

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA MEŽNAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA MEŽNAR

**VPLIV VISKOZNOSTI IN TOPILA V VZORCU NA OBLIKO
KROMATOGRFSKIH VRHOV PRI REVERZNOFAZNI
TEKOČINSKI KROMATOGRAFIJI VISOKE LOČLJIVOSTI
EFFECT OF VISCOSITY AND SAMPLE SOLVENT ON PEAK
SHAPE IN REVERSE PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala v Krki, d. d., Novo mesto, na oddelku Raztapljanje pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm. in somentorja dr. Darka Uršiča mag. farm.

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Član komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič

Mentor: prof. dr. Franc Vrečer

Somentor: dr. Darko Uršič

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Francu Vrečerju in somentorju dr. Darku Uršiču za predano znanje, pomoč in usmeritve pri eksperimentalnem delu ter pisanju magistrske naloge.

Hvala Krki d. d., Novo mesto, ki mi je omogočila izvajanje eksperimentalnega dela in vodji oddelka Raztapljanje dr. Marku Štefaniču za razumevanje in koristne nasvete.

Velika zahvala gre moji družini, predvsem staršema, ki sta mi omogočila študij in me vedno spodbujala tekom študijskih let.

Najlepša hvala tudi Mateju in prijateljem za podporo, razumevanje in lepe trenutke med nastajanja magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja in somentorja dr. Darka Uršiča.

Mateja Mežnar

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	I
Kazalo slik.....	III
Kazalo preglednic.....	V
Povzetek	VII
Abstract	VIII
Seznam okrajšav.....	IX
1. UVOD.....	1
1.1. Osnove reverznofazne kromatografije.....	1
1.1.1. Stacionarna faza.....	1
1.1.2. Mobilna faza.....	2
1.2. Parametri oblike kromatografskega vrha pri RP-HPLC.....	6
1.3. Vpliv sestave in količine injiciranega vzorca na obliko kromatografskega vrha	9
1.3.1. Vpliv elucijske moči vzorca na obliko kromatografskega vrha	9
1.3.2. Vpliv volumna injiciranja na obliko kromatografskega vrha.....	11
1.3.3. Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskega vrha	12
1.4. Določanje viskoznosti vzorca s HPLC sistemom.....	13
2. NAMEN IN NAČRT DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. Materiali.....	15
3.1.1. Modelne spojine	15
3.1.2. Reagenti in raztopine	16
3.2. Naprave.....	17
3.3. Metode	18
3.3.1. HPLC metode	18
3.3.2. Priprava raztopin za preveritev vpliva količine topila, volumna injiciranja in viskoznosti vzorca.....	21

4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1.	Izbor analitov in kromatografskih pogojev	27
4.2.	Vpliv variabilne količine topila v injiciranem vzorcu	30
4.2.1.	Vpliv topila vzorca na kapacitivnost	35
4.2.2.	Vpliv topila vzorca na selektivnost	36
4.3.	Vpliv volumna injiciranja na obliko kromatografskega vrha	38
4.4.	Vpliv viskoznosti na obliko kromatografskega vrha	40
5.	SKLEP	49
6.	LITERATURA	51
	Priloga 1	55
	Priloga 2	56
	Priloga 3	58
	Priloga 4	61
	Priloga 5	63
	Priloga 6	67
	Priloga 7	71
	Priloga 8	72

Kazalo slik

Slika 1: Prikaz kromatogramov pri uporabi MF z enako elucijsko močjo (levo) (12) in nomogram najpogostejših dvokomponentnih MF (povzeto po viru 13).....	4
Slika 2: Snyderjev trikotnik (13).....	4
Slika 3: Viskoznost pogosto uporabljenih organskih topil pri RP-HPLC ob mešanju z vodo. (povzeto po viru 16).....	5
Slika 4: Prikaz parametrov h , W_b in $W_{1/2}$ (povzeto po viru 3).....	6
Slika 5: Grafični prikaz vplivov parametrov α , k in N na resolucijo (3).....	7
Slika 6: Shematični prikaz kromatografskega vrha z označenimi parametri za izračun A_s in T_f (povzeto po viru 19).....	9
Slika 7: Shematski prikaz vpliva injiciranja analita v topilu z močnejšo (primer metanol) in šibkejšo elucijsko močjo od MF (primer voda) (shema povzeta po viru 21).....	10
Slika 8: Vpliv elucijske moči topila v vzorcu na obliko kromatografskega vrha v primerjavi z elucijsko močjo MF (povzeto po viru 3).....	11
Slika 9: Razdvojenost kromatografskega vrha zaradi prevelike količine analita v koloni (2). 11	
Slika 10: Prikaz kapacitivnostnih faktorjev analitov v odvisnost od sestave MF.....	28
Slika 11: Ujemanje k_{FEN} , k_{MP} pri 10 % ACN v MF in k_{EP} , k_{PP} v MF z deleži ACN med 22 % in 25 %.....	29
Slika 12: Prikaz kromatogramov po M_{10} in $M_{23,5}$	30
Slika 13: Vpliv vrste in količine organskega topila v vzorcu na N pri različnih pogojih MF. 32	
Slika 14: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na površino kromatografskega vrha.	34
Slika 15: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem topila vzorca na učinkovitost kolone.	35
Slika 16: Odvisnost separacijskega faktorja od sestave MF.	36
Slika 17: Adsorpcija ACN na površino SF v odvisnosti od sestave MF (povzeto po viru 2)..	37
Slika 18: Vpliv volumna injiciranja na učinkovitost kolone za hitro eluirajoča analita po metodi M_{10} in $M_{23,5}$	39
Slika 19: Vpliv volumna injiciranja na učinkovitost kolone za počasi eluirajoča analita po metodi M_{10} in $M_{23,5}$	39
Slika 20: Korelacija viskoznosti z meritvami tlaka na sistemu HPLC.	41
Slika 21: Odziv tlaka ob injiciranju vzorca in prikaz območij za izračun prirasta tlaka.....	42
Slika 22: Odvisnost viskoznosti od koncentracije saharoze in vrste topil.	43

Slika 23: Kromatogrami paracetamola, raztopljenega v MF in topilu z enako elucijsko močjo, toda različno viskoznostjo (20).	47
Slika 24: Kromatograma piroksikama, po injiciranju v topilih z različno viskoznostjo (20). .	48
Slika 25: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na h	58
Slika 26: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na $W_{1/2}$	58
Slika 27: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na A_s	59
Slika 28: Vpliv količine in vrste topila v vzorcu na T_f	59
Slika 29: Vpliv količine in vrste topila v vzorcu na t_R	60
Slika 30: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter $W_{1/2}$	61
Slika 31: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter h	61
Slika 32: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter T_f	62
Slika 33: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na površino kromatografskega vrha.	62

Kazalo preglednic

Preglednica I: Začetne HPLC metode z dvema izokratskima deloma.	18
Preglednica II: Optimizacija HPLC metode z dvema izokratskima deloma.	19
Preglednica III: Izokratske metode za natančno določitev kapacitivnosti posameznih analitov	19
Preglednica IV: Metoda za določanje viskoznosti s HPLC sistemom.	20
Preglednica V: Postopek priprave raztopin z različnimi deleži ACN in MeOH (nabor D). ...	21
Preglednica VI: Postopek priprave raztopin z različnimi deleži ACN in volumnom injiciranja (nabor E).	22
Preglednica VII: Priprava osnovnih raztopin saharoze z različnimi deleži topil (nabor F).	23
Preglednica VIII: Priprava raztopin z različnimi deleži topil in saharoze (nabor G).	23
Preglednica IX: Priprava raztopin z viskoznostjo 2mPa·s in 4mPa·s (nabor H).	26
Preglednica X: Primer sipanja rezultatov petih in treh zaporednih injiciranj raztopine B _{ACN} za FEN, po metodi M ₁₀	27
Preglednica XI: Vpliv deleža organskega topila v injiciranem vzorcu na parametre oblike in položaja kromatografskega vrha.	32
Preglednica XII: Viskoznost pripravljenih raztopin ovrednotenih s sistemom HPLC.	44
Preglednica XIII: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskih vrhov po metodi M ₁₀	45
Preglednica XIV: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskih vrhov po metodi M _{23,5}	45
Preglednica XV: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskega vrha zelo hitro eluirajočega analita po metodi M ₁₀ in M _{23,5}	46
Preglednica XVI: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov FEN v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.	67
Preglednica XVII: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov MP v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.	68
Preglednica XVIII: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov EP v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.	69
Preglednica XIX: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov PP v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.	70
Preglednica XX: Površina pod krivuljo tlaka ob injiciranju vodnih mešanic MeOH z različno koncentracijo saharoze in pripadajoče viskoznosti.	71

Preglednica XXI: Površina pod krivuljo tlaka ob injiciranju vodnih mešanic ACN z različno koncentracijo saharoze in pripadajoče viskoznosti. 71

Povzetek

Za vrednotenje količine raztopljene zdravilne učinkovine v farmaciji se pogosto uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Večina zdravilnih učinkovin je v vodnih medijih slabo topnih (1). Da dosežemo njihovo ustrezno topnost je v nekaterih primerih potrebna uporaba organskih topil. Pri raztapljanju polizdelka ali končne formulacije, so poleg analitov, ki jih želimo ovrednotiti, lahko raztopljene tudi pomožne snovi, ki prav tako vplivajo na končni matriks, v katerem je potrebno z visoko natančnostjo in točnostjo ovrednotiti koncentracijo želenega analita.

Reverznofazna kromatografija visoke ločljivosti je ena od različic HPLC tehnik. Gre za kompleksno analizno tehniko, katere rezultat je odvisen od več dejavnikov. V magistrski nalogi smo se osredotočili predvsem na vpliv sestave vzorca za injiciranje in delno tudi na sestavo mobilne faze ter preučili njun vpliv na obliko kromatografskega vrha. Oblika slednjega je pomemben parameter za natančno (integracija površine kromatografskega vrha) in točno kvantifikacijo analitov (ločljivost kromatografskih vrhov) ter občutljiv pokazatelj dogajanja znotraj kromatografske kolone. V eksperimentalnem delu smo ovrednotili vpliv v vzorcu prisotnih organskih topil pri različni sestavi mobilne faze, različnem volumnu injiciranja in viskoznosti vzorca. Želena viskoznost vzorcev za injiciranje smo dosegli z različnimi koncentracijami saharoze. Viskoznost injiciranih vzorcev smo določili z metodo, ki smo jo razvili s pomočjo meritev tlaka na HPLC sistemu, katere smo umerili z meritvami viskoznosti določenimi s klasično metodo za vrednotenje viskoznosti.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo zaključili, da imata vrsta in količina topila v injiciranem vzorcu velik vpliv na popačenje oblike kromatografskega vrha, ki ga lahko zmanjšamo z manjšo količino injiciranja ali redčitvijo vzorca in večjo količino injiciranja redčenega vzorca. Dokazali smo, da ima viskoznost injiciranega vzorca v preučevanem območju, ob upoštevanju priporočil in dobrih praks za vrednotenje analitov z RP-HPLC, zanemarljivo majhen vpliv na obliko kromatografskega vrha, vpliva na površino kromatografskega vrha pa nismo zaznali.

KLJUČNE BESEDE: RP-HPLC, oblika kromatografskega vrha, topilo, kapacitivnost, volumen injiciranja, viskoznost

Abstract

Analytical quantification of dissolved active ingredient in pharmacy is often performed by High performance liquid chromatography (HPLC). Most active pharmaceutical ingredients have low aqueous solubility (1). To achieve the needed concentrations and solubility, the use of strong organic solvents in high concentrations is sometimes essential. Dissolved excipients are present in a final matrix solution when the solution of bulk product or final pharmaceutical formulation is prepared for the analysis, during which the concentration of the analyte of interest must be quantified with high precision and accuracy.

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is one of the widely used HPLC separation modes. It is a complex analytical technique and its result depends on many factors. In the master thesis, we focused mainly on sample composition and partly also on mobile phase composition and their influence on chromatographic peak shape. Peak shape is an important parameter for precise (integration of peak area) and accurate (selectivity) quantification and sensitive indicator of what is happening inside the chromatographic column. We studied and discussed the influence of type and quantity of organic solvents in the sample solution in case of different mobile phase composition, different injection volume and different viscosities of sample solution. Targeted viscosities were achieved by the addition of sucrose into the sample solutions. Their viscosities were measured by HPLC system as a function of the area under the pressure curve, which was correlated with the results obtained by the traditional viscosity method.

Based on the obtained results we concluded that type and quantity of sample solvent has a significant influence on peak shape distortions, which can be reduced with the injection volume and the dilution of sample. Viscosity of injected sample solution in the tested range has minor and none effect on peak shape and area, respectively.

KEY WORDS: RP-HPLC, chromatographic peak shape, sample solvent, capacity, injection volume, viscosity

Seznam okrajšav

ACN	-	acetonitril
α	-	selektivnost
h	-	višina kromatografskega vrha
HPLC	-	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. » <i>high performance liquid chromatography</i> «)
k	-	retencijski (kapacitivnostni) faktor
K_a (pK_a)	-	konstanta ionizacije ($pK_a = -\log K_a$)
logP	-	logaritem porazdelitvenega koeficienta
MeOH	-	metanol
MF	-	mobilna faza
RP-HPLC	-	reverznofazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. » <i>reverse phase high performance liquid chromatography</i> «)
R_s	-	ločljivost (resolucija)
SF	-	stacionarna faza
SiO ₂	-	silicijev dioksid
THF	-	tetrahidrofur
t_M	-	retencijski čas topila
t_R	-	retencijski čas analita
W	-	širina kromatografskega vrha
W_b	-	širina kromatografskega vrha ob bazni liniji
$W_{1/2}$	-	širina kromatografskega vrha na polovici višine
$W_{0,05}$	-	širina kromatografskega vrha na 5 odstotnem deležu višine
N	-	število teoretskih podov (učinkovitost kolone)

1. UVOD

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je hitra, učinkovita in specifična analizna tehnika in se uporablja v skoraj vsakem farmacevtskem analitskem laboratoriju (2). Svoje začetke ima v letu 1903, ko je ruski botanik Mikhail Tswett uspešno ločil rastlinska barvila v stekleni koloni, napolnjeni s kalcijevim karbonatom (3). V osnovi je tehnika še vedno enaka, le da danes z vsemi različicami kromatografij ločujemo in kvantificiramo širok spekter analitov iz kompleksnih vzorcev. Izvajamo jo pod visokimi tlaki in pretoki topila (mobilne faze), s specializiranimi kolonami in širokim spektrom detektorjev (2, 3). V magistrski nalogi se bomo osredotočili na reverznofazno kromatografijo visoke ločljivosti (RP-HPLC), zato bomo v nadaljevanju opisali predvsem lastnosti in principe delovanja, ki so značilni zanjo.

1.1. Osnove reverznofazne kromatografije

Osnovni princip delovanja HPLC je fizična ločitev molekul v tekočini ozioma mobilni fazi (MF), ko le-ta potuje med trdnimi delci stacionarne faze (SF) znotraj kromatografske kolone. V primeru RP-HPLC govorimo o razporejanju analitov med polarno MF in nepolarno SF. RP-HPLC je najbolj razširjena in najpogosteje uporabljena oblika kromatografije. Uporablja se v kar 90 odstotnem deležu za ločevanje in kvantifikacijo molekul z nizko molekulsko maso (< 2000 daltonov) (3).

Lipofilnost je primarna lastnost analita, ki ima največji vpliv na čas zadrževanja analita na RP-HPLC koloni. Gre za skupen vpliv interakcij molekul analitov z molekulami MF in SF (adsorpcija). Izražamo jo kot $\log P$ in je razmerje koncentracij analita v neionizirani obliki med dvema topiloma, ki se pod standardnimi pogoji med seboj ne mešata (običajno oktanol in voda). Večja je vrednost $\log P$, bolj lipofilna je molekula in večji delež molekul se bo zadrževal v lipofilni fazi (2, 3, 4, 5).

1.1.1. Stacionarna faza

SF pri RP-HPLC je sestavljena iz enega ali več trdnih, poroznih ali neporoznih delcev, kar predstavlja osnovno površino, na katero so vezane nepolarne skupine. Najpogosteje so RP-HPLC kolone polnjene z okroglimi, poroznimi delci z definirano osnovno velikostjo (običajno 3 - 10 μm), velikostjo por posameznega delca, površino in gostoto vezanih molekul. Najbolj uporabljan material osnovnih delcev SF pri RP-HPLC je amorfni silicijev dioksid (SiO_2), ki ga izdelujejo z različnimi skrbno nadzorovanimi sintezni postopki, katerih rezultat so trdni,

okrogli delci z vnaprej definiranimi porami in porazdelitvijo velikosti delcev. Porozna struktura ima veliko površino (100 - 300 m²/g), ki pripomore k boljši ločljivosti (večje število teoretskih podov). Pomembna lastnost SiO₂ je tudi nestisljivost, ki je potrebna zaradi visokih tlakov znotraj kolone (2, 3).

Na osnovno površino SF so vezane nepolarne molekule. Mesto vezave predstavljajo silanolne skupine na površju SiO₂. Pri RP-HPLC so to najpogosteje oktadecilne (C18), oktilne, heksilne, cianopropilne in fenilne skupine. Ker z derivatizacijo ne dosežemo popolne zasedenosti vseh silanolnih skupin, se izvede dodatna obdelava stacionarne faze oz. sekundarna derivatizacija z manjšimi molekulami (ang. »*endcapping*«), s katerimi se na proste silanolne skupine vežejo še dodatne molekule. Ta je pomembna predvsem zaradi zmanjšanja popačenja kromatografskih vrhov (repatost) in zmanjšanja topnosti SiO₂ v alkalnem pH območju (podaljšamo življenjsko dobo kromatografske kolone). Repatost kromatografskega vrha je posledica interakcij analitov s prostimi silanolnimi skupinami, v primeru raztapljanja SiO₂ pa bi s časom prišlo do nastanka praznin v koloni, kar bi vodilo do izgube njene učinkovitosti in nepravilnih oblik kromatografskih vrhov (2). Med uporabljenimi spojinami za izvedbo tega procesa je najbolj učinkovit trimetilsilan zaradi svoje majhnosti, kar mu omogoča boljši dostop do prostih silanolnih skupin na trdnih delcih. Berendsen in ostali (2, 6) so preučevali uspešnost sekundarne derivatizacije s trimetilsilanom in ugotovili, da se je po obdelavi zmanjšala stopnja popačenja kromatografskih vrhov, kar dokazuje zmanjšano število prostih silanolnih skupin. Ugotovili so tudi, da se je zmanjšala vsebnost ogljika. Vzrok za to je substitucija vezavnih mest dolgih alkilnih skupin z molekulami trimetilsilana, ki imajo večjo vezavno energijo (2). Sinteza hibridnih delcev, ki je podobna sintezi ultra čistega silicijevega dioksida, le da se namesto SiO₂ uporabi tetraetoksisilan in skupaj z metiltrietoksisilanom (XTerra® kolone) ali etiletoksisilanom (XBridge®, Gemini-NX® kolone) tvori tudi v alkalnem pH območju odporno strukturo. Hibridni delci imajo manjšo silanolno aktivnost na površini, kar je posledica manjše gostote silanolnih skupin (7, 8).

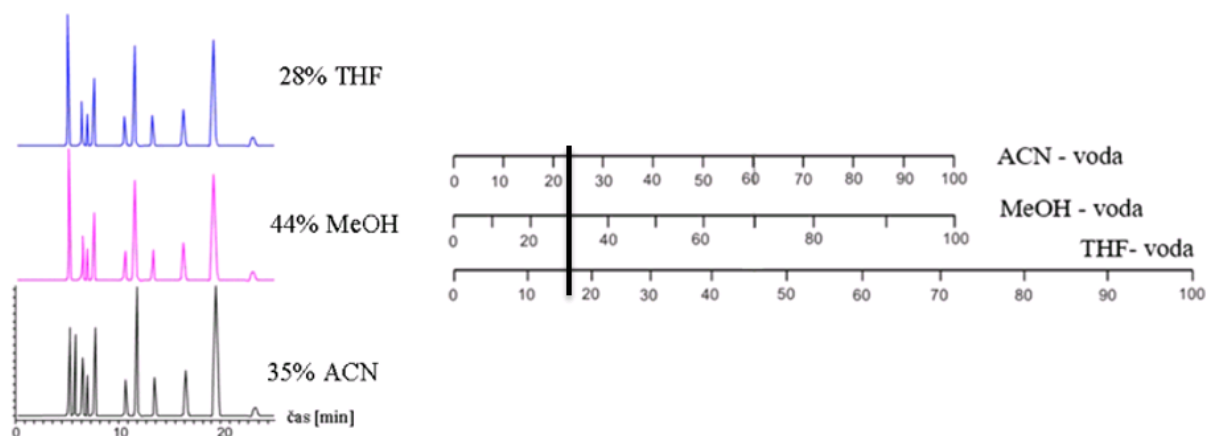
1.1.2. Mobilna faza

MF ali eluent se giblje med delci SF in s seboj nosi raztopljen analit. Pri RP-HPLC je MF najpogosteje sestavljena iz dveh komponent: vodnega dela (voda ali pufer) in organskega modifikatorja (običajno acetonitril (ACN) ali metanol (MeOH)) (2).

V koloni se ustvarita dve območji MF zaradi adsorpcije organskega modifikatorja na lipofilno površino SF. Ob površini, na katero so vezane neparne molekule, se ustvari območje bogatejše z organskim modifikatorjem. Molekule se zaradi svojih lastnosti (predvsem lipofilnosti) razporejajo med fazama in se v njima različno dolgo zadržujejo. Podobne molekule potujejo s približno enako hitrostjo. Pri RP-HPLC se najprej eluirajo polarnejše molekule, saj imajo manjšo tendenco do zadrževanja v koloni.

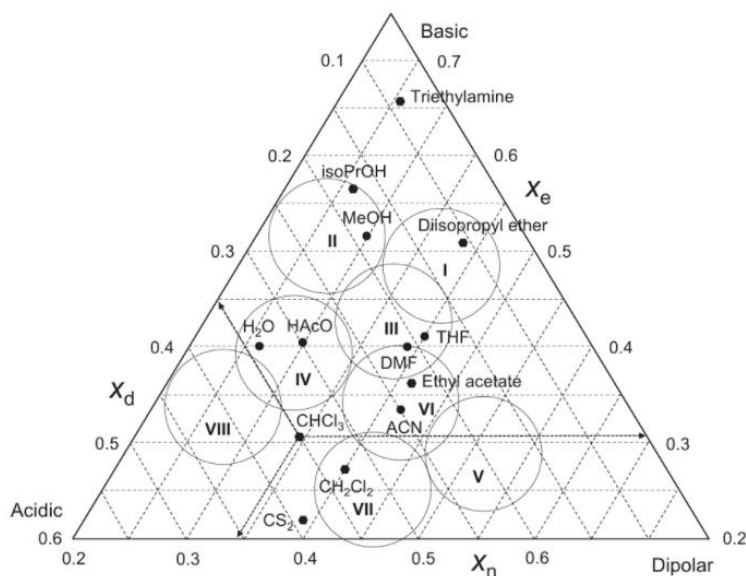
Poleg lipofilnih lastnosti je pomembna tudi pKa vrednost molekul. Od te je namreč odvisna retencija analitov, zato mora biti pH vrednost vodnega dela MF primerno izbrana. Zaželeno je, da se pH MF razlikuje za vsaj 2 pH enoti od pKa analita (takrat bo 100-krat več molekul analita v neioniziranem obliki kot v ionizirani). V primeru, da je pH MF enak pKa vrednosti, imamo enak delež analita v ionizirani in neionizirani obliki, ki po koloni potujeta različno hitro. To je lahko eden izmed pomembnih razlogov za popačeno obliko kromatografskega vrha (2, 3).

