeho použitím je také nutná aktivace, která se provádí jeho zahřátím na 400 °C po dobu 6–16 hodin.

Florisil patří mezi slabě kyselé polární sorbenty, které nejsou tolik využívány jako silikagel a alumina. [15]



Obrázek 12 Kolony pro HPLC [19]

3.1.4.2 Chromatografické předkolony

Předkolony jsou krátké kolony zařazené těsně před analytickou kolonou, z důvodu ochrany této kolony (Obr.13). [13] Předkolony se volí hlavně u přírodních vzorků, u kterých by látky mohly vyvolat předčasné znehodnocení kolony. [15]

V HPLC se používají 2 typy předkolek. První typ předkolek představuje krátkou kolonku, která se umísťuje mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu, a je naplněná stejnou stacionární fází jako je analytická kolona. Účelem této kolonky je zabránění nečistot, které by mohly kontaminovat nadcházející kolonu. Tento typ předkolek je hojně využíván.

Druhý typ představuje předkolonu, která je řazená mezi zásobník mobilní fáze a dávkovací zařízení. Používá se k úpravě mobilní fáze, MF částečně rozpouští náplň předkolek, dříve, než vstoupí na analytickou kolonu. Díky tomu se pak náplň dále nerozpouští. Tento typ předkolek se ale nepoužívá. [13]



Obrázek 13 Předkolona [20]

3.1.5 Detektory

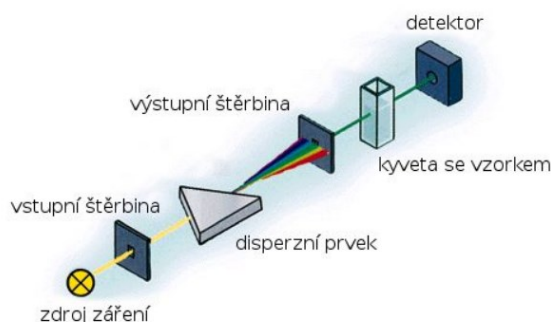
Detektor je zařízení, které monitoruje změny složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Detektory se podle selektivity dělí na univerzální (reaguje na všechny analyty), selektivní (reaguje pouze na určitou skupinu látek) a specifický (reaguje pouze na jediný analyt, případně na velmi malou skupinu látek, které mají podobné vlastnosti).

Mezi ideální požadavky na detektory v HPLC patří možnost detekce všech přítomných komponentů (univerzálnost), okamžitá odezva detektoru, vysoká citlivost a nízká úroveň šumu, odolný vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, vhodný pro gradientovou eluci. V praxi takový detektor bohužel neexistuje a různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně pouze přibližují. [21]

V praxi se jako detektor nejvíce používá fotometrický, refraktometrický a fluorescenční [18]

1) Fotometrické detektory

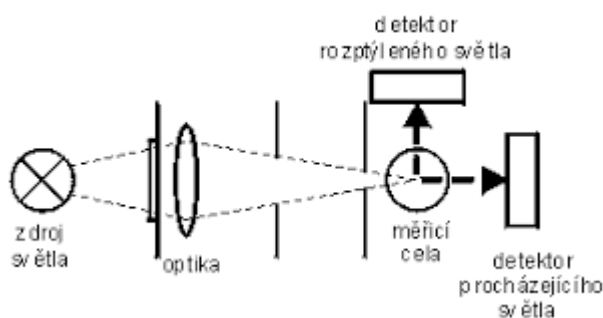
Fotometrické detektory (Obr. 14) se zařazují mezi nejčastější typy detektorů a jsou vhodné pro gradientovou eluci. Fotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A): $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$; kde ε je molární absorpční koeficient ($l/\text{mol}/\text{cm}$). [21]



Obrázek 14 Schéma fotometrického detektoru [22]

2) Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory (Obr. 15) se používají jako univerzální detektory, ale nejsou vhodné pro gradientovou eluci. Tyto detektory se používají pro látky, které neabsorbují a nefluoreskují (cukry, lipidy, polymery). Refraktometrické detektory jsou založeny na měření změn indexu lomu eluátu, který prochází měřicí celou. Čím větší je rozdíl v indexu lomu analytu a mobilní fáze, tím větší je i citlivost. Měření se provádí tak, že paprsek prochází měřenou a srovnávací celou, a je měřen rozdíl intenzity světla, které dopadá na detektor. [23]

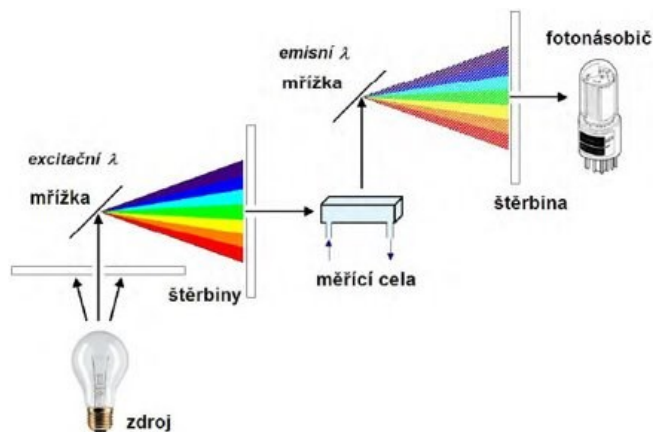


Obrázek 15 Schéma refraktometrického detektoru [24]

3) Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory (Obr. 16) lze použít pro gradientovou eluci. Tyto detektory měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Absorpci elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního stavu do vyšších vibračních hladin.

Absorbovanou energii analyt vyzáří jako fluorescenci. [23]



Obrázek 16 Schéma fluorescenčního detektoru [25]

3.1.6 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatografické analýzy

Způsob kvalitativního vyhodnocení chromatogramů spočívá v porovnání retenčního času neznámé látky a standardu separovaného za stejných podmínek. Nebo se provádí díky napojení hmotnostního spektrometru na kapalinový chromatograf (LC-MS). Tímto se získávají informace o molárních hmotnostech eluovaných složek, a díky tomu se usnadňuje kvalitativní analýza. [15]

Při kvantitativním stanovení se hledá vztah mezi množstvím eluované látky a plochou zaznamenaného píku. Jelikož má vyhodnocení dat v HPLC relativní charakter, je možné vztah mezi plochou píku a neznámou koncentrací stanovovaného analytu určit pomocí standardů. Při kvantitativním stanovení pak lze použít například následující metody:

- a) Metoda vnějšího standardu (metoda kalibrační křivky),
- b) Metoda přídavku standardu,
- c) Metoda vnitřního standardu. [26]

Metoda vnějšího standardu

Tato metoda se řadí mezi nejjednodušší způsoby kvantitativního vyhodnocení. Je známa jako metoda kalibrační křivky. Analyzují se při ní roztoky standardů o známé, ale rozdílné koncentraci a hledá se závislost mezi koncentrací a plochou píku. Obvykle se měří 5–7 bodů přímky, přičemž každý bod se měří alespoň 2 – 3x, aby se dosáhlo co nejspolehlivějších výsledků. Tento způsob kvantitativního vyhodnocení je vhodný pro práci se standardy a v případě, kdy má vzorek a standard srovnatelné vlastnosti. [26]

Metoda přídavku standardu

Předpokladem použití metody standardního přídavku je splnění podmínky linearit mezi plochou píku a stanovovanou koncentrací. Princip této metody je v tom, že se ke vzorku přidá přesné množství té samé látky, u které se má stanovit neznámá koncentrace. Vždy se musí udělat nejméně dva nástřiky vzorku – při prvním se dávkuje přesné množství vzorku, při druhém se dávkuje přesné množství směsi [27]

Metoda vnitřního standardu

V této technice se celá analýza uskuteční v jediném nástřiku a dávkovaný objem vzorku není třeba přesně odměřovat. Princip metody je dán tím, že se naředí vzorek vzorkem

standardu, přičemž původní koncentrace standardu musí být známá. Tato technika má dvě varianty, a to **metoda přímého porovnání a metoda kalibrační křivky**.

a) metoda přímého porovnání

Ke vzorku o určitém objemu a neznámé koncentraci se přidá objem standardu o známé koncentraci. Látky se musí dobře separovat a standard by se měl eluovat v blízkosti stanovované látky. Získaná směs se nadávkuje a vyhodnotí se plochy standardu a stanovované látky.

b) metoda kalibrační křivky

Připraví se série standardních roztoků látky o dané koncentraci a z jednotlivých roztoků se odebere určitý objem a naředí se objemem standardu o známé koncentraci. Získaná směs se nadávkuje a vyhodnotí se plochy standardu a stanovované látky. [18]

3.2 Optimalizace mobilní fáze

Optimalizace představuje nezbytné kroky k úspěšné analýze pomocí HPLC. Optimalizace je postup, který zahrnuje celý proces vývoje a validace metody. Optimalizace se týká výběru chromatografických podmínek, která budou vyhovovat všem standardům a zároveň umožní přesnou separaci a citlivou identifikaci sloučenin ve směsi v co nejkratším čase. Proces optimalizace je většinou experimentální.

3.3 Aplikace a využití HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má uplatnění ve více odvětví, jako je například farmacie pro separaci antibiotik, sedativ, steroidů a analgetik; v biochemii se jedná o separaci aminokyselin, bílkovin, sacharidů a lipidů. V potravinářství lze izolovat umělá sladidla, antioxidanty, aflatoxiny; ve forenzní vědě se jedná o izolaci drog, jedů, narkotik. V průmyslové chemii se snaží separovat polycyklické aromatické uhlovodíky, povrchově aktivní látky, pohonné hmoty a barviva. A v životním prostředí se jedná o separaci pesticidů a herbicidů. [13]

4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MAKROCYKLICKÝCH SLOUČENIN (CYKLODEXTRINY, CUCURBITURULY) A JEJICH VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

4.1 Cyklodextriny

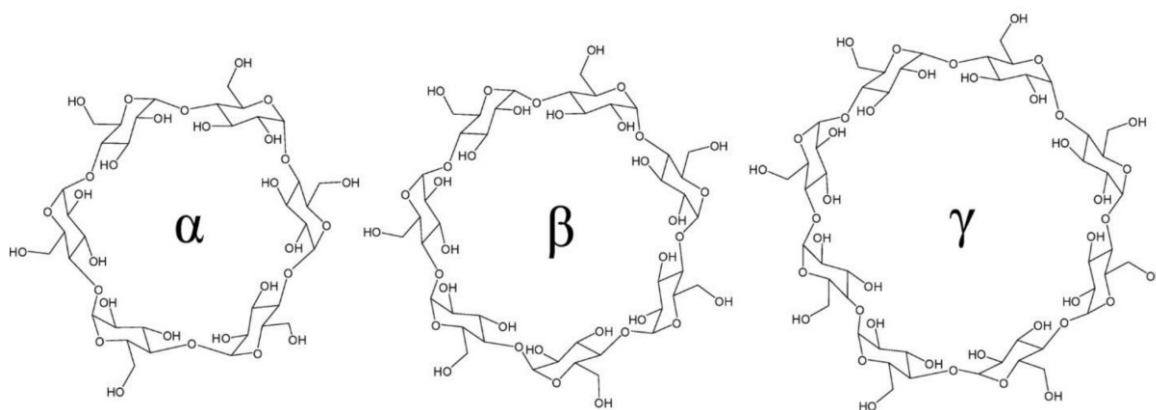
Již několik let se vědci z akademické i průmyslové sféry intenzivně zajímají o cyklodextriny a jejich deriváty, a to z důvodu jejich charakteristických strukturních, fyzikálních a chemických vlastností. Mnoho aplikací cyklodextrinů dodnes nebylo objeveno, proto o ně výzkumníci mají stále velký zájem.

První zmínka o cyklodextrinech (CD) byla publikována už v roce 1891, kdy Antoine Villiers popsal izolaci krystalické látky ze škrobu natráveného bakteriemi rodu *Bacillus*. [29]

4.1.1 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů

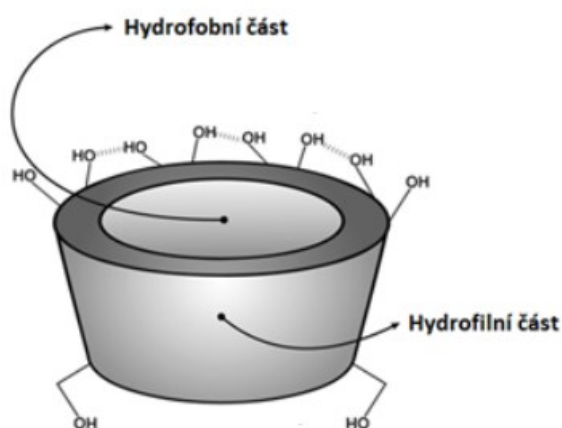
Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené glukopyranozovými jednotkami, které jsou spojeny α -1,4 glykosidickými vazbami. [30] CD nejsou toxické, jedná se cukerné polymery, které jsou ve vodě a některých organických rozpouštědlech stabilní. V zásaditém prostředí (pH = 12,1) se stabilita zvyšuje, pokud ale prostředí není dostatečně zásadité (pH = 4–9), dochází k hydrolyze, což má za následek otevření kruhu. Otevření kruhu způsobuje tvorbu různých lineárních oligosacharidů a glukózových jednotek. [29]

Nejběžnější a nejvíce využívané jsou α , β , γ – cyklodextriny (Obr. 17), které jsou tvořeny 6–8 glukózovými jednotkami: α -cyklodextrin (α -CD) je složen ze šesti, β -cyklodextrin (β -CD) sedmi a γ -cyklodextrin (γ -CD) osmi jednotek. [30]



Obrázek 17 Struktura jednotlivých CD(n) [29]

Geometrické uspořádání glukózových jednotek představuje dutý kužel. Orientace jednotlivých substituentů (hydroxylových skupin) určuje specifické vlastnosti cyklodextrinu. Vnitřní část, nazývaná jako kavita, je hydrofobní (nerozpustná ve vodě), zatímco vnější část je hydrofilní (rozpustná ve vodě) (Obr. 18). Na vnějším širším okraji kavity se nacházejí sekundární hydroxylové skupiny a užší okraj je obklopen primárními hydroxyly. Přítomnost uhlovodíkového řetězce a etherických kyslíků určují hydrofobní vlastnosti vnitřní části. [30]



