UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019 **Bc. Kateřina Nováková**

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Dvourozměrné separace přírodních barviv kapalinovou chromatografií

Bc. Kateřina Nováková

Diplomová práce

2019

UNIVERZITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Two-dimensional separation of natural dyes by liquid chromatography

Bc. Kateřina Nováková

Diploma thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2018/2019**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Kateřina Nováková**
Osobní číslo:	**C17520**
Studijní program:	**N1407 Chemie**
Studijní obor:	**Analytická chemie**
Název tématu:	**Dvourozměrné separace přírodních barviv kapalinovou chromatografií**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části práce popište principy dvourozměrné kapalinové chromatografie včetně běžně používaných fázových systémů. Popište vlastnosti vybraných přírodních organických barviv a jejich využití.

2. Proměřte retenční charakteristiky vybraných přírodních barviv v systému s obrácenými fázemi a v chromatografii hydrofilních separací. Optimalizujte podmínky dvourozměrné chromatografie s cílem dosáhnout co nejlepší separace směsi vybraných barviv. Pokuste se o identifikaci barviv ve směsi.

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. Pavla Doležánová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

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 moji 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 5. 2019

Bc. Kateřina Nováková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu diplomové práce Doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. a své konzultantce Ing. Pavle Doležánové za odborné vedení, rady a pomoc při zpracování této práce.

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na stanovení porfyrinových barviv, zejména vzorku Chlorophyllin sodium copper a čtyř standardů Protoporphyrin IX, Chlorin e4, Chlorin e6 a Pheophorbide a s využitím kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Úkolem bylo vyhodnotit retenční charakteristiky výše uvedených látek a v poslední části byly látky stanoveny pomocí dvoudimenzionální kapalinové chromatografie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dvourozměrná kapalinová chromatografie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, porfyrinová barviva, chlorofylin

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the determination of porphyrin dyes, especially the sample Chlorophyllin sodium copper and four standards Protoporphyrin IX, Chlorine e4, Chlorine e6 and Pheophorbide a using liquid chromatography and mass spectrometry. The retention characteristics of the abovementioned substances were evaluated and in the last part the substances were determined by means of two-dimensional liquid chromatography.

KEYWORDS

Two-dimensional liquid chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, porphyrin dyes, chlorophyllin

OBSAH

ÚVOD 13

1 TEORETICKÁ ČÁST 14

1.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 14

1.2. ROZDĚLENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 14

1.2.1. Chromatografie s obrácenými fázemi 14

1.2.2. Chromatografie s normálními fázemi 15

1.3. HLAVNÍ OBLASTI POUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 15

1.4. VÝHODY KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 16

1.5. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE 16

1.5.1. Hmotnostní spektrometr 17

1.6. DĚLENÍ MS PODLE IONIZAČNÍ TECHNIKY 17

1.6.1. Elektronová ionizace (EI) 17

1.6.2. Chemcká ionizace (CI) 17

1.6.3. Laserová desorpce za účasti matrice (MALDI) 18

1.6.4. Ionizace elektrosprejem (ESI) 18

1.7. SPOJENÍ LC/MS 19

1.7.1. Typy spojení LC/MS 19

1.8. DVOUDIMENZIONÁLNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE 19

1.8.1. Off-line 2DLC 19

1.8.2. Online 2DLC 20

1.9. VÝHODY A NEVÝHODY 2D LC 20

1.10. OBECNÉ VLASTNOSTI 2D KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 21

1.11. KOMPLEXNÍ DVOUROZMĚRNÁ CHROMATOGRAFIE 23

1.11.1. Stacionární fázová modulace 24

1.12. ANALÝZA POMOCÍ DVOUDIMENZIONÁLNÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 24

1.13. PŘIDATNÉ LÁTKY 25

1.13.1. Historie 25

1.13.2. Typy přísad 25

1.14. PŘÍRODNÍ BARVIVA 26

1.15. KLASIFIKACE BARVIV 27

1.16. POTRAVINÁŘSKÁ BARVIVA 27

1.16.1. Dělení barviv 27
1.17. PYROLOVÉ DERIVÁTY 28
1.17.1. Chlorofyly 28
1.17.2. Struktura chlorofylu 29
1.17.3. Mědnaté komplexy chlorofylu 29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 30
2.1. ZAŘÍZENÍ A PŘÍSTROJE 30
2.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 31
2.2.1. Použitý vzorek 31
2.2.2. Použité standardy 31
2.3. PRACOVNÍ POSTUP 34
2.3.1. Příprava standardů – rozpuštění v acetonitrilu 34
2.3.2. Příprava vzorku 34
2.3.3. Podmínky pro měření na HPLC 34
2.3.4. Podmínky pro měření na LC/MS 35
2.3.5. Podmínky pro měření na 2D LC/UV 35
3 VÝSLEDKY A DISKUZE 36
3.1. URČENÍ VLNOVÉ DÉLKY POMOCÍ UV/VIS SPEKTROMETRU 36
3.2. MĚŘENÍ POMOCÍ SPOJENÍ LC/MS 36
3.3. RETENČNÍ CHOVÁNÍ LÁTEK V HILIC SYSTÉMU 38
3.4. ANALÝZA LÁTEK VE 2D LC SYSTÉMU 40
ZÁVĚR 43
LITERATURA 44
Přílohy OBRÁZKY 48
Přílohy TABULKY 74

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 *Schéma kapalinového chromatografu* 14
Obrázek 2 *Schéma hmotnostního spektrometru* 17
Obrázek 3 *Chlorofyl* 29
Obrázek 4 *Protoporphyrin IX* 32
Obrázek 5 *Chlorin e4* 32
Obrázek 6 *Chlorin e6* 33
Obrázek 7 *Pheophorbide a* 33

Tabulka 1 *Seznam základních potravinářských barviv a pigmentů* 28
Tabulka 2 *Použité kolony:* 31
Tabulka 3 *Gradienty pro HPLC* 34
Tabulka 4 *Gradienty LC/MS* 37
Tabulka 5 *Gradienty LC/MS* 37
Tabulka 6 *Gradient LC* 39
Tabulka 7 *První gradient 2D LC* 40
Tabulka 8 *Druhý gradient 2D LC* 41
Tabulka 9 *Třetí gradient 2D LC* 41
Tabulka 10 *Čtvrtý gradient 2D LC* 41
Tabulka 11 *Pátý gradient 2D LC* 42

SEZNAM ZKRATEK

API	ionizace za atmosférického tlaku
CI	chemická ionizace
2D LC	dvourozměrná kapalinová chromatografie
DLI	spojení s přímým vstupem eluátu
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
FAB	průtoková sonda pro ionizaci
GC/MS	spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
ICP	indukčně vázané plazma
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
LC/MS/MS	spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	desorpce laserem za účasti matrice
MB	spojení s nekonečným pásem
NP	chromatografie v systému s normálními fázemi
PB	particle beam
RPC	chromatografie v systému s obrácenými fázemi

ÚVOD

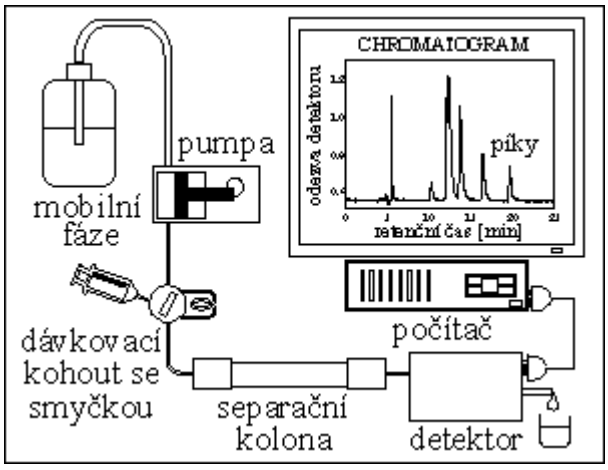
Ve své diplomové práci se zabývám analýzou pyrrolových (porfyrinových) barviv, jedná se o fotosynteticky aktivní zelené pigmenty. Porfyrinový skelet je složen ze čtyř pyrrolových jader spojených methinovými skupinami. Základní stavební jednotkou je porfin, od kterého jsou odvozeny i chlorofyly a chlorofyliny. V současné době je známo sedm typů chlorofylů (a, b, d, g, e, bakteriochlorofyl a bakterioviridin). Chlorofyl a a b jsou důležitou součástí fotosyntézy. Chlorofyl a je modrozelený a b je žlutozelený. Jedná se o zelené barvivo, které se využívá v potravinářském průmyslu, nejčastěji se používají do polévek, olivového oleje, limonád, likérů a různých cukrovinek. Vytváří potravinu atraktivnější pro spotřebitele. Mají také antioxidační a antikarcinogenní vlastnosti. Můžou být přírodní, přírodně identické (nejsou získány přirozenou cestou) nebo syntetické. Získávají se louhováním například z trávy nebo vojtěšky. Doposud nebyly nalezeny žádné negativní účinky. Mezi jejich nevýhody patří citlivost na světlo.

Tato barviva byla analyzována kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi a chromatografií hydrofilních interakcí za použití gradientu a izokratické eluce. V další části byla barviva identifikována pomocí spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie LC/MS a pro poslední část experimentů byla použita dvourozměrná kapalinová chromatografie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Obecná charakteristika kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která má separační metoda má několik využití, slouží k identifikaci složek vzorku, zvýšení jejich koncentrace a izolace od jiných složek při preparativní analýze. Metoda je založena na neustálém ustanovování rovnováhy složek vzorku mezi dvěma fázemi a jejich rozdílné rychlosti migrace. Veškeré chromatografické systémy ať už kapalinové či plynové mají vždy dvě fáze. Jedná se o nepohyblivou neboli stacionární fázi a pohyblivou neboli mobilní fázi. Mobilní fáze se pohybuje společně se separovanými složkami. Přístroje pro kapalinovou chromatografii se skládají z několika částí, jedná se o zařízení pro dávkování vzorku, vysokotlaké čerpadlo, separační kolonu, termostat a detektor, který poskytuje elektrický signál. Časová závislost tohoto signálu se následně zaznamenává jako výsledný chromatogram a to nejčastěji pomocí integrátoru či počítače s analogově – digitálním převodníkem [1].



Obrázek 1 Schéma kapalinového chromatografu

1.2. Rozdělení kapalinové chromatografie

1.2.1. Chromatografie s obrácenými fázemi

Chromatografie s obrácenými fázemi (RPC) je jednou z nejběžněji využívaných typů kapalinové chromatografie (LC). Rozděluje analyzované vzorky mezi polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi. Používané silikagelové stacionární fáze jsou C18, C8 nebo fenyl. Využití této metody je zejména pro analyty s hydrofobními vlastnostmi a delšími alkylovými řetězci [2].

V tomto typu chromatografie je základem použití polárnější mobilní fáze, většinou se jedná o kombinaci methanol – voda, či acetonitril – voda a jiné. Vlastnosti organického rozpouštědla

mají vliv zejména na separaci a její selektivitu a také na velikost retence. Stacionární fáze je zde méně polární jedná se o chemicky vázané fáze. RPC má schopnost rozdělovat velký rozsah vzorků od nepolárních, středně až silně polárních látek. Metoda je vhodná zejména pro látky, které mají různou velikost hydrofobních částí molekul [1].

Vedle silikagelových sorbentů se začínají také objevovat novější materiály jako např. anorganicko-organické hybridy a modifikované oxidy kovů. Vývoj sorbentů pro HPLC je rychlý a používají se materiály s lepšími vlastnostmi, jedná se například o využití modernějších matric. Jedná se o porézní sorbenty, neporézní a povrchově porézní sorbenty nebo monolity. [3]

1.2.2. Chromatografie s normálními fázemi

Chromatografie s normálními fázemi (NP) je nejstarší typ chromatografie, který využívá polární stacionární fázi a méně polární mobilní fázi. Mobilní fáze je zde tvořena směsí dvou organických rozpouštědel, které se liší svou polaritou. Můžou být využita více polární rozpouštědla jako je propanol, acetonitril nebo dichlormethan a méně polární rozpouštědla mezi které řadíme hexan nebo heptan. Metoda je vhodná pro nepolární látky jako jsou například triacylglyceroly, které se vyskytují v organismu, dále pro neiontové látky jako jsou například tenzidy. V současné době se ale NPC moc nepoužívá kvůli vysoké ceně organických rozpouštědel [1].

1.3. Hlavní oblasti použití kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie se používá pro analýzu velkého množství látek. Z nejvýznamnějších patří skupiny látek biologického původu, nebo látek významně ovlivňujících zdraví člověka. Některé vybrané příklady aplikace kapalinové chromatografie jsou uvedeny v následujících odstavcích [4].

Důležitou součástí živých organismů jsou lipidy, které mají velice rozmanitou chemickou strukturu. Jejich hlavní funkcí je ochranný obal organismu, izolační bariéra, součást biologických membrán a mnoho dalších. V minulosti byla objevena spojitost mezi abnormálními vazbami, které mohou způsobovat choroby jako obezita nebo diabetes mellitus. Z tohoto důvodu je na analýzu lipidů kladen větší důraz a důležitost. Úkolem kapalinové chromatografie je poskytnout přehled jednotlivých technik, které se podílejí na výzkumu lipidů, od jednodušších technik jako je tenkovrstvá chromatografie až po složitější a novější techniky jako je multidimenzionální technika [4].

Výroba léčiv patří mezi dlouhodobé perspektivní odvětví. Dochází k neustálému růstu spotřeby léků. Chromatografie je všestrannou technikou při zvolení režimu, detektoru, způsobu dělení a typ odběru vzorku s neznámou chemickou strukturou [4].

Mezi další oblast využití LC je stanovení toxinů, které jsou velice důležité pro klinickou diagnostiku a léčbu. Jedno z významných stanovení je identifikace houbových toxinů, jelikož dochází k častým otravám z hub. Jedná se o spojení LC s hmotnostní spektrometrií [5].

V dnešní době je také důležité stanovení pesticidů a jejich reziduí jsou to látky, které tlumí choroby rostlin. Z hlediska použití LC se jedná o chromatografické stanovení herbicidů jako jsou fenylmočovinové herbicidy, herbicidy s fenoxykyselinami nebo karbamáty dále insekticidů a některých zbytků fungicidů. Nejčastěji se stanovují ve vodě, kdy je u chromatografické separace kladen důraz na požadovanou mez kvantifikace. Kapalinová chromatografie hraje velmi důležitou roli pro stanovení reziduí pesticidů, jejich metabolitů a produktů transformace v ekologických vodách [6].

1.4. Výhody kapalinové chromatografie

Podstatnou roli v rozvoji LC má zejména vývoj adsorbentů, které mají uniformní povrch jak chemicky tak i geometricky. Nepřehlédnutelný je i vývoj přístrojové techniky a použití detektorů s vysokou citlivostí. Rozlišné vlastnosti adsorbentů umožnují chemickou modifikaci povrchů. Nezanedbatelnou výhodou je i vysoký tlakový limit kapalinových chromatografů, který je nutný při zmenšování velikosti částic sorbentu. Jako příklad adsorbentů můžeme uvést oxid hlinitý, zeolit nebo silikagel [7].

Mezi přednosti kapalinové chromatografie zahrnujeme zejména nízkou teplotu kolony, která se typicky pohybuje v rozmezí 20–30 °C, což umožňuje analyzovat i látky tepelně nestabilní. Další předností je také možnost měnit povahu sorbentu a tím ovlivňovat charakter interakce vzorku [7].

1.5. Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o analytickou metodu, která poskytuje jak kvalitativní neboli strukturální, tak i kvantitativní informace o molekulách v daném vzorku. Prvním krokem je zavedení molekul do ionizačního zdroje, kde dochází k tomu, že se z molekuly stává iont. Tento proces se nazývá ionizace dochází ke vzniku záporných či kladných iontů. Následně se ionty dostávají do hmotnostního analyzátoru a dělí se podle poměru hmotnosti/náboje neboli poměru m/z. V posledním kroku dochází ke kontaktu iontů s částí detektoru a ten poskytuje signály, které

zaznamená počítač. Výsledkem je tedy hmotnostní spektrum, které ukazuje počet signálu podle poměru m/z [8].

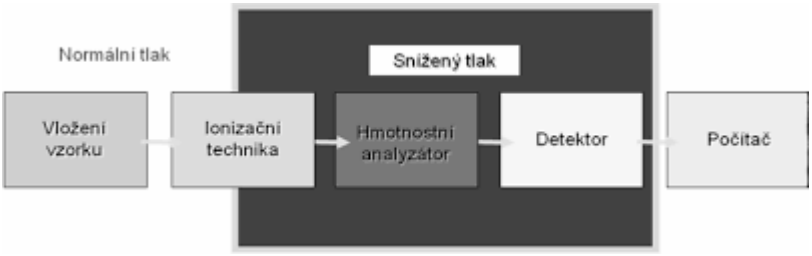
1.5.1. Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí:

a) **iontový zdroj** – převádí analyt do iontového stavu v plynné fázi, jedná se o tzv. ionizaci. Ionty jsou následně transportovány k dalším součástím hmotnostního spektrometru. Existuje několik iontových zdrojů používaných v závislosti na typu analytu, a to elektronová ionizace, chemická ionizace, ionizace elektrosprejem, indukčně vázané plazma (ICP) a desorpce laserem za účasti matrice.

b) **hmotnostní analyzátor** – existuje mnoho typů analyzátorů (statické, dynamické, elektrické či magnetické), ale všechny pracují na stejném principu, a to je oddělení iontů podle jejich m/z. Mezi hmotnostní analyzátory řadíme kvadrupólový analyzátor, iontová past či cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací.

c) **detektor** – zaznamenává průchody nebo dopady iontů, které jsou rozděleny podle hmotnosti a náboje [9].



Obrázek 2 Schéma hmotnostního spektrometru

1.6. Dělení MS podle ionizační techniky

1.6.1. Elektronová ionizace (EI)

Jedná se o nejstarší tvrdou ionizační techniku, která probíhá v plynném stavu za vakua. Vlivem energie, kterou přenášejí elektrony molekule, dojde k odtržení elektronu za vzniku iontu. Tato metoda je v současné době velmi používána ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Tvrdá ionizační technika způsobuje štěpení vzniklého iontu na fragmenty, které nám pomáhají určit analyzovanou sloučeninu. Nevýhodou je požadovaná teplotní stabilita látky a také její možný rozklad v iontovém zdroji, což nám zhoršuje její identifikaci. Těmto nevýhodám můžeme předejít použitím chemické ionizace [10].

1.6.2. Chemická ionizace (CI)

Jedná se o měkkou ionizační techniku, ve které se vyskytují ionty s menším přebytkem energie. Získáváme tedy spektra s menší fragmentací, tudíž zde oproti tvrdé ionizaci snadněji vyhodnotíme molekulární iont. Nejprve dochází k ionizaci reakčního plynu a následně analytu [11].

1.6.3. Laserová desorpce za účasti matrice (MALDI)

Metoda má výhodu v jednoduchosti při přípravě vzorku a toleranci vůči kontaminaci. Dochází zde k ionizaci i desorpci. Metoda má dvě části, v první části se sloučenina, kterou chceme analyzovat, rozpustí nejčastěji v organické kyselině nazvané matice. Organická kyselina musí mít silnou absorbci na vlnové délce laseru. Druhá část probíhá za vakuových podmínek, kdy se posléze vysuší a dojde k odstranění použitých rozpouštědel. Dochází ke krátkému laserovému pulsu, při kterém je energie laseru absorbována matricí s následným převedením analytů do plynné fáze a jejich ionizaci [11].

1.6.4. Ionizace elektrosprejem (ESI)

Metoda způsobuje velmi účinnou ionizaci zejména polárních analytů. Principem metody je přenos iontů z roztoku za atmosférického tlaku do prostředí, kde je vysoké vakuum. Metoda vhodná pro středně polární až polární molekuly, které jsou rozpustné ve vodných rozpouštědlech. Dochází k tvorbě aduktů jak v pozitivních tak v negativních režimech, uvolnění kationtů a aniontů ze solí a deprotonaci. Hmotnostní spektra bávají složitá vzhledem k tvorbě shluků rozpouštědel nebo násobně nabitých iontů, proto se molekuly vzorků nejprve desorbují nebo vzorkují z pevných látek či roztoků [12].

Metoda je citlivá, robustní a velmi spolehlivá. Používá se pro netěkavé a tepelně labilní molekuly. Spolu s kapalinovou chromatografií se stala velmi silnou a účinnou technikou, která je schopna analyzovat malé i velké molekuly v komplexních vzorcích. Automatické zavádění vzorku způsobuje rychlou analýzu a rozpustnost vzorku [8].

1.7.SPOJENÍ LC/MS

Pokud nemůžeme pro stanovení analytu použít plynovou chromatografii, použijeme spojení s kapalinovou chromatografií, která je šetrnější k analyzovaným vzorkům a je vhodná pro netěkavé látky [11].

Problémem ve spojení LC/MS je to, že hmotnostní spektrometr pracuje za vysokého vakua a kapalinový chromatograf pracuje za atmosférického tlaku. Řešením tohoto problému jsou měkké ionizační techniky (chemická ionizace, elektrosprej či termosprej). Tímto způsobem jsme schopni určit molekulovou hmotnost neznámé látky, ale problém je v určení struktury, což může vyřešit spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS) [13].

1.7.1. Typy spojení LC/MS

V průběhu posledních několika desetiletí byla vyvinuta celá řada instrumentálních uspořádání pro spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Mezi dříve používaná spojení patří spojení s přímým vstupem eluátu (DLI), spojení s nekonečným pásem (MB), particle beam (PB), termosprej (TSP) a průtoková sonda pro ionizaci (FAB). V posledních letech se uplatňují hlavně techniky ionizace za atmosférického tlaku (API), mezi které patří elektrosprejová ionizace a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [13].

1.8. Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie

Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie slouží k analýze a charakterizaci složitějších vzorků, které nelze úspěšně separovat pomocí klasické jednorozměrné chromatografie. Vzorek je podroben dvěma různým chromatografickým procesům, abychom dosáhli vyšší rozlišovací schopnosti.

Dvourozměrnou chromatografii lze provozovat v režimu online (2DLC). Na druhé straně u off-line 2DLC dochází k poměrně dlouhé době analýzy, což nám zabraňuje použít tuto techniky pro rutinní analýzy, avšak dosáhneme maximální rozlišovací schopnosti obou procesů [14].

1.8.1. Off-line 2DLC

Tento způsob separace se řadí mezi snadnější techniku, která může být ovšem časově náročnější. Je zde horší možnost automatizace a reprodukovatelnosti. Tato technika je náchylnější na kontaminaci a tvorbu artefaktů [15].