Izraz elucijska moč se pri kromatografiji uporablja v povezavi z MF in označuje, kako hitro je zmožna eluirati analit iz kolone (9, 10, 11). Z večjim deležem organskega modifikatorja v MF se hitrost elucije analita povečuje. Dva eluenta imata enako elucijsko moč, ko je čas zadrževanja analita v koloni enako dolg. Slika 1 prikazuje kromatograme, pri katerih so bile uporabljene različne MF z enako elucijsko močjo, saj eluirajo analite iz kolone ob enakem retencijskem času. Elucijska moč topila je povezana z njegovo lipofilnostjo, kot tudi z dodatnimi interakcijami, ki jih tvori s SF in samim analitom. Te lastnosti so kislost, bazičnost in dipolarnost. Najpogosteje uporabljena topila si razvrščena po elucijski moči sledijo: tetrahidrofuran (THF) > ACN > MeOH >> voda (3). Na Sliki 1 desno je prikazan nomogram, ki prikazuje elucijsko moč različnih vodnih mešanic organskih topil in omogoča njihovo medsebojno primerjavo po vertikali. Če se osredotočimo na črto, ki povezuje vse tri skale na nomogramu, vidimo, da imajo 23 odstotni delež ACN, 30 odstotni delež MeOH in 17 odstotni delež THF približno enako elucijsko moč. Za MeOH je značilno, da ima pri nižjih koncentracijah slabšo elucijsko moč kot ACN, medtem ko se v višjih koncentracijah razlika skoraj izniči.



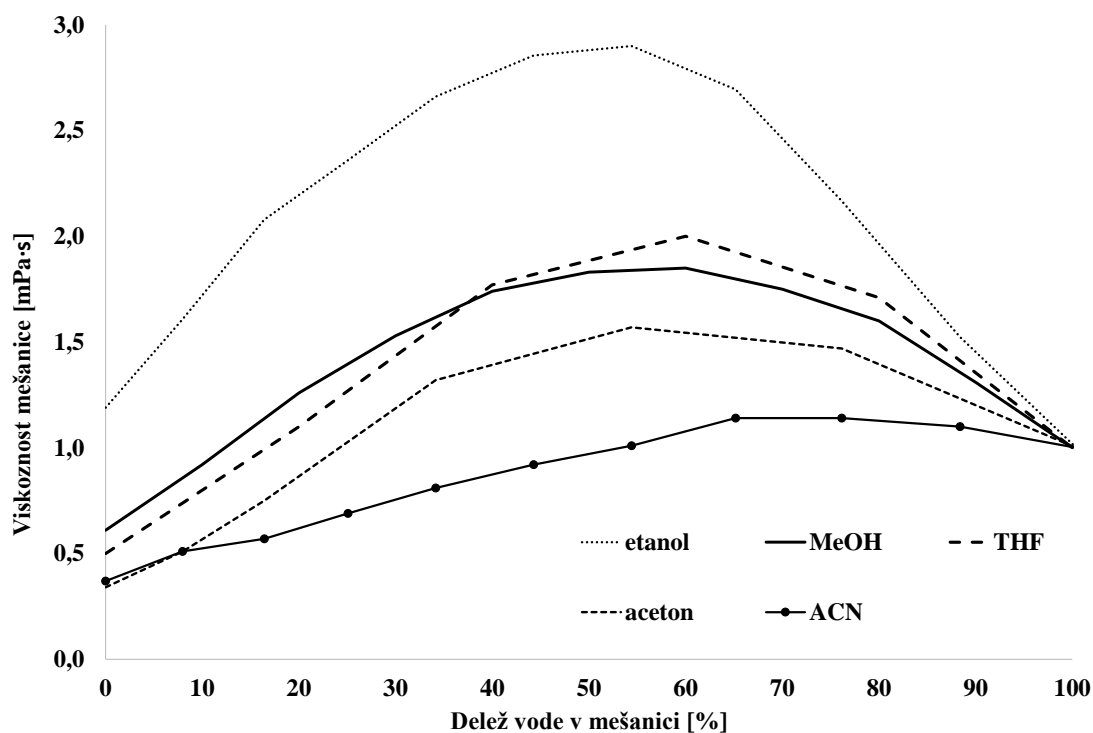
Slika 1: Prikaz kromatogramov pri uporabi MF z enako elucijsko močjo (levo) (12) in nomogram najpogostejših dvokomponentnih MF (povzeto po viru 13).

Snyder (13) je različne lastnosti organskih modifikatorjev povzel z lastnostjo dipolarnosti. Lastnosti MF se zato definirajo tudi s parametri kislosti, bazičnosti in dipolarnosti. Te lastnosti najpogostejših organskih modifikatorjev pri RP-HPLC so prikazane s Snyderjevim trikotnikom na Sliki 2. Dodatno so razvrščeni v skupine (veliki krogi) z različno selektivnostjo (13). Vpliv izbire MF na selektivnost vidimo na kromatogramu na Sliki 1. V primeru 35 % ACN vidimo na začetku dva nižja, med seboj ločena kromatografska vrhova. Na barvnih kromatogramih, kjer je bil v mobilni fazi uporabljen drug organski modifikator, se vrhova združita v skupni, višji vrh. Ločljivosti med prvim in drugim kromatografskim vrhom v primeru MeOH in THF ni, kljub enaki elucijski moči z ACN (12).



Slika 2: Snyderjev trikotnik (13).

Poleg elucijske moči MF je pomembna tudi njena viskoznost. Zaželeno je, da je čim nižja. Pri nižji viskoznosti ima MF manjši upor pri potovanju skozi kolono in masni pretok molekul preko por SF je večji. To se odraža v boljši separaciji, ožjih kromatografskih vrhovih in boljši učinkovitosti. Slika 3 prikazuje viskoznost različnih mešanic organskih topil z vodo. Nekatere kombinacije MeOH in vode tvorijo v primerjavi z ACN zelo viskozno zmes, kar vpliva na manjšo uporabnost MeOH pri RP-HPLC napram ACN (14). Višje tlake, ki jih povzroča MeOH v kromatografski koloni, pripisujejo večji viskoznosti v primerjavi z ACN, kot tudi interakcijam s površino SF (15).

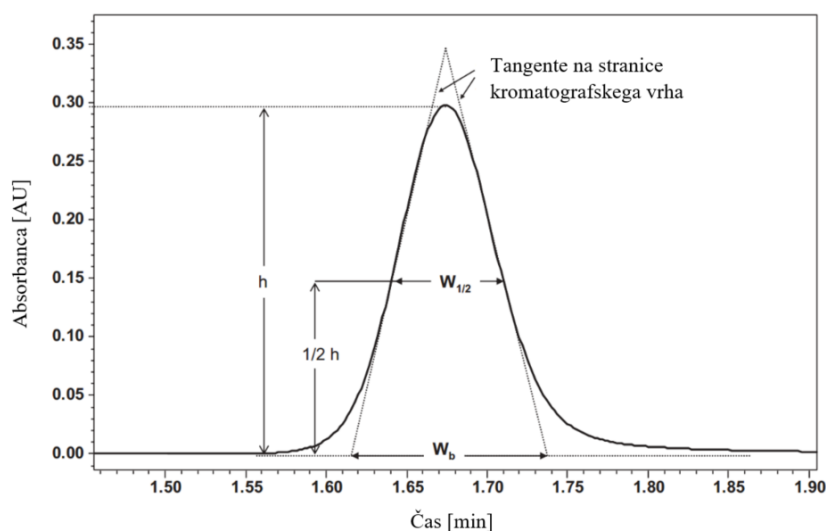


Slika 3: Viskoznost pogosto uporabljenih organskih topil pri RP-HPLC ob mešanju z vodo. (povzeto po viru 16).

Pogosto se HPLC analize izvajajo pod izokraskimi pogoji, kar pomeni, da se sestava MF tekom analize ne spreminja. V primeru gradientne analize se moč MF v času elucije vzorca iz kolone povečuje. Gradient se uporabi pri analizi kompleksnejših vzorcev, ki vsebujejo analite z zelo različno lipofilnostjo. Običajno z gradientom dosežemo boljšo občutljivost in učinkovitost kolone. Glavni slabosti pa sta zmanjšana selektivnost in dejstvo, da je potrebno po gradientni eluciji kolono ob koncu kromatografiranja uravnovežiti na začetno sestavo MF, kar podaljša čas analize (3).

1.2. Parametri oblike kromatografskega vrha pri RP-HPLC

Kromatogram je grafična ponazoritev odziva detektorja, občutljivega na koncentracijo analita v MF. Ko se analit eluira iz kolone, opazimo povišanje odziva v obliki kromatografskega vrha (17). Osnovni parametri oblike in položaja kromatografskega vrha so retencijski čas (t_R), višina (h) in širina (W) kromatografskega vrha, repatost (T_f) kromatografskega vrha, retencijski faktor (k), učinkovitost kolone (N) ter simetrija kromatografskega vrha (A_s). Parametri širine kromatografskega vrha ob bazni liniji (W_b), širine na polovici višine ($W_{1/2}$) in višina so natančneje definirani na Sliki 4 (2, 3).



Slika 4: Prikaz parametrov h , W_b in $W_{1/2}$ (povzeto po viru 3).

Poleg parametrov za širino W_b in $W_{1/2}$ se uporablja tudi $W_{0,05}$, ki predstavlja širino na 5 odstotnem deležu višine kromatografskega vrha. Retencijski čas je čas (običajno izražen v minutah) od injiciranja vzorca na kolono do elucije iz kolone (kromatografskega vrha analita na kromatogramu). Retencijski čas topila (t_M) pa je čas, potreben za prehod topila vzorca, ki se praviloma ne zadrži na koloni, skozi kolono (čas neretenirane komponente vzorca). Retencijski (kapacitivnostni) faktor k je definiran (Enačba 1) kot čas zadrževanja analita relativno na t_M (3).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Enačba 1}$$

Selektivnost, ki jo izražamo s separacijskim faktorjem (α), je razmerje med retencijskima faktorjema (k_1 , k_2) dveh analitov (Enačba 2) in mora biti več kot 1, da sta vrhova ločena.

Odvisna je od številnih faktorjev, ki vplivajo na k , kot so na primer lastnosti SF, sestave MF in lastnosti samega analita (17).

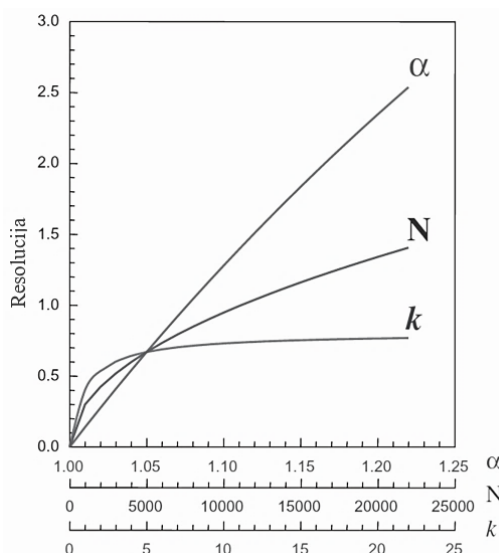
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Enačba 2}$$

Z učinkovito kolono pridobimo ostre kromatografske vrhove, ki imajo obliko Gaussove krivulje, med seboj ločene v relativno kratkem času. Merilo učinkovitosti kolone je število teoretskih podov (N). Definirano je z Enačbo 3. Kolona z večjim številom teoretskih podov je bolj učinkovita.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Enačba 3}$$

Pri razvoju HPLC metod je najpomembnejše, da pridobimo optimalno ločljivost oziroma resolucijo (R_s) v minimalnem času. Ločljivost z vrednostjo 1,5 ali več pomeni, da so kromatografski vrhovi ločeni in se med seboj ne prekrivajo. Odvisna je od parametrov, katerih medsebojna odvisnost je ovrednotena z Enačbo 4 in prikazana na Sliki 5. Ti parametri so selektivnost (izražena z α), učinkovitosti (izražena z N) in kapacitivnost (izražena s k).

$$R_s = \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \quad \text{Enačba 4}$$



Slika 5: Grafični prikaz vplivov parametrov α , k in N na resolucijo (3).

Enačbo 4 uporabimo v primeru izokratske elucije, pri kateri se kromatografski vrh razširi v odvisnosti od t_R . Pri gradientni eluciji pa imajo vrhovi podobno širino, ker so eluirani z

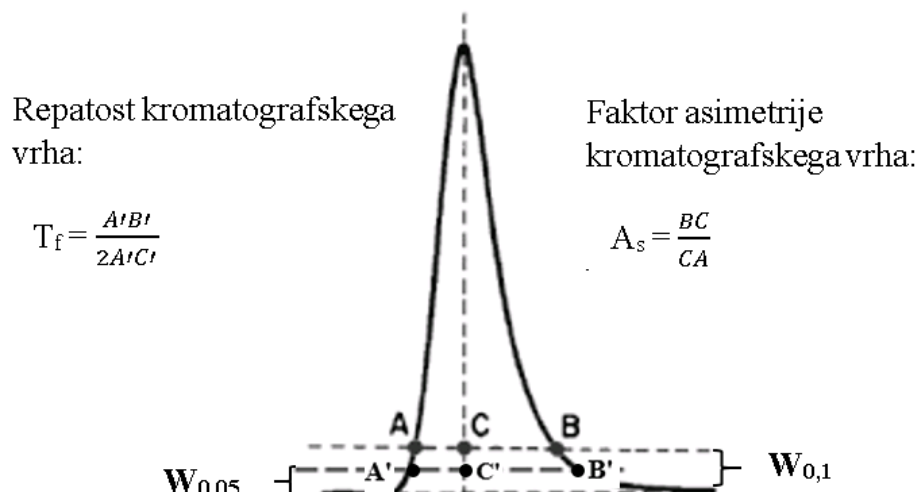
naraščajočo elucijsko močjo MF (3). Pri gradientni eluciji je učinkovitost kolone definirana kot največje število kromatografskih vrhov z resolucijo 1 na kromatogramu.

Drugi način za izračun ločljivosti (med dvema vrhovoma) je povezan neposredno s parametri, pridobljenimi iz kromatograma (Enačba 5). Ti so razdalja med sečiščema obeh tangent (t_{w1} , t_{w2}) kromatografskega vrha (Slika 4) in retencijski čas.

$$R_s = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{0,5 \times (t_{w1} + t_{w2})} \quad \text{Enačba 5}$$

Za primerno R_s je zaželena vrednost k med 3 in 10. Vrednosti $k > 10$ resolucije bistveno ne izboljšajo, le čas kromatografskega postopka se po nepotrebnem povečuje. Vrednost α mora biti več kot 1, sicer se kromatografski vrhovi popolnoma prekrivajo. Običajno je vrednost α med 1,01 in 1,50 in jo lahko izboljšamo s pravilno izbiro kolone in MF (menjava organskega modifikatorja ali njegovega deleža). Že majhne spremembe v selektivnosti imajo zelo velik vpliv na resolucijo. Učinkovitost lahko izboljšamo z dolžino kolone, vendar moramo biti pozorni na to, da je odvisnost med dolžino kolone, ki je sorazmerna z N in ločljivostjo korenska, kot je razvidno iz Enačbe 4.

Oblika kromatografskega vrha je eden najpomembnejših parametrov pri kromatografiji, saj odraža dogajanje znotraj kromatografske kolone. Da lahko popačenje oblike pravilno interpretiramo in odpravimo, moramo poznati pogoje analize in vpliv le-teh na obliko kromatografskega vrha (18). Idealna oblika kromatografskega vrha je definirana s popolno simetrijo, ozkim kromatografskim vrhom z obliko Gaussove krivulje in velikim N kolone. Ustrezna oblika kromatografskega vrha je pomembna za dobro ločljivost in pravilno integracijo površine kromatografskega vrha (3). V realnosti večina kromatografskih vrhov ni idealnih, ampak je prisotna določena stopnja popačenja. Za vrednotenje simetrije se uporabljata A_s in T_f . A_s je definiran kot razmerje med širino desne in leve polovice na 10 odstotnem deležu njegove višine. T_f se po navedbah USP, izračuna kot razmerje širine kromatografskega vrha pri $W_{0,05}$ in dvakratnikom širine leve polovice kromatografskega vrha na $W_{0,05}$ (3). Omenjeni parametri so prikazani na Sliki 6.



Slika 6: Shematični prikaz kromatografskega vrha z označenimi parametri za izračun A_s in T_f (povzeto po viru 19).

Če sta vrednosti T_f in A_s 1,0 pomeni, da je vrh popolnoma simetričen, vrednosti med 0,5 in 2,0 so za večino kromatografskih vrhov sprejemljive, vrednosti večje od 2,0 pa kažejo na stopnjo popačenja oblike, ki lahko povzroča napake pri določanju površine. Običajno sta si vrednosti A_s in T_f zelo podobni. Le za tiste kromatografske vrhove, kjer je prisotno izrazito popačenje, je vrednost A_s nekoliko večja od T_f (3). V primeru desne asimetrije (ang. »fronting«) so vrednosti T_f manjše od 1, v primeru repatosti kromatografskega vrha pa večje od 1 (ang. »tailing«).

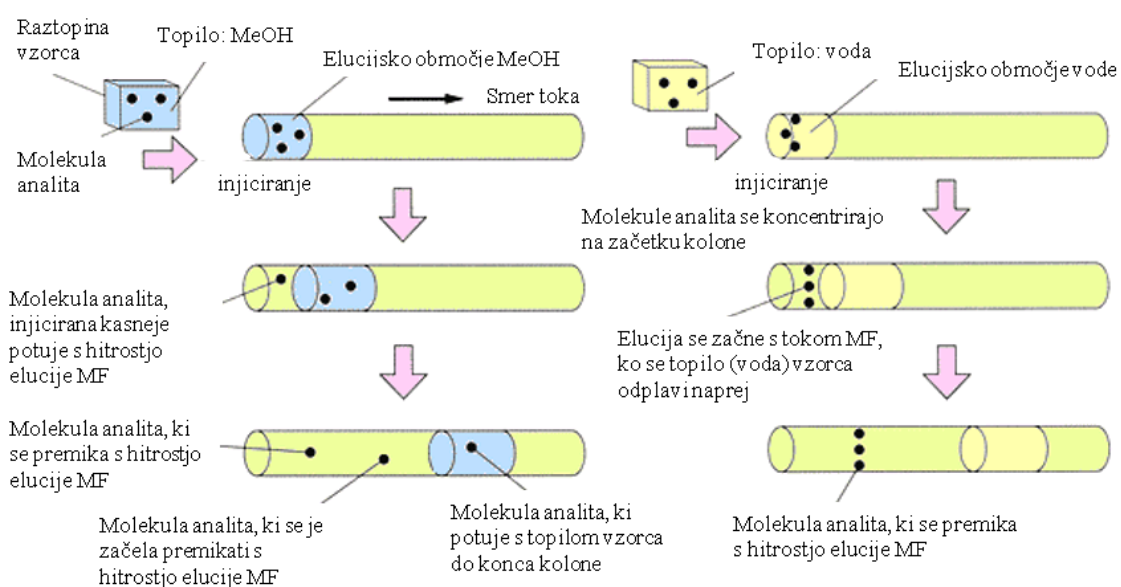
1.3. Vpliv sestave in količine injiciranega vzorca na obliko kromatografskega vrha

Rezultat ustrezne HPLC metode je ločen ($R_s > 1,5$), simetričen kromatografski vrh, ki se pojavi na kromatogramu ob določenem t_R . V primeru težav z njegovo obliko, ki se odražajo kot široki, razdvojeni in asimetrični kromatografski vrhovi, so vzroki različni. Lahko gre za okvaro HPLC sistema ali kolone, do popačenja oblike kromatografskega vrha pa lahko pride tudi zaradi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih vzorca glede na MF, kot sta npr. viskoznost in elucijska moč. Vzorec za injiciranje je raztopina, v kateri želimo natančno določiti koncentracijo enega ali več analitov. To so lahko preproste raztopine v vodnih medijih z enim analitom, lahko pa je vzorec bolj kompleksen. Tak vzorec vsebuje na primer več analitov, raztopljenih pomožnih snovi iz farmacevtskih oblik (lipide, površinsko aktivne snovi, polimere) in organska topila (3, 20).

1.3.1. Vpliv elucijske moči vzorca na obliko kromatografskega vrha

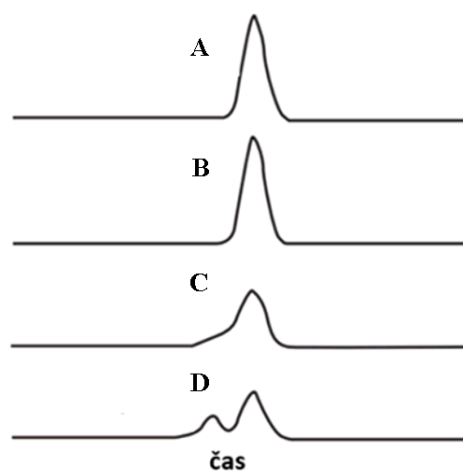
Če ima injicirano topilo drugačno elucijsko moč (vsebuje večji/manjši delež organskega topila, dodatke, drugačno ionsko moč ali druga topila), kot ga ima MF, se molekule analita ob vstopu

na kromatografsko kolono lahko obnašajo drugače, kot bi se raztopljene v MF (Slika 7). Ko pride vzorec na kolono, se molekule analita sprva obnašajo in potujejo vzdolž kolone, kot bi se, če bi bila MF enaka topilu vzorca. Šele kasneje se območje topila vzorca in molekule analita med seboj ločijo. V primeru topila vzorca z večjo elucijsko močjo molekule analita potujejo hitreje s topilom, od katerega se ločijo, ko se topilo vzorca postopoma zmeša z MF. Posledično je kromatografski vrh lahko razširjen, asimetričen ali celo razdvojen (Slika 8). V topilu s slabšo elucijsko močjo bodo molekule analita potovale na začetku počasneje (tako hitro, kot bi v MF s slabšo elucijsko močjo), MF z večjo elucijsko močjo, pa jih bo s skupne točke (na začetku kolone) odnesla vzdolž kolone (21).



