

OBSAH:

1	PRAXE V MODERNÍ HPLC	13
1.1	PŘÍPRAVA A POUŽITÍ MOBILNÍ FÁZE.....	13
1.1.1	Obecné zásady při přípravě mobilní fáze.....	14
1.1.2	Filtrace mobilní fáze	16
1.1.3	Odplynění mobilní fáze.....	16
1.1.4	Pufrované mobilní fáze	17
1.2	PŘÍPRAVA A POUŽITÍ CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY	22
1.2.1	Obecné použití chromatografické kolony.....	22
1.2.2	Instalace kolony a spojovacích kapilár.....	23
1.2.3	Uchovávání chromatografické kolony	27
1.2.4	Ekvilibrace kolony.....	28
1.2.5	Použití předkolon a předkolonových filtrů.....	30
1.2.6	Regenerace kolony.....	31
1.3	PRAVIDELNÁ ÚDRŽBA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU.....	34
1.3.1	Zařízení pro úpravu mobilní fáze.....	34
1.3.2	Čerpadlo mobilní fáze.....	34
1.3.3	Dávkovací zařízení.....	35
1.3.4	Kolonový termostat	35
1.3.5	Detektory	35
2	VÝVOJ A OPTIMALIZACE HPLC METODY	37
2.1	ANALÝZA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ ANALYTŮ A URČENÍ CÍLE METODY.....	37
2.2	VÝBĚR ZPŮSOBU DETEKCE ANALYTŮ.....	42
2.2.1	Detekční přístupy v HPLC.....	42
2.2.2	Volba podmínek při UV detekci.....	42
2.2.3	Volba podmínek při fluorescenční detekci.....	46
2.2.4	Volba podmínek při detekci aerosolovými detektory.....	48
2.2.5	Volba podmínek při elektrochemické detekci	49
2.2.6	Volba podmínek při hmotnostní detekci	51
2.3	VOLBA CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU.....	62
2.3.1	Nízkomolekulární látky.....	63
2.3.2	Cukry.....	64
2.3.3	Anorganické ionty	65
2.3.4	Polymery	66
2.3.5	Peptidy.....	66
2.3.6	Proteiny.....	67
2.3.7	Nukleové kyseliny	68
2.3.8	Lipidy.....	68
2.4	VOLBA STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE.....	70

2.4.1	<i>Stacionární fáze</i>	71
2.4.2	<i>Rozměry kolony</i>	76
2.4.3	<i>Velikost částic</i>	78
2.4.4	<i>Velikost pórů částic</i>	78
2.4.5	<i>Mobilní fáze a typ eluce</i>	79
2.5	PŘEDBĚŽNÉ EXPERIMENTY S VYUŽITÍM STANDARDNÍCH LÁTEK	80
2.5.1	<i>Obecné zásady volby výchozích podmínek a postupu optimalizace metody</i>	80
2.5.2	<i>Systematický přístup k vývoji metody</i>	80
2.6	VLASTNÍ OPTIMALIZACE METODY	83
2.6.1	<i>Optimalizace pH mobilní fáze na reverzních fázích</i>	84
2.6.2	<i>Optimalizace gradientového programu</i>	87
2.6.3	<i>Objem vzorku dávkovaný na HPLC kolonu</i>	88
2.6.4	<i>Průtok mobilní fáze</i>	91
2.6.5	<i>Optimalizace teploty separace</i>	91
2.6.6	<i>Výpočet a optimalizace doby analýzy</i>	94
2.7	ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ SEPARACE PŘI VÝVOJI METODY	94
2.8	SPECIFICKÉ OPTIMALIZAČNÍ PŘÍSTUPY	96
2.8.1	<i>Sekvenční metody</i>	96
2.8.2	<i>Simultánní metody</i>	98
2.8.3	<i>Využití chromatografických optimalizačních programů pro vývoj metod</i>	101
3	PŘÍPRAVA VZORKŮ K CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZE	104
3.1	ZÁKLADNÍ TECHNIKY PRO ÚPRAVU VZORKŮ	106
3.1.1	<i>Přímá extrakce</i>	106
3.1.2	<i>Srážení proteinů</i>	111
3.1.3	<i>Extrakce z kapaliny do kapaliny</i>	114
3.1.4	<i>Extrakce na tuhou fázi</i>	118
3.2	MODERNÍ TRENDY V TECHNIKÁCH PRO ÚPRAVU VZORKŮ	122
3.2.1	<i>Mikroextrakční techniky</i>	124
3.2.2	<i>On-line extrakční techniky</i>	129
3.2.3	<i>Extrakční techniky s vysokou selektivitou</i>	134
4	VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ V HPLC	136
4.1	KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ	136
4.2	KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ	136
4.2.1	<i>Metoda vnějšího standardu</i>	137
4.2.2	<i>Metoda přídavku standardu</i>	139
4.2.3	<i>Metoda vnitřního standardu</i>	144
4.2.4	<i>Metoda vnitřní normalizace</i>	147
5	VALIDACE METOD V HPLC	149
5.1	DEFINICE METROLOGICKÝCH POJMŮ	149