1.8.2. Online 2DLC

Tato technika je rychlejší a reprodukovatelnější, ale je zde potřeba specifického rozhraní. Rozdíl mezi konvenční a komplexní chromatografickou technikou je to, že první typ umožňuje opětovné dávkování frakcí z první do druhé kolony. V druhém případě je vzorek podroben oddělení v obou dimenzích. Komplexní 2D LC se provádí za použití jednoho či dvou HPLC systému vybavených přenosovým zařízením tzv. rozhraní nebo modulátor. Rozhraní vzorkuje eluát z první kolony a dojde k jeho dávkování do druhé kolony. Doba analýzy druhé dimenze by měla být stejná jako doba modulace. Význam modulace je z důvodu zabránění ztrátě informací v dvourozměrném oddělení, vzhledem k nedostatečnému odběru vzorku v prvním rozměru [15].

1.9. Výhody a nevýhody 2D LC

Tento typ chromatografie umožňuje vysokou rozlišovací schopnost a tzv. píkovou kapacitu. Při potřebě vyšší rozlišovací schopnosti však dochází k většímu ředění vzorků, což způsobuje snížení citlivosti. Výhoda online 2DLC je snižování času analýzy, avšak problém je u spojení dvou chromatografických procesů. Poměrně vysokého snížení doby analýzy můžeme dosáhnout pomocí vysokých tlaků. Je nutné, aby byl druhý rozměr separace rychlý s dostatečnou rozlišovací schopností, vzhledem k opakovanému vzorkování z prvního rozměru. Pro dosažení menšího přiváděného objemu vzorku musí být separace na první koloně prováděna při nízké lineární rychlosti průtoku. Mezi další nevýhody patří kompatibilita mobilní fáze, která je použitá v obou rozměrech [6].

Pokud zkombinujeme dva separační procesy, můžeme při analýze dosáhnout dvourozměrné charakterizace vzorku. Dvourozměrné LC techniky jsou vysoce účinné pro komplexní sloučeniny a směsi, proto se mohou uplatňovat i v analýze průmyslového prostředí. Pokud analyzujeme takové směsi, musíme vybrat vhodné složení dvou separačních rozměrů, využíváme tzv. modulaci pomocí přepínacího ventilu se smyčkami. Úkolem modulátoru je shromažďovat frakce z prvního rozměru (1D, první separace) a přenášení na druhý rozměr (2D, druhá separace). Pokud je eluát opouštějící první kolonu dostatečně často vzorkován a analyzován, je tato separace označována jako komplexní (tzv. comprehensive). Čas modulace a doba analýzy v druhé separaci je stejná.

Další výhodou je vysoké rozlišení 2D LC, které nám umožňuje stanovení složitějších směsí, jako jsou např. látky používající se pro výrobu polyetherpolyolů. Mezi tyto látky patří

ethoxyláty ricinového oleje, které mohou obsahovat ethoxylované mastné kyseliny jako je kyselina linolová nebo stearová [16].

Mezi další aplikace 2D LC řadíme stanovení lipidomických vzorků, které jsou složité a často překračují limity maximální dosažitelné píkové kapacity klasické jednorozměrné chromatografie. Zde můžeme opět využít komplexní dvourozměrnou kapalinovou chromatografii, avšak nevýhodou jsou složité soubory dat, zejména kvůli spojení LC/MS používané při těchto analýzách [17].

Vedle separace 2D kapalinovou chromatografií, která využívá několik funkcí jako je sběr frakcí z prvního režimu, oddělování a následovné vstřikování vzorku do druhého separačního režimu lze použít 2D LC také pro online výměnu pufrů. Technika dvourozměrné kapalinové chromatografie může zjednodušit proces čištění a snížit náklady na separaci. Dále je možné celou techniku automatizovat [18].

Metoda dvourozměrné kapalinové chromatografie má několik výhod jako je snížení účinku matrice, vysokou specifičnost, citlivost a reprodukovatelnost. V neposlední řadě také vysokou píkovou kapacitu a možnost automatizace. Proto je vhodnou metodou pro analýzu a oddělení stopových látek. Používá se tedy v oblasti farmacie, životního prostředí a potravinářského průmyslu. Jedná se o kvantitativní a kvalitativní stanovení drog, toxikantů a endogenních látek v biologických vzorcích [19].

1.10. Obecné vlastnosti 2D kapalinové chromatografie

Online dvourozměrná kapalinová chromatografie má menší teoreticky dosažitelnou píkovou kapacitu kolem 1500, oproti off-line technice, která může generovat píkovou kapacitu až kolem 10 000. Hlavním cílem 2D LC je zvýšení rychlosti, za kterou je možné daný počet píků získat. Pokud chceme optimalizovat 2D LC je nutné se zaměřit na několik parametrů, které mají vliv na separační schopnosti celého systému. Důležité je správná volba prvního a druhého separačního módu. Jedná se o teplotu, průtok mobilní fáze a další. Maximální kapacity 2D systému dosáhneme, pokud na sobě nejsou retenční charakteristiky závislé a jsou tzv. ortogonální. Další významný parametr, který má vliv na účinnost separace je vzorkování a sběr frakcí z eluátu z první dimenze [20].

Dnes je off-line nebo online 2D kapalinová chromatografie nejmodernější technika, která je využívána v mnoha laboratořích pro stanovení proteinů z komplexních vzorků. Používají se metody ortogonální separace. Pro první rozměr je to technika iontové výměny (Strong Cation Exchange, SCX) a pro druhý rozměr je to separace v systému s obrácenými fázemi.

Pro dosažení lepší citlivosti metody se dělení v druhém rozměru provádí v miniaturizovaném prostředí [21].

Tato technika vzhledem ke své vysoké rozlišovací schopnosti může analyzovat složitější vzorky, což má význam v proteomickém a metabolickém výzkumu. Je zde vysoký potenciál v rozlišovací schopnosti, které lze dosáhnout v krátkém čase oproti jednorozměrné chromatografii. Tato vlastnost je dána především píkovou kapacitou separace v obou rozměrech. Dvourozměrnou separaci si můžeme představit jako třístupňový proces. Prvním krokem je separace na první koloně. Druhým krokem, který je kritický pro správné fungování 2D LC je to tzv. "odběr" eluátu z první kolony. Třetí krok je separace frakcí vzorku na druhé koloně. Pokud je eluát z první kolony při vzorkování tzv. "podhodnocen", může dojít ke snížení maximální kapacity 2D LC. Všechny tyto tři procesy mají vliv na skutečně dosaženou píkovou kapacitu. Při výpočtu odhadů maximální kapacity je nutno neopomenout ztráty v důsledku kroku odběru vzorků. [22].

2DLC technika aplikuje na vzorek dva nezávislé systémy separace v kapalné fázi. Přenos pouze části vzorku z první dimenze do druhé se také nazývá "heart-cut" chromatografie. Může také docházet k přenosu části z první dimenze do druhé v několika malých alikvotech, tento proces se nazývá "komplexní" 2D chromatografie. Z analytického hlediska je důležité věnovat pozornost druhé koloně a následné detekci. Technika je schopna analyzovat vzorky s jednoduchými směsmi obsahující několik látek až po vzorky obsahující tisíce složek. Ještě do nedávné doby byla tato specializovaná technika 2D LC ve vztahu k jiným LC včetně gradientové a izokratické eluce přístupná jen několika laboratořím. Důležitou vlastností je doba analýzy, snaha zkrátit ji na co nejmenší dobu při analýze složitých vzorků. Bylo zjištěno, že největší omezující faktor je rychlost gradientové eluce v 1D LC. Při optimalizaci gradientové eluce v 1D LC bylo zjištěno, že je tato technika účinná při analýze vzorků obsahujících méně než deset chemických složek. Při použití v 2D LC v obou dimenzích přináší gradientová eluce zlepšení rychlosti a kvality separace. Teorie o ideální píkové kapacitě pochází z práce Murpyho, Schureho a Foleye, která popisuje, jak často musí být odebrán eluát z první kolony, aby bylo zachováno rozlišení z první dimenze. Odběr by měl být proveden třikrát nebo čtyřikrát, aby bylo zabráněno mísení již rozdělených částí vzorku. Toto je označováno jak M-S-F neboli kritérium výběru. Správný čas odběru vzorku musí být zvolen již na začátku vývoje komplexní 2DLC separační metody. Při použití gradientové eluce v 2D LC nesmí čas gradientu v druhé dimenzi překročit vzorkovací interval [23].

V komplexní dvourozměrné kapalinové chromatografii je výstup z kolony prvního separačního procesu (první rozměr) postupně odebírán a dávkován do systému druhého rozměru. Celkový čas analýzy se odvíjí od rychlosti druhého separačního systému. Citlivost 2D metody závisí na fázi odběru vzorků. Existuje spousta metod pro spojení separačních systémů. Může být využit osmiportový ventil s příslušnými smyčkami, který je typický pro spojování a opakované vzorkování prvního separačního rozměru. Dále se používá kombinace šestiportových ventilů pro kontinuální vzorkování do druhého rozměru. Jednou z nejnáročnějších aplikacích dvourozměrného systému jsou separace polymerů, kopolymerů a jejich směsí. Tyto látky mohou obsahovat tisíce jednotlivých monomerů s vlastní distribucí. 2D LC byly používány už několik let pro oddělení a charakterizaci biomolekul [24].

1.11. Komplexní dvourozměrná chromatografie

Tato metoda potřebuje pro své použití automatické spínací ventily, dále velké množství elučních čerpadel. Přístroj je řízen počítačem, kdy výsledné dvourozměrné chromatogramy bývají vizualizovány jako dvourozměrné obrysy nebo trojrozměrné plochy tzv. "paradigma", což znamená schéma či model. Výhoda dvourozměrné separaci je dostatečné množství síly, která umožní dosažení maximální kapacity, oproti jednočlenným separacím. Maximální kapacita je maximální počet píků komponent s dostatečným rozlišením. Důležité je, aby byly píky rovnoměrně rozmístěny v důsledku dosažení maximální kapacity, která je podstatným měřítkem účinnosti separace. V roce 2003 byly navrženy podmínky pro dvourozměrné separace dle Giddingse:

1. Každá část vzorku je podrobena dvěma různým separacím.
2. Stejné procento jednotlivých složek vzorku (100 % nebo nižší) musí projít přes obě kolony až k detektoru.
3. Rozdělení (rozlišení) separace v první dimenzi musí být zachováno [25].

Komplexní dvourozměrná chromatografie obvykle používá přepínací ventil se vzorkovacími smyčkami. Tyto smyčky mají funkci sběrnou a vstřikovací, které pomáhají přenosu segmentů prvního rozměru odtokovou kolonou do výstupu druhého rozměru. Toto je označováno jako pasivní modulace. Jedná se o přenos dat pomocí nosného signálu.

Každý pík eluovaný z prvního rozměru by měl být odebrán alespoň třikrát:

1. Aby nedošlo ke smísení oddělených částí a bylo dosaženo dostatečného dvourozměrného rozlišení.
2. Aby se co nejvíce minimalizovalo rozšíření nebo zkreslení zón.
3. Pokud má mobilní fáze prvního rozměru vyšší eluční sílu než mobilní fáze druhého rozměru, může dojít ke zhoršení účinku.
4. Rychlé impulsy vysokého tlaku mohou ovlivnit druhou dimenzi.
5. Může docházet k ředění analytu, kvůli přenosu po sobě jdoucích frakcí, které brání detekci analytů.

Zásadní je tedy výběr chromatografických kolon a separačních podmínek. Často jsou použity mikro-či nano-průtoky a úzké kolony v první dimenzi 1D a dále větší kolony v druhé dimenzi.

Aktivní modulace je schopna zmírnit některé komplikace spojené s pasivní modulací a to pomocí úpravy objemu, koncentrace či rozpouštědel v první dimenzi. Za ideální aktivní modulaci považujeme, když je objem shromážděných segmentů snížen bez přítomnosti analytu natolik, že rozšíření zón v 2D není tak významné. Jeden z nejlepších přístupů k aktivní modulaci v LC x LC je modulace pomocí stacionární fáze [26].

1.11.1. Stacionární fázová modulace

V této technice se analyzují koncentrace tím, že jsou zachyceny v rozhraní smyčky a následně eluovány. Může dojít ke snížení účinnosti, vzhledem k nedostatečné re-ekvilibraci. Můžou být použity protiběžné gradienty v 1D pro udržení konstantního složení rozpouštědla a také za účelem reprodukovatelnější separace [26].

1.12. Analýza pomocí dvoudimenzionální kapalinové chromatografie

Co se týká doby analýzy, tak pro výrazné snížení je potřeba snížit 2D cyklus a to pomocí zvýšené teploty, vysokého tlaku nebo pomocí využití paralelních 2D technologií. K tomu, aby došlo ke snížení disperze píků v druhém rozměru je využíváno úzkých a dlouhých kolon v 1D v řádech 1 až 2 mm a krátkých a širokých kolon v 2D s vnitřním průměrem přibližně 4 mm. Pokud se používají takové kombinace, je možné minimalizovat poměr mezi objemem frakcí, které jsou shromážděné od prvního rozměru a 2D kolony. Díky tomu je dosaženo vysoké píkové kapacity, avšak na úkor vysokého ředění a tím i snížení citlivosti. Pro tento problém bylo

navrženo alternativní spojení kolon, kdy není potřeba zvýšené ředění, došlo k menšímu rozšíření dávkované zóny a je zde možnost zkombinovat chromatografické režimy, kdy je možno použít nekompatibilní rozpouštědla. Jedná se například o rozhraní s vakuovým odpařováním rozpouštědla nebo tepelně asistovaná modulace. Tyto techniky sice mají úspěch při snižování problémů s dávkováním silných či nekompatibilních rozpouštědel, avšak nedosáhly takového rozšíření, které by umožnilo jejich aplikaci v rutinní analýze LC x LC [14].

Vzhledem k tomu, že se v praktické části diplomové práce budu zabývat přírodními barvivy, budou následující kapitoly zaměřené zejména na ně.

1.13. Přidatné látky

1.13.1. Historie

V osmdesátých letech 20.století se přídatné látky používaly pro zlepšení potravin, což vedlo časem k zneužívání a falšování potravin. Vzhledem k nekontrolované manipulaci potravin došlo k celosvětovému problému s kvalitou. V polovině 20. století se tyto látky staly legálními chemickými přísadami. V dnešní době je do jídla přidáváno více než 2500 přídatných látek pro zlepšení skladovatelnosti a uchování některých vlastností. Dnes jsou potravinářské přísady téměř nezbytné, vzhledem k přepravě potravin přes velké dálky ke spotřebiteli. Jsou potřeba pro zajištění podmínek, zabránění kontaminaci či znehodnocení [27].

1.13.2. Typy přísad

V rámci Evropské unie jsou přísady rozděleny do několika skupin podle jejich funkce. Patři mezi ně sladidla, barviva, konzervační látky, antioxidanty, nosiče, kyseliny a další. V dnešní době průmysl hodně závisí na potravinových přísadách. Dochází k různým přepravám potravin přes velké vzdálenosti, a proto je důležité udržet potraviny v dobrých podmínkách, aby se zabránilo kontaminaci a znehodnocení. Toto zahrnuje nezbytnosti jako je správné balení potravin, environmentální podmínky a v neposlední řadě přísady pro udržení stanovených parametrů. Vzhledem k tomu, že mají přísady vliv na zdraví a mohou způsobit zdravotní rizika je kladen důraz na zlepšení a produkci účinnějších přísad [27].

Jednou ze skupin přidatných látek používaných v potravinách jsou barviva. Ty slouží k zlepšení vzhledu potravin. Barviva mohou být přírodního původu, syntetická s identickou strukturou jako přírodní, nebo zcela syntetická. V posledních letech je snaha nahrazovat syntetická barviva přírodními [28].

1.14. Přírodní barviva

Přírodní barviva jsou klasifikována podle jejich zdroje a chemické struktury chromoforu. Přírodní barvy pocházejí z několika zdrojů:

1. Živé organismy
2. Hmyz
3. Zvířata
4. Mikroorganismy
5. Rostliny

Mikroorganismy a rostliny jsou důležité pro biotechnologickou výrobu barviv. V současné době je 16 ze 40 barviv schváleno a používáno jako přídatné potravinářské látky. Přírodní barviva, která pocházejí z bakterií, se dnes používají vzhledem k jejich kompatibilitě s prostředím a dobrou biologickou odbouratelností. Přírodní barviva jsou rozdělena také podle jejich barev. Mezi základní barvy patří modrá, žlutá a červená. Indigo neboli modré barvivo se získává fermentací listů. Madder je zdrojem rostlinného červeného pigmentu. Kurkuma a měsíček produkují žlutý pigment. Mezi hlavní vlastnosti přirozených barviv patří nutriční charakteristiky, dobrá kvalita a farmakologické účinky, jelikož jsou přírodní barviva citlivá na pH, teplo, světlo a může dojít ke snížení stability. Pro tyto problémy byly navrženy metody mikro-a nanoenkapsulace, které zlepšují stabilitu pří různých environmentálních podmínkách. Mezi barviva pocházejících z rostlin, které jsou využívány pro průmyslové účely, patří známý annatto neboli Bixa orellana. Tato rostlina má vnější vrstvu z pryskyřice a poskytuje červeno-oranžovou barvu, která se skládá z karotenoidních pigmentů: bixin, norbixin a jejich estery. Annato se používá zejména pro potravinářský a textilní průmysl, avšak mohou být aplikovány i ve farmaceutickém průmyslu pro jejich antikarcinogenní aktivitu [28].

Syntetická potravinářská barviva byla používána zejména díky své vysoké stabilitě a příznivě nízké ceně. Časem ovšem došlo k nahrazení syntetických barviv přirozeně odvozenými alternativami. Použití pigmentů přírodních barviv však způsobuje nižší stabilitu, problémy s požadovanými odstíny, špatnou kvalitu tinktury a také možné interakce s různými přísadami potravin. Vzhledem k těmto problémům nemohou přirozeně odvozená barviva nahradit univerzální alternativu syntetického barviva. Vznikají také aplikace a barvy (teplé, chladné či achromatické) přírodních pigmentů, jako jsou antokyany. Jedná se o modré či červené barvivo [29].

1.15. Klasifikace barviv

Klasifikace přírodních barviv je komplikovaná, vzhledem k různým přirozeným vlastnostem jednotlivých barviv. Jelikož pocházejí z různých zdrojů, mají i odlišnou chemickou kompozici a mohou mít různý vliv na stabilitu, rozpustnost a jiné vlastnosti. Mezi nejčastěji používaná barviva patří:

Rostliny – jedná se o pigmenty, které pomocí biochemických aktivit vedou k různým fyzikálně – chemickým vlastnostem. Pigmenty rostlin obsahují chemické látky, jako jsou porfiriny, karotenoidy či betalainy.

Zvířata – zvířata mohou produkovat různé chemické sloučeniny, které vedou k tvorbě různého zbarvení v živočišné oblasti. Tyto pigmenty mají důležité úkoly jako je například transport kyslíku.

Mikrobiální organismy – použití těchto pigmentů pro výrobu barviv je důležité pro řízení podmínek růstu či obnovitelnosti.

Minerály – jsou to krystalické látky, které mají použití v kosmetice, potravinách a jiné [29].

1.16. Potravinářská barviva

Jedná se o látky (tabulka 1), které slouží ke změně barvy potravin a to z několika důvodů, aby se zvýšila atraktivita potravin vzhledem ke spotřebitelům.

1.16.1. Dělení barviv

Dělíme je do pěti skupin: 1. azosloučeniny

2. chinolinová barviva

3. triarylmethany

4. xantheny

5. indigová barviva

Mezi nejznámější azobarviva patří tartrazin, amarant nebo karmoxin. Chinolinová barviva jsou žlutá, jedná se o synteticky připravené látky, které mohou způsobovat astma či kopřivku. Triarylmethanová barviva sem řadíme brilantní modrou či černou barvu.

Mezi xantheny řadíme erythrosin, fluorescein, eozin a rhodamin. Indigová barviva se extrahují z křoviny Indigofera trinctoria [27].

Tabulka 1 Seznam základních potravinářských barviv a pigmentů

E - kód	**název barviva**	**E - kód**	**název barviva**
E100	Kurkumin	**E153**	medicinální uhlí
E101a	Riboflavin	**E154**	hneď FK
E102	Tartrazin	**E155**	hneď HT
E104	chinolinová žluť	**E160a**	Karoteny
E110	žluť SY	**E160b**	Bixin
E120	pravý karmín	**E160c**	kapsanthin, kapsorubin
E122	Azorubin	**E160d**	Lykopen
E123	Amarant	**E160e**	beta - apo - 8 -karotenal
E124	ponceau 4R	**E160f**	ethylester kys.beta - apo - 8 - karotenové
E127	Erythrosin	**E161b**	Lutein
E128	červeň 2G	**E161g**	Kanthaxanthin
E129	allura červeň AC	**E162**	Betanin
E131	patentní modř V	**E163**	Anthokyany
E132	Indigotin	**E170**	uhličitan vápenatý
E133	brilantní modř FCF	**E171**	titanová běloba
E140	chlorofyly a chlorofyliny	**E172**	oxidy a hydroxidy železa
E141	mědnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	**E173**	hliník v podobě pigmentu
E142	zeleň S	**E174**	stříbro v podobě pigmentu
E150	cukrová barviva-různé druhy karamelů	**E175**	zlato v podobě pigmentu
E151	brilantní čerň BN	**E180**	litholrubin BK

V následující teoretické části budou popsána pyrolová barviva, které jsou hlavním cílem mé praktické části.

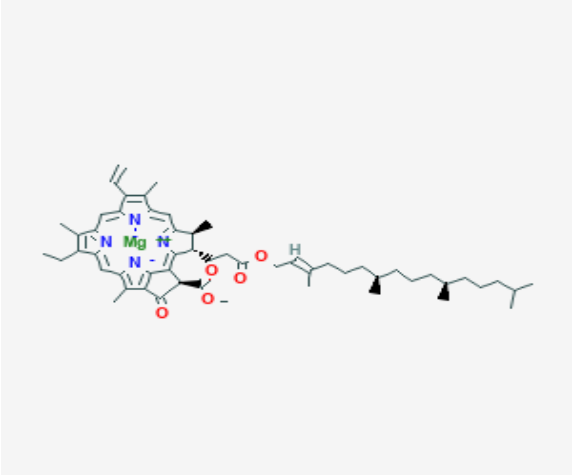
1.17. Pyrrolové deriváty

1.17.1. Chlorofyly

Chemická struktura se skládá z pětičlenného kruhu, který obsahuje čtyři atomy uhlíku a jeden atom dusíku. Tyto látky jsou důležité v biologických systémech, jsou to stavební kameny pro některé heteroatomické kruhy. Mezi nejvíce zabývanými deriváty pyrolu jsou pigmenty hemu a chlorofylu. Chlorofyl patří mezi tetrapyrrolová barviva a vytváří široké spektrum barev ve viditelné oblasti [29].