Slika 7: Shematski prikaz vpliva injiciranja analita v topilo z močnejšo (primer metanol) in šibkejšo elucijsko močjo od MF (primer voda) (shema povzeta po viru 21).

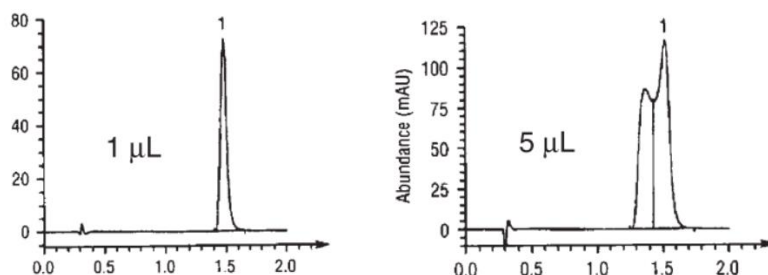
Na Sliki 8 so prikazane oblike kromatografskih vrhov v odvisnosti od elucijske moči vzorca in MF. V primeru A na Sliki 8 je elucijska moč vzorca manjša od elucijske moči MF, v primeru B je enaka, v primeru C je elucijska moč vzorca višja od elucijske moči MF, v primeru D pa je razlika elucijskih moči v prid vzorca največja.



Slika 8: Vpliv elucijske moči topila v vzorcu na obliko kromatografskega vrha v primerjavi z elucijsko močjo MF (povzeto po viru 3).

1.3.2. Vpliv volumna injiciranja na obliko kromatografskega vrha

Popačenje kromatografskih vrhov se še posebej izrazi pri velikih volumnih injiciranega vzorca, kot posledica večje količine in koncentracije organskega topila kot tudi pri preveliki obremenjenosti kromatografske kolone z analitom. Slednja težava se pogosteje pojavlja pri kromatografskih kolonah z majhno površino (neporozni, večji delci), lahko le za enega od več analitov. Slika 9 prikazuje kromatogram 0,1 odstotnega deleža raztopine benzena. V primeru injiciranja $1 \mu\text{L}$ je oblika kromatografskega vrha ustrezna, medtem ko se pri injiciranju $5 \mu\text{L}$ pojavi hujše popačenje v obliki razdvojenega kromatografskega vrha. Vzrok za to je premajhna razpoložljiva površina na začetku kolone za hkratno adsorpcijo celotne količine analita na SF. Del molekul se zato odplavi naprej hitreje, kar povzroči razdvojen kromatografski vrh.



Slika 9: Razdvojenost kromatografskega vrha zaradi prevelike količine analita v koloni (2).

Poleg prisotnih organskih topil v vzorcu lahko na obliko kromatografskega vrha vpliva tudi viskoznost v kromatografsko kolono injiciranega vzorca.

1.3.3. Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskega vrha

Viskoznost lahko definiramo z dvema konceptoma: kinematično in dinamično. Kinematična viskoznost je upor tekočine pod silo gravitacije, dinamična pa je upor tekočine proti toku pod vplivom zunanje sile in ni odvisna od gostote tekočine (22). Učinek popačenja oblike kromatografskega vrha, ki je posledica različne dinamične viskoznosti injiciranega vzorca, so opazovali pri več različicah kromatografij. Pri RP-HPLC je vpliv slabše raziskan (20).

Cherrak s sodelavci je raziskoval, kako injiciranje vzorca z višjo/nišjo viskoznostjo od MF vpliva na obliko kromatografskega vrha pri kromatografiji z ločevanjem po velikosti (ang. »*size – exclusion chromatography*«), ki se uporablja za ločevanje komponent na osnovi velikosti molekul. Ugotovil je, da že 10 odstotna razlika v viskoznosti elucijske tekočine in injiciranega vzorca povzroči občutne deformacije kromatografskega vrha (23).

Popačenje kromatografskih vrhov zaradi različnih viskoznosti tekočin je posledica hidrodinamske nestabilnosti (24). Stik tekočin ni več raven, ampak postane deformiran, zaradi vdora manj viskozne tekočine v bolj viskozno. V primeru manj viskozne MF in viskoznejšega vzorca, MF vdre v območje topila vzorca, del vzorca v viskoznejši tekočini pa zaostane. Pride do t. i. nastanka viskoznih prstov (ang. »*viscous fingering*«). Če je injicirano topilo manj viskozno od MF, pričakujemo popačenje na začetnem delu kromatografskega vrha, v nasprotnem primeru pa bo v obliki prstov popačen zadnji del (20). Prav tako je sistem mešanja injicirane raztopine z MF manj stabilen pri velikih hitrostih injiciranja, saj je celoten volumen vzorca zelo hitro izpostavljen vplivom viskoznosti MF (24). Razumevanje nastanka viskoznih prstov je pomembno, ker nastanek le-teh zmanjša učinkovitost ločbe analitov znotraj HPLC kolone. Vplivajo predvsem na (a) simetričnost in širjenje kromatografskih vrhov. Najpogosteje je težava močno izražena pri preparativni tekočinski kromatografiji in kromatografiji z ločevanjem po velikosti, kjer so volumni injiciranja v primerjavi s pretokom MF zelo veliki (25). Broyles s sodelavci (26) je ugotovil, da je v primeru, ko injiciranje vzorca ne povzroči spremembe tlaka za več kot 10 - 15 % pri konstantnem pretoku, zelo majhna verjetnost za pojav efekta viskoznih prstov. Če je ta sprememba v tlaku med 10 in 25 odstotnem deležu, nam ta efekt ne bo povzročal težav. V primeru, da je sprememba v tlaku višja in se pojavijo motnje v obliki kromatografskega vrha kot tudi spremembe v učinkovitosti ločbe, je potrebno spremeniti hitrost pretoka, injicirati večji volumen vzorca v bolj razredčeni raztopini ali raztopino z manj viskoznim topilom (toda ne z močnejšo elucijsko močjo) od MF (26).

1.4. Določanje viskoznosti vzorca s HPLC sistemom

Uveljavljeni in s strani farmakopej predpisani postopki za merjenje viskoznosti (kapilarni ali rotacijski viskozimeter) (22), so pogosto dolgotrajni, upravljajo se ročno, za izvedbo ene meritve pa je potrebna velika količina vzorca (od nekaj 10 mL do nekaj 100 mL). Mach in Gregory (27) sta razvila metodo za merjenje dinamične viskoznosti s sistemom HPLC. Ugotovila sta, da je sprememba v tlaku ob injiciranju vzorca v kolono odvisna od viskoznosti vzorca. Vzorec so injicirali v cevko, dolgo od 0,5 m do 3 m, in z notranjim premerom 0,13 mm. Tako so dosegli dovolj velik tlak znotraj sistema HPLC, da so bile razlike v viskoznosti dobro izražene. Umeritveno krivuljo so pripravili z vodnimi mešanici glicerola z znano viskoznostjo, s katero so nato korelirali vse ostale meritve. Meritve so izvedli z nekaj 10 μ L vzorca z uporabo avtomatskega vzorčevalnika. Metoda omogoča avtomatizirano merjenje velikega števila vzorcev v kratkem času, brez stalne prisotnosti analitika in z majhno porabo vzorca (28).

2. NAMEN IN NAČRT DELA

V delu bomo s pomočjo petih analitov ovrednotili vpliv vrste in količine organskega topila v vzorcu za injiciranje na spremembo položaja in oblike kromatografskega vrha analitov z različnim časom eluiranja iz kolone.

Spreminjali bomo:

- sestavo mobilne faze,
- sestavo injiciranega vzorca,
- volumen injiciranja vzorca,
- viskoznost injiciranega vzorca.

Naše hipoteze so:

hipoteza 1: s povečanjem deleža organskega topila v vzorcu se popačenje oblike kromatografskega vrha poveča,

hipoteza 2: z zmanjšanjem volumna injiciranja ali večjim volumnom bolj redčenega vzorca (manjša koncentracija organskega topila v vzorcu) zmanjšamo vpliv organskega topila na popačenja oblike kromatografskega vrha,

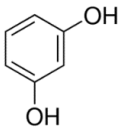
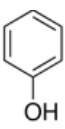
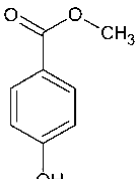
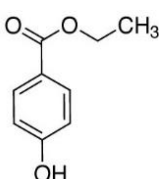
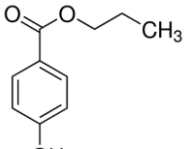
hipoteza 3: razlika v viskoznosti za faktor 2, v območju viskoznosti vodnih mešanic s pogosto uporabljenimi organskimi topili pri RP-HPLC, ne vpliva na popačenje oblike kromatografskega vrha.

V okviru magistrske naloge bomo razvili več metod, s katerimi bomo vrednotili vplive injiciranja raztopin z različnimi deleži izbranih organskih topil (ACN, MeOH), različno količino injiciranja in viskoznostjo. Optimizirali bomo tudi metodo za merjenje viskoznosti injiciranih vzorcev s sistemom HPLC in jo primerjali s klasično metodo za vrednotenje viskoznosti. Ovrednotili bomo, na kakšen način in v kakšnem obsegu preučevane spremenljivke vplivajo na obliko kromatografskega vrha, kakšne izzive lahko pričakujemo pri vsakodnevnih analizah raztopin s kompleksnejšo sestavo vzorca za injiciranje (visok delež organskega topila, različne viskoznosti) in preučili nekatere dosedanje raziskave o vplivu viskoznosti na obliko kromatografskega vrha pri RP-HPLC.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Modelne spojine

Lastnosti	resorcinol (RES)	fenol (FEN)	metilparaben (MP)	etilparaben (EP)	propilparaben (PP)
Molekulska formula	C ₆ H ₆ O ₂ (28)	C ₆ H ₆ O (33)	C ₈ H ₈ O ₃ (38)	C ₉ H ₁₀ O ₃ (42)	C ₁₀ H ₁₂ O ₃ (44)
Molska masa [g/mol]	110,11 (28)	94,11 (33)	152,15 (38)	166,17 (42)	180,20 (44)
pKa	9,30 in 11,06 (29)	9,99 (34)	8,40 (39)	8,34 (43)	7,91 (45)
logP	0,80 (30)	1,46 (35)	1,96 (35)	2,47 (44)	3,04 (35)
Topnost v vodi [g/L] (25 °C)	717,0 (31)	82,8 (36)	2,5 (40)	0,9 (35)	0,5 (46)
Strukturna formula	 (32)	 (37)	 (41)	 (47)	 (48)
Podatki o standardu (čistost)	USP, referenčni standard (99,8 %)	Sigma-Aldrich, referenčni standard (99,8%)	Krka, referenčni standard (99,6 %)	Sigma – Aldrich, sekundarni standard (99,6 %)	Krka, referenčni standard (99,9 %)

3.1.2. Reagenti in raztopine

Reagenti; čistost (vir)

- Metanol; (Ultra) Gradient HPLC grade, $\geq 99,8$ %, (J. T Baker, ZDA)
- Acetonitril; Ultra Gradient HPLC grade, $\geq 99,9$ %, (J. T Baker, ZDA)
- Ortofosforna kislina, konc. 85 %, (Merck, Nemčija)
- Saharoza, $\geq 99,5$ %, (Merck, Nemčija)

Raztopine in njihova priprava

- 0,2 % ortofosforna kislina:
1000 mL merilno bučo smo napolnili s približno 500 mL ultra čiste vode za kromatografijo, odpipetirali 2,0 mL koncentrirane ortofosforne kisline, dobro premešali in dopolnili z vodo do oznake volumna.
- Osnovna standardna raztopina v ACN (A_{ACN}) in MeOH (A_{MeOH}):
V 50,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg vsakega izmed petih analitov ($c=0,2$ g/L) – RES, FEN, MP, EP in PP. Dodali smo približno 25 mL organskega topila (MeOH (A_{MeOH}) ali ACN (A_{ACN})) in spojine raztopili s pomočjo ultrazvoka. Ko se je raztopina ohladila na sobno temperaturo, smo bučko dopolnili z organskim topilom do oznake volumna.
- Standardna raztopina (B_{ACN} , B_{MeOH}):
Odpipetirali smo 5,0 mL osnovne raztopine v 100,0 mL merilno bučko in dopolnili do oznake volumna z ultra čisto vodo. Končna raztopina standarda vsebuje 5 odstotni delež organskega topila.
- Standardna raztopina (C_{ACN}):
Odpipetirali smo 30,0 mL A_{ACN} , ki smo ji dodali še 60,0 mL ACN.
- raztopine topil (T):
Ustrezno količino topila (v primeru 5 % raztopine je to 5 mL/100 mL končnega volumna) smo odpipetirali v merilno bučko. Po dodatku vode (do približno $\frac{3}{4}$ volumna) smo raztopino premešali in jo temperirali na sobno temperaturo. Z ultra čisto vodo smo

dopolnili do oznake volumna. Primer oznake 5 odstotnega deleža raztopine ACN: T_{5%/ACN}.

3.2. Naprave

- Kromatografski sistem HPLC, Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, ZDA),
 - kvarтерна črpalka: 1260 Quat Pump VL (G1311C),
 - avtomatski vzorčevalnik: 1260 HiP ALS (G1367E),
 - termostat avtomatskega vzorčevalnika: 1290 Thermostat (G1330B),
 - termostat za kolono: 1260 TTC (G1316A),
 - UV detektor: 1260 DAD (G4212B),
- Tehtnica, XPE205 (Mettler Toledo, Švica),
- Tehtnica, ME36S-OCE (Sartorius AG, Nemčija),
- Ultrazvočna kadica, SONIS 20 (Iskra Pio, Slovenija),
- Digitalni reometer, RVDV III+ (Brookfield Ametek, ZDA).

3.3. Metode

3.3.1. HPLC metode

HPLC metode so označene s kratico M, poleg pa je navedena številka, ki označuje delež organskega modifikatorja v prvem izokratskem delu metode, kjer vrednotimo obliko in položaj kromatografskega vrha (na primer M₅). V primeru, da je parameter metode enak predhodni metodi, ga v preglednici ponovno nismo navedli. Navedene so torej le spremembe s predhodno metodo. Na ta način smo želeli poudariti spremenljivke med posameznimi metodami.

Preglednica I: Začetne HPLC metode z dvema izokratskima deloma.

Parametri	Vrednost parametrov									
Kolona	X-Bridge® C18, premer delcev: 2,5 µm, dimenzije kolone: 50 mm x 4,6 mm									
Mobilna faza	<u>Kanal A:</u> 0,2 % konc. ortofosforna kislina; <u>Kanal B:</u> ACN									
Parametri elucije	Čas [min]	% B							Opomba	
		M ₅	M ₁₀	M ₁₅	M ₂₀	M ₂₅	M ₃₀	M ₃₅	M ₄₀	
	0,0	5	10	15	20	25	30	35	40	1.izokratski del
	5,5	5	10	15	20	25	30	35	40	
	5,6	40							2.izokratski del	
	7,0	40								
	7,1	5	10	15	20	25	30	35	40	Uravno- teženje kolone
9,0	5	10	15	20	25	30	35	40		
Pretok	2 mL/min									
Temperatura kolone	45 °C									
Temperatura vzorcev	20 °C									
Valovna dolžina	200 nm									
Volumen injiciranja	10 µL									
Čas kromatografiranja	9 min									

Preglednica II: Optimizacija HPLC metode z dvema izokratskima deloma.

Parametri	Vrednost parametrov								
Parametri elucije	Čas [min]	% B							
		M₁₀	M₂₂	M_{22,5}	M₂₃	M_{23,5}	M₂₄	M_{24,5}	M₂₅
	0,0	10	22	22,5	23	23,5	24	24,5	25
	5,5	10	22	22,5	23	23,5	24	24,5	25
	5,6	40							
	7,0	40							
	7,1	10	22	22,5	23	23,5	24	24,5	25
	9,0	10	22	22,5	23	23,5	24	24,5	25

Preglednica III: Izokratske metode za natančno določitev kapacitivnosti posameznih analitov

Parametri	Vrednost parametrov					
Metoda	M₅	M₁₀	M₁₅	M₂₀	M_{23,5}	M₂₅
% B	5	10	15	20	23,5	25
Čas kromatografiranja [min]	20	15	15	10	8	8
Metoda	M₃₀	M₄₀	M₄₅	M₅₀	M₆₀	M₈₀
% B	30	40	45	50	60	80
Čas kromatografiranja [min]	20	15	15	10	8	8

Preglednica IV: Metoda za določanje viskoznosti s HPLC sistemom.

Parametri	Vrednost parametra
Predkolona	Gemini® C18, dimenzije predkolone: 4,0 x 3,0 mm
% B	10
Valovna dolžina	/ (spremljamo odziv tlaka)
Volumen injiciranja	100 µL
Čas kromatografiranja	1,5 min

3.3.2. Priprava raztopin za preveritev vpliva količine topila, volumna injiciranja in viskoznosti vzorca

V primeru navedbe ACN v oznaki raztopine, smo za pripravo uporabili A_{ACN} in ACN, kjer pa je naveden MeOH, smo uporabili A_{MeOH} in MeOH.

Preglednica V: Postopek priprave raztopin z različnimi deleži ACN in MeOH (nabor D).

Raztopina vzorca	Volumen A_{ACN}/A_{MeOH} [mL]	Volumen ACN/MeOH [mL]	Volumen bučke [mL]
D _{5%} /ACN/10 μ L	2,5	0	50,0
D _{10%} /ACN/10 μ L		2,5	
D _{15%} /ACN/10 μ L		5,0	
D _{20%} /ACN/10 μ L		7,5	
D _{25%} /ACN/10 μ L		10,0	
D _{30%} /ACN/10 μ L		12,5	
D _{40%} /ACN/10 μ L		17,5	
D _{45%} /ACN/10 μ L		20,0	
D _{50%} /ACN/10 μ L		22,5	
D _{60%} /ACN/10 μ L		27,5	
D _{80%} /ACN/10 μ L		37,5	
D _{100%} /ACN/10 μ L		47,5	
D _{5%} /MeOH/10 μ L		0	
D _{10%} /MeOH/10 μ L		2,5	
D _{15%} /MeOH/10 μ L		5,0	
D _{20%} /MeOH/10 μ L		7,5	
D _{25%} /MeOH/10 μ L		10,0	
D _{30%} /MeOH/10 μ L		12,5	
D _{40%} MeOH/10 μ L		17,5	
D _{45%} /MeOH/10 μ L		20,0	
D _{50%} /MeOH/10 μ L	22,5		
D _{60%} /MeOH/10 μ L	27,5		
D _{80%} /MeOH/10 μ L	37,5		
D _{100%} /MeOH/10 μ L	47,5		

(Oznaka raztopine vzorca: oznaka nabora delež topila/vrsta topila/volumen injiciranja)

Preglednica VI: Postopek priprave raztopin z različnimi deleži ACN in volumnom injiciranja (nabor E).

Raztopina vzorca	Volumen A_{ACN} [mL]	Volumen C_{ACN} [mL]	Volumen ACN [mL]	Volumen bučke [mL]
E _{10%} /ACN/5 μ L	5,0	0	0	50,0
E _{20%} /ACN/5 μ L	5,0	0	5,0	50,0
E _{30%} /ACN/5 μ L	5,0	0	10,0	50,0
E _{40%} /ACN/5 μ L	5,0	0	15,0	50,0
E _{50%} /ACN/5 μ L	5,0	0	20,0	50,0
E _{60%} /ACN/5 μ L	5,0	0	25,0	50,0
E _{80%} /ACN/5 μ L	5,0	0	35,0	50,0
E _{100%} /ACN/5 μ L	5,0	0	45,0	50,0
E _{20%} /ACN/7,5 μ L	0	10,0	22,5	50,0
E _{20%} /ACN/7,5 μ L	0	10,0	27,5	50,0
E _{20%} /ACN/7,5 μ L	0	10,0	37,5	50,0
E _{20%} /ACN/7,5 μ L	0	10,0	47,5	50,0
E _{10%} /ACN/15 μ L	0	5,0	0	50,0
E _{20%} /ACN/15 μ L	0	5,0	5,0	50,0
E _{30%} /ACN/15 μ L	0	5,0	10,0	50,0
E _{40%} /ACN/15 μ L	0	5,0	15,0	50,0
E _{80%} /ACN/15 μ L	0	5,0	35,0	50,0
E _{5%} /ACN/20 μ L	2,5	0	2,5	100,0
E _{10%} /ACN/20 μ L	2,5	0	7,5	100,0
E _{15%} /ACN/20 μ L	2,5	0	12,5	100,0
E _{20%} /ACN/20 μ L	2,5	0	17,5	100,0
E _{25%} /ACN/20 μ L	2,5	0	22,5	100,0
E _{30%} /ACN/20 μ L	2,5	0	27,5	100,0
E _{40%} /ACN/20 μ L	2,5	0	37,5	100,0
E _{50%} /ACN/20 μ L	2,5	0	47,5	100,0
E _{60%} /ACN/20 μ L	2,5	0	57,5	100,0

(Oznaka raztopine vzorca: Oznaka nabora delež topila/vrsta topila/volumen injiciranja)

Preglednica VII: Priprava osnovnih raztopin saharoze z različnimi deleži topil (nabor F).

Raztopina vzorca	Masa saharoze [g]	Volumen ACN/MeOH [mL]	Volumen bučke [mL]
F _{5%} /MeOH/400	20,009	2,5	50,0
F _{10%} /MeOH/400	20,015	5,0	50,0
F _{23,5%} /MeOH/400	20,011	12,5	50,0
F _{40%} /MeOH/400	20,020	20,0	50,0
F _{5%} /ACN/400	40,061	5,0	100,0
F _{10%} /ACN/400	20,005	5,0	50,0
F _{23,5%} /ACN/320	16,024	12,5	50,0
F _{40%} /ACN/120	6,032	20,0	50,0

(Definicija oznake: oznaka nabora delež topila/vrsta topila/koncentracija saharoze [g/L])

Preglednica VIII: Priprava raztopin z različnimi deleži topil in saharoze (nabor G).

