

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza optických zjasňovacích prostředků pomocí kapalinové chromatografie

Bc. Petra Komenská

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Komenská**  
Osobní číslo: **C16542**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Analýza optických zjasňovacích prostředků pomocí kapalinové chromatografie**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části práce popište principy kapalinové chromatografie a nejčastěji používané fázové systémy. Vyhledejte a rešeršně zpracujte práce pojednávající o optických zjasňovacích prostředcích, jejich vlastnostech, využití a možností analýz těchto látek.
2. Experimentálně ověřte možnosti separace vybraných standardů optických zjasňovačů na bázi sulfonovaných stilbenů (Leucophor) v systému s obrácenými fázemi a v chromatografii hydrofilních interakcí. Optimalizujte podmínky analýzy s cílem dosáhnout co nejlepší separace standardů. Proveďte analýzy optických zjasňovačů ve vyluzích z vybraných papírenských výrobků.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

**Ing. Jana Váňová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na mojí práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2018

Bc. Petra Komenská

#### Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala především mému vedoucímu diplomové práce, Doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za cenné odborné rady, praktické připomínky, trpělivost a ochotu při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Janě Váňové, Ph.D. V neposlední řadě patří poděkování také celé rodině za finanční i psychickou podporu při studiu a samozřejmě i všem svým přátelům.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je věnována analýze optických zjasňovacích prostředků pomocí kapalinové chromatografie. Cílem této práce byla analýza optických zjasňovačů na bázi stilbenu včetně optimalizace dělení těchto látek ve směsi. Dále byla pomocí hmotnostní spektrometrie navržena struktura těchto látek. Tyto optické zjasňovače byly následně analyzovány v reálných vzorcích výluhů ze dvou typů obalů z recyklovaného papíru a ve výluhu kancelářského papíru.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Optické zjasňující prostředky, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, recyklovaný papír.

## **TITLE**

Analysis of optical brightening agents using liquid chromatography

## **ANNOTATION**

The thesis is devoted to the analysis of optical brightening agents using liquid chromatography. The aim of this thesis was to analyze optical brighteners based on stilbene including the optimization of the separation of these substances in the mixture. Further, the structure of these substances was proposed by mass spectrometry. These optical brighteners were analyzed in extracts of real samples from two types of recycled paper packaging and in the leachate of office paper.

## **KEYWORDS**

Optical brightening agents, liquid chromatography, mass spectrometry, recycled paper

# OBSAH

ÚVOD .....	13
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1. UV-VIS SPEKTROMETRIE.....	14
1.2. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	14
1.2.1. CHARAKTERISTIKA .....	15
1.2.2. INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ.....	15
1.2.3. ČERPADLA V HPLC.....	16
1.2.4. DÁVKOVÁNÍ VZORKU .....	17
1.2.5. DETEKTORY V HPLC.....	18
1.2.6. KOLONY A STACIONÁRNÍ FÁZE .....	20
1.2.7. CHROMATOGRAFIE S NORMÁLNÍMI FÁZEMI .....	23
1.2.8. CHROMATOGRAFIE S REVERZNÍMI FÁZEMI.....	24
1.2.9. HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRAFIE.....	24
1.2.10. CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY .....	25
1.2.11. GRADIENTOVÁ ELUCE.....	26
1.3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	26
1.3.1. CHARAKTERISTIKA .....	26
1.3.2. INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ.....	27
1.3.3. IONTOVÉ ZDROJE .....	27
1.3.4. HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY .....	30
1.3.5. DETEKTORY.....	32
1.4. SPOJENÍ HPLC-MS.....	32
1.5. OPTICKÉ ZJASŇOVACÍ PROSTŘEDKY .....	33
1.5.1. DEFINICE .....	33
1.5.2. LEUCOPHOR AL, UKO, SAC .....	35
1.5.3. STANOVENÍ OPTICKÝCH ZJASŇOVACÍCH PROSTŘEDKŮ.....	35
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
2.1. CHEMIKÁLIE.....	38
2.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	38
2.3. PRACOVNÍ POSTUPY.....	39
2.3.1. PŘÍPRAVA STANDARDŮ .....	39
2.3.2. PŘÍPRAVA REÁLNÝCH VZORKŮ.....	39
2.3.3. MĚŘENÍ SPEKTER NA UV-VIS SPEKTROMETRII .....	39
2.3.4. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	39

2.3.5.	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE VE SPOJENÍ S MS DETEKČÍ .....	42
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	43
3.1.	VÝBĚR VHODNÉ VLNOVÉ DÉLKY POMOCÍ UV-VIS SPEKTROMETRIE .....	43
3.2.	SEPARACE POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE .....	43
3.2.1.	SEPARACE V SYSTÉMU S OBRACENÝMI FÁZEMI .....	43
3.2.2.	SEPARACE V HILIC SYSTÉMU .....	46
3.2.3.	ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII .....	50
3.3.	URČENÍ MS SPEKTER STANDARDŮ .....	50
3.4.	ANALÝZY LC-MS .....	55
4.	ZÁVĚR .....	61
5.	LITERATURA .....	62
	PŘÍLOHY .....	65



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Schéma spektrofotometru [6].....	14
Obrázek 2 - HPLC instrumentace [9] .....	16
Obrázek 3 -Schéma dávkovacího ventilu s vnější smyčkou (A) a s vnitřní smyčkou (B) [12]	18
Obrázek 4 - Funkční skupiny na povrchu silikagelu [17].....	21
Obrázek 5 – Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu [19] .....	22
Obrázek 6 - Schéma hmotnostního spektrometru [39] .....	26
Obrázek 7 - Chemická ionizace APCI [43] .....	28
Obrázek 8 - Schéma ionizace v elektrospreji [43].....	29
Obrázek 9 - Schéma trojitého kvadrupólu [43] .....	31
Obrázek 10 – Segmentový kvadrupól [43].....	32
Obrázek 11 – Vstupní a výstupní elektroda [43] .....	32
Obrázek 12 - Příklad spojení HPLC/MS s ionizací elektrosprejem a iontovou pastí [43] .....	33
Obrázek 13 - Druhy optických zjasňovacích prostředků [48] .....	35
Obrázek 14 - Grafy gradientů 1-6 použitých při měření v HILIC systému.....	41
Obrázek 15 - Grafy gradientů 7-13 použitých při měření v HILIC systému.....	41
Obrázek 16 - Grafy gradientů A a B použitých při měření v systému s obrácenými fázemi ...	41
Obrázek 17 - Závislost absorbance na vlnové délce při měření UV-VIS spektra standardů....	43
Obrázek 18 - Graf závislosti log k na objemovém zlomku acetonitrilu isokratického měření v systému s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-voda .....	45
Obrázek 19 - Graf závislosti log k na objemovém zlomku vodné fáze isokratického měření v HILIC systému na OH5 koloně .....	49
Obrázek 20 - Graf závislosti log k na log objemového zlomku vodné fáze isokratického měření v HILIC systému na OH5 koloně .....	49
Obrázek 21 - MS spektrum disulfonovaného optického zjasňovače .....	50
Obrázek 22 - MS/MS spektrum disulfonovaného optického zjasňovače .....	51
Obrázek 23 - Schéma hypotetických ztrát disulfonovaného optického zjasňovače .....	52
Obrázek 24 - MS spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače .....	52
Obrázek 25 - MS/MS spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače .....	53
Obrázek 26 - Schéma hypotetických ztrát tetrasulfonovaného optického zjasňovače .....	54
Obrázek 27 - MS spektrum hexasulfonovaného optického zjasňovače .....	55

Obrázek 28 - UV spektrum disulfonovaného optického zjasňovače .....	56
Obrázek 29 - UV spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače .....	56
Obrázek 30 - UV spektrum hexasulfonovaného optického zjasňovače .....	57
Obrázek 31 - UV spektrum výluhu z šedého kartónu.....	57
Obrázek 32 - MS spektrum výluhu z šedého kartónu.....	58
Obrázek 33 - UV spektrum výluhu z bílého kartónu.....	58
Obrázek 34 - MS spektrum výluhu z bílého kartónu.....	59
Obrázek 35 - UV spektrum výluhu z kancelářského papíru .....	59
Obrázek 36 - MS spektrum výluhu z kancelářského papíru .....	60

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - použité kolony .....	38
Tabulka 2 - tabulka použitých gradientů. Gradienty označené číslicí se používaly v HILIC systému, zatímco gradienty označené písmenem byly použity v systému s obrácenými fázemi. Mobilní fáze A se měnila, B je vždy acetonitril. Hodnoty ve sloupcích A a B vyjadřují objemové % dané složky mobilní fáze. ....	40
Tabulka 3 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na amidové koloně v systému s obrácenými fázemi .....	44
Tabulka 4 - Retenční faktory standardů isokratických analýz v systému s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-voda.....	45
Tabulka 5 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na koloně HILIC Kinetex v systému HILIC.....	47
Tabulka 6 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na koloně OH5 v systému HILIC .....	48
Tabulka 7 - Retenční faktory disulfonovaného a tetrasulfonovaného standardu isokratických analýz v HILIC systému na koloně OH5.....	48

## SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace elektrickým výbojem
APPI	Chemická ionizace působením UV záření
DART	Chemická ionizace desorpcí nestabilním plynem
DESI	Chemická ionizace desorpcí elektrosprejem
ESI	Chemická ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
MALDI	Chemická ionizace desorpcí laserem
MRM	Sledování vybraných reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
PGC	Porézní grafitový uhlík
QqQ	Trojité kvadrupól
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SIM	Sledování vybraného iontu
TOF	Analyzátor doby letu
UV-VIS	Ultrafialové – viditelné

## ÚVOD

Optické zjasňující prostředky jsou látky, používané především do recyklovaných papírů pro dodání bělosti těmto produktům. Látky přidávané do papírenských výrobků absorbují záření v oblasti UV a mají fluorescenční emise v rozsahu 400-500 nm, čímž překryjí přirozenou nažloutlou až hnědou barvu absorbující právě v tomto rozsahu vlnových délek. V současnosti se používá na 400 různých optických zjasňovačů.

Tato diplomová práce se zabývá stanovením optických zjasňujících prostředků na bázi stilbenu používaných v recyklovaných papírech. Práce vznikla ve spolupráci s firmou Huhtamaki (Příbraslavice, Česká republika). Měření proběhlo také ve vyluzích reálných vzorků, a to ve dvou vzorcích kartonových obalů potravin a v kancelářském papíru. Měření probíhalo na kapalinové chromatografii s UV detektorem v systému s obrácenými fázemi a HILIC systému, pro návrh struktury látek byla použita hmotnostní spektrometrie.

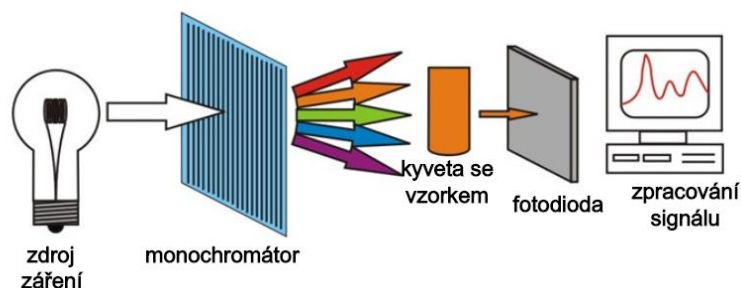
# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. UV-VIS SPEKTROMETRIE

UV-VIS spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, jež se řadí mezi molekulovou absorpční spektrometrii. UV-VIS spektrometrie pracuje v rozsahu vlnových délek od 200 nm do 800 nm [1-3]. Pracuje na principu měření energie, kterou vzorek (látka) pohltí při průchodu záření. Měřením získáváme spektra, vyjadřující závislost absorbance na vlnové délce. Právě absorpcí elektromagnetického záření molekulou dochází ke změně v elektronovém stavu látky, čímž dochází k elektronovým přechodům. Měření absorbance vychází z Bouguerova-Lambertova-Beerova zákona, vyjadřující závislost absorbance na koncentraci látky ( $c$ ), tloušťce kyvety ( $d$ ) a molárního absorpčního koeficientu ( $\epsilon$ ), který je daný pro jednotlivé látky.

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \quad (1)$$

Platnost tohoto zákona je však omezena na zředěné roztoky. Tvzení, že molární absorpční koeficient je nezávislý na koncentraci se vztahuje pouze na roztoky do koncentrace  $10^{-2}$  mol/l. U koncentrovanějších roztoků je tento koeficient závislý na indexu lomu [4,5]. Schéma spektrometru pro UV-VIS je uvedeno na obr. 1.



Obrázek 1 - Schéma spektrofotometru [6]

## 1.2. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kapalinová chromatografie používá jako mobilní fázi kapalinu a stacionární fází je tuhá látka. Zde však o separaci nerozhoduje pouze afinita analytu k stacionární fází, jak tomu je u plynové chromatografie, ale svou roli hraje i použití mobilní fáze. Dle uspořádání stacionární fáze můžeme rozlišit chromatografii kolonovou, tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografií. V této diplomové práci se zabývám pouze kapalinovou chromatografií kolonovou.

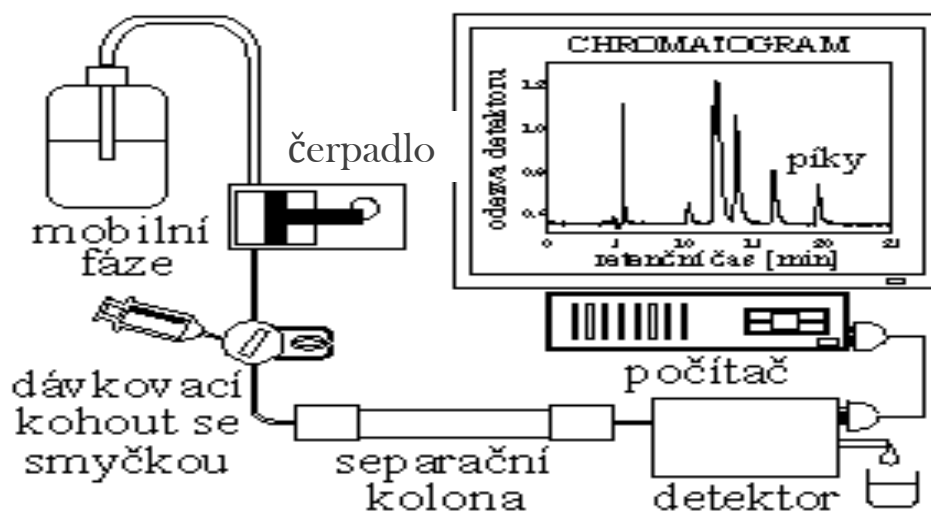
### 1.2.1. CHARAKTERISTIKA

Základem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se stala klasická kapalinová chromatografie, kdy se skleněná trubice o průměru přibližně 2 cm a délce asi 50 cm plnila sorbentem. Dole byla zakončena fritou ze zrnitého oxidu hlinitého a na horní vrstvu sorbentu se dávkovalo malé množství vzorku, následně se přidala mobilní fáze. Průchodem kolonou se složky analytu separovaly a kolonu opouštěly v různých časech. V HPLC chromatografii je potřeba pracovat při vysokém tlaku, jelikož je nutné používat sorbent o velmi malých rozměrech, potřebných pro účinnou separaci.

Kapalinovou chromatografii můžeme rozdělit podle typu pracovních technik na kapalinovou rozdělovací chromatografii (LLC) a kapalinovou adsorpční chromatografii (LSC). Dále jsou známé ještě techniky gelové permeační chromatografie (GPC) a iontově výměnné chromatografie (IEC), které jsou méně časté, avšak v některých případech nezbytné [7].

### 1.2.2. INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí přístroje (obr. 2), a to ze zásobníků mobilních fází, čerpadla, dávkovacího ventilu (případně autosampleru), chromatografické kolony, detektoru a počítače s vyhodnocovacím software. Dále bývá ještě za zásobníkem umístěn odplyňovač mobilní fáze. Toto uspořádání je platné pro isokratickou eluci. V případě gradientové eluce je ještě před čerpadlo zařazen směšovač mobilních fází. Gradientovou eluci lze provést také použitím dvou čerpadel, v tomto případě je směšovač zařazen až za jednotlivá čerpadla. Směšovač je vždy řízen programem pro požadované množství látek mobilní fáze. Jednou z nevýhod kapalinové chromatografie oproti plynové je ta, že na konci kapalinového chromatografu je vývod pro odpad, který je třeba kontrolovat před každým měřením. Tato nevýhoda je ovšem výhodou spočívající v možnosti odchyty jednotlivých frakcí [8].



Obrázek 2 - HPLC instrumentace [9]

### 1.2.3. ČERPADLA V HPLC

Požadavků na čerpadla použité v HPLC je nespočet. Jedním z nich je především kontinuální průtok mobilní fáze bez jakýchkoliv pulsů. Dále je potřeba, aby čerpadla pracovala přesně a správně (odchylka průtoku mobilní fáze (MF) vždy max. 1%). Průtok mobilní fáze musí být možný jak ve velmi nízkém množství (0,1 ml/min), tak i při průtoku 10 ml/min. Dalším parametrem je rozsáhlé rozmezí použitelnosti tlaků (1-100 MPa) a v neposlední řadě musí být materiál použitý na konstrukci čerpadla odolný vůči korozi. Vysokotlaká čerpadla lze rozdělit do dvou skupin, a to podle způsobu, kterým se dostává píst čerpadla do pohybu. Zatímco u čerpadel pracujících s konstantním tlakem se používá tlak plynu, či hydraulická kapalina k rozpořbování pístu čerpadla, u čerpadel pracujících za konstantního objemového průtoku se k rozpořbování pístu využívá mechanický pohyb [8,10,11].

#### 1.2.3.1. PNEUMATICKÁ ČERPADLA

Tato čerpadla řadíme do skupiny pracující za konstantního tlaku. Jelikož je zde ale použit konstantní tlak, tedy tlak plynu či kapaliny působící na píst čerpadla, může se stát, že vlivem změny teploty a tím spjaté viskozity mobilní fáze se také změní odpor kolony a dojde ke změně průtoku mobilní fáze. Vzhledem k maximálnímu tlaku na vstupu do kolony, činícím 3-5 MPa se toto čerpadlo v dnešní době skoro nepoužívá [8].

#### 1.2.3.2. INJEKČNÍ ČERPADLA

Injekční čerpadla pracují na mechanickém principu pomocí elektromotoru. Ten je skrze táhlo se závitem a převodovku spojen s pístem. Injekční čerpadla jsou zbavena nedostatků



pneumatických čerpadel. Maximální tlak na výstupu je 40-60 MPa, průtok mobilní fáze je i při změně odporu konstantní, a navíc je bezpulzní, čímž zajišťuje lepší stabilitu základní linie detektoru. Ovšem ani toto čerpadlo není bez chyby. Hlavními mínusy jsou především limitovaný objem mobilní fáze (určený objemem pracovního válce), čas potřebný k dosažení stabilního průtoku a také vysoká pořizovací cena [8].

#### 1.2.3.3. PÍSTOVÁ ČERPADLA

Hlavní výhodou pístových čerpadel je taková konstrukce, díky které je mrtvý objem co nejnižší. Těmto čerpadlům je vlastní pulzní technika tlaku a objemového průtoku v závislosti na čase. Tlak těchto čerpadel se v maximu pohybuje okolo 60-100 MPa a pomocí otáček elektromotoru lze nastavit průtok mobilní fáze. Hlavní výhodou je neomezené dávkování mobilní fáze bez přerušování toku na kolonu. Naopak nevýhoda je kolísání průtoku vlivem střídání sací a výtlačné fáze. Aby však tyto tlaky byly vyrovnané, byla do konstrukce zařazena další hlava, která pracuje v opačné fázi [8].

#### 1.2.3.4. MEMBRÁNOVÁ ČERPADLA

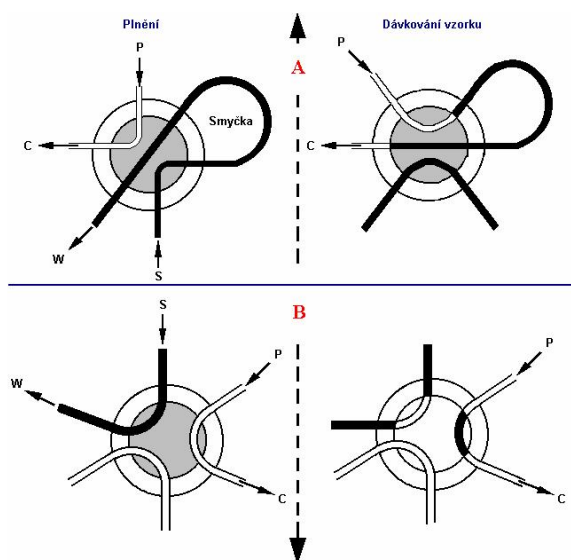
Princip fungování membránových čerpadel lze ve zkratce popsat tak, že hydraulická kapalina je stlačována pístem a přes membránu je přenášen tlak na mobilní fázi, která je pomocí sacího a výtlačného ventilu vytlačena do kolony. Čerpadla tohoto typu nejsou v dnešní době skoro vůbec využívána vzhledem k jejich technické náročnosti, kterými jsou výběr materiálu sacího a výtlačného ventilu (většinou se volí rubín či safír), úprava tohoto povrchu, který musí být dokonale hladký a čistý, aby nedocházelo ke kontaminaci mechanickými nečistotami a v neposlední řadě musí být také mobilní fáze důkladně čištěna. Membránové čerpadlo má také daleko vyšší mrtvý objem než čerpadlo pístové [8].

#### 1.2.4. DÁVKOVÁNÍ VZORKU

Dávkování vzorku má vliv na účinnost chromatografického procesu. Jestliže je dávkování nedokonalé, může docházet k rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. V současnosti se používají převážně automatické dávkovače (tzv. autosamplery), které jsou v laboratořích hlavním požadavkem vzhledem k velkému počtu vzorků. Nicméně se používají také manuální smyčkové dávkovače, pracující na principu přepínacích ventilů [8,10].

#### 1.2.4.1. VYSOKOTLAKÉ DÁVKOVACÍ VENTILY

Vysokotlaké dávkovací ventily jsou schopny dávkovat i při tlaku 60–80 MPa a mají různé objemy dávkovacích smyček (0,2 až 2000  $\mu\text{l}$ ). Vše je ovládáno buďto pneumaticky či elektricky. Princip dávkování pomocí třicestného ventilu je znázorněn na obr. 3 [8].



Obrázek 3 -Schéma dávkovacího ventilu s vnější smyčkou (A) a s vnitřní smyčkou (B) [12]

#### 1.2.4.2. AUTOMATICKÉ DÁVKOVAČE – AUTOSAMPLERY

Autosamplery jsou spojeny se zásobníkem vzorků. V zásobníku je jeden, případně více karuselů, do kterých se vkládají mikronádobky se vzorkem či standardem. Tyto mikronádobky označujeme jako vialky. Vyrábějí se o různých objemech, nejčastěji však 2 ml a jsou buďto na závit nebo se uzavírají hliníkovým uzávěrem (krimpovací vialky). Pokud se pracuje s malými objemy, jsou do vialek vloženy tzv. inserty o objemu stovky mikrolitrů.

Existují tři druhy spojení dávkovače se zásobníkem vzorku. První typ představuje fixní zásobník vzorku a pohybující se rameno s jehlou. Druhým typem je stabilní injekční stříkačka dávkovače a pohybuje se pouze zásobník se vzorky. Poslední konstrukční uspořádání nám představí fixní injekční dávkovač i zásobník vzorků. K transportu vialek slouží pohyblivé rameno [8].

#### 1.2.5. DETEKTORY V HPLC

Detektory jsou v HPLC systému umístěny za kolonou a jejich funkce je zaznamenávat rozdíl v intenzitě signálu čisté mobilní fáze a mobilní fáze s obsahem analytu. Detektory lze dělit na koncentrační a hmotnostní, podle toho, zda reagují na změnu hmotnostní koncentrace,

či hmotnostního toku složky v eluentu. Dalším dělením je na detektory destrukční a nedestrukční. V prvním případě dochází k nenávratné změně detekované komponenty, zatímco v případě druhém nedochází k žádné chemické změně. Požadavků na ideální HPLC detektor je mnoho a nelze splnit všechny. Jsou jimi například vysoká citlivost a odezva, univerzálnost, specifita, linearita, spolehlivost, snadnost použití, nezávislý signál na změně teploty a průtoku, kvalitativní informace pro detekované píky apod. V současné době je známo několik detektorů, přesto nejpoužívanějším je stále detektor s detekční technikou UV-VIS a v posledních letech se do popředí dostává také hmotnostní spektrometrie [8,13].

#### 1.2.5.1. SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na Lambert-Beerově zákoně, vyjadřující vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující látky ( $c$ ), molárního dekadického absorpčního koeficientu ( $\epsilon$ ) a vlastní absorpcí vyjádřenou jako absorbance ( $A$ )

$$A = l \cdot \sum_{i=1}^n \epsilon_i \cdot c_i \quad (2)$$

Vzhledem k tomu, že tento vztah nezohledňuje vliv teploty, vlnové délky a rozpouštědla používají se pravé a zdánlivé odchylky. Dochází-li v roztoku ke změně chemické rovnováhy, použijeme odchylku pravou, v případě změny fyzikální rovnováhy jsou použity odchylky zdánlivé. Použitelnost spektrofotometrických detektorů je omezen na interval vlnových délek 190-800 nm. Podle konstrukčního uspořádání lze rozdělit detektory do čtyř kategorií. Detektory s fixní vlnovou délkou využívají nízkotlakou rtuťovou výbojku. Dále je to detektor s měnitelnými vlnovými délkami, nicméně ty musí být předem dány. Výhodnějším typem je detektor s programovatelnou vlnovou délkou, kterou lze měnit v průběhu analýzy. Lze také měřit celé spektrum látky, či zaznamenat dvě až čtyři vlnové délky současně, avšak na úkor citlivosti. V neposlední řadě je to detektor s diodovým polem. Tyto detektory snímají celé spektrum v reálném čase. Princip tohoto detektoru spočívá v rozkladu záření ze zdroje po průchodu měrnou celou na mřížce. Toto rozložené záření následně dopadá na jednotlivé fotodiody, je však zeslabeno o absorpci v celé detektoru. Spektrální rozlišení je pak dáno počtem diod (512-1024). Výhodou tohoto detektoru je možnost porovnávání spekter s knihovnou [8,10].

#### 1.2.5.2. FLUORESCENČNÍ DETEKTORY

Fluorescenční detektory pracují na bázi fluorescence a měření sekundárního záření, které látka vydá po absorpci primárního záření. U fluorescence bývá doba fotoluminiscence v jednotkách  $10^{-2}$  až  $10^2$   $\mu$ s. Látka, která absorbuje elektromagnetické záření přejde ze

základního vibračního stavu na různé hladiny excitovaného stavu. Tuto absorbovanou energii může molekula přeměnit na energii vibrační, předat ji dalším molekulám nebo vyzářit jako fluorescenci. Emitované fluorescenční záření bývá ve většině případů vyšší vlnové délky. Tento jev je zapříčiněn vibrační relaxací. Při použití tohoto detektoru je důležité roztoky zbavovat rozpuštěného kyslíku, aby nedocházelo ke zhášení luminiscence. Jednoduché fluorescenční detektory používají jako zdroj monochromatického excitačního záření rtuťovou výbojku a interferenční filtr. U moderních přístrojů se vyskytuje také monochromátor, díky němuž lze nastavit vlnovou délku emitovaného a excitovaného záření, namísto měření celého spektra [8].

### 1.2.5.3. VODIVOSTNÍ DETEKTORY

Princip vodivostního detektoru spočívá v měření vodivosti eluátu v průtokové cele mezi elektrodami. Na elektrody je vkládáno střídavé napětí a to proto, aby nedocházelo k jejich polarizaci. Největší požadavky při použití tohoto detektoru jsou kladeny na mobilní fázi, od které se očekává naprostá nevodivost a schopnost rozpustit veškeré dělené látky. Mobilní fáze musí mít také dostatečně vysokou permitivitu. Tyto podmínky splňuje převážně redestilovaná voda, případně se může přidat polární organické rozpouštědlo. Vodivostní detektory jsou používány především v iontové chromatografii, kde jsou kolony plněny ionxy s nízkou kapacitou [8,14].

## 1.2.6. KOLONY A STACIONÁRNÍ FÁZE

### 1.2.6.1. KOLONY

Kolony jsou v současnosti vyráběny komerčně, a tak si uživatel může zvolit druh sorbentu velikost a typ částic a rozměry kolony dle nabídky výrobce. Vlastností, které musí splňovat kolona je několik, avšak nejdůležitější z nich jsou především antikoroziní materiál na výrobu kolon, odolnost vůči chemickému působení mobilní fáze a vysokého tlaku, až 100 MPa. V ideálním případě by měl být její vnitřní povrch před naplněním sorbentem dokonale hladký. Mohou se vyskytovat i kolony skleněné, uložené do kovového pouzdra, ty jsou však použitelné pouze do tlaků 20 MPa. V praxi jsou ale v dnešní době používány analytické kolony délky 10-300 mm, vnitřním průměru 2,1-5 mm a velikosti částic 1-10  $\mu\text{m}$  [8,15].

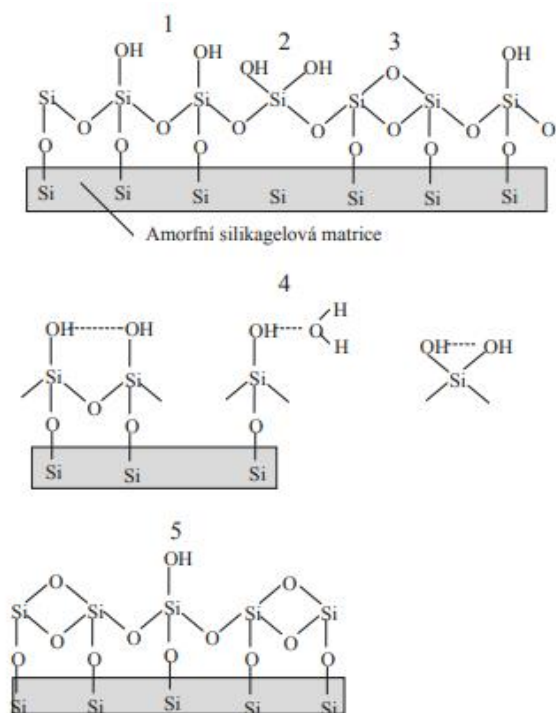
### 1.2.6.2. STACIONÁRNÍ FÁZE

Stacionární fáze je buďto pevná látka nebo film kapaliny zakotven či chemicky navázán na tuhou matici nazývanou nosič. Nejčastějším dělením stacionárních fází je dělení dle jejich vlastností, a to tedy na polární, nepolární a amfoterní. Další dělení je podle chemického složení

na anorganické oxidy, chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku. Požadavky na stacionární fázi jsou chemická a tepelná stabilita, měla by být nereaktivní s mobilní fází a nerozpustná. Stacionární fáze se také nesmí z kolony vymývat [8,16].

#### 1.2.6.2.1. SILIKAGEL

Silikagel je nejrozšířenější anorganický polární sorbent díky svým vlastnostem. Používá se pro separaci v normálních fázích a módu HILIC, po navázání ligandů se také hojně vyskytuje v separaci v reverzních fázích. Nejčastěji má porézní amorfni formu o složení  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ . Skupina Si-OH vzniká chemicky vázanou vodou v nestechiometrickém množství. Těchto skupin existuje několik typů, každá vykazuje jinou kyselost (obr. 4).



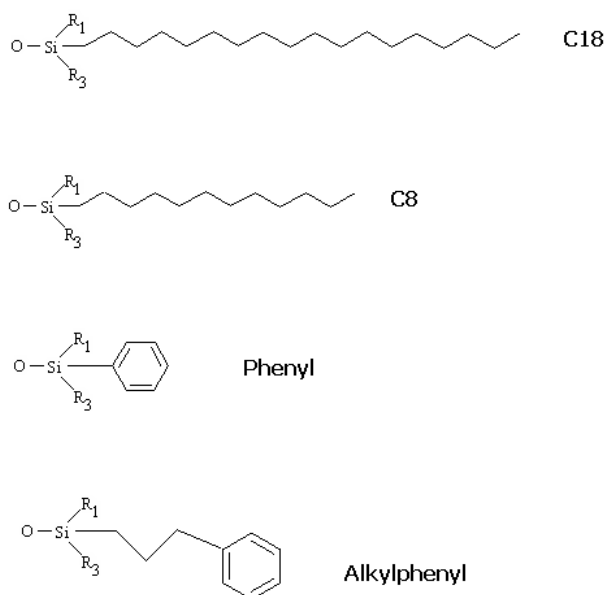
Obr. 1. Různé typy funkčních skupin na povrchu silikagelu;  
 1 – vicinální silanolové skupiny; 2 – geminální silanolové skupiny;  
 3 – siloxanové skupiny; 4 – asociované silanolové skupiny;  
 5 – izolovaná silanolová skupina

Obrázek 4 - Funkční skupiny na povrchu silikagelu [17]

#### 1.2.6.2.2. CHEMICKY VÁZANÉ FÁZE NA BÁZI SILIKAGELU

Chemickým navázáním stacionární fáze na nosič získáváme mnoho výhod. Je jimi například zamezení vymývání stacionární fáze, zvýšení robustnosti ke změně teploty a další. Zde se jako nosič používá silikagel, na který je navázána stacionární fáze s vhodnými

organickými sloučeninami podle požadovaného typu interakce se složkami vzorku. Těchto typů je v dnešní době nespočet a představují většinu komerčně dostupných kolon po HPLC (více než 400). Jsou jimi například fáze s chemicky vázanými alkyly, fáze s chemicky vázanou aminopropylovou a kyanopropylovou skupinou, diolové fáze, nitrofenylové a pentafluorfenylpropylové fáze a chemicky stabilní silikagelové fáze (příklady běžných stacionárních fází jsou na obr. 5) [8,18].



Obrázek 5 – Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu [19]

#### 1.2.6.2.3. STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI KOVOVÝCH OXIDŮ

Tyto fáze také patří mezi anorganické polární sorbenty. Hlavní výhoda spočívá v lepší chemické stabilitě oproti silikagelu. Z tohoto vyplývají další pozitiva, jimiž jsou delší životnost kolony a možnost pracovat v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách dosahující 200°C. Nezanedbatelná výhoda je také menší vymývání ligandu a možnost čištění kolon agresivnějšími způsoby. Existují tři typy těchto oxidů. Jsou jimi oxid hlinitý, oxid titaničitý a oxid zirkoničitý, v současné době nejpoužívanější z oxidů [8,20].

#### 1.2.6.2.4. POLYMERNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE

Polymerní stacionární fáze jsou stabilní v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách. Jsou však omezeny tlakem a to 20 MPa. Tvoří je síť malých mikrosfér, vytvářející porézní strukturu. Používají se hlavně v systému s reverzními fázemi, kde se využívá především

kopolymer styrenu a divinylbenzenu (PS-DVB) či polyvinyl alkohol (PVA) a metakryláty [8,21].

#### 1.2.6.2.5. HYBRIDNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE

Hybridní fáze byly použity s myšlenkou spojení výhod silikagelu a polymerních fází. Jde o reakci tetraethoxysilanu s methyltriethoxysilanu v poměru 2:1. Hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky uvnitř i na povrchu. Následně se povrch modifikuje trifunkčními silany. Hybridní fáze vykazují vysokou stabilitu v rozmezí pH 1-12. Tyto fáze mohou být modifikovány ligandy, které jsou typické pro rezervní stacionární fáze, ale také polárnějšími typy ligandů [8,22].

#### 1.2.6.2.6. STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI GRAFITOVÉHO UHLÍKU

Nejpoužívanější stacionární fází je z hlediska dobré mechanické stability a chromatografické účinnosti porézní grafitový uhlík (PGC). Při použití vodně organické mobilní fáze dochází u grafitového uhlíku k silné retenci velkých molekul. Velkou výhodou těchto fází je možnost změny retence bazických látek v závislosti na změně pH mobilní fáze [8].

#### 1.2.7. CHROMATOGRAFIE S NORMÁLNÍMI FÁZEMI

V systému s normálními fázemi (NP-HPLC) jsou pro separaci látek použity polární stacionární fáze a mobilní fáze musí mít nižší polaritu než fáze stacionární. Mechanismus spočívá v retenci určené specifickými mezimolekulárními interakcemi látky s povrchem sorbentu a nespécifickými interakcemi látky s mobilní fází. Adsorpce látky je tedy dána rozdílnou polaritou sil působících mezi povrchem sorbentu a dělenou látkou a polárních sil působících mezi povrchem sorbentu a mobilní fází. Lze tedy říct, že retence látek na koloně se zvyšuje s rostoucí polaritou analytů a klesá s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fází.

Pro tuto separaci se používají výhradně polární stacionární fáze. Nejčastěji se jedná o silikagel či polární chemicky vázané fáze na bázi silikagelu.

Ovlivnit retenci látek lze změnou eluční síly mobilní fáze, tedy použitím rozpouštědel o různé polaritě. V praxi se často volí binární směs alifatického uhlovodíku s polární složkou mobilní fáze, například propanolu. Výběr rozpouštědla podle polarit nám umožňuje eluotropická řada rozpouštědel. Dalším faktorem je obsah vody v použitém rozpouštědle.

Separace na normálních fázích se díky svým nedostatkům dostává do pozadí. Nicméně stále nalézá uplatnění tam, kde se analyty v jiných systémech rozkládají, jako je například vitamín K nebo lipidy. Chromatografie s normálními fázemi se také používá na separaci isomerů, které nejsou v jiných módech separovány, nebo je jejich dělení obtížné [8,23-27].