1.17.2. Struktura chlorofylu

Jedná se o porfinový kruh, který má 8 poloh pro substituci, symetrický cyklický tetrapyrrol. V přírodě dochází k fytolovému připojení s centralizovaným hořčíkovým iontem. Tyto složky jsou nedílnou součástí, která způsobuje barvení potravin. Při štěpení fytolu vzniká chlorofylin a ten umožní přeměnu lipofilního pigmentu na hydrofilní [29].



Obrázek 3 Chlorofyl

1.17.3. Mědnaté komplexy chlorofylu

Měď se přidává k derivátům chlorofylu pro získání silnější barvy. Musí se ale přidat forma, která nezpůsobí degradaci nebo nezanechá nadbytek mědnatého iontu v produktu. Tímto způsobem dojde k vytvoření velmi stabilních komplexů, které se používají jako funkční složky či potravinářské barvy. Komplexní měď je velice stabilní. Měď není biologicky dostupná. Vzhledem k pevnému a stabilnímu porfyrinovému kruhu se kovové komplexy vyskytují i v ložiscích ropy. Výskyt mědi je přirozený, jelikož mnoho rostlin obsahuje významnou její významnou část [30].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Zařízení a přístroje

Pro LC/MS byl používán následující systém:

- **Hmotnostní spektrometr**

  → QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA)

- **Kapalinový chromatograf**

  → Autosampler SIL-20DXR (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

  → Směšovač mobilní fáze (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

  → Čerpadla mobilní fáze LC-20XR (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

  → Termostat kolon LCO 102 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

  → UV/VIS detektor SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Analýzy ve 2D byly realizovány na kapalinovém chromatografu:

- **Kapalinový chromatograf Agilent Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), který se skládá z následujících modulů:**
  - Binární čerpadlo (1260, G1312B) pro kolonu v první dimenzi
  - Binární čerpadlo (1290 Infiniti II, G7…) pro kolonu v druhé dimenzi
  - Autosampler (G7114B, Vialsampler) s oddílem pro termostatování kolon
  - Detektor s proměnnou vlnovou délkou (G7114B)
  - Osmiportový dvoupozicový ventil (Four port duo valve) vybavený smyčkami s 20 a 60 μl
- **Ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko)**
- **Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)**
- **UV-VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Kyoto, Japonsko)**

Tabulka 2 Použité kolony:

Název kolony	rozměry (mm)	velikost částic (µm)	výrobce kolony	Průtok m.f. (ml/min)
Kinetex HILIC 100 A	100 x 2,1	1,7	Phenomenex	0,1
Kinetex Polar C18 100 A	150 x 3,0	2,6	Phenomenex	0,4
Kinetex Biphenyl 100 A	150 x 3,0	2,6	Phenomenex	0,4
Kinetex Biphenyl 100 A	50 x 4,6	2,6	Phenomenex	2,0

2.2. Použité chemikálie

→ Acetonitrile CHROMASOLV, SIGMA-ALDRICH

→ 2 – Propanol CHROMASOLV, SIGMA-ALDRICH

→ Ammonium acetate, BioXtra, SIGMA-ALDRICH

→ Formic Acid [for LC-MS], TCI, TOKYO

→ Ammonium formate, Fluka Analytical

→ Acetic Acid 99,8 %, Honeywell

→ chlorid měďnatý Lachema, Brno

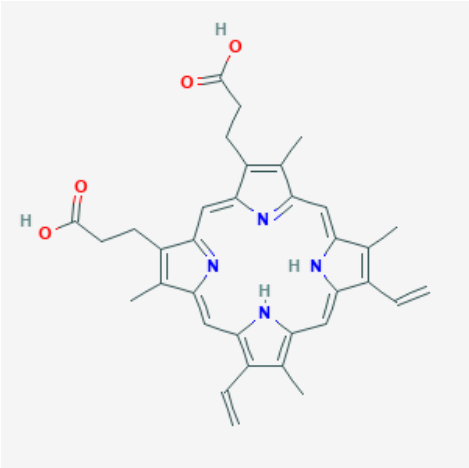
2.2.1. Použitý vzorek

→ Chlorophyllin sodium copper salt, SIGMA

2.2.2. Použité standardy

→ **PROTOPORPHYRIN IX**

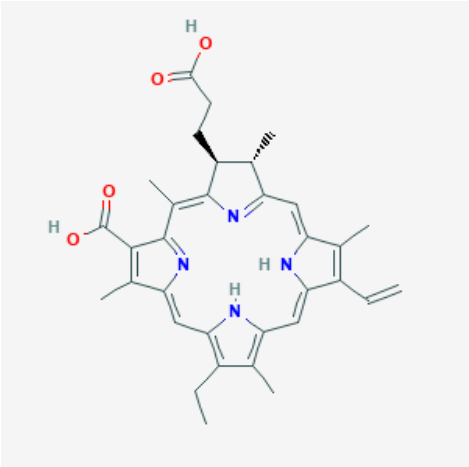
- Sumární vzorec $C_{34}H_{34}N_4O_4$
- Molární hmotnost 562,6581 g/mol



Obrázek 4 Protoporphyrin IX

→ **CHLORIN E4**

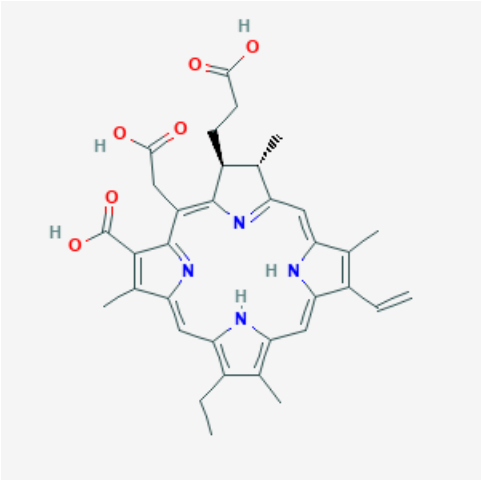
- Sumární vzorec $C_{33}H_{36}N_4O_4$
- Molární hmotnost 552.675 g/mol



Obrázek 5 Chlorin e4

→ **CHLORIN E6**

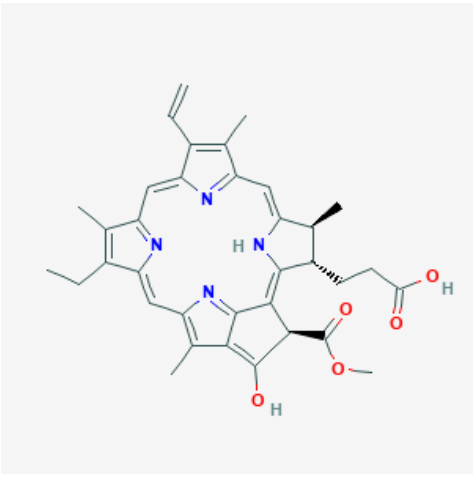
- Sumární vzorec $C_{34}H_{36}N_4O_6$
- Molární hmotnost 596.684 g/mol



Obrázek 6 Chlorin e6

→ **PHEOPHORBIDE A**

- Sumární vzorec $C_{35}H_{36}N_4O_5$
- Molární hmotnost 592,68 g/mol



Obrázek 7 Pheophorbide a

2.3. Pracovní postup

2.3.1. Příprava standardů – rozpuštění v acetonitrilu

Do velké skleněné vialky byl u všech standardů navážen 1 mg standardu a 1 ml acetonitrilu. Takto připravené standardy byly vloženy do ultrazvuku na 15 minut. Z takto připravených roztoků bylo odpipetováno 50 µl a přidáno 450 µl acetonitrilu. Takto připravené standardy byly použity pro analýzu kapalinovou chromatografií a LC/MS.

2.3.2. Příprava vzorku

Do velké skleněné vialky byl navážen 1 mg vzorku Chloropyllin sodium copper a 1 ml acetonitrilu. Takto připravený vzorek byl vložen do ultrazvuku na 15 minut. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 50 µl a přidáno 450 µl acetonitrilu. Připravený vzorek byl použit pro analýzu kapalinovou chromatografií a LC/MS.

2.3.3. Podmínky pro měření na HPLC

Analýza standardů chlorin e4, chlorin e6, protoporphyrin IX a pheophorbide a byla prováděna na kolonách uvedených v tabulce 2. Jako mobilní fáze byla použita voda (A) a acetonitril (B). Do vody byly dále přidávány aditiva (octan amonný, kyselina mravenčí, kyselina octová a mravenčan amonný). Pro mobilní fázi (B) bylo použito několik koncentrací od 50 –100 %. Teplota termostatu kolon během analýzy byla 30 °C, vlnová délka pro měření standardů a vzorku byla 400 nm a vlnová délka pro měření mrtvého objemu, kterým byla thiomočovina nebo acenaften byla 254 nm. Pro měření na LC byly používány i gradienty s mobilní fází od 500 –100 % acetonitrilu (B).

Tabulka 3 Gradienty pro HPLC

čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	50
20	100
25	100
26	50

2.3.4. Podmínky pro měření na LC/MS

Při LC/MS experimentech bylo použito následující nastavení hmotnostního spektrometru. Spektra byla proměřována v režimu lineární iontové pasti (Enhanced MS) v záznamu kladných i záporných iontů pomocí ionizace elektrosprejem. Na zdroji byly nastaveny parametry Curtain gas 20 psi, napětí na spreji 5500/-4500 V, teplota sušícího plynu 300 °C, tlak plynů Gas1 40 psi, Gas2 50 psi, deklasterační potenciál 100/-100 V, vstupní potenciál 10/-10 V, kolizní energie 10/-10 V. Spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z 300-900 s rychlostí skenování 10 000 Da/s.

2.3.5. Podmínky pro měření na 2D LC/UV

Analýzy pomocí dvourozměrné chromatografie byly realizovány v režimu komplexní 2D separace. Byly testovány různé průběhy gradientů v první a druhé dimenzi (tabulka 7, 8, 9, 10 a 11). Byly testovány dva objemy smyček pro převod frakcí a to 20 µl ve spojení s modulačním časem přepnutí ventilu 30 s a smyčky objemu 60 µl s časem přepnutí ventilu 60 s. Ostatní podmínky analýzy byly obdobné jako u jednorozměrné LC/UV separace, tedy teplota kolon 30 °C, detekční vlnová délka 406 nm. Při 2D analýze bylo dávkováno 20 µl vzorku na první kolonu.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Určení vlnové délky pomocí UV/VIS spektrometru

Na začátku praktické části diplomové práce byla změřena UV/VIS spektra pro jednotlivé standardy chlorin e4, chlorin e6, protoporphyrin IX a pheophorbide a. Výsledná spektra jsou uvedena v příloze OBRÁZKY a to: Graf P 1 (chlorin e4), Graf P 2 (chlorin e6), Graf P 3 (protoporphyrin IX) a Graf P 4 (pheophorbide a). Elektronové absorpční spektrum chlorofylů a jejich derivátů je velmi charakteristické a je přisuzováno systému konjugovaných dvojných vazeb, tvořících základní porfyrinovou strukturu. Přechody elektronu jednotlivých molekul chlorofylu tvoří absorpční pásy a jejich hustota je vyjádřena molárním absorpčním koeficientem, který podle Lambert-Beerova zákona závisí na optické hustotě, molární koncentraci a optické dráze paprsku. Absorpční maxima jednotlivých derivátů chlorofylu se nacházejí v modrofialové oblasti kolem 400 nm, kde jsou jejich charakteristické píky. Kromě toho existují i menší výrazné pásy kolem 500–700 nm v červené oblasti. Z naměřených spekter byla zvolena vhodná vlnová délka 406 nm pro měření na kapalinovém chromatografu Agilent Infinity II.

3.2. Měření pomocí spojení LC/MS

Nejprve byla provedena experimentální měření standardů pomocí výše uvedeného stanovení UV/VIS spektrometru. Na těchto záznamech se nacházelo více píků. Majoritní pík byl identifikován jako cílová složka, tedy standard. Zbylé minoritní píky byly identifikovány jako případné nečistoty či izomery cílové složky.

Separace pomocí spojení LC/MS probíhala za gradientové eluce a s použitím dvou typů kolon v systému s obrácenými fázemi a v chromatografii hydrofilních interakcí (Kinetex HILIC a Kinetex POLAR C18). Mobilní fáze pro tyto analýzy byl acetonitril a 30 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min, teplota 30 °C a detekční vlnová délka 400 nm.

Gradientová separace na LC/MS v HILIC módu:

Kinetex HILIC kolona, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota 30 °C, dávkování 1 µl vzorku. Gradient A – 50mM octan amonný ve vodě, B-acetonitril, gradientový profil je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4 Gradienty LC/MS

čas (min)	koncentrace acetonitrilu (%)
0	99 % B
15	50 % B
17	50 % B
18	99 % B
30	stop analýzy

V grafu P 6 se nachází spektrum, kde majoritní signál z m/z 553,3 v retenčním čase 6,71 minut odpovídá chlorinu e4, jehož skutečná molekulová hmotnost je 552,675 g/mol. Ve spektru se dále nachází signál s m/z 1105, odpovídající $[2M+H]^+$. V grafu P 7 se nachází LC/UV záznam chlorinu e6, široký pík s retenčním časem 6,69 min je pravděpodobně způsoben větším množstvím koelujících látek a špatnou rozpustností vzorku, a proto také nebylo získáno jednoznačné hmotnostní spektrum tohoto standardu. V grafu P 9 se nachází spektrum, kde majoritní signál 563,4 v retenčním čase 7,94 minut (graf P 8) odpovídá protoporphyrinu IX, jehož skutečná molekulová hmotnost je 562,67 g/mol. V grafu P 11 se nachází spektrum, kde majoritní signál 593,3 v retenčním čase 5,58 minut (graf P 10) odpovídá pheophorbidu a se skutečnou molekulovou hmotností 592,696 g/mol. Také v tomto spektru byl pozorován signál s m/z odpovídající $[2M+H]^+ = 1185,2$.

Měření za těchto podmínek odpovídá graf P 5 až graf P 11 v příloze OBRÁZKY.

Gradientová separace na LC/MS v RP módu:

Kinetex Polar C18 kolona, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota 30 °C, dávkování 1 µl vzorku. Gradient A – 50mM octan amonný ve vodě, B-acetonitril, gradientový profil je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5 Gradienty LC/MS

čas (min)	koncentrace acetonitrilu (%)
0	50
20	100
25	100
26	50

V grafu P 13 se nachází MS/MS spektrum, kde je majoritní signál 553,3 z hmotnostního spektra na grafu P 12 byl fragmentován, a který odpovídá standardu chlorinu e4.

Dále se zde nachází ztráta dvou oxidů uhličitých z dekarboxylace molekuly chlorinu (m/z = 509 a 465). V grafu P 14 je MS spektrum chlorinu e6, z něhož byl dále fragmentován prekurzor s m/z 597. Graf P 15 zobrazuje MS/MS spektrum, kde je majoritní signál 597,4, který odpovídá prekurzoru standardu chlorinu e6 a dále se zde nachází ztráta oxidu uhličitého (m/z = 553) a vody (m/z = 579). V grafu P 17 se nachází MS/MS spektrum, kde je majoritní signál prekurzoru při m/z = 593,3 odpovídá standardu pheophorbidu a a dále se zde nachází ztráty kyseliny octové (m/z = 533,3). Jednoduché hmotnostní spektrum k této analýze je uvedeno na grafu P 16.

Měření za těchto podmínek odpovídá graf P 12 až graf P 17 v příloze OBRÁZKY.

Pomocí výše uvedených experimentů bylo potvrzeno, že dané standardy chlorofylinů obsahují majoritní složku, která v chromatogramech reprezentuje pík s nejvyšší plochou.

3.3. Retenční chování látek v HILIC systému

Nejprve byly proměřeny standardy chlorin e4, pheophorbide a a protoporphyrin IX pomocí izokratické eluce při různých poměrech mobilních fází a s několika typy aditiv mobilních fází. Pro stanovení mrtvého objemu byl použit acenaften jako nepolární látka, která se nezadržuje na polární stacionární fázi a zároveň poskytuje výrazný signál při UV detekci. Jako první byla použita mobilní fáze acetonitril/voda s aditivem 50 mM octanem amonným, další aditivum byl 50 mM mravenčan amonný, 50 mM kyselina mravenčí a jako poslední 50 mM kyselina octová. Pro tato měření byla používána kolona Kinetex HILIC (velikost částic 1,7 μm a rozměry 100 x 2,1 mm). Zvolené poměry mobilních fází byly následující: 80 % (v/v) acetonitrilu a do 100 % (v/v) byla přidána voda s příslušným aditivem; dále 85 % (v/v), 86 % (v/v), 87 % (v/v), 90 % (v/v) a jako poslední 92 % (v/v) acetonitrilu. Podrobné informace s výsledky retenčních faktorů (vypočtených s použitím rovnice (1)), logaritmu retenčního faktoru a příslušných grafů jsou uvedeny v příloze TABULKY (Tabulka P 1 = octan amonný, Tabulka P 2 = mravenčan amonný, Tabulka P 3 = kyselina mravenčí a Tabulka P 4 = kyselina octová) a OBRÁZKY (Graf P 18 = octan amonný, Graf P 19 = mravenčan amonný, Graf P 20 = kyselina mravenčí a Graf P 21 = kyselina octová). Grafy byly sestrojeny jako závislost logaritmu retenčního faktoru na logaritmu koncentrace vodné složky mobilní fáze (objemový zlomek). U grafů byla zjištěna lineární závislost, dále bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací vodné složky klesá retence, což potvrzuje separační mechanismus chromatografie hydrofilních interakcí. Při porovnání jednotlivých aditiv byl jako nejlepší pro analýzu vyhodnocen mravenčan amonný vzhledem k tomu, že poskytoval největší retenci studovaných látek, největší směrnici závislosti, pH bylo v kyselé oblasti a také největší iontovou sílu, proto byl

mravenčan amonný zvolen jako mobilní fáze pro 2D LC analýzu. Standard chlorin e6 nebyl proměřen z důvodu špatné rozpustnosti v daných rozpouštědlech.

Výpočty retenčního faktoru byly provedeny pomocí rovnice 1:

Retenční faktor $\mathbf{k = (t_R / t_M) - 1}$ (1)

$\mathbf{t_R}$.....retenční čas látky (standardu)

$\mathbf{t_M}$....retenční čas mrtvého objemu (acenaftenu)

Druhé měření na LC probíhalo v systému s obrácenými fázemi pomocí gradientové eluce viz. tabulka 6. Vzhledem k tomu, že detailní retenční chování studovaných látek na bifenylové koloně bylo studováno v rámci předešlé diplomové práce (Analýza porfyrinových potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie, Láníková H., 2017), byly v systému s obrácenými fázemi provedeny pouze experimenty zaměřené na sledování vlivu rozpouštědla vzorku na separaci. Vzorek byl analyzován v acetonitrilu a acetonitrilu s přídavkem vody, což simulovalo převod frakcí ve 2D systému z chromatografie hydrofilních interakcí. Průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, kolona Biphenyl (velikost částic 2,6 μm a rozměry 150 x 3,0 mm), mobilní fáze acetonitril a voda, vlnová délka 406 nm, profil gradientu je uveden v tabulce 6.

Standardy a vzorek byly připraveny třemi způsoby:

→ 50 μl látky + 450 μl acetonitrilu – odpovídá 100 % (v/v) acetonitrilu

→ 50 μl látky + 50 μl vody + 400 μl acetonitrilu – odpovídá 90 % (v/v) acetonitrilu

→ 50 μl látky + 100 μl vody + 350 μl acetonitrilu – odpovídá 80 % (v/v) acetonitrilu

Tabulka 6 Gradient LC

čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	50
15	100
20	100
21	50
25	konec analýzy

Měření za těchto podmínek odpovídá graf P 22 až graf P 26. Z porovnání získaných záznamů vyplývá, že pro vzorky chlorinu e4, chlorinu e6 a pheophorbide a dochází pouze k malé změně

chromatogramů. U protoporphyrinu IX je deformace píků nejvýznamnější, nicméně lze shrnout, že příprava vzorku v 80 – 100 % (v/v) by neměla následné RP separaci činit výraznější problémy.

3.4. Analýza látek ve 2D LC systému

2D LC analýza probíhala ve spojení dvou typů kolon Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm) a Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), byly použity dva typy smyček s menším objemem 20 µl a s větším objemem 60 µl. Nejprve byly proměřeny směsi standardů a vzorek s průtokem mobilní fáze 2 ml/min na koloně Biphenyl a byla použita větší smyčka 60 µl, jedná se o první gradient v tabulce 7. Na základě jednotlivých výsledků byly upraveny podmínky pro následující měření a to tím, že byl zvýšen průtok v druhé dimenzi na 3 ml/min na koloně Biphenyl, dále byla použita menší smyčka 20 µl, jedná se o druhý gradient v tabulce 8. Třetí použitý gradient byl obdobný, pouze se lišil zvolený čas gradientu v druhé dimenzi a to 0,8, 0,4 a 0,7 min. Tímto jsme se propracovali k finálním podmínkám, kdy byl zvýšen průtok na 3,3 ml/min na druhé koloně Biphenyl, byla použita smyčka s objemem 20 µl, lišila se pouze doba analýzy neboli „stop time“ u čtvrtého gradientu 0,8 min v tabulce 10 a u pátého gradientu 0,4 min v tabulce 11. U tohoto gradientu byly změřeny jednotlivé standardy a vzorek nejprve samostatně a poté s přídavkem roztoku chloridu měďnatého, který komplexuje se vzorky chlorinů a vytváří tak měďnaté analogy těchto látek.

Vzhledem k posunu v první dimenzi z 1 % (v/v) pufru na 4 % (v/v) pufru došlo k lepšímu rozložení látek, stejně tak i v druhé dimenzi při snížení rozsahu gradientu došlo k lepšímu rozprostření látek po dvourozměrné ploše, tak i k lepšímu oddělení jednotlivých látek. Po přidání roztoku $CuCl_2$ k jednotlivým látkám se zvýšila retence v prvním rozměru v HILIC systému, a to pravděpodobně díky centrálnímu atomu mědi, který umožnil iontovou výměnu.

Tabulka 7 První gradient 2D LC

1D - kolona Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm), průtok m.f. 0,06 ml/min	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	99
50	50
59	50
59,1	99
2D - kolona Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), průtok m.f. 2 ml/min, smyčka 60 µl	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	50
0,8	100

Tabulka 8 Druhý gradient 2D LC

1D - kolona Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm), průtok m.f. 0,06 ml/min	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	99
75	50
88	50
89	99
2D - kolona Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), průtok m.f. 3 ml/min, smyčka 20 µl	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	50
0,4	100

Tabulka 9 Třetí gradient 2D LC

1D - kolona Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm), průtok m.f. 0,06 ml/min	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	99
50	50
59	50
59,1	99
2D - kolona Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), průtok m.f. 3 ml/min, smyčka 60 µl	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	60
0,7	100

Tabulka 10 Čtvrtý gradient 2D LC

1D - kolona Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm), průtok m.f. 0,04 ml/min	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	99
50	50
59	50
59,1	99
2D - kolona Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), průtok m.f. 3,3 ml/min, smyčka 20 µl	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	60
0,8	100

Tabulka 11 Pátý gradient 2D LC

1D - kolona Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,1 mm), průtok m.f. 0,04 ml/min	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	96
75	60
88	60
89	96
2D - kolona Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), průtok m.f. 3,3 ml/min, smyčka 20 µl	
čas (min)	**koncentrace acetonitrilu (%)**
0	60
0,4	100

Tabulce 7 odpovídá graf P 27, P 28, P 29. Tabulce 8 odpovídá graf P 30 a P 31. Tabulce 9 odpovídá graf P 32. Tabulce 10 odpovídá graf P 33 a tabulce 11 odpovídá graf P 34, P 35, P 36, P 37, P 38, P 39, P 40, P 41, P 42 a P 43.