Obrázek 18 Znárodnění struktury CD[n] [31]

4.1.2 Syntéza cyklodextrinů

Cyklodextriny vznikají hydrolyzou škrobu za působení enzymů. Dva nejčastěji používané enzymy jsou α -amyláza a cyklodextrin-glykosyltransferáza (CGT). CGT je produkován různými druhy bakterií, jako je např. *Klebsiella*, *Clostridium* nebo *Bacillus*. [30] CGT se přidává po rozpuštění škrobu teplem nebo pomocí α -amylázy, která štěpí škrob na menší jednotky, aby se zvýšila jeho rozpustnost. Výsledkem je směs, která se většinou skládá z α -CD, β -CD a γ -CD v jejich typickém poměru. Díky nízké rozpustnosti β -CD, jej lze snadno krystalizovat z roztoku směsi. Zatímco α -CD a γ -CD mají poměrně vysokou rozpustnost, špatně tedy krystalizují a zůstávají v roztoku. Cyklodextriny s vysokou rozpustností lze ze směsi získat pomocí chromatografických metod. [32]

4.1.3 Využití cyklodextrinů

Cyklodextriny mají hojné využití. V současné době se ve farmaceutickém průmyslu objevuje stále více farmakologických sloučenin, které jsou téměř nerozpustné ve vodném prostředí. V minulosti se k rozpouštění těchto látek používaly povrchově aktivní látky,

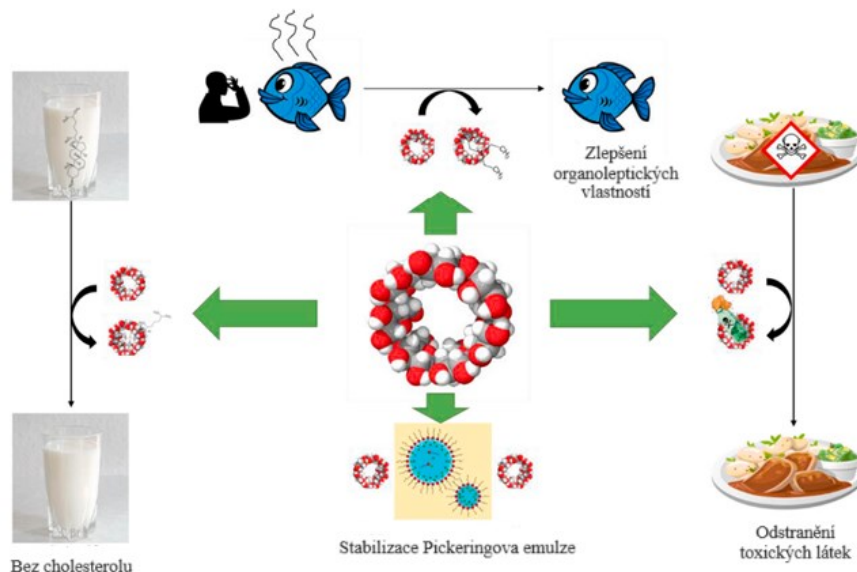
organická rozpouštědla nebo drastické změny pH. To často vedlo k podráždění nebo jiným negativním důsledkům pro organismus. Výsledkem je, že CD, která jsou netoxická a díky své molekulární struktuře schopná vytvářet inkluzní komplex s léčivou [33]

Další zajímavou vlastností cyklodextrinů je, že jsou schopné vázat a tím odstraňovat nepříjemné pachy. V kosmetickém průmyslu se tak používají jako součást deodorantů, parfémů a dalších produktů.

Další uplatnění mají v oblasti ochrany životního prostředí. Díky své schopnosti vázat do své struktury různé látky, jako jsou například těžké kovy či pesticidy, jsou cyklodextriny schopny odstraňovat tyto látky z vody a půdy, a tím čistit prostředí od škodlivin. [34]

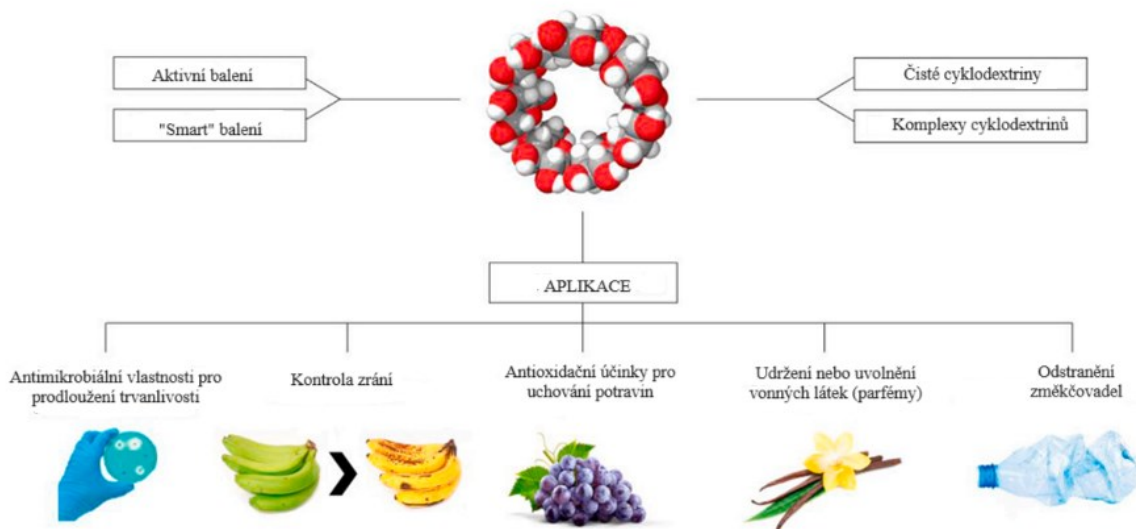
V potravinářském průmyslu se cyklodextriny využívají mnohem více než druhé nejčastěji využívané makrocykly – cucurbiturily, protože jsou to molekuly bez chuti, bez kalorií a bez zápachu s několika cennými vlastnostmi, jako je schopnost oddělovat chirální sloučeniny a jejich schopnost rozpouštět nebo stabilizovat bioaktivní sloučeniny. [35] CD(n) mají dokonce svůj E – kód (E-459) a používají se ke zlepšení chuťových vlastností a stability určitých složek potravin, jako jsou koření, oleje a vitamíny. [36]

V největší míře se využívají k extrakci různých látek z biologického materiálu či potravin, z důvodu zvýšení výnosů nebo k výrobě upravených produktů. Jedná se například o „free“ produkty, kdy se za jejich pomoci extrahují určité látky z potravy, jako například laktóza, cukr nebo gluten, čím vznikají laktóza – free, cukr – free (sugar – free), gluten – free a jiné produkty. Případně se využívají na eliminaci nahořklé chuti a pachuti, například k odstranění bobovité příchutě sójového mléka, hořkých složek nebo k eliminaci rybiho či koziho zápachu. [35] Dále slouží i na odstranění volných mastných kyselin, čímž zlepšují vlastnosti tuku při smažení [36] (Obr. 19).



Obrázek 19 Využití CD(n) k dosažení organoleptických vlastností a k výrobě „free“ produktů [35]

Pomocí CD se vylepšuje i samotné balení potravin. Cílem je vytvořit „smart“ balení, které po přidání CD prodlužují expirační dobu produktu. Mohou být přidávány jako „volné“ CD nebo „v komplexu“. Volné slouží na zachytávání určitých malých molekul, zatím co CD v komplexu se přidávají na uvolnění ligandu sloužícího jako konzervační látky. Využití nacházejí při snižování tvorby výparů dozrávající zeleniny a ovoce [35], čímž se zpomaluje enzymatické hnědnutí na povrchu zpracovávané potraviny. [36] Využívají se také na zachytávání aditiv a kontaminantů z obalů, anebo jako nosiče antioxidantů. (Obr 20). Vzhledem k tomu, že CD jsou oligosacharidy na bázi škrobu, a jsou tedy biologicky odbouratelné, lze navíc celý obal považovat za biologicky odbouratelný.

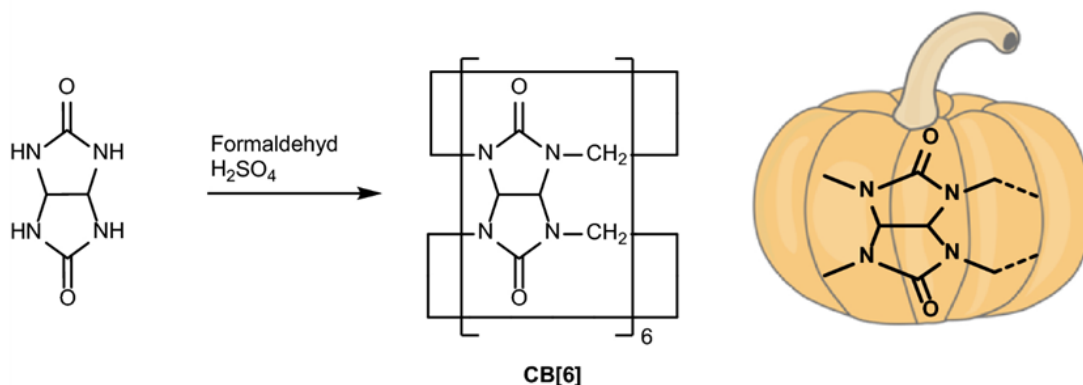


Obrázek 20 Aplikace CD v potravinářských obalech [35]

V neposlední řadě se využívají i na výrobu nosičů bioaktivních látek jako jsou vitamíny, mastné kyseliny, antioxidanty či karotenoidy. [35]

4.2 Cucurbit(n)urily

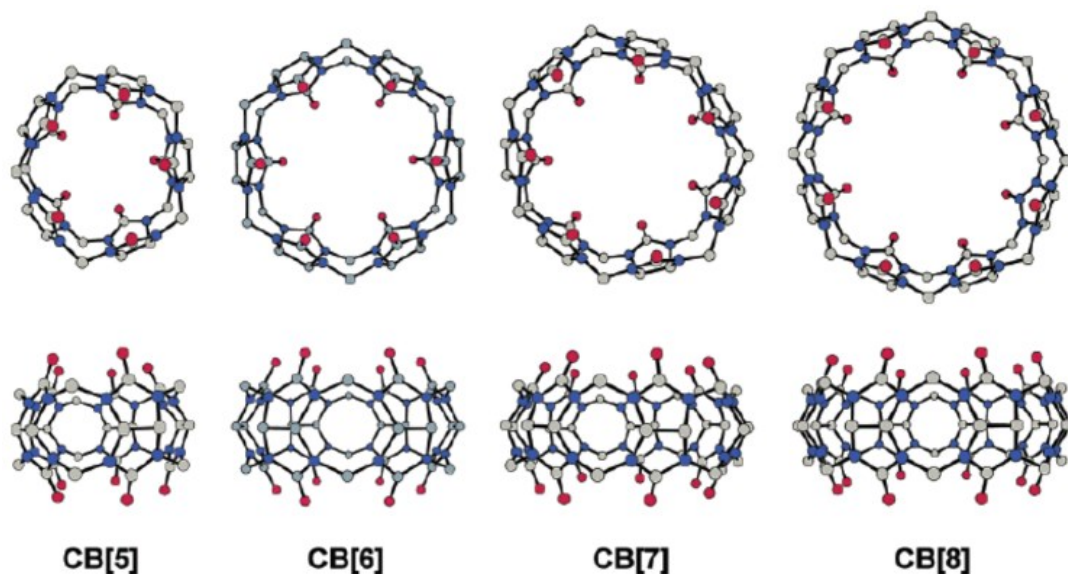
Syntéza cucurbiturilů začíná v roce 1905, kdy R. Behrend se svým kolektivem popsal cucurbiturily jako produkty kondenzačních reakcí glykolurilu a formaldehydu (Obr. 21, vlevo) v kyselém prostředí. Struktura cucurbiturilů byla objasněna o několik let později, až v roce 1981, kdy W. L. Mock získal makrocyclickou strukturu CB(6) a pojmenoval ji po botanické čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*), kvůli její struktuře ve tvaru dýně (Obr. 21, vpravo). [32]



Obrázek 21 Vlevo: Syntéza prvního cucurbiturilu CB(6). Vpravo: Ilustrace dýňovité struktury CB(n) [37]

4.2.1 Struktura a vlastnosti cucurbiturilů

Cucurbiturily jsou syntetické, makrocyclické sloučeniny s různým počtem glykolurilových jednotek vázaných přes dusík methylenovými můstky. Aktuálně je známá struktura CB(n) složených z 5, 6, 7, 8 a 10 jednotek (Obr. 22). CB(9) byl sice také identifikován, a to pomocí NMR, ale dosud nebyl izolován. [38]



Obrázek 22 Krystalová struktura některých cucurbiturilů [39]

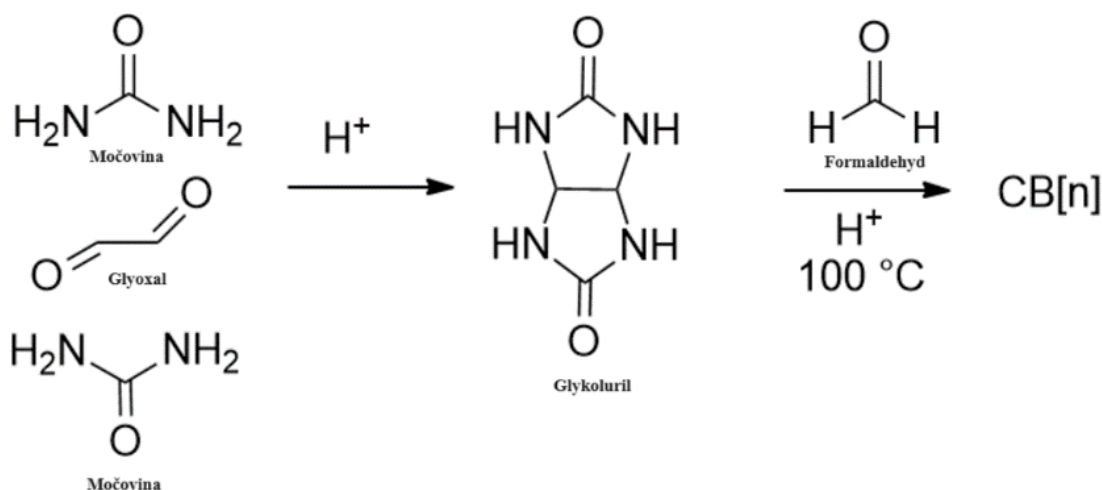
Navzdory rozsáhlému výzkumu nebyly nalezeny žádné důkazy o škodlivých účincích CB(n) na lidský organismus, proto jej považujeme za bezpečné a vhodné látky, i pro použití ve farmaceutickém a lékařském průmyslu. [32]

Mezi důležité vlastnosti patří tvorba komplexů látek s CB(n). Například CB(5) umožňuje pouze vázání plynů, CB(6) váže alifatické uhlovodíky, CB(7) dokáže vázat aromatický cyklus a CB(8) je schopný vázat v dutině dvě aromatická jádra zároveň vedle sebe.