### 1.2.8. CHROMATOGRRAFIE S REVERZNÍMI FÁZEMI

Při chromatografii v obrácených fázích (RP-HPLC) se používá polární mobilní fáze, nejčastěji směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly, mísitelnými s vodou. Stacionární fáze zde mají nepolární charakter. Volí se dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče. Nejčastěji používanou fází je zde především C<sub>18</sub> (oktadecyl silikagel). Polárnější fáze lze použít v obou uspořádáních v závislosti na použité mobilní fázi. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla, tedy naopak, než tomu bylo u systému s normálními fázemi. Dle eluční síly můžeme seřadit nejpoužívanější rozpouštědla následovně: voda < methanol < acetonitril < propan-2-ol < dioxan < tetrahydrofuran. Při chromatografii silně polárních nebo ionizovaných analytů je potřeba použít přísady do mobilní fáze (pufry, soli, ...) pro potlačení ionizace, vytvoření iontových asociátů nebo iontových párů s analytem.

Díky své univerzálnosti se stává chromatografie na reverzních fázích nejpoužívanější metodou separace. V současné době činí zhruba 85 % aplikací v kapalinové chromatografii. Použití je možné jak pro jednoduché směsi malých molekul, tak i pro velmi komplikované směsi (rostlinné extrakty, tryptické štěpy nebo biologické vzorky při studiu metabolitů nových léčiv) [8].

### 1.2.9. HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Technika hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) se používá pro analyty, které interagují s hydrofilní stacionární fází a eluce je prováděna relativně hydrofobní binární mobilní fází obsahující vodnou složku jako silné eluční činidlo.

Stacionární fáze je zde polární, především silikagel nebo stacionární fáze, které obsahují hydroxyethylovou, aminovou či další polární skupiny. Ty jsou navázané na silikagelový, polymerní nebo hybridní nosič. Všeobecně lze stacionární fáze používané v HILIC chromatografii rozdělit do tří skupin. Neutrální, bez elektrostatických interakcí (diol, amid či cyklodextrin), nabitě se silnými elektrostatickými interakcemi (silikagel, aminopropyl silikagel) a zwitterionty se slabými elektrostatickými interakcemi (sulfobetain). Pro bazické látky se vybírá především stacionární fáze modifikované amidovou či zwitteriontovou sulfobetainovou



skupinou, na rozdíl od kyselých látek, kde je vhodnější použít stacionární fázi modifikované aminopropyl skupinou.

Retence je zvyšována s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polaritu mobilní fáze. V HILIC systému obsahuje mobilní fáze vysoké procento organické složky, většinou acetonitril s obsahem nad 50 %, a druhou složku tvoří voda či těkavý pufr.

V HILIC chromatografii je také podstatné rozpouštědlo vzorku. To musí být stejné jako je mobilní fáze. Pokud rozpouštědlo obsahuje vysoký podíl vody, lze pozorovat ztrátu účinnosti separace, snížení retence a další negativní jevy.

Metoda HILIC našla v poslední době uplatnění ve farmaceutických a bioanalytických laboratořích. Výhodou je nejen dostatečná selektivita a současná analýza polárních a nepolárních látek, ale také vhodnost mobilních fází, které jsou ideální pro spojení s hmotnostní spektrometrií díky těkavosti a vysokému obsahu acetonitrilu. [8,28-37].

## 1.2.10. CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY

### 1.2.10.1. RETENČNÍ OBJEM A ČAS

Tyto veličiny jsou základní charakteristikou pro každou dělenou látku. Retenční objem  $V_R$  je objem mobilní fáze, která proteče systémem od nástřiku vzorku až po dosažení maxima píku. Retenční čas  $t_R$  je pak čas, který uplyne od nástřiku vzorku až po dosažení maxima píku. Zatímco retenční čas je kvalitativní charakteristika látky, za kvantitativní charakteristiku považujeme výška píku ( $h$ ) nebo plocha pod píkem ( $A$ ). Mezi retenčním objemem  $V_R$  a retenčním časem  $t_R$  existuje vztah:

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (3)$$

kde  $F_m$  značí objemový průtok mobilní fáze [8].

### 1.2.10.2. RETENČNÍ FAKTOR

Nejpoužívanější veličinou charakterizující retenci látek je retenční faktor  $k$ . Retenční čas i objem lze převést na retenční faktor pomocí následujících rovnic:

$$V_R = V_0(1 + k) \quad (4)$$

$$t_R = t_0(1 + k) \quad (5)$$

kde  $t_0/V_0$  je mrtvý retenční čas/objem, vyjadřující čas/objem složky, která není na koloně zadržována a pohybuje se tedy stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Z předchozích rovnic lze pak jednoduše vyjádřit rovnici pro retenční faktor [8]:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (6)$$

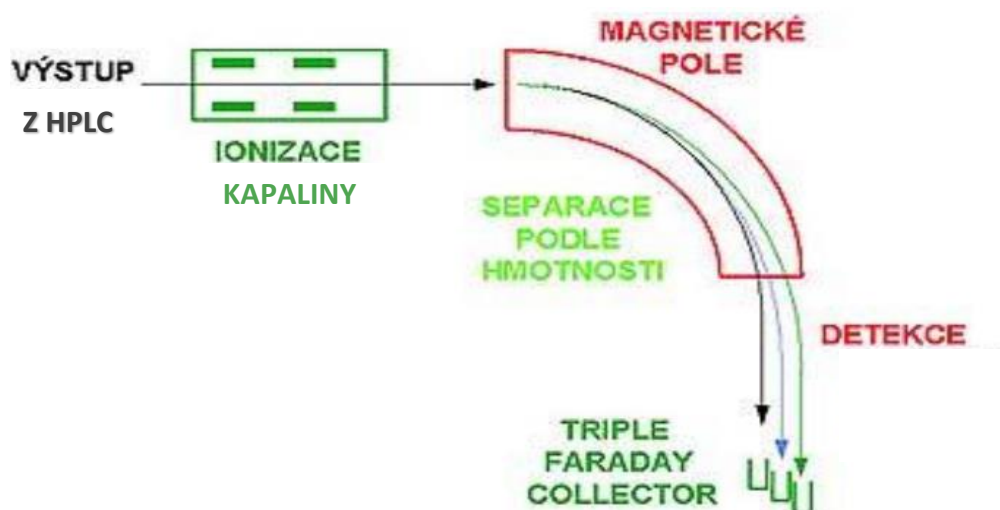
### 1.2.11. GRADIENTOVÁ ELUCE

Gradientová eluce je termín pro proces, při němž se mění složení mobilní fáze během chromatografické analýzy. Na začátku analýzy je použité rozpouštědlo vhodné pro eluci některých složek, ale je "slabé", pokud jde o jeho schopnost uvolnit další sloučeniny z kolony. Jak probíhá chromatografie, změní se složení mobilní fáze, aby se uvolnily všechny sloučeniny z kolony a včas se oddělí tyto sloučeniny navzájem. Gradientová eluce se použije, když vzorek obsahuje disimilární složky, které mají široký rozsah polarit a izokratickou (jedinou) mobilní fází nelze všechny složky vzorku rozdělit v přiměřené době. Proto je nutné měnit složení mobilní fáze (eluční síly), což má za následek snížení retenčních faktorů v průběhu analýzy, a tedy zkrácení její délky (rovnice 5) [38].

## 1.3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

### 1.3.1. CHARAKTERISTIKA

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při níž jsou molekuly vzorku převedeny na ionty, které jsou dále zaznamenávány v hmotnostním spektru, jako poměr hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Výhoda hmotnostní spektrometrie spočívá v použití malého množství vzorku, vysoké citlivosti a určení jak kvalitativního důkazu, tak kvantitativního stanovení látek. Naopak nevýhodou této techniky, jsou vysoké pořizovací a provozní náklady a také fakt, že se jedná o destruktivní techniku.



Obrázek 6 - Schéma hmotnostního spektrometru [39]

### 1.3.2. INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí, kterými jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (obr. 6). Tyto části jsou umístěny ve vakuovém systému, který je jedním z dalších důležitých částí přístroje, stejně jako iontová optika a počítač. Ten slouží především k ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, případné porovnání s knihovnou spekter. V iontovém zdroji probíhá tzv. ionizace, kdy dochází k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Klíčovou součástí je již zmiňovaný hmotnostní analyzátor, kde se podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) dělí ionty za vysokého vakua v plynné fázi. Detektor slouží k záznamu iontů po jejich rozdělení podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů [40].

### 1.3.3. IONTOVÉ ZDROJE

Již výše je zmíněno, že iontový zdroj je jedna ze tří nejdůležitějších částí hmotnostního spektrometru. Dochází zde k ionizaci, tedy vytvoření nabitých částic z neutrálních molekul analytu. Ty mohou po svém vzniku fragmentovat (rozpadat se). Do iontového zdroje nevstupuje pouze analyt samotný, ale také jeho matrice (doprovodné látky vzorku či mobilní fáze kapalinové chromatografie). Proto nevznikají pouze molekulární ionty kladně nebo záporně nabitě ( $M^+$ ,  $M^-$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ), ale také ionty aduktové ( $[M+CH_5]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+HCOO]^-$ ,...). V případech méně stabilních látek mohou někdy vznikat i fragmenty ionizované molekuly. V dnešní době je několik desítek iontových zdrojů, ale všeobecně je můžeme rozlišit na „tvrdé“ a „měkké“. Toto rozdělení určuje energie, kterou dodáváme při ionizaci [41].

#### 1.3.3.1. ELEKTRONOVÁ IONIZACE

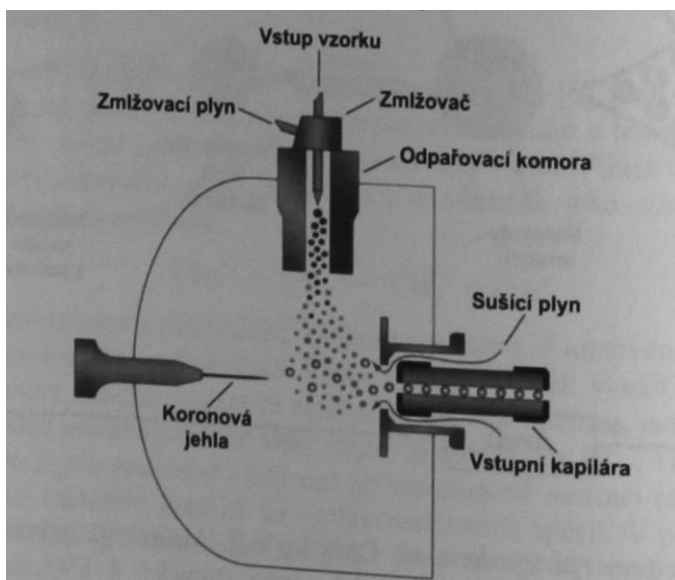
Elektronová ionizace je nejtypičtějším typem „tvrdé“ ionizace. V této ionizaci dochází k tomu, že je molekulám analytu předávána energie letících elektronů. Pomocí této ionizace získáme kladně nabitý radikál molekuly včetně bohatého fragmentačního spektra dané látky. Elektronová ionizace probíhá v plynné fázi, a to je důvodem tak časté kombinace hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií (GC/MS). Výhodou „tvrdé ionizace“ oproti „měkké ionizační technice“ zastoupenou například chemickou ionizací je snadnější identifikace analyzovaného vzorku, díky vzniku bohatých fragmentačních spekter. Elektronová ionizace se dá použít pouze v případě těkavých molekul. Z tohoto důvodu dochází často k derivatizaci analytu prostřednictvím trimethylchloristanu, chloroformiátu aj. Tímto krokem ovšem často

dochází ke zhoršení analytických parametrů zejména v případech kvantitativních multikomponentních metod [41].

### 1.3.3.2. CHEMICKÁ IONIZACE

Při identifikaci ovšem může nastat problém, například ten, že ve zdroji dochází k úplnému rozpadu molekulového iontu, čímž dochází ke ztrátě informace o molekulové hmotnosti.

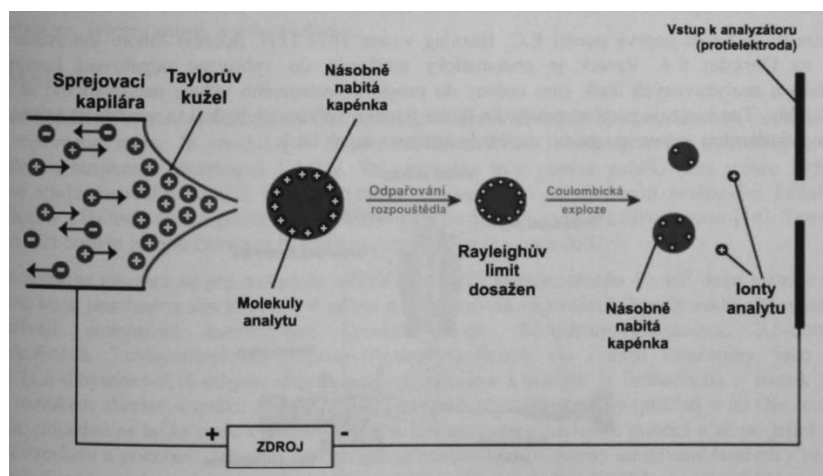
Toto však lze vyřešit použitím měkké ionizační techniky, např. chemické ionizace. V tomto případě dochází nejdříve k ionizaci reakčního plynu, až poté se ionizují molekuly analytu. Zde tedy nedochází k rozsáhlé fragmentaci právě z důvodu předávání nižší energie molekulám analytu. Ve spektru pak vidíme většinou ion  $[M+H]^+$  čímž získáme molekulovou hmotnost sledované sloučeniny. Ionizačních technik však existuje celá řada. K ionizaci tak může nastat i vlivem vysokého napětí, k čemuž dochází u elektrospreje (ESI), působením UV záření v případě APPI nebo elektrickým výbojem u APCI. U ionizace máme ještě třetí typ, a to je desorpční ionizace. V případě MALDI dochází k desorpci z pevných povrchů pomocí laseru, u DESI působením desorpčního elektrospreje a v technice DART díky nestabilnímu plynu. Tyto ionizační techniky poskytují především molekulární ionty, v některých případech i adukty se složkami mobilní fáze nebo matrice [41].



Obrázek 7 - Chemická ionizace APCI [43]

### 1.3.3.3. ELEKTROSPREJ

Ionizace elektrosprejem (obr. 7 a 8) je vedle MALDI nejpoužívanější ionizací biologických vzorků. Díky své univerzálnosti lze elektrosprejem ionizovat jak středně polární, tak i vysoce polární látky. Proces ionizace se zakládá na působení silného elektrického pole na elektrodu za atmosférického tlaku. Napětí elektrického pole se pohybuje okolo 2-5 kV. Celý proces spočívá v tom, že na hrotu elektrody, kam vstupuje mobilní fáze společně s analytem se vytvoří nabitý aerosol. Toto je způsobeno mimo jiné i zmlžujícím plynem, který proudí sousovým směrem. Aerosol následně zvyšuje svůj povrchový náboj odpařováním rozpouštědla během velmi krátkého času pomocí proudu plynu o zvýšené teplotě. Ve chvíli, kdy odpudivé síly převládají nad silami přitažlivými, dojde k explozi kapiček nebo v případě již dostatečně malých kapek (takových, ve kterých již nedochází k odpuzování stejně nabitých částic) jsou ionty uvolňovány z povrchu kapiček do plynné fáze. Elektrosprej se může používat i při vysokém průtoku mobilní fáze, a to i více než 1 ml/min. Tato ionizace však nedokáže separovat ionty vzniklé z analytu a konkurenční ionty např. soli ze vzorku, proto musíme zvolit správnou separaci (např. HPLC v kombinaci se značenými standardy) [41].



Obrázek 8 - Schéma ionizace v elektrospreji [43]

### 1.3.3.4. MALDI

MALDI ionizace se používá především v off-line spojení s HPLC. Této desorpční ionizace vzorku laserem za přítomnosti matrice (MALDI) se často používá pro analýzu proteinů a jiných makromolekul. Vzorek je nejdříve smíchán s organickou kyselinou absorbující energii laseru. Následně se tato směs vysuší a nastává samotná ionizace. Ta zahrnuje krátký intenzivní puls laseru, čímž zahřeje a desorbuje matrici a analyty. Současně dojde také k ionizaci matrice,

který předá náboj analytu. Vše probíhá ve vakuu, tím tedy odpadá problém s přenosem iontů mezi atmosférickým tlakem a provozním vakuem analyzátoru [8,41].

### 1.3.4. HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

#### 1.3.4.1. KVADRUPÓL

Dnes nejrozšířenějším hmotnostním analyzátozem je právě kvadrupól, kdy jedním z důvodů je nízká pořizovací cena v porovnání s ostatními analyzátozem. V principu se jedná o čtyři tyče, na nichž je přiváděno stejnosměrné a střídavé napětí. Vždy dvě elektrody naproti sobě mají stejnou polaritu. Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy napětí střídavého, se ionty s určitou hodnotou  $m/z$  v daném okamžiku pohybují po stabilní dráze dále do detektoru. Ionty, které hodnotu  $m/z$  nespĺňují, se tedy nepohybují po stabilní trajektorii, jsou vychýleny a k detektoru nedoletí, jsou „rozbity o tyče kvadrupólu“. Analyzátoz může pracovat ve dvou režimech, kdy první mód, skenovací, umožňuje prověření všech hodnot  $m/z$  v krátkém čase a druhý režim, kde se nastaví elektrické pole analyzátozu tak, aby procházela jen jedna hodnota  $m/z$ . Zatímco první režim umí „proskenovat“ celou látku s nižší citlivostí, druhý mód se zaměří na určitou hodnotu  $m/z$  s účinností vysokou, používanou pro citlivou kvantifikaci [41].

#### 1.3.4.2. TROJITÝ KVADRUPÓL

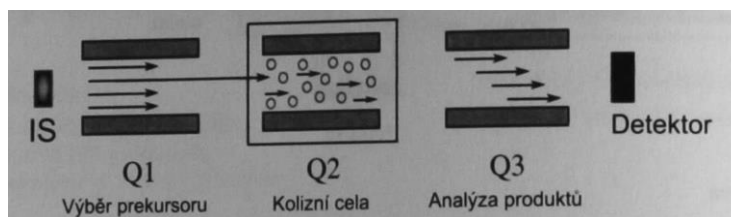
Trojité kvadrupól (QqQ) je v hmotnostní spektrometrii využíván již od roku 1979. Trojité kvadrupól (obr. 9) je tvořen třemi sériově zapojenými kvadrupóly za sebou, kdy první a třetí slouží jako filtry hmot a druhý slouží jako kolizní cela, do které je přiváděn plyn, nejčastěji Ar nebo N<sub>2</sub>. Princip spočívá ve sledování specifického přechodu mezi prekursorovým a produktovým iontem daného analytu. Ionty vstupují do prvního kvadrupólu, kterým projdou pouze ionty s námi zvolenou hodnotou  $m/z$ . Tyto ionty jsou nazývány jako prekursorové. Následně jsou vedeny do kolizní cely, kde dochází na základě kolizní energie k fragmentaci, čímž vzniknou produktové ionty, které jsou vedeny do třetího kvadrupólu. Tímto kvadrupólem projdou opět jen ionty s předem určenou hodnotou  $m/z$ . Trojité kvadrupól má čtyři druhy skenů.

SCAN, kdy systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu a na detektor jsou propuštěny všechny ionty, tím se získá celé hmotnostní spektrum.

Ve skenu SIM (selected ion monitoring) také systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu, ale na detektor jsou propuštěny pouze ionty s námi zvolenou hodnotou  $m/z$ .

U skenu product ion pracuje systém v režimu trojitého kvadrupólu, kde prvním kvadrupólem projde hmota  $m/z$ , která je rozštěpena v kolizní cele a vzniklé ionty projdou třetím kvadrupólem a jsou detekovány.

Při skenu MRM (multiple reaction monitoring) pracuje systém v režimu trojitého kvadrupólu. Hmota  $m/z$  projde prvním kvadrupólem, vzniklý prekurzotový iont je rozštěpen v kolizní cele a třetím prekurzorem projde produktový iont, který je detekován [42-44].



Obrázek 9 - Schéma trojitého kvadrupólu [43]

#### 1.3.4.3. ANALYZÁTOR DOBY LETU

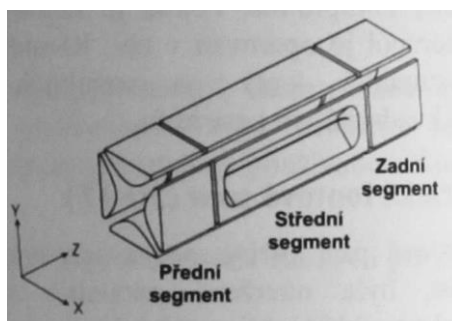
Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF) měří dobu letu iontů potřebnou pro překonání určité dráhy. Ionty jsou pomocí napěťového pulzu urychleny do letové trubice, kde letí v závislosti na jejich  $m/z$  různou rychlostí, tedy i dopadají na detektor v různém čase. Na detektor „doletí“ rychleji ionty menší, protože ionty s menší hodnotou  $m/z$  se pohybují rychleji, než ty s vyšší hodnotou  $m/z$ , přestože jim je udělena stejná kinetická energie. Měření spekter je s tímto analyzátozem velice rychlé, navíc není omezen rozsah hmotností  $m/z$ . TOF spadá do pulzních hmotnostních analyzátorů, jelikož ionty jsou nejdříve velmi krátkým pulzem urychleny na vstupu do trubice analyzátoru a poté se měří čas, za který dojdou ionty k detektoru, čímž se určí jejich  $m/z$  [45].

#### 1.3.4.4. LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST

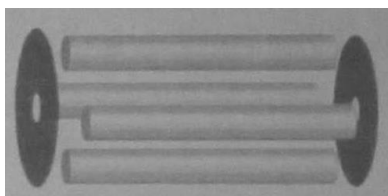
Lineární iontová past (obr. 10 a 11) je také označována za 2D-iontovou past nebo dvourozměrnou iontovou past. V podstatě se jedná o kvadrupól schopný uchovávat ionty. Je toho docíleno vkládáním radiofrekvenčního napětí bez stejnosměrné složky na tyče kvadrupólu. Toto je použito ve směru radiálním, zatímco ve směru axiálním se využívá ke snížení pohybu iontů stejnosměrné napětí, vkládané buď na vstupní a výstupní kruhovou elektrodu nebo na segmenty tyčí kvadrupólu.

Tandemová hmotnostní spektrometrie umožňuje také spojení trojitého kvadrupólu s lineární iontovou pastí (QqQ<sub>LIT</sub>). Jedná se o hybridní analyzátor, který má v podstatě trojitý

kvadrupól a namísto třetího kvadrupólu je lineární iontová past. Toto tandemové uspořádání se uplatňuje v proteomice, analýze životního prostředí, kontrole potravin a dalších aplikacích [43].



Obrázek 10 – Segmentový kvadrupól [43]



Obrázek 11 – Vstupní a výstupní elektroda [43]

### 1.3.5. DETEKTORY

Detektor zaznamenává ionty, které jsou vybrány hmotnostním analyzátozem. Detektory můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jak zaznamenávají ionty.

V první skupině jsou detektory, které jsou schopny zaznamenat veškeré ionty bez ohledu na jejich hodnotu  $m/z$ . Tyto detektory pracují na principu přímého měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí jednotlivých násobičů. Často se používají elektronové násobiče se sadou dynod, či s kontinuálním dynodovým elektronovým násobičem, zvaným channeltron.

Druhou skupinu tvoří detektory schopné zaznamenávat ionty s ohledem na hodnotu  $m/z$ . Patří zde především iontová cyklotronová rezonance a orbitrap. Ionty pak lze detekovat jako komplexní obraz všech přítomných iontů díky indukci proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátozem. Tento signál je následně pomocí Fourierovy transformace zpracován a převeden na spektrum [41].

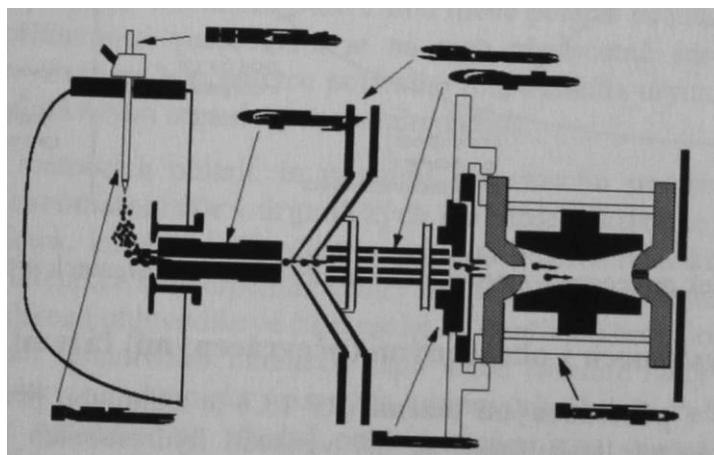
## 1.4. SPOJENÍ HPLC-MS

Spojení LC-MS se používá především pro analýzu reálných vzorků, jako jsou environmentální matrice nebo biologické tkáně či tekutiny. Vzhledem ke složitosti těchto vzorků



je spojení separační techniky a specifického detektoru metodou první volby. Hlavními výhodami tohoto spojení je např. možnost analýzy složitých směsí, větší jistota identifikace látek díky strukturní informaci MS a retenčnímu času a menší spotřeba vzorku než při off-line provedení. Další výhodou je také lepší spolehlivost kvantitativní analýzy díky izotopicky značeným vnitřním standardům. Pozitiv tohoto spojení je mnohem více, zde jsem však uvedla ty nejpodstatnější. Toto spojení je tedy využíváno jak k určení molekulové hmotnosti, tak i k identifikaci látek a ke kvantifikaci. Přestože v počátcích byl velký problém hlavně vysoký průtok mobilních fází v kapalinové chromatografii a rozdíly v separaci probíhající v atmosférickém tlaku a ve vakuu při MS, řešenou převodníky, dnes je tento problém vyřešen. Je tomu tak díky ionizačním technikám pracujícím za atmosférického tlaku ESI, APCI a APPI, které zároveň slouží jako rozhraní (interface).

Protože se ve spojení LC-MS mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu, nelze využívat klasické mobilní fáze pro HPLC, jako například čistý hexan, netěkavá aditiva a pufrý, halogenovaná rozpouštědla, ionpárová činidla nebo bezvodé mobilní fáze. Naopak vhodnými mobilními fázemi jsou těkavá rozpouštědla s přidávkou těkavých aditiv (kyselina mravenčí, kyselina octová a pufrý octanu a mravenčanu amonného). Koncentrace těchto aditiv by však neměla být vyšší než 1 % nebo 10 mmol/l, protože jinak dochází k soupeření o náboj při ionizaci, čímž dochází k poklesu signálu a růstu šumu pozadí [8,46,47].



Obrázek 12 - Příklad spojení HPLC/MS s ionizací elektrosprejem a iontovou pastí [43]

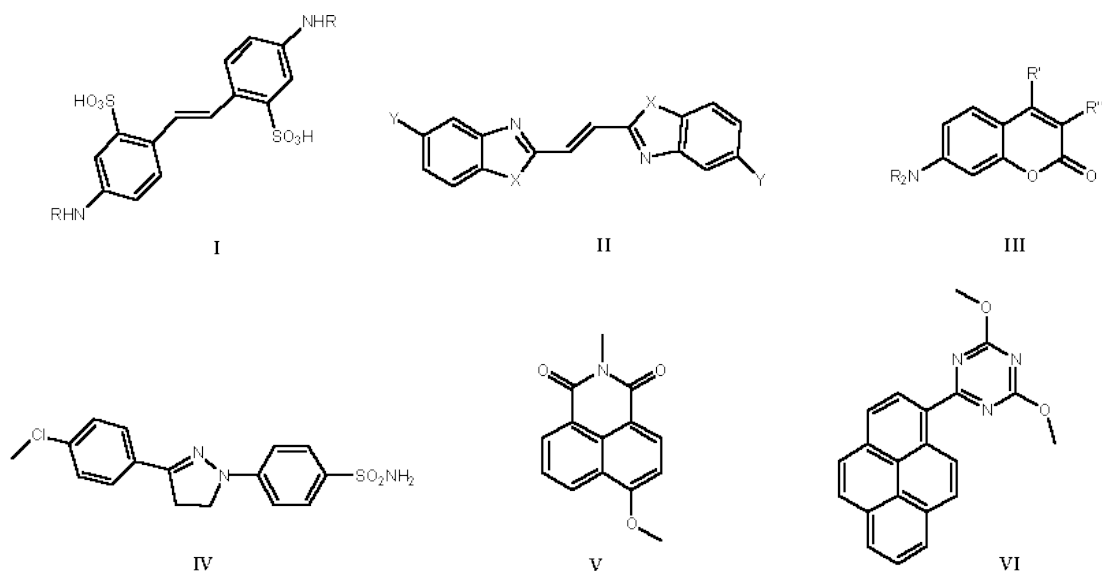
## 1.5. OPTICKÉ ZJASŇOVACÍ PROSTŘEDKY

### 1.5.1. DEFINICE

V surovém stavu mají materiály, jako papír, textilní vlákna či plasty absorpční pásy v rozmezí 400-500 nm, což vede k nažloutlému nebo hnědému odstínu. Tuto barvu způsobují

nečistoty, přímo se vyskytující v materiálech nebo získané z výroby. Tyto nečistoty mohou být alespoň částečně zničeny chemickým bělením, ale nadměrné bělení neničí pouze nečistoty, ale také samotný substrát. Jednou z možností je barvení, které absorbuje v oblasti UV a má fluorescenční emise v rozsahu 400-500 nm. Tyto emise zakryjí absorpci nečistot v této oblasti. V dnešní době se vyrábí asi 400 různých optických zjasňovačů, které lze rozdělit do šesti skupin.

- 1) Látky odvozené od stilbenu, například produkty alkylace kyseliny 4,4'-diamoni-stilben-2,2'-disulfonové. Zde patří zhruba 80 % všech optických zjasňovačů a vždy obsahují charakteristický systém dvojných vazeb. Používají se pro celulózu a polyamidy a díky zbytkům sulfonovaných kyselin jsou rozpustné ve vodě.
- 2) Další skupinou jsou ethylenové deriváty obsahující dva heteroaromatické radikály, analogické derivátům stilbenu, ale jsou hydrofobní. Používají se při procesech tavení.
- 3) Tyto deriváty byly na počátku vývoje optických zjasňovačů. Hydroxykumariny jsou odvozené od aesculinu, dnes se již nepoužívají. Nyní jsou nahrazeny sloučeninami obsahující aminoskupiny či N-heterocykly. Používají se především u látek na bázi akrylonitrilu.
- 4) Poměrně malou skupinou jsou 1,3-difenyl-2-pyraloziny. Ty se používají k optickému zesvětlení proteinových vláken, acetátu celulózy a polyamidů.
- 5) Pátou skupinou jsou naftalimidy s nejdůležitějším N-methyl-4-methoxynaftalimidem. Díky svým vlastnostem je toto fluorescenční barvivo velmi stabilní a použitelné téměř pro všechny materiály.
- 6) Poslední, šestá, skupina obsahuje všechny sloučeniny, kde je kondenzovaná aromatická skupina přímo spojena s heteroaromatickou skupinou. Typickým zástupcem je 2,4-dimethoxy-6-(1'-pyrenyl)-1,3,5-triazin [48].



Obrázek 13 - Druhy optických zjasňovacích prostředků [48]

### 1.5.2. LEUCOPHOR AL, UKO, SAC

Zjasňující prostředky Leucophor vyrábí společnost Archoma, která nabízí kompletní řadu těchto látek vyrobených tak, aby vyhovovaly požadavkům na papírenský průmysl. Výrobky Leucophor tak umožňují výrobcům, nejen recyklovaného, papíru dosáhnout vysoké úrovně bělosti a jasů. Tyto, námi zkoumané, produkty obsahují aniontové disulfonované, tetrasulfonované a hexasulfonované skupiny.

Leucophor AL je disulfonované optické zjasňující činidlo obsahující močovinu pro zásobní a natírací aplikace. Leucophor SAC je hexasulfonovaný optický zjasňovač, neobsahující močovinu, pro maximální bělost ve velkoobjemovém tisku a potahování. Leucophor UKO je tetrasulfonovaný optický zjasňovač s neutrálním odstínem, používá se ve velkoobjemovém tisku a nátěrových přípravcích. Vykazuje dobrou kompatibilitu s komerčními škroby a dobrou stabilitu vůči kyselinám a zásadám [49].

### 1.5.3. STANOVENÍ OPTICKÝCH ZJASŇOVACÍCH PROSTŘEDKŮ

Stanovení optických zjasňovačů v kartonech a lepenkách určených pro styk s potravinami určuje česká technická norma ČSN EN 648. Tato česká norma je obdobou evropské normy EN 648:2006. Vzorek je nasycen zkušební kapalinou a zatíží se na stanovenou dobu. Zkušebními kapalinami jsou destilovaná či deionizovaná voda, zředěná kyselina octová, simulat slin a olivový olej podle očekávaného druhu styku s potravinou. Výluh je pak pod UV lampou vizuálně vyhodnocen srovnáním se sérií srovnávacích papírů [50].

Stanovení optických zjasňovačů pomocí separačních technik bylo publikováno v několika pracích [51-55]. V jedné z prací na stanovení optických zjasňujících prostředků se tyto produkty stanovují pomocí kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií, konkrétně pak kvadrupól a analyzátor doby letu v tandemovém uspořádání. Dosavadní práce se totiž zabývaly pouze fluorescenční spektroskopií, či kapalinovou chromatografií s UV detekcí, které však nejsou selektivní a neposkytují informace o chemických strukturách sloučenin. Navíc je příliš diskutabilní použití vhodných rozpouštědel při chromatografických technikách, kde se analytici rozdělili do dvou táborů. Jedni doporučují používání organických rozpouštědel, zatímco druzí tvrdí, že ideálním rozpouštědlem je voda. Výsledky z práce s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií ukazují, že nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci optických zjasňujících prostředků z komerčních papírů je vroucí voda. Dále používali elektronovou ionizaci s pozitivním i negativním iontem pro pozorování přímých hmotnostních spekter jak pro standardy, tak pro extrakty z papírových výrobků. Nejběžnější ionizací pro stanovení optických zjasňovačů je elektronová ionizace. Tetrasulfonovaný optický zjasňovač na bázi stilbenu zde poskytoval hmotu  $m/z$  1075 v režimu negativních iontů a hodnotu  $m/z$  1077 v režimu pozitivních iontů. Analýza LC-MS optických zjasňovačů v papírových extraktech ukázala, že mohou existovat jak *cis*, tak *trans* formy. Tato izomerace však může nastat, když jsou roztoky optických zjasňovačů vystaveny přirozenému světlu [51].

Další z prací popisuje stanovení jedenácti optických zjasňovačů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzními fázemi, tak i za použití radiálně stlačených HPLC kolon. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a methanolem ve vodě s 0,05 M fosfátovým pufrům. UV detekce byla nastavena na 340 nm a poskytovaly citlivost v rozmezí 0,05 a 2 % [52].

Můžeme se také dočíst, že pro stanovení optických zjasňujících prostředků, konkrétně pro disulfo-, tetrasulfo- a hexasulfo- fluorescenční bělicí prostředky, v papíru a kartónu lze využít kapilární elektroforézy. Vzorky se analyzovaly ve 100 mM octanu amonném o  $\text{pH} = 9$ . Použitý byl UV detektor se skenováním mezi 195 a 365 nm. Výsledky zjištěné touto studií se shodovaly s výsledky dosaženými pomocí kapalinové chromatografie [53].

Optické zjasňující prostředky se nepoužívají pouze v recyklovaných papírech, ale také v pracích prostředcích a jiných detergentech. Právě na pracích prostředcích probíhalo vytvoření metody identifikace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí ultrafialovou, fluorescenční a hmotnostní spektrometrií. K analýze byli vybráni zástupci ze skupin stilbenu, bifenyly, pyrazolinu, oxazolu a deriváty kumarinu. Analýza probíhala na koloně C8 a jako

detektory byly zvoleny ultrafialový a fluorescenční. Při identifikaci látek hmotnostní spektrometrií byly navrženy struktury neznámých zjasňovačů. Při identifikaci byl použit detektor s diodovým polem, čímž lze dosáhnout přesného stanovení známých zjasňovačů i pro koeluující píky [54].

Zjasňující prostředky lze nalézt i ve vodách. Byla vyvinuta metoda pro stanovení prostředků čtyř typů stilbénového základu a jednoho distyrylbifenylového typu v ekologických vzorcích vody. Při této metodě byly zkoumány různé kolonky pro extrakci tuhou fází. Nově vyvinutá kolonka se slabým anexem a sorbentem s reverzní fází poskytuje optimální výsledky pro extrahovaný vzorek. Analyty byly poté identifikovány a kvantifikovány kapalinovou chromatografií s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií v negativním ionizačním módu za použití di-n-hexylamoniumacetátu jako ionpárového činidla v mobilní fází. Přesnost stanovení se pohybovala mezi 68 a 97 %. Metoda byla nakonec použita pro vzorky odpadních vod z čistírny toků a čistíren odpadních vod, kde se tyto látky projevíly [55].

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. CHEMIKÁLIE

Jako mobilní fáze se v kapalinové chromatografii používal převážně acetonitril (Honeywell, Německo), pufr octanu amonného v různých koncentracích (Sigma-Aldrich, Nizozemí) a voda čištěná pomocí Milli-Q Reference System (MERCK, Německo). Při jednom z měření byla jako mobilní fáze použita také 0,2 % (v/v) kyselina mravenčí (TCI Europe, Belgie) ve vodě. Jako standardy byly použity vzorky Leucophoru AL, SAC a UKO dodány přímo od firmy Huhtamaki (Příbraslavice, Česká republika). Pro proměření mrtvého objemu se používala thiomocovina (Lachema, Česká republika) a acenaften (Sigma Aldrich, USA).