Při porovnání dvourozměrné analýzy standardů chlorinu e4, chlorinu e6, protoporphyrinu IX a pheophorbidu a a vzorku sodné soli chlorofylinů je patrné, že vzorek může obsahovat dané látky (zejména chloriny). Pro jednoznačnou identifikaci látek přítomných ve směsi vzorku by však bylo vhodné provést následnou analýzu například hmotnostní spektrometrií. Ta by však byla vzhledem k nutnosti použití 2D instrumentace složitější. Z prostého srovnání retenčních časů v grafech P 34 – P 43 je patrná shoda píků měďnatého komplexu chlorinu e4 a chlorinu e6 se vzorkem.

ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla provedena identifikace jednotlivých standardů (chlorin e6, chlorin e4, protoporphyrin IX a pheophorbide a) a vzorku (chlorophyllin sodium copper) pomocí metody HPLC/MS, kde byly zjištěny majoritní signály odpovídající uvedeným látkám podle jejich molekulové hmotnosti.

Chromatografická analýza probíhala s třemi typy kolon a s různými kombinacemi mobilních fází. Jednalo se o acetonitril a voda nebo acetonitril a voda v systému s obrácenými fázemi a s jednotlivými aditivy (octan amonný, mravenčan amonný, kyselina mravenčí a kyselina octová) v chromatografii hydrofilních interakcí. Tímto měřením bylo zjištěno, že standard chlorin e6 je špatně rozpustný. Při použití mobilní fáze acetonitril a voda s jednotlivými aditivy, bylo zjištěno, že nejlepší je mravenčan amonný a proto byl zvolen pro následující 2D LC analýzu.

2D LC analýza probíhala v kombinaci dvou typů kolon a to pro první dimenzi Kinetex HILIC (rozměry 100 x 2,6 mm) a pro druhou dimenzi Biphenyl (rozměry 50 x 4,6 mm), která pro studované látky poskytovala vyšší retenci než kolona C18. Mobilní fáze pro první dimenzi byla acetonitril a mravenčan amonný a pro druhou dimenzi acetonitril a voda. Pro tuto analýzu byly použity dva typy smyček 20 µl a 60 µl, bylo ověřeno, že menší smyčka poskytuje lepší rozlišení analyzovaných látek. Při porovnání 2D analýz standardů, jejich měďnatých komplexů a vzorku měďnatých chlorofylinů bylo patrné, že tyto vzorky pravděpodobně obsahují zejména chloriny e4 a e6.

LITERATURA

1. Helán, V., Analýza organických látek 1999, Český Těšín.
2. The LC Handbook, in Guide to LC Columns and Method Development. 2016, Agilent Technologies: USA.
3. Sýkora, D., Tesařová, E., Vosmanská M., Zvolánková M., Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. Chemické listy, 2007. 101(3): p. 190-199.
4. Fanali, S., Haddad, P.R., Poole, C., Riekkola, M-L., Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation, Elsevier; 2 edition (July 5, 2017).
5. Abrahim, A., Al-Sayah, M., Skrdla, P., Bereznitski, Y., Chen, Y., Wu, N., Practical comparison of 2,7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical proces development. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. 51(1): p. 131-137.
6. Hatrík Š., Tekel J., Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. Journal of Chromatography A, 1996. 733(1-2): p. 217-233.
7. Kiselev., V.A., Georgijevič, A., Ivanovič, J.J., Bosáček, V., Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie. 1988, Praha: Nakladatelství technické literatury.
8. Ho, C.S., Lam, C.W., Chan, M.H., Cheung, R.C., Law, L.K., Lit, L.C., Ng, K.F., Suen, M.W., Tai, H.L., Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. The clinical biochemist reviews, 2003. 24(1): p. 3-12.
9. Holčapek, M., Hmotnostní spektrometrie, Fakulta chemicko-technologická: Pardubice.
10. Friedecký, D., Lemr, K., Úvod do hmotnostní spektrometrie. Klinická biochemie a metabolismus, 2012. 20(41): p. 152–157.
11. Hoffmann, E., Stroobant, V., Mass Spectrometry. Principles and Applications. John Wiley and Sons, Ltd, 2007, New York.
12. Venter, A., Nefliu, M., Cooks, G, Ambient desorption ionization mass spectrometry. Trends in Analytical Chemistry, 2008. 27(4): p. 284-290.
13. Holčapek, M., Jandera, P., Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Chemické listy, 1998. 92: p. 278-286.

14. Gargano, A.F.G., Duffin, M., Navarro, P., Schoenmakers, P.J., Reducing Dilution and Analysis Time in On-line Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography by Active Modulation. Analytical chemistry, 2016. 88(3): p. 1785-793.
15. Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G., Mondello, L., Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. Journal of Chromatography A, 2008. 1184(1-2): p. 353–368.
16. Groeneveld, G., Dunkle, M.N., Rinken, M., Gargano, A.F.G., Niet, A., Pursch, M., Mes, E.P.C., Schoenmakers, P.J., Characterization of complex polyether polyols using comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to high- resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2018. 1569: p. 128-138.
17. Navarro-Reig, M., Jaumot, J., Tauler, R., An untargeted lipidomic strategy combining comprehensive two-dimensional liquid chromatography and chemometric analysis. Journal of Chromatography A, 2018. 1568: p. 80-90.
18. Jianshan, W., Xia, H., Wan, G., Liu, J., Jin, L., Bai, Q., On-line Fast Purification of Three Kinds of Active Proteins from Egg White with Two-dimensional Liquid Chromatography Using a Single Column. Acta Chimica, 2016. 74(3): p. 265-270.
19. Xiao, W., Jian, Y., Li, H., Application of Two-dimensional Liquid Chromatography in Bioanalysis of Drugs and Toxicants. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014. 42(12), p. 1851-1857.
20. Horváth, K., Fairchild, J., Guiochon, G., Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(12): p. 2511-2518.
21. Nägele, E., Vollmer, M., Hörth, P., Vad, C., 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. Expert Review of Proteomics, 2004. 1(1): p. 37-46.
22. Potts, L.W., Stoll, D.R., Li, X., Carr, P.W., The impact of sampling time on peak capacity and analysis speed in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 2010. 1217(36): p. 5700-5709.
23. Stoll, D.R., Li, X., Wang, X., Carr, P.W., Porter, S.E., Rutan, S.C., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 2007. 1168(1-2): p. 3-43.
24. Murphy, R.E., Schure, M.R.., Foley, J.P., Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Analytical Chemistry, 1998. 70(8): p. 1585-1594.

25. Shellie, R.A, Haddad, P.R., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2006. 386(3): p. 405-415.
26. Fornells, E., Barnett, B., Bailey, M., Hilder, E.F., Shellie, R.A., Breadmore, M.C., Evaporative membrane modulation for comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Analytica Chimica Acta, 2018. 1000: p. 303-309.
27. Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R, Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. Compresive reviews in food science and food safety, 2014. 13(4): p. 377-399.
28. Mohd-Nasir, M., Abd-Talib, N., Mohd-Setapar, S.H., Lee Peng, W., Idham, Z., Casillas, A.Ch., Ahmad, A., Natural colorants from plants for welness industry. International journal of pharmaceutical sciences and research, 2017. 1: p. 836-843.
29. Sigurdson, G.T., Tang, P., Giusti, M.M., Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. Annual Review of Food Science and Technology, 2017. 8: p. 261-280.
30. Humphrey, A.M., Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. Journal of Food Science, 2006. 69(5): p. 422-425.

OBRÁZKY

1. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html
2. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_11_957-959.pdf
3. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorophyll_a#section=2D-Structure
4. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/protoporphyrin_IX#section=2D-Structure
5. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25060996#section=2D-Structure
6. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorin_e6#section=2D-Structure

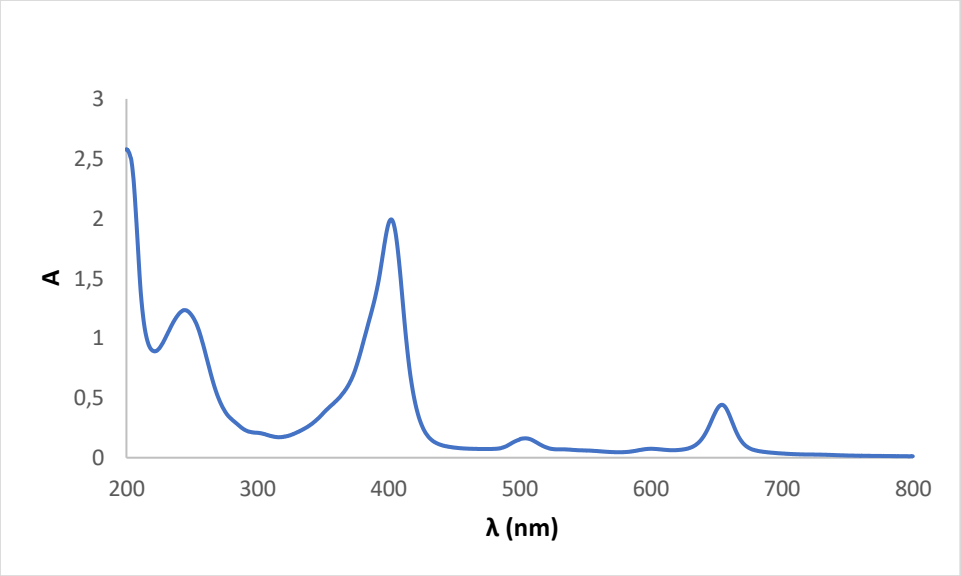
7. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/253193#section=2D-Structure

TABULKY

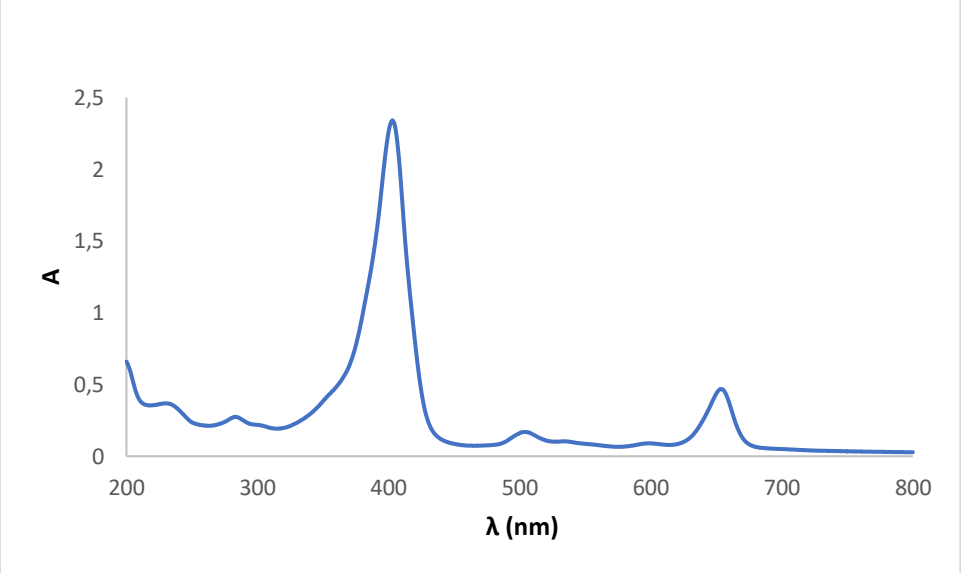
1. [online-cit-2019-05-04] Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/navody2007/5prezentacepigmenty.pdf

Přílohy

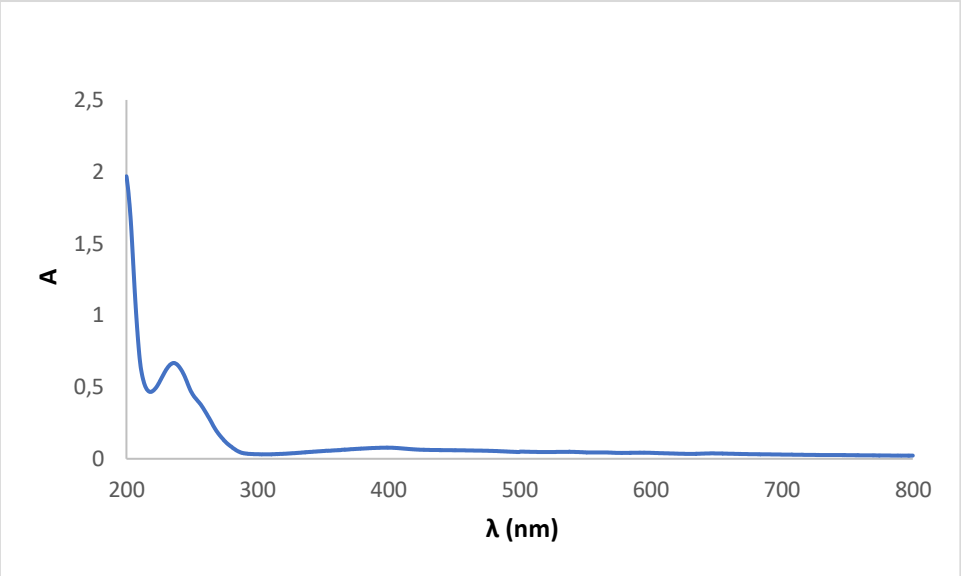
OBRÁZKY



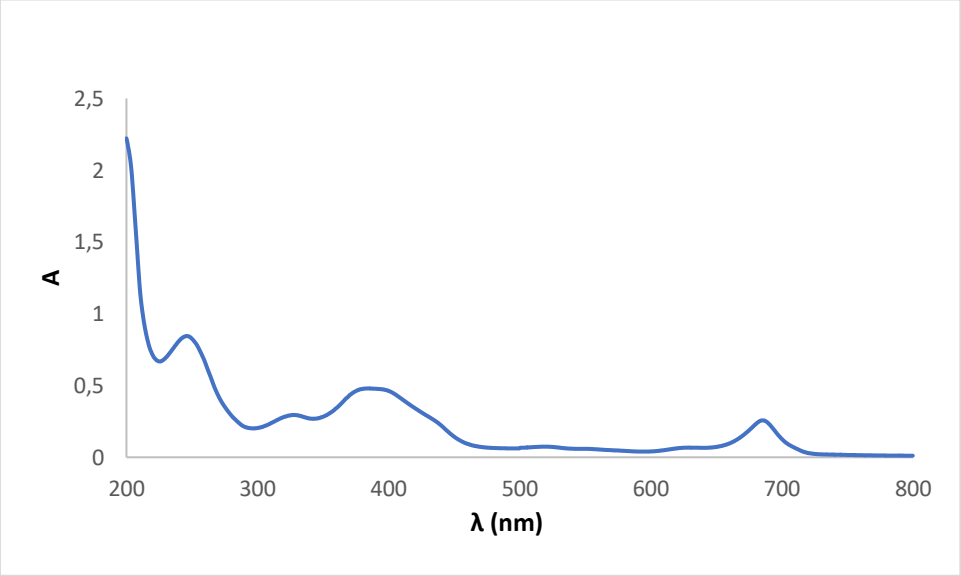
Graf P 1 **UV/VIS spektrum pro chlorin e4.**



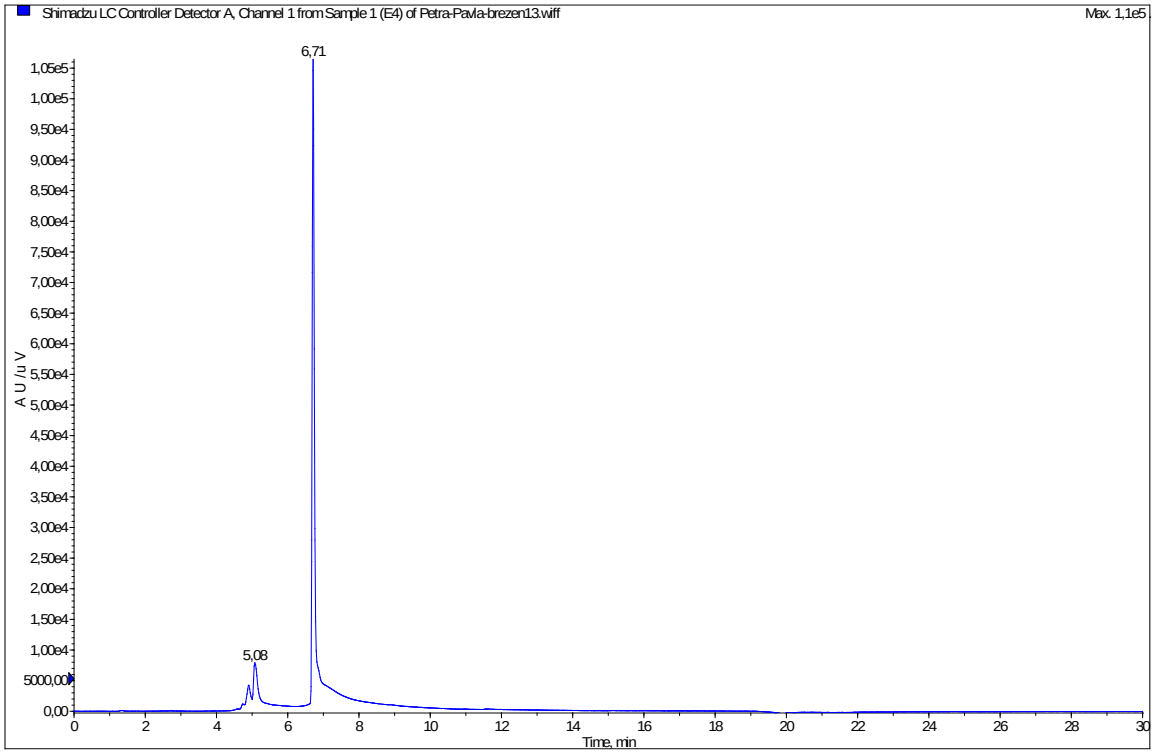
Graf P 2 **UV/VIS spektrum pro chlorin e6.**



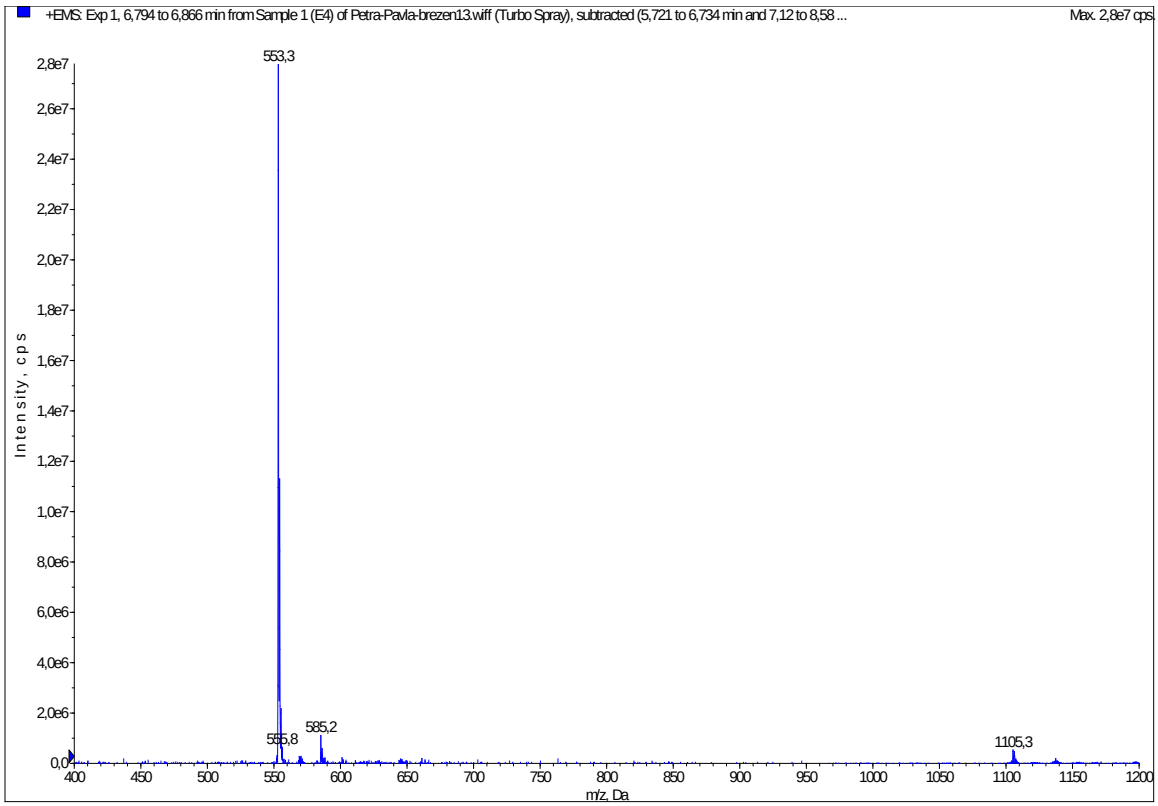
Graf P 3 **UV/VIS spektrum pro protoporphyrin IX.**