Vzorec	Oznaka raztopine saharoze	Volumen raztopine saharoze [mL]	Oznaka topila	Volumen bučke [mL]
G _{5%} /MeOH/360	F _{5%} /MeOH/400	9,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/320	F _{5%} /MeOH/400	8,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/280	F _{5%} /MeOH/400	7,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/240	F _{5%} /MeOH/400	6,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/200	F _{5%} /MeOH/400	10,0	T _{MeOH/5%}	20,0
G _{5%} /MeOH/160	G _{5%} /MeOH/200	8,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/120	G _{5%} /MeOH/200	6,0	T _{MeOH/5%}	10,0
G _{5%} /MeOH/80	F _{5%} /MeOH/400	4,0	T _{MeOH/5%}	20,0
G _{5%} /MeOH/40	F _{5%} /MeOH/400	2,0	T _{MeOH/5%}	20,0
G _{10%} /MeOH/360	F _{10%} /MeOH/400	9,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/320	F _{10%} /MeOH/400	8,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/280	F _{10%} /MeOH/400	7,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/240	F _{10%} /MeOH/400	6,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/200	F _{10%} /MeOH/400	10,0	T _{MeOH/10%}	20,0
G _{10%} /MeOH/160	G _{10%} /MeOH/200	8,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/120	G _{10%} /MeOH/200	6,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%} /MeOH/80	F _{10%} /MeOH/400	4,0	T _{MeOH/10%}	20

G _{10%} /MeOH/40	F _{10%} /MeOH/400	2,0	T _{MeOH/10%}	20
G _{23,5%} /MeOH/360	F _{23,5%} /MeOH/400	9,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/320	F _{23,5%} /MeOH/400	8,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/280	F _{23,5%} /MeOH/400	7,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/240	F _{23,5%} /MeOH/400	6,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/200	F _{23,5%} /MeOH/400	10,0	T _{MeOH/23,5%}	20
G _{23,5%} /MeOH/160	G _{23,5%} /MeOH/200	8,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/120	G _{23,5%} /MeOH/200	6,0	T _{MeOH/23,5%}	10,0
G _{23,5%} /MeOH/80	F _{23,5%} /MeOH/400	4,0	T _{MeOH/23,5%}	20,0
G _{23,5%} /MeOH/40	F _{23,5%} /MeOH/400	2,0	T _{MeOH/23,5%}	20
G _{40%} /MeOH/360	F _{23,5%} /MeOH/400	9,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/320	F _{23,5%} /MeOH/400	8,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/280	F _{23,5%} /MeOH/400	7,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/240	F _{23,5%} /MeOH/400	6,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/200	F _{23,5%} /MeOH/400	10,0	T _{MeOH/40%}	20,0
G _{40%} /MeOH/160	G _{40%} /MeOH/200	8,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/120	G _{40%} /MeOH/200	6,0	T _{MeOH/40%}	10,0
G _{40%} /MeOH/80	F _{23,5%} /MeOH/400	4,0	T _{MeOH/40%}	20,0
G _{40%} /MeOH/40	F _{23,5%} /MeOH/400	2,0	T _{MeOH/40%}	20,0
G _{5%} /ACN/360	F _{5%} /ACN/400	9,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/320	F _{5%} /ACN/400	8,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/280	F _{5%} /ACN/400	7,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/240	F _{5%} /ACN/400	6,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/200	F _{5%} /ACN/400	10,0	T _{ACN/5%}	20,0
G _{5%} /ACN/160	G _{5%} /ACN/200	8,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/120	G _{5%} /ACN/200	6,0	T _{ACN/5%}	10,0
G _{5%} /ACN/80	F _{5%} /ACN/400	4,0	T _{ACN/5%}	20,0
G _{5%} /ACN/40	F _{5%} /ACN/400	2,0	T _{ACN/5%}	20,0
G _{10%} /ACN/360	F _{10%} /ACN/400	9,0	T _{ACN/10%}	10,0
G _{10%} /ACN/320	F _{10%} /ACN/400	8,0	T _{ACN/10%}	10,0
G _{10%} /ACN/280	F _{10%} /ACN/400	7,0	T _{ACN/10%}	10,0
G _{10%} /ACN/240	F _{10%} /ACN/400	6,0	T _{ACN/10%}	10,0
G _{10%} /ACN/200	F _{10%} /ACN/400	10,0	T _{MeOH/10%}	20,0

G _{10%/ACN/160}	G _{10%/ACN/200}	8,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%/ACN/120}	G _{10%/ACN/200}	6,0	T _{MeOH/10%}	10,0
G _{10%/ACN/80}	F _{10%/ACN/400}	4,0	T _{MeOH/10%}	20,0
G _{10%/ACN/40}	F _{10%/ACN/400}	2,0	T _{MeOH/10%}	20,0
G _{23,5%/ACN/288}	F _{23,5%/ACN/320}	9,0	T _{ACN/10%}	10,0
G _{23,5%/ACN/256}	F _{23,5%/ACN/320}	8,0	T _{ACN/23,5%}	10,0
G _{23,5%/ACN/224}	F _{23,5%/ACN/320}	7,0	T _{ACN/23,5%}	10,0
G _{23,5%/ACN/192}	F _{23,5%/ACN/320}	6,0	T _{ACN/23,5%}	10,0
G _{23,5%/ACN/160}	F _{23,5%/ACN/320}	10,0	T _{ACN/23,5%}	20,0
G _{23,5%/ACN/128}	G _{23,5%/ACN/160}	8,0	T _{ACN/23,5%}	10,0
G _{23,5%/ACN/96}	G _{23,5%/ACN/160}	6,0	T _{ACN/23,5%}	10,0
G _{23,5%/ACN/64}	F _{23,5%/ACN/320}	4,0	T _{ACN/23,5%}	20,0
G _{23,5%/ACN/32}	F _{23,5%/ACN/320}	2,0	T _{ACN/23,5%}	20,0
G _{40%/ACN/84}	F _{40%/ACN/120}	7,0	T _{ACN/40%}	10,0
G _{40%/ACN/60}	F _{40%/ACN/120}	5,0	T _{ACN/40%}	10,0
G _{40%/ACN/36}	F _{40%/ACN/120}	3,0	T _{ACN/40%}	10,0
G _{40%/ACN/18}	F _{40%/ACN/120}	3,0	T _{ACN/40%}	20,0

(Definicija oznake: oznaka nabora delež topila/vrsta topila/koncentracija saharoze [g/L])

Preglednica IX: Priprava raztopin z viskoznostjo 2mPa·s in 4mPa·s (nabor H).

Vzorec	Volumen A _{ACN} [mL]	Volumen A _{MeOH} [mL]	Masa saharoze [g]	Volumen ACN [mL]	Volumen MeOH [mL]	V _{bučka} [mL]
H _{5%} /MeOH/2mPa·s	0	2,5	8,697	0	0	50,0
H _{10%} /MeOH/2mPa·s	0	2,5	6,996	0	2,5	50,0
H _{23,5%} /MeOH/2mPa·s	0	2,5	3,315	0	9,25	50,0
H _{40%} /MeOH/2mPa·s	0	2,5	0,694	0	22,5	50,0
H _{5%} /MeOH/4mPa·s	0	2,5	18,652	0	0	50,0
H _{10%} /MeOH/4mPa·s	0	2,5	17,224	0	2,5	50,0
H _{23,5%} /MeOH/4mPa·s	0	2,5	14,154	0	9,25	50,0
H _{40%} /MeOH/4mPa·s	0	2,5	11,963	0	22,5	50,0
H _{5%} /ACN/2mPa·s	2,5	0	9,353	0	0	50,0
H _{10%} /ACN/2mPa·s	2,5	0	8,848	2,5	0	50,0
H _{23,5%} /ACN/2mPa·s	2,5	0	8,558	9,25	0	50,0
H _{5%} /ACN/4mPa·s	2,5	0	19,021	0	0	50,0
H _{10%} /ACN/4mPa·s	2,5	0	18,493	2,5	0	50,0

(Definicija oznake: oznaka nabora delež topila/vrsta topila/ciljana viskoznost raztopine)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Izbor analitov in kromatografskih pogojev

Vodilo pri izboru modelnih molekul je bila podobnost v strukturi in razlika v lipofilnosti. Izbrali smo homologno vrsto parabenov (esterskih derivatov *p*-hidroksi benzojske kisline), ki se med seboj razlikujejo po dolžini alkilne verige. Dodali smo še fenol in resorcinol, ki sta v primerjavi s parabeni bolj hidrofilna analita zaradi hidroksilnih skupin na benzenskem obroču. Po lipofilnosti so razvrščeni v zaporedju: RES < FEN < MP < EP < PP. Razlika v logP je omogočala dobro ločbo na RP-HPLC koloni.

Z namenom preveritve retencije analitov v koloni pri različni sestavi MF smo uporabili več HPLC metod (Preglednica I) z različnimi deleži organskega modifikatorja (% B) v prvem izokratskem delu metode. Cilj je bil, da za vrednotenje oblike uporabimo dve metodi z različnima sestavama MF, pri katerih imata dva analita iz prve metode, podobno kapacitivnost kot analita, ki sta ovrednotena z drugo metodo. Po 5,5 minutah smo delež organskega modifikatorja zvišali na 40 %, da so se iz kolone eluirali tudi počasi eluirajoči analiti. Vsa injiciranja raztopin smo izvedli v več ponovitvah. Sprva smo vsako raztopino injicirali petkrat, nato pa smo zaradi dobre ponovljivosti, skrajšanja časa analiz in manjše porabe reagentov, raztopine injicirali trikrat (Preglednica X). Vsi rezultati so povprečja večkratnih injiciranj iste raztopine.

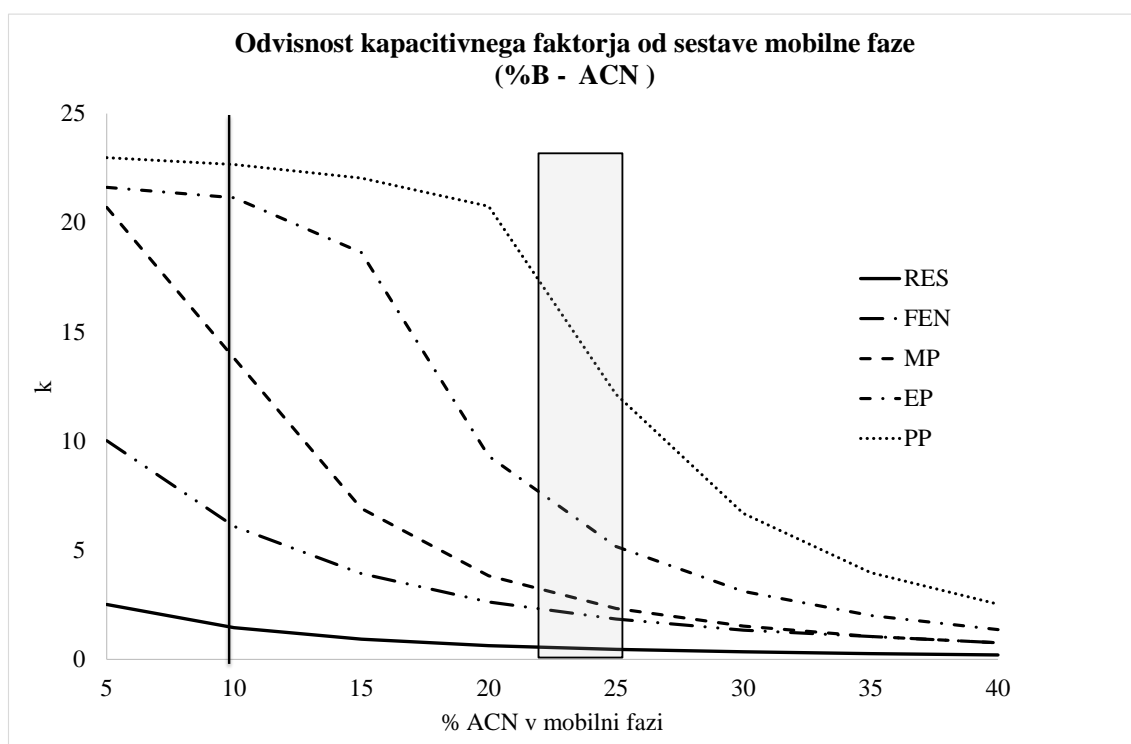
Preglednica X: Primer sipanja rezultatov petih in treh zaporednih injiciranj raztopine B_{ACN} za FEN, po metodi M₁₀.

Parametri	zaporedno število injiciranja					n=5			n=3		
	1	2	3	4	5	\bar{x}	SD	RSD [%]	\bar{x}	SD	RSD [%]
Retencijski čas [min]	1,92	1,91	1,91	1,91	1,91	1,91	0,00	0,07%	1,91	0,00	0,07%
Višina krom. vrha [mAU]	85,38	85,53	85,69	85,55	85,49	85,53	0,10	0,12%	85,53	0,12	0,15%
Površina krom. vrha [mAU*s]	327,54	328,45	327,37	328,64	328,75	328,15	0,58	0,00	327,79	0,47	0,00
Širina krom. vrha [min]	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00	0,11%	0,06	0,00	0,13%
Začetek krom. vrha [min]	1,83	1,83	1,83	1,83	1,82	1,83	0,00	0,15%	1,83	0,00	0,04%
Konec krom. vrha [min]	2,12	2,13	2,09	2,13	2,13	2,12	0,02	0,71%	2,11	0,02	0,75%
Simetrija krom. vrha	1,20	1,20	1,21	1,20	1,21	1,20	0,00	0,34%	1,20	0,00	0,38%
Repatost krom. vrha	1,27	1,27	1,28	1,28	1,28	1,27	0,00	0,19%	1,27	0,00	0,23%
Učinkovitost kolone	6205	6182	6213	6212	6183	6199	14	0,22%	6200	13	0,21%

Pri metodah z dvema izokratskima deloma (Preglednica I) smo uporabili raztopino B_{ACN}. Iz t_M in t_R analitov smo izračunali kapacitivnost (Enačba 1) in jih prikazali grafično na Sliki 10 v odvisnosti od deleža organskega topila v MF v prvem izokratskem delu metode. Izbrali smo

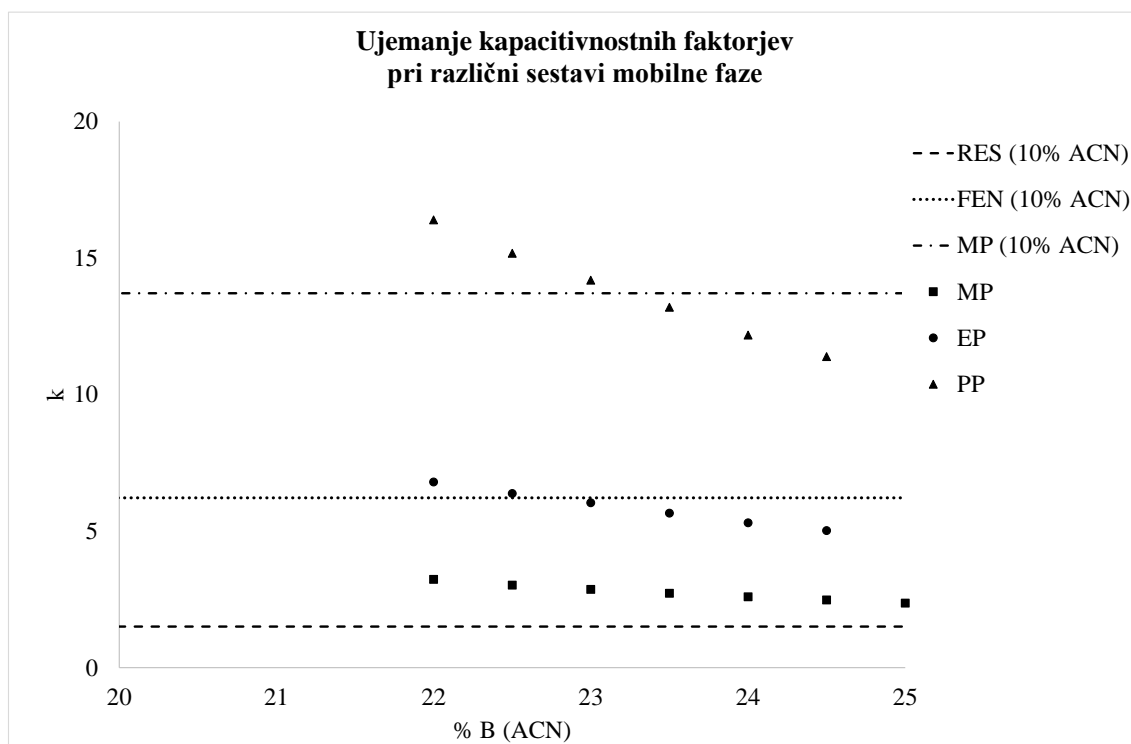
metodo M_{10} , s katero smo spremljali vpliv na obliko kromatografskih vrhov FEN in MP. Za vrednotenje oblike kromatografskih vrhov EP in PP z drugo metodo, smo na podlagi rezultatov ocenili, da je najprimernejša sestava MF (% B), v območju med 22 in 25 % ACN v MF. Na Sliki 10 je to območje označeno s pravokotnikom.

Na Sliki 10 so krivulje EP in PP pri nižjih deležih ACN v MF položnejše. Vzrok za to je, da so se analiti eluirali iz kolone v drugem izokratskem delu metode (40 % ACN). Z zviševanjem deleža organskega modifikatorja v MF so se postopoma spuščali v prvi izokratski del kromatograma, kjer se je razmerje med njimi ustalilo. Vsi analiti so se eluirali iz kolone v prvem delu metode pri 20 % deležu ACN v MF. Pri višjih deležih organskega modifikatorja so se krivulje kapacitivnostnih faktorjev začele združevati. To pomeni, da kromatografski vrhovi med seboj niso bili več ločeni. Podatki za izračun kapacitivnostnih faktorjev se nahajajo v Prilogi 1.



Slika 10: Prikaz kapacitivnostnih faktorjev analitov v odvisnost od sestave MF.

Da bi še natančneje določili delež organskega topila v MF, pri katerem se kapacitivnostni faktorji najbolje ujema, smo znotraj območja med 22 in 25 % spreminjali delež organskega modifikatorja v 0,5 odstotnih korakih (Preglednica II).



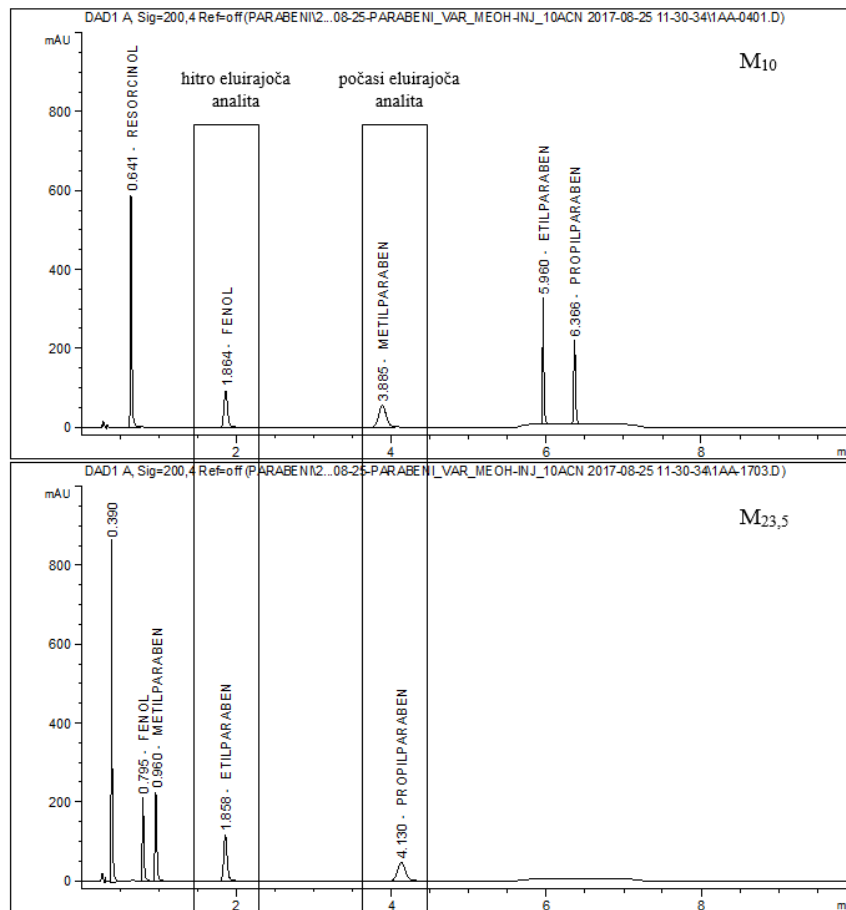
Slika 11: Ujemanje k_{FEN} , k_{MP} pri 10 % ACN v MF in k_{EP} , k_{PP} v MF z deleži ACN med 22 % in 25 %.

Prekinjene črte smo na Sliki 11 uporabili za prikaz vrednosti k_{RES} , k_{FEN} in k_{MP} po metodi M_{10} . Najboljše ujemanje k_{FEN} in k_{MP} pri 10 % ACN v MF smo za k_{EP} in k_{PP} dosegli pri 23,5 % ACN v MF.

Vrednost k hitro eluirajočih analitov: $k_{FEN} = 6,2 (M_{10}) \approx k_{EP} = 6,0 (M_{23,5})$

Vrednost k počasi eluirajočih analitov: $k_{MP} = 13,7 (M_{10}) \approx k_{PP} = 14,2 (M_{23,5})$

Na ta način smo pri različni sestavi MF dobili podobno retencijo dveh različnih analitov v koloni (kromatograma sta prikazana na Sliki 12). V nadaljnjih poskusih smo za vrednotenje različnih vplivov na obliko in položaj kromatografskih vrhov uporabili metodi M_{10} in $M_{23,5}$. Pri primerjavah z različno sestavo MF smo resorcinol izpustili, ker je najbolj polaren in se iz kolone eluira zelo hitro že pri nizkih deležih organskega modifikatorja v MF. Kljub temu smo spremljali obliko njegovega kromatografskega vrha, da smo lahko ocenili vpliv preučevanih parametrov oblike kromatografskih vrhov na zelo hitro eluirajoče analite.



Slika 12: Prikaz kromatogramov po M₁₀ in M_{23,5}.

4.2. Vpliv variabilne količine topila v injiciranem vzorcu

Z metodama (M₁₀ in M_{23,5}) smo vrednotili vpliv sestave vzorcev, ki so se med seboj razlikovali po vrsti in količini topila (nabor D). S tem smo želeli potrditi našo prvo hipotezo o vplivu količine organskega topila v vzorcu na obseg popačenja oblike kromatografskega vrha. Spremljali smo vpliv na naslednje parametre:

- retencijski čas kromatografskega vrha (t_R),
- površina kromatografskega vrha,
- širina kromatografskega vrha na polovici višine ($W_{1/2}$),
- višina kromatografskega vrha (h),
- repatost (T_f),
- simetrija kromatografskega vrha (A_s),
- učinkovitost kolone (N).

Vplive nanje smo razporedili glede na stopnjo spremembe:

- brez vpliva (sprememba manjša od 5 %),
- manjši vpliv (med 5 in 20 %),
- velik vpliv (več kot 20 % in manj ali enako 50 %),
- zelo velik vpliv (več kot 50 %) .