Hlavní nevýhodou a důvodem, proč je práce s CB(n) poměrně náročná, je jejich špatná rozpustnost. Žádné z organických rozpouštědel nepodporuje rozpustnost CB(n). CB(6) a CB(8) jsou ve vodě téměř nerozpustné, zatímco CB(5) a CB(7) jsou zhruba 1000krát rozpustnější ve vodě než CB(6). Rozpustnost CB(n) ve vodě se zvyšuje v přítomnosti solí kovů tím, že iont kovu je koordinován na karbonylové skupiny. Obecně lze říct, že se CB(n) dobře rozpouští pouze v silně kyselém prostředí. [39]

4.2.2 Syntéza cucurbiturilů

Pro syntézu cucurbiturilů, se využívá reakce močoviny s diketonem (glyoxal), kdy z takových to výchozích látek vzniká meziprodukt glykoluril. Glykoluril se s formaldehydem kondenzuje v kyselém prostředí (přítomnost kyseliny sírové nebo kyseliny chlorovodíkové) za vzniku produktu CB(6), při teplotě nad 110 °C (Obr. 23).



Obrázek 23 Syntéza CB(n)

CB(6) je, díky hojnosti vodíkových vazeb, hlavním produktem reakce. Při snížení teploty reakce na 75 – 90 °C lze získat i další CB, jako je CB(5) a CB(10). [27] Bohužel CB(n) s deseti podjednotkami, lze z reakční směsi izolovat pouze ve formě komplexu s CB(5) ve velmi malém množství. Separace samotného CB(10) je prováděna vyvázáním CB(5) triazinovým derivátem, s nímž tvoří CB(10) stabilnější komplex. Triazinovým derivát je následně z kavity odstraněn zahříváním v anhydridu kyseliny octové. [39]

4.2.3 Využití cucurbiturilů

Cucurbiturily se díky svým komplexotvorným vlastnostem používají v mnoha průmyslových odvětvích. Bohužel se nepoužívají tak často, jak by mohly, a to kvůli nedostatku čistých homologů, jejich špatné rozpustnosti ve vodných roztocích a obtížnosti s navázáním funkčních skupin na jejich povrch. [40]

Využití ale nacházejí například ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče nerozpustných léčiv nebo při katalýze chemických reakcí. [41]

V oblasti životního prostředí se cucurbiturily uplatnily při čištění odpadních vod. Pomocí polymerů cucurbituril-ethandithiolů je možné z odpadních vod odstranit syntetická barviva, jako je například methylenová modř, konžská červeň, Orange II. a dalších. [42]

V potravinářském průmyslu se cucurbiturily mohou využít pro adsorpci iontů těžkých kovů. Těžké kovy ovlivňují kvalitu vody a na lidskou populaci působí nepříznivě, mohou

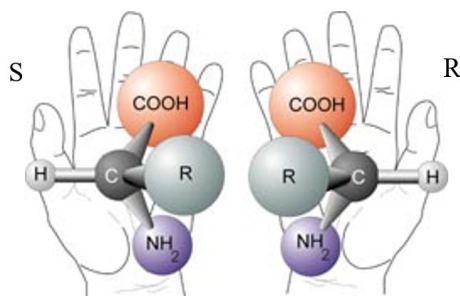
vyvolat zdravotní potíže, proto je nutné těžké kovy z vody odstranit. Nejvyšší účinnost adsorpce těžkých kovů z vody prokázal CB(6). [42][43]

4.3 Využití vybraných makrocyclických sloučenin v HPLC

4.3.1 Cyklodextriny

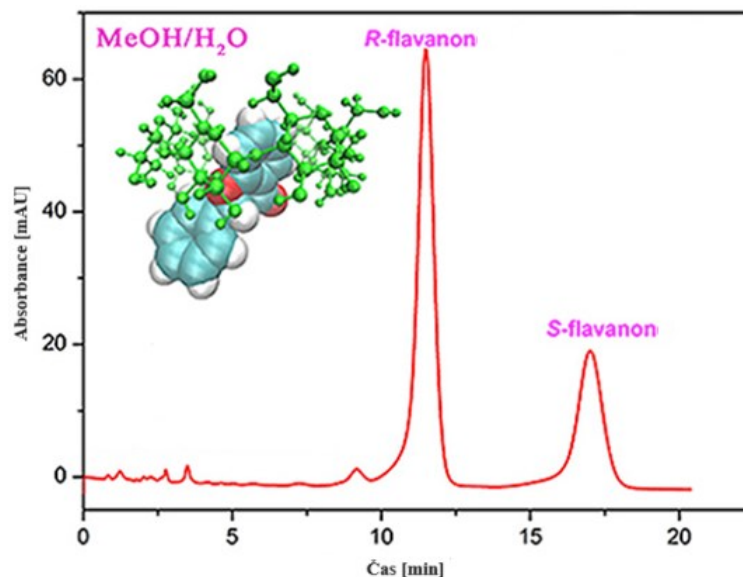
V potravinářském průmyslu je důležité znát množství živin nebo bioaktivních látek ve výrobcích a za tímto účelem byly vyvinuty nové metody měření se zvýšenou citlivostí. V tomto ohledu mnoho vlastností CD, jako je jejich schopnost chirálního rozpoznávání izomerů nebo zesilování jejich signálů, znamená, že je lze použít jako platformu pro vývoj nových nanosenzorů. [44] Konkrétně se jedná o chirální separace, prováděné pomocí techniky HPLC, kde vystupují jako chirální selektory v stacionární fázi i mobilní fázi.

Chirální separace se řadí mezi analytické metody umožňující separovat látky, které jsou opticky aktivní (S, R-izoméry) a vyskytují se jako stereoizomery (molekuly se shodným sumárním vzorcem a konstitucí, lišící se prostorovým uspořádáním) (Obr. 24). [45]



Obrázek 24 Příklad chirálních molekul (enantiomerů) - zrcadlové obrazy, které jsou vzájemně neztotožnitelné [45]

Enantiomery mají stejné fyzikální a chemické vlastnosti, což takové separace komplikuje, protože většina separačních technik odděluje jednotlivé analyty na základě jejich odlišných fyzikálních a chemických vlastností. Chirálním selektorem se rozumí látka, která s analytem na sebe vzájemně působí. Může být buď součástí stacionární fáze (navázán na sorbentu) (Obr. 25) nebo může být přidán ve formě aditiva do fáze mobilní. [46]



Obrázek 25 Ukázka chirální separace S,R-flavonu pomocí CD navázaného na stacionární fázi [47]

Jako chirální selektor se významně využívají typy CD jako jsou: α , β , γ -cyklodextrinů. Podle počtu glukózových jednotek se vnitřní průměr jednotlivých CD liší, z toho vyplývá využití jednotlivých CD v závislosti na velikosti analytu. α -CD se uplatňuje hlavně pro separaci malých molekul (jeden kruh), sloučeniny obsahující dva kruhy jsou separovány pomocí β -CD a pro separaci větších molekul obsahující tři a více kruhů (steroidy) slouží γ -CD. Největší uplatnění má β -CD. [30]

4.3.2 Cucurbiturily

Cucurbiturily se využívají jako stacionární fáze imobilizovaná na silikagelu nebo polymerních kuličkách v analytických separačních metodách. Využití právě cucurbiturilů je z důvodu jejich výrazných inkluzních a koordinačních vlastností v kombinaci s chemickou odolností.

Jako SF pro HPLC prokázal nejvyšší stabilitu CB(7) imobilizovaný silikagelem (SiO_2). Kromě toho CB(7) vykazuje určitý stupeň hydrofobních i hydrofilních vlastností, což naznačuje, že tuto stacionární fázi lze použít jak v chromatografii na reverzní, tak i na normální fázi. [42]

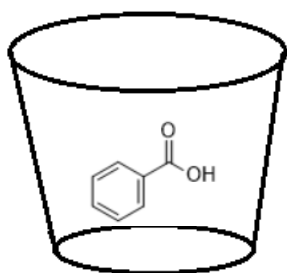
Studie prokázaly také použití CB(6) vázaného na silikagel jako stacionární fázi pro HPLC k separaci alkaloidů (berberin, efedrin, atropin, nikotin). [48]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

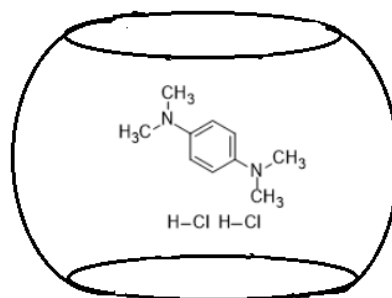
5 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této práce bylo seznámení se s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a optimalizace mobilní fáze pro analýzu dvou komplexů a následně jejich směsi. První komplex (Obr. 26) byl sestaven z β – cyklohextrinu s kyselinou benzoovou, a druhý komplex (Obr. 27) z cucurbiturilu(7) s N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem.

Po optimalizaci podmínek se vytvoří a přeměří koncentrační řady komplexů, ze kterých se vytvoří kalibrační křivky. Ty mohou sloužit na rychlé stanovení čistoty syntetizovaných makrocyclů.



Obrázek 27 Komplex 1 – β – CD s kyselinou benzoovou



Obrázek 26 Komplex 2 – CB(7) s N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem.

6 METODIKA

Byla vyvinuta metoda pro analýzu 2 supramolekulárních komplexů za pomoci HPLC:

- 1) Makrocyklus β – CD s ligandem kyselinou benzoovou
- 2) Makrocyklus CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem

Z kalibračních řad těchto komplexů o daných koncentracích byla poté vytvořena kalibrační křivka.

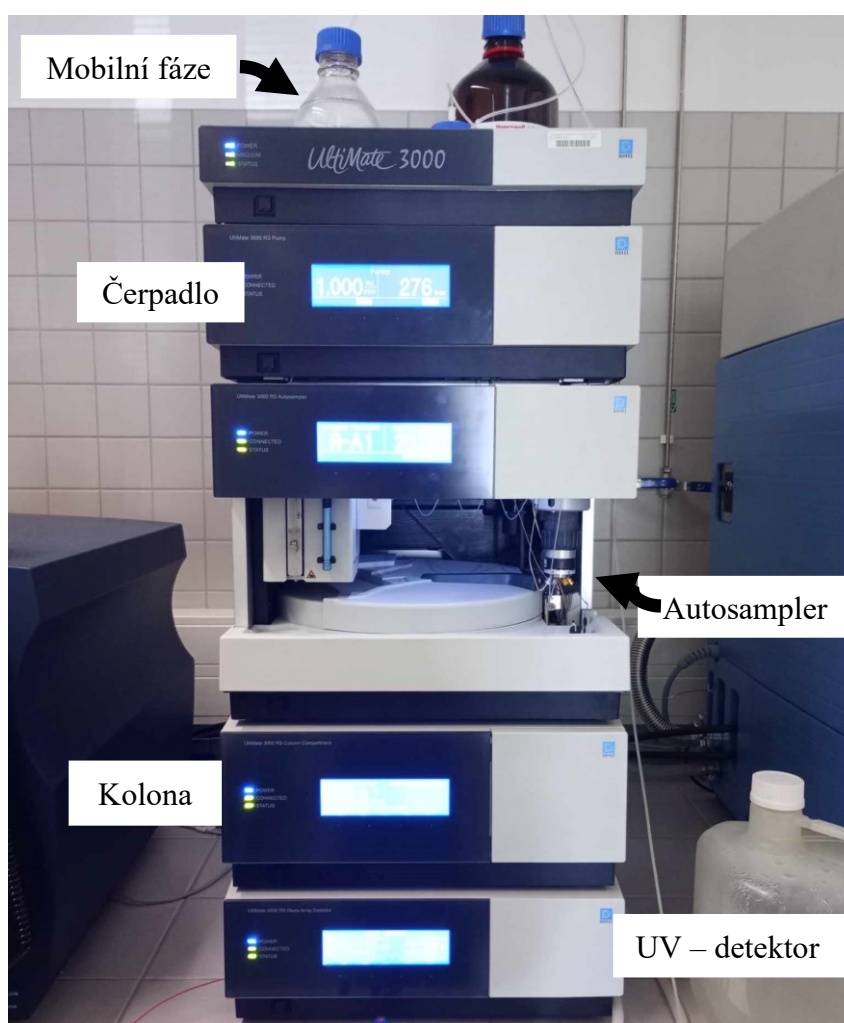
6.1 Chemikálie

- β – cyklodextrin (Ing. Petr Janovský, UTB Zlín)
- Cucurbituril(7) (Ing. Petr Janovský, UTB Zlín)
- N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diamin dihydrochlorid 98 % (Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika)
- Kyselina benzoová (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)
- Octan amonný (LACHEMA, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina octová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Acetonitril (Honeywell, USA)
- Methanol (Honeywell, USA)
- HPLC voda (Fisher Chemical, Indie)

6.2 Použité přístroje a pomůcky

- Aparatura pro HPLC (Chromatograf Dionex Ultimate 3000)
- Kolona Discovery C18, velikost částic 5 μm , průměr 4,6 mm, délka 25 cm
- Detektor DAD UV-VIS
- Software HyStar Post Processing
- Dávkovací stříkačka (Chirana T. Injecta cz, spol. s r.o., Česká republika)
- Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm (BIOFIL, Španělsko)

- pH metr (HANNA instrument, HI 2221 Calibration Check pH/ORP Meter, Praha, Česká republika)
- Ultrazvuková lázeň (ARGO LAB, Velká Británie)
- Analytické váhy (BOECO, Germany)
- Laboratorní sklo
- Chladnička (LG Smart ThinQ, Jižní Korea)



Obrázek 28 Chromatograf Dionex Ultimate 3000

7 ANALÝZA KOMPLEXŮ POMOCÍ HPLC

7.1 Příprava mobilních fází pro analýzu komplexů

Všechny připravené mobilní fáze měly HPLC kvalitu.