Jako vzorky použité při stanovení optických zjasňovačů v reálných produktech byly použity bílý kartón od vajec, šedý kartón od vajec a kancelářský papír.

### 2.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

UV-VIS spektra pro určení absorpčního maxima u analýz v kapalinové chromatografii byly proměřeny na spektrofotometru Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Při navažování chemikálií a reálných vzorků byly použity analytické váhy (Sartorius, Česká republika). Pro homogenizaci vzorku byl použit ultrazvuk Bandelin Sonorex (Bandelin, Německo). Výluhy reálných vzorků byly odstředěny na centrifuze Micro High Speed Jet Biofil (MERCY, Česká republika). Samotné experimenty byly provedeny na kapalinovém chromatografu s UV detekcí a autosamplerem Agilent Technologies 1290 Infinity II (Waldbronn, Německo). Hmotnostní spektra jednotlivých standardů byly zjištěny pomocí hmotnostního spektrometru QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA). Kolony použité v kapalinové chromatografii jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 - použité kolony

Číslo kolony	Název kolony	Výrobce	Rozměry (mm)	Velikost částic (µm)
1.	Ascentic® RP AMIDE	Sigma-Aldrich (Bellefonte, USA)	150 x 1	3
2.	Kinetex® HILIC 100 Å	Phenomenex (USA)	100 x 2,1	1,7
3.	Ascentic® Express OH <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich (Bellefonte, USA)	100 x 2,1	2,7

## 2.3. PRACOVNÍ POSTUPY

### 2.3.1. PŘÍPRAVA STANDARDŮ

Příprava standardů pro měření ať už na kapalinové chromatografii či hmotnostní spektrometrii spočívala pouze v napipetování 10  $\mu$ l koncentrovaného standardu SAC, UKO a AL do vialky a doplněno 1,5 ml 50 % (v/v) acetonitrilu ve vodě, v případě měření na hmotnostní spektrometrii byly standardy rozpuštěny v destilované vodě.

### 2.3.2. PŘÍPRAVA REÁLNÝCH VZORKŮ

Reálné vzorky byly připraveny následovně. V 500 ml destilované vody byl karton či papír (v obou případech 1 dm<sup>2</sup>) namočen na 24 hodin. Tento výluh byl následně odstředěn na centrifuze a čistý výluh byl analyzován jak na kapalinové chromatografii s UV detekcí, tak i ve spojení s hmotnostní spektrometrii.

### 2.3.3. MĚŘENÍ SPEKTER NA UV-VIS SPEKTROMETRII

Nañeděné standardy optických zjasňovačů (SAC, UKO, AL) byly postupně vloženy do skleněné kyvety UV-VIS spektrometru, kde bylo následně proti blanku (destilovaná voda) změřeno UV-VIS spektrum standardů v rozsahu vlnových délek 200-600 nm.

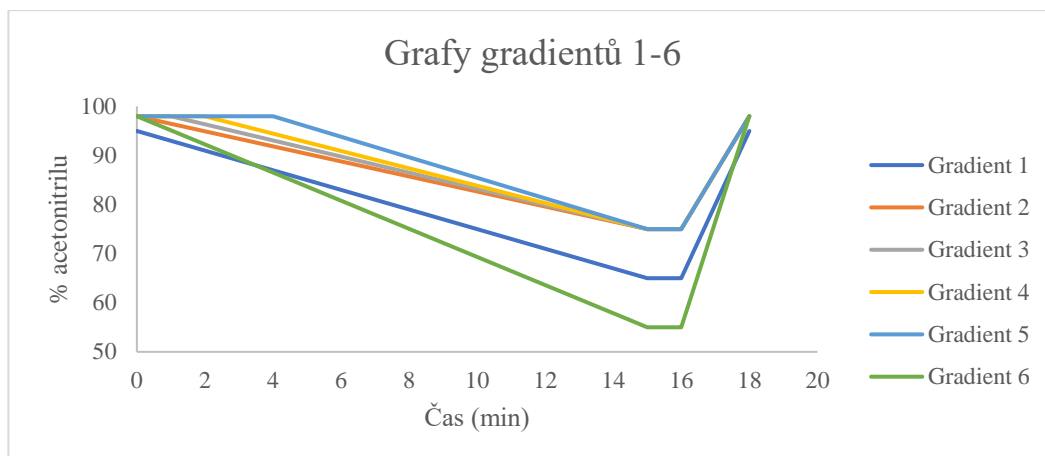
### 2.3.4. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Analýza optických zjasňovačů byla provedena jak v systému s obrácenými fázemi, tak v HILIC systému. Separace probíhala na koloně amidové v případě RP systému a na kolonách Kinetex® HILIC a OH<sub>5</sub> kolona v HILIC systému. Všechna měření byla analyzována při vlnové délce 350 nm a teplotě kolony 25 °C. Jako mobilní fáze byla použita destilovaná voda a acetonitril, 0,2 % (v/v) kyselina mravenčí v destilované vodě a acetonitril nebo pufr octanu amonného v různých koncentracích (50 a 75 mM) a acetonitril. Poměry těchto mobilních fází se měnily a jsou uvedeny v tabulce 2 a na obr. 8-10. V případě obrácených fází byl průtok mobilní fáze nastaven na 0,1 ml/min a nástřik vzorku na 0,1  $\mu$ l, v HILIC systému byl průtok 0,3 ml/min a nástřik vzorku činil 0,2  $\mu$ l.

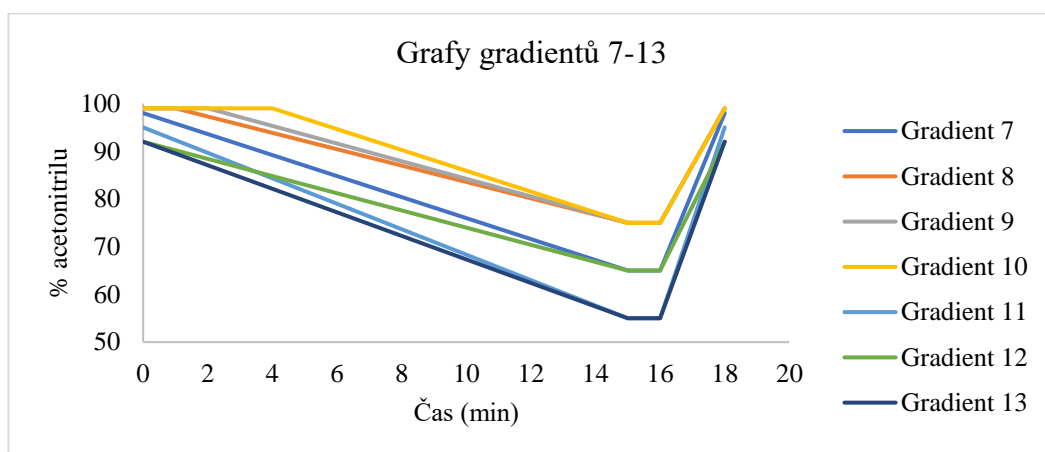
Tabulka 2 - tabulka použitých gradientů. Gradienty označené číslicí se používaly v HILIC systému, zatímco gradienty označené písmenem byly použity v systému s obrácenými fázemi. Mobilní fáze A se měnila, B je vždy acetonitril. Hodnoty ve sloupcích A a B vyjadřují objemové % dané složky mobilní fáze.

Gradient 1			Gradient 6			Gradient 11		
Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)
0	5	95	0	2	98	0	5	95
15	35	65	15	45	55	15	45	55
16	35	65	16	45	55	16	45	55
18	5	95	18	2	98	18	5	95
Gradient 2			Gradient 7			Gradient 12		
Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)
0	2	98	0	2	98	0	8	92
15	25	75	15	35	65	15	35	65
16	25	75	16	35	65	16	35	65
18	2	98	18	2	98	18	8	92
Gradient 3			Gradient 8			Gradient 13		
Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)
0	2	98	0	1	99	0	8	92
1	2	98	1	1	99	15	45	55
15	25	75	15	25	75	16	45	55
16	25	75	16	25	75	18	8	92
18	2	98	18	1	99			
Gradient 4			Gradient 9			Gradient A		
Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)
0	2	98	0	1	99	0	99	1
2	2	98	2	1	99	2	99	1
15	25	75	16	25	75	20	75	25
16	25	75	16	25	75			
18	2	98	18	1	99			
Gradient 5			Gradient 10			Gradient B		
Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)	Čas (min)	A (%)	B (%)
0	2	98	0	1	99	0	99	1
4	2	98	4	1	99	5	99	1
15	25	75	15	25	75	20	75	25
16	25	75	16	25	75			
18	2	98	18	1	99			

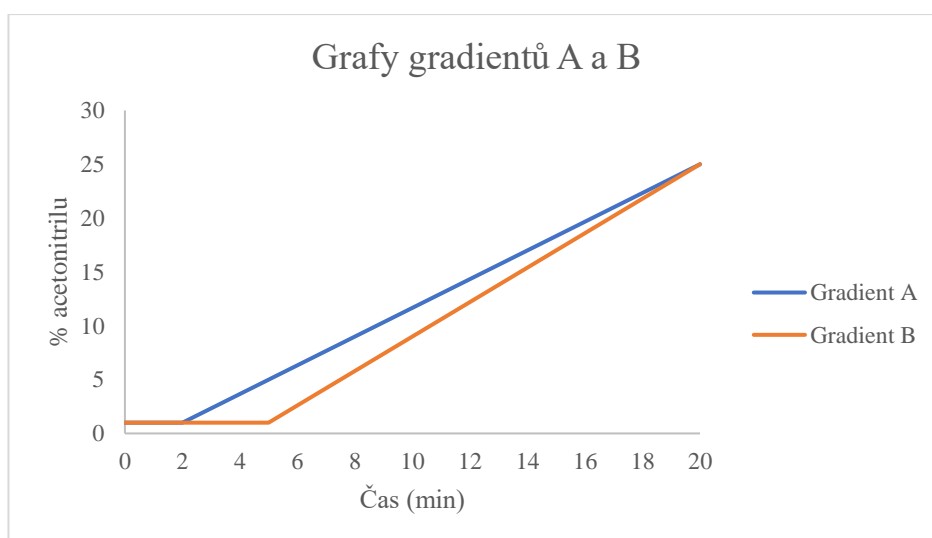




Obrázek 14 - Grafy gradientů 1-6 použitých při měření v HILIC systému



Obrázek 15 - Grafy gradientů 7-13 použitých při měření v HILIC systému



Obrázek 16 - Grafy gradientů A a B použitých při měření v systému s obrácenými fázemi

### 2.3.5. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE VE SPOJENÍ S MS DETEKČÍ

Analýzy standardů a reálných vzorků byly prováděny na koloně Ascentic® Express OH<sub>2</sub> a mobilní fáze byla použita acetonitril a 30 mM pufru octanu amonného. Přestože tato koncentrace nebyla proměřena v HPLC systému se samostatnou UV detekcí, byla zvolena kvůli požadavkům na MS detekci. Gradient byl použit na základě předchozího měření kapalinovou chromatografií a byl tedy zvolen gradient 7 (tab. 2). Standardy byly připraveny klasickým způsobem, rozpuštěním v destilované vodě. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 ml/min a nástřik vzorku činil 1  $\mu$ l.

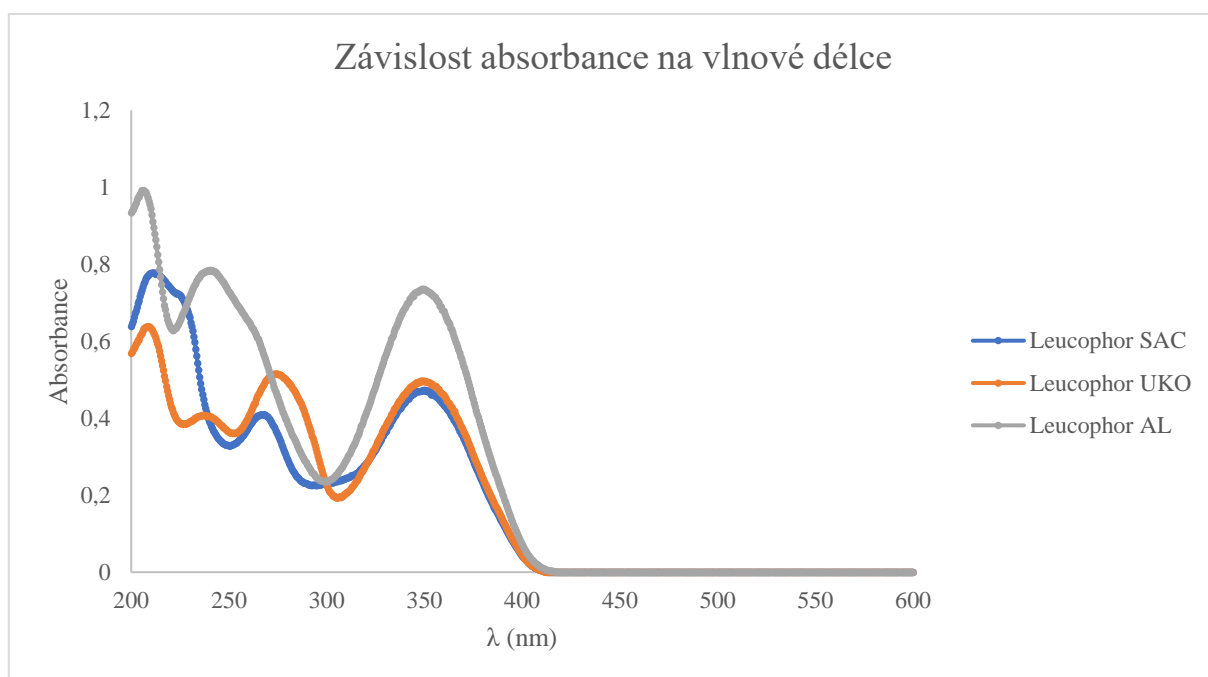
Parametry hmotnostního spektrometru byly nastaveny následovně: měření probíhalo v negativním režimu na lineární iontové pasti, 10 kDa/s, dynamické plnění pasti, záznam spekter 100–1200 m/z, CUR 30 psi, teplota 200 °C, Gas1 60 psi, Gas2 50 psi, ion spray napětí -4500 V, deklasterační potenciál -60 V, vstupní potenciál -10 V a kolizní energie -10 V.

Analýza standardů s přímým vstupem probíhala také v negativním režimu, nicméně na kvadrupólu. Na prvním kvadrupólu byla nastavena rychlost skenu na 1000 Da/s, rozsah 250–1250 m/z, CUR 20 psi, laboratorní teplota, Gas1 20 psi, ion spray napětí -4500 V, deklasterační potenciál -70 V a vstupní potenciál -10 V. Na třetím kvadrupólu byly použity stejné podmínky, jen s rozdílnou rychlostí skenu, která činila 200 Da/s a navíc byla nastavena kolizní energie na -40 V a vstupní potenciál kolizní cely na -10 V. Uvedeným způsobem byly studovány fragmentace standardů a záznam fragmentových spekter sloužil pro navržení struktury.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1. VÝBĚR VHODNÉ VLNOVÉ DÉLKY POMOCÍ UV-VIS SPEKTROMETRIE

Jako první bylo provedeno měření UV-VIS spektra standardů (obr. 17). Ze spektra je patrná výrazná absorpce záření v oblasti 200-400 nm, ovšem každý ze studovaných standardů vykazoval jiná dílčí maxima. Společné absorpční maximum všech látek je při vlnové délce 354 nm. Tato vlnová délka byla použita při nastavení UV-VIS detektoru HPLC.



Obrázek 17 - Závislost absorpance na vlnové délce při měření UV-VIS spektra standardů

#### 3.2. SEPARACE POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

##### 3.2.1. SEPARACE V SYSTÉMU S OBRACENÝMI FÁZEMI

Při měření v kapalinové chromatografii v systému s obrácenými fázemi byla použita kolona amidová. Jednotlivá měření sloužila jako optimalizace, proto byly proměřeny pouze standardy. Mobilní fáze byla zvolena voda a acetonitril, 50 mM octan amonný a acetonitril a byla vyzkoušena také 0,2 % (v/v) kyselina mravenčí a acetonitril. Byly provedeny jak isokratické analýzy, tak i měření s gradientem. V případě isokratického měření s mobilní fází voda – acetonitril byly použity koncentrace 99 %, 98 %, 97 %, 95 %, 90 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % a 1 % acetonitrilu (v/v). Ve stejné mobilní fázi byly standardy analyzovány také pomocí gradientu, kde byly použity gradienty A a B (tab. 2).

Isokratické měření bylo provedeno také v mobilní fázi 50 mM octan amonný a acetonitril. Zde byly analýzy provedeny při 99 % a 90 % acetonitrilu (v/v). V neposlední řadě probíhala na této koloně také analýza s gradientovou elucí (gradient A a B (tab. 2)) v mobilní fázi 0,2 % (v/v) vodném roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Jelikož při většině těchto měření docházelo k opuštění standardu z kolony s mrtvým objemem nebo nebyly analýzy vůbec opakovatelné, přikládám tabulku s jednotlivými časy standardů vyhodnocenými jako průměr ze dvou nebo tří analýz (tab. 3). Čas thiomocoviny činil 1,33 min. Záznamy z měření gradientů v mobilní fázi acetonitril-voda jsou uvedeny na obr. P1-P6 v přílohách.

Tabulka 3 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na amidové koloně v systému s obrácenými fázemi

<b>Mobilní fáze - acetonitril-voda (uvedená procenta ACN)</b>									
	99 %	98 %	97 %	95 %	90 %	60 %	50 %	40 %	30 %
AL	1,51	-	-	1,76	1,32	1,33	1,37	1,43	1,66
UKO	1,49	-	-	1,91	1,33	1,3	1,31	1,33	1,36
SAC	1,48	-	-	2,06	1,34	1,3	1,3	1,31	1,32
	25 %	20 %	15 %	10 %	5 %	3 %	2 %	1 %	
AL	2,1	-	-	-	-	-	-	-	
UKO	1,39	1,44	1,66	2,41	3,39	3,92	4,56	4,86	
SAC	1,33	1,35	1,41	1,51	1,74	1,86	2,04	2,33	
	Gradient A		Gradient B						
AL	2,1		2,1						
UKO	1,41		1,42						
SAC	1,33		1,31						
<b>Mobilní fáze - acetonitril-50 mM octan amonný (uvedená procenta ACN)</b>									
	99 %	90 %							
AL	-	-							
UKO	-	1,35							
SAC	-	1,27							
<b>Mobilní fáze - acetonitril-0,2 % (v/v) kyselina mravenčí (uvedená procenta ACN)</b>									
	Gradient A		Gradient B						
AL	-		1,36						
UKO	-		-						
SAC	-		-						

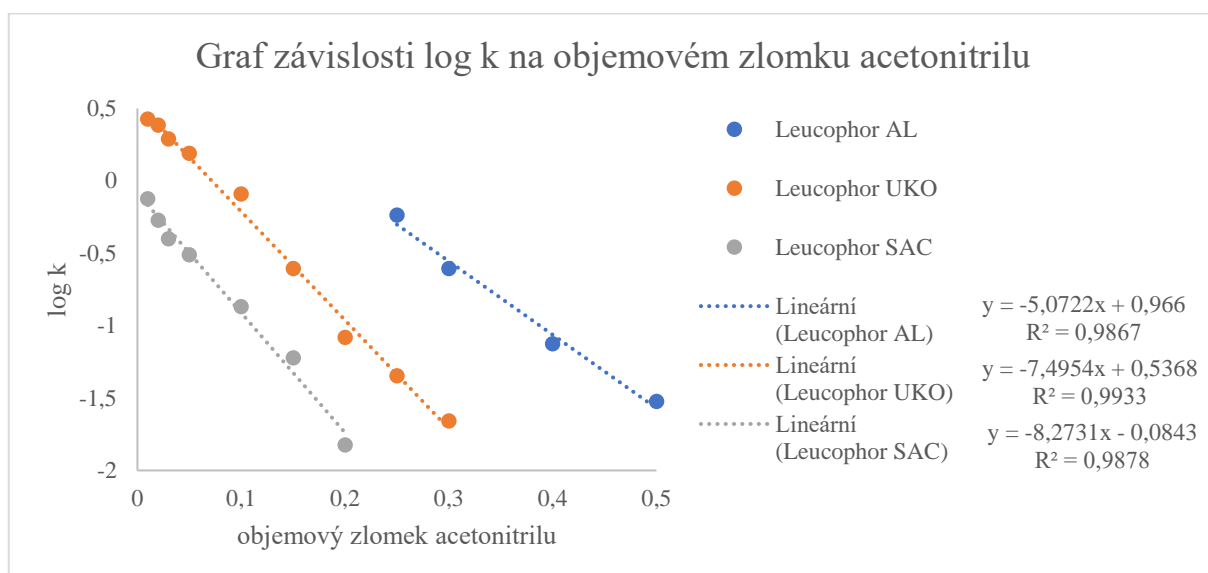
U isokratických analýz v mobilní fázi acetonitril-voda byl od měření v 50 % acetonitrilu (v/v) níže spočten retenční faktor  $k$ , dle vzorce

$$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 \quad (7)$$

kde  $t_R$  je retenční čas látky a  $t_M$  čas thiomocoviny. Retenční faktory jsou uvedeny v tab. 5 a závislost těchto faktorů na objemovém zlomku acetonitrilu uvedena na obr. 18.

Tabulka 4 - Retenční faktory standardů isokratických analýz v systému s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-voda

	AL	UKO	SAC
50	0,03	-	-
40	0,075	-	-
30	0,248	0,022	-
25	0,579	0,045	-
20	-	0,083	0,015
15	-	0,248	0,06
10	-	0,812	0,135
5	-	1,549	0,308
3	-	1,947	0,398
2	-	2,429	0,534
1	-	2,677	0,752



Obrázek 18 - Graf závislosti log k na objemovém zlomku acetonitrilu isokratického měření v systému s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-voda

Z obr. 18 vyplývá, že všechny standardy jsou díky sulfoskupinám v molekule poměrně málo zadržované na stacionární fázi a pro gradientovou eluci je nutné volit počáteční koncentraci acetonitrilu co nejnižší (od 1 %, v/v). Lineární trend závislosti odpovídá mechanismu separace dle hydrofobicity látek.

### 3.2.2. SEPARACE V HILIC SYSTÉMU

Měření v HILIC systému probíhalo na dvou kolonách, a to na Kinetex® HILIC a OH<sub>5</sub> koloně. Pro přehlednost byly výsledky uvedeny do dvou samostatných kapitol.

#### 3.2.2.1. SEPARACE NA KOLONĚ Kinetex® HILIC

Jednotlivé separace sloužily jako optimalizace, proto byly analyzovány pouze standardy. Mobilní fáze byla zvolena 50 mM octan amonný a acetonitril a 75 mM octan amonný a acetonitril. Měřilo se jak isokratické měření, tak měření s gradientem. V případě isokratického měření s mobilní fází 50 mM octan amonný – acetonitril se měřilo při 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, a 70 % (v/v) acetonitrilu. Ve stejné mobilní fázi byly standardy separovány také pomocí gradientu, kde byly použity gradienty 1, 2, 3, 4 a 5, 8, 9 a 10 (tab. 2). Isokratické měření bylo provedeno také v mobilní fázi 75 mM octan amonný a acetonitril. Zde bylo měřeno při 85 % a 80 % (v/v) acetonitrilu. Také v této fázi byla provedena gradientová eluce, a to za použití gradientu 3, 4, 5, 8, 9 a 10 (tab. 2). Jelikož také zde docházelo ve většině případů k opuštění standardu z kolony s mrtvým objemem nebo nebyly analýzy vůbec interpretovatelné (opakovatelné), přikládám tabulku s jednotlivými časy vyhodnocenými jako průměr ze dvou až tří měření (tab. 5). Čas acenaftenu, použitého jako marker mrtvého objemu kolony, činil 0,91 minut. Záznamy analýz určitých gradientů jsou uvedeny na obr. P7-P27 v přílohách.

Tabulka 5 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na koloně HILIC Kinetex v systému HILIC

<b>Mobilní fáze - acetonitril-50 mM octan amonný (uvedena procenta ACN)</b>						
	<b>90 %</b>	<b>85 %</b>	<b>80 %</b>	<b>75 %</b>	<b>70 %</b>	
<b>AL</b>	0,83	0,8	0,8	0,8	0,8	
<b>UKO</b>	3,68	1,14	0,89	0,82	0,79	
<b>SAC</b>	0,8	1,15	-	1,51	0,91	
	<b>Gradient 1</b>		<b>Gradient 2</b>		<b>Gradient 3</b>	<b>Gradient 4</b>
<b>AL</b>	0,79		0,83		0,83	0,84
<b>UKO</b>	0,78		0,8		-	-
<b>SAC</b>	0,84		-		-	-
	<b>Gradient 5</b>		<b>Gradient 8</b>		<b>Gradient 9</b>	<b>Gradient 10</b>
<b>AL</b>	0,84		1,1		1,11	1,1
<b>UKO</b>	-		-		-	-
<b>SAC</b>	-		-		-	-
<b>Mobilní fáze - acetonitril-75 mM octan amonný (uvedena procenta ACN)</b>						
	<b>85 %</b>	<b>80 %</b>				
<b>AL</b>	0,8	0,84				
<b>UKO</b>	1,13	1,03				
<b>SAC</b>	-	-				
	<b>Gradient 3</b>		<b>Gradient 4</b>		<b>Gradient 5</b>	
<b>AL</b>	0,96		0,95		0,95	
<b>UKO</b>	0,85 ; 10,61		11,15		12,15	
<b>SAC</b>	13,84 ; 17,6		14,24 ; 17,7		-	
	<b>Gradient 8</b>		<b>Gradient 9</b>		<b>Gradient 10</b>	
<b>AL</b>	1,12		1,12		1,12	
<b>UKO</b>	10,93		11,39		12,25	
<b>SAC</b>	14,07 ; 17,59		14,42 ; 17,76		-	

### 3.2.2.2. SEPARACE NA KOLONĚ OH<sub>5</sub>

Jednotlivá měření sloužila jako optimalizace, proto byly proměřeny pouze standardy. Mobilní fáze byla zvolena 75 mM octan amonný a acetonitril. Měřilo se jak isokratické měření, tak měření s gradientem. V případě isokratického měření se měřilo při 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, a 70 % (v/v) acetonitrilu. Gradientová eluce byla měřena za gradientů 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 13 (tab. 2). Pro přehlednost výsledků je uvedena tabulka s časy standardů vyhodnocenými jako průměr ze dvou nebo tří analýz (tab. 6). Čas acenaftenu, použitého jako marker mrtvého objemu kolony činil 0,9 minut. Záznamy analýz s gradientovou elucí jsou uvedeny na obr. P28-P63 v přílohách.

Tabulka 6 - Časy standardů při jednotlivých měřeních na koloně OH5 v systému HILIC

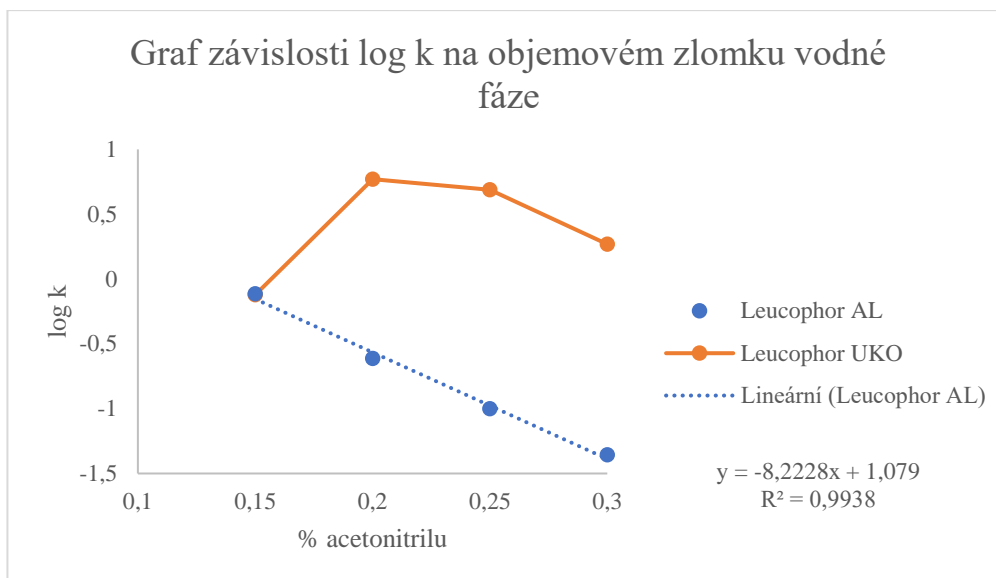
<b>Mobilní fáze - acetonitril-75 mM octan amonný (uvedena procenta ACN)</b>						
	<b>90 %</b>	<b>85 %</b>	<b>80 %</b>	<b>75 %</b>	<b>70 %</b>	
<b>AL</b>	4,7	1,59	1,12	0,99	0,94	
<b>UKO</b>	-	1,58	6,2	5,29	2,57	
<b>SAC</b>	-	-	-	-	2,65	
	<b>Gradient 1</b>		<b>Gradient 3</b>		<b>Gradient 4</b>	<b>Gradient 5</b>
<b>AL</b>	5,38		9,15		9,8	11,08
<b>UKO</b>	13,22		14,78		15,33	16,19
<b>SAC</b>	5,48 ; 13,29		-		-	-
	<b>Gradient 6</b>		<b>Gradient 7</b>		<b>Gradient 8</b>	<b>Gradient 9</b>
<b>AL</b>	5,66		6,77		9,54	10,16
<b>UKO</b>	11,36		13,74		15,02	15,46
<b>SAC</b>	5,73 ; 11,4 ; 15,45		6,79 ; 13,81		-	-
	<b>Gradient 10</b>		<b>Gradient 11</b>		<b>Gradient 12</b>	<b>Gradient 13</b>
<b>AL</b>	11,39		4,18		3,34	1,27
<b>UKO</b>	16,25		10,77		12,51	10,07
<b>SAC</b>	-		-		12,6	-

U isokratických analýz od měření v 85 % acetonitrilu (v/v) níže spočten retenční faktor k pro disulfonovaný a tetrasulfonovaný standard, dle vzorce 7. Retenční faktory jsou uvedeny v tab. 7 a závislost těchto faktorů na objemovém zlomku vodné fáze uvedena na obr. 19 a 20.

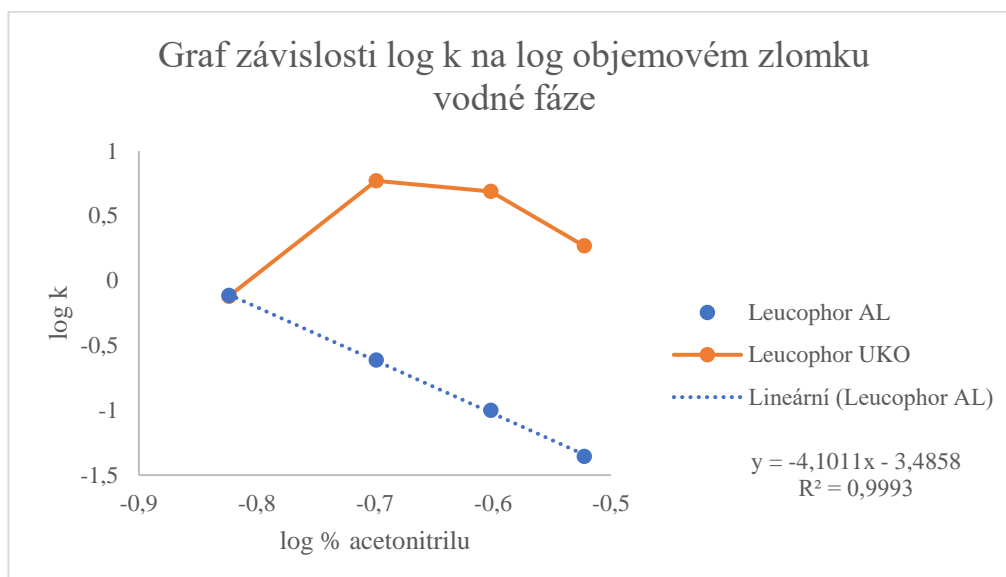
Tabulka 7 - Retenční faktory disulfonovaného a tetrasulfonovaného standardu isokratických analýz v HILIC systému na koloně OH5

	<b>AL</b>	<b>UKO</b>
<b>85</b>	0,767	0,756
<b>80</b>	0,244	5,889
<b>75</b>	0,1	4,878
<b>70</b>	0,044	1,856





Obrázek 19 - Graf závislosti log k na objemovém zlomku vodné fáze isokratického měření v HILIC systému na OH5 koloně



Obrázek 20 - Graf závislosti log k na log objemového zlomku vodné fáze isokratického měření v HILIC systému na OH5 koloně

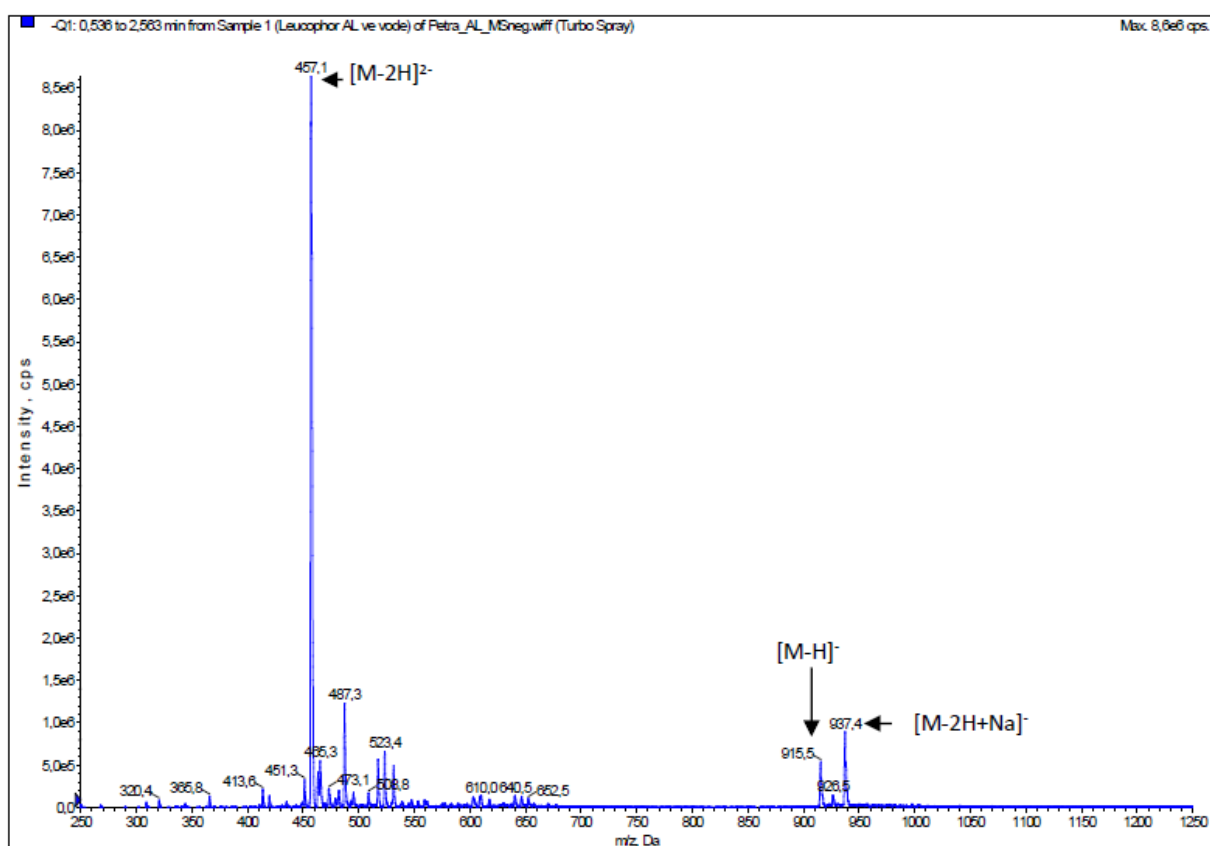
Pro oba záznamy je zřejmé, že pro disulfonovaný Leucophor AL retence lineárně klesá s koncentrací vodné fáze, což odpovídá rozdělovacímu mechanismu HILIC, zatímco nelineární trend u tetrasulfonovaného Leucophoru UKO může být způsoben dalšími vlivy, např. iontovou exkluzí [56].