5.2	VALIDAČNÍ PARAMETRY	150
5.3	PRAKTICKÉ PROVEDENÍ VALIDACE	151
5.3.1	<i>Správnost metody (method accuracy)</i>	151
5.3.2	<i>Přesnost metody (method precision)</i>	154
5.3.3	<i>Linearita a rozsah metody</i>	158
5.3.4	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	160
5.3.5	<i>Selektivita metody</i>	160
5.3.6	<i>Robustnost metody</i>	165
5.4	LÉKOPISNÉ NEBO NORMOVANÉ METODY	168
5.5	TEST ZPŮSOBILOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	169
6	KVALIFIKACE HPLC SYSTÉMU	171
6.1	OBECNÉ PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÝCH TESTŮ	171
6.2	TLAKOVÝ TEST SYSTÉMU	172
6.3	TEPLOTA KOLONOVÉHO TERMOSTATU (SPRÁVNOST A LINEARITA)	172
6.4	HPLC ČERPADLO	173
6.4.1	<i>Správnost průtoku</i>	173
6.4.2	<i>Opakovatelnost průtokové rychlosti</i>	173
6.4.3	<i>Linearita průtokové rychlosti</i>	174
6.4.4	<i>Správnost složení gradientu</i>	174
6.4.5	<i>Přesnost míchání mobilních fází</i>	175
6.4.6	<i>Linearita gradientu</i>	176
6.5	HPLC AUTOMATICKÝ DÁVKOVAČ	176
6.6	TEPLOTA AUTOMATICKÉHO DÁVKOVAČE (SPRÁVNOST A LINEARITA)	176
6.6.1	<i>Linearita a citlivost dávkovaného objemu</i>	177
6.6.2	<i>Opakovatelnost dávkovaného objemu</i>	177
6.6.3	<i>Detekce pozice vialky v zásobníku vialek</i>	178
6.6.4	<i>Křížová kontaminace</i>	178
6.7	HPLC DETEKTORY	178
6.7.1	<i>Linearita UV detektoru</i>	178
6.7.2	<i>Správnost nastavení vlnové délky PDA detektoru</i>	179
6.7.3	<i>Linearita fluorescenčního detektoru</i>	179
6.7.4	<i>Správnost nastavení vlnové délky fluorescenčního detektoru</i>	180
6.7.5	<i>Linearita RI detektoru</i>	180
6.7.6	<i>Citlivost RI detektoru</i>	181
6.7.7	<i>Opakovatelnost odezvy RI detektoru</i>	181
7	ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ V HPLC (TROUBLESHOOTING)	182
7.1	PROBLÉMY SYSTÉMOVÉHO TLAKU	185
7.1.1	<i>Vyšší systémový tlak než je obvyklé</i>	185
7.1.2	<i>Nižší systémový tlak než je obvyklé</i>	186
7.1.3	<i>Kolísající systémový tlak</i>	187

7.2	PROBLÉMY ZÁKLADNÍ LINIE	189
7.2.1	Šum a drift základní linie	189
7.2.2	Cyklický průběh základní linie	194
7.2.3	Necyklický průběh základní linie	195
7.3	PROBLÉMY RETENČNÍHO ČASU	198
7.3.1	Kolísavý retenční čas	198
7.3.2	Zvyšující nebo snižující se retenční čas	198
7.3.3	Změna retenčního času o novou hodnotu (konstantu)	198
7.4	PROBLÉMY TVARU A PLOCHY PÍKU	200
7.4.1	Dvojitý pík	200
7.4.2	Frontující pík	204
7.4.3	Chvostující pík nebo deformovaný pík	205
7.4.4	Negativní pík(y) (jeden nebo více)	208
7.4.5	Uřezaný pík	209
7.4.6	Snížení účinnosti separace	211
7.4.7	Změna plochy píku	213
7.5	PROBLÉMY CHROMATOGRAMU	214
7.5.1	Více píků než očekáváme	214
7.5.2	Méně píků než očekáváme	220
7.5.3	Neobvyklý profil chromatogramu	221
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	223
9	UŽITEČNÉ TABULKY V HPLC DENNÍ PRAXI	234
9.1	MÍŠITELNOST ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL POUŽÍVANÝCH V HPLC	234
9.2	DYNAMICKÁ VISKOZITA η SMĚSÍ ACETONITRIL/VODA A METHANOL/VODA	235
9.3	HODNOTY ABSORPČNÍCH MAXIM A MOLÁRNÍCH EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ TYPICKÝCH FUNKČNÍCH SKUPIN ORGANICKÝCH SLOUČENIN	236
10.1	Mikroextrakční techniky	124
10.2	On-line extrakční techniky	129
10.3	134
10.4	136
11	KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ	136
11.1	136
11.2	137
11.3	139
11.4	141
11.5	142
11.6	143
11.7	144
11.8	145
11.9	146
11.10	147
11.11	148
11.12	149
11.13	149