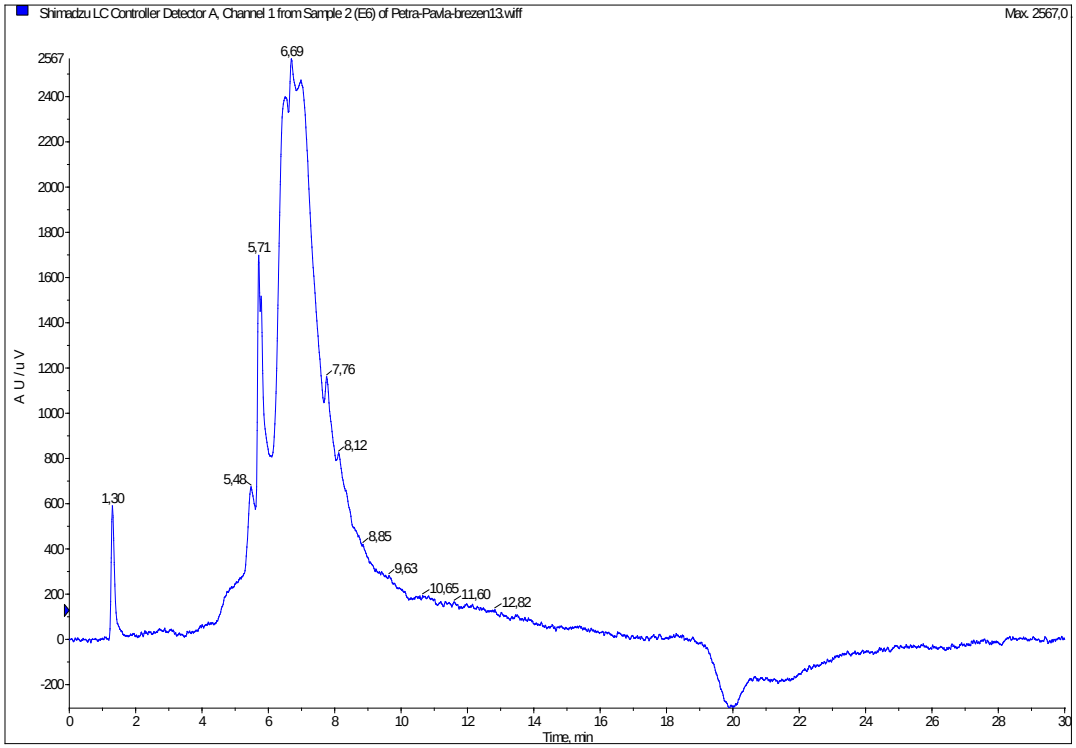
Graf P 4 **UV/VIS spektrum pro pheophorbide a.**



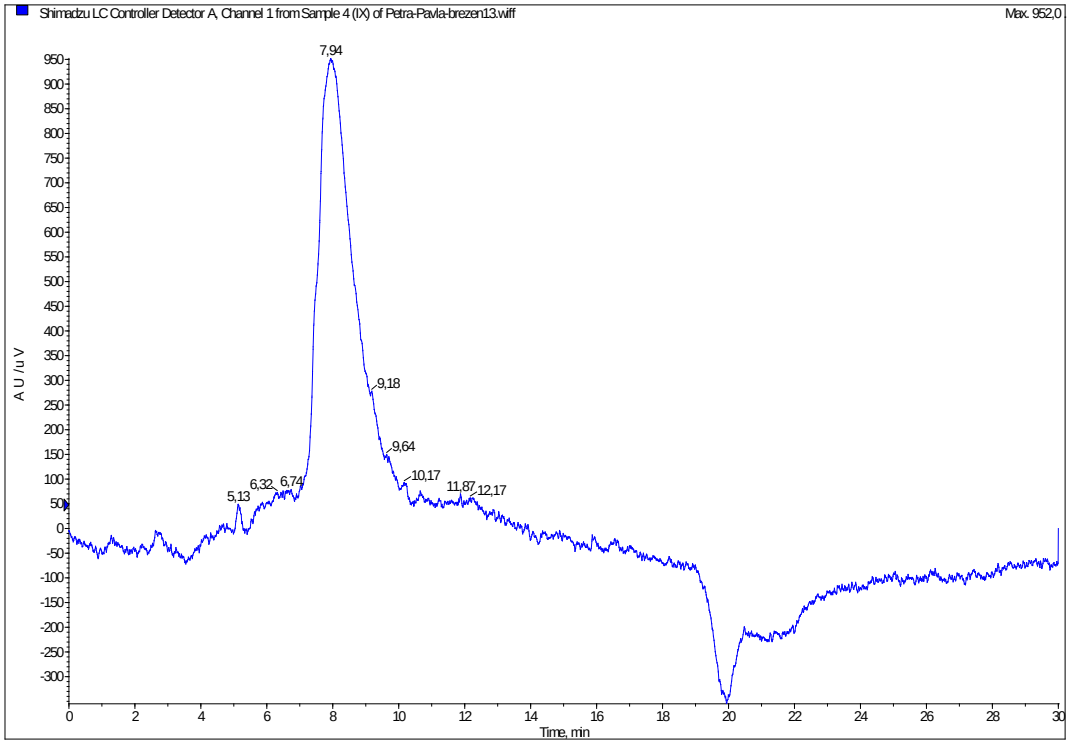
Graf P 5 **LC/UV záznam chlorinu e4 na koloně Kinetex HILIC 100 A s monilní fází acetonitril/octan amonný.**



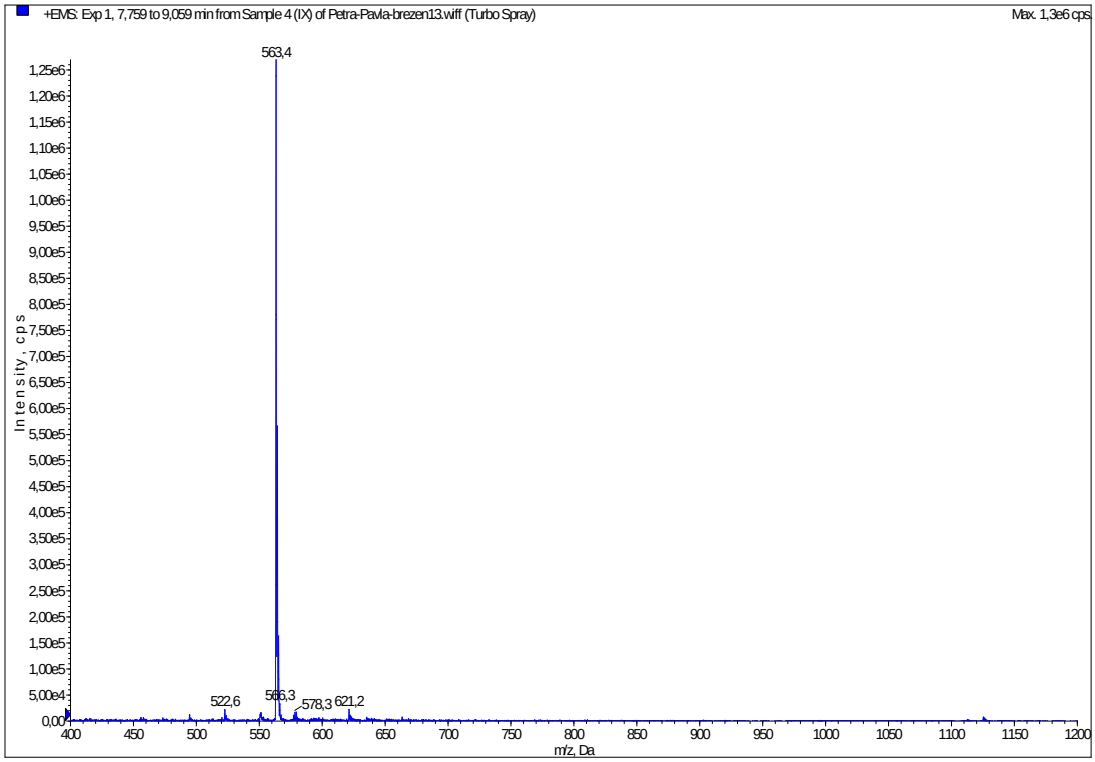
Graf P 6 **Hmotnostní spektrum pro pík s retenčním časem 6,71 min.**



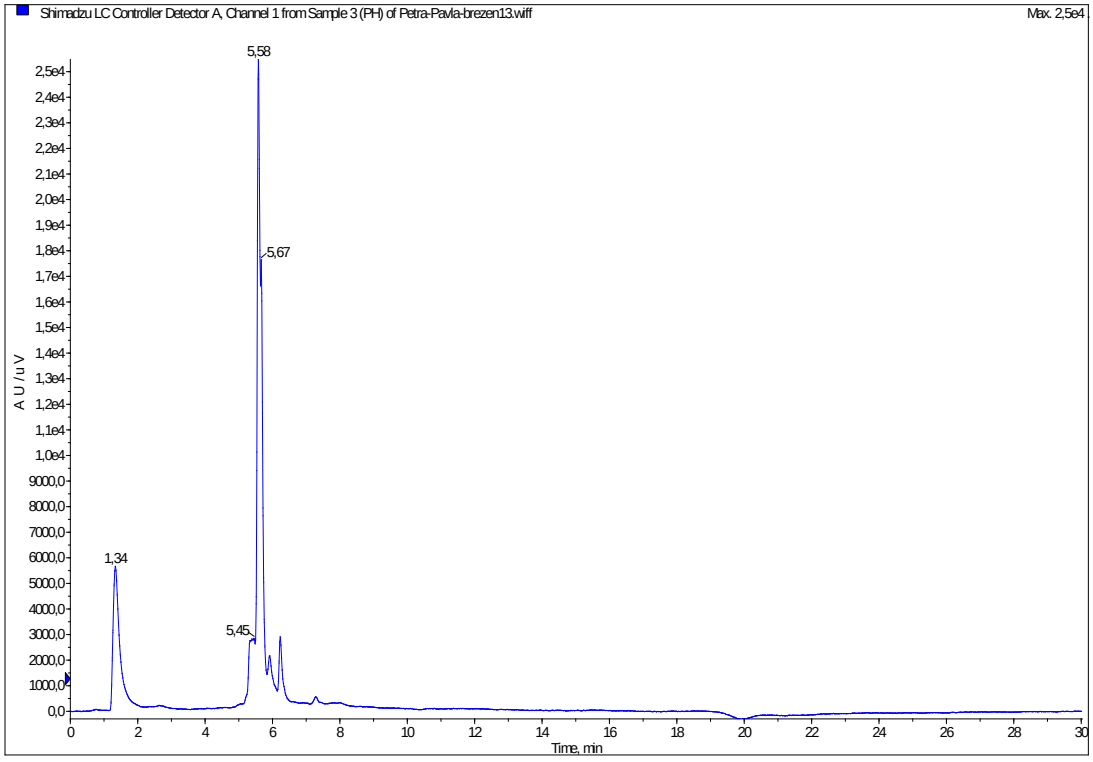
Graf P 7 **LC/UV záznam chlorinu e6 na koloně Kinetex HILIC 100 A s mobilní fází acetonitril/octan amonný.**



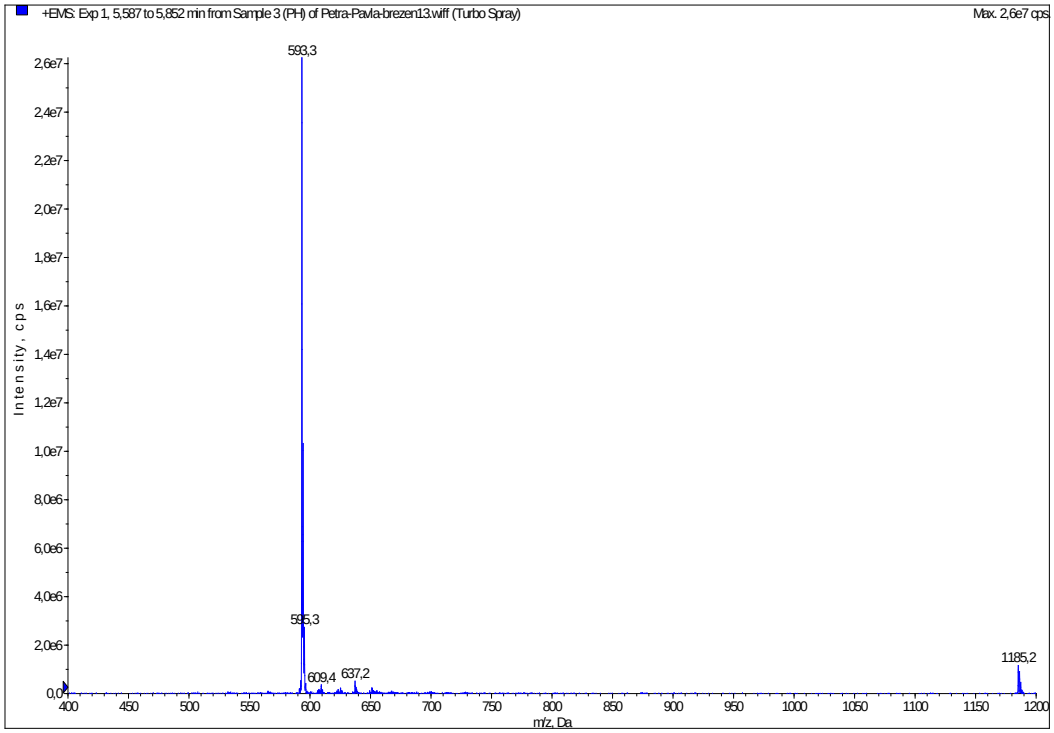
Graf P 8 **LC/UV záznam pro protoporphyrin IX na koloně Kinetex HILIC 100 A s monilní fází acetonitril/octan amonný.**



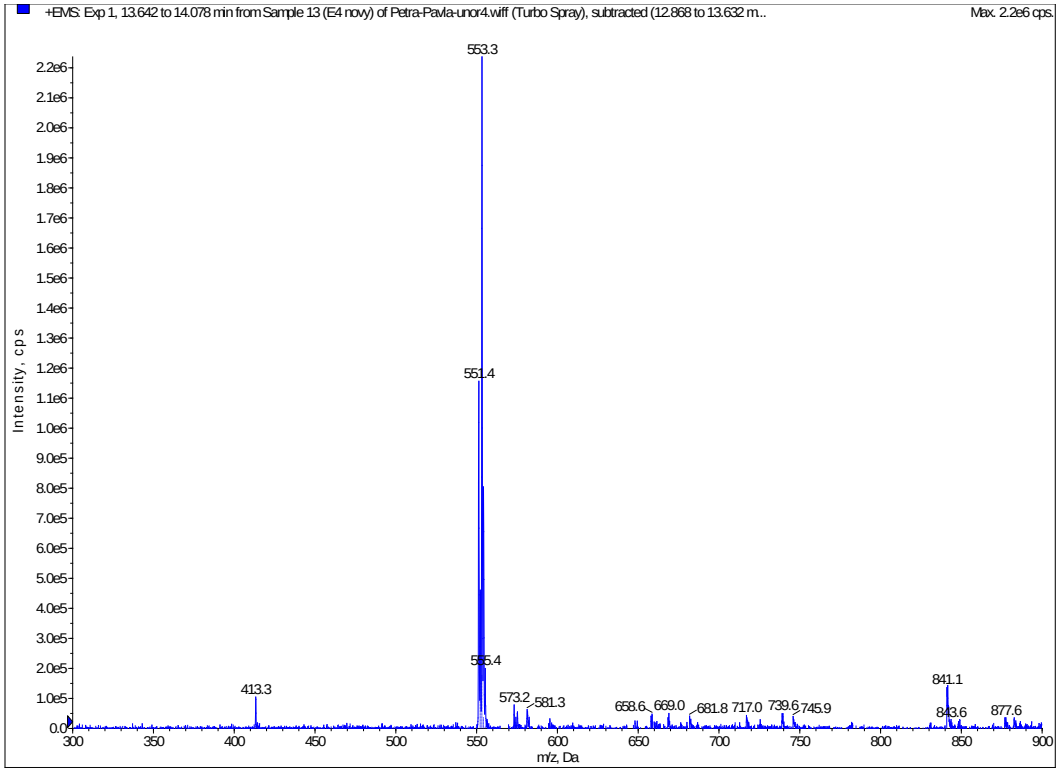
Graf P 9 **Hmotnostní spektrum pro pík s retenčním časem 7,94 min.**



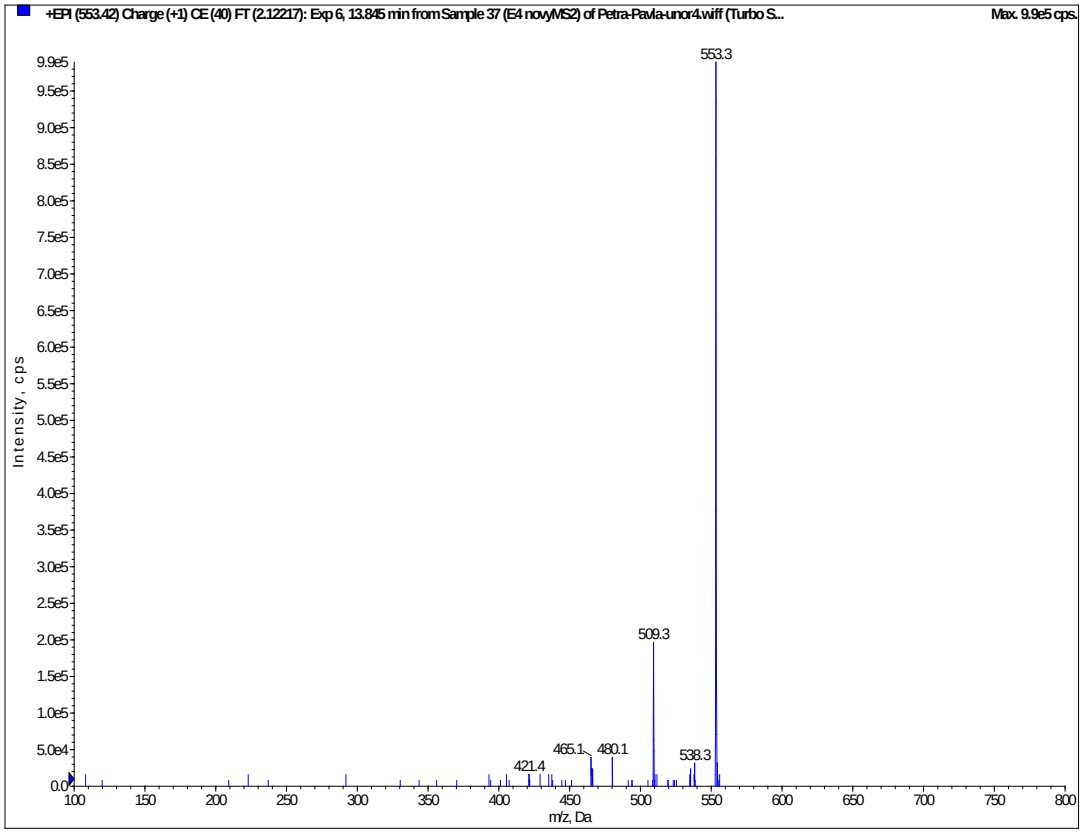
Graf P 10 **LC/UV záznam pro pheophorbide a na koloně Kinetex HILIC 100 A s monilní fází acetonitril/octan amonný.**



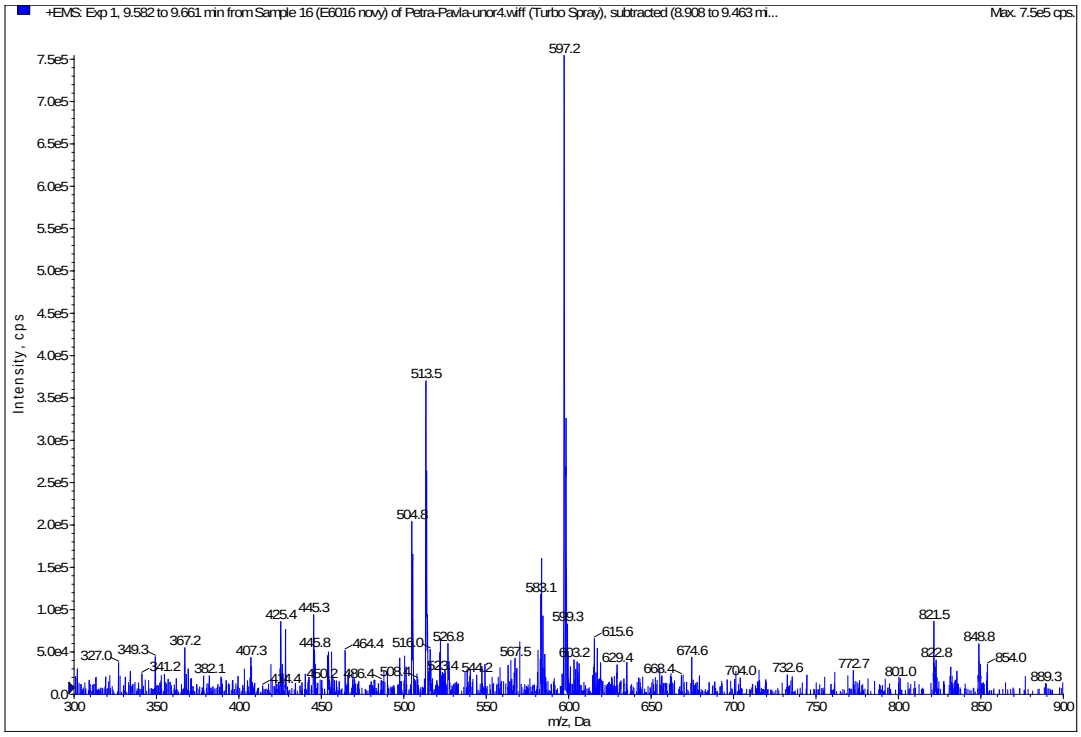
Graf P 11 **Hmotnostní spektrum pro pík s retenčním časem 5,58 min.**



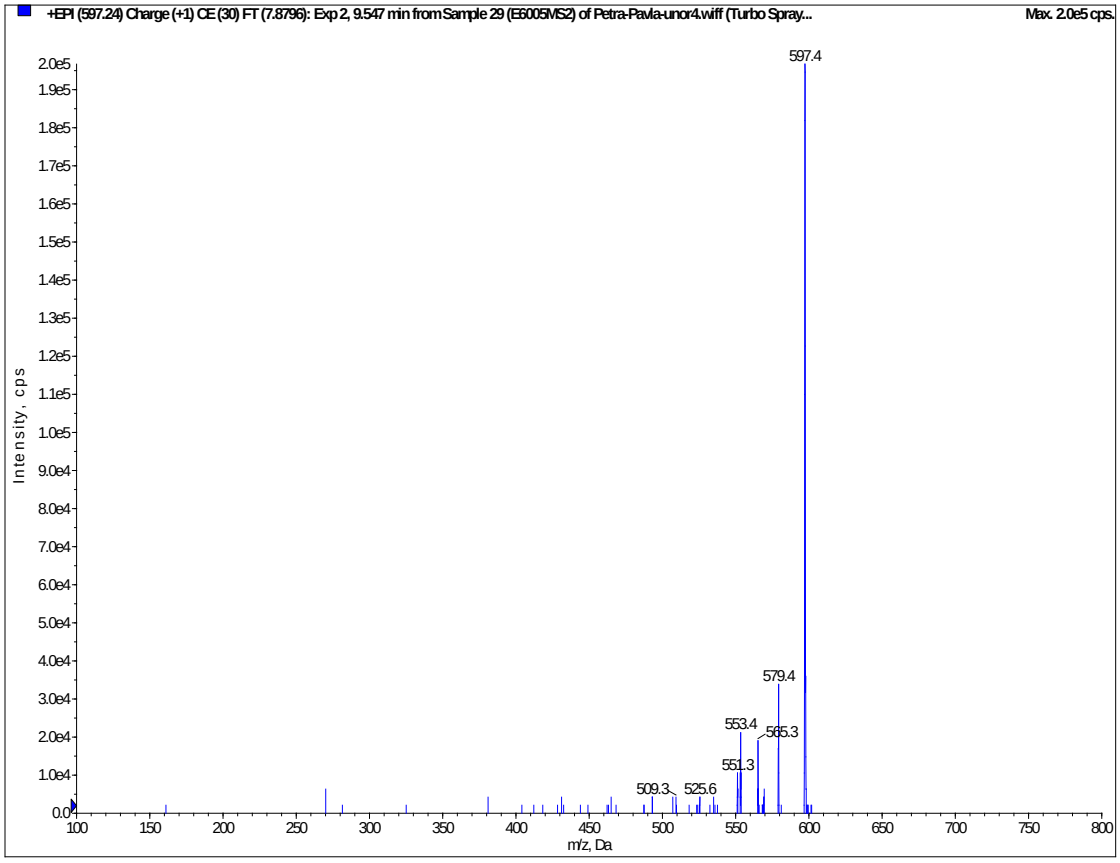
Graf P 12 **MS+ spektrum standardu chlorinu e4. Signál 553,3 odpovídá chlorinu e4, jehož molekulová hmotnost je 552,675 g/mol.**