7.1.1 Příprava mobilní fáze pro měření komplexu 1: makrocyklu β – CD s ligandem kyselinou benzoovou

Jako mobilní fáze pro tento komplex (Obr. 26) byly vyzkoušeny 3 varianty:

1. Octan amonný s methanolem;
2. Octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s methanolem;
3. Octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s acetonitrilem.

7.1.1.1 Příprava MF octanu amonného s methanolem

Na měření byl použitý 100 % HPLC methanol jako organická fáze a octan amonný o koncentraci 5 mM jako vodní fáze. Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 500 ml HPLC vody.

7.1.1.2 Příprava MF octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s methanolem

Na měření byl použitý 100 % HPLC methanol jako organická fáze a octan amonný o koncentraci 5 mM, okyselený kyselinou octovou, aby vznikla kyselá vodní fáze. Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 500 ml HPLC vody. Kyselina octová se k roztoku octanu amonného přidávala po kapkách do té doby, než roztok octanu amonného získal hodnotu $\text{pH} = 4,4$. pH se měřilo pomocí pH metru.

7.1.1.3 Příprava MF octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s acetonitrilem

Na měření byl použitý 100 % HPLC acetonitril jako organická fáze a octan amonný o koncentraci 5 mM, okyselený kyselinou octovou, aby vznikla kyselá vodní fáze. Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 500 ml HPLC vody. Kyselina octová se k roztoku octanu amonného přidávala po kapkách do té doby, než roztok octanu amonného získal hodnotu $\text{pH} = 4,4$. pH se měřilo pomocí pH metru.

7.1.2 Příprava mobilní fáze pro měření komplexu 2: makrocyklu CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem

Jako mobilní fáze pro tento komplex (Obr. 27) byly vyzkoušeny 2 varianty:

1. Octan amonný s methanolem;
2. Octan amonný s acetonitrilem.

7.1.2.1 Příprava MF octanu amonného s methanolem

Na měření byl použitý 100 % HPLC methanol jako organická fáze a octan amonný o koncentraci 5 mM jako vodní fáze. Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 500 ml HPLC vody.

7.1.2.2 Příprava MF octanu amonného s acetonitrilem

Na měření byl použitý 100 % HPLC acetonitril jako organická fáze a octan amonný o koncentraci 5 mM jako vodní fáze. Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 500 ml HPLC vody.

7.2 Příprava vzorků pro získání komplexů

7.2.1 Příprava vzorku pro komplex 1: makrocyklus β – CD s ligandem kyselinou benzoovou

Jako ligand, pro stanovení komplexu s β – CD (Obr. 26), byla použita kyselina benzoová o koncentraci 10 mM. Ligand byl připraven smícháním 27,8 μ l kyseliny benzoové v 30 ml HPLC vody.

Makrocyklus β – CD o koncentraci 10 mM, byl připraven rozpuštěním 0,3415 g β – CD v 30 ml HPLC vody. Takto připravený vzorek byl na 2 minuty vložen do ultrazvuku pro lepší rozpuštění β – CD. Získaný makrocyklus se uchovával v lednici při teplotě 5–7 °C do dalšího použití.

Roztoky na samotné měření byly připravené ředěním zásobních roztoků ligandu s makrocyklem na předem určenou výslednou koncentraci komplexu. Vzorky byly odebírány mikropipetou, a přes mikrofiltr přefiltrovány do vialky o objemu 2 ml. Poté se vzorky měřily pomocí HPLC. Koncentrace vzorků komplexu 1 jsou uvedeny v tab. č. 1.

Výsledná koncentrace komplexu [mM]	Objem ligandu [μl]	Objem zásobního roztoku makrocyklu [μl]	Objem vody [μl]	Výsledný objem [ml]
4	800	800	400	2
3,5	700	700	600	
2,5	500	500	1000	
1	200	200	1600	
0,5	100	100	1800	
0,25	50	50	1900	

Tabulka 1 Koncentrace vzorků komplexu 1 pro měření pomocí HPLC

7.2.2 Příprava zásobního roztoku pro komplex 2: makrocyklus CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem

Jako ligand, pro stanovení komplexu s CB(7) (Obr. 27), byl použit N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diamin dihydrochlorid o koncentraci 10 mM. Ligand byl připraven rozpuštěním 0,0703 g N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminu dihydrochloridu v 30 ml HPLC vody.

Makrocyklus CB(7) o koncentraci 10 mM, byl připraven rozpuštěním 0,3487 g CB(7) v 30 ml HPLC vody. Takto připravený vzorek byl na 2 minuty vložen do ultrazvuku pro lepší rozpuštění. Získaný makrocyklus se uchovával v lednici při teplotě 5–7 °C do dalšího použití.

Roztoky na samotné měření byly připravené ředěním zásobních roztoků ligandu s makrocyklem na předem určenou výslednou koncentraci komplexu. Ligandy s makrocyklem byly odebírány mikropipetou, a přes mikrofiltr byly přefiltrovány do vialky o objemu 2 ml. Poté se připravené vzorky měřily pomocí HPLC. Koncentrace vzorků komplexu 2 jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Výsledná koncentrace komplexu [mM]	Objem ligandu [μ l]	Objem zásobního roztoku makrocyklu [μ l]	Objem vody [μ l]	Výsledný objem [ml]
4	800	800	400	2
3,5	700	700	600	
2,5	500	500	1000	
1	200	200	1600	
0,5	100	100	1800	
0,25	50	50	1900	

Tabulka 2 Koncentrace vzorků komplexu 2 pro měření pomocí HPLC

7.3 Chromatografické stanovení daných komplexů

Stanovení analyzovaných komplexů se provádělo na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 od společnosti Dionex, kde se použila kolona s reverzní fází Discovery C18 (4,6 mm x 25 cm, 5 μ m,).

Jako mobilní fáze se pro komplex 1 (Obr. 26) vyzkoušel octan amonného s methanolem; druhou variantou byl octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s methanolem; a dále pak octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s acetonitrilem.

Jako mobilní fáze se, pro komplex 2 (Obr. 27), vyzkoušel octan amonný s methanolem a octan amonný s acetonitrilem.

Stanovení probíhalo v izokratickém elučním režimu, průtok MF se nastavil na 1 ml/min a termostat kolony na 30 °C. Délka měření komplexu 1 (Obr. 26) trval 10 minut, a pro komplex 2 (Obr. 27) 15–20 minut. Tlak se pohyboval kolem 300 barů, což odpovídá 30 MPa. Zvýšení tlaku způsobila závada na chromatografu, která ale neovlivňovala průběh měření.

Z obou připravených komplexů byl proveden na kolonu nástřik vzorku o dané koncentraci. A získané výsledky po analýze byly vyhodnoceny. Při změně mobilních fází se jeden vzorek často měřil i třikrát, dokud se nedosáhlo úspěšného výsledku. Důvodem mohl být stav chromatografické kolony.

Detekce byla provedena pomocí detektoru diodového pole (DAD) při vlnové délce 210 a 235 nm. Měřilo se i při vlnové délce 544 a 650 nm, ale ty v chromatogramu nebyly viděny.

7.4 Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení daných komplexů

K vytvoření první kalibrační křivky komplexu 1 (Obr. 26) se sestavila kalibrační řada roztoků o koncentraci 5; 2,5; 0,5, 0,25 a 0,1 mmol/l. Pro sestavení druhé kalibrační křivky komplexu 1 se sestavila kalibrační řada o koncentraci 4; 3,5; 2,5; 1; 0,5 a 0,25 mmol/l. Takto připravené kalibrační řady se měřily za stejných chromatografických podmínek pomocí HPLC. Naměřené píky analytů byly poté integrované pomocí softwaru Hystar, a ze získaných integrálů se vytvořila kalibrační křivka.

Stejným způsobem byla připravena i kalibrační křivka pro komplex 2 (Obr. 27).

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Úvod do problematiky této práce

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo seznámení se s HPLC analytickou metodou a přeměření dvou vybraných supramolekulárních komplexů a potencionálně i jejich směsí.

Teoretický postup pro analýzu supramolekulárních komplexů na HPLC představuje výběr vhodného hostitele (ligandu), který je schopen tvořit stabilní komplexy s hostem (makrocyclické sloučeniny), a absorbovat v oblasti detektoru. Další kritérium ideální analýzy spočívá v rozdílném retenčním čase komplexu a samostatného ligandu, za stejných podmínek.

Po nalezení ideálních podmínek měření, se z vybraných ligandů a makrocyclů připraví a přeměří koncentrační rada. Z intenzity signálů se získá jejich integrál, z kterého se v závislosti na koncentraci komplexů vytvoří kalibrační křivka, která může v budoucnu sloužit jako rychlý nástroj ověřování čistoty synteticky připravených makrocyclických sloučenin na Ústavu chemie, co se týče zejména cucurbiturilu(7).

8.2 Optimalizace podmínek analýzy

8.2.1 Optimalizace MF pro komplex 1

Optimalizace MF se zkoušela u čistého ligandu o koncentraci 10 mM a komplexu: β – cyklodextrinu s ligandem kyselinou benzoovou (Obr. 26) o celkové koncentraci 5 mM.

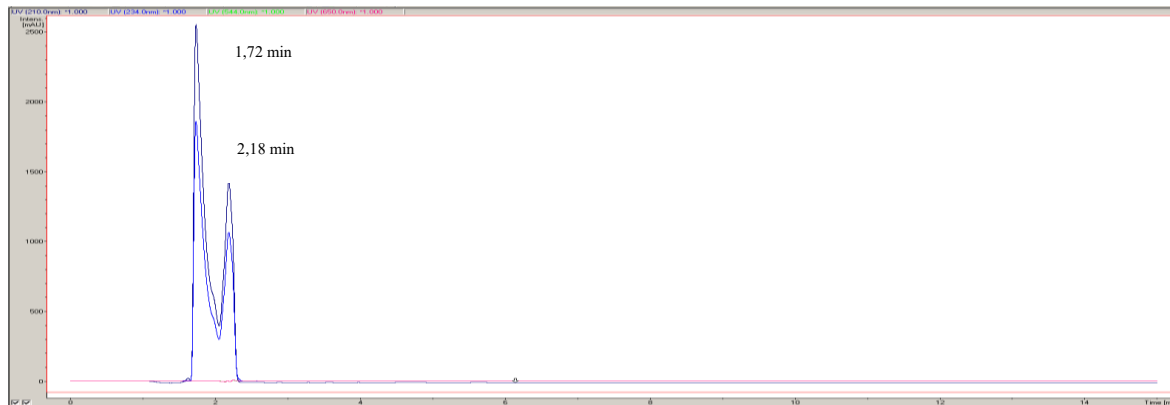
Nejprve se experimentálně prováděla zkouška klasické MF octanu amonného s methanolem. U čistého ligandu byl nejprve vyzkoušen poměr 50:50 methanol ku octan amonný, a došlo ve spektru k vytvoření dvojpiku, který měl krátký retenční čas, a to 1,68 min a 2,05 min (Obr. 29), z důvodu možné deprotonace kyseliny benzoové.



Obrázek 29 Spektrum čistého ligandu (10 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50

Vzniklý pík měl krátký retenční čas, což indukuje na polární sloučeninu. Méně polární podmínky by měly prodloužit retenční čas.

A proto byl poté vyzkoušen nový poměr 60:40 methanol ku octanu amonnému, ale opět se ve spektru zobrazil dvojpík s retenčními časy 1,72 min a 2,18 min (Obr. 30). Retenční časy se viditelně nezměnily.



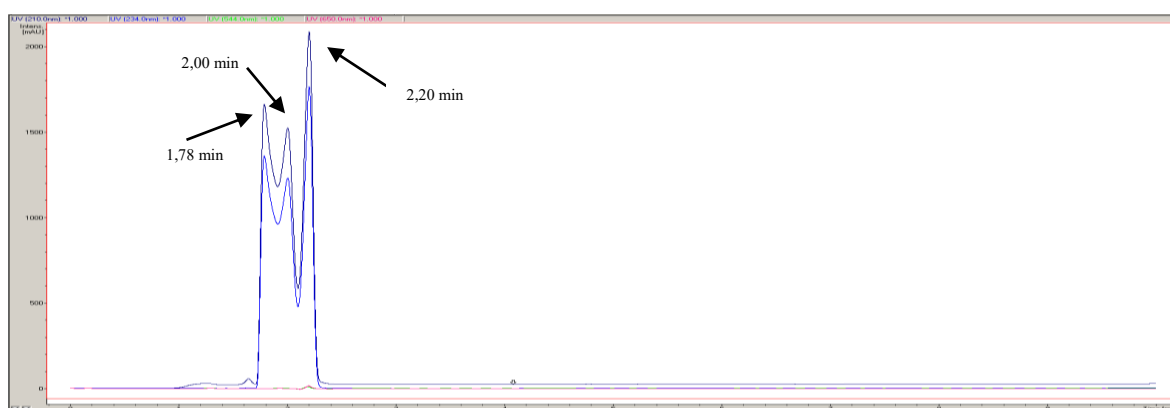
Obrázek 30 Spektrum čistého ligandu (10 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 60:40

Zároveň byl testován i komplex, a to ve stejných poměrech jako u ligandu. Při poměru 50:50, tak i u 60:40 methanol ku octan amonný, došlo k vytvoření dvojpíku ve spektru, taktéž z důvodu deprotonace kyseliny benzoové. Dále vzniklý pík měl u poměru 50:50 krátký retenční čas a to 1,67 min a druhý pík 2,08 min (Obr. 31), což indukuje na polární sloučeninu.