### 3.2.3. ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII

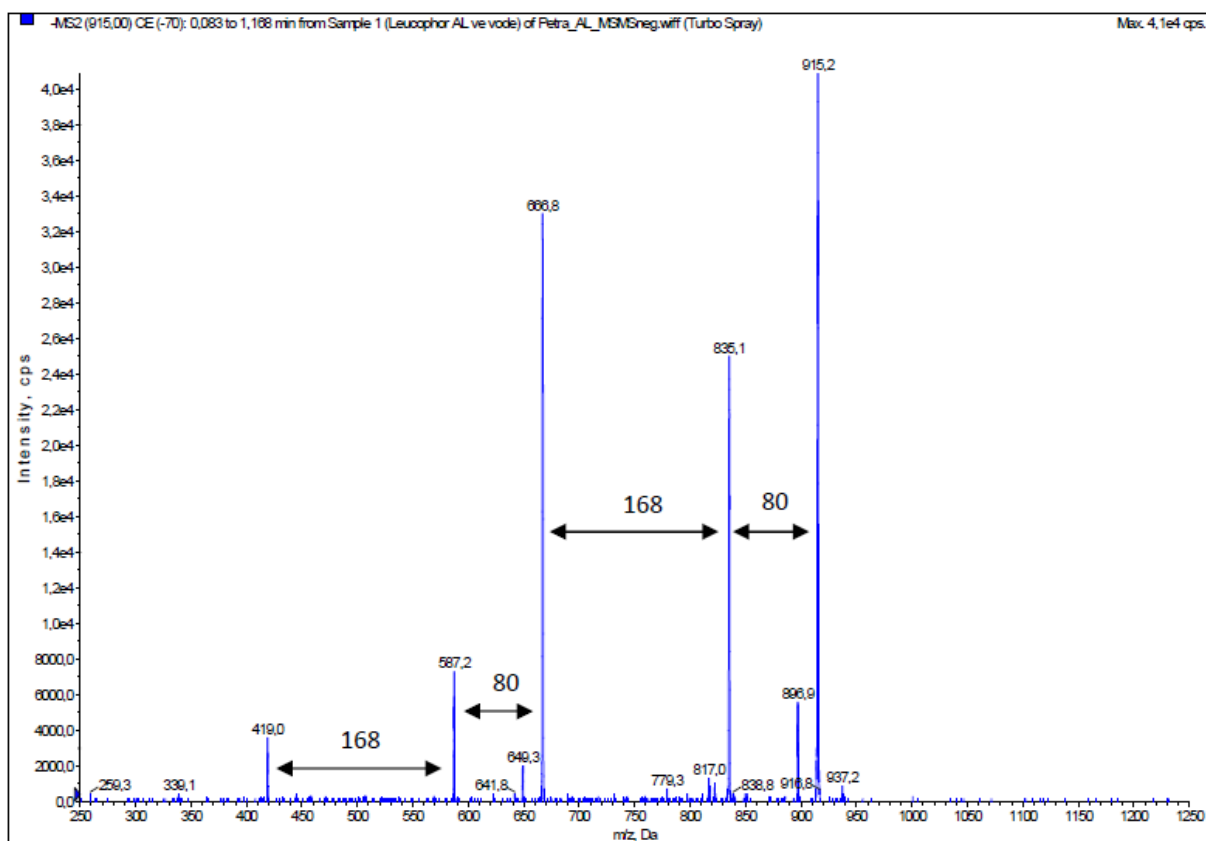
Měření reálných vzorků na kapalinové chromatografii probíhalo z technických důvodů pouze v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub>. Pro reprezentativní výsledky bylo zvoleno i měření v systému s obrácenými fázemi, nicméně došlo k ucpání amidové kolony, proto toto měření neproběhlo. Separace v HILIC systému na OH<sub>5</sub> koloně s UV detekcí byla provedena u gradientů zvolených na základě měření standardů na této koloně, tedy gradientů 1, 6, 7, 11, 12 a 13 (tab. 2). Díky nízkému obsahu zjasňovačů ve vzorcích výluhů nebylo možné s UV detekcí tyto látky identifikovat. Z tohoto důvodu jsme přistoupili ke spojení LC-MS, jehož výsledky jsou uvedeny dále.

### 3.3. URČENÍ MS SPEKTER STANDARDŮ

Standardy byly nejdříve analyzovány pomocí přímého nástřiku. V tomto případě byly vzorky rozpuštěny ve vodě a prováděly se nástřiky všech tří standardů. Spektrum disulfonovaného optického zjasňovače je uvedeno na obr. 21, jeho spektrum MS<sup>2</sup> pak na obr. 22.

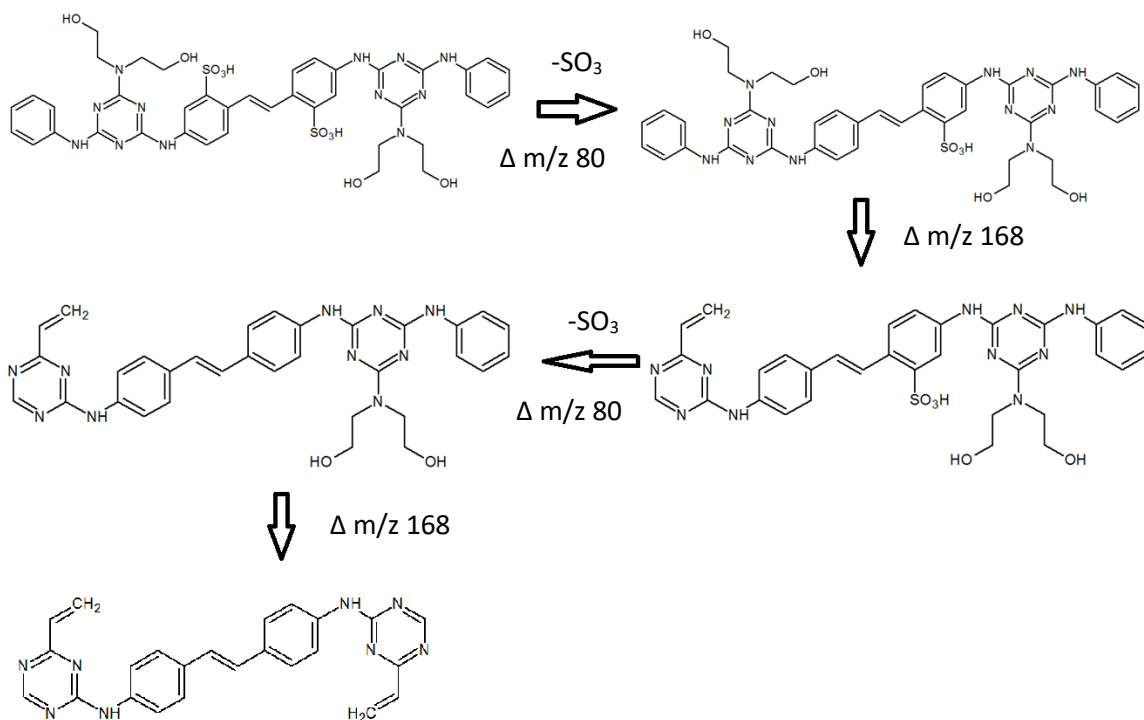


Obrázek 21 - MS spektrum disulfonovaného optického zjasňovače



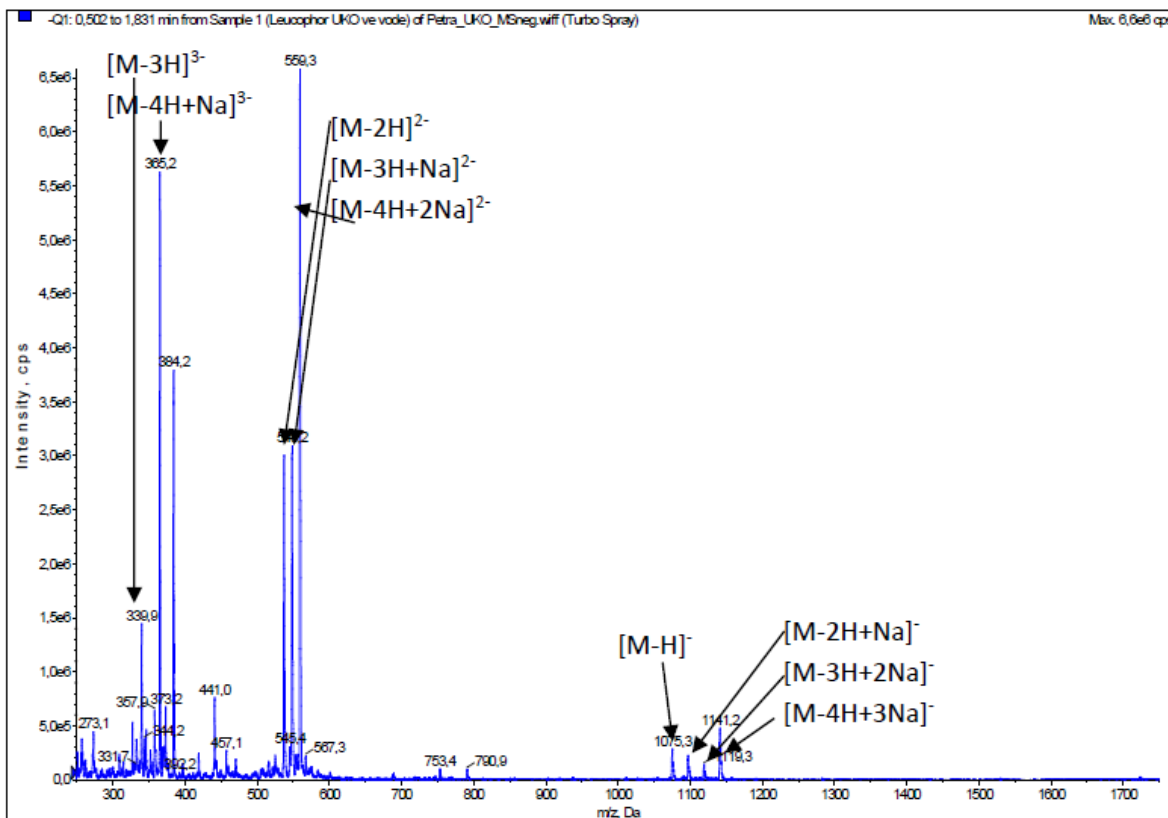
Obrázek 22 - MS/MS spektrum disulfonovaného optického zjasňovače

Ztráta  $\Delta m/z = 80$  představuje ztrátu skupiny  $\text{SO}_3$  a při ztrátě  $\Delta m/z = 168$  dochází jak k odštěpení skupin, tak k přesmyku molekuly. Z tohoto důvodu uvádím možný hypotetický postup jednotlivých ztrát a s tím i předpokládanou strukturu optického zjasňovače (obr. 23) [57].

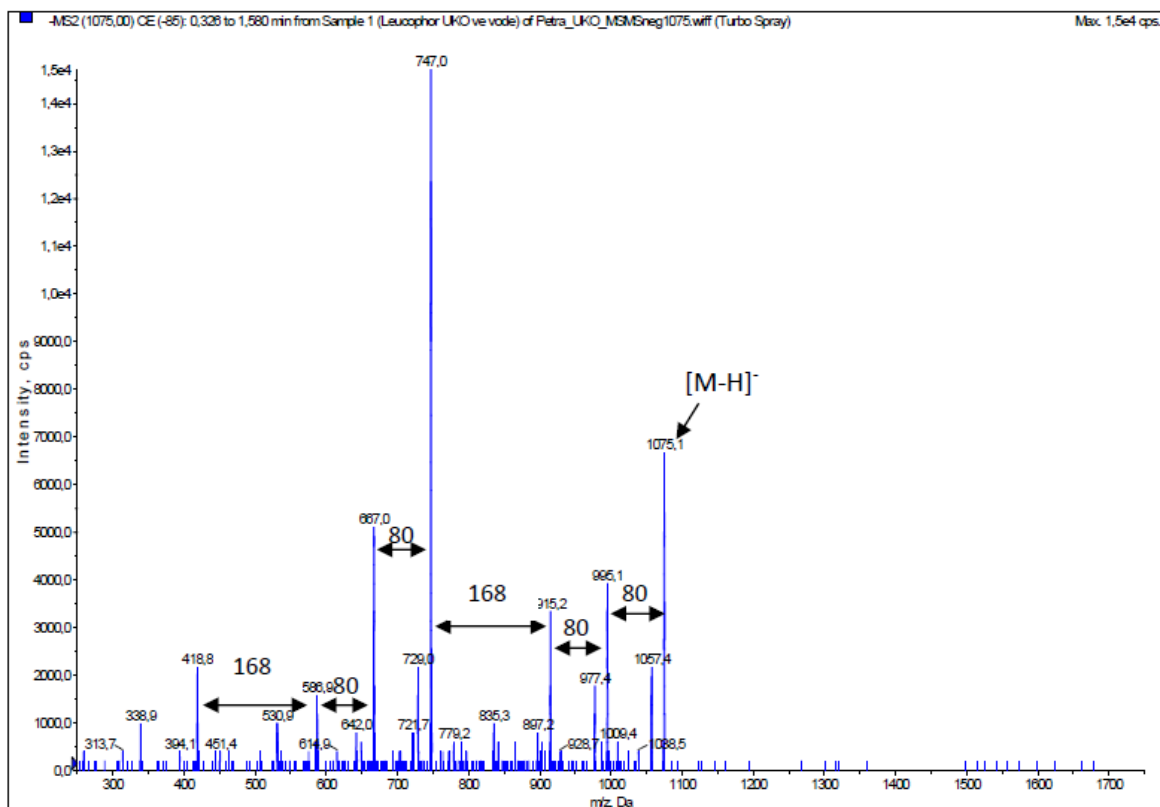


Obrázek 23 - Schéma hypotetických ztrát disulfonovaného optického zjasňovače

Spektrum tetrasulfonovaného zjasňovače a jeho spektrum  $\text{MS}^2$  nalezneme na obr. 24 a 25.



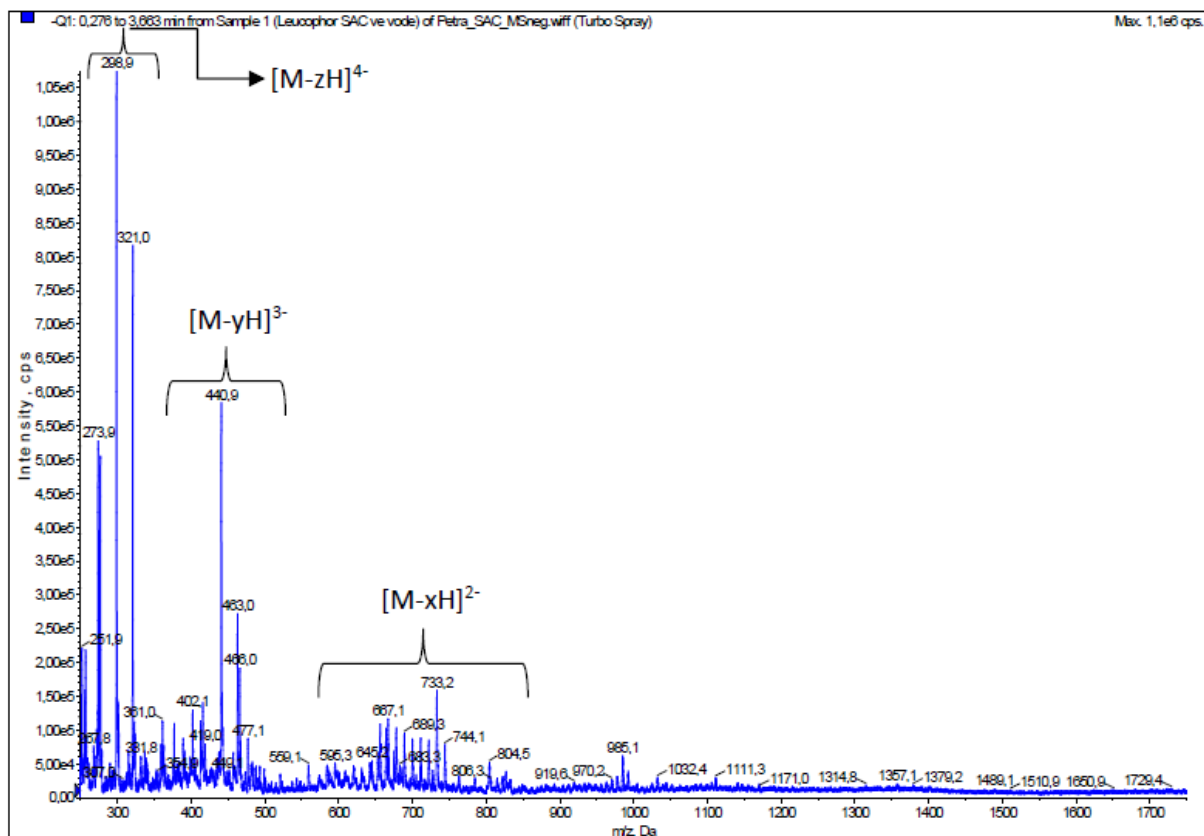
Obrázek 24 -  $\text{MS}$  spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače



Obrázek 25 - MS/MS spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače

Také u tetrasulfonovaného optického zjasňovače je hypotéza jednotlivých ztrát uvedena v obr. 26. Rovněž u této látky jsou ve spektru pozorovány charakteristické ztráty s  $\Delta m/z = 80$  a 168 související s odštěpením oxidu sírového a s přesmykem na triazinové skupině.



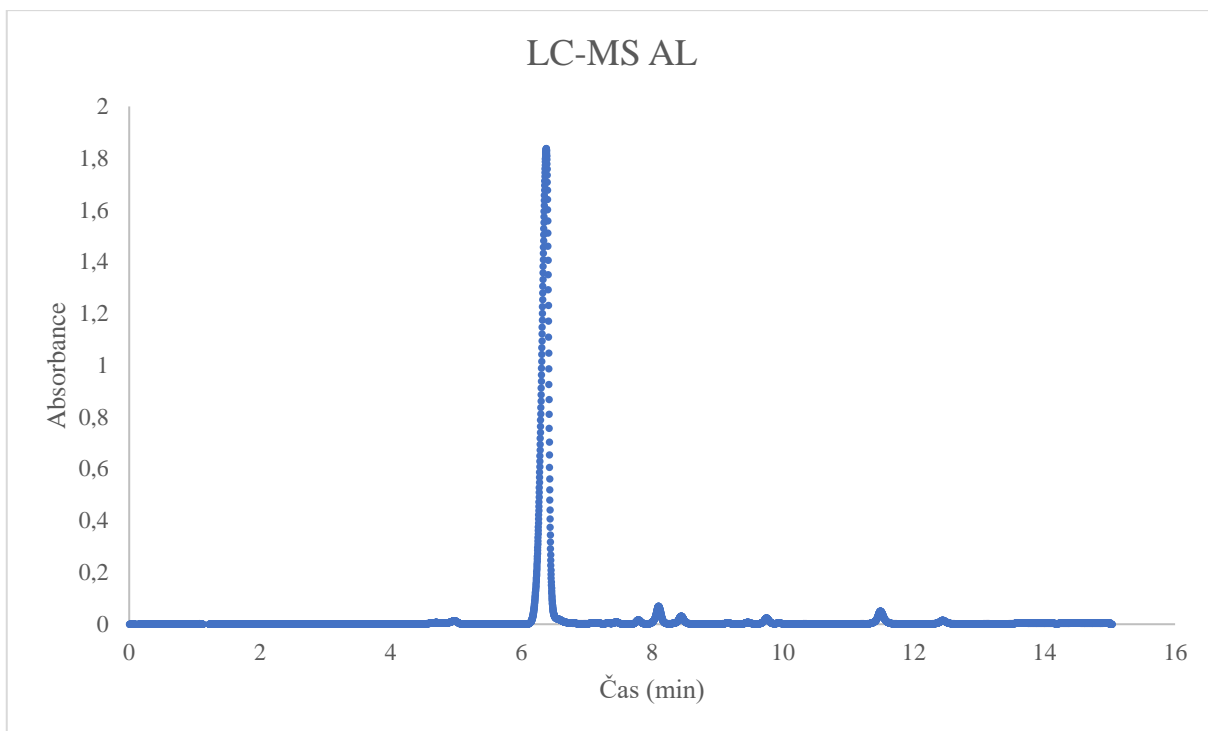


Obrázek 27 - MS spektrum hexasulfonovaného optického zjasňovače

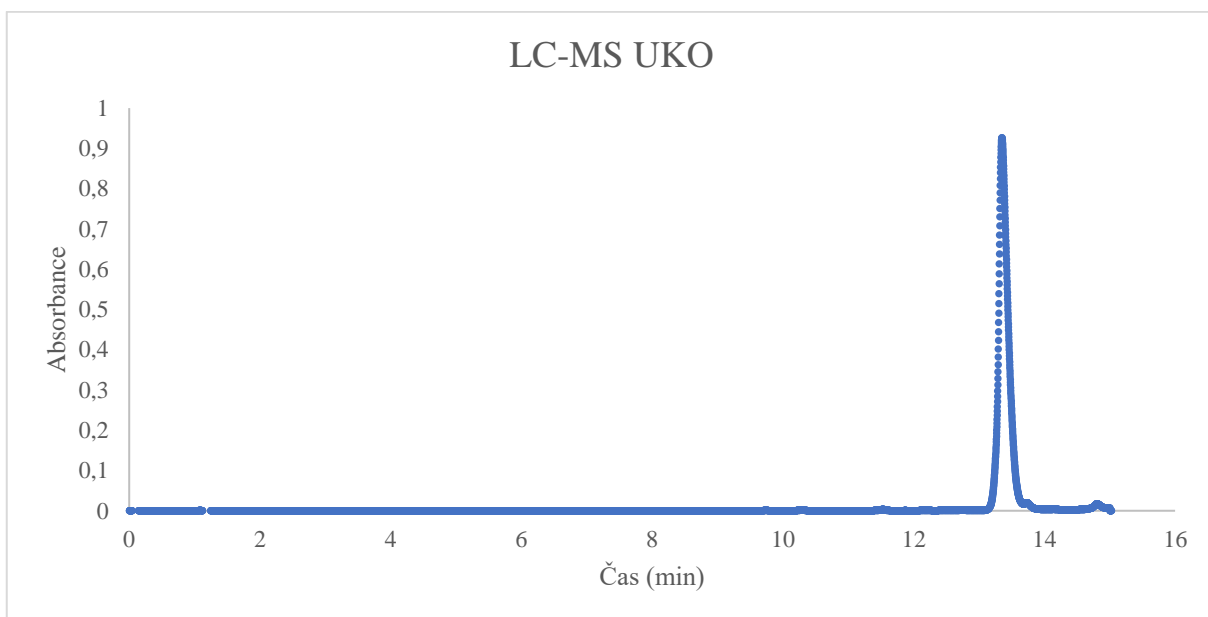
### 3.4. ANALÝZY LC-MS

Reálné vzorky a standardy analyzovány na LC-MS za podmínek uvedených v experimentální části jsou vyhodnoceny právě zde. Protože standardy z MS detektoru jsou vyhodnoceny výše, zde uvedu pouze záznam standardů z UV detektoru, a to v pořadí disulfonovaný (obr. 28), tetrasulfonovaný (obr. 29) a hexasulfonovaný (obr. 30) optický zjasňovač.

Z retenčních časů jednotlivých standardů lze říci, že disulfonovaný zjasňovač opouští kolonu v čase 6,38 min, tetrasulfonovaný v čase 13,34 minut a hexasulfonovaný byl za těchto podmínek pravděpodobně velice silně zadržován v koloně a k jeho eluci v době analýzy nedošlo. V záznamu se přesto vyskytují píky s retenčními časy odpovídajícími disulfonovanému a tetrasulfonovanému zjasňovači, ovšem s podstatně nižší intenzitou. Tyto látky zde mohou být přítomny jako nečistoty.

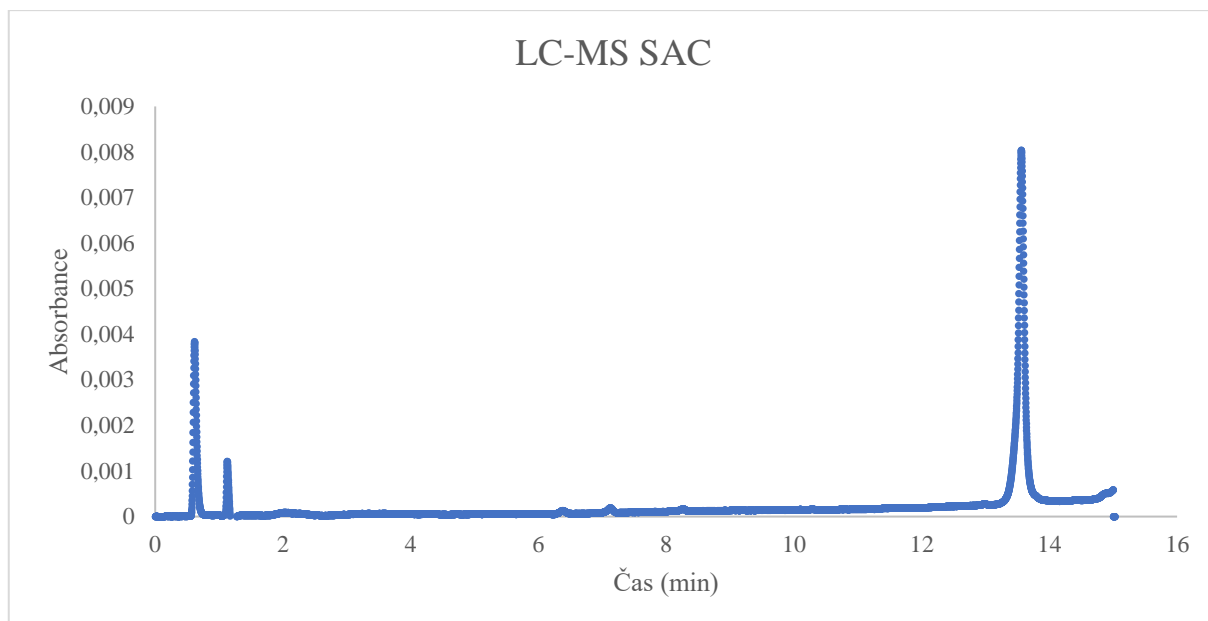


Obrázek 28 - UV spektrum disulfonovaného optického zjasňovače



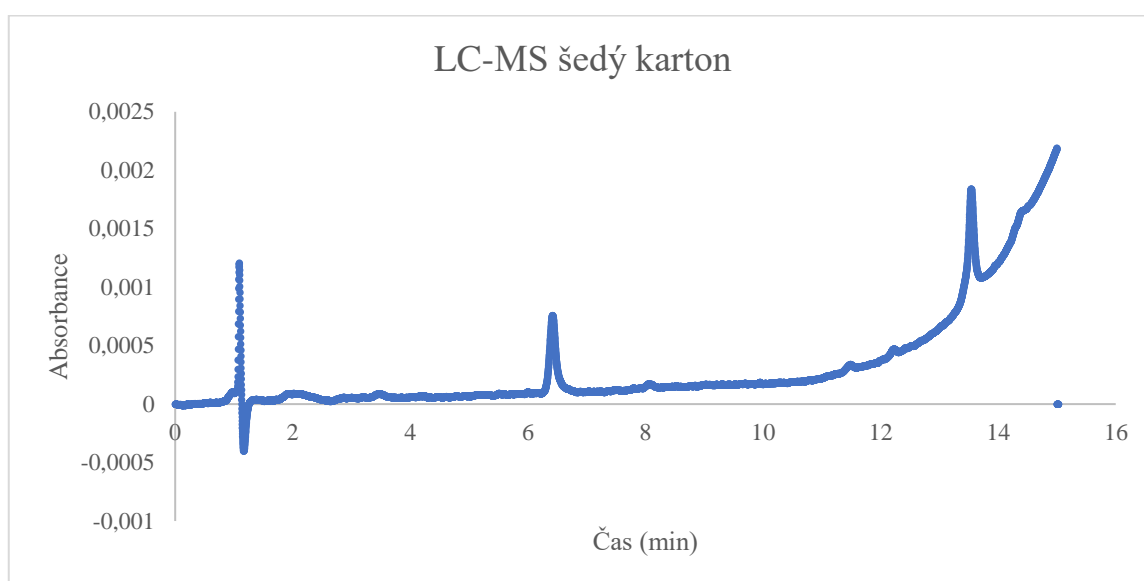
Obrázek 29 - UV spektrum tetrasulfonovaného optického zjasňovače



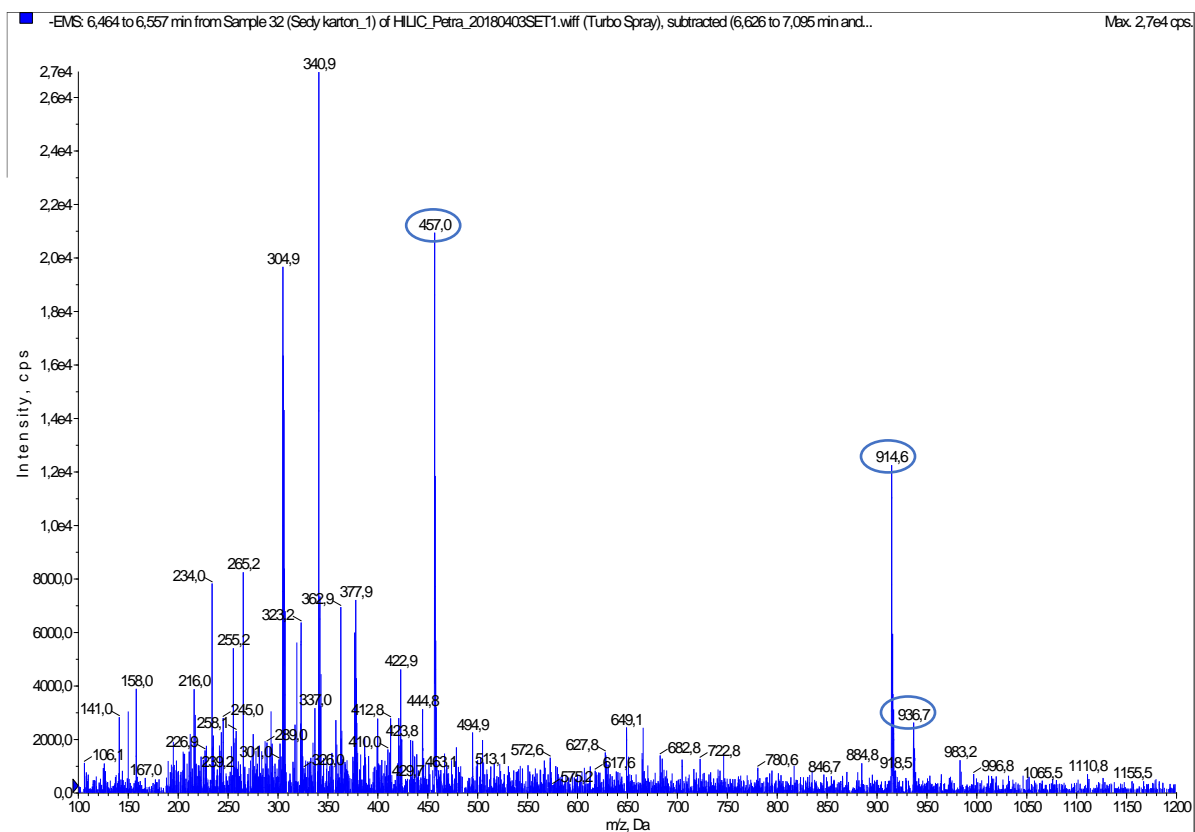


Obrázek 30 - UV spektrum hexasulfonovaného optického zjasňovače

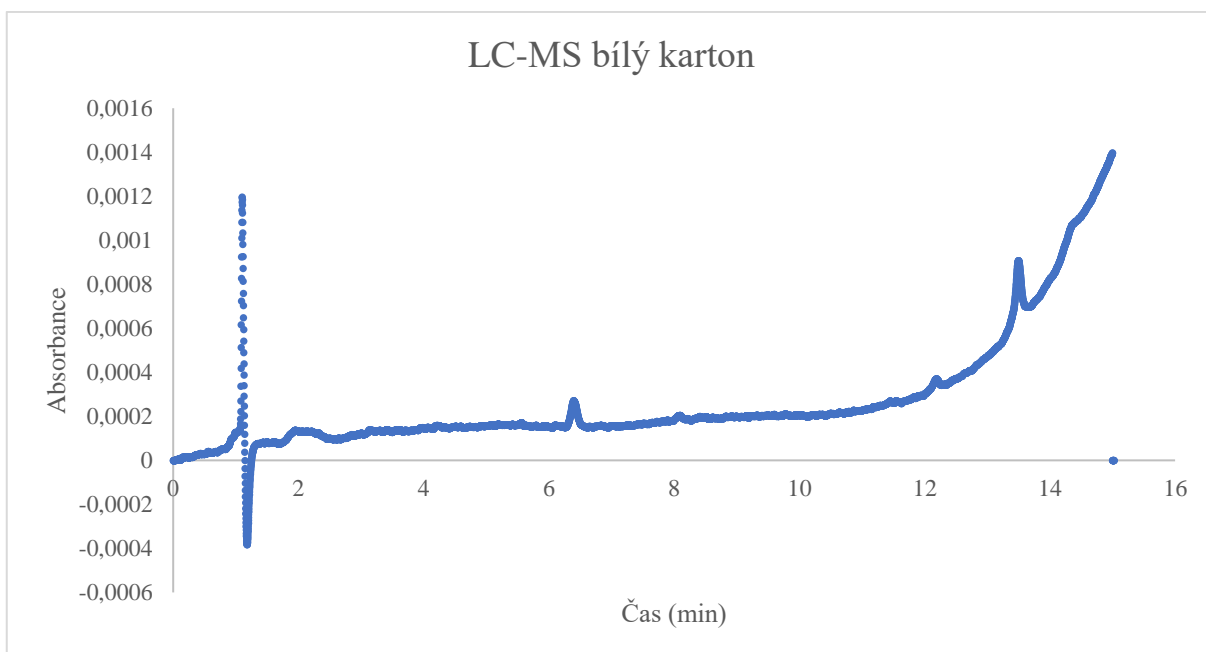
Analýza reálných vzorků probíhala za stejných podmínek jako standardy optických zjasňovačů. V případě reálných vzorků zde uvádím jak výsledky z UV-VIS detektoru (obr. 31, 33 a 35), tak z MS spektrometru (obr. 32, 34 a 36). U šedého kartonu lze podle času odhadnout, že obsahuje disulfonovaný optický zjasňovač. Tento fakt je potvrzen také z hmotnostního spektra. V menší míře lze tento zjasňovač najít také v bílém kartonu a kancelářském papíru. Domnívám se, že tak nízká intenzita není způsobená absencí zjasňujících prostředků v těchto produktech, ale obsazením jiných, než které byly analyzovány.