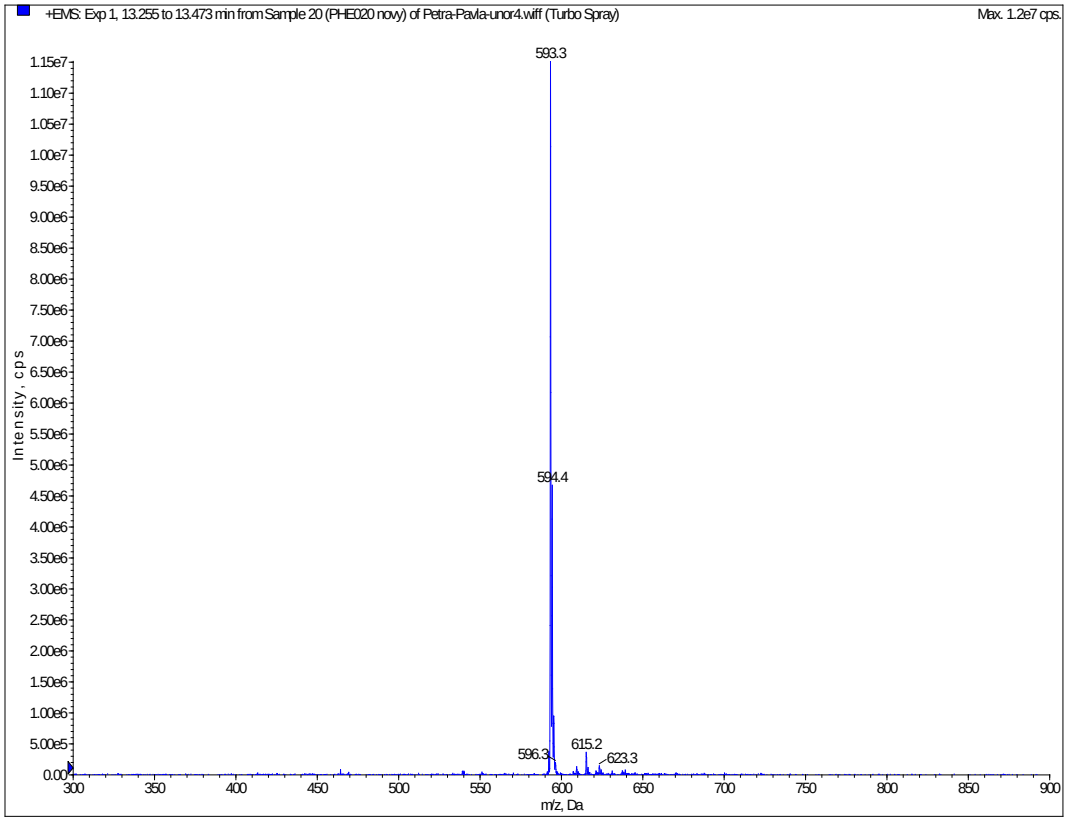
Graf P 13 **Spektrum MS/MS pro signál 553,3 chlorinu e4. V tomto záznamu se nachází ztráta dvou oxidů uhličitých a to (553,3 – 509,3 = 44) a (509,3 – 465,1 = 44,2).**



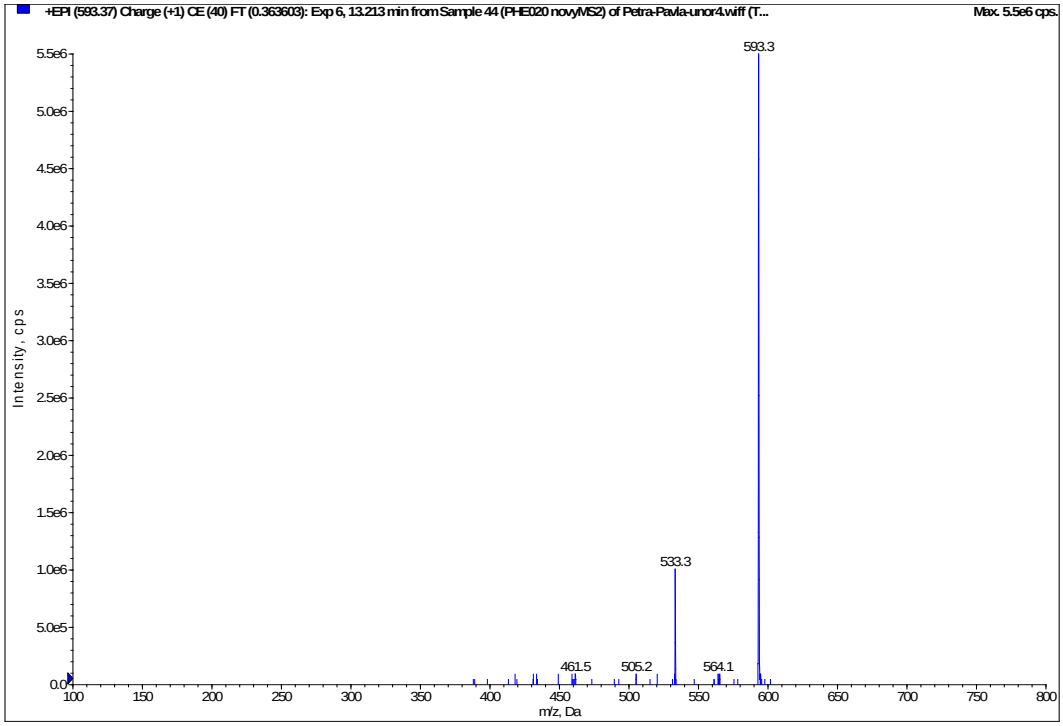
Graf P 14 **MS+ spektrum standardu chlorinu e6. Signál 597,2 odpovídá chlorinu e6, jehož molekulová hmotnost je 596,68 g/mol.**



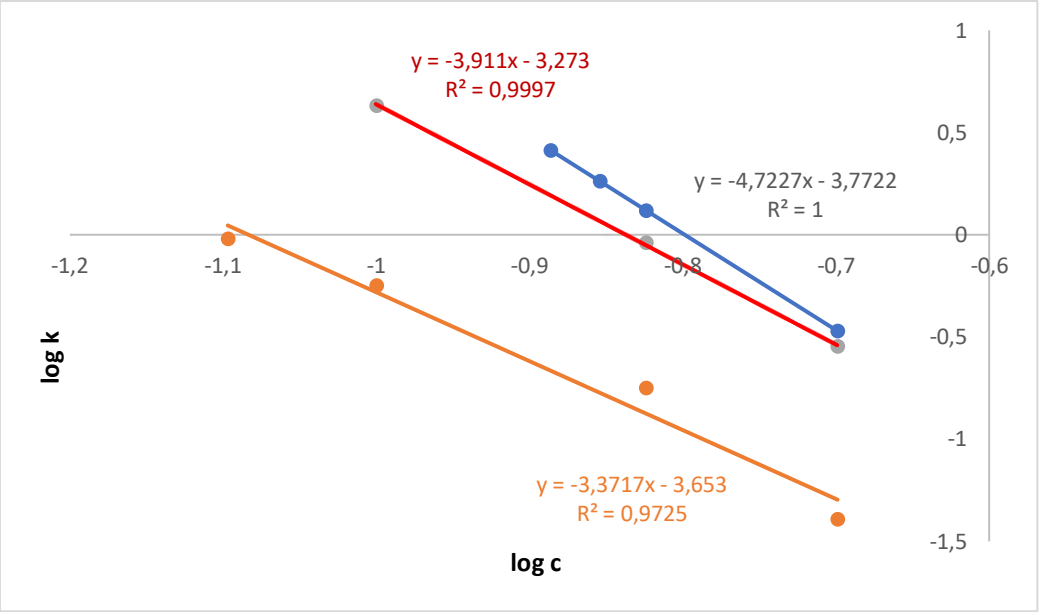
Graf P 15 **Spektrum MS/MS pro signál 597,4 chlorinu e6. V tomto záznamu se nachází ztráta oxidu uhličitého a to (597,4 – 553,4 = 44) a ztráta vody (597,4 – 579,4 = 18)**



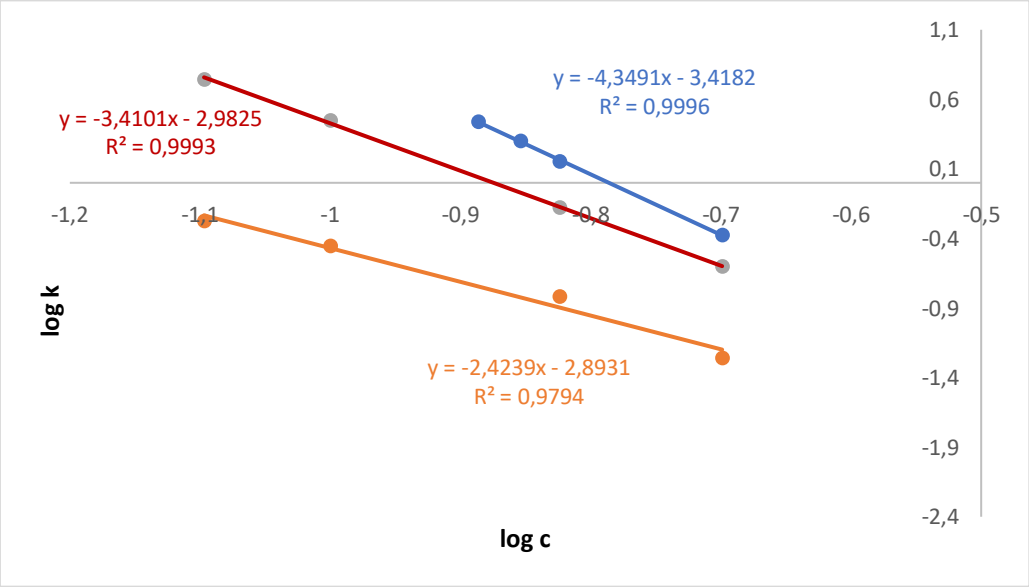
Graf P 16 **MS+ spektrum standardu pheophorbide a. Signál 593,3 odpovídá pheophorbidu a , jehož molekulová hmotnost je 592,696 g/mol.**



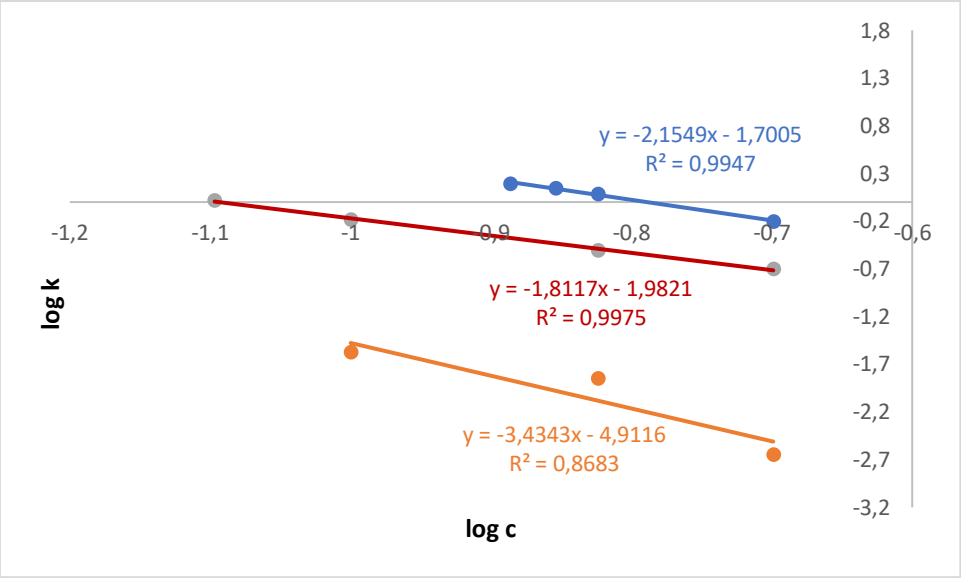
Graf P 17 **Spektrum MS/MS pro signál 593,3 pheophorbidu a. V tomto záznamu se nachází ztráta kyseliny octové a to (593,3 – 533,3 = 60).**



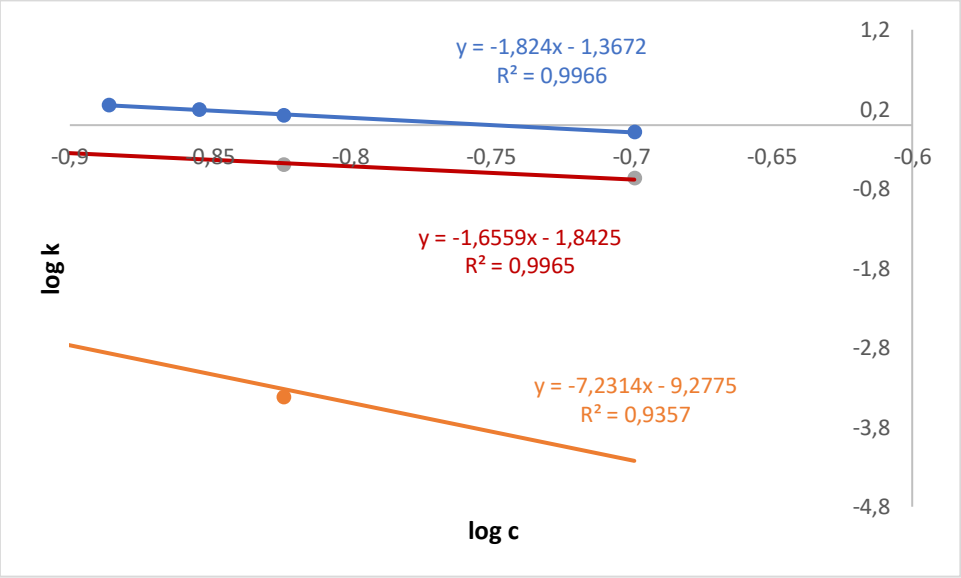
Graf P 18 **Závislost log retenční faktoru (log k) na log koncentrace vody s aditivem octanem amonným (log c). Proměřeny standardy chlorin e4 (modrý), pheophorbide a (oranžový) a protoporphyrin IX (červený). Měřeno na koloně Kinetex HILIC 100 A, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm velikost částic, průtok 0,1 ml/min, teplota 30 °C, detekce při 406 nm. Proměřeno systémem LC.**



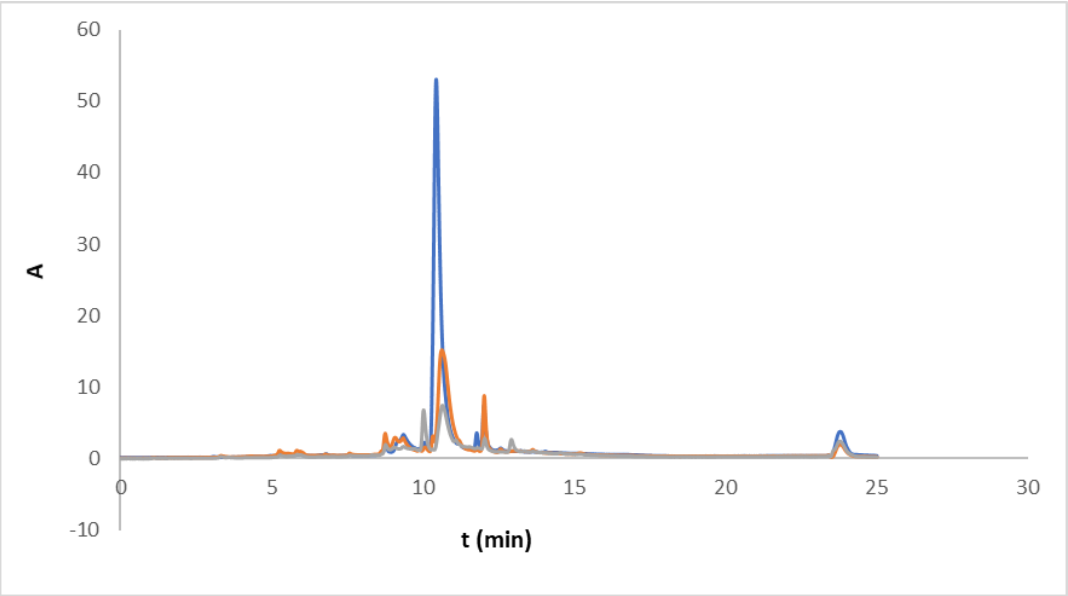
Graf P 19 **Závislost log retenční faktoru (log k) na log koncentrace vody s aditivem mravenčanem amonným (log c). Proměřeny standardy chlorin e4 (modrý), pheophorbide a (oranžový) a protoporphyrin IX (červený). Měřeno na koloně Kinetex HILIC 100 A, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm velikost částic, průtok 0,1 ml/min, teplota 30 °C, detekce při 406 nm. Proměřeno systémem LC.**



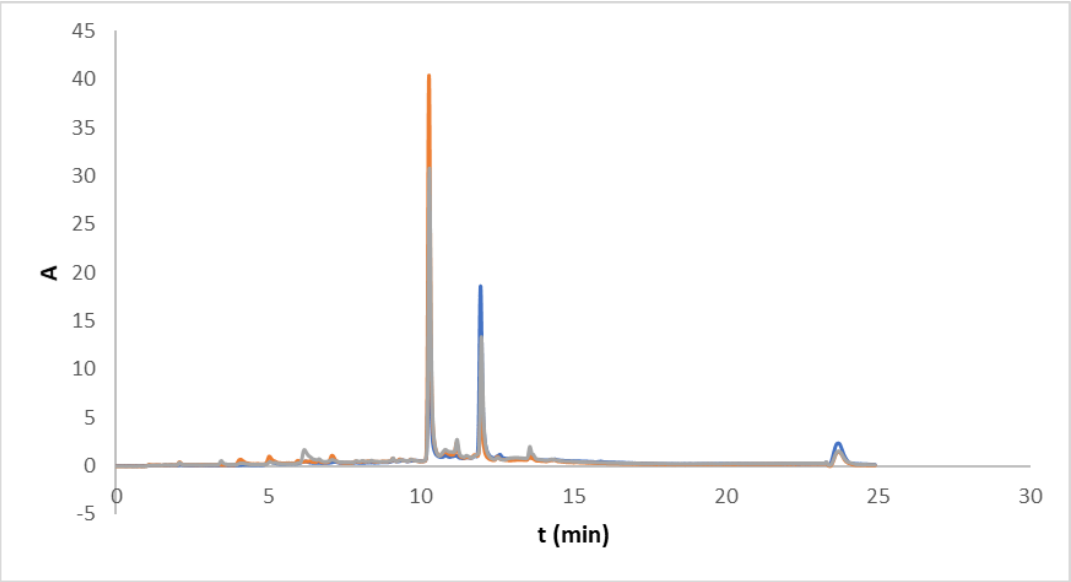
Graf P 20 **Závislost log retenční faktoru (log k) na log koncentrace vody s aditivem kyselinou mravenčí. (log c). Proměřeny standardy chlorin e4 (modrý), pheophorbide a (oranžový) a protoporphyrin IX (červený). Měřeno na koloně Kinetex HILIC 100 A, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm velikost částic, průtok 0,1 ml/min, teplota 30 °C, detekce při 406 nm. Proměřeno systémem LC.**



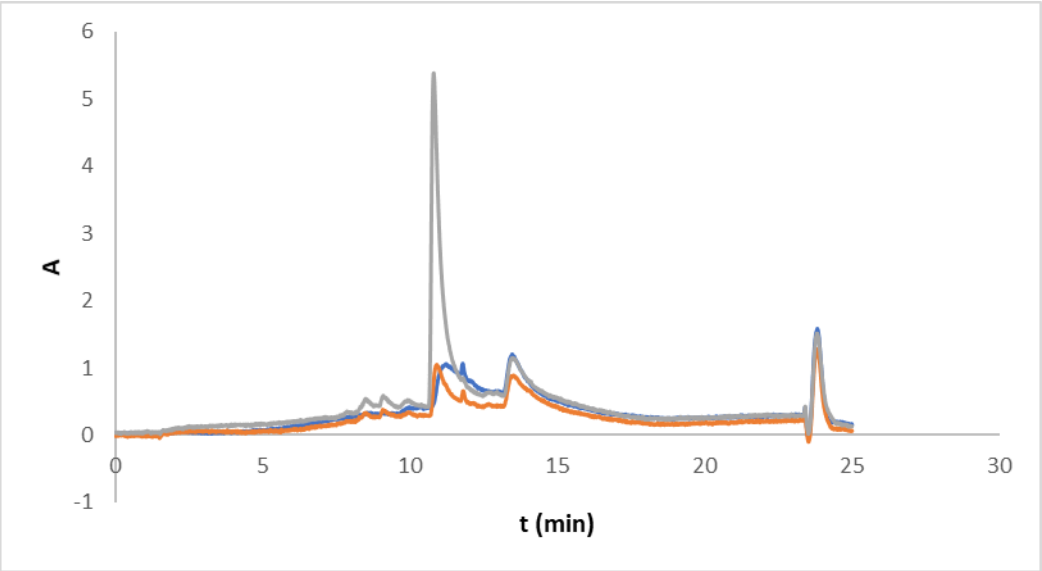
Graf P 21 **Závislost log retenční faktoru (log k) na log koncentrace vody s aditivem kyselinou octovou. (log c). Proměřeny standardy chlorin e4 (modrý), pheophorbide a (oranžový) a protoporphyrin IX (červený). Měřeno na koloně Kinetex HILIC 100 A, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm velikost částic, průtok 0,1 ml/min, teplota 30 °C, detekce při 406 nm. Proměřeno systémem LC.**