Obrázek 31 Spektrum komplexu (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50

A u poměru 60:40 methanol ku octan amonný byl retenční čas 1,78 min a 2,20 min, u kterého se zviditelnil třetí pík o retenčním čase 2,00 min (Obr. 32).

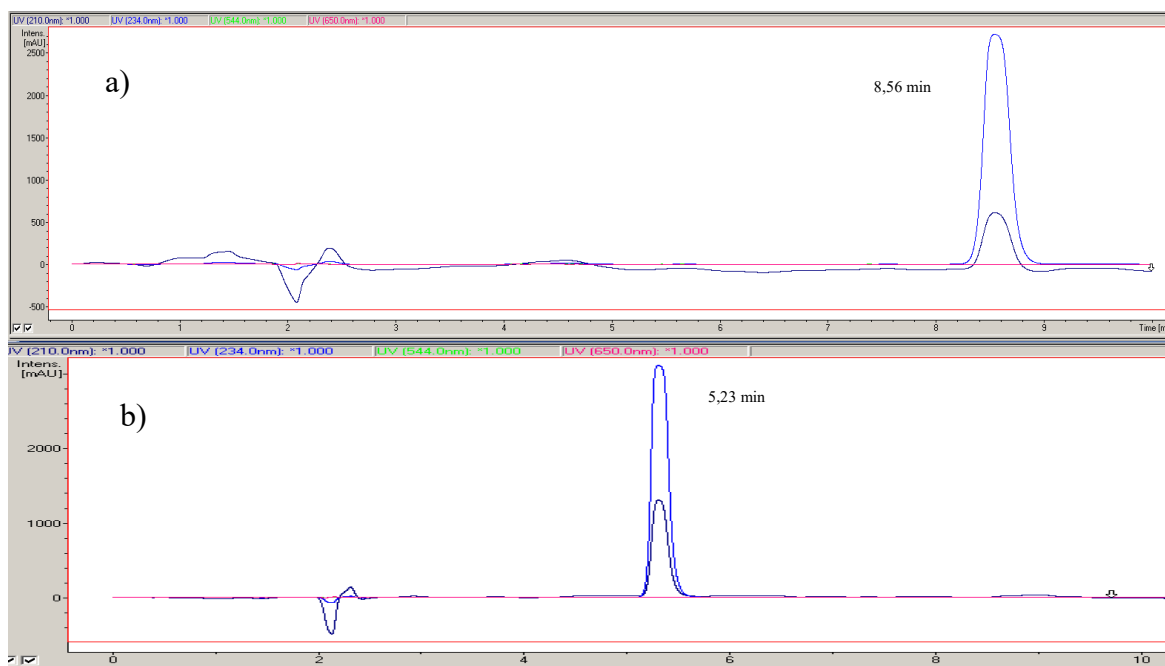


Obrázek 32 Spektrum komplexu (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 60:40

Vzhledem k deprotonaci kyseliny benzoové se přistoupilo na kyselou mobilní fázi, která zabrání této deprotonaci, a měla by vést ke vzniku jednoho píku. Byla proto provedena optimalizace další MF, a to octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou s methanolem. Nejprve se analyzoval komplex pomocí této MF v poměrech 40:60 a 50:50 methanol ku octan amonný.

Nejprve se měřil poměr 40:60, došlo k sjednocení píků a vytvořil se pouze jeden pík o vysoké intenzitě odpovídající dané koncentraci. Bohužel u tohoto poměru byl velmi dlouhý retenční čas, a to 8,56 min (Obr. 33; a)), a proto se vyzkoušel druhý poměr, a to 50:50, z důvodu přidání více polární mobilní fáze (octanu amonného), aby došlo ke zkrácení

retenčního času. Při tomto poměru opravdu došlo ke zkrácení retenčního času, a to na 5,23 min (Obr. 33, b)).



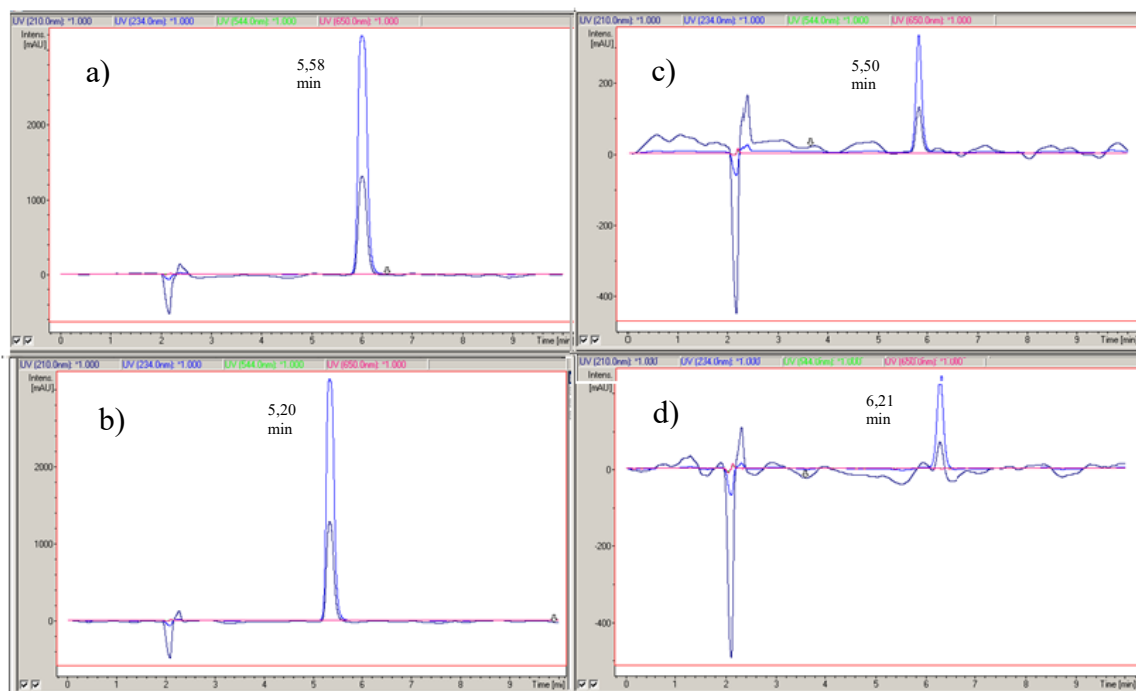
Obrázek 33 Spektrum komplexu 1 (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou v poměrech a) 60:40, b) 50:50

Po získání optimalizované MF pro komplex 1 (Obr. 26) se doměřily ostatní koncentrace tohoto komplexu v poměru 50:50 methanol ku octan amonný, okyselený kyselinou octovou, a z takto získaných koncentrací se vypočítaly příslušné integrály a vytvořila se první kalibrační křivka (Kapitola: Vytvoření kalibračních křivek; graf č. 1). Byla pozorována nižší reprodukovatelnost v naměřeném retenčním čase, což by se dalo odůvodnit stavem kolony (Tab. č. 3).

Koncentrace [mM]	Retenční čas [min]
0,1	6,34
0,25	5,83
0,5	5,72
2,5	5,76
5	5,98

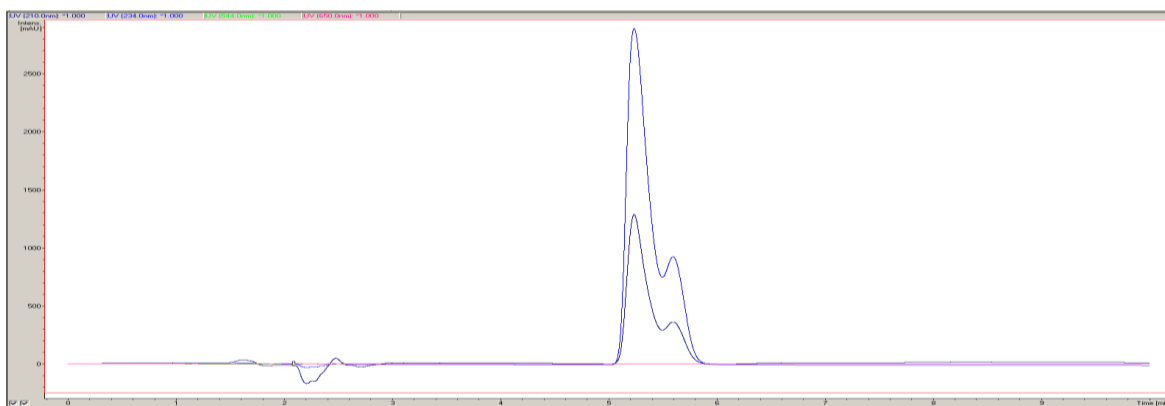
Tabulka 3 Retenční časy komplexu 1 odpovídající daným koncentracím

Byl přeměřen i samotný ligand, kyselina benzoová, v kyselých podmínkách. Zjistilo se, že retenční čas samotného ligandu se od komplexu mírně liší (Obr. 34). Reprodukovatelnost retenčních časů při změně koncentrace obou analytů byla znovu nízká. Závěrem je, že porovnávání retenčních časů u komplexu a ligandu za daných podmínek není relevantní.



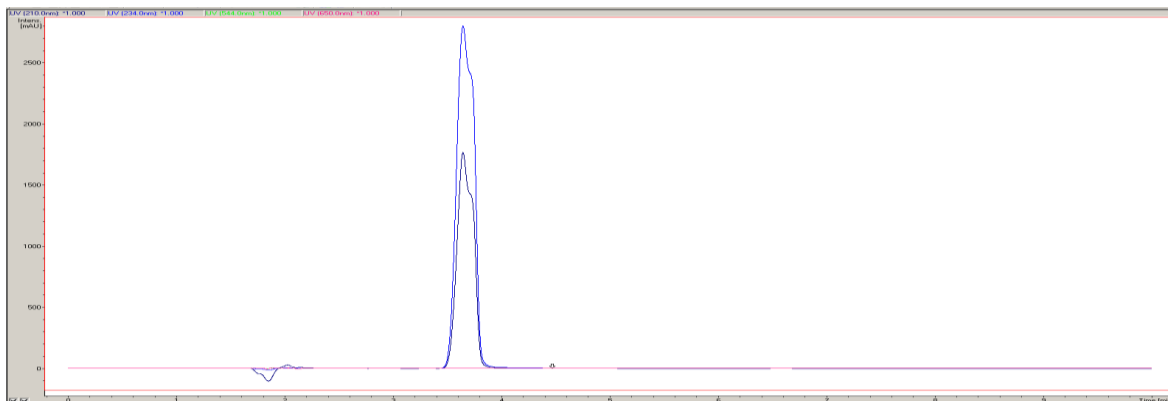
Obrázek 34 Spektra čistého ligandu (kyselina benzoová) a komplexu s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou; a) komplex o koncentraci 5 mM; b) ligand o koncentraci 5mM; c) komplex o koncentraci 0,25 mM; d) ligand o koncentraci 0,25 mM

Během měření postupně začalo docházet k rozkladu píku na dvojpík. I při snížení pH nedošlo k žádné změně (Obr. 35).



Obrázek 35 Spektrum rozloženého komplexu (4 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou

A proto se použil octan amonný, okyselený kyselinou octovou, ale místo methanolu se použil acetonitril v poměru 50:50 (Obr. 36). Bylo prokázáno, že použití acetonitrilu způsobuje vyšší ostrost píků než methanol, a vzniklý dvojpík byl zredukovaný.



Obrázek 36 Spektrum komplexu (4 mM) s použitím MF acetonitril s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou v poměru 50:50

Po těchto nových poznatcích se doměřily zbylé koncentrace tohoto komplexu a vytvořila se druhá kalibrační křivka (Kapitola: Vytvoření kalibračních křivek, graf č. 2). Každý bod v křivce byl naměřen třikrát.

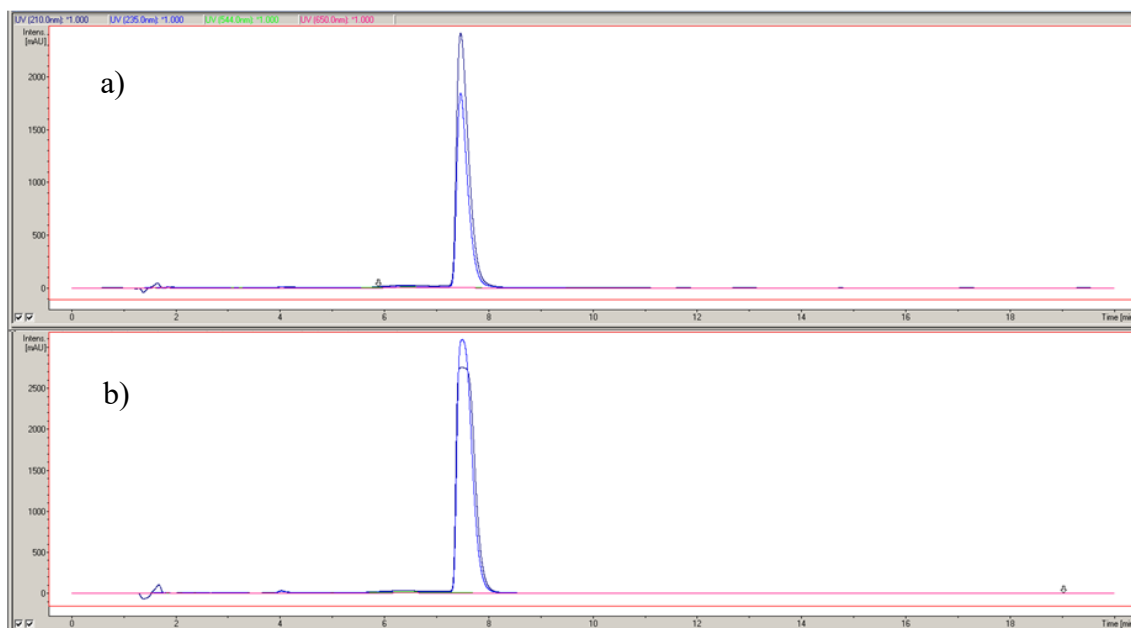
Samotný ligand se za daných podmínek z důvodu změny retenčních časů neměřil.