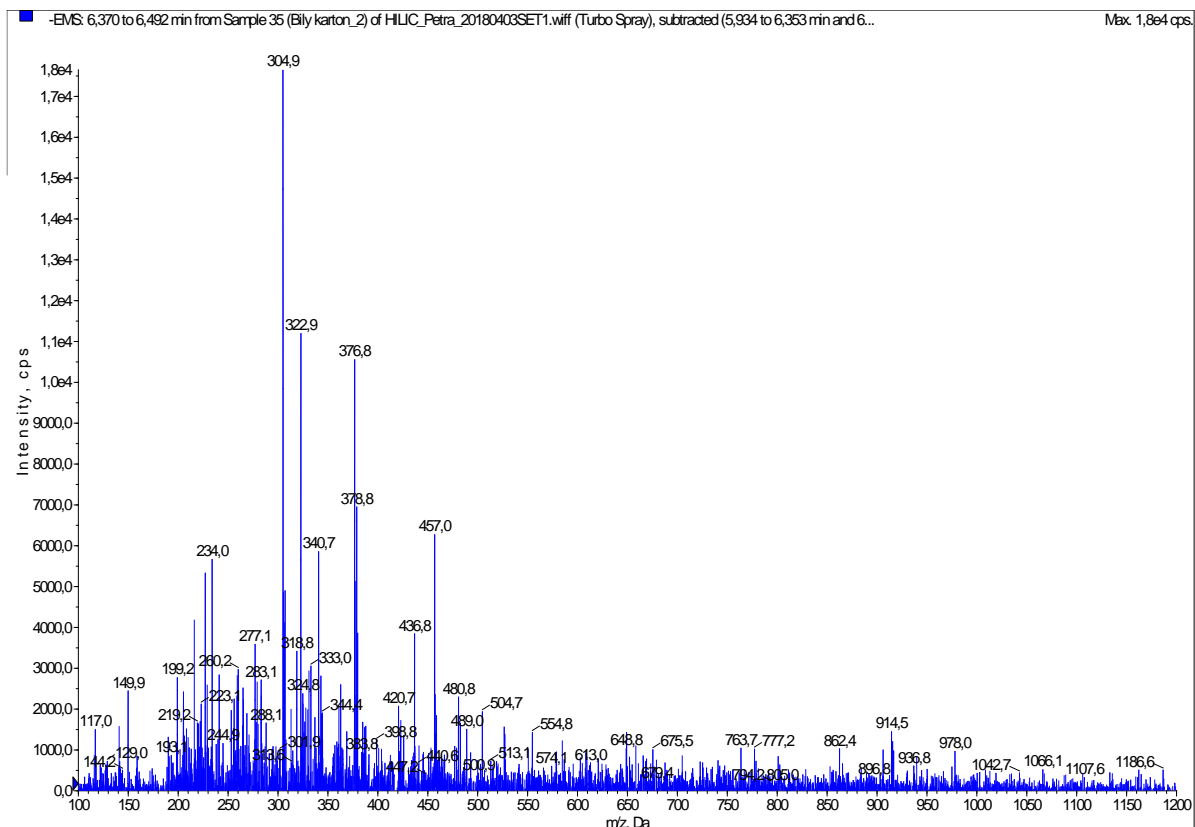
Obrázek 31 - UV spektrum výluhu z šedého kartónu



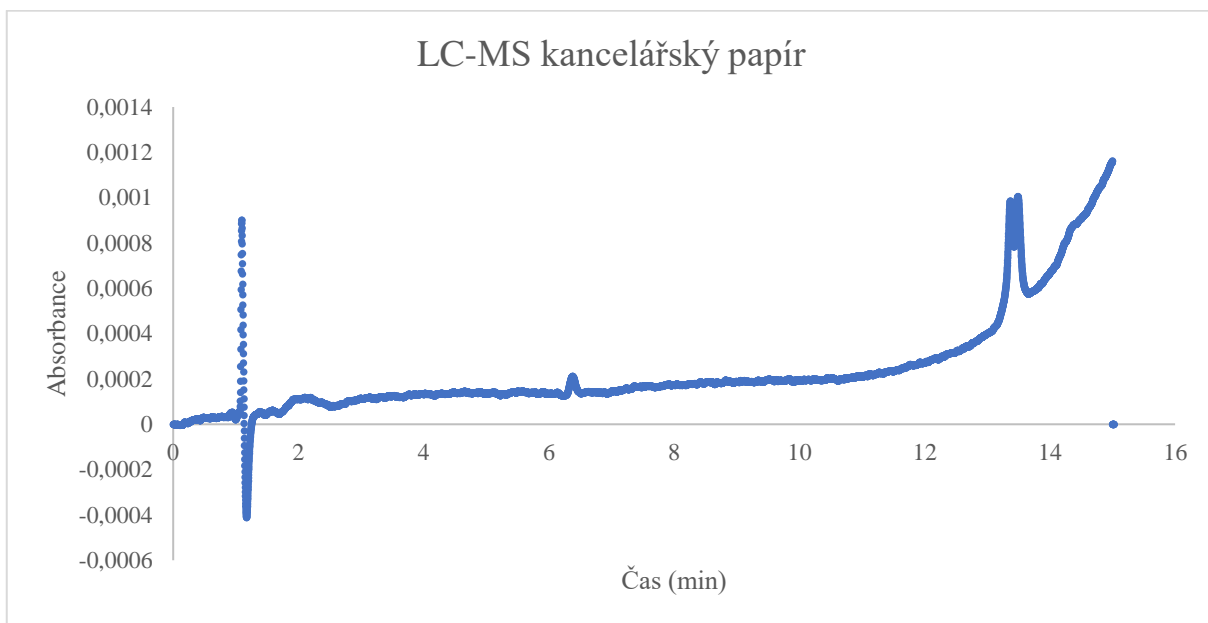
Obrázek 32 - MS spektrum výluhu z šedého kartónu



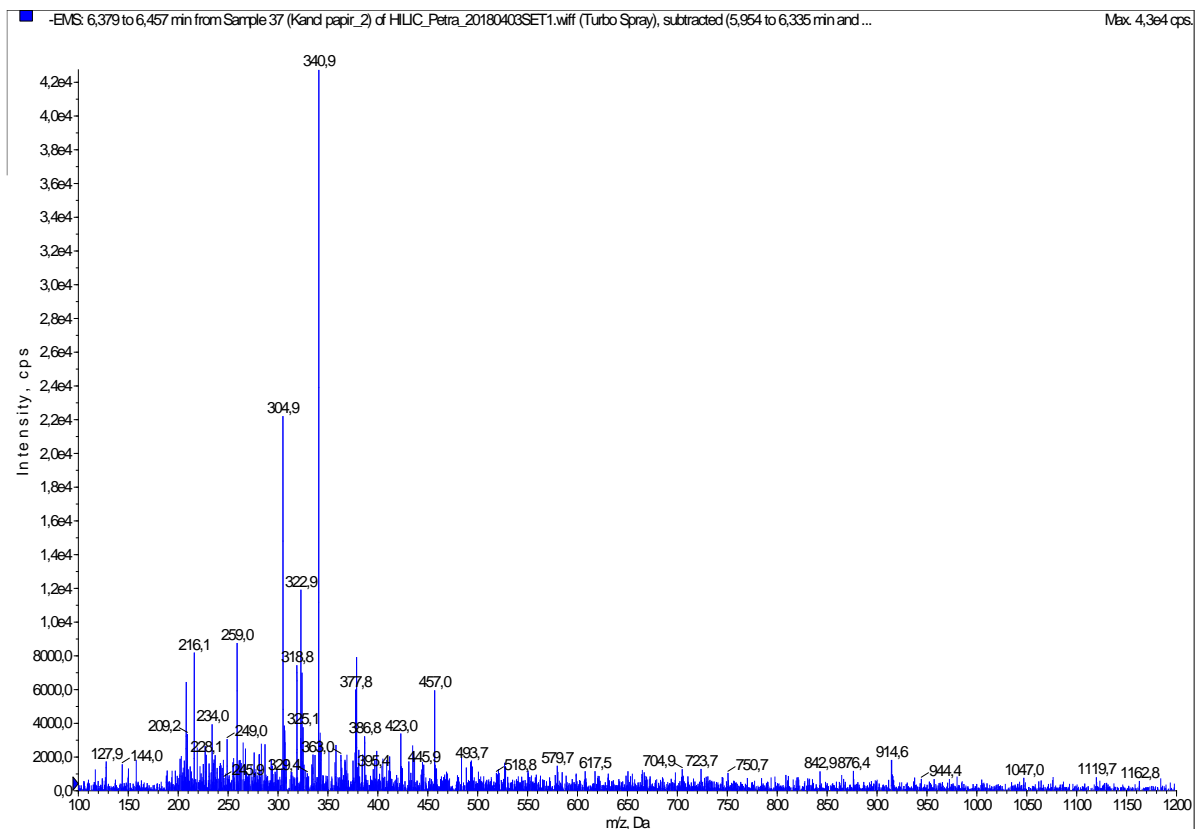
Obrázek 33 - UV spektrum výluhu z bílého kartónu



Obrázek 34 - MS spektrum výluhu z bílého kartónu



Obrázek 35 - UV spektrum výluhu z kancelářského papíru



Obrázek 36 - MS spektrum výluhu z kancelářského papíru

## 4. ZÁVĚR

Úkolem této diplomové práce byla optimalizace metody na stanovení optického zjasňovače na bázi stilbenu, konkrétně pak disulfonovaný, tetrasulfonovaný a hexasulfonovaný. Následně byly proměřeny také dva vzorky kartonového obalu na potraviny z recyklovaného papíru a kancelářského papíru. Zde byly námi studované látky obsaženy pouze v jednom kartonovém obalu. Absence těchto optických zjasňovačů ovšem neznamená, že ostatní produkty nejsou chemicky běleny, je ale použito jiných látek, které nebyly identifikovány.

Chromatografické analýzy probíhaly v systému s obrácenými fázemi a v HILIC systému. Bylo použito třech typů kolon, a to: amidové, HILIC Kinetex a OH<sub>5</sub>. Jako mobilní fáze se používal acetonitril, který se v různých poměrech míchal s vodou, 0,2 % kyselinou mravenčí nebo puforem octanu amonného o různých koncentracích. Nejlepší výsledky poskytovala analýza v HILIC systému s OH<sub>5</sub> kolonou a mobilní fází acetonitril – 75 mM octan amonný.

Na základě analýzy hmotnostní spektrometrií byly také navrženy struktury jednotlivých látek a ve spojení s kapalinovou chromatografií byly námi studované látky hledány v reálných vzorcích.

## 5. LITERATURA

1. **NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P.** *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
2. **MILATA, V. A SEGĚLA, P.** *Spektrálne metody v chémii*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2004. ISBN 80-227-2049-6.
3. **GAUGLITZ, G. and MOORE, D. S.** *Handbook of spectroscopy*. Weinheim: Wiley-VCH, 2014. ISBN 978-3-527-32150-6.
4. **KLOUDA, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
5. **PERKAMPUS, H.** *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlín: Springer, 1992. ISBN 978-3-527-32150-6.
6. <http://slideplayer.cz/slide/5624955/release/woothee>, citováno 19. 3. 2018.
7. [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=52970](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970), citováno 2. 3. 2018.
8. **NOVÁKOVÁ, L. DOUŠA, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
9. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, citováno a upraveno 5. 3. 2018
10. **OPEKAR, F. JELÍNEK, I. RYCHLOVSKÝ, P. PLZÁK, Z.** *Základní analytická chemie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0553-8.
11. **SKOOG, D. A. LEARY, J. J.** *Principles of instrumental analysis*. USA: Saunders College Publishing, 1992. ISBN 0-03-075398-8
12. [http://www.hplc.cz/Teorie/valve\\_injection.html](http://www.hplc.cz/Teorie/valve_injection.html), citováno 5. 3. 2018
13. **SNYDER, L. R. KIRKLAND, J. J. DOLAN, J. W.** *Intoduction to modern liquid chromatography*. USA: Wiley – interscience, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0
14. **FRITZ, J. S. GJERDE, D. T. POHLANDT, C.** *Ion chromatography*. New York: Hüthig, 1982.
15. **ASSHAUER, J. HOLÁSZ, J. J.** *Chromatogr. Sci* 12. 1974. 139.
16. **MARIN, S. J. JONES, B. A. FELIX, W. D. CLARK, J. J.** *Cromatogr. A* 1030. 2004. 255.
17. **SÝKORA, D. TESAŘOVÁ, E. VOSMANSKÁ, M. ZVOLÁNKOVÁ, M.** *Chem. Listy* 101. 2007. 190.
18. **MIYABE, K. GUIOCHON, G. J.** *Chromatogr. A* 903. 2000. 1.
19. <http://www.hplc.cz/teorie/adsorbent.html>, citováno 13. 3. 2018.

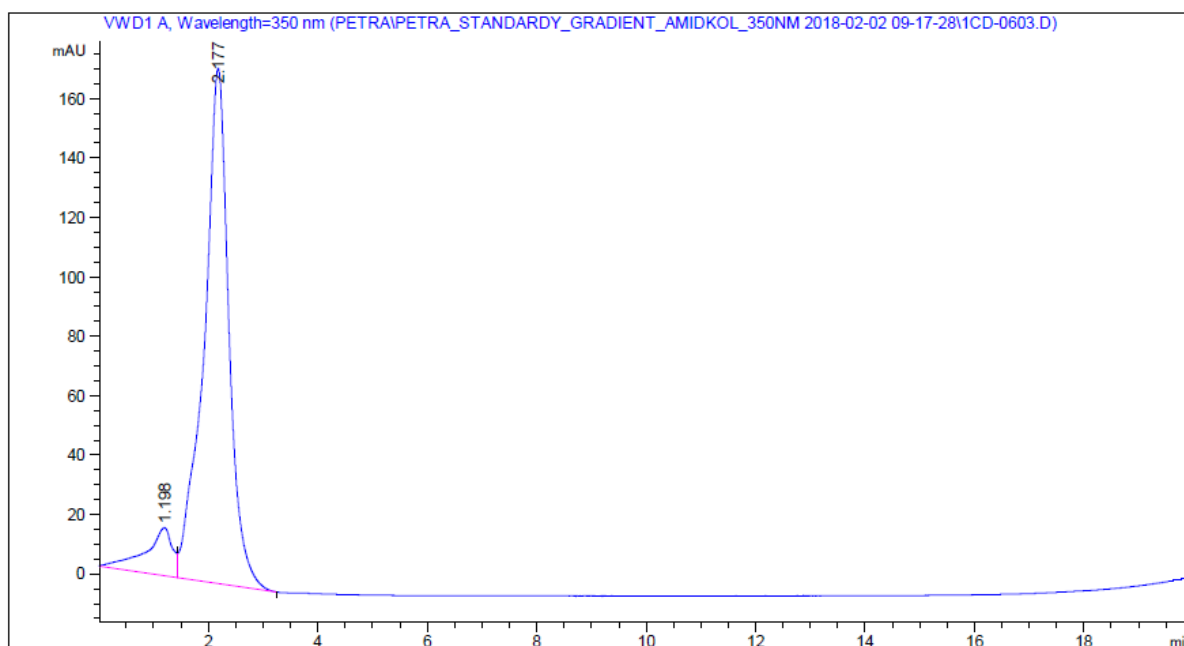
20. **NAWROCKI, J. DUNLAP, C. McCORMICK., A. CARR, P. W.** *J. Chromatogr. A* 1028. 2004. 1.
21. **KIRKLAND, J. J. van STRATEN, M. A. CLASSENS, H. A.** *J. Chromatogr. A* 691. 1995. 3.
22. **NEUE, U. D. WALTER, T. H. ALDEN, B. A. JIANG, Z. P. FISK, R. P. COOK, J. T. GLOSE, K. H. CARMODY, J. L. GRASSI, J. M. CHENG, Y. F. LU, Z. L. CROWLEY, R. J.** *Am. Lab.* 31. 1999. 36.
23. **SNYDER, L. R.** *Anal. Chem.* 46. 1974. 1384.
24. **SOCZEWIŃSKI, E.** *Anal. Chem.* 41. 1969. 179.
25. **NAWROCKI, J.** *J. Chromatogr. A* 779. 1994. 29.
26. **PRIETO-BLANCO, M. C. LÓPEZ-MAHÍA, P. PRADA-RODRÍGUEZ, D.** *J. Chrom. Sci.* 47. 2009. 121.
27. **McLAREN, D. G. MILLER, P. L. LASSMAN, M. E. CASTRO-PEREZ, J. M. HUBBARD, B. K. RODDY, T. P.** *Anal. Biochem.* 414. 2011. 266.
28. **ALPERT, A. J.** *J. Chromatogr.* 499. 1990. 177.
29. **GUINEBAULT, P. BROQUAIRE, M.** *J. Chromatogr.* 217. 1981. 509.
30. **VUKMANIC, D. CHIBA, M.** *J. Chromatogr.* 483. 1989. 189.
31. **LEOSER, E. DRUMM, P.** *J. Sep. Sci.* 29. 2006. 2847.
32. **WANG, Y. WANG, T. SHI, X. WAN, D. ZHANG, P. HE, X. GAO, P. YANG, S. GU, J. XU, G.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47. 2008. 870.
33. **HUTTUNEN, K. H. RAUTIO, J. LEPPÄNEN, J. VEPSÄLÄINEN, J. KESKI-RAHKONEN, P.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50. 2009. 469.
34. **LU, S. TRAN, B. N. NELSEN, J. L. ALDUS, K. M.** *J. Chromatogr B* 877. 2009. 2499.
35. **LEE, H. W. JI, H. Y. KIM, H. Y. PARK, E.-S. LEE, K. CH. LEE, H. S.** *J. Chromatogr. B* 877. 2009. 1716.
36. **BUCK, K. VOEHRINGER, P. FERGER, B.** *J. Neurosci. Methods* 182. 2009. 78.
37. **JIAN, W. EDOM, R. W. XU, Y. WENG, N.** *J. Sep. Sci.* 33. 2010. 681.
38. **BIDLINGMEYER, B. A.** *Partical HPLC methodology and applications*. USA: John Wiley & Sons, 1992. ISBN 0-471-57246-2.
39. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/texty/dech.htm>, citováno a upraveno 17. 2. 2018.
40. [http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol spek/Mol spek prednaska6 MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol%20spek/Mol%20spek%20prednaska6%20MS.pdf), citováno 17. 2. 2018.
41. **FRIEDECKÝ, D. LEMR, K.** *Úvod do hmotnostní spektrometrie. Klinická biochemie a metabolismus, 2012.* č. 20, č. 41, s. 152-157).

42. **YOUS, R. A. ENKE, C. G.** *Analytical chemistry*. 1979, vol. 51.
43. **ČÁSLAVSKÝ, J. ŠEVČÍK, J. G. K. a kol.** *Analyza organických látek*. Český Těšín: 2 THETA ASE s.r.o., 2014.
44. [http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC\\_MS\\_MS.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC_MS_MS.pdf) , citováno 24. 4. 2018.
45. [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf), citováno 15. 3. 2018.
46. **DASS, Ch.** *Fundamentals of contemporary mass spektrometry*. USA: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-0-471-68229-5.
47. **HOLČAPEK, M. VOLNÁ, K. JANDERA, P. KOLÁŘOVÁ, L. LEMR, K. EXNER, M. CÍRKVA, A.** *Journal of mass spektrometry*. 2004, vol. 39.
48. <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/aufheller.htm>, citováno 12. 3. 2018.
49. <http://www.pp.archroma.com/whiteness/leucophor/>, citováno 17. 2. 2018.
50. Norma ČSN EN 648
51. **SHADKAMI, F. HELLEUR, R. SITHOLE, B. B.** *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2011, vol 31.
52. **McPHERSON, B. P. OMELCZENKO, N.** *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1980, vol. 57, 388.
53. **DAMANT, A. CASTLE, L.** *Journal of Microcolumn Separation*. 1999, vol. 11, 259.
54. **OGURA, I. DuVal, D. L. MIYAJIMA, K.** *Journal American Oil Chemists*. 1995, vol. 72, 827.
55. **CHEN, H. WANG, S. DING, W.** *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1102, 135.
56. **ČESLA, P. VAŇKOVÁ, N. KŘENKOVÁ, J. FISCHER, J.** *Journal of chromatography A*. 2016, vol. 1438, 179.
57. <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02158067>, citováno 8. 3. 2018

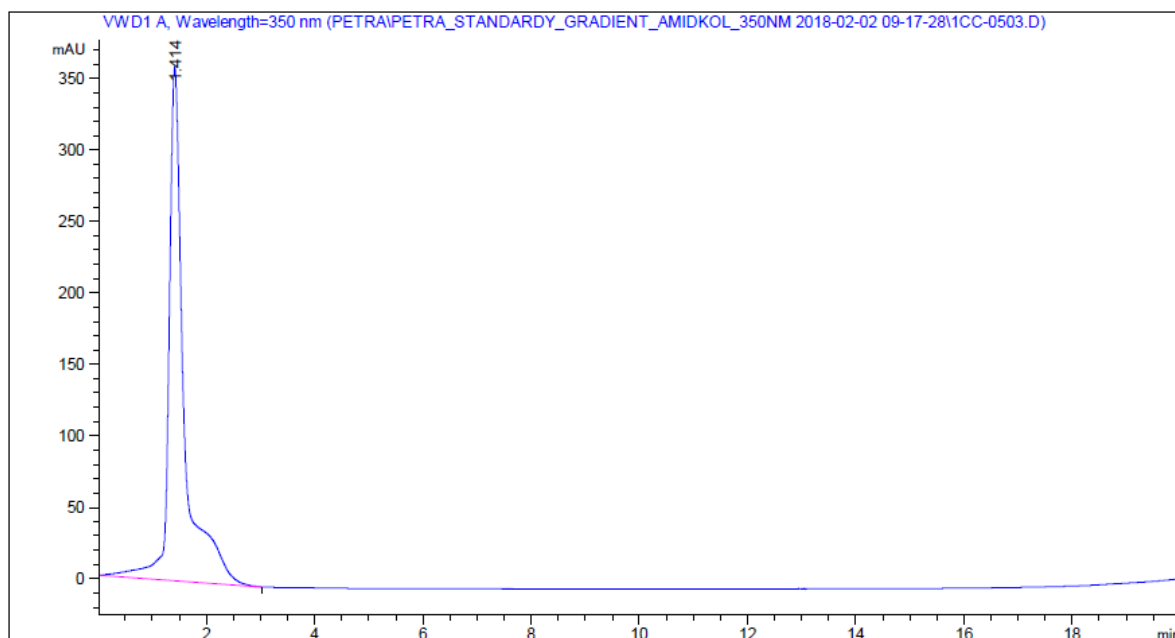


## PŘÍLOHY

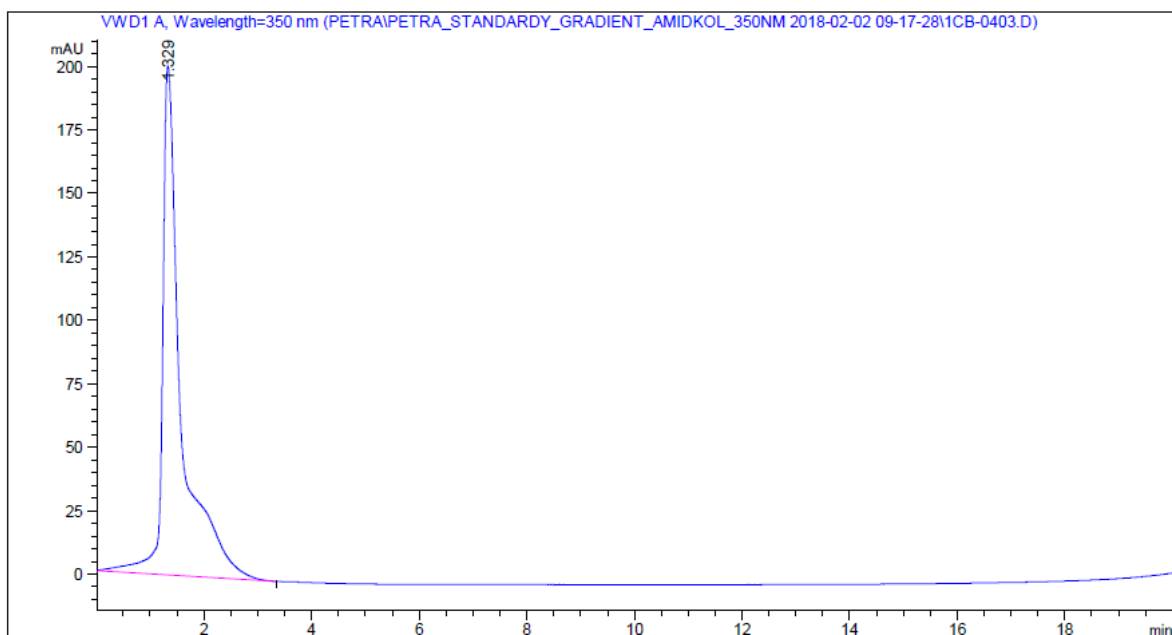
Záznamy z měření v systému s obrácenými fázemi v mobilní fázi acetonitril-voda, gradient A



Obrázek P 1 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

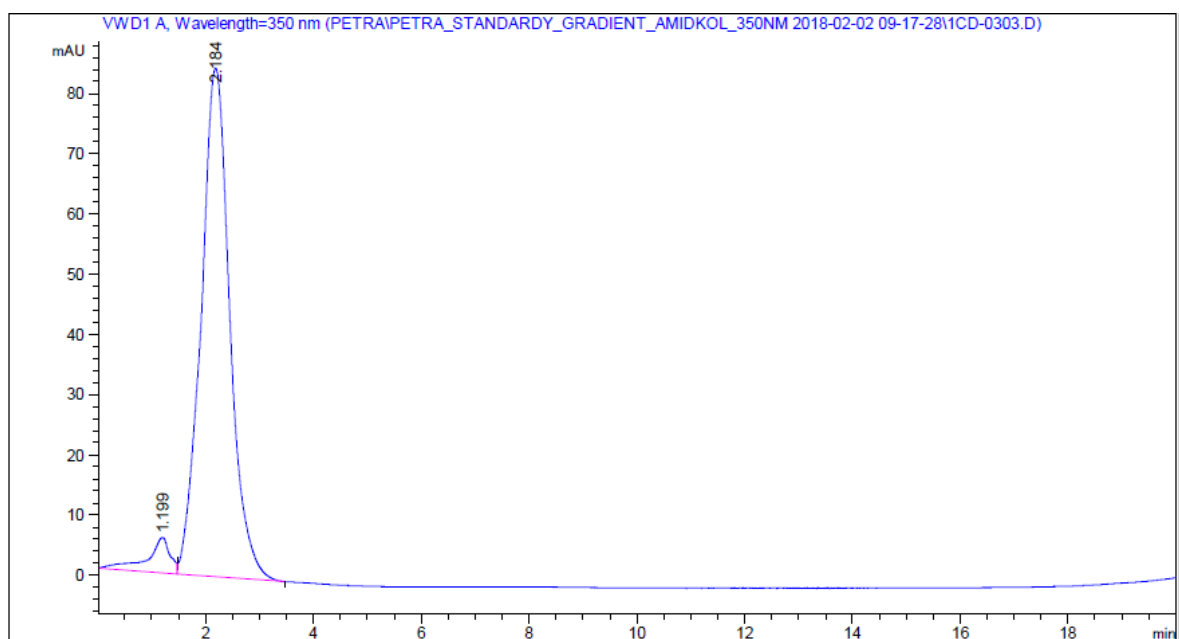


Obrázek P 2 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

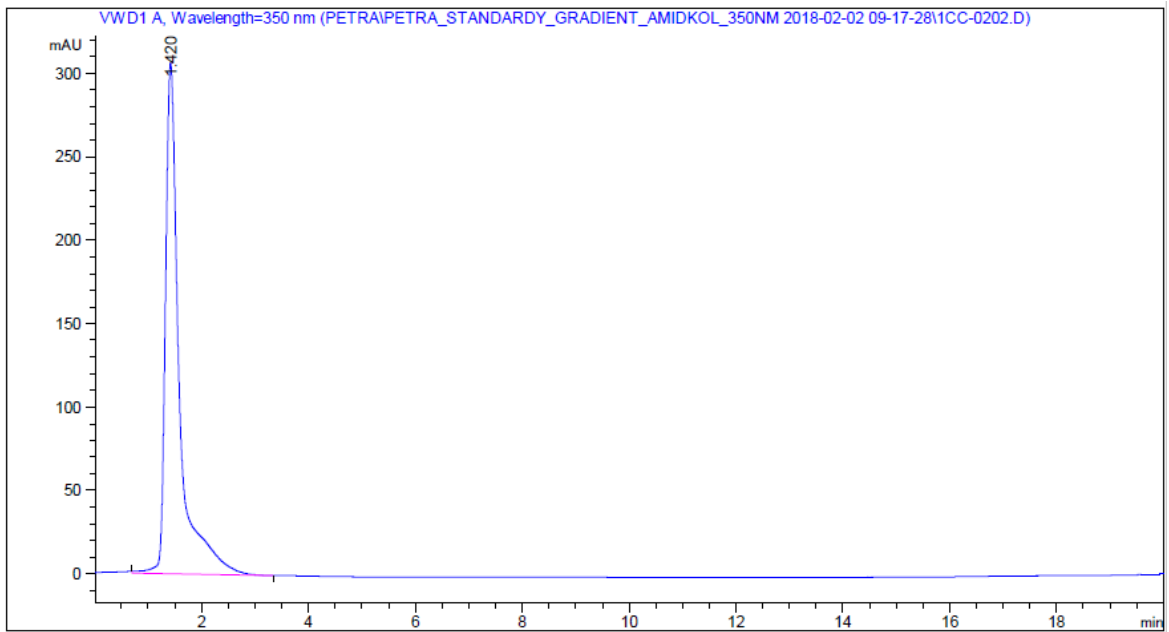


Obrázek P 3 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

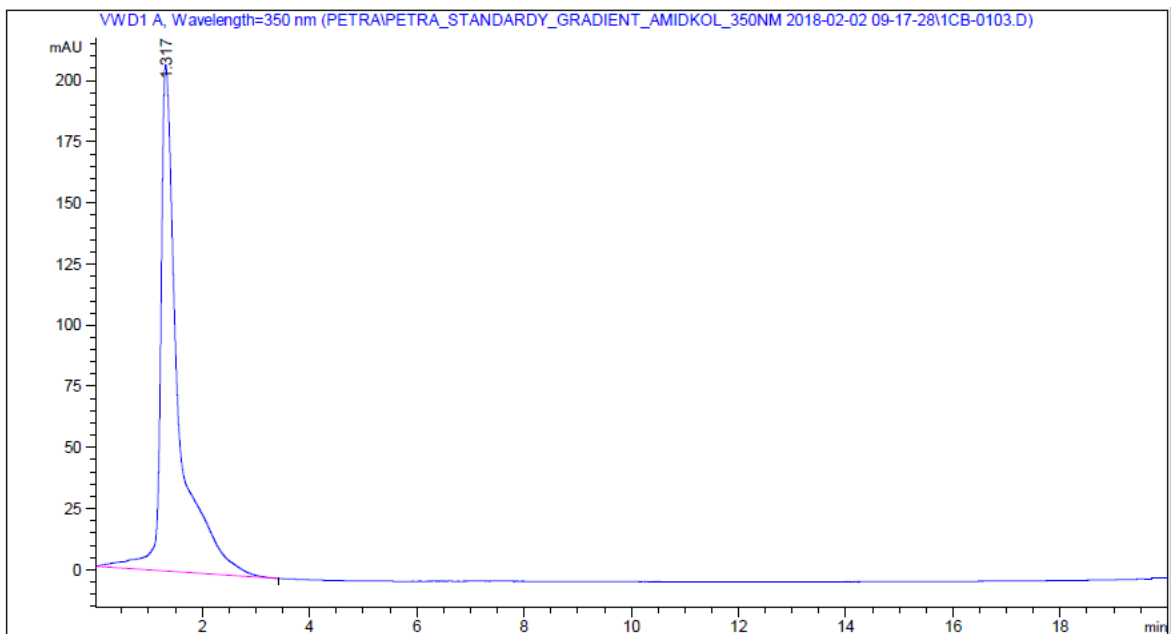
Záznamy z měření v systému s obrácenými fázemi v mobilní fázi acetonitril-voda, gradient B



Obrázek P 4 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

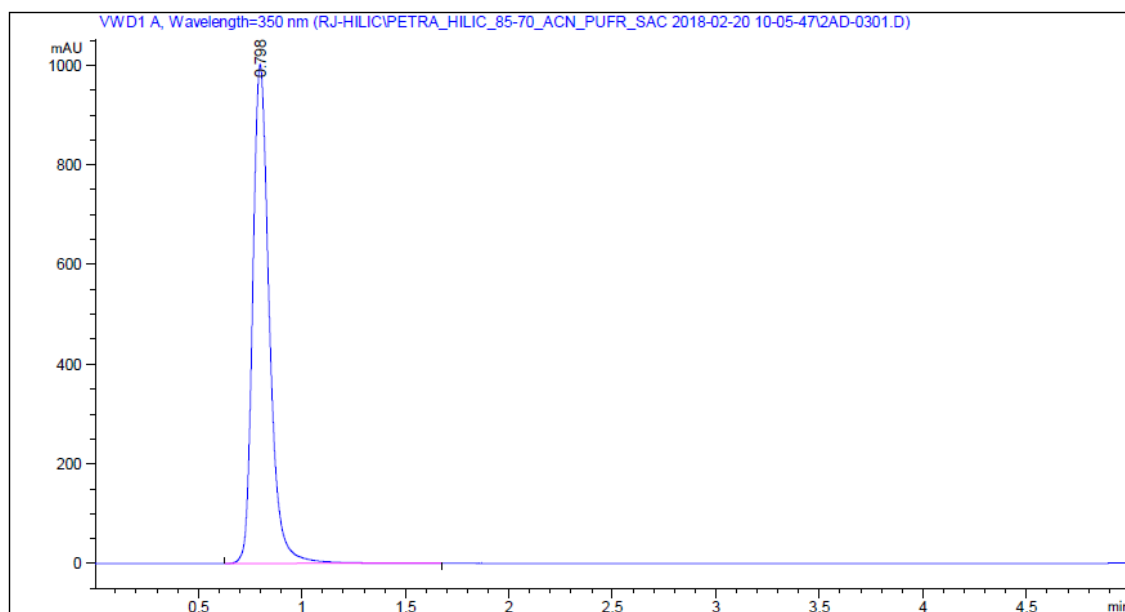


Obrázek P 5 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

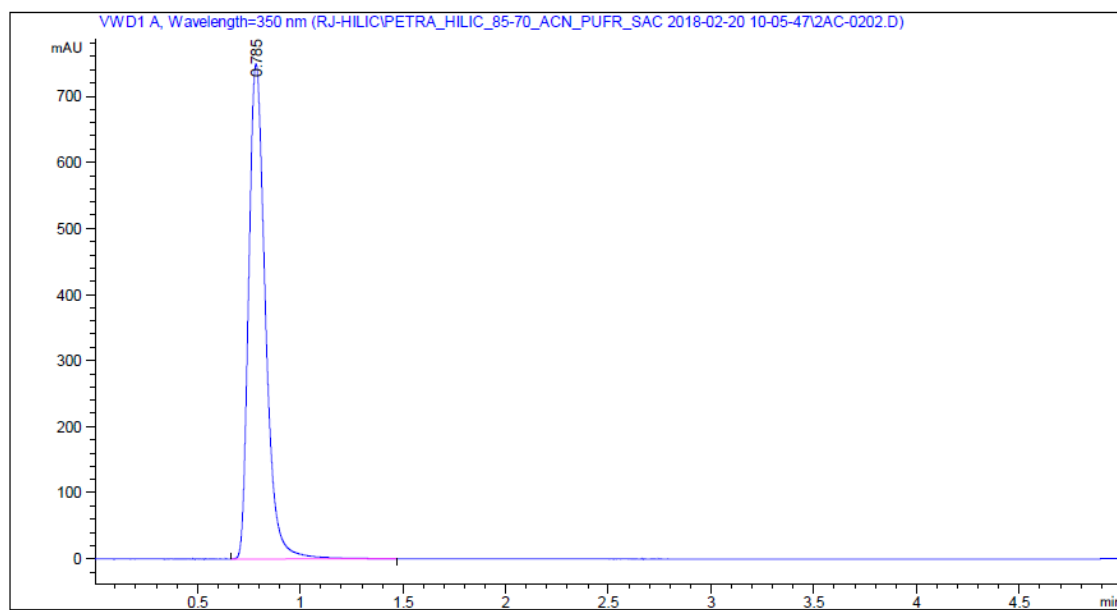


Obrázek P 6 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

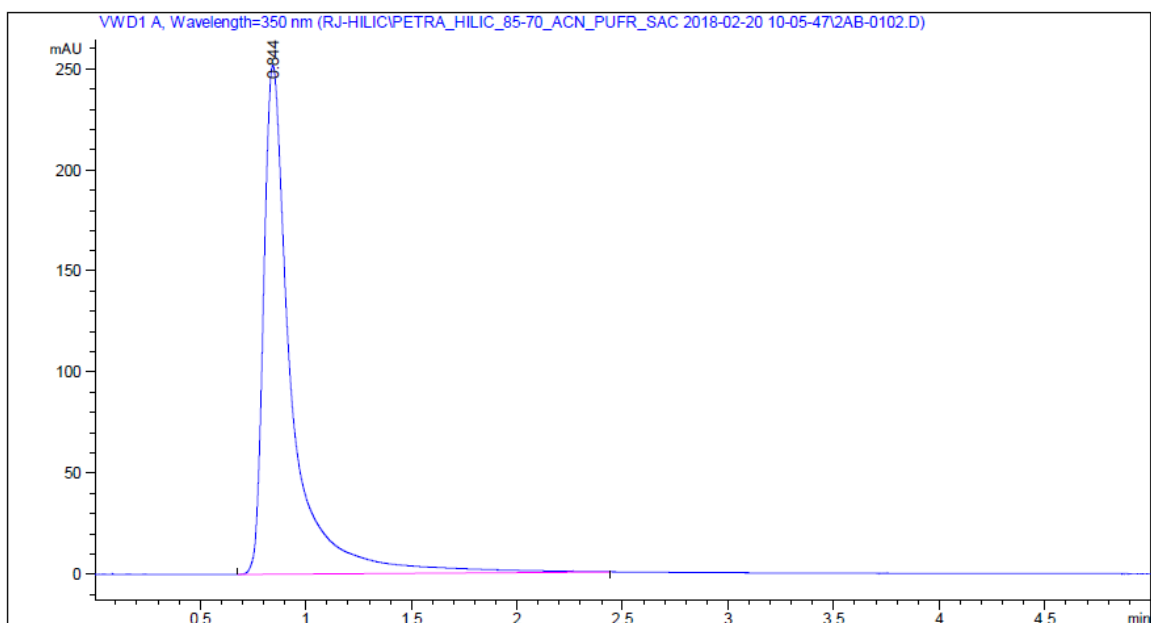
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex® HILIC v mobilní fázi acetonitril-50 mM octan amonný, gradient 1