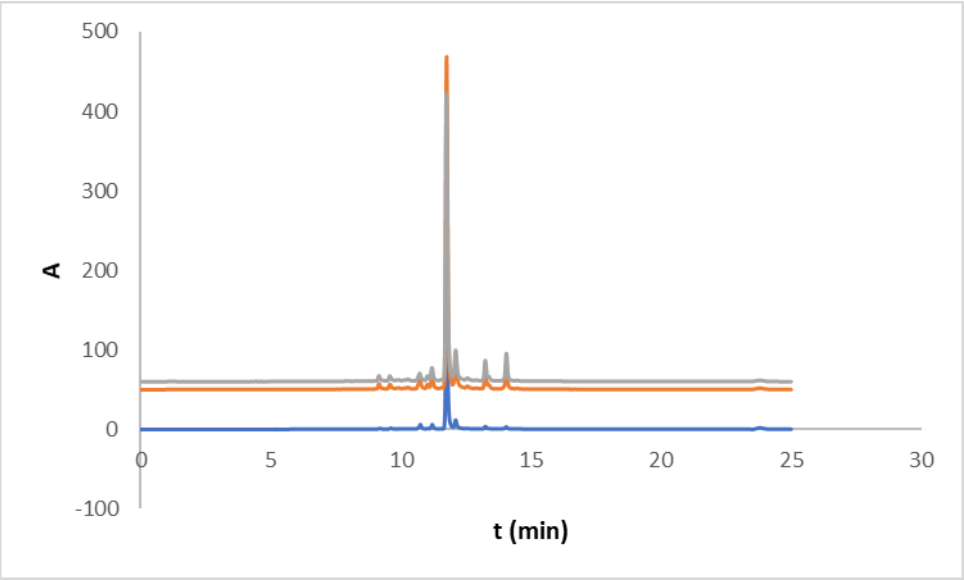
Graf P 22 **Závislost absorbance na čase měřen standard chlorin e4 na kapalinovém chromatografu pomocí gradientu viz. Tabulka č. Teplota 30 °C, vlnová délka 406 nm, průtok m.f. 0,4 ml/min. Standard byl připraven 3 způsoby. Modrý pík odpovídá ředění 50 µl standardu (odpipetovaného ze zásobního roztoku 1 mg standardu + 1 ml acetonitrilu) + 450 µl acetonitrilu. Oranžový pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 50 µl destilované vody + 400 µl acetonitrilu. Šedý pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 100 µl destilované vody + 350 µl acetonitrilu. Profil použitého gradientu uveden v tabulce 6.**



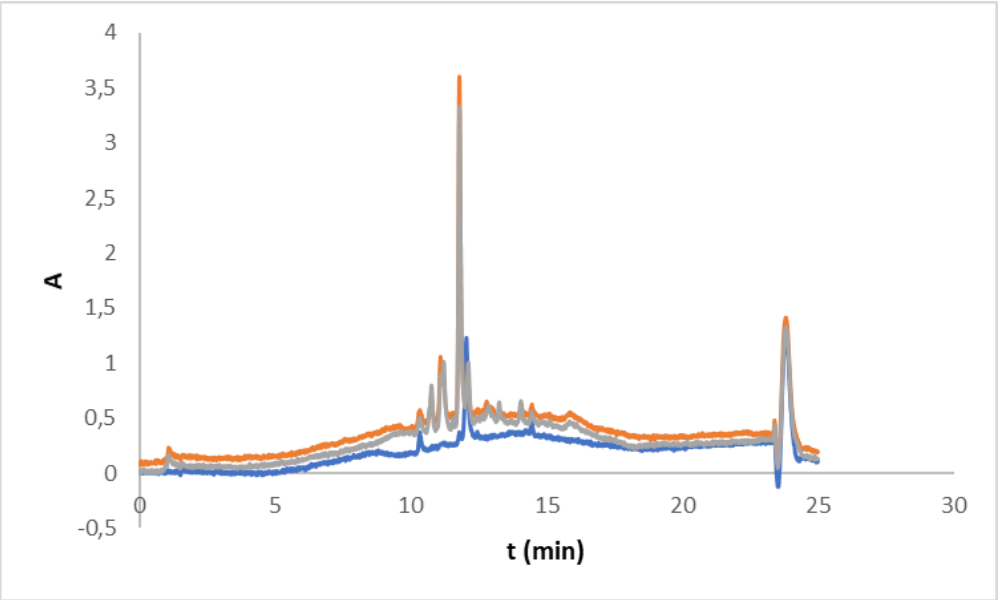
Graf P 23 **Závislost absorbance na čase měřen standard chlorin e6 na kapalinovém chromatografu pomocí gradientu viz. Tabulka č. Teplota 30 °C, vlnová délka 406 nm, průtok m.f. 0,4 ml/min. Standard byl připraven třemi způsoby. Modrý pík odpovídá ředění 50 µl standardu (odpipetovaného ze zásobního roztoku 1 mg standardu + 1 ml acetonitrilu) + 450 µl acetonitrilu. Oranžový pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 50 µl destilované vody + 400 µl acetonitrilu. Šedý pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 100 µl destilované vody + 350 µl acetonitrilu. Profil použitého gradientu uveden v tabulce 6.**



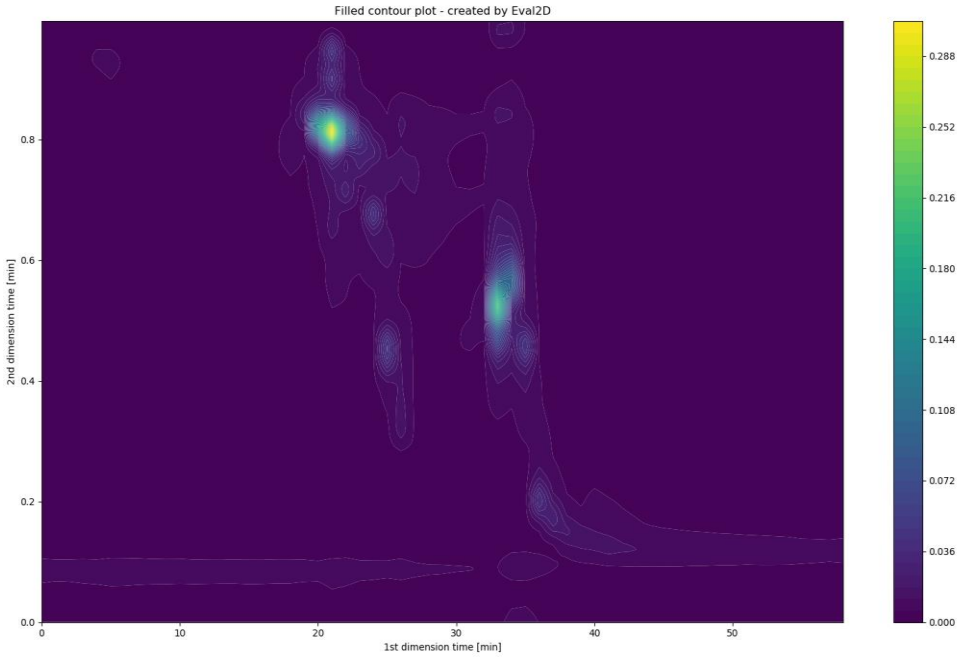
Graf P 24 **Závislost absorbance na čase měřen standard protoporphyrin IX na kapalinovém chromatografu pomocí gradientu viz. Tabulka č. Teplota 30 °C, vlnová délka 406 nm, průtok m.f. 0,4 ml/min. Standard byl připraven třemi způsoby. Modrý pík odpovídá ředění 50 µl standardu (odpipetovaného ze zásobního roztoku 1 mg standardu + 1 ml acetonitrilu) + 450 µl acetonitrilu. Oranžový pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 50 µl destilované vody + 400 µl acetonitrilu. Šedý pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 100 µl destilované vody + 350 µl acetonitrilu. Profil použitého gradientu uveden v tabulce 6.**



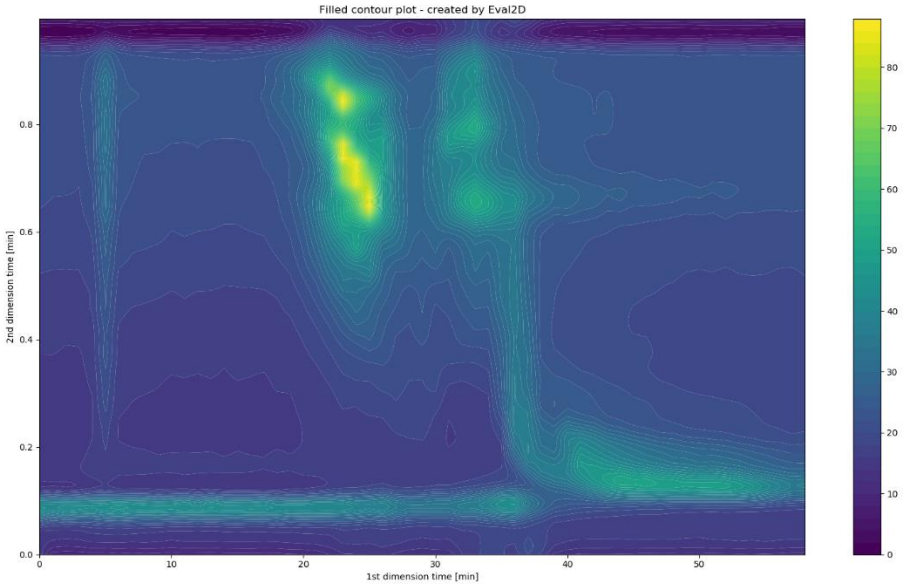
Graf P 25 **Závislost absorbance na čase měřen standard pheophorbide a na kapalinovém chromatografu pomocí gradientu viz. Tabulka č. Teplota 30 °C, vlnová délka 406 nm, průtok m.f. 0,4 ml/min. Standard byl připraven třemi způsoby. Modrý pík odpovídá ředění 50 µl standardu (odpipetovaného ze zásobního roztoku 1 mg standardu + 1 ml acetonitrilu) + 450 µl acetonitrilu. Oranžový pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 50 µl destilované vody + 400 µl acetonitrilu. Šedý pík odpovídá ředění 50 µl standardu + 100 µl destilované vody + 350 µl acetonitrilu. Profil použitého gradientu uveden v tabulce 6.**



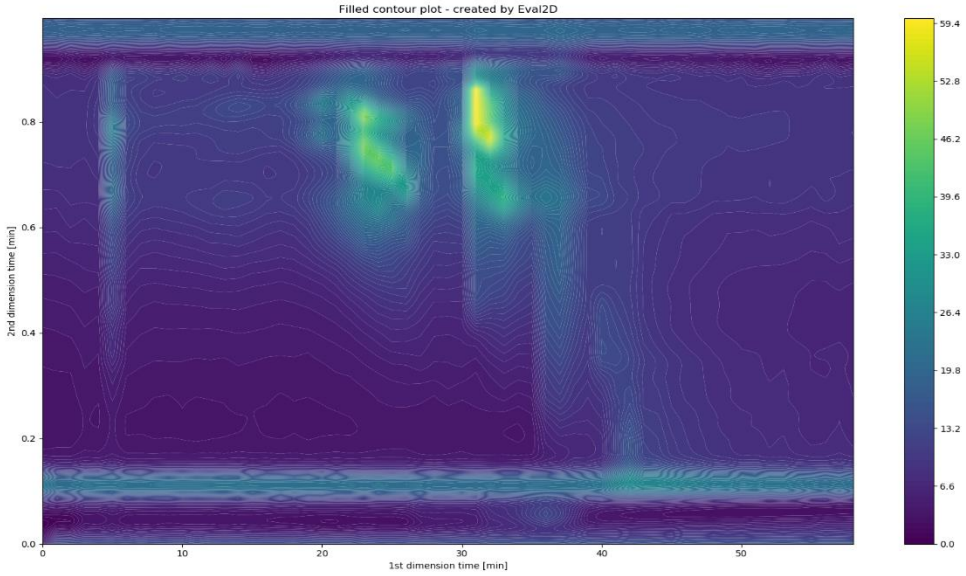
Graf P 26 **Závislost absorbance na čase měřen vzorek chlorophyllin sodium copper na kapalinovém chromatografu pomocí gradientu viz. Tabulka č. Teplota 30 °C, vlnová délka 406 nm, průtok m.f. 0,4 ml/min. Vzorek byl připraven třemi způsoby. Modrý pík odpovídá ředění 50 µl vzorku (odpipetovaného ze zásobního roztoku 1 mg vzorku + 1 ml acetonitrilu) + 450 µl acetonitrilu. Oranžový pík odpovídá ředění 50 µl vzorku + 50 µl destilované vody + 400 µl acetonitrilu. Šedý pík odpovídá ředění 50 µl vzorku + 100 µl destilované vody + 350 µl acetonitrilu. Profil použitého gradientu uveden v tabulce 6.**



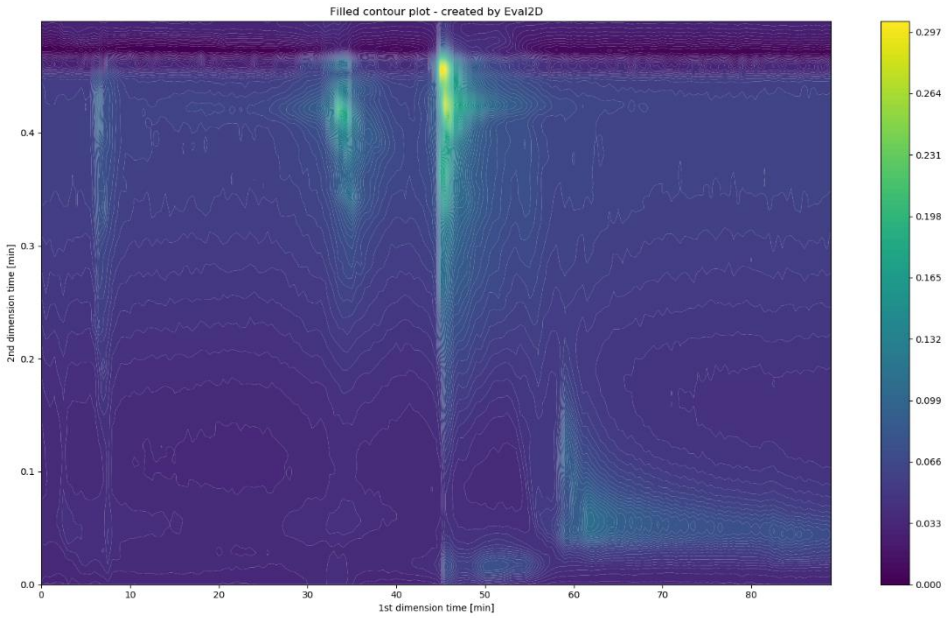
Graf P 27 **Analýza směsi standardů chlorinu e4, chlorine e6, protoporphyrinu IX a pheophorbidu a pomocí 2D LC za použití prvního grafientu uvedeného výše v tabulce 7.**



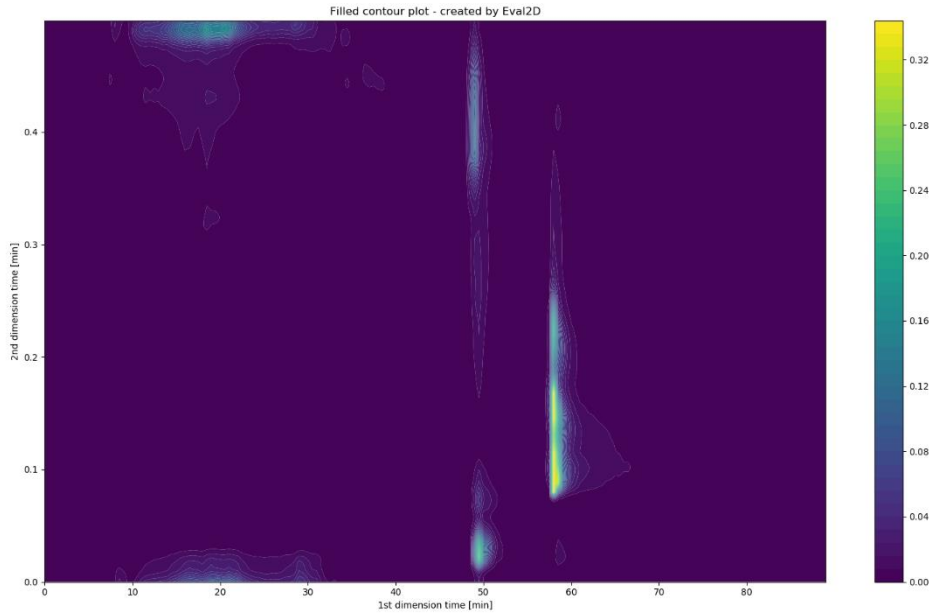
Graf P 28 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití prvního gradientu uvedeného výše v tabulce 7.**



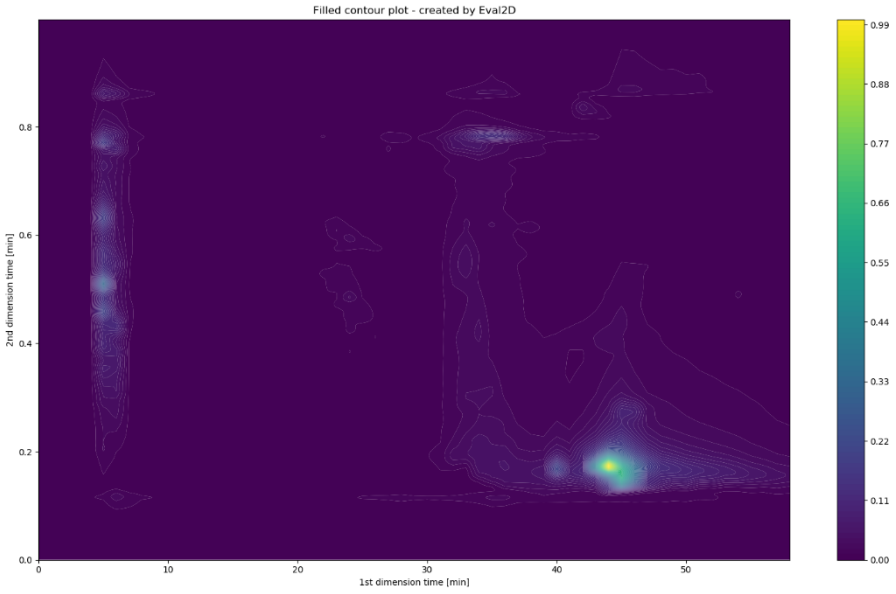
Graf P 29 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití druhého gradientu uvedeného výše v tabulce 7.**



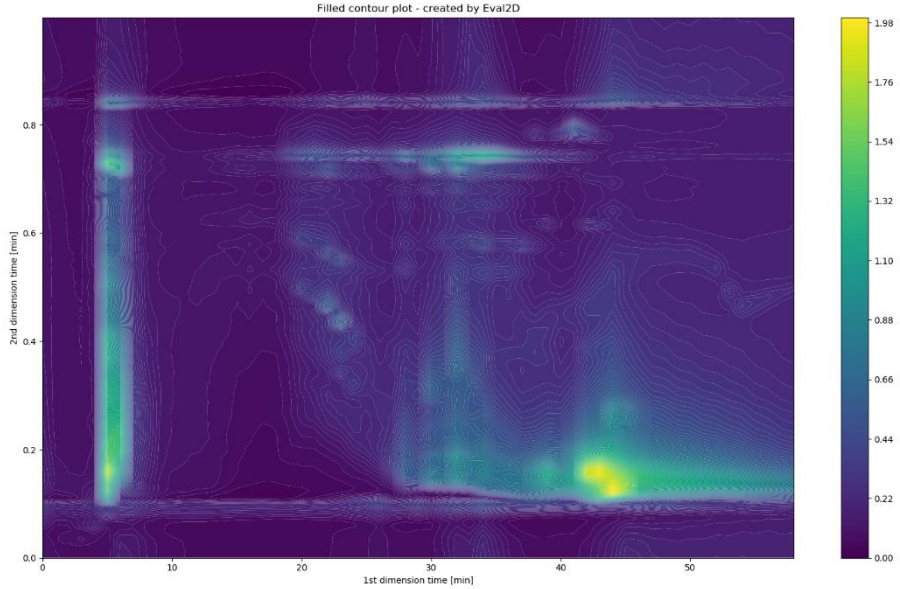
Graf P 30 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití třetího gradientu uvedeného výše v tabulce 8.**



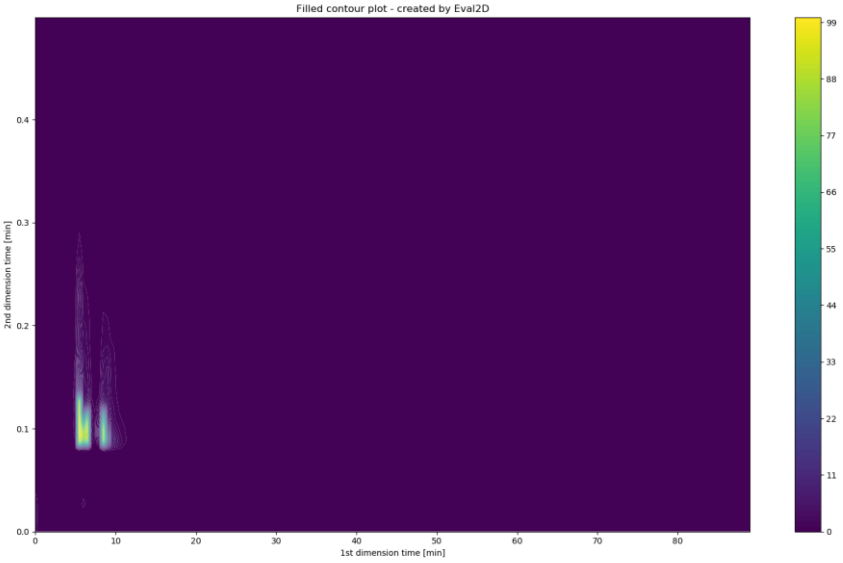
Graf P 31 **Analýza směsi standardů chlorinu e4, chlorine e6, protoporphyrinu IX a pheophorbidu a pomocí 2D LC za použití třetího grafientu uvedeného výše v tabulce 8.**