8.2.2 Optimalizace MF pro komplex 2

Optimalizace MF se zkoušela u čistého ligandu o koncentraci 10 mM a u komplexu CB(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem (Obr. 27) o celkové koncentraci 5 mM.

Nejprve se experimentálně prováděla optimalizace MF octanu amonného s methanolem. U čistého ligandu byly zkoušeny poměry 70:30, 30:70 a 50:50 methanol ku octan amonný. Nejlepší podmínky byly u poměru 50:50, u tohoto poměru byl pík ve spektru velmi ostrý a při vysoké intenzitě (Obr. 37, b)). Stejná MF (50:50) byla testovaná i u komplexu (Obr. 37, a)). Vzhledem na stejné retenční časy ligandu i komplexu, není možné ze spekter určit, zda se jedná o čistý ligand nebo komplex, proto se spoléhá na vysokou konstantu stability ligandů daného typu s CB(7) ($\log K = 6,32$).

Vznikem komplexu jsme si proto jistí a dané podmínky hodnotíme jako vhodné pro optimalizaci.



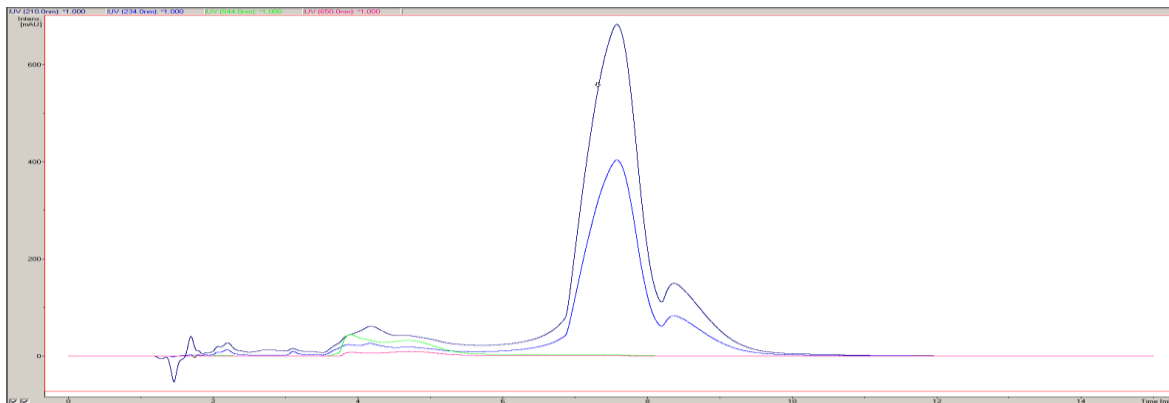
Obrázek 37 a) Spektrum komplexu 2 (5 mM) a b) spektrum ligandu s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50

Po získání optimalizované MF pro komplex 2 (Obr. 27) se doměřily ostatní koncentrace tohoto komplexu, a z takto získaných koncentrací se vytvořila první kalibrační křivka (Kapitola: Vytvoření kalibračních křivek, graf č. 3). Byla pozorována vyšší reprodukovatelnost v naměřeném v retenčním čase (Tab. č. 4), ale retenční čas se shodoval s retenčním časem samotného ligandu (Obr. 35), proto porovnání retenčních času ligandu a komplexu není taktéž relevantní.

Koncentrace [mM]	Retenční čas [min]
0,05	7,40
0,25	7,42
0,5	7,36
2,5	7,52
5	7,43

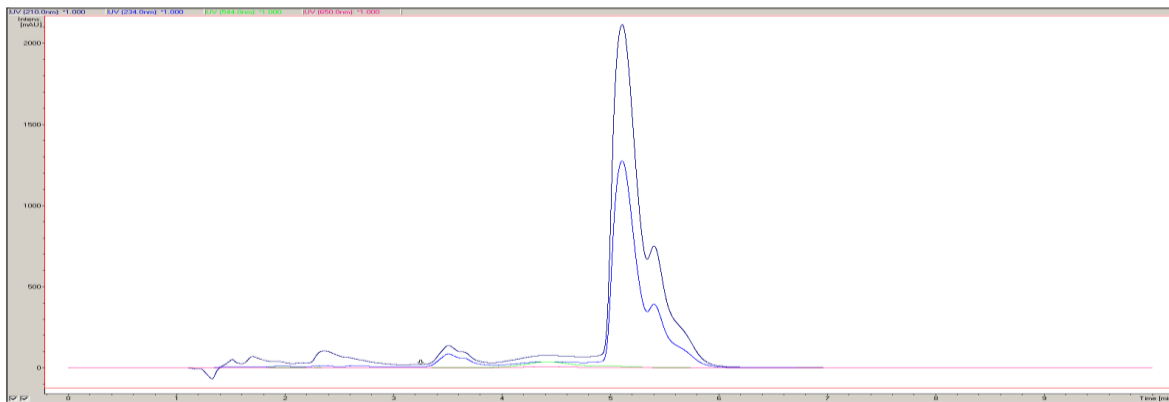
Tabulka 4 Retenční časy komplexu 2 odpovídající daným koncentracím

Při opakovaném měření došlo k rozšíření a zmnožení píku (Obr. 38). To mohlo být způsobené oxidací ligandu. Bohužel, ani po čerstvě připraveném zásobním roztoku ligandu se v dané mobilní fázi nepodařilo experimenty reprodukovat.



Obrázek 38 Spektrum rozloženého komplexu (4 mM) s MF methanolem a octanem amonným

Přistoupilo na otestování jiné MF složené z octanu amonného s acetonitrilem v poměru 50:50 (Obr. 39).



Obrázek 39 Spektrum komplexu (4 mM) s MF acetonitril s octanem amonným v poměru 50:50

Za daných podmínek došlo k zúžení píku dvojpíku, ale samotný dvojpík se nepodařilo zredukovat, jeho intenzita se ale dá zanedbat.

Po těchto nových poznatcích se pomocí mobilní fáze octanu amonného s acetonitrilem doměřily zbylé koncentrace komplexu. Každá z nich se měřila třikrát. Po získání spekter a integrací se vytvořila druhá kalibrační křivka (Kapitola: Vytvoření kalibračních křivek, graf č. 4).

8.3 Vytvoření kalibračních křivek

Kalibrační křivky mají sloužit jako rychlý způsob analýzy čistoty makrocyclických sloučenin.

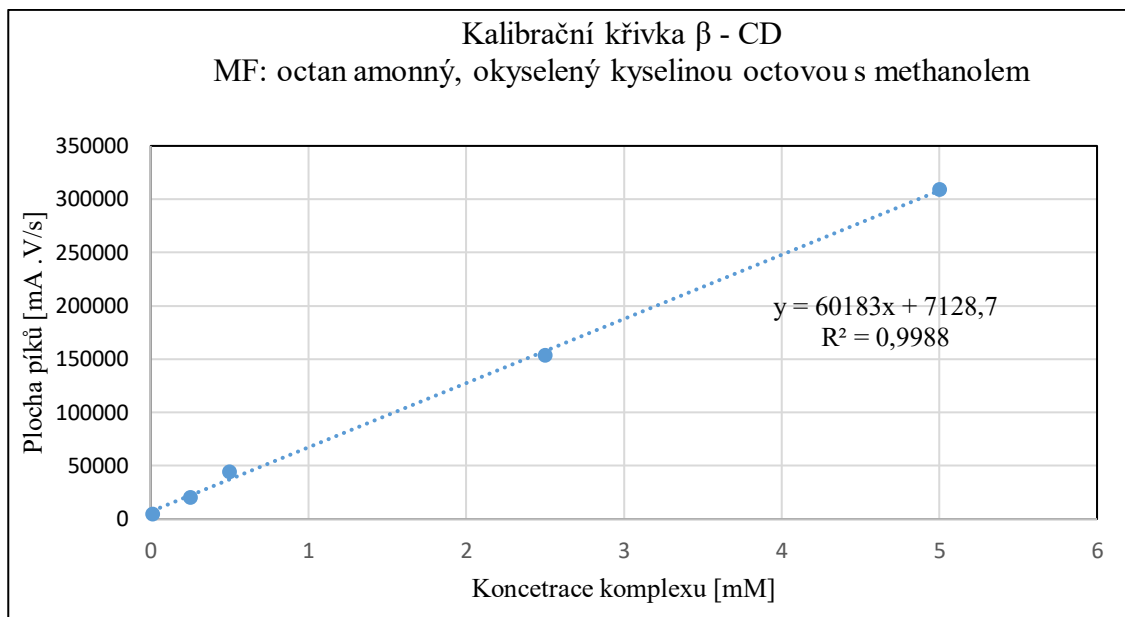
Ze změřených spekter jsou integrovány plochy píků komplexů, a ze získaných integrálů se vytvoří kalibrační křivka odpovídající danému komplexu.

8.3.1 Kalibrační křivka β – CD s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s methanolem v poměru 50:50

Kalibrační křivka tohoto komplexu byla vytvořena z koncentrací komplexu: 5; 2,5; 0,5; 0,25 a 0,01 mmol/l. Plochy píků odpovídající dané koncentraci jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Koncentrace komplexu [mM]	Plocha píků [mA .V/s]
5	309288
2,5	153851
0,5	44295
0,25	20547
0,01	4770

Tabulka 5 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci



Graf 1 Kalibrační křivka β – CD, jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s methanolem

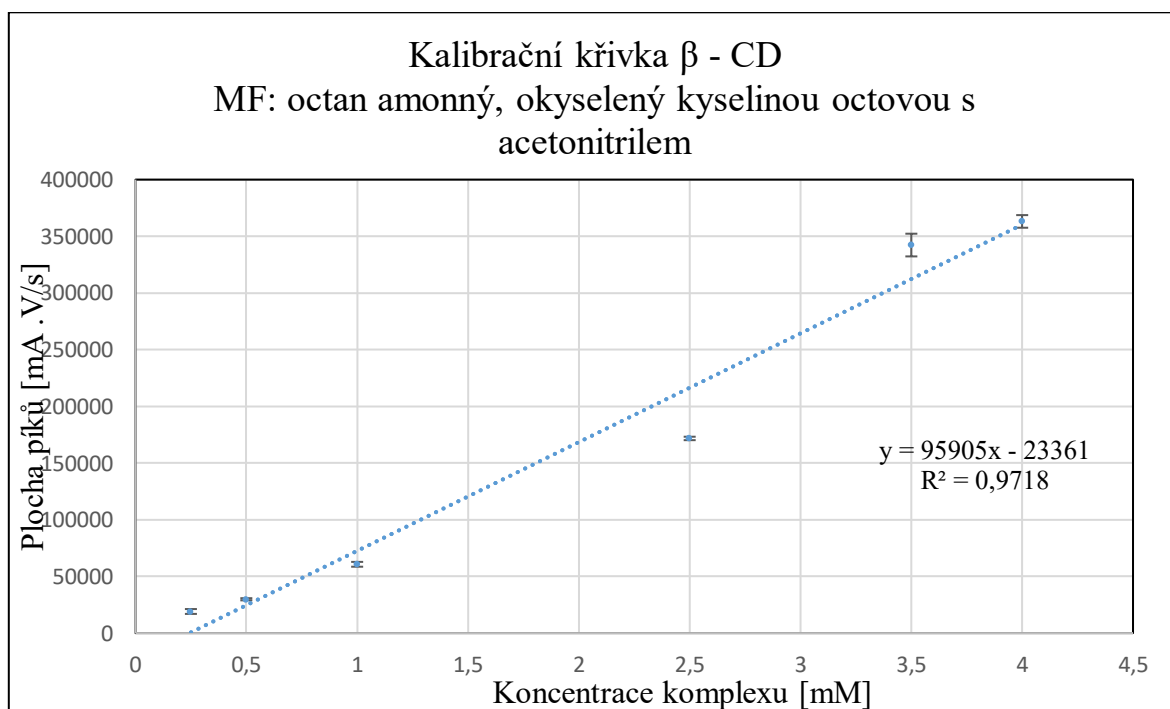
Z grafu (graf č. 1) je možné si všimnout, že hodnota spolehlivosti je 0,9988. Tento graf lze považovat pouze za orientační, protože hodnoty v grafu jsou měřeny jen jednou, to znamená, že při měření jednoho bodu vícekrát by byl graf mnohem přesnější, chyby měření tedy nejsou zahrnuty.