Za parameter površine kromatografskega vrha, ki je ključen za vrednotenje količine raztopljenega analita pri RP-HPLC, smo postavili strožje pogoje:

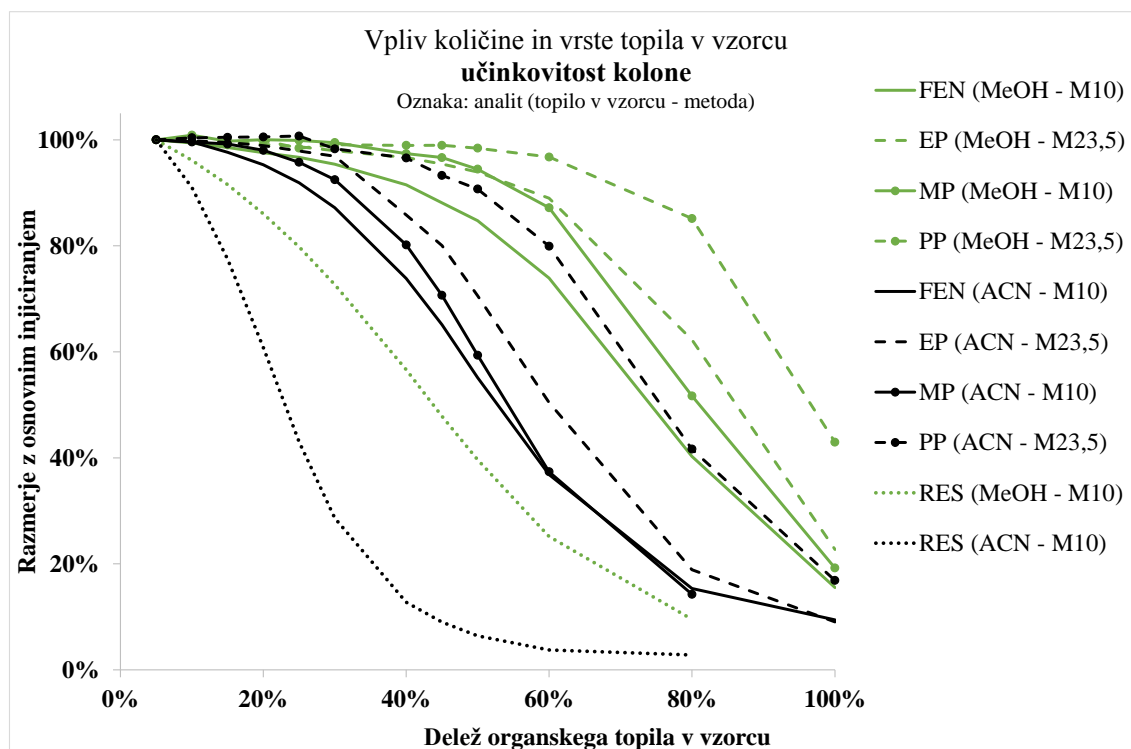
- brez vpliva (sprememba manjša ali enaka 1,0 %),
- manjši vpliv (sprememba med 1,0 in 2,0 %),
- velik vpliv (sprememba večja od 2,0 %).

Mejo brez vpliva smo postavili na 1,0 %, ker to predstavlja sprejemljivo območje natančnosti priprave raztopin. Primerjavo smo ovrednotili kot razmerje vrednosti posameznih parametrov raztopin z njihovimi vrednostmi pri raztopini vzorca $D_{5\%}/ACN/10\mu L$ za ACN in $D_{5\%}/MeOH/10\mu L$ za MeOH. Primerjali smo jih torej z vzorcem, ki vsebuje v naboru najmanjšo količino organskega topila. Volumen injiciranja se med vzorci ni razlikoval (10 μL). Eksperimentalni podatki, na osnovi katerih smo preučili vpliv količine in vrste topila na obliko kromatografskega vrha, se nahajajo v Prilogi 2.

Preglednica XI: Vpliv deleža organskega topila v injiciranem vzorcu na parametre oblike in položaja kromatografskega vrha.

Parameter	Stopnja vpliva	Največja vrednost spremembe
t_R	ni vpliva	1,8 %
h	zelo velik vpliv	65,8 %
površina kromatografskega vrha	zelo velik vpliv	2,6 %
$W_{1/2}$	zelo velik vpliv	328,8 %
A_s	velik vpliv	43,1 %
T_f	velik vpliv	44,4 %
N	zelo velik vpliv	90,9 %

V Preglednici XI so povzete stopnje vpliva glede na postavljene kriterije in navedene največje spremembe za posamezen parameter, spremljan pri analitih FEN, MP, EP, PP. Iz preglednice je razvidno, da ima organsko topilo zelo velik vpliv na večino parametrov, ki smo jih spremljali. Vpliva nismo zaznali le na parametru t_R , ki opisuje položaj kromatografskega vrha. Rezultati vpliva vrste in količine topila na občutljive parametre (vse preučevane parametre razen t_R) so prikazani grafično na Sliki 13 in v Prilogi 3.



Slika 13: Vpliv vrste in količine organskega topila v vzorcu na N pri različnih pogojih MF.

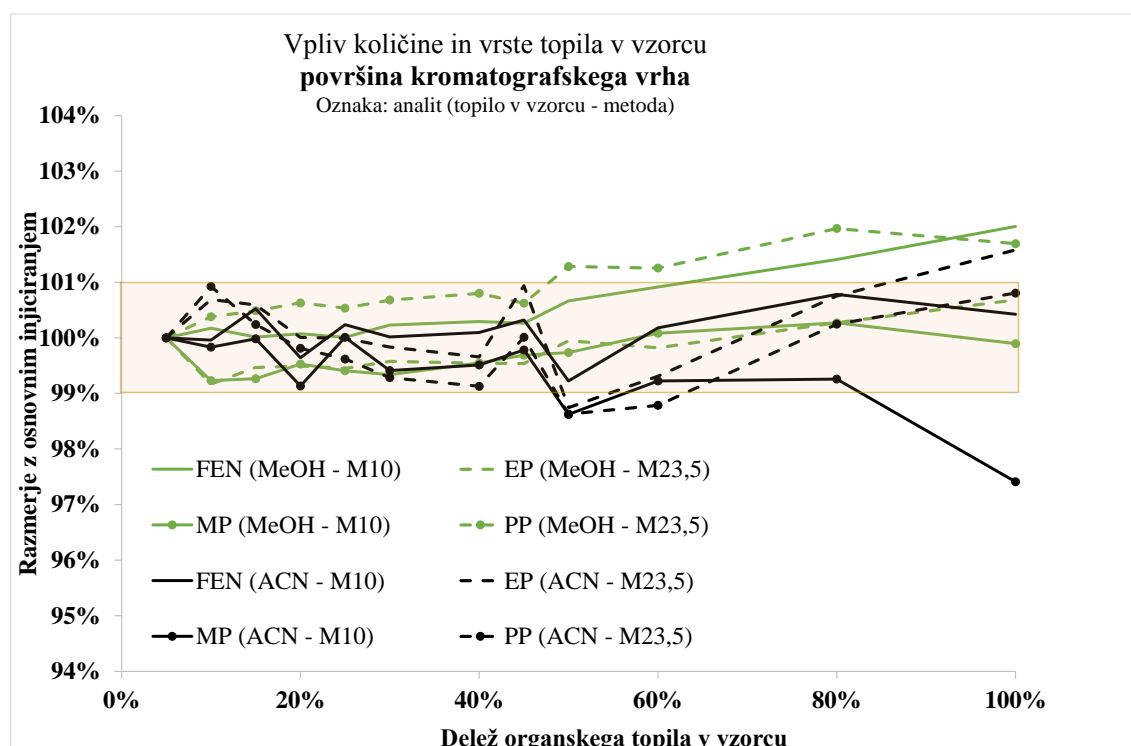
Na Sliki 13 opazimo hitrejše popačenje hitro eluirajočih analitov in je močnejše izraženo pri ACN (črne krivulje), ki je v primerjavi z MeOH (zelene krivulje) močnejši eluent. Prikazanemu grafu smo dodali tudi krivulji vpliva uporabe različnih topil na zelo hitro eluirajoč analit RES (po M_{10}), kateremu učinkovitost s količino organskega topila v vzorcu najhitreje pade. Dlje časa kot se analit zadržuje v koloni (MP in PP sta na koloni dlje časa kot FEN in EP), večjo kapacitivnosti ima pri danih pogojih MF.

Mobilna faza ima prav tako pomemben vpliv. Parametri oblike kromatografskih vrhov se kasneje popačijo pri višjih deležih ACN v MF ($M_{23,5}$). Ključnega pomena pri obsegu popačenja oblike kromatografskega vrha je ravno razlika v kapacitivnostih analita v MF napram kapacitivnosti analita v topilu, v katerem je injiciran. Če uporabimo MF z večjim deležem organskega modifikatorja, večji delež organskega topila lahko vzorec vsebuje, vse dokler je kapacitivnost analita v topilu vzorca večja. V tem primeru bo imela MF večjo elucijsko moč kot območje topila vzorca in analit ne bo dolgo potoval vzdolž kolone v njegovem območju (Slika 7). V primeru naših metod z različnim deležem organskega modifikatorja to pomeni, da bo imel vzorec v primeru M_{10} večjo kapacitivnost v primeru injiciranja v topilu z manj kot 10 odstotnim deležem ACN, v primeru $M_{23,5}$ pa v primeru injiciranja v topilu z manj kot 23,5 % ACN. Če v topilu vzorca uporabimo organsko topilo, ki je enako organskemu modifikatorju v MF, to lažje ocenimo (z večjim deležem organskega modifikatorja se kapacitivnost zmanjšuje). V primeru različnih organskih topil, uporabljenih v MF in vzorcu, je potrebno preveriti elucijsko moč in lastnosti organskega topila v vzorcu in skladno s tem prilagoditi metodo in sestavo vzorca za injiciranje.

Mnogo literaturnih virov navaja (npr. 3, 20), da je najbolj zaželeno, da je topilo v vzorcu po sestavi enako MF. Iz pregledov natančnih vrednosti vseh parametrov smo opazili, da so vrednosti pri manjših deležih organskega topila v vzorcu, kot je v MF, bližje idealni obliki kromatografskega vrha ali enaki vrednostim parametrov oblike kromatografskega vrha, kot v primeru injiciranja v MF. Vpliv se v večji meri izrazi pri hitro eluirajočih analitih. Idealnejšo obliko v primeru injiciranja v topilu vzorca z manjšo elucijsko močjo pripisujemo bolj simetričnemu kromatografskemu vrhu, kar je posledica večje količine analita na samem začetku kromatografskega vrha zaradi bolj skoncentriranega analita v koloni, kjer poleg repatosti dobimo še desno asimetrijo (ang. »*fronting*«). To pripisujemo predvsem večji interakciji analita z medfazo v primeru injiciranja vzorca z manjšo elucijsko močjo od MF. Manjša elucijska moč topila vzorca v primerjavi z elucijsko močjo MF omogoča boljše koncentriranje molekul analita

na začetku kolone, nato pa jih s skupne točke začne MF eluirati vzdolž kolone. Topilo vzorca se zaradi večje hidrofilnosti v primerjavi z MF hitreje odplavi iz kolone.

Ključni parameter predstavlja površina kromatografskega vrha, ki je odraz količine analita injiciranega v kolono. Zelo pomembno je, da pogoji analize ali sestava vzorca ne povzročita napak v integraciji površine. Manjši vpliv na površino smo zaznali pri 50 odstotnem deležu organskega topila v vzorcu, medtem ko smo večje odstopanje (več kot 2 %) opazili le v enem primeru, in sicer pri 100 odstotnem deležu organskega topila v vzorcu.

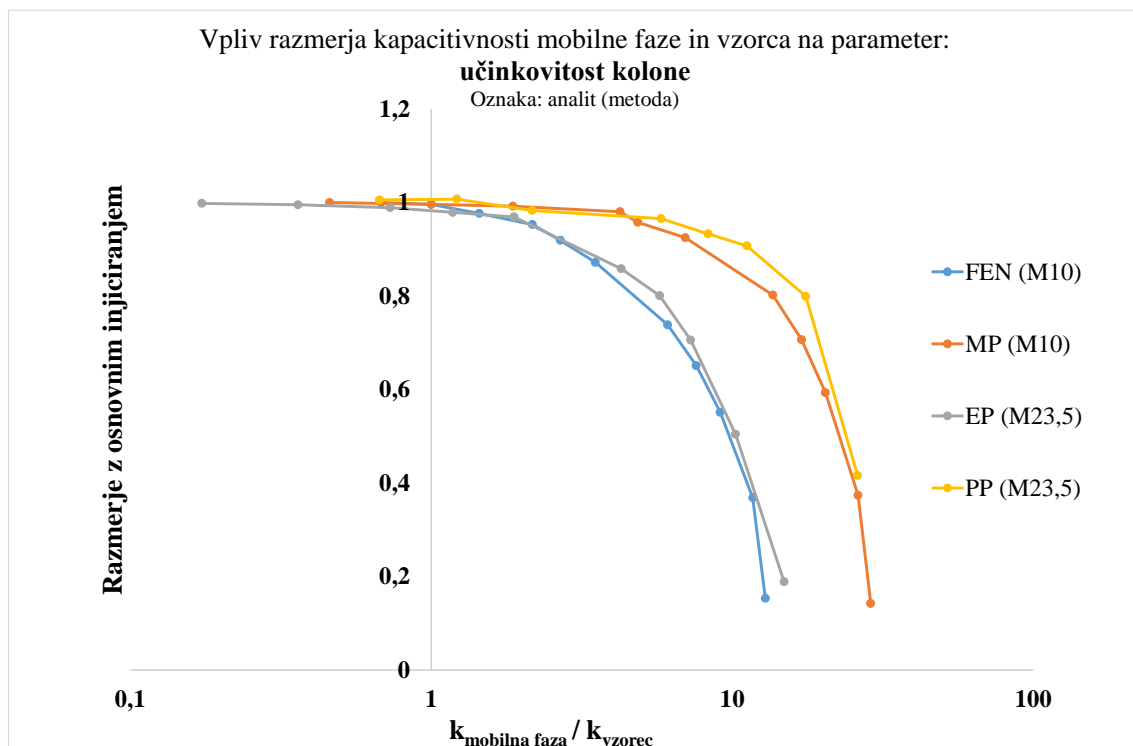


Slika 14: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na površino kromatografskega vrha.

Vplivi na ostale parametre so prikazani na slikah, priloženih v Prilogi 3. Vpliv nanje je različno velik, razmerje in učinek pa sta podobna kot na Sliki 13. Na parametra A_s in T_f smo zaznali velik vpliv, kljub temu pa so bile njune vrednosti med 0,5 in 2 pri vseh injiciranjih, kar naj ne bi povzročalo napak pri integraciji površine kromatografskega vrha. Vrednosti A_s in T_f so s povčevanjem deleža topila v vzorcu padale. To pomeni da je prišlo do tako imenovane desne asimetrije kromatografskega vrha (ang. »frontinga«). Topilo v vzorcu z večjo elucijsko močjo je povročilo odplavljanje molekul analita vzdolž kolone.

4.2.1. Vpliv topila vzorca na kapacitivnost

Z metodami, povzetimi v Preglednici III smo določili kapacitivnost uporabljenih analitov pri posamezni sestavi vzorca z namenom, da bi izničili vpliv razlik v lipofilnosti analitov in vpliv sestave MF. Poskus smo izvedli z uporabo ACN v vzorcu in v MF. Sestavo MF smo spreminjali, kot smo variirali količino organskega topila v vzorcu. Potrditi smo želeli, da enako razmerje kapacitivnosti (MF napram topilo vzorca) pomeni enako stopnjo popačenja kromatografskega vrha. To nam je omogočilo, da smo stopnjo popačenja kromatografskega vrha lahko primerjali med seboj glede na razliko v kapacitivnosti vzorca in MF ne glede na analit in sestavo MF. Vpliv razmerja kapacitivnosti analitov v MF in kapacitivnosti v topilu vzorca na učinkovitost kolone je prikazan na Sliki 15. Vpliv na vse ostale parametre, ki smo jih spremljali, pa je prikazan na slikah v Prilogi 4.



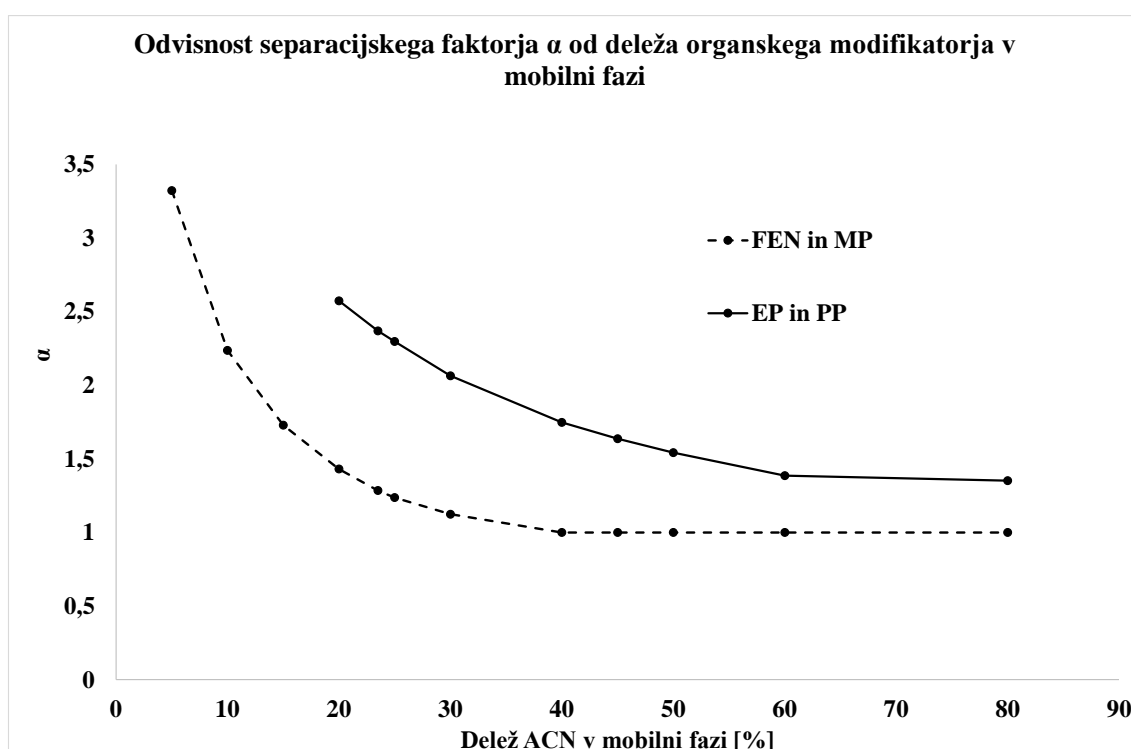
Slika 15: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem topila vzorca na učinkovitost kolone.

Pri manjši kapacitivnosti analita v topilu vzorca pride do velikega padca učinkovitosti kolone. Pri kapacitivnosti vzorca, ki je večja ali enaka MF, vpliva na učinkovitost kolone ni. To dejstvo potrjuje teorijo, da pride do popačenja kromatografskega vrha analita takrat, ko je analit injiciran v topilu z večjo elucijsko močjo od MF, ki povzroči manjšo retencijo analita na SF. Krivulje na grafu so se razporedile v dve skupini. Modra in siva krivulja predstavljata analita,

ki se pri metodi M_{10} (FEN) in $M_{23,5}$ (EP) eluirata prej v primerjavi z MP in PP – sta hitro eluirajoča analita (FEN in EP). Rumena in oranžna krivulja pa pripadata počasi eluirajočima analitoma, ki sta vrednotena po M_{10} (MP) in $M_{23,5}$ (PP). Pri hitro eluirajočih analitih pride do pojava popačenja prej, saj je retencija na koloni zaradi manjše lipofilnosti analitov manjša.

4.2.2. Vpliv topila vzorca na selektivnost

Kapacitivnost analita je ključna za ustrezno selektivnost med dvema analitoma. Da bi preverili vpliv na α med hitro in počasi eluirajočim analitom pri metodi M_{10} (FEN in MP) in $M_{23,5}$ (EP in PP), smo razmerje njihovih kapacitivnostnih faktorjev prikazali v odvisnosti od sestave MF.

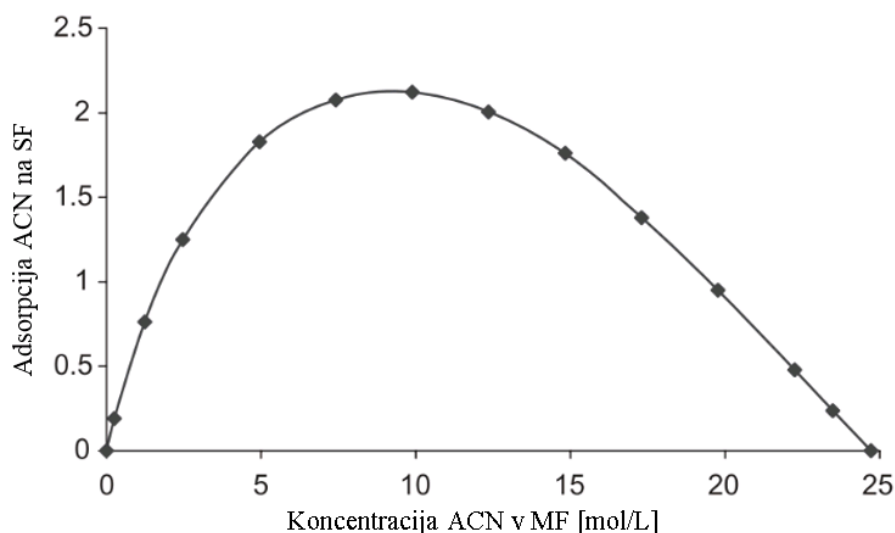


Slika 16: Odvisnost separacijskega faktorja od sestave MF.

Na Sliki 16 najprej opazimo nelinearen odziv separacijskih faktorjev glede na spremembo sestave MF. Gilpin s sodelavci (49) poroča o tem, da linearno odvisnost separacijskih faktorjev pri metilenski selektivnosti (analitih, ki se med seboj razlikujejo v dolžini alkilne verige) lahko pričakujemo le v primeru MeOH, v primeru uporabe ACN ali THF v MF pa je ta odziv nelinearen. Številne raziskave so dokazale, da se organski modifikator adsorbira med molekule, vezane na osnovne delce SF in tako tvori medfazo, sestavljeno iz organskega modifikatorja MF in molekul vezanih na osnovne delce SF. Pri retenciji analitov je pomemben mehanizem razporejanja molekul analita med MF in SF kot tudi adsorpcija organskega modifikatorja na SF. Slednji mehanizem navajajo kot ključni oziroma dominantni vpliv retencije pri RP-HPLC.