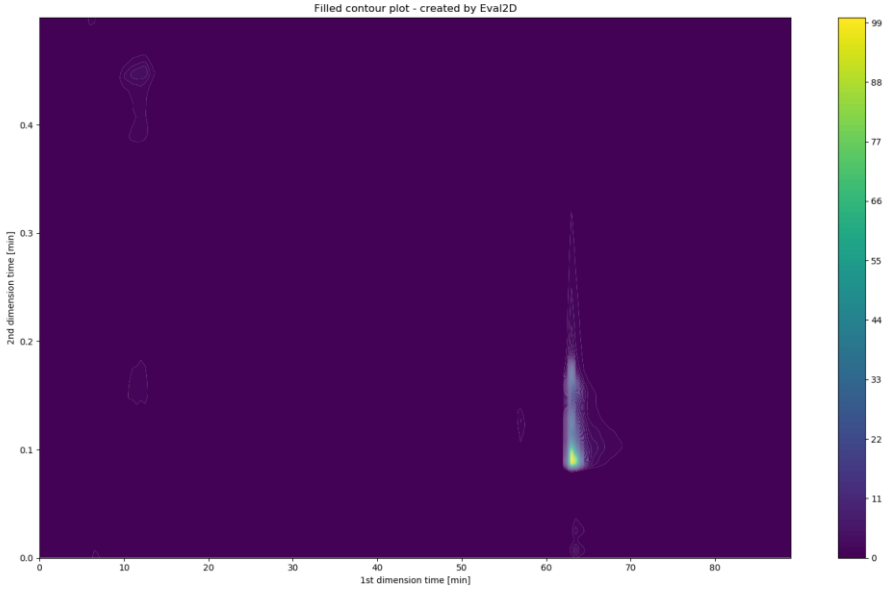
Graf P 32 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití třetího gradientu uvedeného výše v tabulce 9.**



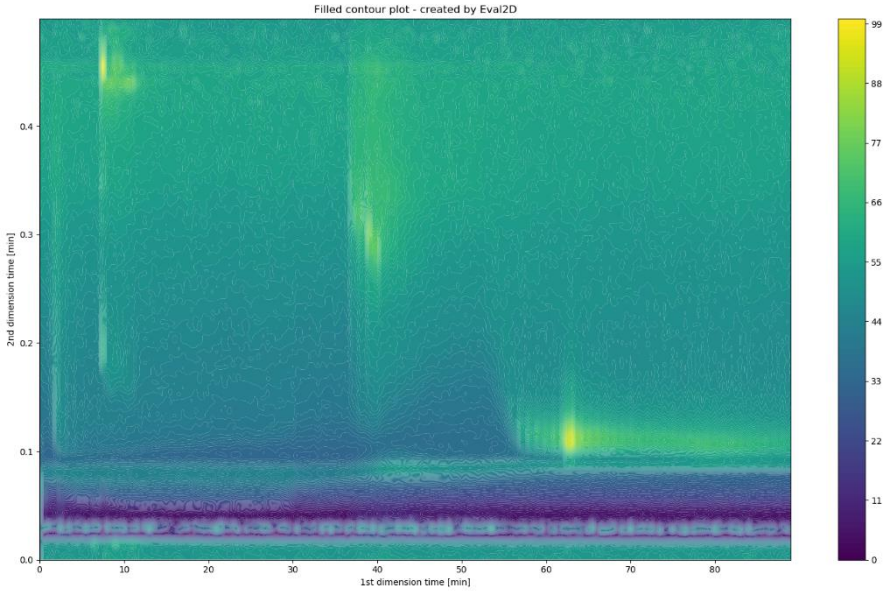
Graf P 33 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití čtvrtého gradientu uvedeného výše v tabulce 10.**



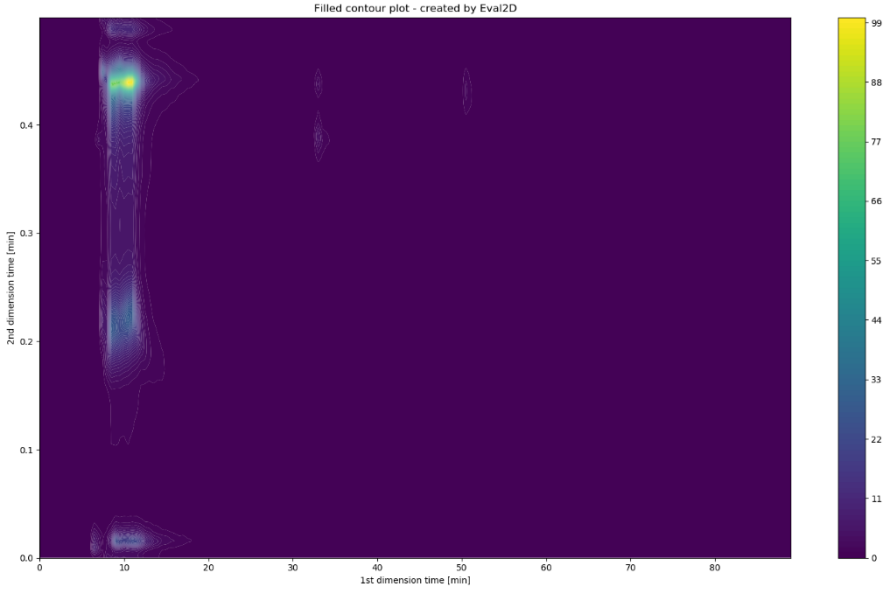
Graf P 34 **Analýza standardu chlorinu e4 pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



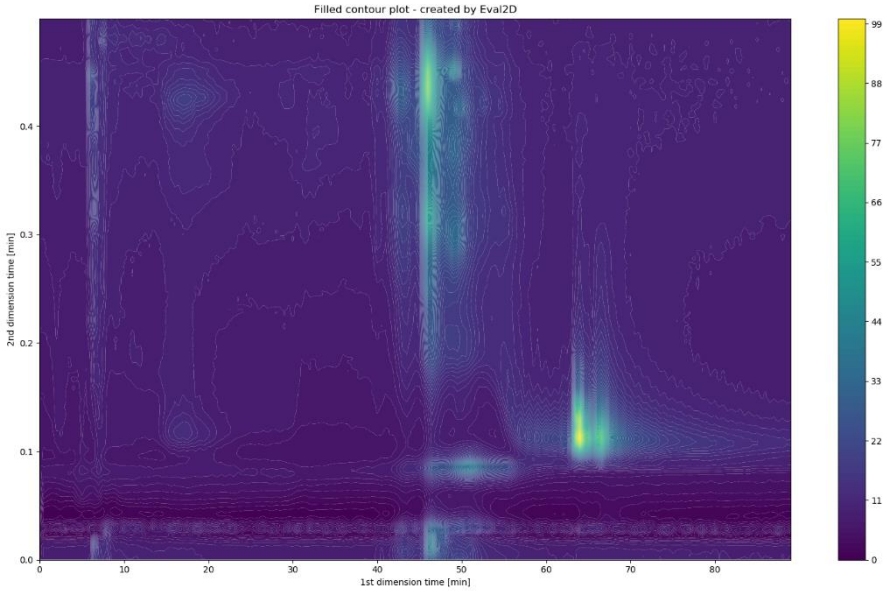
Graf P 35 **Analýza standardu chlorinu e6 pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



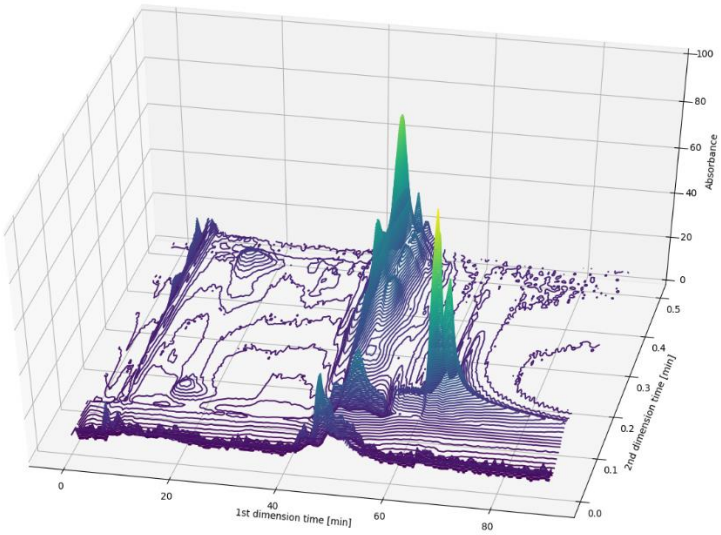
Graf P 36 **Analýza standardu protoporphyrinu IX pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



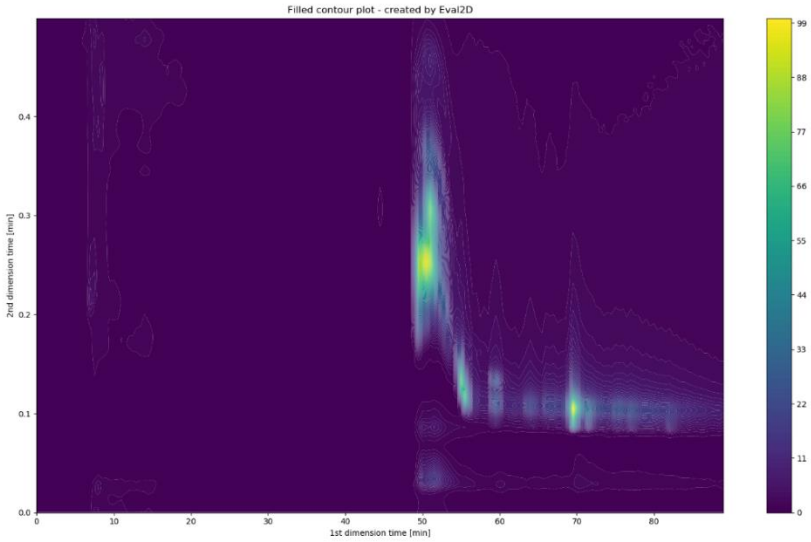
Graf P 37 **Analýza standardu pheophorbide a pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



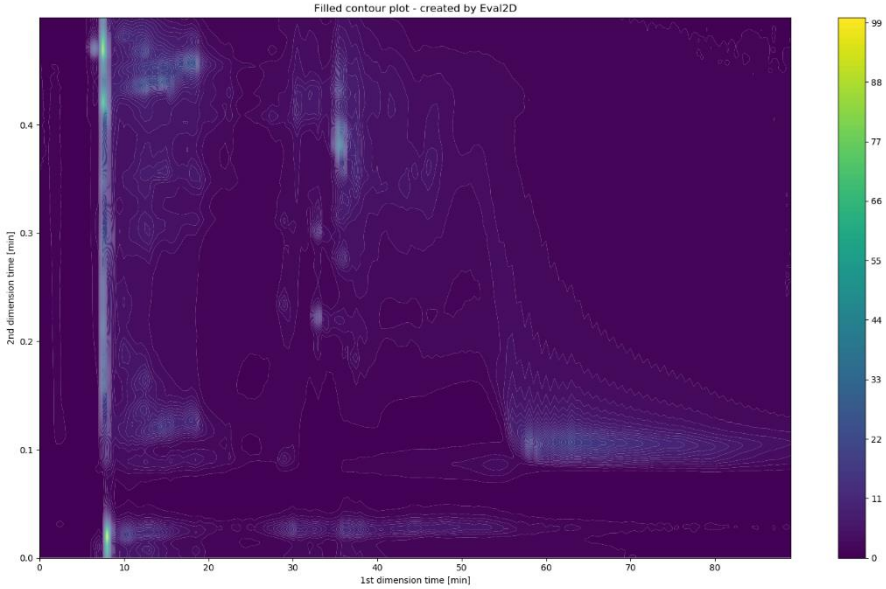
Graf P 38 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



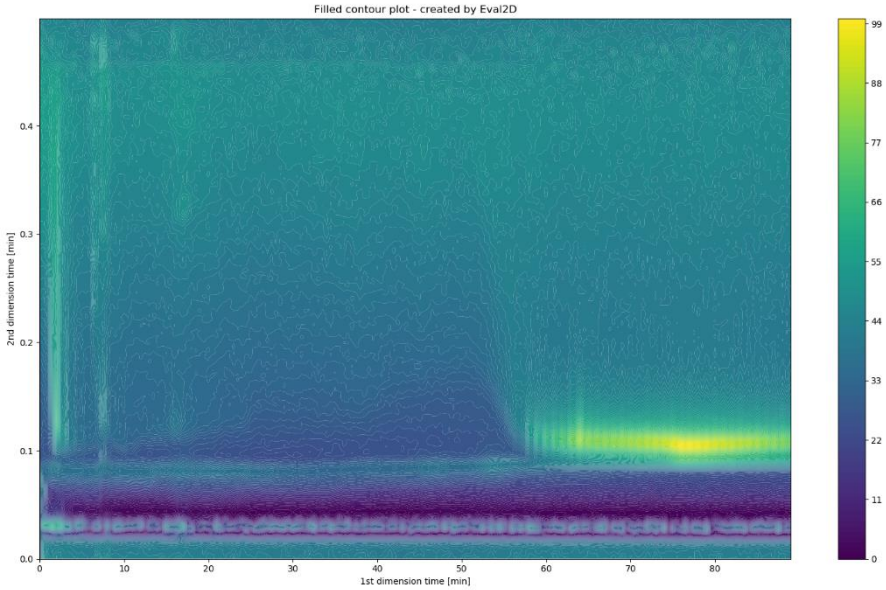
Graf P 39 **3D zobrazení vzorku chlorophyllin sodium copper pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



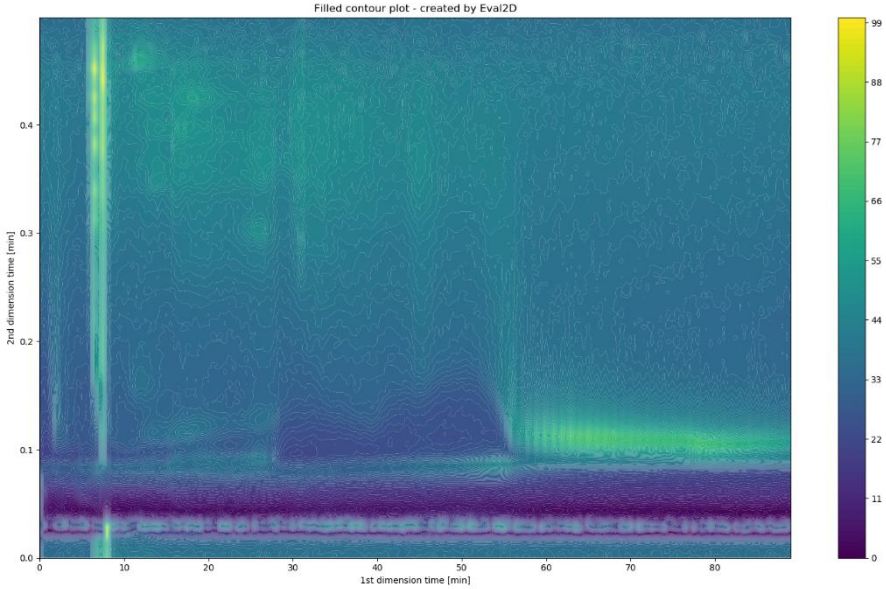
Graf P 40 **Analýza standardu chlorinu e4 s přídavkem $CuCl_2$ pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



Graf P 41 **Analýza standardu pheophorbide a s přídavkem $CuCl_2$ pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



Graf P 42 **Analýza standardu protoporphyrin IX s přídavkem $CuCl_2$ pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**



Graf P 43 **Analýza vzorku chlorophyllin sodium copper s přídavkem $CuCl_2$ pomocí 2D LC za použití pátého gradientu uvedeného výše v tabulce 11.**

Přílohy

TABULKY

Tabulka P 1 **Analýza standardů chlorinu e4, pheophorbide a a protoporphyrin IX. Při poměru mobilní fáze 80 % acetonitrilu (B) a 20 % vody s octanem amonným (A), 85 % (B) a 15 % (A), 86 % (B) a 14 % (A), 87 % (B) a 13 % (A), 90 % (B) a 10 % (A) a nakonec 92 % (B) a 8 % (A). Průměr byl vypočten ze tří měření. Tabulka odpovídá grafu P 18 v příloze obrázky.**

koncentrace m.f. A v %	**20%**	-	-
koncentrace	0,2	-	-
logaritmus koncentrace	-0,699	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,305	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	1,746	0,338	-0,472
pheophorbide a	1,358	0,041	-1,391
protoporphyrin IX	1,676	0,284	-0,547
koncentrace m.f. A v %	**15%**	-	-
koncentrace	0,15	-	-
logaritmus koncentrace	-0,824	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,32	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,06	1,317	0,12
pheophorbide a	1,556	0,178	-0,749
protoporphyrin IX	2,53	0,916	-0,038

Pokračování Tabulky P 1.

koncentrace m.f. A v %	**14%**	-	-
koncentrace	0,14	-	-
logaritmus koncentrace	-0,854	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,326	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,745	1,824	0,261
koncentrace m.f. A v %	**13%**	-	-
koncentrace	0,13	-	-
logaritmus koncentrace	-0,886	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,328	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	4,753	2,579	0,411
koncentrace m.f. A v %	**10%**	-	-
koncentrace	0,1	-	-
logaritmus koncentrace	-1,000	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,328	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	2,08	0,566	-0,247
protoporphyrin IX	7,03	4,294	0,633
koncentrace m.f. A v %	**8%**	-	-
koncentrace	0,08	-	-
logaritmus koncentrace	-1,097	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,328	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	2,595	0,954	-0,020

Tabulka P 2 **Analýza standardů chlorinu e4, pheophorbide a a protoporphyrin IX. Při poměru mobilní fáze 80 % acetonitrilu (B) a 20 % vody s mravenčanem amonným (A), 85 % (B) a 15 % (A), 86 % (B) a 14 % (A), 87 % (B) a 13 % (A), 90 % (B) a 10 % (A) a nakonec 92 % (B) a 8 % (A). Průměr byl vypočten ze tří měření. Tabulka odpovídá grafu P 19 v příloze obrázky.**

koncentrace m.f. A v %	**20%**	-	-
koncentrace	0,2	-	-
logaritmus koncentrace	-0,699	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,304	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	1,854	0,422	-0,375
pheophorbide a	1,377	0,056	-1,252
protoporphyrin IX	1,631	0,251	-0,601
koncentrace m.f. A v %	**15%**	-	-
koncentrace	0,15	-	-
logaritmus koncentrace	-0,824	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,317	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,199	1,429	0,155
pheophorbide a	1,518	0,153	-0,816
protoporphyrin IX	2,192	0,664	-0,178
koncentrace m.f. A v %	**14%**	-	-
koncentrace	0,14	-	-
logaritmus koncentrace	-0,854	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,321	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,958	1,996	0,300

Pokračování Tabulky P 2.

koncentrace m.f. A v %	**13%**	-	-
koncentrace	0,13	-	-
logaritmus koncentrace	-0,886	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,32	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	4,938	2,741	0,438
koncentrace m.f. A v %	**10%**	-	-
koncentrace	0,1	-	-
logaritmus koncentrace	-1,000	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,33	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	1,8	0,353	-0,452
protoporphyrin IX	5,082	2,821	0,450
koncentrace m.f. A v %	**8%**	-	-
koncentrace	0,08	-	-
logaritmus koncentrace	-1,097	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,335	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	2,046	0,533	-0,274
protoporphyrin IX	8,703	5,519	0,742

Tabulka P 3 **Analýza standardů chlorinu e4, pheophorbide a a protoporphyrin IX. Při poměru mobilní fáze 80 % acetonitrilu (B) a 20 % vody s kyselinou mravenčí (A), 85 % (B) a 15 % (A), 86 % (B) a 14 % (A), 87 % (B) a 13 % (A), 90 % (B) a 10 % (A) a nakonec 92 % (B) a 8 % (A). Průměr byl vypočten ze tří měření. Tabulka odpovídá grafu P 20 v příloze obrázky.**

koncentrace m.f. A v %	**20%**	-	-
koncentrace	0,2	-	-
logaritmus koncentrace	-0,699	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,320	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	2,153	0,631	-0,200
pheophorbide a	1,313	-0,005	-
protoporphyrin IX	1,582	0,198	-0,702
koncentrace m.f. A v %	**15%**	-	-
koncentrace	0,15	-	-
logaritmus koncentrace	-0,824	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,331	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	2,958	1,222	0,087
pheophorbide a	1,334	0,002	-2,647
protoporphyrin IX	1,748	0,313	-0,504
koncentrace m.f. A v %	**14%**	-	-
koncentrace	0,14	-	-
logaritmus koncentrace	-0,854	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,335	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,213	1,407	0,148

Pokračování Tabulky P 3.

koncentrace m.f. A v %	**13%**	-	-
koncentrace	0,13	-	-
logaritmus koncentrace	-0,886	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,336	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,422	1,561	0,194
koncentrace m.f. A v %	**10%**	-	-
koncentrace	0,1	-	-
logaritmus koncentrace	-1,000	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,344	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	1,363	0,014	-1,850
protoporphyrin IX	2,225	0,656	-0,183
koncentrace m.f. A v %	**8%**	-	-
koncentrace	0,08	-	-
logaritmus koncentrace	-1,097	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,349	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	1,385	0,027	-1,574
protoporphyrin IX	2,76	1,046	0,020

Tabulka P 4 **Analýza standardů chlorinu e4, pheophorbide a a protoporphyrin IX. Při poměru mobilní fáze 80 % acetonitrilu (B) a 20 % vody s kyselinou octovou (A), 85 % (B) a 15 % (A), 86 % (B) a 14 % (A), 87 % (B) a 13 % (A), 90 % (B) a 10 % (A) a nakonec 92 % (B) a 8 % (A). Průměr byl vypočten ze tří měření. Tabulka odpovídá grafu P 21 v příloze obrázky.**

koncentrace m.f. A v %	**20%**	-	-
koncentrace	0,2	-	-
logaritmus koncentrace	-0,699	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,322	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	2,397	0,813	-0,090
pheophorbide a	1,315	-0,005	-
protoporphyrin IX	1,605	0,214	-0,669
koncentrace m.f. A v %	**15%**	-	-
koncentrace	0,15	-	-
logaritmus koncentrace	-0,824	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acetnaften	1,332	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,1	1,327	0,123
pheophorbide a	1,333	0,001	-3,125
protoporphyrin IX	1,752	0,315	-0,501
koncentrace m.f. A v %	**14%**	-	-
koncentrace	0,14	-	-
logaritmus koncentrace	-0,854	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,335	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,439	1,576	0,198
koncentrace m.f. A v %	**13%**	-	-
koncentrace	0,13	-	-
logaritmus koncentrace	-0,886	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,334	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
chlorin e4	3,713	1,783	0,251

Pokračování Tabulky P 4.

koncentrace m.f. A v %	**10%**	-	-
koncentrace	0,1	-	-
logaritmus koncentrace	-1,000	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,342	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	1,366	0,018	-1,748
protoporphyrin IX	2,211	0,648	-0,189
koncentrace m.f. A v %	**8%**	-	-
koncentrace	0,08	-	-
logaritmus koncentrace	-1,097	-	-
mrtvý čas t_M (min)	**Průměr t_M (min)**	-	-
acenaften	1,346	-	-
retenční čas t_R (min)	**Průměr t_R (min)**	**retenční faktor (k)**	**log k**
pheophorbide a	1,385	0,029	-1,538
protoporphyrin IX	2,639	0,961	-0,017