8.3.2 Kalibrační křivka β – CD s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s acetonitrilem v poměru 50:50

Kalibrační křivka tohoto komplexu byla vytvořena z koncentrací komplexu: 4; 3,5; 2,5; 1; 0,5 a 0,25 mmol/l. Plochy píků odpovídající dané koncentraci jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Koncentrace komplexu [mM]	Plocha píků [mA .V/s]
4	356960
3,5	342268
2,5	172897
1	60686
0,5	29839,71
0,25	19084,15

Tabulka 6 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci



Graf 2 Kalibrační křivka β – CD, jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s acetonitrilem

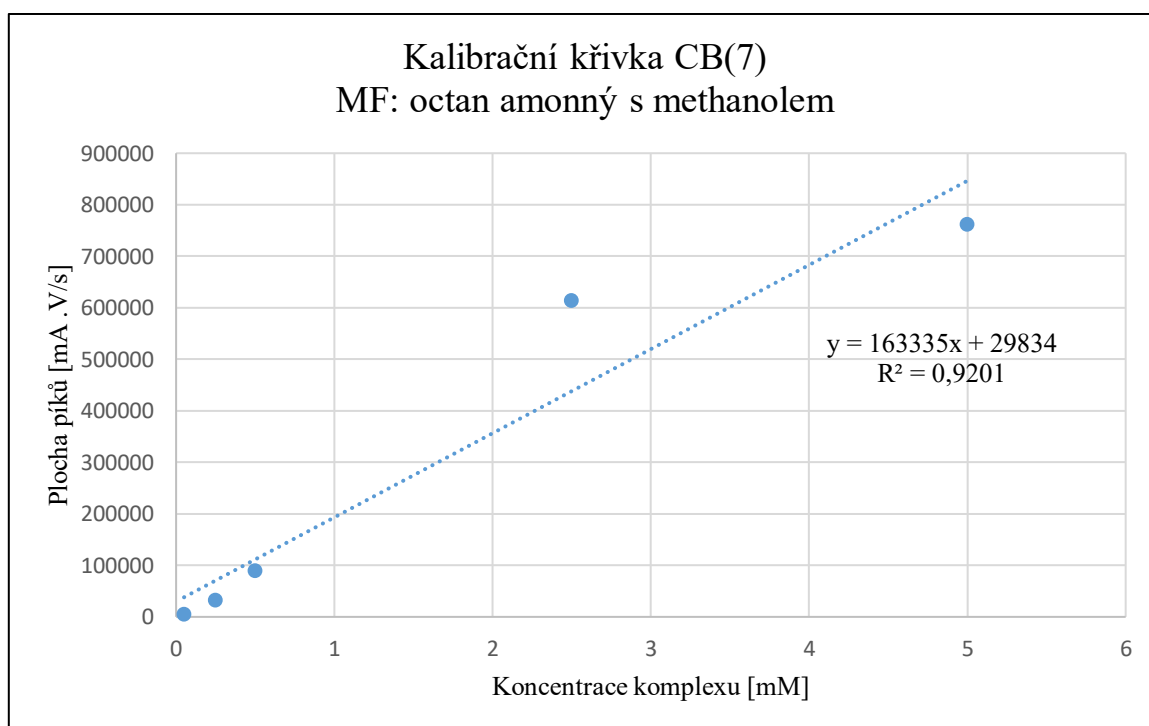
Z grafu (graf č. 2) je možné si všimnout, že hodnota spolehlivosti je 0,9723. Tento graf lze považovat za důvěryhodný, hodnota spolehlivosti je vysoká. Všechny body v kalibrační křivce jsou měřeny třikrát a obsahují směrodatnou odchylku, která je ve většině bodů zanedbatelná, což taktéž indikuje na vysokou spolehlivost měření.

8.3.3 Kalibrační křivka CB(7) s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s methanolem v poměru 50:50

Kalibrační křivka tohoto komplexu byla vytvořena z koncentrací komplexu: 5; 2,5; 0,5; 0,25 a 0,05 mmol/l. Plochy píků odpovídající dané koncentraci jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Koncentrace komplexu [mM]	Plocha píků [mA .V/s]
5	762662
2,5	614674
0,5	89683
0,25	32877
0,05	4958

Tabulka 7 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci



Graf 3 Kalibrační křivka CB(7), jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s methanolem

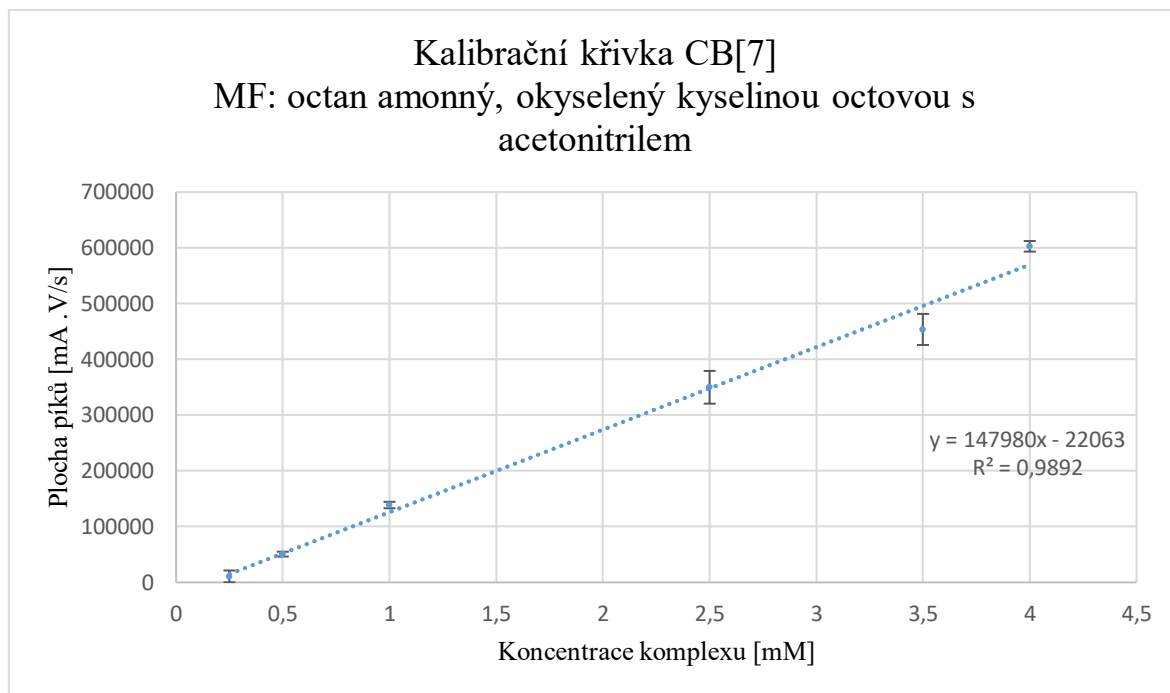
Z grafu (graf č. 3) je možné si všimnout, že hodnota spolehlivosti je 0,9201. Tento graf lze považovat pouze za orientační, protože hodnoty v grafu jsou měřeny jen jednou, to znamená, že při měření jednoho bodu vícekrát by byl graf mnohem přesnější, chyby měření tedy nejsou zahrnuty.

8.3.4 Kalibrační křivka CB(7) s optimalizovanou mobilní fází octanu amonného, okyseleného kyselinou octovou, s acetonitrilem v poměru 50:50

Kalibrační křivka tohoto komplexu byla vytvořena z koncentrací komplexu: 4; 3,5; 2,5; 1; 0,5 a 0,25 mmol/l. Plochy píků odpovídající dané koncentraci jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Koncentrace komplexu [mM]	Plocha píků [mA .V/s]
4	356960
3,5	342268
2,5	172897
1	60686
0,5	29839,71
0,25	19084,15

Tabulka 8 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci



Graf 4 Kalibrační křivka CB(7), jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s acetonitrilem

Z grafu (graf č. 4) je možné si povšimnout, že hodnota spolehlivosti je 0,9892. Tento graf lze považovat za důvěryhodný, hodnota spolehlivosti je vysoká. Všechny body v kalibrační křivce jsou měřeny třikrát a obsahují směrodatnou odchylku, která je u koncentrací 2,5 a 3,5 mM výraznější. Pro zvýšení přesnosti měření, by se tyto koncentrace měly přeměřit znovu.

ZÁVĚR

Supramolekulární chemie zapadá mezi novější studie, a je o ni čím dál větší zájem. U mnoho makrocyclických sloučenin nejsou známy veškeré informace, proto se vědci snaží nalézt nové poznatky a uplatnit je v určitém vědním oboru. Na Ústavu chemie na UTB, se pozornost soustředí na chemii supramolekulárních komplexů, a právě proto bylo cílem této bakalářské práce seznámení se s danou tematikou. V teoretické části této bakalářské práce bylo cílem vypracování rešerše na téma supramolekulární chemie a její využití se zaměřením na potravinářský průmysl. Dále byla tato práce zaměřena na seznámení se s jednou z nejvíce využívaných analytických metod a to HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Rešerše se proto soustředila na teoretický popis metody a získání nových poznatků o využití supramolekulární chemie v HPLC, a to v různých aplikacích.

V praktické části bylo cílem naměřit supramolekulární komplexy pomocí HPLC. Proto bylo nezbytné získat optimální postup pro analýzu vybraných komplexů, konkrétně β – cyklodextrinu s kyselinou benzoovou a cucurbiturilu(7) s ligandem N, N, N', N' – Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem.

Princip měření komplexů na HPLC spočíval v přípravě vzorků, poté v nalezení správné mobilní fáze a následně vytvoření kalibrační křivky z přeměřených koncentračních řad komplexů.

Příprava vzorků nebyla časově náročná. Pro vytvoření komplexu se napipetovalo určité množství makrocyclicku a ligandu pomocí mikropipety do vialky, a poté se provedla filtrace přes mikrofiltr. Takto připravené vzorky se dále měřily na HPLC.

Mnohem složitější bylo objevit podmínky pro reprodukovatelné měření komplexů. Jednalo se o nalezení správné mobilní fáze a přizpůsobení kolony na změnu podmínek. To bylo dosažené několikanásobným opakovaným měřením jednotlivých vzorků při změně mobilní fáze

Pro komplex 1: β – cyklodextrin s kyselinou benzoovou se zkoušely MF – octan amonný s methanolem; octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s methanolem, a octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s acetonitrilem. Po analýze bylo zjištěno, že nejvhodnější mobilní fáze pro tento komplex je octan amonný, okyselený kyselinou octovou, s acetonitrilem v poměru 50:50.

Pro komplex 2: cucurbiturilu(7) s ligandem N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem se zkoušely MF - octan amonný s methanolem a poté se místo methanolu použil acetonitril. Po analýze bylo zjištěno, že nejvhodnější mobilní fáze pro tento komplex je octan amonný s acetonitrilem v poměru 50:50.

Bohužel nelze stanovit směs těchto dvou komplexů z důvodu rozdílných nároků na mobilní fázi, pokud by se taková směs vytvořila, byl by v chromatogramu viděn pouze jeden z komplexů, v závislosti na výběru mobilní fáze.

Z obou komplexů byla následně vytvořena kalibrační křivka.

Závěrem lze říct, že se nám podařilo najít vhodné podmínky na analýzu vybraných supramolekulárních komplexů a taktéž se podařilo vytvořit kalibrační křivky, které mohou sloužit na rychlé stanovení čistoty syntetizovaných mikrocyklů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MÁTLOVÁ, Jana. *Studium tvorby supramolekulárních komplexů azobarviv na bázi adamantanu s cucurbit[n]urily pomocí ESI-MS*. [online]. Zlín, 2020 [cit. 2024-03-20]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
Dostupné z: <https://theses.cz/id/nc9cln/?lang=sk>
- [2] LIPUTAN 6.COM, *Nano Kapsul, Penumpas Kanker* [online]. ©2011 [cit. 2024-02-07].
Dostupné z: <https://www.liputan6.com/health/read/314684/nano-kapsul-penumpas-kanker>
- [3] HOCHREITER, Sepp a CHELBAT, Noura. *Bioinformatics III Structural Bioinformatics and Genome Analysis* [online]. Rakousko, 2007, vol. 3, strana 22 [cit.2024-03-10].
Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/238681799_Bioinformatics_III_Structural_Bioinformatics_and_Genome_Analysis
- [4] YONG, Hou a LINIUN, Zou a QINGLONG, Li a MEIYING, Chen a HAONAN, Ruan a ZHAOCUI, Sun a XUDONG, Xu a JUNSHAN, Yang a GUOXU, Ma. *Supramolecular assemblies based on natural small molecules: Union would be effective* [online]. 2022, vol. 15. strana 2 [cit. 2024-02-20]. ISSN 2590-0064.
Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/361329113_Supramolecular_assemblies_based_on_natural_small_molecules_Union_would_be_effective
- [5] RUIZ-HITZKY, Eduardo a CASAL, B. *Crown ether intercalations with phyllosilicates*. *Nature* [online]. 1978, s 596–597 [cit. 2024-02-18].
Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/276596a0>
- [6] HUANG, Feihe a ANSLYN, Eric V. *Introduction: Supramolecular Chemistry*. *Chemical Reviews* [online]. 2015, vol. 115, no. 15, s 6999–7000 [cit. 2024-02-18]. ISSN 0009-2665

- [7] CHEM IS YOU.BLOGSPOT.COM, *Design and Synthesis of Self-Assembled Metal Cage Complex* [online]. ©2016 [cit. 2024-02-17].
Dostupné z: <https://chem-is-you.blogspot.com/2016/06/a-new-generation-of-supramolecular.html>
- [8] MEJUTO, Juan C. a SIMAL-GANDARA, Jesus. Host-Guest Complexes. *International journal of molecular sciences*. [online]. 2022. [cit. 2024-02-18].
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms232415730>
- [9] ENDERESOVÁ, Markéta. *Molekulární klipsa vycházející z glykolurilu* [online]. Zlín, 2020 [cit. 2024-03-15]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
Dostupné z: <https://theses.cz/id/fvu0av/?lang=cs>
- [10] CONTAKES, Stephen M. Host-Guest Chemistry and π - π Stacking Interactions. *LibreTexts chemistry*. [online]. [cit. 2024-03-17].
Dostupné z:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Inorganic_Chemistry_\(LibreTexts\)/06%3A_Acid-Base_and_Donor-Acceptor_Chemistry/6.05%3A_Intermolecular_Forces/6.5.01%3A_Host-Guest_Chemistry_and_-_stacking_interactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Inorganic_Chemistry_(LibreTexts)/06%3A_Acid-Base_and_Donor-Acceptor_Chemistry/6.05%3A_Intermolecular_Forces/6.5.01%3A_Host-Guest_Chemistry_and_-_stacking_interactions)
- [11] ZATLOUKAL, Filip. *Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií v analýze potravin*. [online]. Zlín, 2015 [cit. 2024-03-20]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
Dostupné z: <https://theses.cz/id/jrv76x/?lang=en>
- [12] XING, Ma a YANLI, Zhao. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chemical Reviews*. [online]. 2015, vol. 115, no. 15, s 7794-7839. [cit. 2024-02-20].
Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500392w>
- [13] SKOOG, A. Douglas, WEST M. Donald, HOLLER, F. James, CROUCH, R. Stanley. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2019, s 833-851. Kapitola 33 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. ISBN 978-80-7592-043-0.