Znotraj kolone so torej pomembna 3 območja: SF, MF in medfaza, ki jo predstavlja na molekule, s katerimi je derivatizirana SF, adsorbiran organski modifikator. Razmerje vodnega in organskega dela MF ob SF je torej precej drugačno od razmerja MF, ki teče skozi kolono. Na tej točki je potrebno poudariti, da se zaradi adsorpcije organskega modifikatorja na SF, sestava MF v uravnoteženi koloni bistveno ne spremeni. Razmerje med površino SF, volumnom kolone in adsorbirane količine na SF je zanemarljivo majhno. Razlika v deležu organskega modifikatorja v MF in medfazi pa je lahko precej velika. ACN in THF izkazujeta večjo adsorpcijo na SF v primerjavi z MeOH. Slednji naj bi se na površino SF adsorbiral le v eni plasti, medtem ko je adsorpcija THF in ACN večplastna (50). To je najverjetnejši vzrok bolj linearnega odziva separacijskega faktorja analitov na sestavo MF v primeru MeOH v primerjavi z ACN in THF.

To pa še vedno ne pojasni različnih razmerij med krivuljami separacijskih faktorjev naših analitov na Sliki 16 (krivulji nista vzporedni). Opazimo, da se razmerje med separacijskimi faktorji spreminja v odvisnosti od sestave MF. Slika 17 prikazuje odvisnost adsorbiranega ACN na površino SF v odvisnosti od sestave MF. Krivulja ima obliko parabole z maksimalno debelino adsorbiranega sloja pri koncentraciji ACN v MF približno 10 mol/L.



Slika 17: Adsorpcija ACN na površino SF v odvisnosti od sestave MF (povzeto po viru 2).

Dejstvo, da je adsorpcija organskega modifikatorja na SF odvisna od sestave MF, razloži razliko v razmerjih med separacijskimi faktorji pri različni sestavi MF (na Sliki 16 krivulji nista vzporedni). Sestava MF torej vpliva na sestavo in lastnosti medfaze, ta pa ima ključno vlogo pri separaciji analitov v kromatografski koloni.

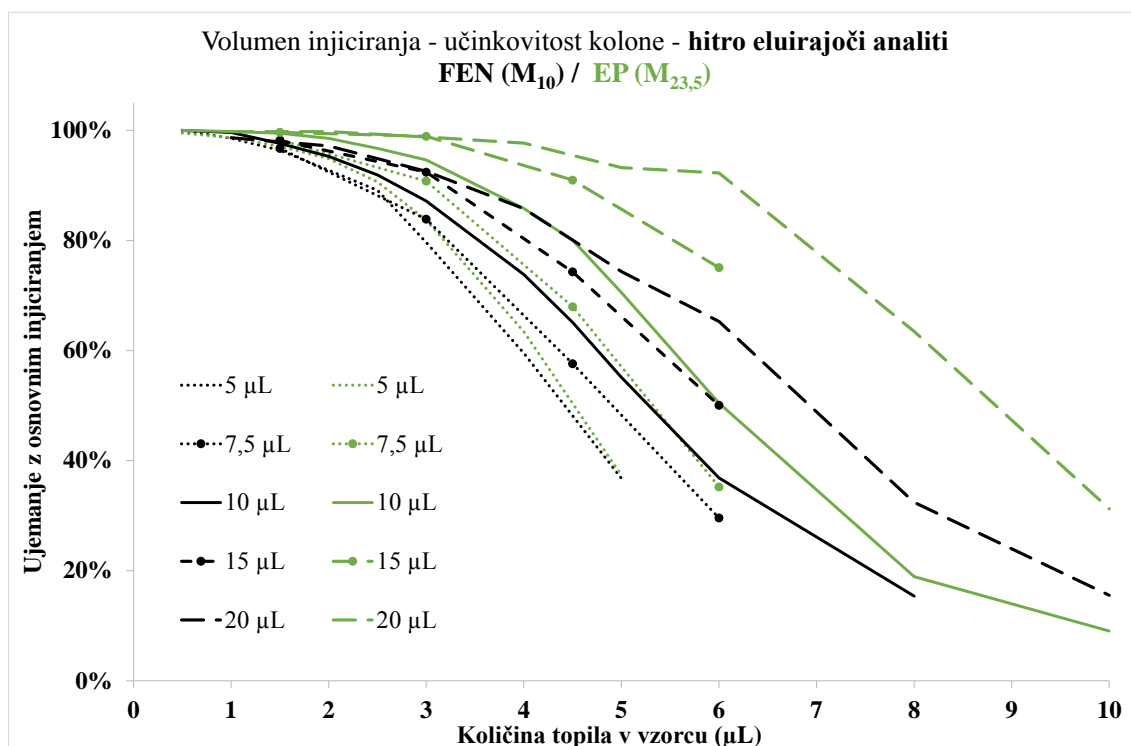
Rezultati, predstavljeni v poglavjih 4.2. so tako potrdili našo prvo hipotezo. S količino in vrsto organskega topila močno vplivamo na popačenje oblike kromatografskega vrha. Kromatografski vrh bo imel pravilnejšo obliko, če bo injiciran v topilu z manj organskega topila oz. v topilu z manjšo elucijsko močjo od MF.

4.3. Vpliv volumna injiciranja na obliko kromatografskega vrha.

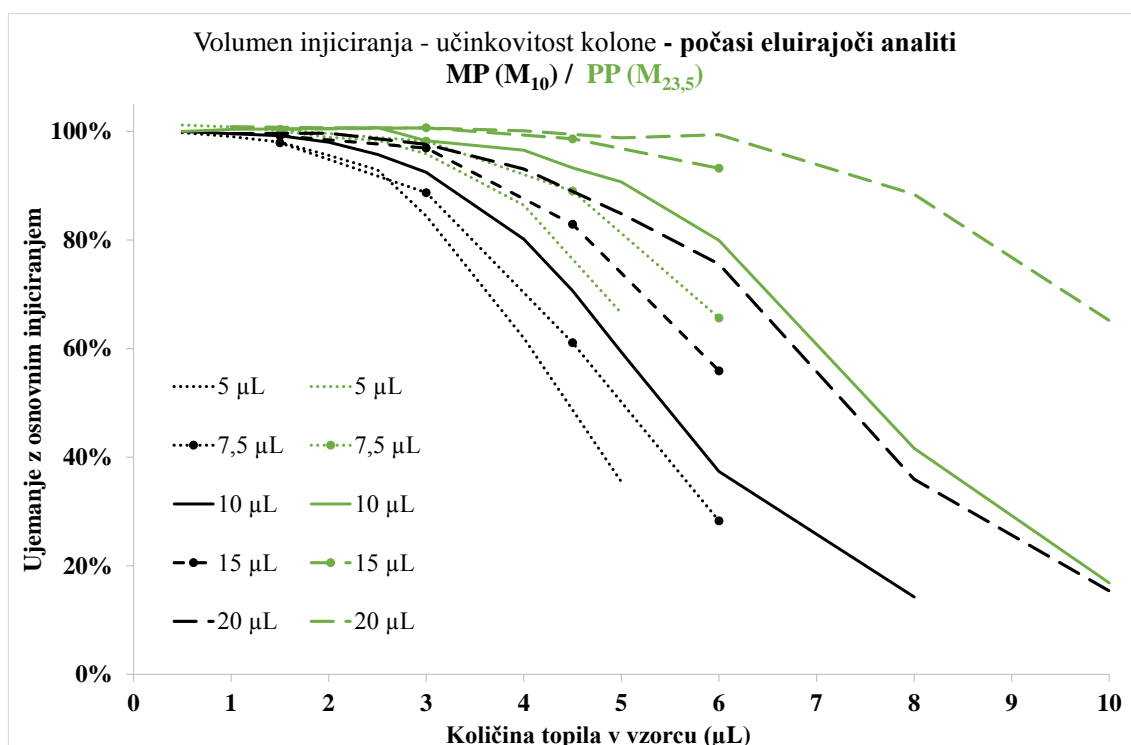
V naslednjih poskusih smo spreminjali količino organskega topila v injiciranem vzorcu in volumen injiciranja. Z njimi smo želeli potrditi našo drugo hipotezo, v kateri smo zapisali, da z manjšim volumnom injiciranja ali z večjim volumnom bolj redčenega vzorca zmanjšamo vpliv popačenja kromatografskega vrha.

Analizirali smo nabor raztopin E in del nabora D (D_{ACN} - vzorci pripravljene z ACN). Rezultati so priloženi v Prilogi 5. Injiciranje 10 μL vzorca je predstavljalo osnovno injiciranje, ostala injiciranja pa so bila manjša (5 in 7,5 μL) ali večja (15 in 20 μL). Rezultati so predstavljeni kot ujemanje vrednosti posameznih parametrov raztopin z vrednostjo osnovnega injiciranja (10 μL) z najmanjšim deležem topila v vzorcu ($D_{5\%/ACN/10\mu\text{L}}$). Kriteriji popačenja oblike kromatografskega vrha so enaki, kot smo jih določili v poglavju 4.2. Rezultati vpliva na učinkovitost kolone so prikazani z ločenima slikama za hitro eluirajoča (Slika 18) in počasi eluirajoča analita (Slika 19), uporabljeni metodi pa sta na slikah barvno ločeni (črne krivulje za M_{10} in zelene za $M_{23,5}$). Ostali rezultati so podani v preglednicah v Prilogi 6.

V primeru injiciranja 10 μL predstavljata 20 odstotni delež organskega topila v vzorcu 2 μL , v primeru 5 μL predstavljata 2 μL organskega topila 40 odstotni delež. Z različnimi volumni injiciranja smo ovrednotili pomen redčenja / koncentriranja vzorcev. Rezultati kažejo na to, da se pri večjem volumnu injiciranja bolj razredčenega vzorca (manjši delež organskega topila) parametri oblike kromatografskega vrha popačijo kasneje. Če primerjamo 80 % delež topila (8 μL) pri 10 μL injiciranju in 80 % delež pri 5 μL injiciranju (4 μL) opazimo manjše popačenje parametrov pri manjšem volumnu injiciranja. To pomeni, da je v primeru, ko raztopine ne moremo redčiti in še nismo na meji kvantifikacije analita, bolje injicirati čim manj vzorca, saj je območje topila v koloni manjše in se lahko hitreje zmeša z mobilno fazo. Redčenje vzorca je smiselno, ko smo na meji kvantifikacije in nam večji volumen injiciranja bolj razredčenega vzorca omogoča enak ali večji nanos mase analita v kolono. Z rezultati smo tako potrdili tudi našo drugo hipotezo.



Slika 18: Vpliv volumna injiciranja na učinkovitost kolone za hitro eluirajoča analita po metodi M_{10} in $M_{23,5}$.



Slika 19: Vpliv volumna injiciranja na učinkovitost kolone za počasi eluirajoča analita po metodi M_{10} in $M_{23,5}$.

Ponovno je izražen nelinearen odziv parametra oblike kromatografskega vrha na koncentracijo topila v vzorcu, ki je posledica razlik v kapacitivnosti analitov v topilu vzorca in kapacitivnostjo analitov v MF. Dokler je kapacitivnost MF manjša od kapacitivnosti topila vzorca, vpliva na naše preučevane parametre oblike ni bilo, ko pa je kapacitivnost analita v topilu vzorca manjša kot v MF, začne krivulja strmo in nelinearno padati, kar je posledica nelinearne odvisnosti retencije analita od elucijske moči topila vzorca.

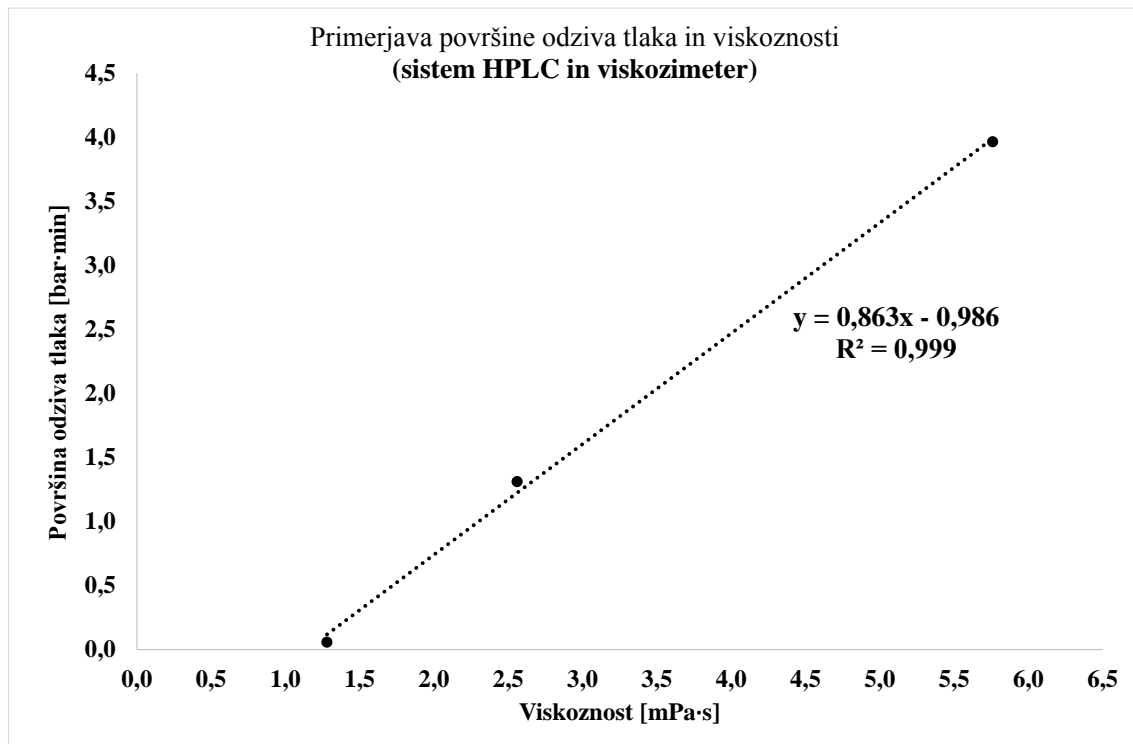
4.4. Vpliv viskoznosti na obliko kromatografskega vrha

Ekperimentalni del, predstavljen v tem poglavju, smo izvedli z namenom, da potrdimo ali ovržemo tretjo hipotezo, v kateri smo navedli, da različne viskoznosti, ki jih povzročajo vodne mešanice (Slika 3) pogosto uporabljenih organskih topil, niso vzrok popačenja kromatografskega vrha. Predstavljena je tudi optimizacija metode za merjenje dinamične viskoznosti s sistemom HPLC in korelacija teh rezultatov z meritvami viskoznosti z rotirajočim viskozimetrom. Pri vrednotenju vpliva viskoznosti smo za oceno stopnje spremembe uporabili enake kriterije, kot so navedeni v poglavju 4.2.

Za spremljanje vpliva viskoznosti na obliko kromatografskega vrha smo pripravili nabor raztopin F. Pri raztopinah saharoze s koncentracijo 400 g/L v 40 % in 23,5 % ACN smo dobili dvofazni sistem, zato smo pripravili koncentracijo sladkorja, pri kateri do ločitve faz ni prišlo – 120 g/L v 40 % ACN in 320 g/L za 23,5 % ACN. Z raziskavami na področju »sugaring-out« efekta za raztopine saharoze v vodnih mešanicah ACN so dokazali (51), da se nad kritično koncentracijo sladkorjev (monosaharidov in disaharidov) inducira nastanek dvofaznega sistema. Ločita se vodna faza s sladkorji in faza z ACN in manjšim deležem vode.

Raztopinam F_{5%/ACN/400}, G_{5%/ACN/200} in T_{5%/ACN} smo izmerili dinamično viskoznost z rotirajočim viskozimetrom. Meritve so nam omogočile izračun korelacije med odzivi tlakov izmerjenih s sistemom HPLC in dejansko viskoznostjo. Meritve z viskozimetrom smo izvedli pri konstantni temperaturi 20 °C z vretenom ULA, ki je namenjeno merjenju viskoznosti tekočin z nizko viskoznostjo (do 2000 mPa·s). Za izvedbo meritve je bilo potrebnega 16 mL vzorca. Dobljene vrednosti smo primerjali z odzivi tlaka, ki smo jih ob injiciranju istih raztopin izmerili s sistemom HPLC in preverili linearnost odzivov. Slika 20 prikazuje graf, na katerega smo na abscisno os nanegli viskoznosti izmerjene z viskozimetrom, na ordinatno os pa površino odziva tlaka istih raztopin izmerjenega s sistemom HPLC. Postopek izračuna površine odziva tlaka je razložen v nadaljevanju. Na ta način smo pridobili enačbo premice linearne odvisnosti med

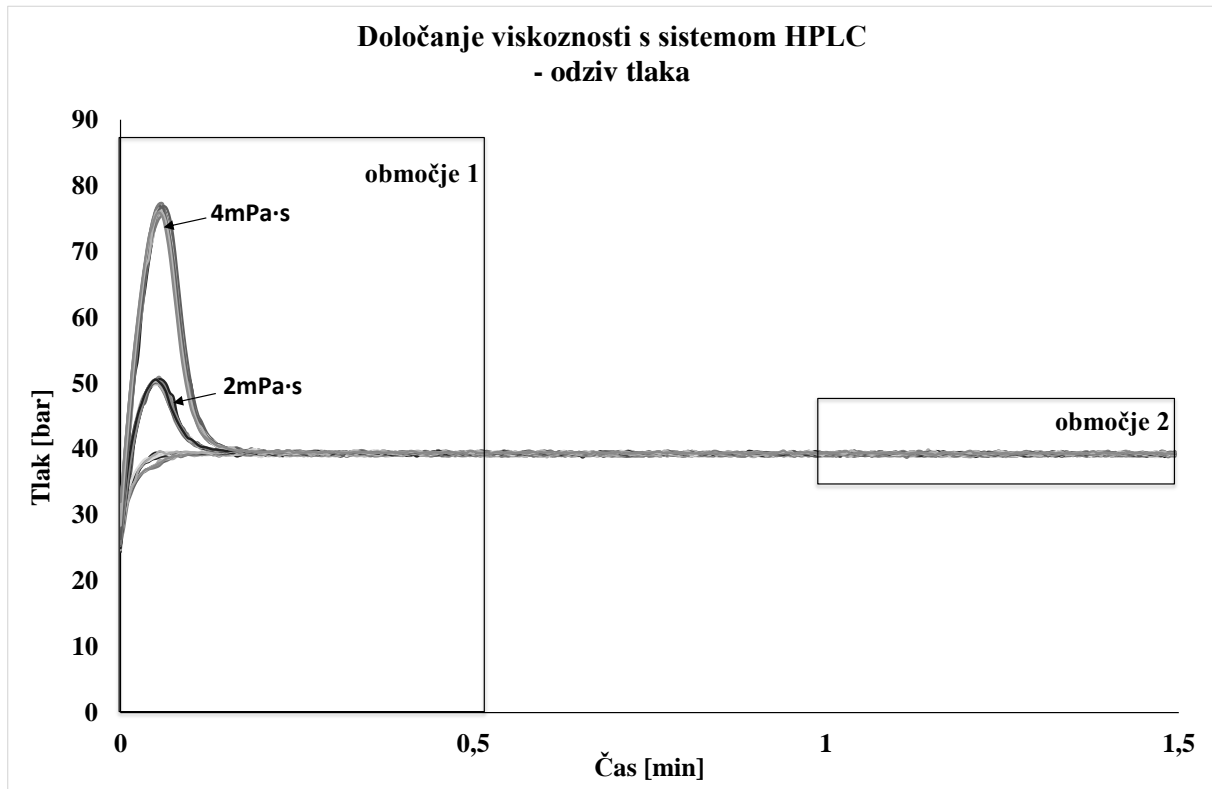
viskoznostjo in površino pod krivuljo tlaka. Enote bar·min smo pretvorili v miliPascal sekunde (mPa·s). Rezultati meritev so povzeti v Prilogi 7.



Slika 20: Korelacija viskoznosti z meritvami tlaka na sistemu HPLC.

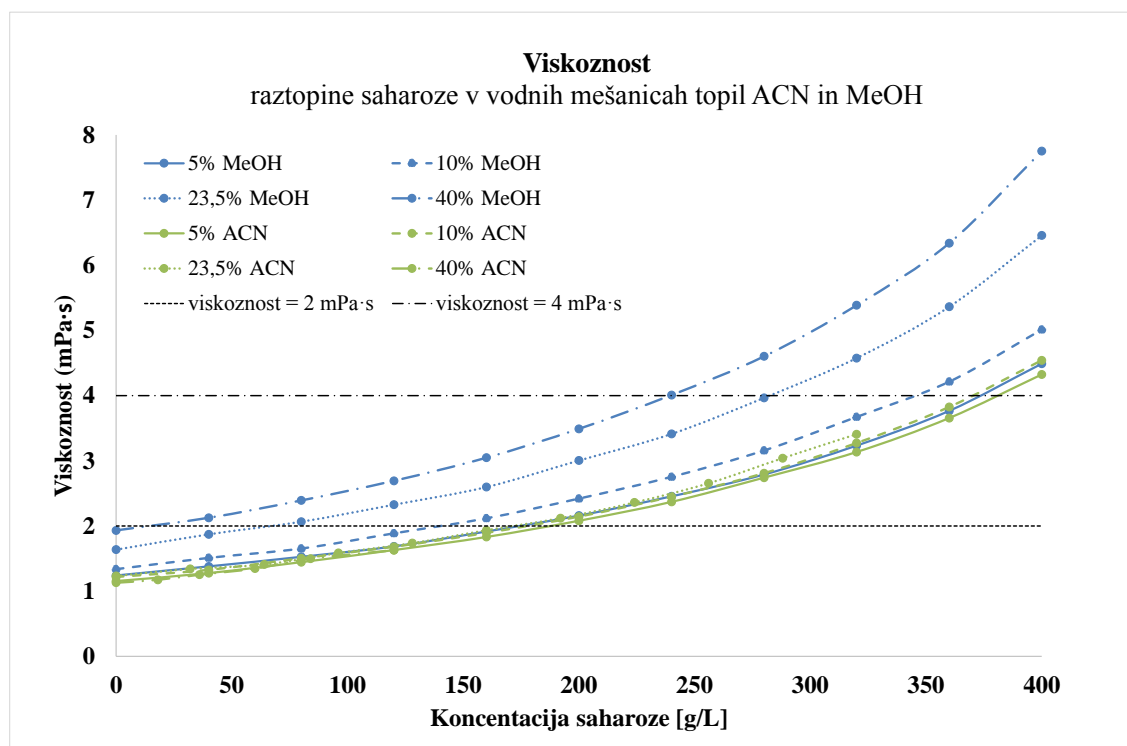
Pri vrednotenju viskoznosti s sistemom HPLC smo spremljali odziv tlaka ob injiciranju raztopin z različno viskoznostjo. V zadnjem poglavju uvoda smo povzeli članek (27), v katerem so avtorji opisali postopek meritve viskoznosti s sistemom HPLC. V nasprotju z njimi, ki so z namenom, da ustvarijo ustrezen upor tekočine, injicirali raztopine v dolgo tanko kovinsko cevko, smo mi uporabili predkolono, ki je ustvarila ustrezen upor in posledično večji odziv tlaka. Raztopine z različnimi koncentracijami raztopljene saharoze in organskimi topili smo injicirali trikrat po metodi povzeti v Preglednici IV. Injicirali smo tudi MF, katere odziv smo nato upoštevali v izračunu. Po končani analizi smo iz programske opreme za nadzor sistema HPLC OpenLAB CDS (Rev. C.01.05 [51]) izvozili podatke o tlakih (meritev tlaka je bila izvedena vsakih 5 tisočink minute - skupno 300 meritev tlaka na paralelko) za vsako injiciranje posebej. S pomočjo programa Microsoft Excel® smo iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje bazne linije (območje 2 na Sliki 21) iz vrednosti tlaka v območju med 1,0 min in 1,5 min. Z integracijo po trapezni metodi smo izračunali površino med povprečno vrednostjo bazne linije in krivuljo tlaka od 0,0 min do 0,5 min (območje 1). Vrednostim v tem območju smo odšteli

odziv tlaka MF in izračunali prirast površine pod krivuljo v primerjavi z MF. Upoštevali smo tudi prve točke odziva tlaka, kjer je krivulja tlaka nekaj časa nižja od bazne linije.