Obrázek P 7 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

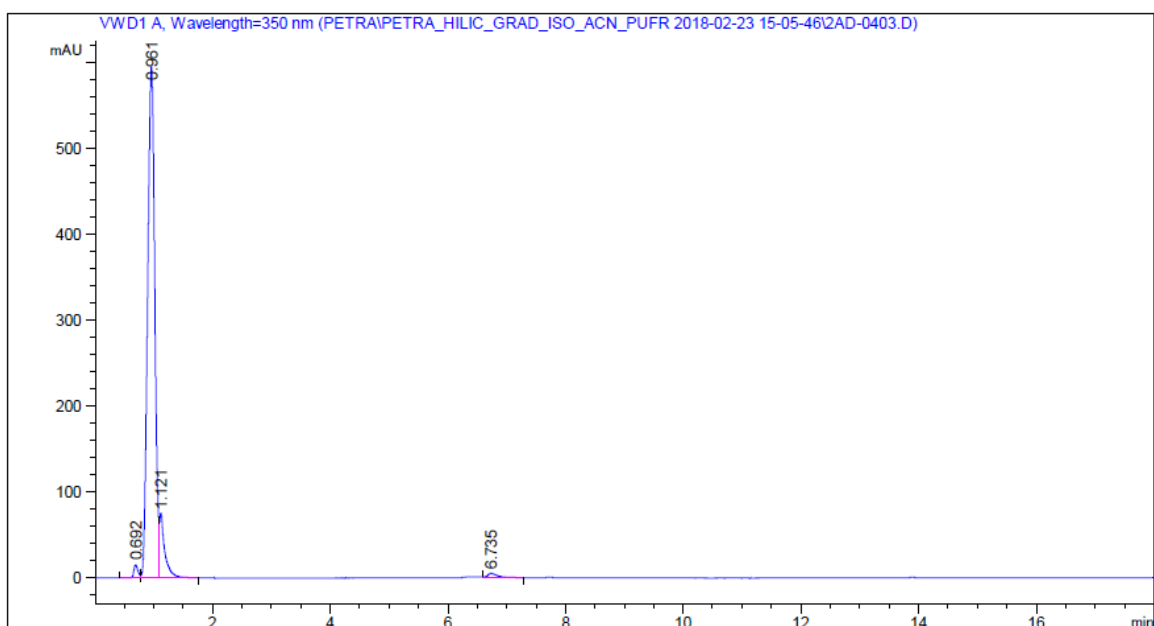


Obrázek P 8 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

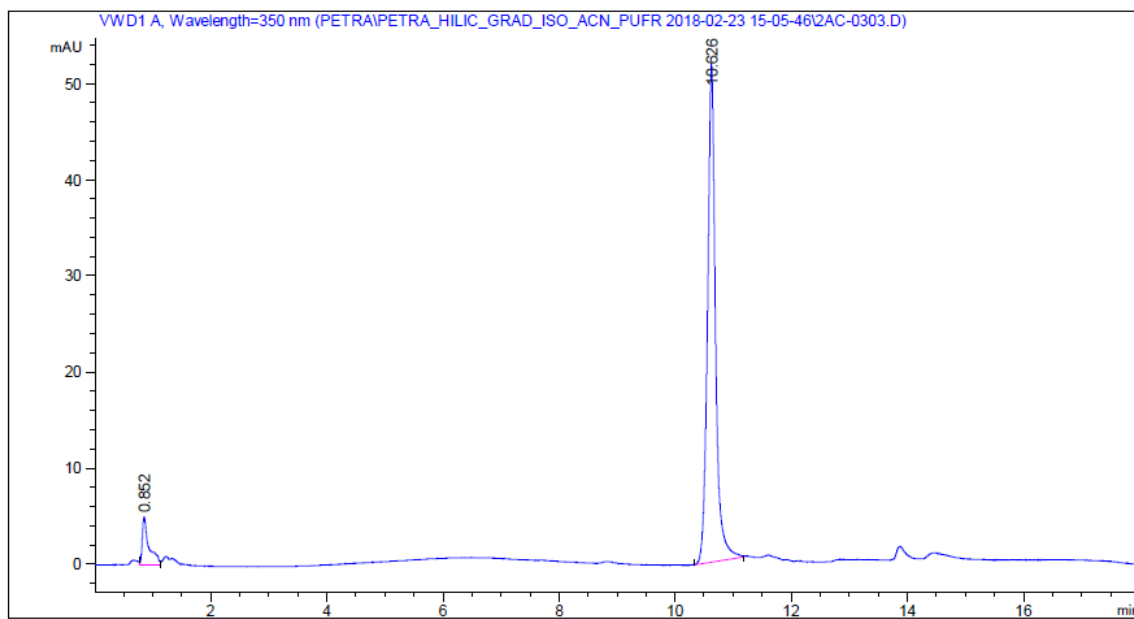


Obrázek P 9 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

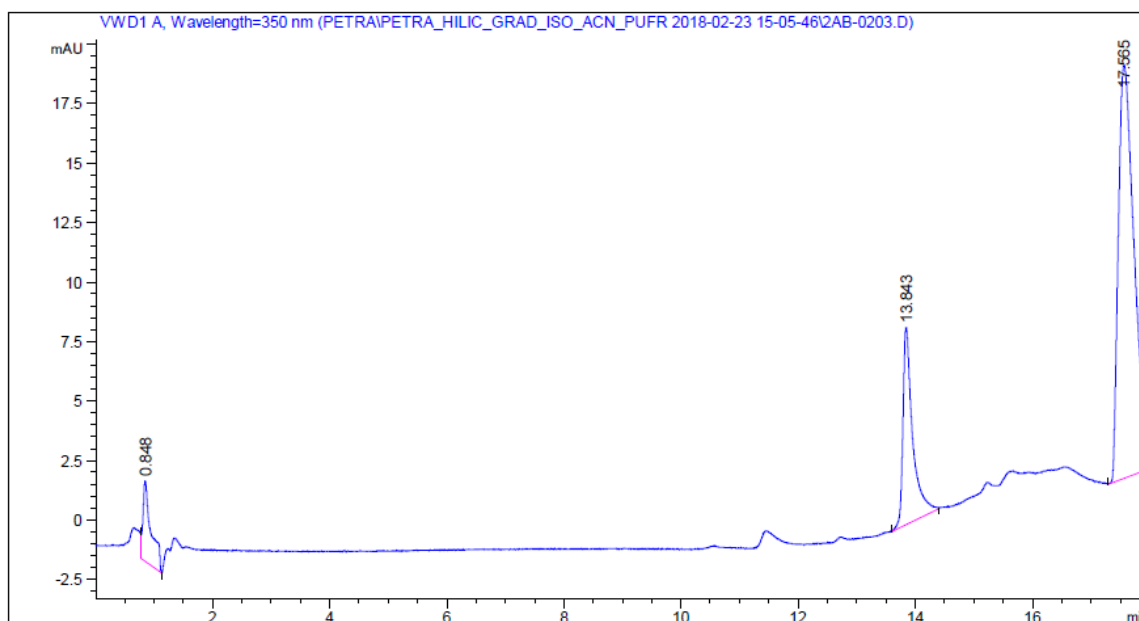
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex ® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 3



Obrázek P 10 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

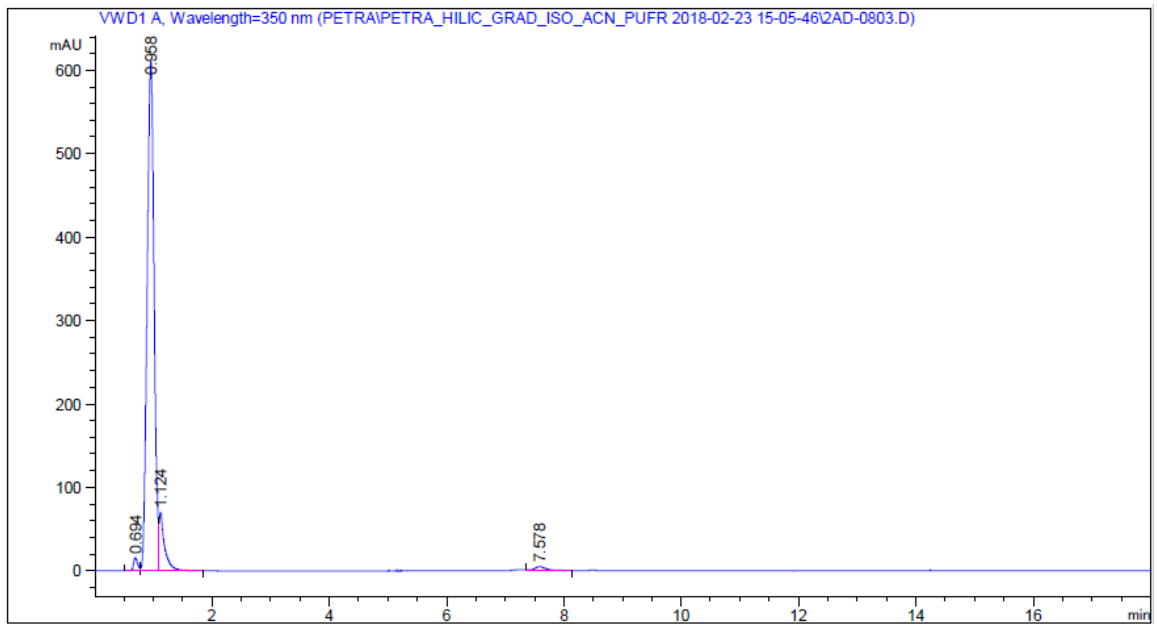


Obrázek P 11 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

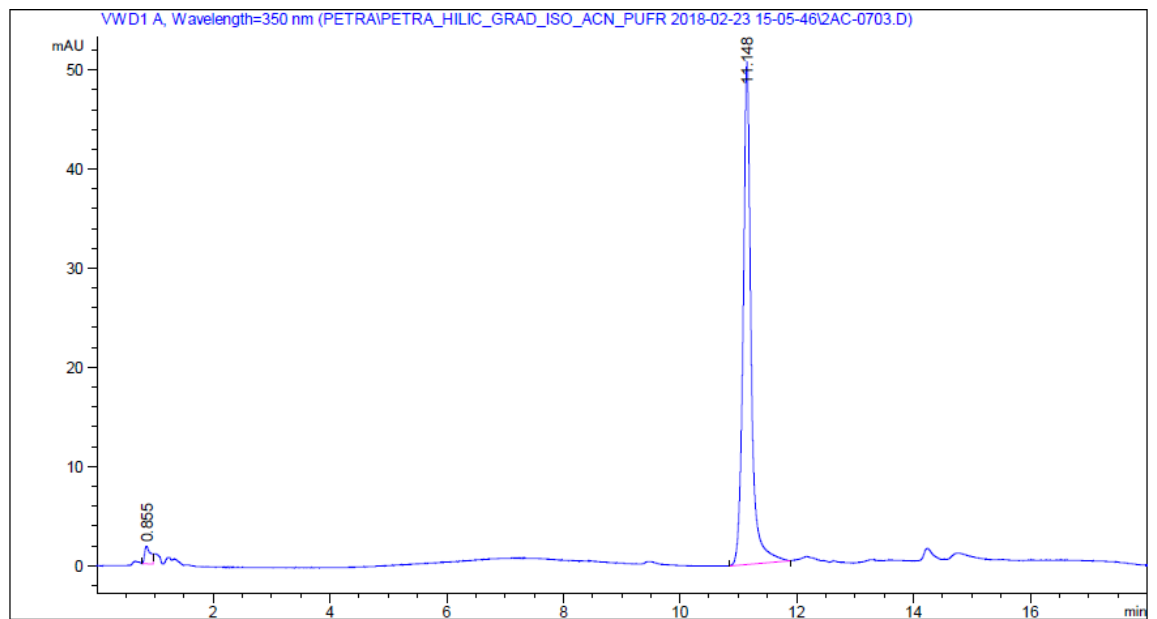


Obrázek P 12 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

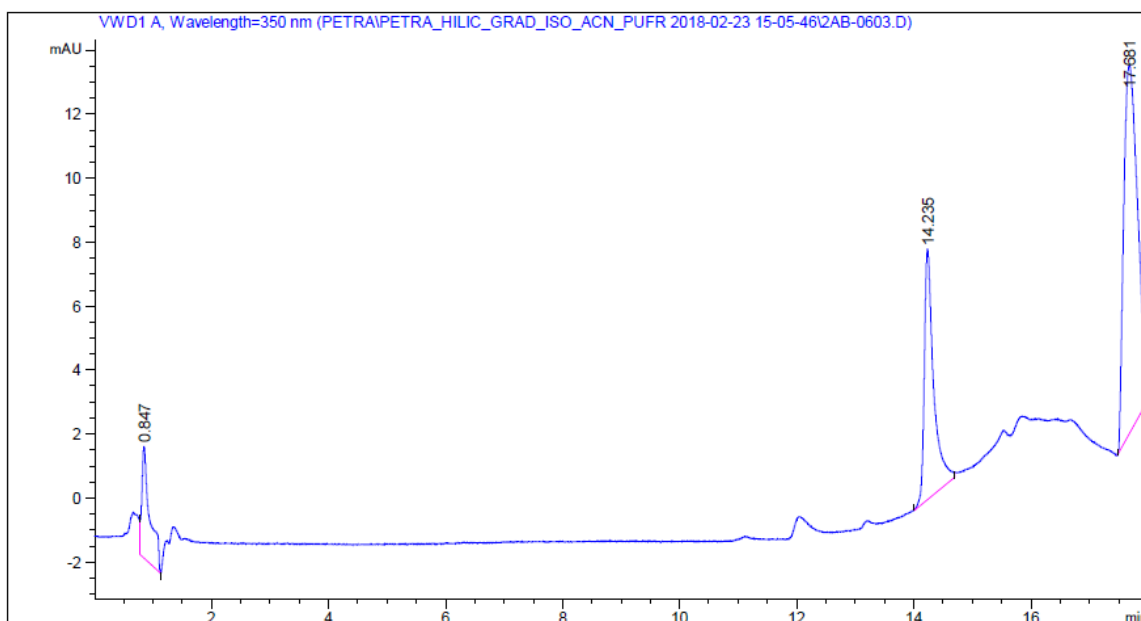
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 4



Obrázek P 13 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

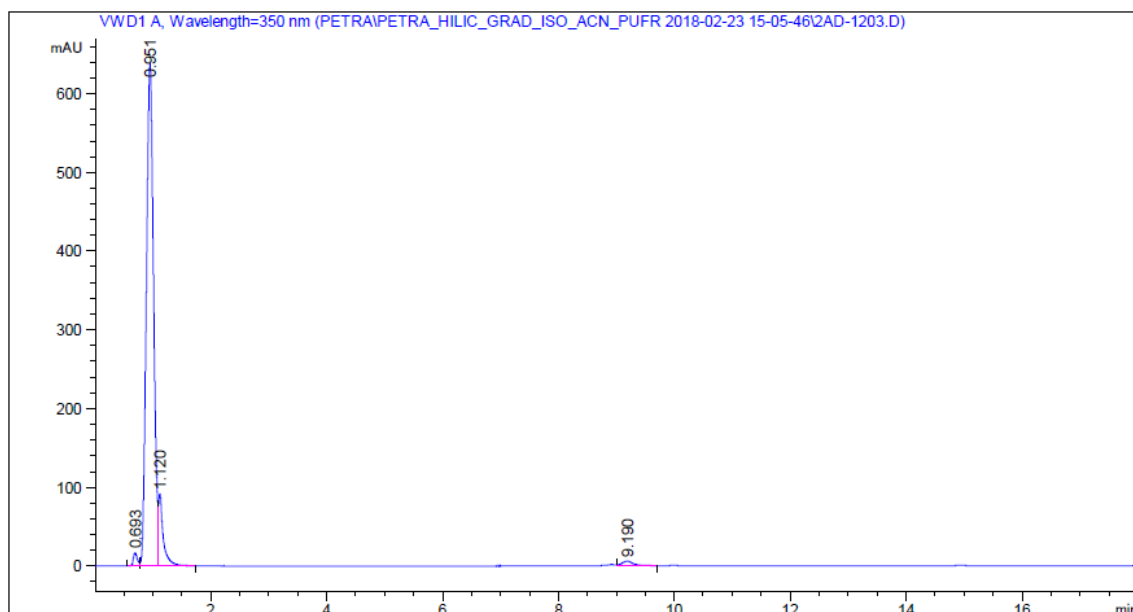


Obrázek P 14 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače



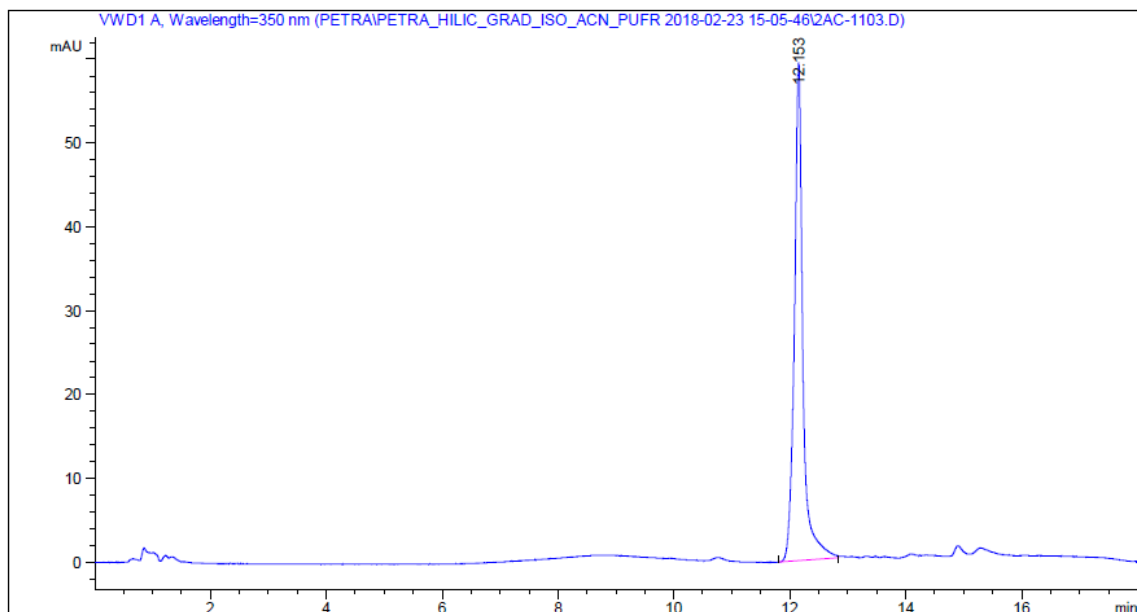
Obrázek P 15 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex ® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 5

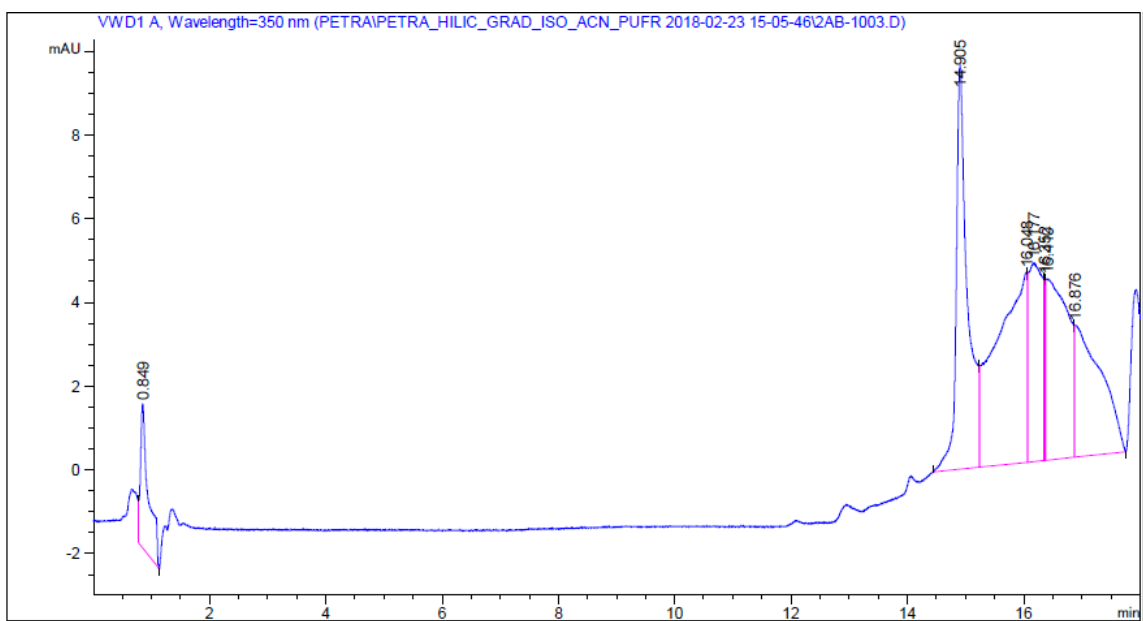


Obrázek P 16 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače



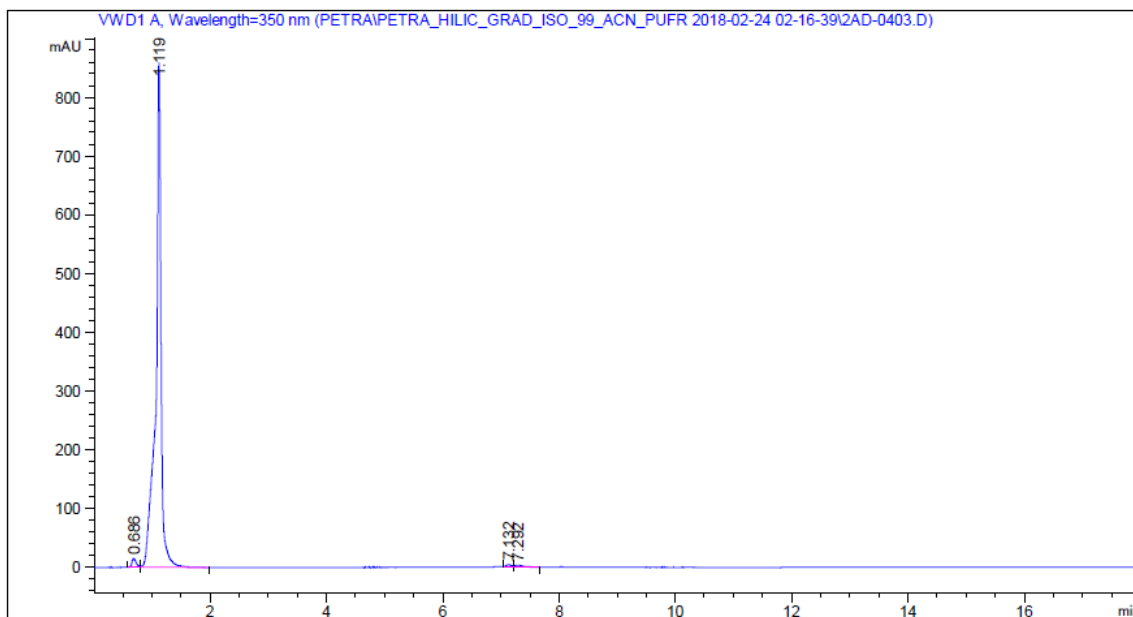


Obrázek P 17 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

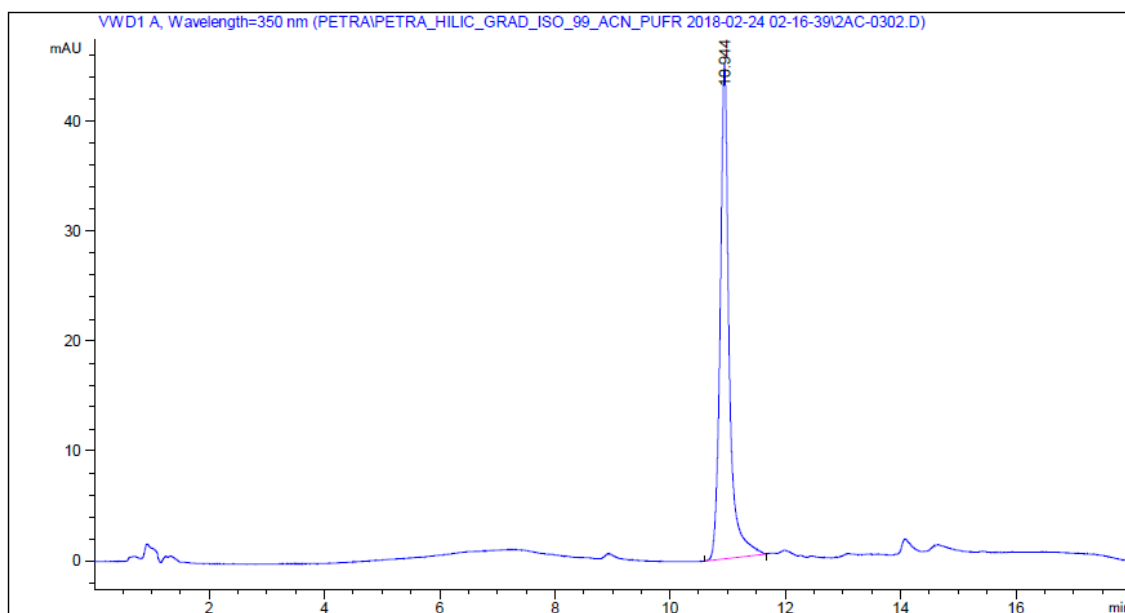


Obrázek P 18 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

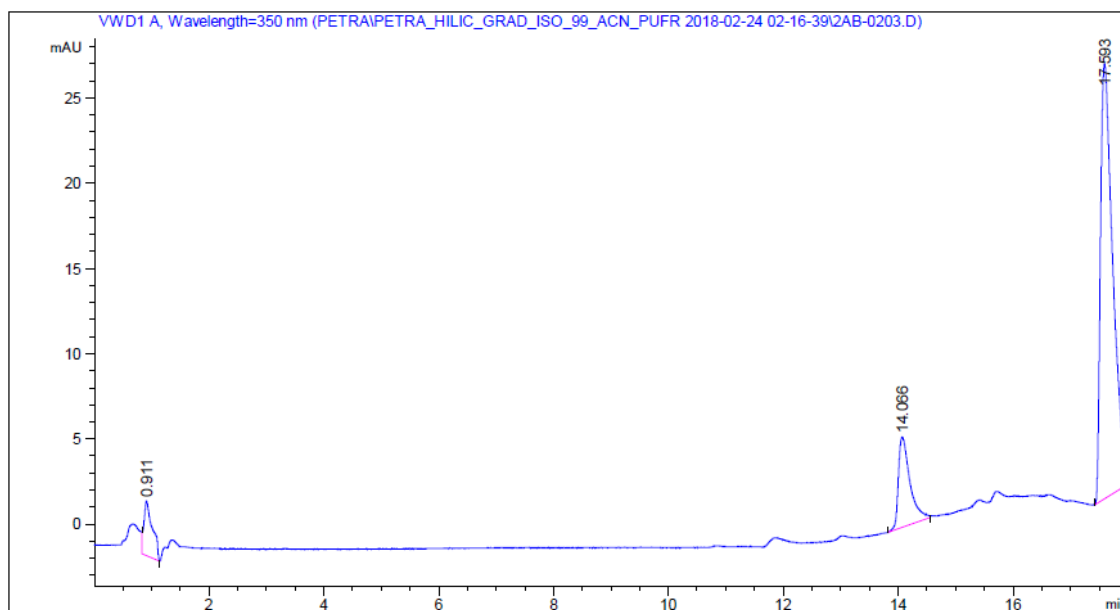
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 8



Obrázek P 19 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

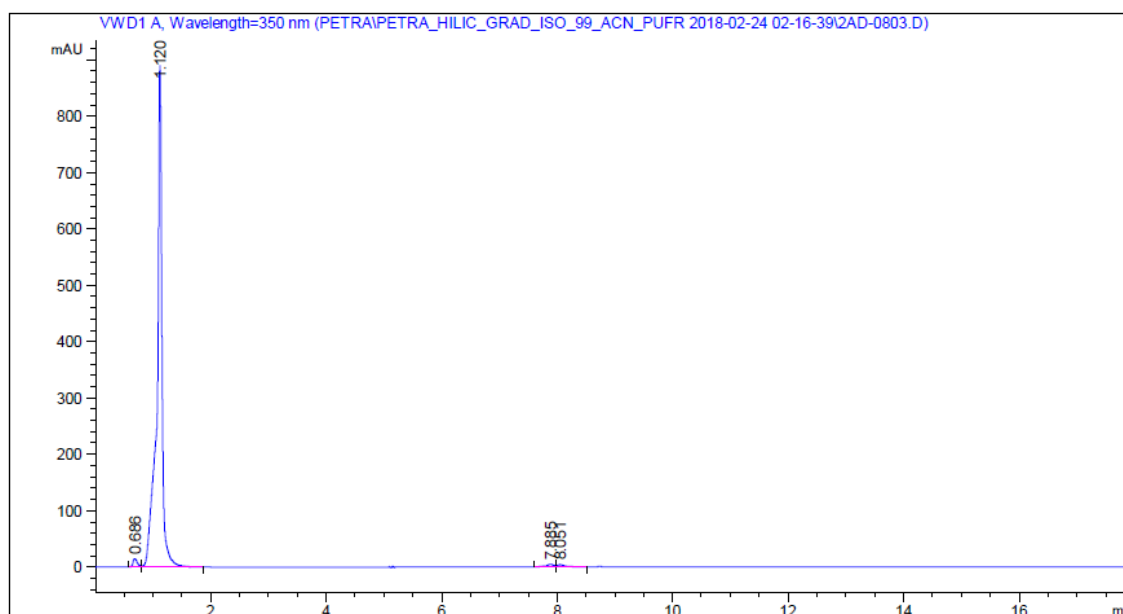


Obrázek P 20 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

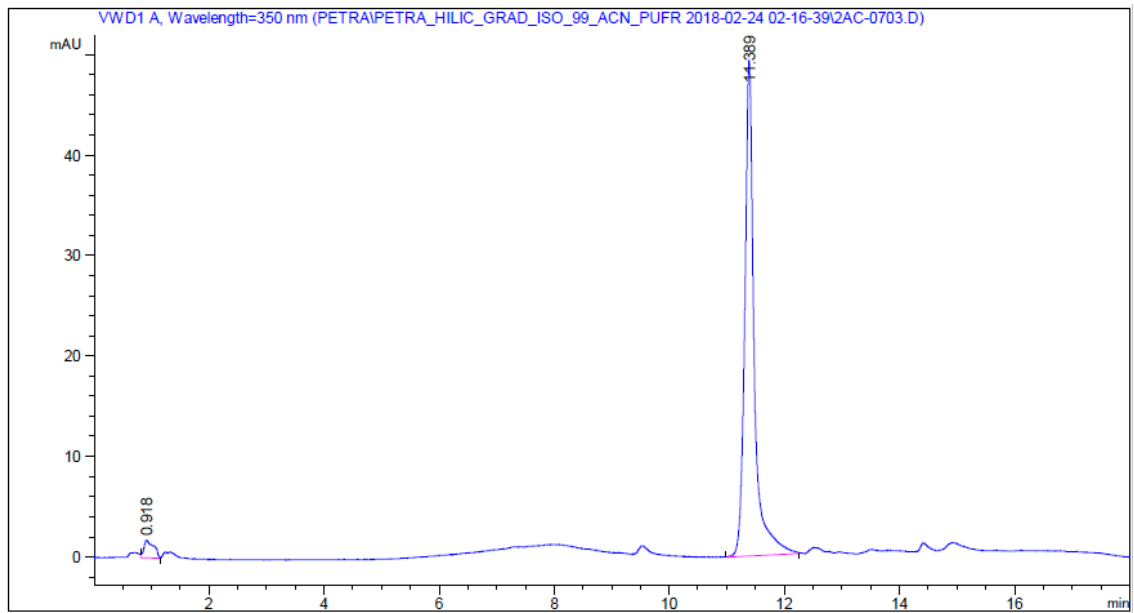


Obrázek P 21 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

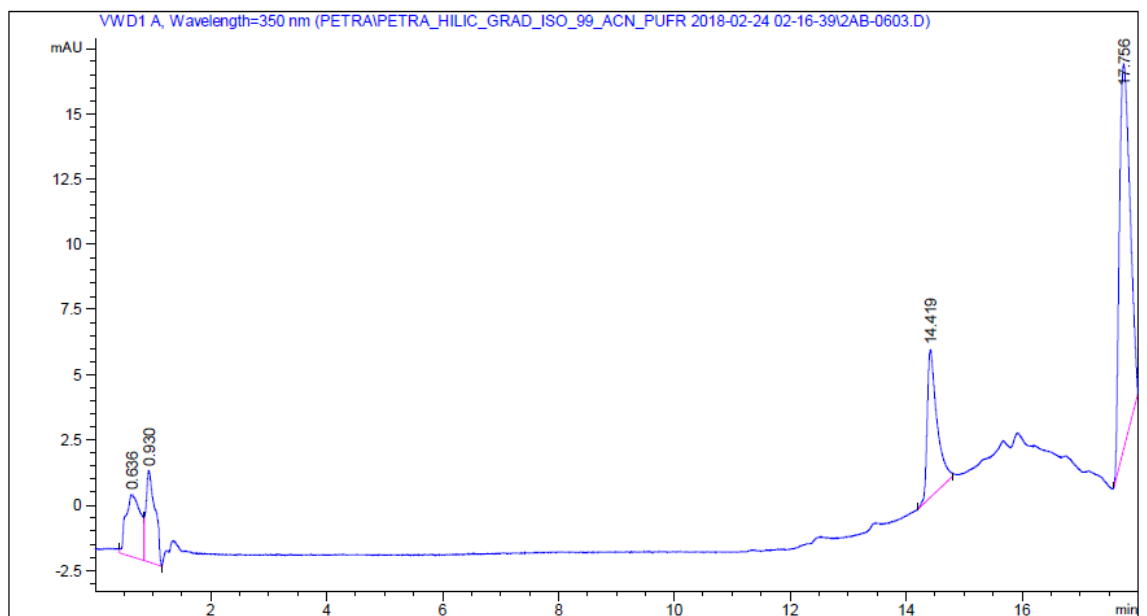
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex ® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 9



Obrázek P 22 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

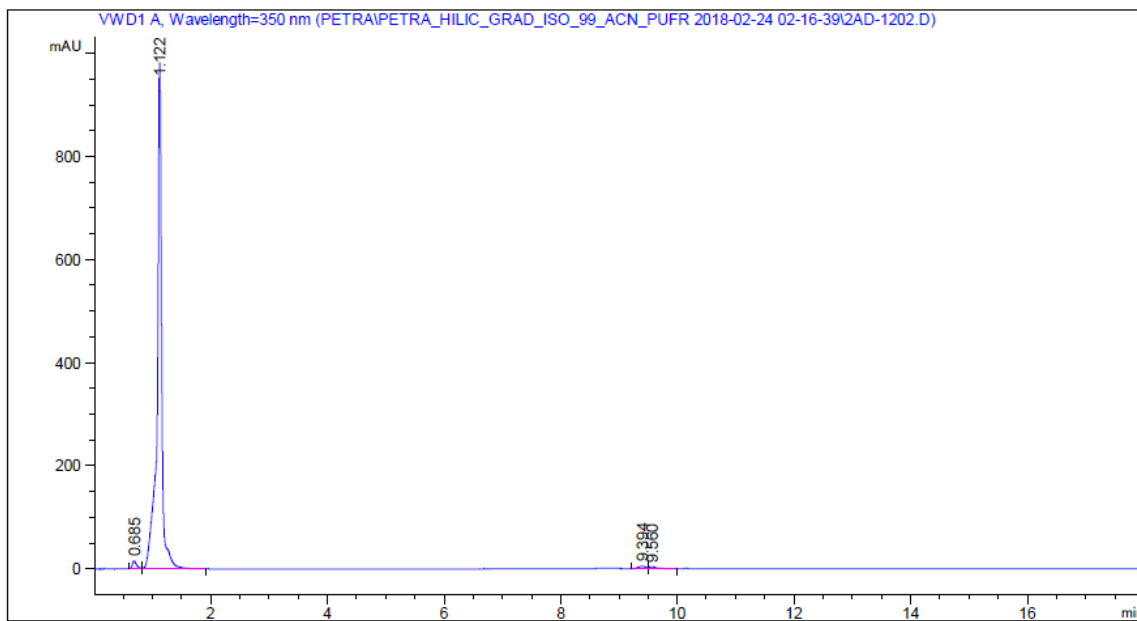


Obrázek P 23 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

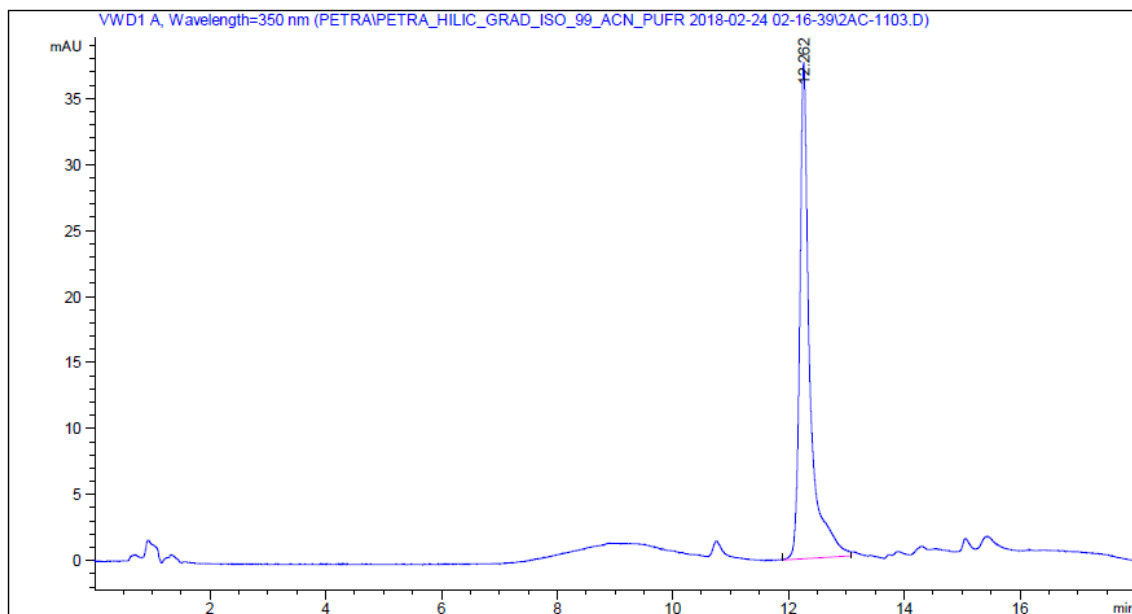


Obrázek P 24 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

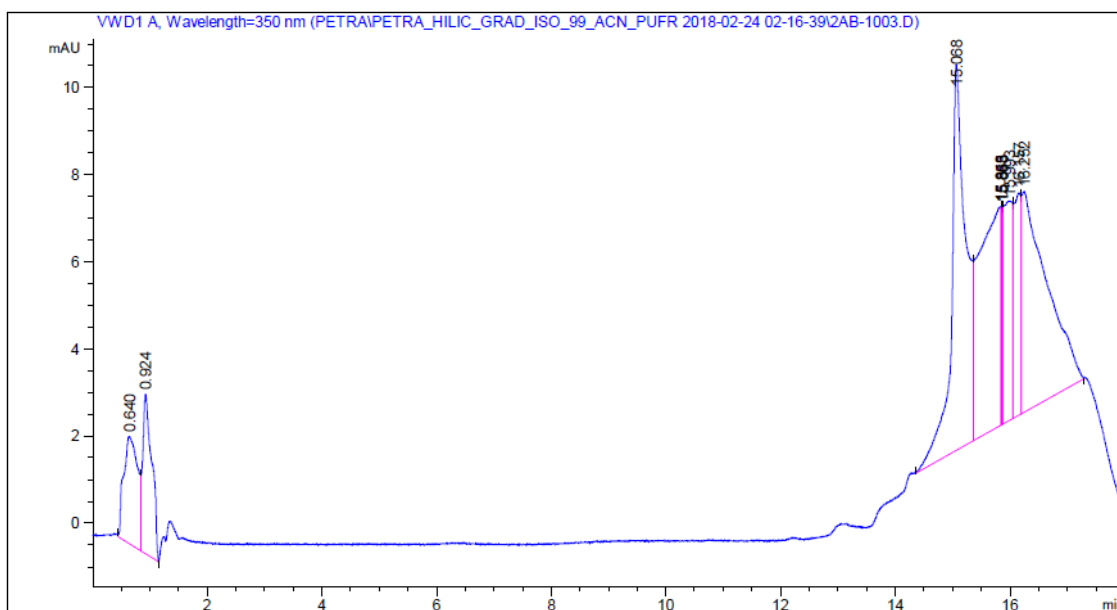
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně Kinetex® HILIC v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 10