- [14] BAČINA, Aleš a BUDAYOVÁ, Eva a VOKATÁ, Soňa. HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). In: *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové* [online]. [cit. 2024-02-20].
Dostupné z: <https://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>.
- [15] KRÍŽEK, Martin a ŠÍMA, Jan. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2015, s. 188-195. Kapitola 18.4. Kapalinová chromatografie. ISBN 978-80-7394-486-5 (brož.)
- [16] TURČANOVÁ, ANNA. *Vývoj UHPLC – DAD metody na separaci fenolických látek z rostlinného materiálu a optimalizace jejich extrakce*. [online]. Hradec Králové, 2023 [cit. 2024-03-20]. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/180365>
- [17] H A SCIENTIFIC& CHEMICALS. *Bottles for HPLC with Connection Systéms* [online]. [cit. 2024-02-22].
Dostupné z: <https://www.hascindia.com/bottles-for-hplc-with-connection-systems.html>
- [18] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavko, 2016, 3. vydání, s 9-25. Kapitola 4 CHROMATOGRRAFIE. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [19] LABRULEZ. *21. Škola hmotnostní spektrometrie: Nové HPLC/UHPLC kolony ARION*. [online]. [cit. 2024-03-07].
Dostupné z: <https://gcms.cz/article/666>.
- [20] HPST.CZ. *Předkolony, filtry*. [online]. [cit. 2024-03-07].
Dostupné z: <https://hpst.cz/kapalinova-chromatografie-prislusenstvi/hplc-uhplc-kolony-predkolony-filtry/predkolony-filtry#>.
- [21] DOUŠA, Michal. Typy detektorů v HPLC. In: *Česká chromatografická škola*. [online]. [cit. 2024-03-07].
Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html
- [22] ZVĚŘINA, Ondřej. *UV VIS spektrometrie* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2017. [cit. 2024-02-07].
Dostupné z:
https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/BVCP0222c/um/UV_Vis_spektrometrie.pdf

- [23] CVAČKA, Josef. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2010. [cit. 2024-02-28].
Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [24] ÚSTAV POČÍTAČOVÉ A ŘÍDICÍ TECHNIKY. *Turbidimetry a nefelometry*. [online]. ©2016 VŠCHT Praha. [cit. 2024-03-07].
Dostupné z: <https://uprt.vscht.cz/kminekm/mrt/F4/F4k46-sloz.htm>
- [25] HOLUBOVÁ, Monika. *Vývoj/validace HPLC analytické metody pro stanovení mirtazapinu v biologické matrici*. [online] Brno, 2019 [cit. 2024-03-20].
Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Dostupné z: <https://theses.cz/id/1vmgmo/?lang=en>
- [26] BITTOVÁ, Miroslava. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013. [cit. 2024-03-20].
Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf 24
- [27] DOUŠA, Michal. *Vyhodnocování výsledků v HPLC* [online]. Praha: Česká chromatografická škola, 2019. [cit. 2024-02-20].
Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/evaluation_HPLC.html#_top
- [28] COUFAL, Petr. *Separáční (dělicí) metody*. [online]. Praha: Univerzita Karlova, 1996. [cit. 2024-02-16].
Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [29] POULSON, B.G. a ALSULAMI, Q.A. a SHARFALDDIN, A. a EL AGAMMY, E.F. a MOUFFOUK, F. a EMWAS, A.-H. a JAREMKO, L. a JAREMKO, M. *Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications. Polysaccharides* [online]. 2022, no. 3, s 1-31. [cit. 2024-03-16].
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>
- [30] DANĚK, Alois. *Využití HPLC v chirálních separacích IV*. [online]_Hradec Králové, 2019 [cit. 2024-03-22]. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
Dostupné z:
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/110000/120346696.pdf?sequence=1>

- [31] GIANI, Linde a LAVERDE, Andrea a COLAUTO, Antonio a BARROS, Nelson. Changes to Taste Perception in the Food Industry: Use of Cyclodextrins *Handbook of Behavior, Food and Nutrition* [online]. 2011, s 99-118. [cit. 2024-03-22].
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/263846166_Changes_to_Taste_Perception_in_the_Food_Industry_Use_of_Cyclodextrins
- [32] HROMÁDKOVÁ, Aneta. *Syntéza a studium supramolekulárních vlastností homoditopických ligandů na bázi adamantylovaných bipyridiniových solí* [online]. Zlín, 2018 [cit. 2024-03-22]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta.
Dostupné z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/42080>
- [33] KURKOV, Sergey V. a LOFTSSON, Thorsteinn. *Cyclodextrins* [online]. ©2012 PubMed Disclaimer. [cit. 2024-03-14].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771733/>
- [34] HAVELKA, Ondřej. *Cyklodextriny: Malé molekuly s velkým využitím. IQ LANDIA* [online]. 16. 6. 2023. [cit. 2024-03-07].
Dostupné z: <https://iqlandia.cz/iqblog/cyklodextriny-male-molekuly-s-velkym-vyuzitim>
- [35] MATENCIO, A. a NAVARRO-ORCAJADA, S. a GARCÍA-CARMONA, F. a LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. Applications of cyclodextrins in food science. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020. [cit. 2024-02-07].
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224420305677>
- [36] SURMOVÁ, Heda. *Cyklodextriny a jejich aplikace v potravinářství*. [online]. Zlín, 2014 [cit. 2024-03-22]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta.
- [37] FUNK, Sebastian. a SCHATZ, Jürgen. Cucurbiturils in supramolecular catalysis. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [online]. 2020, vol. 96, s 1-27. [cit. 2024-03-12].
Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10847-019-00956-0>

- [38] CHEMEUROPE. *Cucurbituril* [online]. [cit. 2024-04-07].
Dostupné z: <https://www.chemeurope.com/en/encyclopedia/Cucurbituril.html>
- [39] ŠVEC, Jan. *Supramolekulární komplexy cucurbit[n]urilů pro přípravu koordinačních polyrotaxanů*. [online]. Brno, 2006 [cit. 2024-02-22]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
Dostupné z: <https://theses.cz/id/33xd7m/>
- [40] BARROW, Steven J. a KASERA, Setu a ROWLAND, Matthew J. a DEL BARRIO, Jesús a SCHERMAN, Oren A. *Cucurbituril-Based Molecular Recognition* [online]. © 2015 American Chemical Society, vol. 115, s 12320–12406 [cit. 2024-03-22].
Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00341>
- [41] SURMOVÁ, Heda. *Příprava nesymetrických bisimidazoliových solí* [online]. Zlín, 2016 [cit. 2024-04-07]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta.
Dostupné z:
https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/37755/surmov%C3%A1_2016_dp.pdf?sequence=1
- [42] CICOLANI, Renato Salviato a SOUZA, Lilian Rodrigues Rosa a DE SANTANA DIAS, Giovanni Batista. Cucurbiturils for environmental and analytical chemistry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [online]. 2020, vol. 99, s 1-12 [cit. 2024-04-02].
Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10847-020-00999-8>
- [43] KARAMI Hassan. Heavy metal removal from water by magnetite nanorods. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2013, vol. 219, s 209-216 [cit. 2024-04-02].
Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894713000624>
- [44] MATENCIO, Adrián a BERMEJO-GIMENO, Mario J., GARCÍA-CARMONA, Francisco, LÓPEZ-NICOLÁS, José Manuel. Separating and Identifying the Four Stereoisomers of Methyl Jasmonate by RP-HPLC and using Cyclodextrins in a Novel Way. *Phytochemical Analysis* [online]. 2017, vol. 28, strana 151-158 [cit. 2024-03-02].

Dostupné z:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2654>

- [45] DOUŠA, Michal. *Chirální separace* [online]. Praha: Česká chromatografická škola, 2019. [cit. 2024-03-20].

Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/evaluation_HPLC.html#_top

- [46] KREJČA, Marek. *Studium chirální separace vybraných sloučenin s axiální chiralitou* [online]. Olomouc, 2022 [cit. 2024-04-05]. Diplomová práce.

Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta.

Dostupné z: <https://theses.cz/id/xf5110/?lang=en>

- [47] XIAOXUAN, Li a XIAOBIN, Yao a YIN Xiao a YONG Wang. Enantioseparation of single layer native cyclodextrin chiral stationary phases: Effect of cyclodextrin orientation and a modeling study. [online]. 2017, vol. 990, strana 174 – 184. [cit. 2024 – 03 - 06]. ISSN 0003-2670

Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017308371?via%3Dihub>

- [48] SHAMSUL AZIM KHAN, Muhammad. *Modified cucurbit[n]urils: Synthesis and supramolecular interactions* [online]. Brno, 2012 [cit. 2024-03-05].

Disertační Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

Dostupné z: <https://theses.cz/id/p605eo/?lang=en>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
CD	Cyklodextrin
CB	Cucurbituril

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 a) příklad supramolekulárního komplexu složeného ze dvou pyrenbutyrových kyselin (modrá struktura) navázaných pomocí vodíkových můstků uvnitř hexamerní nanokapsle složené ze 6 – hexylpyrogalloareňů [2]; b) Přehled nekovalentních interakcí [3]	11
Obrázek 2 Specifické makroskopické systémy [4].....	12
Obrázek 3 Crown ethery [5].....	12
Obrázek 4 Donald J. Cramov, Jean-Marie Lehnov a Charles J. Pedersen [7]	13
Obrázek 5 Princip hostitel – host [10].....	14
Obrázek 6 Vybraní zástupci hostitelských molekul (cyklodextriny, kalixareny, cucurbiturily) [11].....	14
Obrázek 7 Využití v oboru [12].....	15
Obrázek 8 Interakce enzymu se substrátem [8].....	15
Obrázek 9 Schéma HPLC [16]	16
Obrázek 10 Závislost odezvy detektoru na retenčním čase [28].....	17
Obrázek 11 Zásobník MF [17]	17
Obrázek 12 Kolony pro HPLC [19].....	19
Obrázek 13 Předkolona [20].....	20
Obrázek 14 Schéma fotometrického detektoru [22]	20
Obrázek 15 Schéma refraktometrického detektoru [24]	21
Obrázek 16 Schéma fluorescenčního detektoru [25]	21
Obrázek 17 Struktura jednotlivých CD(n) [29].....	24
Obrázek 18 Znázornění struktury CD[n] [31]	25
Obrázek 19 Využití CD(n) k dosažení organoleptických vlastností a k výrobě „free“ produktů [35]	27
Obrázek 20 Aplikace CD v potravinářských obalech [35].....	27
Obrázek 21 Vlevo: Syntéza prvního cucurbiturilu CB(6). Vpravo: Ilustrace dýňovité struktury CB(n) [37].....	28
Obrázek 22 Krystalová struktura některých cucurbiturilů [39].....	29
Obrázek 23 Syntéza CB(n).....	30
Obrázek 24 Příklad chirálních molekul (enantiomerů) - zrcadlové obrazy, které jsou vzájemně neztotožnitelné [45]	31
Obrázek 25 Ukázka chirální separace S,R-flavonu pomocí CD navázaného na stacionární fázi [47].....	32
Obrázek 27 Komplex 2 – CB(7) s N, N, N', N' - Tetramethyl – p – phenylen – diaminem dihydrochloridem.	34
Obrázek 26 Komplex 1–β – CD s kyselinou benzoovou	34

Obrázek 28 Chromatograf Dionex Ultimate 3000.....	36
Obrázek 29 Spektrum čistého ligandu (10 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50	43
Obrázek 30 Spektrum čistého ligandu (10 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 60:40	43
Obrázek 31 Spektrum komplexu (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50	44
Obrázek 32 Spektrum komplexu (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 60:40	44
Obrázek 33 Spektrum komplexu (5 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou v poměrech a) 60:40, b) 50:50	45
Obrázek 34 Spektra čistého ligandu (kyselina benzoová) a komplexu s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou; a) komplex o koncentraci 5 mM; b) ligand o koncentraci 5mM; c) komplex o koncentraci 0,25 mM; d) ligand o koncentraci 0,25 mM.....	46
Obrázek 35 Spektrum rozloženého komplexu (4 mM) s použitím MF methanol s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou.....	46
Obrázek 36 Spektrum komplexu (4 mM) s použitím MF acetonitril s octanem amonným, okyselený kyselinou octovou v poměru 50:50.....	47
Obrázek 37 a) Spektrum komplexu (5 mM) a b) spektrum ligandu s použitím MF methanol s octanem amonným v poměru 50:50	48
Obrázek 38 Spektrum rozloženého komplexu (4 mM) s MF methanolem a octanem amonným	49
Obrázek 39 Spektrum komplexu (4 mM) s MF acetonitril s octanem amonným v poměru 50:50	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Koncentrace vzorků komplexu 1 pro měření pomocí HPLC.....	39
Tabulka 2 Koncentrace vzorků komplexu 2 pro měření pomocí HPLC.....	40
Tabulka 3 Retenční časy komplexu odpovídající daným koncentracím.....	45
Tabulka 4 Retenční časy komplexu odpovídající daným koncentracím.....	48
Tabulka 5 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci.....	50
Tabulka 6 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci.....	52
Tabulka 7 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci.....	53
Tabulka 8 Naměřené plochy píků odpovídající dané koncentraci.....	54

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka β – CD, jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s methanolem.....	51
Graf 2 Kalibrační křivka β – CD, jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s acetonitrilem.....	52
Graf 3 Kalibrační křivka CB(7), jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s methanolem.....	53
Graf 4 Kalibrační křivka CB(7), jako mobilní fáze: octan amonný, okyselený kyselinou octovou s acetonitrilem.....	55