Slika 21: Odziv tlaka ob injiciranju vzorca in prikaz območij za izračun prirasta tlaka.

S pomočjo enačbe premice in integracijo vseh površin pod krivuljami odzivov tlakov ob injiciranju raztopin iz nabora G smo pridobili viskoznosti vseh raztopin. Prikazane so na Sliki 22.



Slika 22: Odvisnost viskoznosti od koncentracije saharoze in vrste topil.

Pridobili smo podatke o pripravi raztopin z enako viskoznostjo in različnim deležem organskega topila ter raztopine z enakim deležem topila in različno viskoznostjo, ki je posledica različnega deleža raztopljenega sladkorja. S 40 odstotnim deležem ACN ni bilo mogoče doseči viskoznosti 2 mPa·s in 4 mPa·s. Raztopina s 23,5 % ACN in koncentracijo saharoze 320 g/L pa ni zadoščala za pripravo raztopine z viskoznostjo 4 mPa·s. Na Sliki 22 opazimo, da so si raztopine, pripravljene z različnimi deleži ACN, med seboj v viskoznosti zelo podobne. Opazimo manjše naraščanje do 23,5 % ACN, pri 40 % ACN pa je viskoznost od vseh pripravljenih mešanic najnižja, kar je skladno s podatki iz literature in Sliko 3.

Pripravili smo raztopine (nabor H) z viskoznostima različnima za faktor 2 (2 mPa·s in 4 mPa·s), le da smo tokrat dodali še analite in spremljali vpliv na obliko in položaj njihovih kromatografskih vrhov v odvisnosti od deleža in vrste topila ter viskoznosti injiciranega vzorca. Za potrditev, da smo dosegli želene viskoznosti, smo ponovno izmerili viskoznost raztopin s sistemom HPLC. Parametre oblike kromatografskih vrhov smo ovrednotili z obema metodama M_{10} in $M_{23,5}$.

Preglednica XII: Viskoznost pripravljenih raztopin ovrednotenih s sistemom HPLC.

Vzorec	Viskoznost določena s sistemom HPLC [mPa·s]
H _{5%} /MeOH/2mPa·s	2,059
H _{10%} /MeOH/2mPa·s	2,052
H _{23,5%} /MeOH/2mPa·s	2,081
H _{40%} /MeOH/2mPa·s	2,115
H _{5%} /MeOH/4mPa·s	4,155
H _{10%} /MeOH/4mPa·s	4,129
H _{23,5%} /MeOH/4mPa·s	4,102
H _{40%} /MeOH/4mPa·s	4,226
H _{5%} /ACN/2mPa·s	2,023
H _{10%} /ACN/2mPa·s	2,031
H _{23,5%} /ACN/2mPa·s	2,069
H _{5%} /ACN/4mPa·s	4,004
H _{10%} /ACN/4mPa·s	4,059

Dosegli smo dobro ujemanje eksperimentalno določenih viskoznosti s ciljnim vrednostmi naših raztopin (znotraj 5 odstotnega deleža ciljane vrednosti). V dveh primerih smo mejo prekoračili, in sicer v primeru 40 % MeOH, pri 2 mPa·s (5,8 %) in 4 mPa·s (5,3 %). Ker je razmerje med njima ostalo enako (oba sta imela višjo vrednost od ciljane), smo se odločili, da ju kljub odstopanju uporabimo in ovrednotimo. Rezultati so prikazani kot ujemanje viskoznejše raztopine z manj viskozno raztopino, vendar z enakim deležem in vrsto topila. Rezultate spremljanja vpliva različnih viskoznosti injiciranih spojin smo prikazali v Preglednicah XIII, XIV in XV, kot ujemanje parametrov za obliko kromatografskih vrhov pri bolj viskoznem vzorcu (4 mPa·s) napram manj viskoznemu vzorcu (2 mPa·s). Neobdelani podatki se nahajajo v Prilogi 8. Vrednosti, ki glede na postavljene kriterije predstavljajo vpliv na preučevan parameter, so v preglednicah v nadaljevanju obarvane rdeče.

Preglednica XIII: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskih vrhov po metodi M₁₀.

Vrsta organskega topila		10% ACN v mobilni fazi					
		Ujemanje parametra; 4 mPa·s/2 mPa·s					
		MeOH				ACN	
Delež organskega topila		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%
FEN	t _R	100,0%	100,6%	100,5%	100,1%	100,0%	99,8%
	h	97,4%	96,0%	95,9%	97,0%	99,6%	99,6%
	površina kromatografskega vrha	99,6%	99,4%	99,8%	99,8%	99,6%	100,0%
	W _{1/2}	102,3%	103,5%	103,7%	102,9%	100,3%	100,1%
	A _s	100,3%	100,2%	100,5%	100,2%	100,6%	100,7%
	T _f	100,6%	100,3%	100,9%	100,6%	100,5%	100,9%
	N	95,6%	94,5%	93,9%	94,7%	99,4%	99,5%
MP	t _R	100,0%	101,0%	100,9%	100,2%	100,0%	99,9%
	h	97,9%	96,0%	96,3%	98,0%	99,6%	99,4%
	površina kromatografskega vrha	99,8%	99,1%	99,3%	99,9%	99,6%	99,8%
	W _{1/2}	101,6%	103,3%	103,5%	101,9%	100,3%	100,3%
	A _s	99,7%	99,8%	100,4%	100,3%	100,6%	100,2%
	T _f	100,0%	99,9%	100,3%	100,3%	100,5%	100,4%
	N	97,0%	95,5%	95,0%	96,7%	99,4%	99,1%

Preglednica XIV: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskih vrhov po metodi M_{23,5}.

Vrsta organskega topila		23,5% ACN v mobilni fazi					
		Ujemanje parametra; 4 mPa·s/2 mPa·s					
		MeOH				ACN	
Delež organskega topila		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%
EP	t _R	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%	99,8%
	h	98,5%	98,0%	98,8%	97,9%	99,2%	99,0%
	površina kromatografskega vrha	100,0%	99,2%	100,0%	100,0%	99,9%	99,8%
	W _{1/2}	100,8%	100,8%	100,6%	101,6%	100,5%	100,4%
	A _s	100,1%	100,9%	100,6%	100,6%	100,4%	100,3%
	T _f	100,5%	100,9%	101,1%	101,0%	100,8%	100,6%
	N	98,4%	98,4%	98,8%	96,7%	98,7%	99,0%
PP	t _R	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%	99,8%	99,8%
	h	98,9%	98,4%	99,7%	99,0%	100,4%	99,6%
	površina kromatografskega vrha	99,7%	98,8%	99,8%	100,2%	99,8%	99,8%
	W _{1/2}	100,5%	100,7%	99,9%	100,6%	99,3%	99,8%
	A _s	99,7%	101,1%	99,7%	100,2%	100,0%	100,4%
	T _f	99,8%	101,3%	99,9%	100,6%	100,1%	100,6%
	N	99,0%	98,6%	100,3%	98,8%	101,1%	100,1%

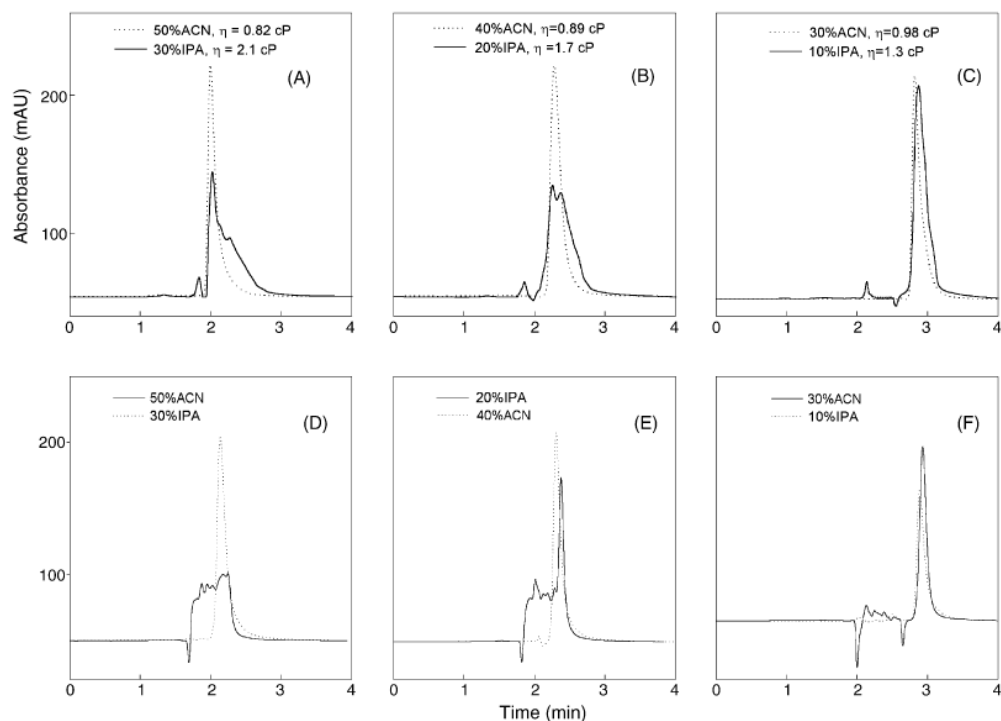
Preglednica XV: Vpliv viskoznosti vzorca na obliko kromatografskega vrha zelo hitro eluirajočega analita po metodi M_{10} in $M_{23,5}$.

		Ujemanje parametra; 4 mPa·s/2 mPa·s					
		MeOH				ACN	
Vrsta organskega topila		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%
RES M_{10}	Delež organskega topila	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%
	t_R	99,9%	100,3%	100,4%	100,1%	99,9%	99,7%
	h	94,3%	93,3%	93,1%	92,8%	95,4%	90,6%
	površina kromatografskega vrha	100,1%	99,7%	100,3%	100,1%	100,6%	100,4%
	$W_{1/2}$	105,5%	106,5%	107,5%	108,3%	104,9%	111,2%
	A_s	101,6%	102,4%	102,7%	99,5%	103,2%	103,6%
	T_f	101,7%	102,1%	102,6%	99,8%	102,9%	102,8%
N	89,8%	88,7%	87,2%	85,4%	90,8%	80,3%	
RES $M_{23,5}$	t_R	99,9%	99,9%	99,9%	99,7%	99,9%	99,8%
	h	90,3%	89,9%	88,6%	81,8%	91,1%	89,1%
	površina kromatografskega vrha	100,8%	100,6%	100,2%	99,6%	101,3%	100,8%
	$W_{1/2}$	110,2%	110,6%	113,2%	126,0%	110,6%	112,2%
	A_s	105,6%	104,0%	104,0%	97,8%	105,7%	104,3%
	T_f	105,0%	103,4%	103,4%	96,5%	104,9%	103,5%
	N	82,2%	81,6%	77,8%	62,7%	81,6%	79,0%

Iz rezultatov je razvidno, da zaradi povečanja viskoznosti vzorca v primeru FEN, MP, EP in PP, ki smo jih po obeh metodah spremljali glede na njihovo kapacitivnost v MF, ne pride do večjih popačenj kromatografskih vrhov. Največja sprememba, ki jo zaznamo, je 6 odstotna sprememba učinkovitosti kolone za MP po metodi M_{10} , kar je po naših kriterijih med manjšimi vplivi na obliko kromatografskega vrha. V primeru RES, ki se iz kolone eluira zelo hitro in ima kapacitivnostni faktor v primeru vrednotenja po M_{10} 1,4 in po $M_{23,5}$ le 0,74, opazimo večji vpliv na obliko kromatografskega vrha. Več kot 20 odstotno razliko (velik vpliv) zaznamo pri parametru učinkovitosti kolone po metodi $M_{23,5}$, ko se je analit iz kolone eluiral skoraj istočasno s topilom. Vpliva na površino kromatografskega vrha, ki je ključni parameter za kvantifikacijo analita, tudi v primeru zelo hitro eluirajočega analita, nismo zaznali. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo in obenem potrdimo našo tretjo hipotezo, da viskoznost v preverjenem območju nima vpliva oz. je ta minimalen, če upoštevamo kriterije dobrih metod RP-HPLC, za katere je želena vrednost kapacitivnostnega faktorja več kot 3.

Keunchkarian s sodelavci (20) je preučevala popačenje kromatografskih vrhov pri RP-HPLC. Injicirali so raztopljen analit v mešanicah vode z različnimi organskimi topili z enako elucijsko močjo. Po njihovih navedbah so se med seboj razlikovali le v viskoznosti. Pri zelo hitro eluirajočih analitih so opazili popačenje kromatografskih vrhov v obliki cepljenja in razširitve, kar so pripisali razlikam med viskoznostjo injiciranega vzorca in viskoznostjo MF.

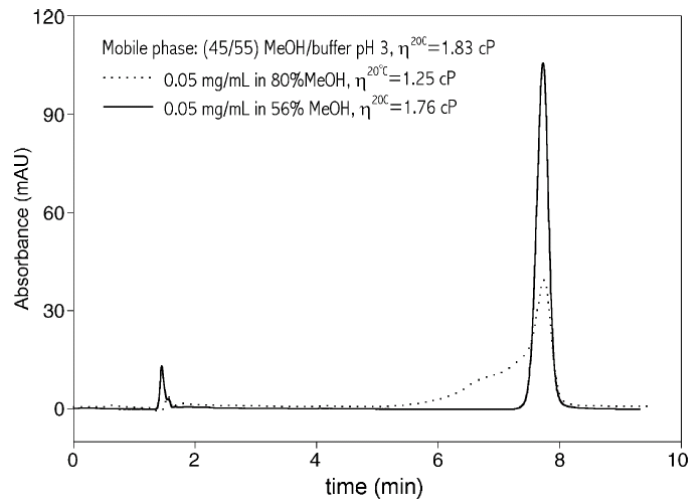
Kot smo pisali v predhodnih poglavjih, je pri RP-HPLC zaželena vrednost retencijskega faktorja večja od 3 oziroma je v splošnem priporočeno, da se izogibamo elucijskim pogojem, pri katerih ima analit, ki ga želimo ovrednotiti, retencijski faktor manjši od 1,5 (2).



Slika 23: Kromatogrami paracetamola, raztopljenega v MF in topilu z enako elucijsko močjo, toda različno viskoznostjo (20).

V primeru prikaza kromatogramov na Sliki 23 je vrednost retencijskih faktorjev zelo majhna (v primeru prikaza kromatograma A in B le 0,2 oz 0,4). Uporabljene MF in topila v vzorcih so vsebovale visoke deleže organskih topil. Kljub trditvi, da so uporabili topila z enako elucijsko močjo v MF in injiciranem vzorcu, lahko zaradi kombinacij več topil hkrati, v koloni dobimo nepredvidljive efekte adsorpcije topila na medfazo, kar vpliva na obnašanje molekul analita. Avtorji (21) so sami navedli, da močno topilo v vzorcu preprečuje molekulam topljenca, da bi se uravnotežile s površino kolone v začetnih delih kolone in zato del topljenca potuje hitreje s tokom topila vzorca v naslednje dele kolone. Posledično naj bi po njihovih trditvah prišlo le do nastanka raztegnjenih vrhov, ne pa razcepljenih. Če se navežemo na literaturne vire (2) iz poglavja 1.3.2. in Sliko 9, vidimo, da so razcepljeni vrhovi lahko posledica prevelike količine analita na izpostavljeno površino kolone, kar se odraža v razcepljenih kromatografskih vrhovih. V primeru MF in analita, raztopljenega v topilu z enako sestavo, ta efekt ni toliko izražen, saj ni prišlo do dodatnih efektov različnih organskih topil ter do porušanja ravnotežja topil na SF.

V naših poskusih smo varirali le viskoznost brez spreminjanja razmerja organskih topil v vzorcu. Med seboj smo primerjali vpliv na popačenje kromatografskih vrhov med vzorci z enako elucijsko močjo, saj sta vrsta in delež organskega topila ostala enaka.



Slika 24: Kromatograma piroksikama, po injiciranju v topilih z različno viskoznostjo (20).

Slika 24 prikazuje kromatograma injiciranega vzorca, raztopljenega v različnih deležih metanola. Kapacitivnost analita na koloni je v tem primeru ustrezna ($k \approx 4$). Vzrok popačenja kromatografskega vrha so v članku pripisali razlikam v viskoznosti. Iz navedenih podatkov o uporabljenih topilih je razvidno, da sta se injicirana vzorca razlikovala predvsem v elucijski moči. V prvem primeru so v vzorcu uporabili 80 % MeOH, v drugem pa 56 % MeOH. V obeh injiciranjih je imel analit v topilu, v katerem je bil injiciran, manjšo kapacitivnost kot v MF. Iz nomograma na Sliki 1, literarnih podatkov, mehanizma retencije pri RP-HPLC in na podlagi naših analiz lahko potrdimo, da se z višjim deležem organskega modifikatorja elucijska moč povečuje.

V uvodu smo omenili tudi članek (23), ki navaja, da je pomembna sprememba v tlaku injiciranega vzorca. Podatki so bili navedeni v povezavi s kromatografijo z ločevanjem po velikosti (ang. »*size - exclusion chromatography*«). Pri tovrstni kromatografiji je volumen vzorca na koloni napram pretoku precej večji, kot pri RP-HPLC. Pri našem delu se je največji odziv tlaka med bolj in manj viskoznim vzorcem razlikoval za približno 60 %, vendar kljub temu v primeru FEN, MP, EP in PP nismo opazili večjih sprememb, ki bi vplivale na obliko kromatografskih vrhov. Spremembo oblike kromatografskih vrhov smo zaznali le pri RES, ki pa se je iz kolone eluiral pod pogoji, ki niso tipični in priporočeni za vrednotenje analitov z RP-HPLC.

5. SKLEP

Za retencijo analitov na RP-HPLC koloni so pomembne lastnosti mobilne faze, stacionarne faze in medfaze. Medfazo predstavljajo na stacionarno fazo vezane molekule in organski modifikator, ki se nanje adsorbira v odvisnosti od sestave mobilne faze in vrste organskega modifikatorja

Popačenje oblike kromatografskega vrha se pri parametrih, ki smo jih spremljali, najbolj odrazi na parametrih višine, širine na polovici višine kromatografskega vrha, površini in na učinkovitosti kolone. Pri teh parametrih smo zaznali najhitrejši in najbolj obsežen vpliv vrste in količine organskega topila v vzorcu.

V magistrskem delu smo potrdili prvo hipotezo. Večji deleža organskega topila v vzorcu vpliva na večji obseg popačenja oblike kromatografskega vrha. Pri bolj lipofilnih analitih bo prišlo do popačenja oblike kromatografskega vrha kasneje, zaradi večje retencije na kromatografski koloni. Hkrati je potrebno poudariti, da sestava topila vzorca z večjo kapacitivnostjo od kapacitivnosti mobilne faze, ne bo izkazovala popačenja kromatografskega vrha.

Na podlagi rezultatov injiciranja različnih volumnov vzorca lahko potrdimo našo drugo hipotezo in zaključimo, da je priporočljivo redčiti vzorec, saj lahko na ta način injiciramo enako količino analita pri manjšem popačenju oblike kromatografskega vrha. Redčenje je smiselno tudi, ko smo na meji kvantifikacije in lahko z večjo količino bolj redčenega vzorca na kolono naneseemo večjo koncentracijo analita. Hkrati pa je potrebno poudariti, da je redčenje vzorca časovno in stroškovno potratno ter vnaša v proces dodaten vpliv, ki se lahko odrazi na rezultatu. V primeru, ko nismo na meji detekcije, lahko volumen injiciranja tudi zmanjšamo in s tem izboljšamo obliko kromatografskega vrha.

Optimizirali smo metodo merjenja dinamične viskoznosti raztopin s sistemom HPLC. Odzivi tlaka ponovljivo in linearno korelirajo z meritvami, pridobljenimi z merjenjem viskoznosti istih raztopin z rotacijskim viskozimetrom. Merjenje viskoznosti s sistemom HPLC zahteva izdelavo umeritvene krivulje in primerjavo z viskozimetrom ter dodatno obdelavo podatkov, obenem pa za meritve potrebuje le nekaj 10 μL vzorca, meritve so izvedene avtomatsko, v kratkem času in brez stalne prisotnosti analitika. Metodo ocenjujemo kot primerno za vrednotenje viskoznosti raztopin.

Na podlagi sistematičnega in ciljanega preverjanja vpliva viskoznosti injiciranega vzorca (s spreminjanjem izključno viskoznosti raztopin, količina in vrsta organskega topila v vzorcu je

ostala nespremenjena) smo preverili vpliv viskoznosti na obliko kromatografskega vrha za raztopine, ki se med seboj v viskoznosti razlikujejo za faktor 2 in potrdili tretjo hipotezo. Zaključili smo, da je vpliv viskoznosti v preučevanem območju, v primeru upoštevanja priporočil in dobrih praks za vrednotenje analitov (npr. vrednost kapacitivnostega faktorja) z metodami RP-HPLC, brez vpliva oziroma je ta vpliv zanemarljivo majhen.