Obrázek P 25 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

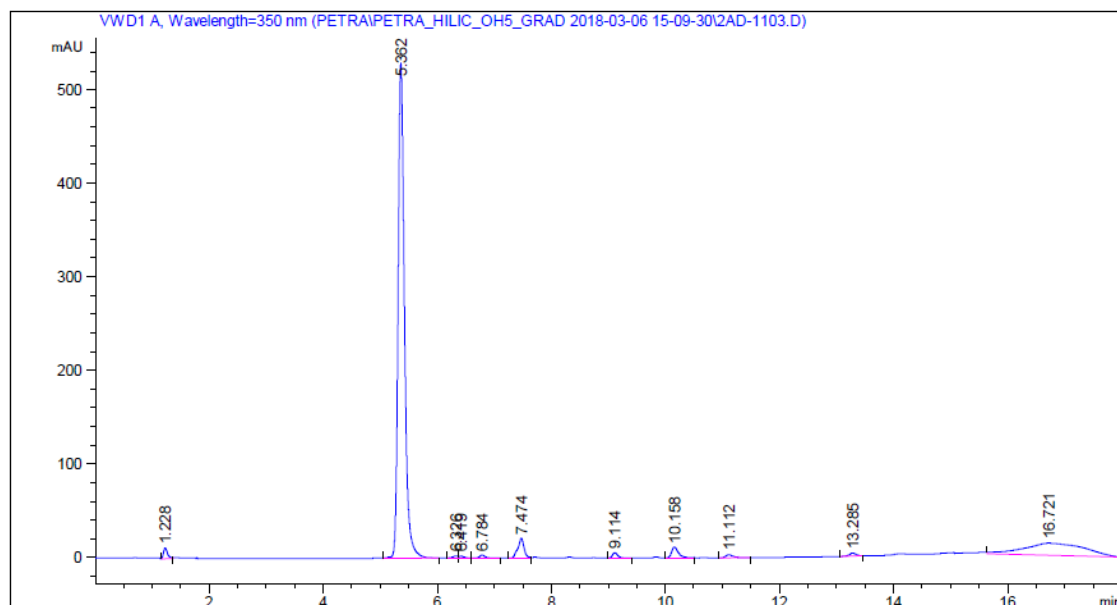


Obrázek P 26 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

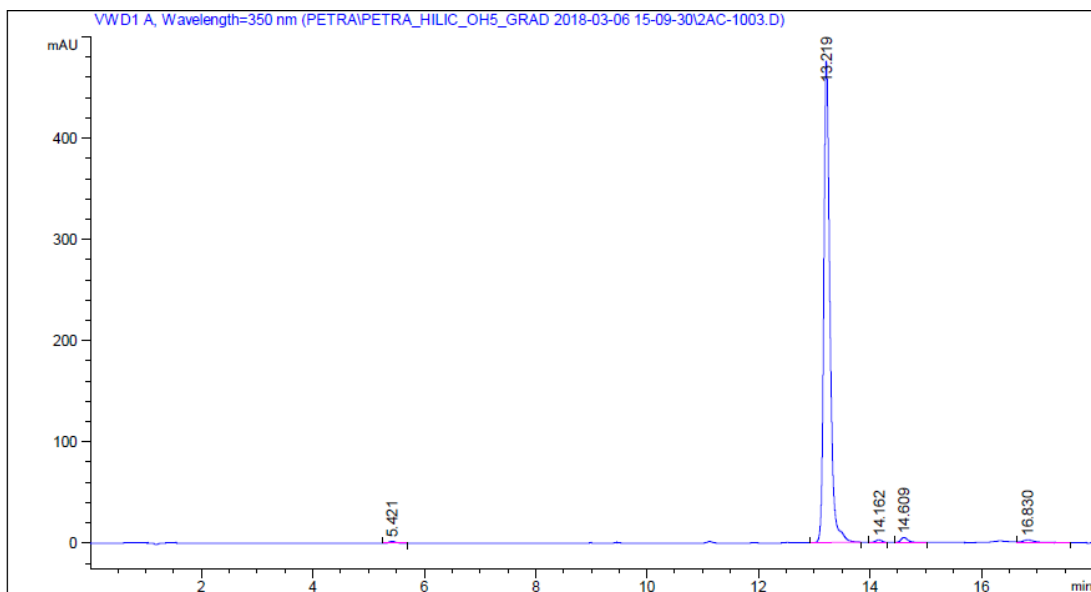


Obrázek P 27 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

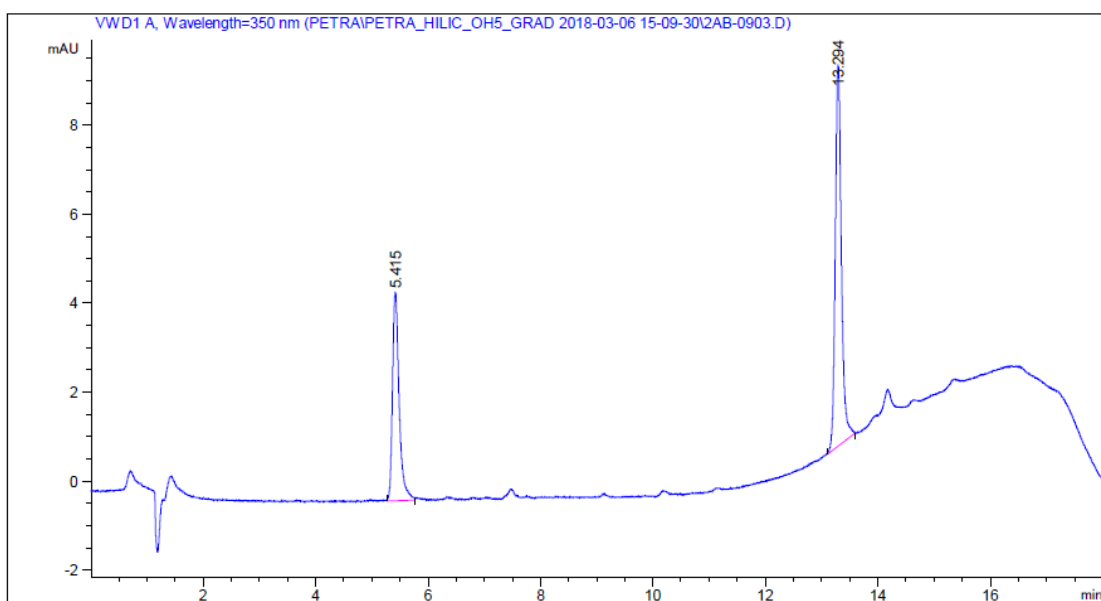
Záznamy z měření v HILIC systému na OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 1



Obrázek P 28 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

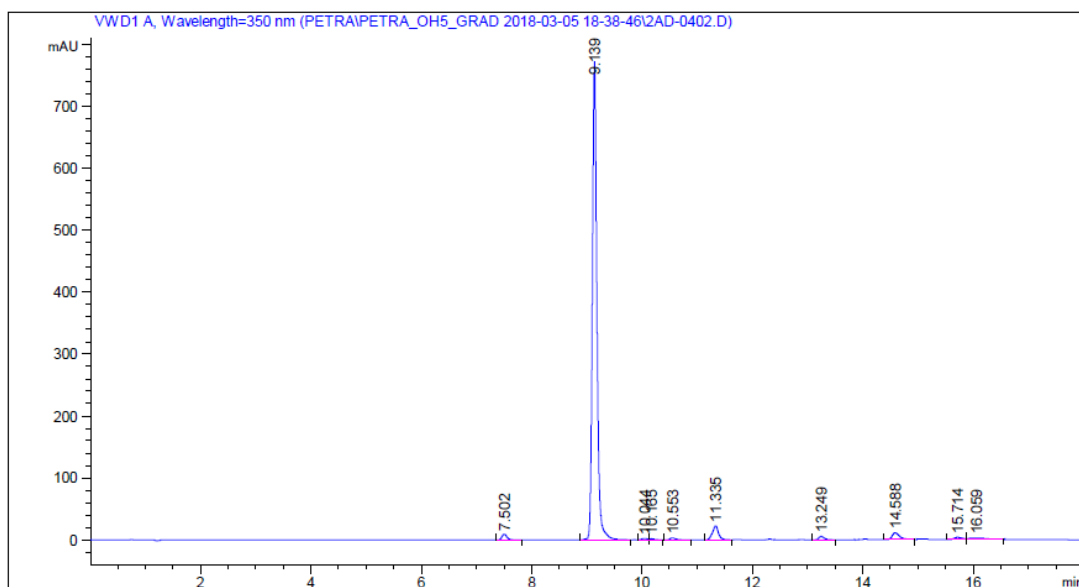


Obrázek P 29 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

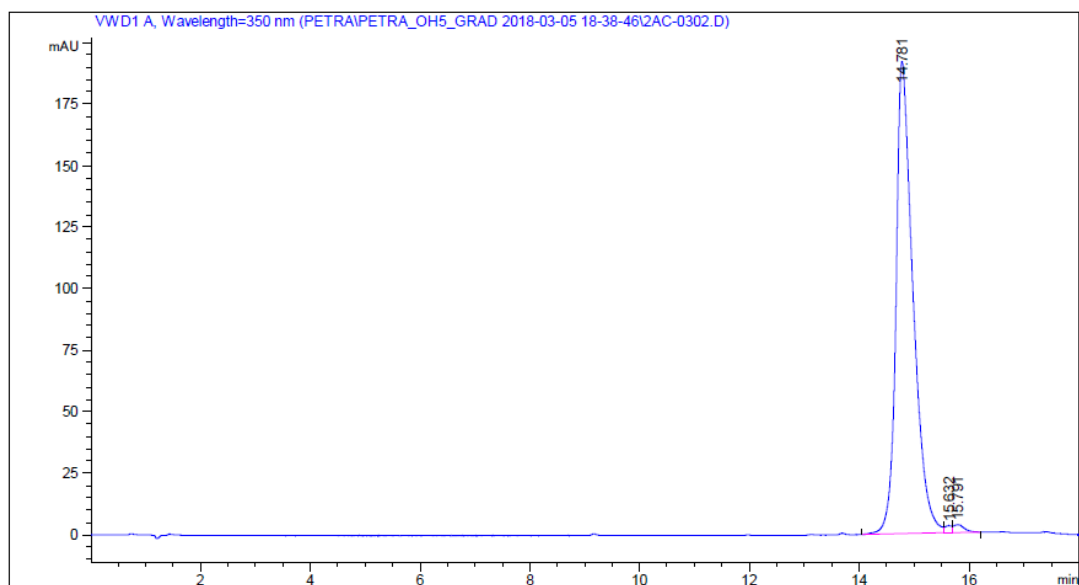


Obrázek P 30 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 3

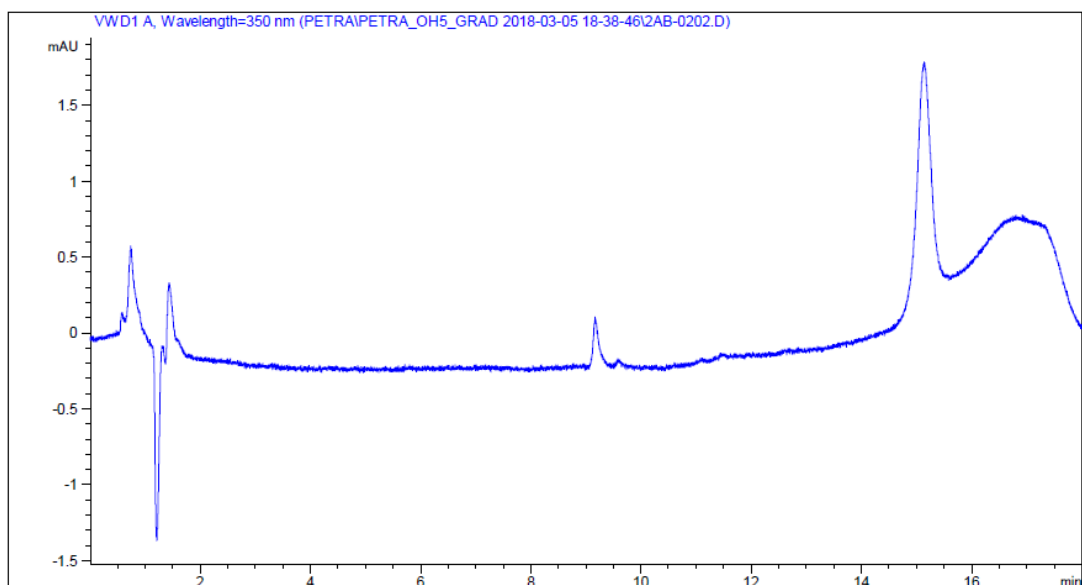


Obrázek P 31 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače



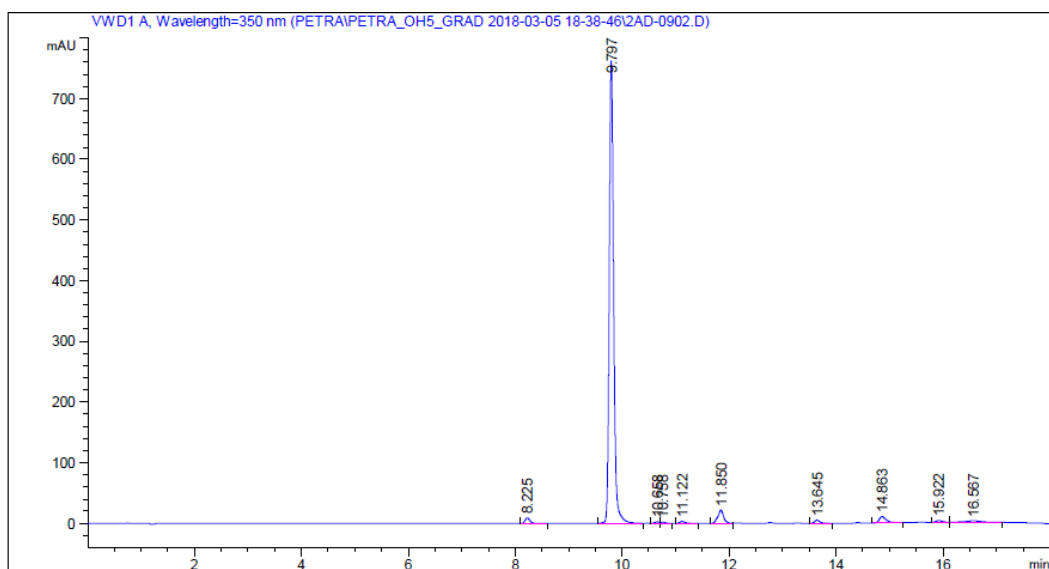
Obrázek P 32 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače



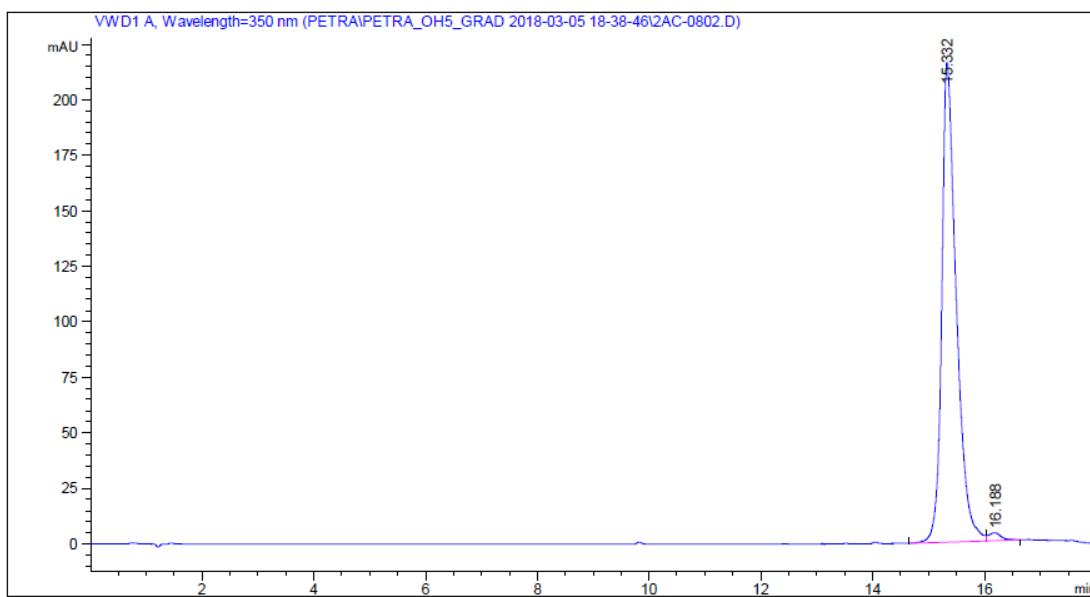


Obrázek P 33 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

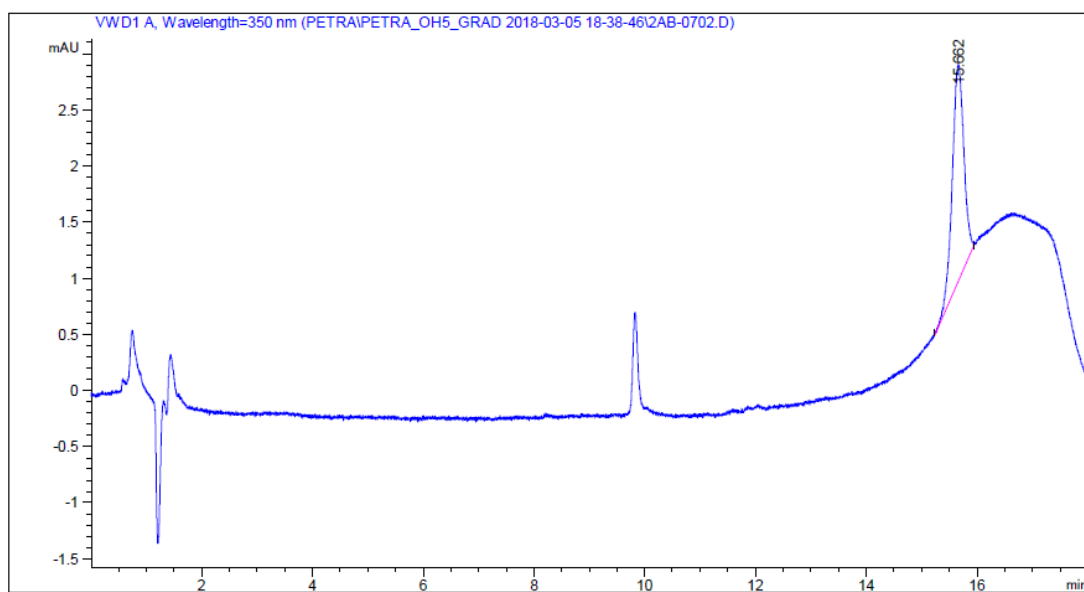
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 4



Obrázek P 34 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

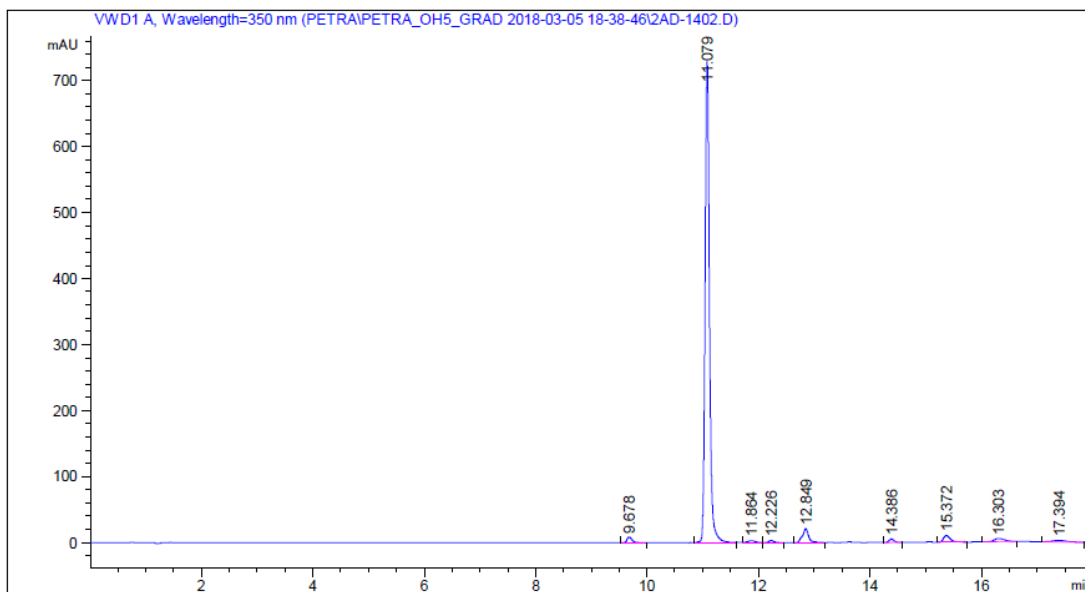


Obrázek P 35 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

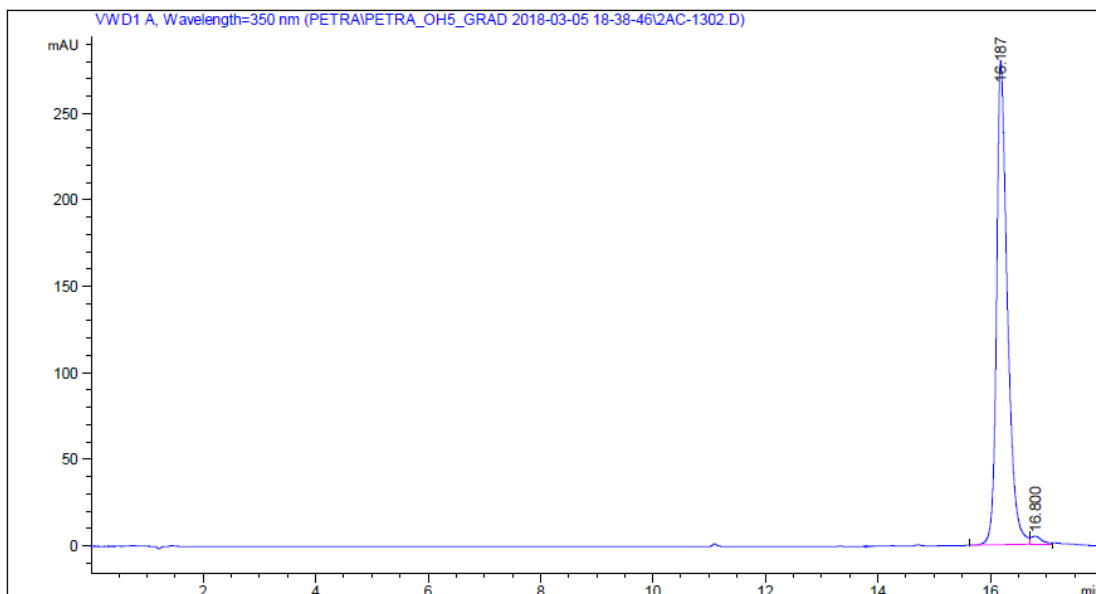


Obrázek P 36 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

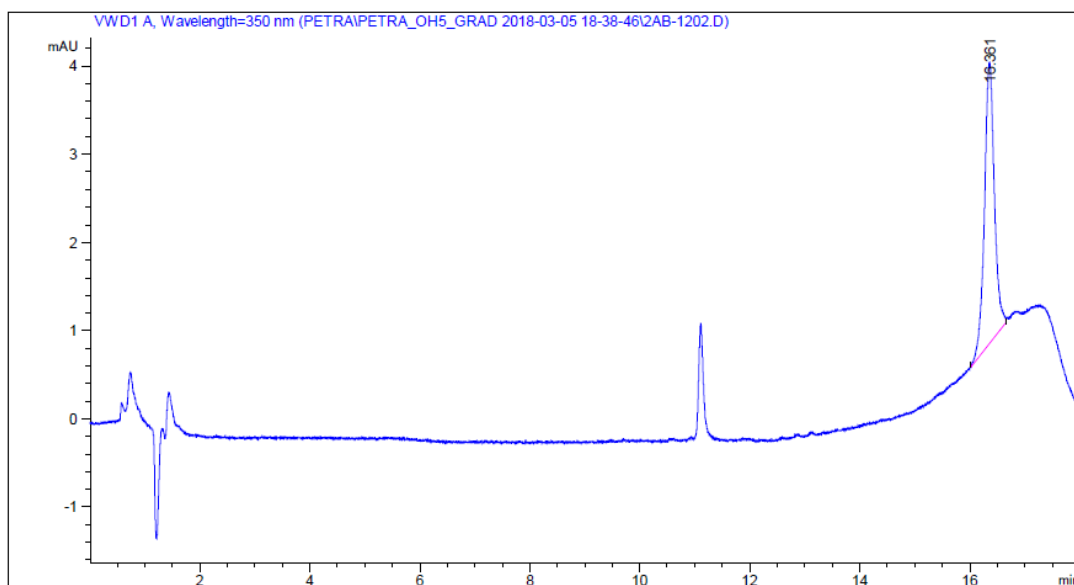
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 5



Obrázek P 37 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

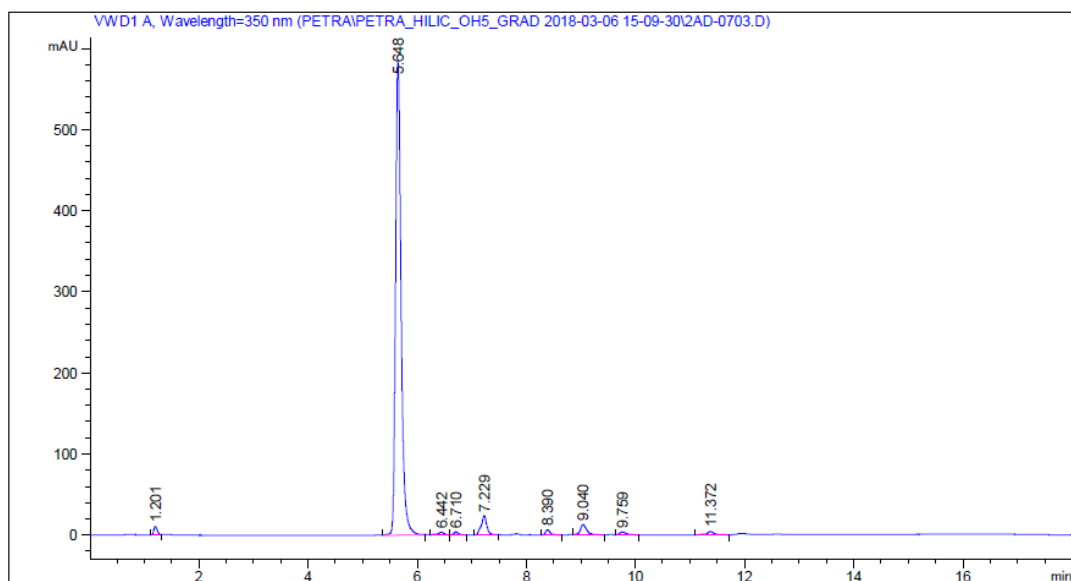


Obrázek P 38 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

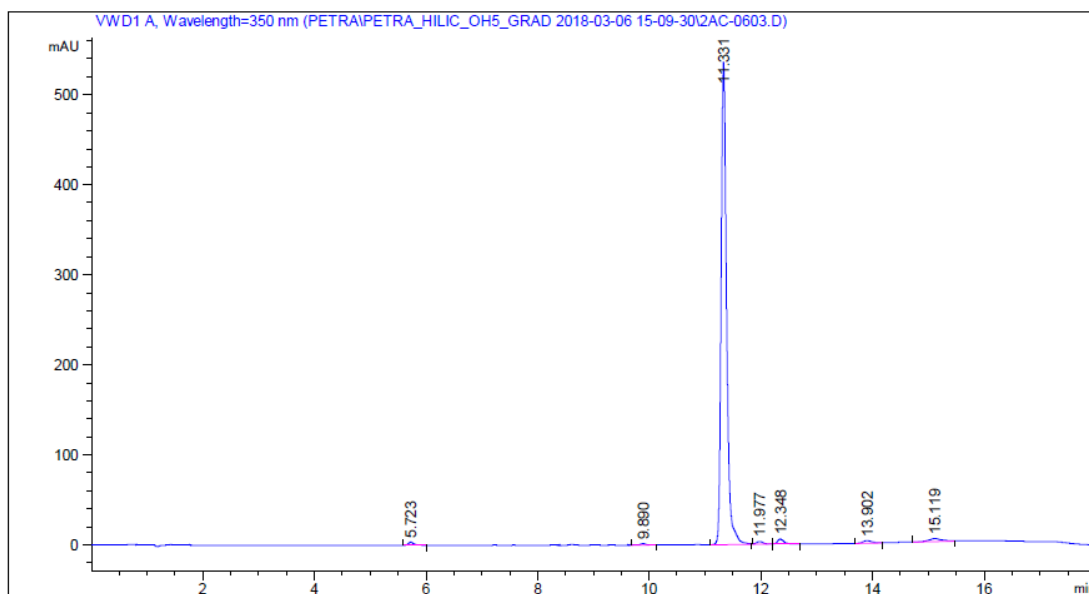


Obrázek P 39 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

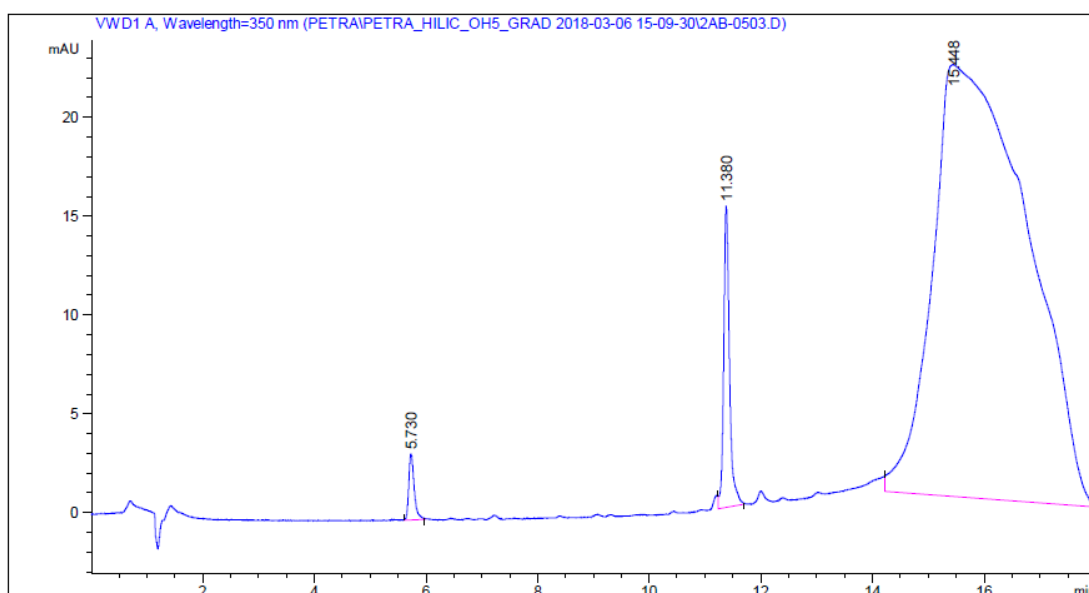
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 6



Obrázek P 40 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

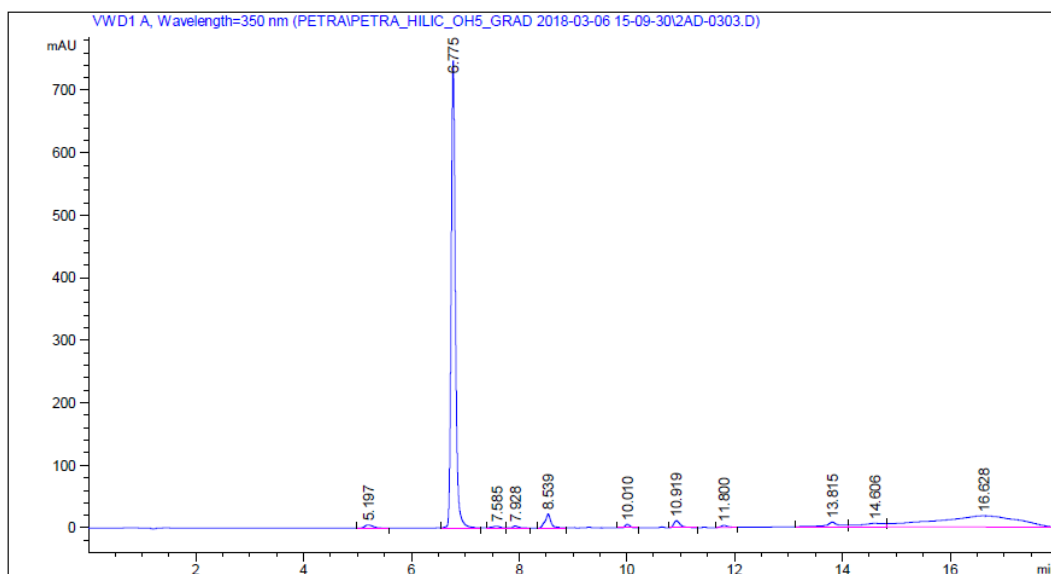


Obrázek P 41 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

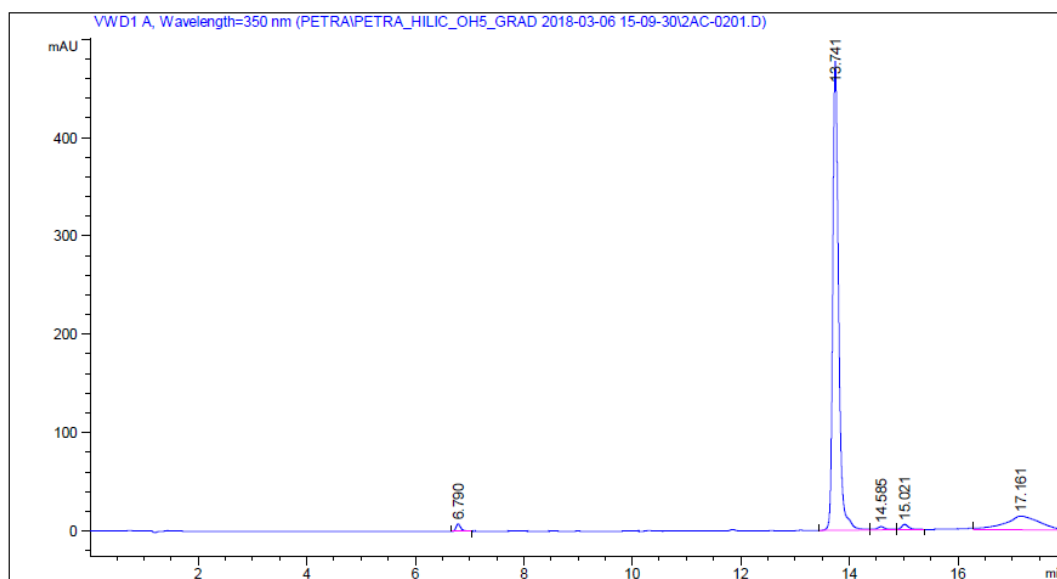


Obrázek P 42 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

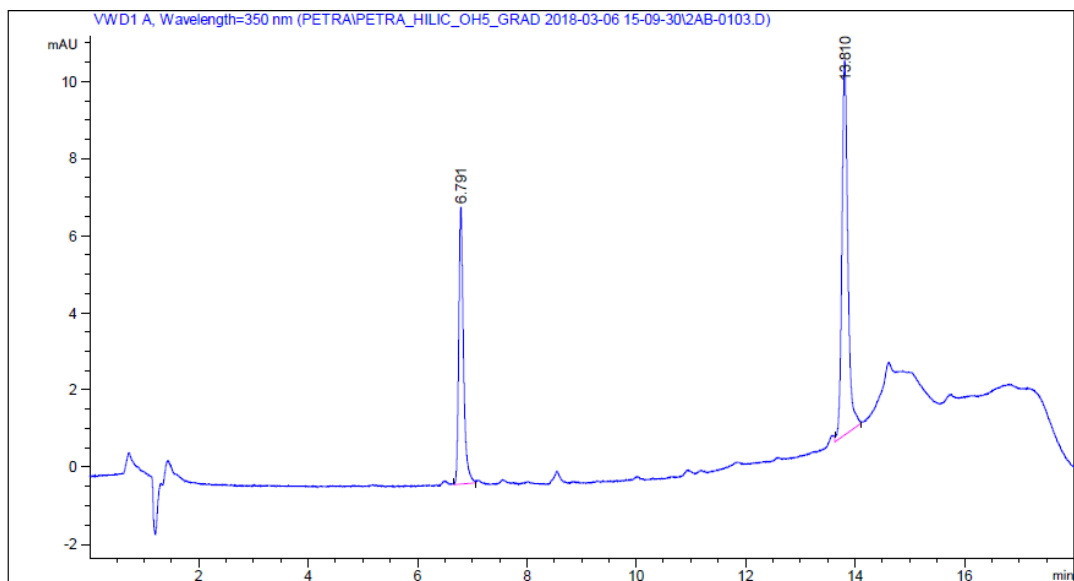
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 7



Obrázek P 43 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

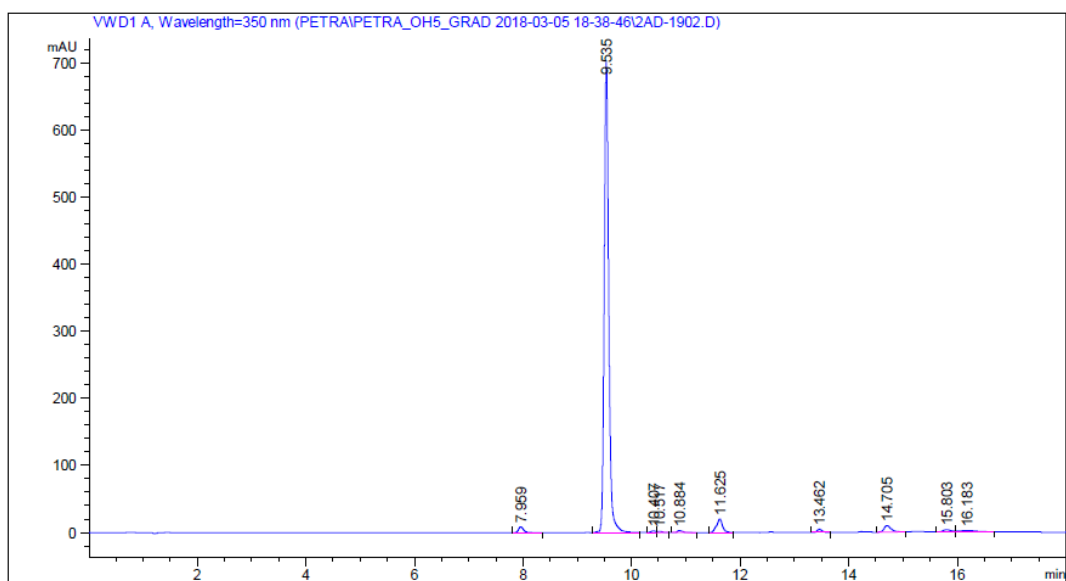


Obrázek P 44 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

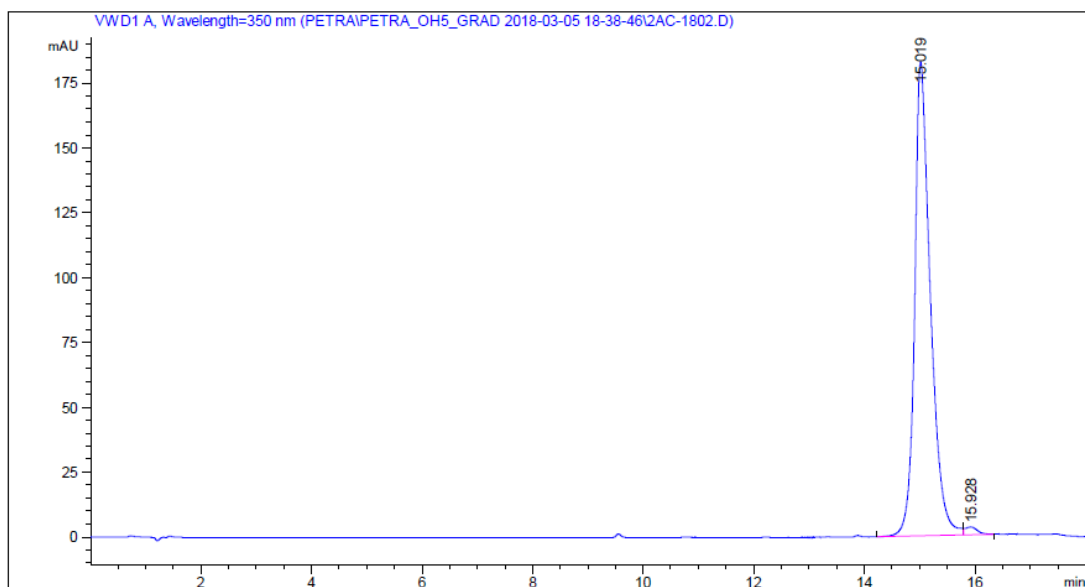


Obrázek P 45 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

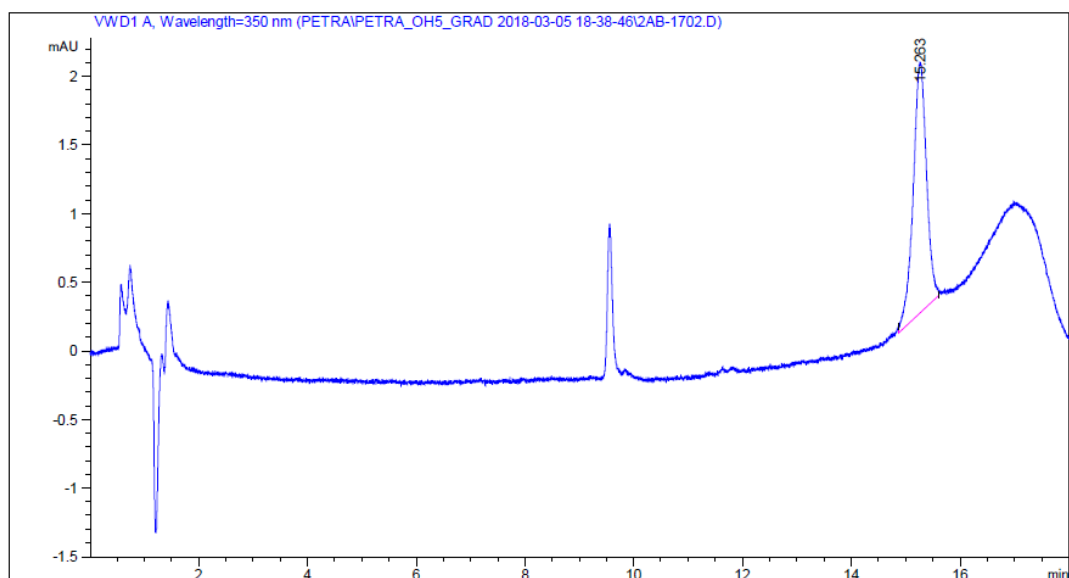
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 8



Obrázek P 46 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače



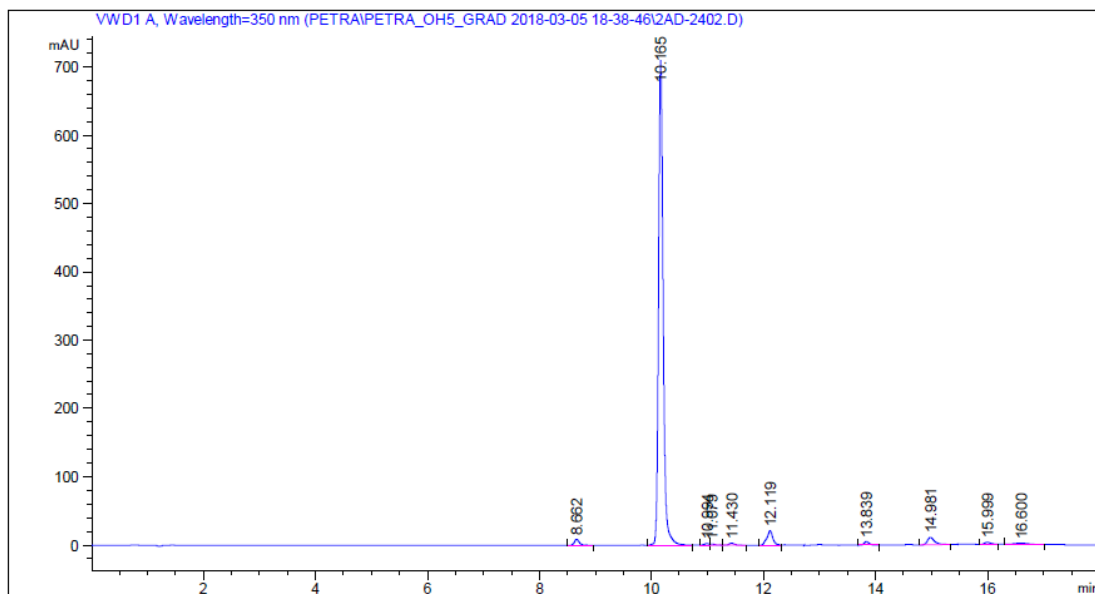
Obrázek P 47 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače



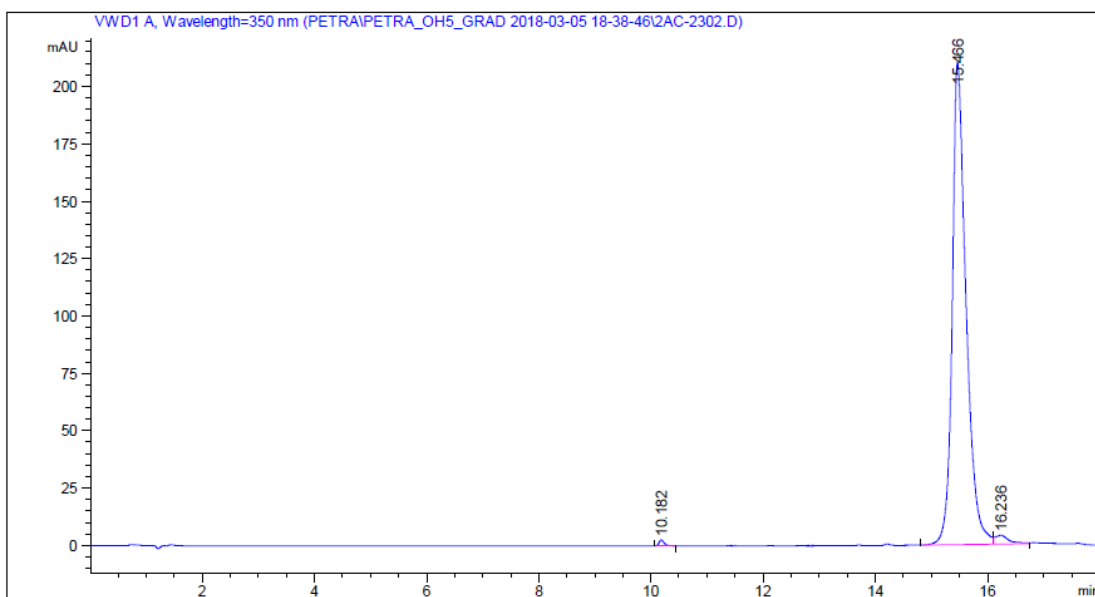
Obrázek P 48 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače



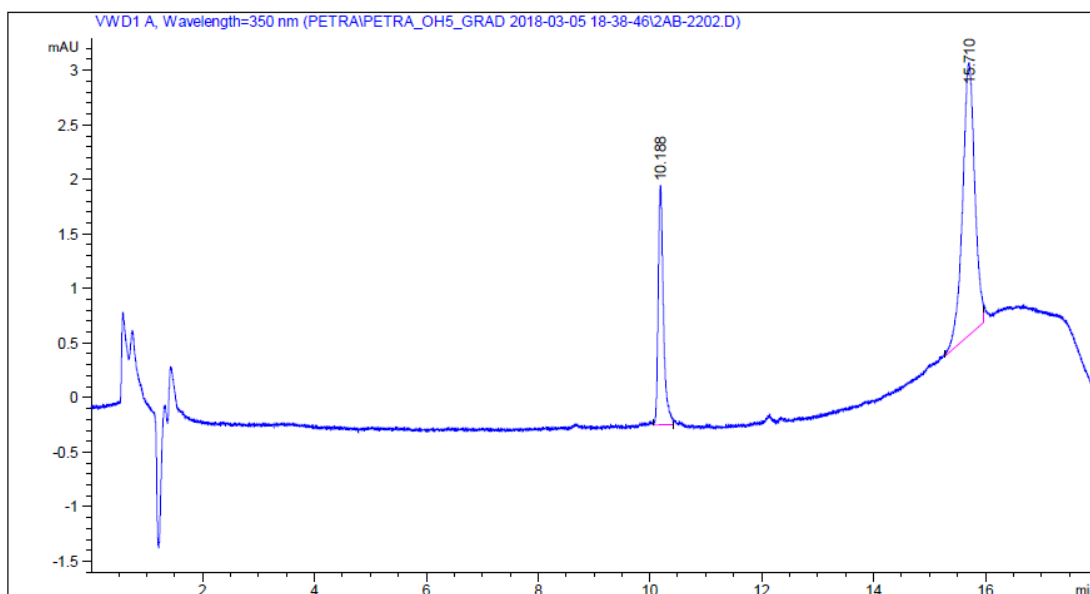
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 9



Obrázek P 49 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

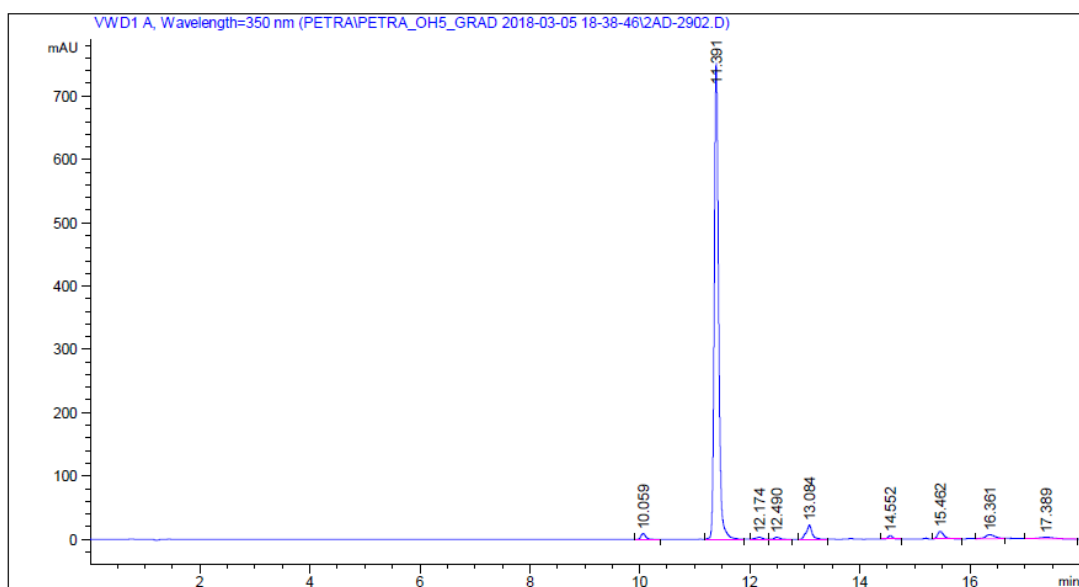


Obrázek P 50 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

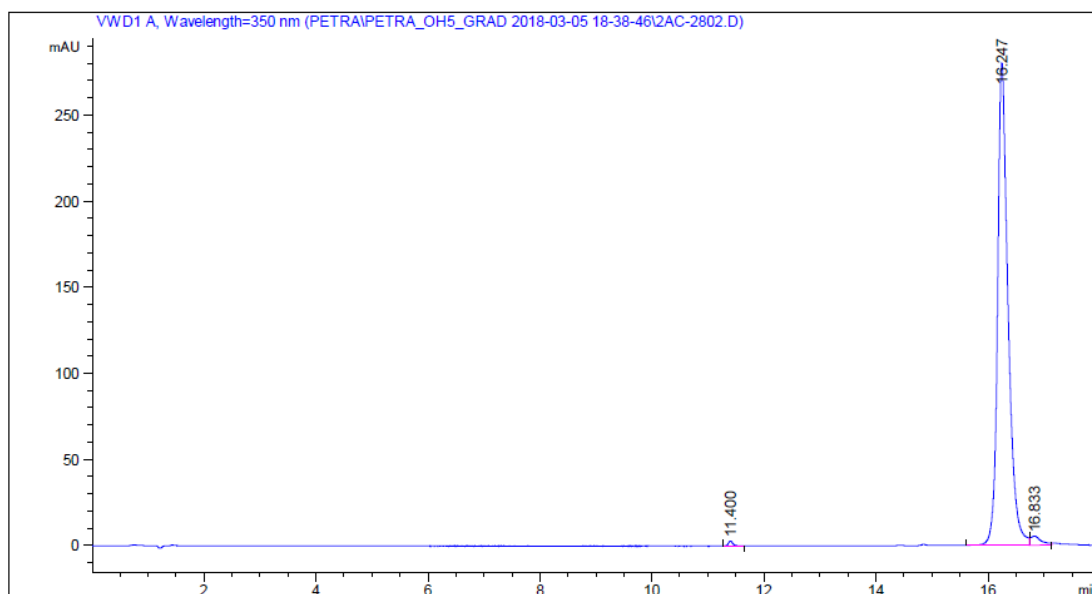


Obrázek P 51 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

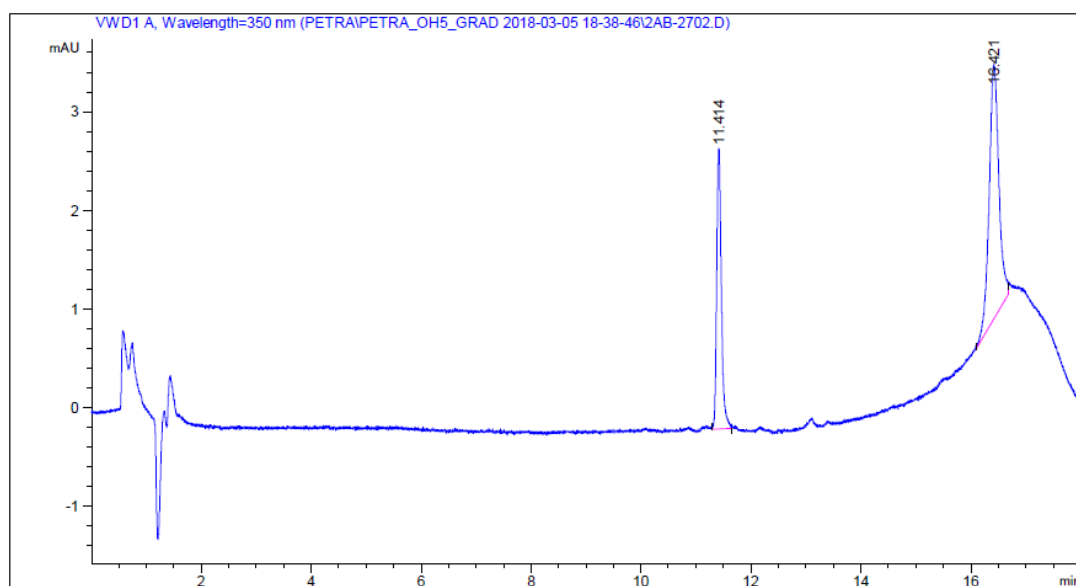
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 10



Obrázek P 52 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

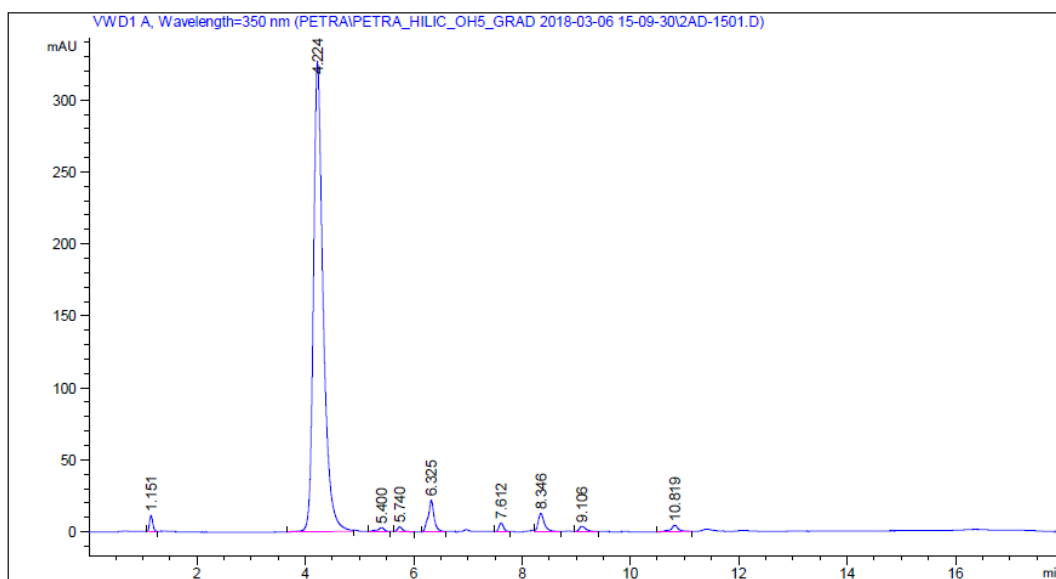


Obrázek P 53 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

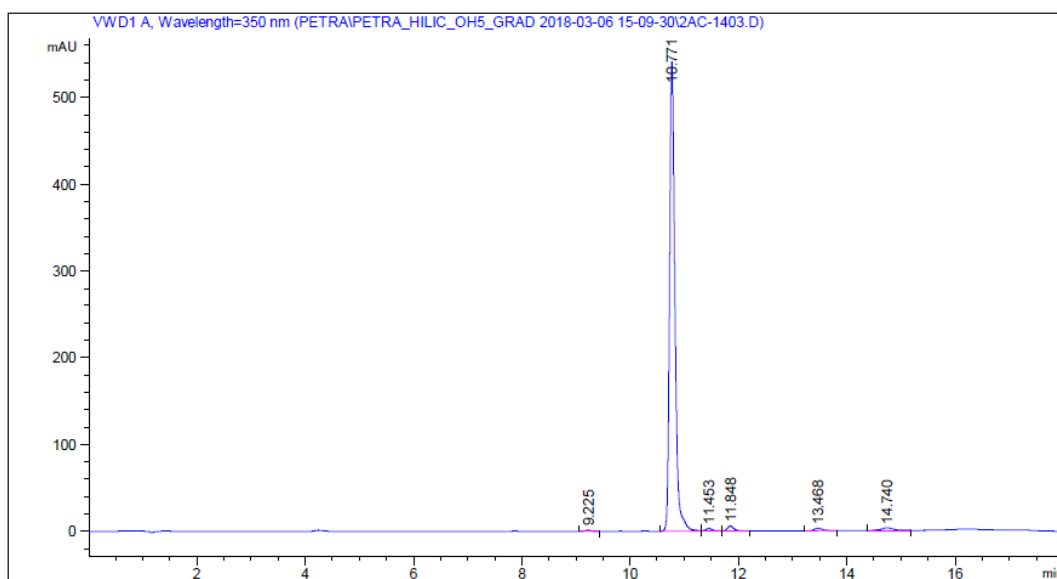


Obrázek P 54 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

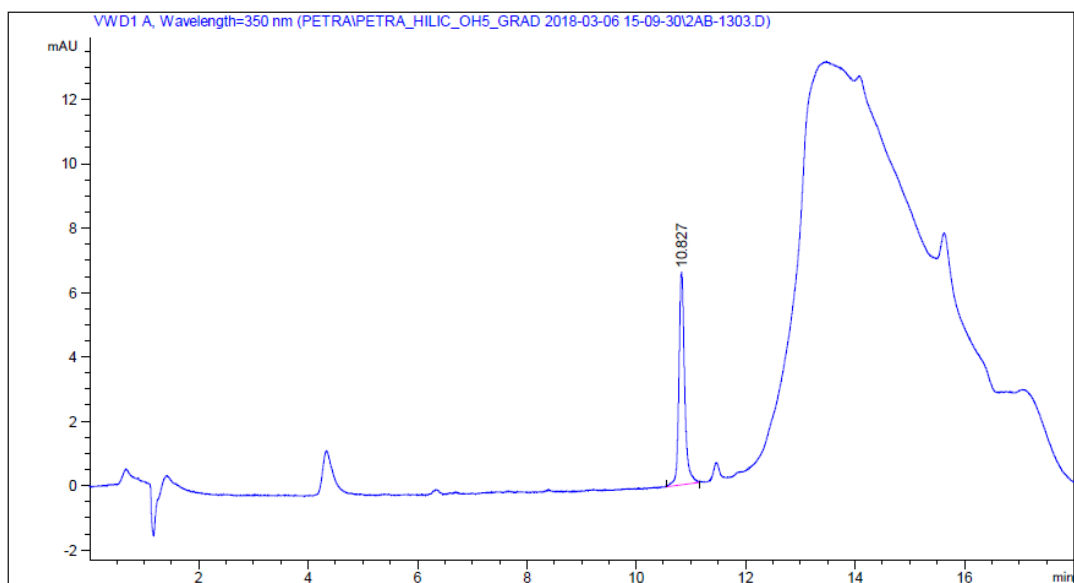
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 11



Obrázek P 55 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

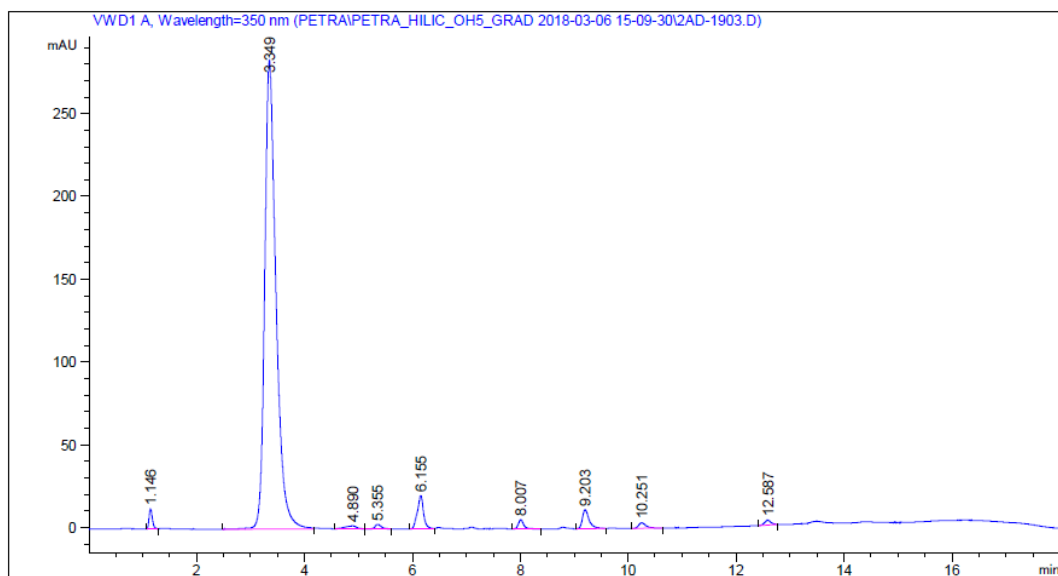


Obrázek P 56 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

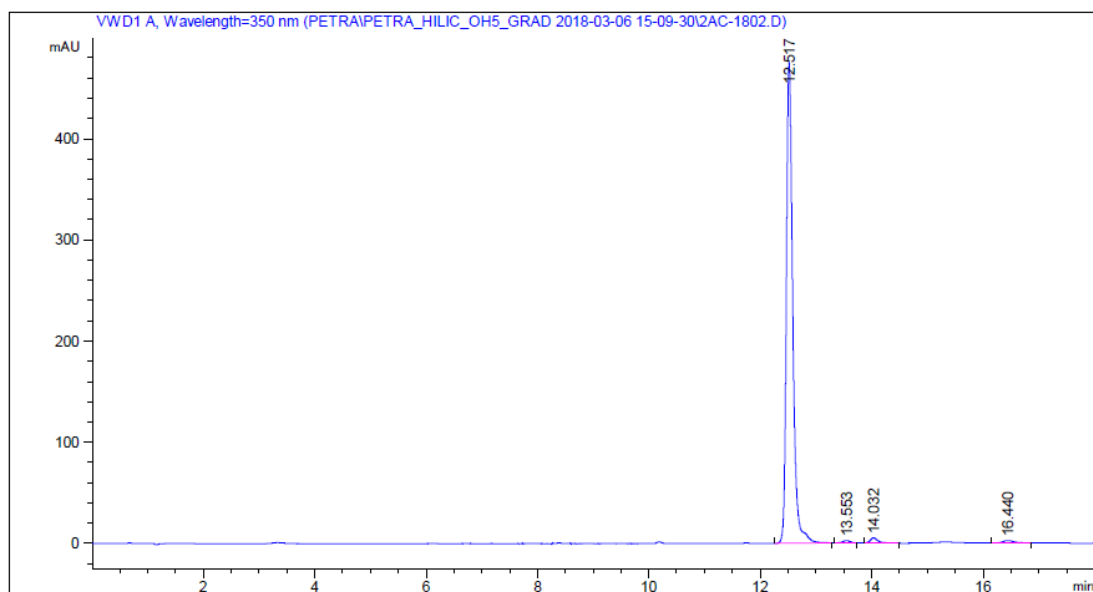


Obrázek P 57 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

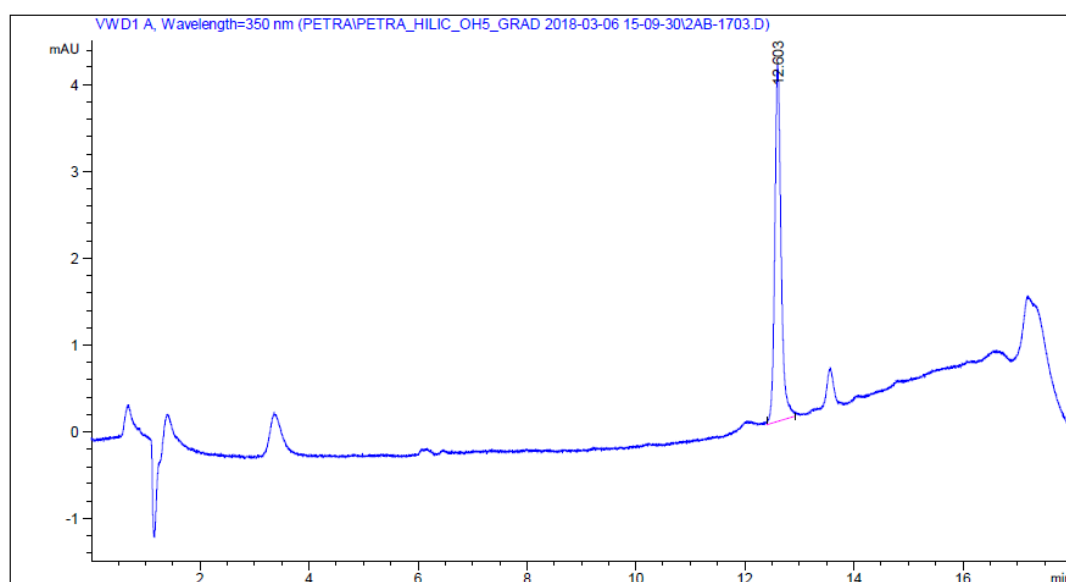
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 12



Obrázek P 58 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače

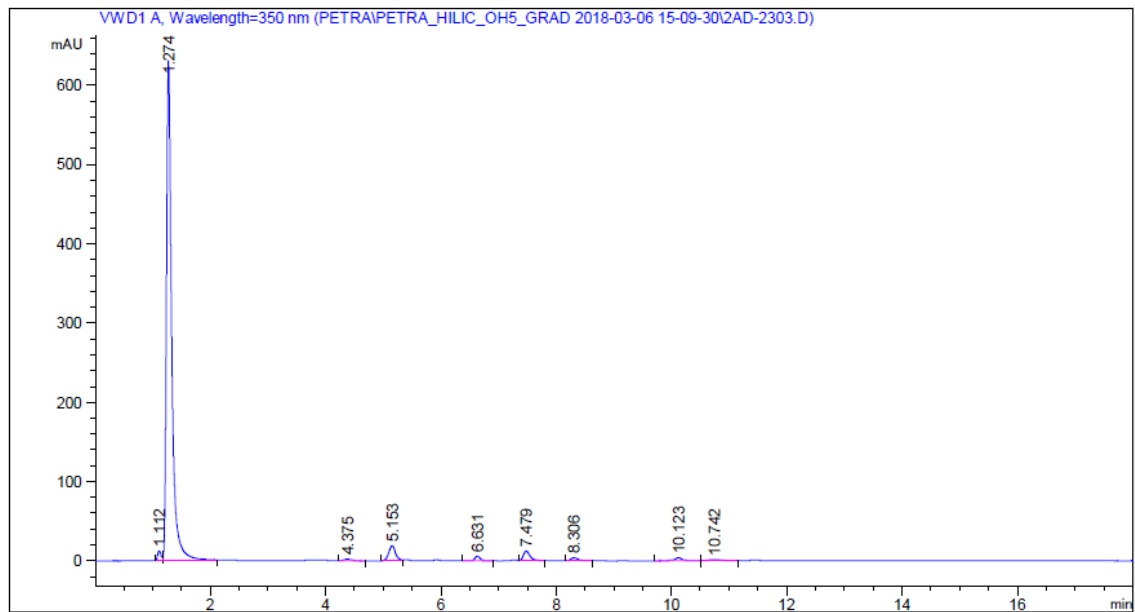


Obrázek P 59 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače

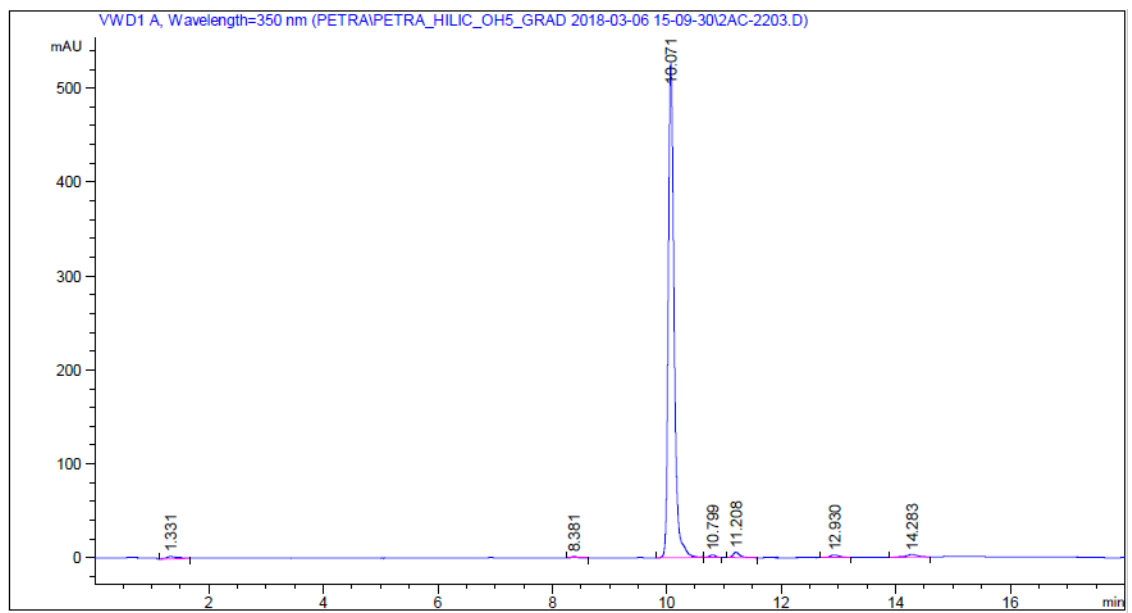


Obrázek P 60 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače

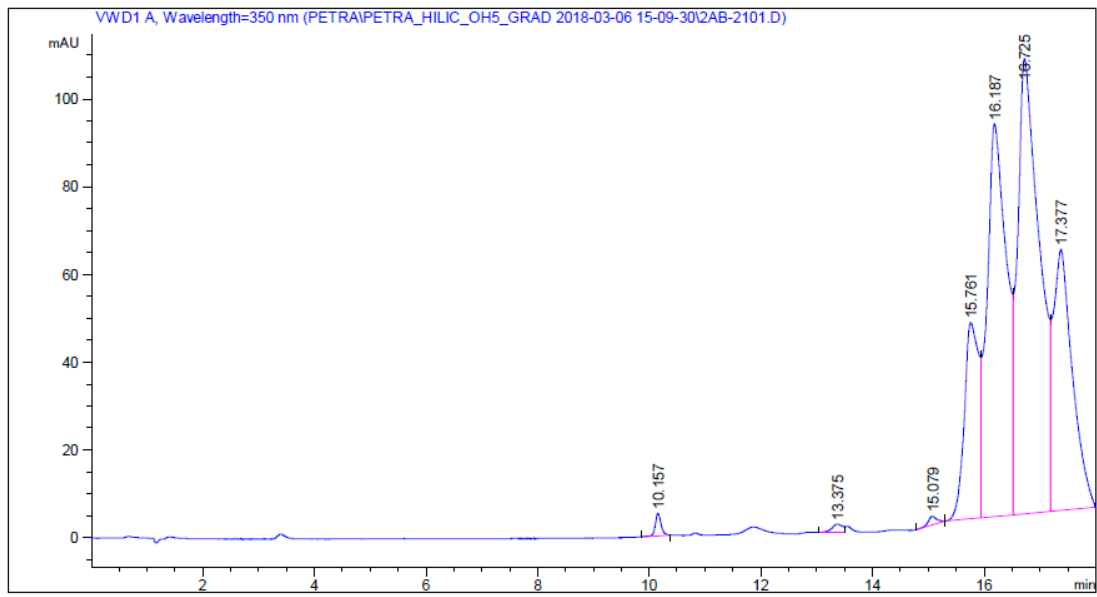
Záznamy z měření v HILIC systému na koloně OH<sub>5</sub> v mobilní fázi acetonitril-75 mM octan amonný, gradient 13



Obrázek P 61 - Záznam měření disulfonovaného optického zjasňovače



Obrázek P 62 - Záznam měření tetrasulfonovaného optického zjasňovače



Obrázek P 63 - Záznam měření hexasulfonovaného optického zjasňovače