6. LITERATURA

1. Sharma D, Soni M, Kumar S, Gupta GD. Solubility enhancement—eminent role in poorly soluble drugs. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2009; 2 (2): 220–224.
2. Kazakevich Y, Lobrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey. John Wiley & Sons, Inc, 2007: 100-101, 43-55, 124-126, 130, 145-153.
3. Dong WM. *Modern HPLC for practising scientists*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2006: 17-30, 40, 253-255.
4. Bayne S, Calin M. *Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography*. Taylor and Francis Group, LLC, Florida, 2010: 32-43, 146-147.
5. Spletni vir:
http://www.chromacademy.com/lms/sco5/Theory_Of_HPLC_Reverse_Phase_Chromatography.pdf
Dostopano: 22.5.2017
6. Berendsen EG, et al. Preparation of Various Bonded Phases for HPLC Using Monochlorosilanes. *Journal of Liquid Chromatography*, 3, 1980: 1437-1264.
7. Spletni vir: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=nvlhIDsHonOvmOIIEcCdB&subNav=htxjqDsHonOvmOIIEcCdB> Dostopano: 15.06.2017
8. Spletni vir: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf> Dostopano: 21.03.2017
9. Snyder L.R, Kirkland J.J, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, second edition, John Wiley & Sons, New York, 1979: 365-382.
10. Snyder L.R et al. *Practical HPLC Method Development*. Second Edition, Wiley-Interscience, New York, 1997: 234-239.
11. Stout TH. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, Marcel Dekker, New York, 2001: 87.
12. Spletni vir:
<http://www.chromacademy.com/lms/sco5/09EluotropicSeries.html?fChannel=0&fCourse=0&fSco=5&fPath=sco5/09-Eluotropic-Series.html> Dostopano: 05.06.2017
13. Fanali S et al. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Second edition, Elsevier, Vol 1, 2017:351-355.

14. Spletni vir:
<http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Robustness-in-HPLC-Eluents.html> Dostopano: 11.5.2017
15. Spletni vir:
https://www.shimadzu.eu/sites/default/files/Tips_for_practical_HPLC_analysis-Separation_Know-how.pdf Dostopano: 05.03.2017
16. Spletni vir:
<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa20769.pdf> Dostopano: 11.05.2017
17. Spletni vir: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=phenol&interface=All&N=0&mode=match %20partialmax&lang=en®ion=SI&focus=product](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=phenol&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=SI&focus=product) Dostopano: 11.03.2017
18. Spletni vir: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/j100662a020> Dostopano: 11.05.2017
19. Spletni vir: <http://www.lcresources.com/resources/TSWiz/hs40.htm> Dostopano: 05.06.2017
20. Keunchkarian S. Et al. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *Journal of Chromatography A*, Elsevier (1119), 2006: 20-28.
21. Spletni vir: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/39/39intro.html>
Dostopano: 22.05.2017
22. Spletni vir: http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02_methods_of_analysis/2.2._physical_and_physicochemical_methods/2.2.9.%20Capillary%20viscometer%20method.pdf
Dostopano: 22.07.2017
23. Cherrak D et.al. Viscous Fingering: A Sysematic Study of Viscosity Effects in Methanol-Isopropanol Systems. *Chromatographia*, 46, 1997:647-654.
24. Rousseaux G, Martin M, De Wit A. Viscous fingering in packed chromatographic columns: Non-linear dynamics. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, 2011: 8353-8361.
25. Castells B. C, Castells C.R. Peak distortion in reversed-phase liquid chromatography as a consequence of viscosity differences between sample solvent and mobile phase. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, 1998: 55–61.
26. Broyles B.S, et al. Visualization of viscous fingering in chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, 1998: 173–187.

27. Gregory S, Mach H. Adoption of a High-Pressure Liquid Chromatography System for the measurements of Viscosity. *Chromatography*, 1(2), 2014: 55-64.
28. Spletni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resorcinol#section=Top>
Dostopano: 11.3.2017
29. Serjeant E. P, Dempsey B. Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. Pergamon Press, Inc., New York, 1979: 162.
30. Hansch C, Leo A, Hoekman D. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society, Washington DC, 1995: 20.
31. Yalkowsky S.H, He Y, Jain P. Handbook of Aqueous Solubility Data. Second Edition, CRC Press, Inc., Florida, 2010: 255.
32. Spletni vir: https://www.google.si/search?q=resorcinol&rlz=1C1CHHM_sISI751SI751&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiw0ImelNvVAhVLRQKHAYAdmEQ_AUICigB&biw=1455&bih=1009&dpr=1.1#imgrc=x6gStv7rb3hFjM Dostopano: 05.03.2017
33. Spletni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/996#section=Top> Dostopano: 11.03.2017
34. Lide D.R, CRC Handbook of Chemistry and Physics. 83rd edition, CRC Press Inc., Florida, 2002: 8-49.
35. Hansch C, Leo A, Hoekman D, Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society, Washington DC, 1995: 20, 42, 57, 73.
36. Spletni vir: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03255> Dostopano: 11.03.2017
37. Huizhen L, et al. Selective Phenol Hydrogenation to Cyclohexanone Over a Dual Supported Pd–Lewis Acid Catalyst. *Science*, 5957(326), 2009: 1250-1252.
38. Spletni vir: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_4-hydroxybenzoate#section=Top
Dostopano: 11.03.2017
39. Tomlinson E, Dunn, J III et al. Determination and Estimation. Pergamon Press, New York, 1986: 101-41.
40. Yalkowsky S. H, He Y, Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL dATABaSE. CRC Press LLC, Florida, 2003: 477, 571, 607.
41. Spletni vir: <http://www.sielc.com/Compound-Methyl-Paraben.html> Dostopano: 05.03.2017
42. Spletni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8434#section=Top> Dostopano: 12.03.2017
43. Yonezawa Y et al. Kogai Shigen Kenkyusho. *Iho* 15, 1985: 75-86

-
44. Spletni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7175#section=Top> Dostopano: 12.03.2017
45. Spletni vir: <http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2013/04/978-87-93026-02-5.pdf> Dostopano: 20.03.2017
46. Spletni vir: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2009/Hajnrih_Urska_dipl_nal_2009.pdf Dostopano: 17.06.2017
47. Spletni vir: <http://shop.isotope.com/productdetails.aspx?itemno=ULM-9760-1.2> Dostopano: 05.03.2017
48. Spletni vir: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/propylparaben180209413311?lang=en®ion=SI> Dostopano: 05.03.2017
49. Gilpin R.K, Jaroniee M, Lin S. Dependence of the Methylene Selectivity on the Composition of Hydro-Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatographic Systems with Alkyl Bonded Phases. *Chromatographia*, 30, 1990: 393-399.
50. Zhuang P, et al. A Retention Model for Polar Selectivity in Reversed Phase Chromatography as a Function of Mobile Phase Organic Modifier Type. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2005: 1345–1356.
51. DhamoleBD, Mahajan P, Feng H. Phase Separation Conditions for Sugaring-Out in Acetonitrile-Water Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55, 2010: 3803-3806.
52. Spletni vir: https://www.fmf.uni-lj.si/~mohoric/skripta/praktikum/o_meritvah_old.pdf Dostopano: 22.08.2017

Priloga 1

Prikazani so podatki (povprečja 3 injiciranj) za izračun kapacitivnostnega faktorja analitov pri različni sestavi MF (spreminjanje deleža organskega modifikatorja – ACN (% B))

Parametri kromatografskega vrha	delež organskega modifikatorja (ACN) v mobilni fazi								
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	
t_M	0,2795	0,2680	0,2565	0,2450	0,2336	0,2221	0,2106	0,1991	
RES	t_R [min]	0,9503	0,6625	0,5203	0,4402	0,3935	0,3634	0,3418	0,3258
	h [mAU]	365,6	526,5	663,5	774,9	847,9	878,6	874,4	832,3
	Površina [mAU*s]	762,1	778,0	777,5	789,5	796,7	828,5	823,2	820,9
	$W_{1/2}$ [min]	0,0301	0,0206	0,0162	0,0139	0,0128	0,0125	0,0128	0,0138
	Začetek krom. vrha [min]	0,9023	0,6280	0,4931	0,4172	0,3724	0,3444	0,3244	0,3088
	Konec krom. vrha [min]	1,1967	0,9345	0,6787	0,6406	0,5512	0,5698	0,5147	0,4540
	A_s	1,277	1,328	1,369	1,402	1,408	1,385	1,395	1,379
	T_f	1,406	1,505	1,578	1,630	1,638	1,639	1,629	1,585
	N [št. teoretskih podov]	5518,0	5745,0	5711,6	5587,4	5280,2	4693,0	3949,4	3090,8
FEN	t_R [min]	2,9733	1,9130	1,3317	0,9809	0,7685	0,6323	0,5531	0,4761
	h [mAU]	54,6	85,5	123,3	165,3	207,5	249,3	376,1	648,8
	Površina [mAU*s]	323,7	328,2	332,0	335,4	335,8	320,8	718,1	709,2
	$W_{1/2}$ [min]	0,0900	0,0572	0,0393	0,0291	0,0231	0,0192	0,0296	0,0150
	Začetek krom. vrha [min]	2,8417	1,8265	1,2696	0,9332	0,7328	0,5810	0,5146	0,4541
	Konec krom. vrha [min]	3,2209	2,1173	1,5243	1,1644	0,8627	0,6613	0,7667	0,6111
	A_s	1,152	1,203	1,250	1,290	1,326	1,391	1,014	1,413
	T_f	1,195	1,274	1,357	1,431	1,493	1,356	1,199	1,628
	N [št. teoretskih podov]	6046,2	6199,0	6355,4	6301,4	6154,0	6028,8	1937,0	5606,0
MP	t_R [min]	5,8599	3,9924	2,1364	1,3032	0,8999	0,6829	0,5537	0,4761
	h [mAU]	352,1	45,5	86,1	138,7	196,8	260,0	375,5	648,8
	Površina [mAU*s]	372,7	368,0	368,3	368,4	370,5	398,1	664,4	709,2
	$W_{1/2}$ [min]	0,0153	0,1236	0,0640	0,0387	0,0267	0,0207	0,0271	0,0150
	Začetek krom. vrha [min]	5,8176	3,8219	2,0403	1,2428	0,8627	0,6613	0,5225	0,4541
	Konec krom. vrha [min]	6,0440	4,2882	2,3566	1,4989	1,1001	0,8957	0,7685	0,6111
	A_s	1,194	1,140	1,204	1,264	1,309	1,249	1,218	1,413
	T_f	1,364	1,174	1,267	1,369	1,447	1,428	1,512	1,628
	N [št. teoretskih podov]	809450,6	5781,2	6180,2	6296,6	6281,8	6015,6	2561,3	5606,0
EP	t_R [min]	6,1075	5,9776	5,3001	2,7839	1,6662	1,1119	0,8123	0,6389
	h [mAU]	299,8	289,3	34,4	67,3	111,8	164,9	220,8	274,9
	Površina [mAU*s]	373,4	373,9	366,9	372,3	373,3	374,2	375,1	376,9
	$W_{1/2}$ [min]	0,0179	0,0191	0,1652	0,0835	0,0492	0,0326	0,0239	0,0190
	Začetek krom. vrha [min]	6,0789	5,9460	5,0765	2,6605	1,5896	1,0598	0,7746	0,6111
	Konec krom. vrha [min]	6,2716	6,1654	5,5930	3,0206	1,8626	1,3027	1,0198	0,8364
	A_s	1,286	1,205	1,117	1,177	1,240	1,288	1,326	1,353
	T_f	1,423	1,341	1,143	1,222	1,319	1,410	1,484	1,537
	N [št. teoretskih podov]	643756,6	543685,8	5704,6	6161,2	6355,8	6433,4	6391,8	6239,0
PP	t_R [min]	6,4748	6,3896	6,2209	5,8731	3,5469	2,0743	1,3424	0,9529
	h [mAU]	198,6	192,6	190,3	171,0	49,9	85,8	131,1	181,2
	Površina [mAU*s]	354,1	354,5	355,3	385,2	350,6	353,1	354,4	355,8
	$W_{1/2}$ [min]	0,0256	0,0268	0,0275	0,0313	0,1072	0,0613	0,0393	0,0279
	Začetek krom. vrha [min]	6,3978	6,3475	6,1770	5,6607	3,3972	1,9752	1,2797	0,9076
	Konec krom. vrha [min]	6,6492	6,5579	6,4587	6,0545	3,7941	2,2805	1,5307	1,1494
	A_s	1,271	1,258	1,204	1,173	1,151	1,208	1,265	1,301
	T_f	1,386	1,382	1,320	1,332	1,189	1,273	1,372	1,444
	N [št. teoretskih podov]	354914,0	316127,6	283499,6	195677,4	6069,2	6342,8	6459,6	6468,4

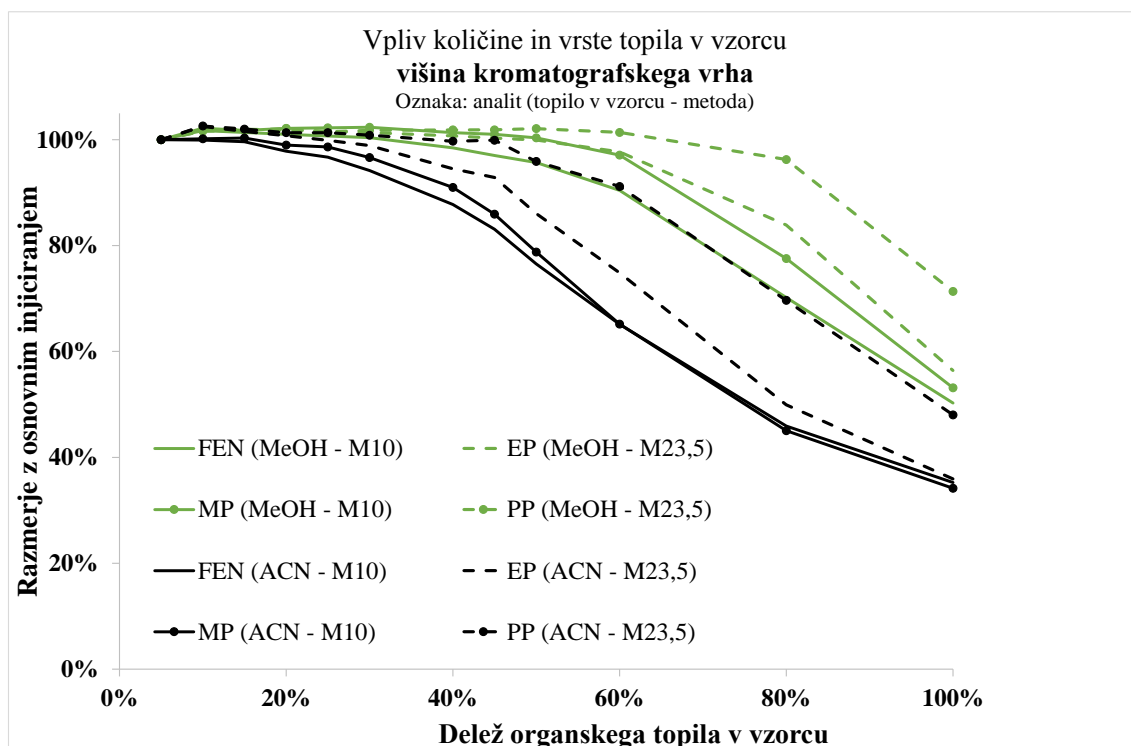
Priloga 2

Prikazani so podatki za izračun primerjave vpliva vrste in količine organskega topila v vzorcu po metodi M_{10} in $M_{23,5}$

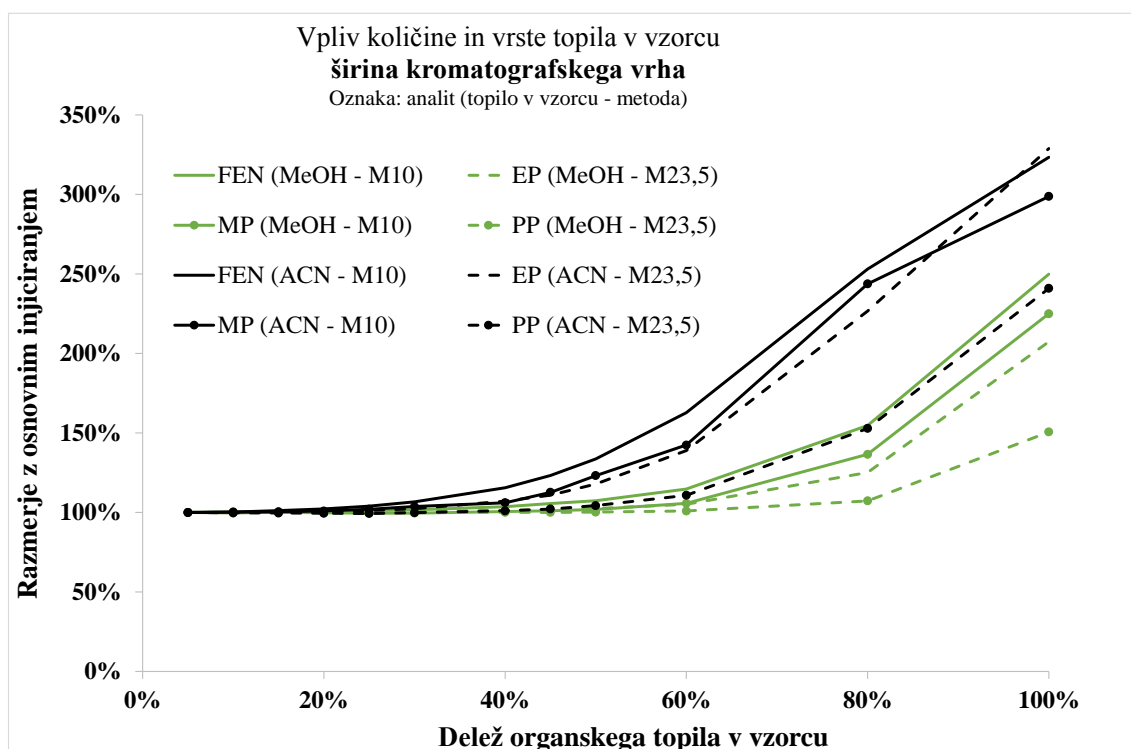
Parametri kromatografskega vrha		Spreminjanje deleža organskega topila v vzorcu - MeOH												
		5%	10%	15%	20%	25%	30%	40%	45%	50%	60%	80%	100%	
M_{10}	RES	t_R [min]	0,6412	0,6406	0,6405	0,6385	0,6371	0,6359	0,6332	0,6332	0,6314	0,6305	0,6317	0,6328
	h [mAU]	589,8	591,4	579,5	566,1	548,1	528,8	477,3	445,5	413,2	341,9	239,3	183,6	
	Površina [mAU*s]	754,6	770,9	771,1	771,7	772,0	773,4	774,9	777,9	779,9	784,0	794,2	757,6	
	$W_{1/2}$ [min]	0,0181	0,0184	0,0189	0,0194	0,0201	0,0210	0,0237	0,0258	0,0282	0,0354	0,0576	0,0403	
	Začetek krom. vrha [min]	0,5975	0,6008	0,5975	0,6043	0,5856	0,5912	0,5774	0,5609	0,5715	0,5691	0,5242	0,4055	
	Konec krom. vrha [min]	0,9627	0,9895	0,9536	0,9528	0,9782	0,9587	0,9851	0,9650	0,9591	1,0019	1,0412	1,0411	
	A_s	1,312	1,310	1,317	1,309	1,316	1,308	1,273	1,246	1,199	1,053	0,787	0,651	
	T_f	1,436	1,433	1,440	1,429	1,434	1,422	1,380	1,349	1,299	1,145	0,847	0,675	
	N [št. teoretskih podov]	6982,7	6712,0	6393,3	6008,3	5572,7	5076,3	3956,0	3340,7	2769,0	1757,0	666,3	1368,7	
	FEN	t_R [min]	1,8633	1,8628	1,8614	1,8583	1,8540	1,8509	1,8469	1,8486	1,8425	1,8372	1,8292	1,8336
h [mAU]	93,0	94,7	94,3	94,0	93,7	93,4	91,6	90,3	89,0	84,1	65,3	46,8		
Površina [mAU*s]	310,4	310,9	310,4	310,6	310,4	311,1	311,3	311,2	312,5	313,3	314,8	316,6		
$W_{1/2}$ [min]	0,0488	0,0490	0,0491	0,0493	0,0494	0,0497	0,0506	0,0516	0,0525	0,0560	0,0755	0,1220		
Začetek krom. vrha [min]	1,7631	1,7775	1,7707	1,7621	1,7484	1,7580	1,7550	1,7516	1,7468	1,7319	1,7037	1,6389		
Konec krom. vrha [min]	2,1404	2,1494	2,1279	2,1294	2,1332	2,1466	2,1585	2,1173	2,1432	2,1524	2,1150	2,1207		
A_s	1,103	1,105	1,104	1,108	1,110	1,111	1,108	1,109	1,104	1,093	0,964	0,731		
T_f	1,155	1,157	1,155	1,160	1,161	1,164	1,161	1,159	1,155	1,143	1,015	0,772		
N [št. teoretskih podov]	8065,7	8018,0	7950,0	7870,3	7799,0	7696,0	7380,0	7107,7	6835,7	5960,7	3248,7	1254,0		
MP	t_R [min]	3,8840	3,8873	3,8836	3,8749	3,8647	3,8578	3,8553	3,8616	3,8448	3,8329	3,8132	3,8204	
h [mAU]	55,4	56,6	56,4	56,6	56,6	56,7	56,1	55,9	55,6	53,8	42,9	29,4		
Površina [mAU*s]	395,9	392,9	393,0	394,1	393,6	393,3	394,2	394,7	394,9	396,3	397,0	395,5		
$W_{1/2}$ [min]	0,1052	0,1048	0,1053	0,1049	0,1047	0,1047	0,1058	0,1063	0,1071	0,1111	0,1436	0,2366		
Začetek krom. vrha [min]	3,6975	3,7011	3,7071	3,6988	3,6912	3,6864	3,6535	3,6549	3,6728	3,6360	3,5898	3,4056		
Konec krom. vrha [min]	4,2928	4,2800	4,2709	4,2997	4,2625	4,2510	4,2603	4,2647	4,2447	4,2626	4,2388	4,2009		
A_s	1,078	1,079	1,084	1,080	1,081	1,088	1,087	1,086	1,084	1,077	0,971	0,717		
T_f	1,121	1,122	1,126	1,125	1,125	1,130	1,132	1,129	1,127	1,119	1,012	0,748		
N [št. teoretskih podov]	7557,7	7624,0	7538,0	7559,7	7550,3	7518,7	7360,0	7305,3	7139,0	6589,0	3907,0	1452,3		
$M_{23,5}$	EP	t_R [min]	1,8588	1,8570	1,8554	1,8546	1,8533	1,8516	1,8504	1,8486	1,8470	1,8435	1,8363	1,8365
	h [mAU]	115,2	117,1	117,5	117,3	117,1	116,8	116,1	115,6	115,2	112,6	96,7	65,0	
	Površina [mAU*s]	377,0	373,9	375,0	375,1	375,0	375,4	375,3	375,3	376,8	376,4	378,1	379,6	
	$W_{1/2}$ [min]	0,0472	0,0473	0,0473	0,0473	0,0474	0,0475	0,0478	0,0481	0,0484	0,0497	0,0591	0,0980	
	Začetek krom. vrha [min]	1,7678	1,7618	1,7710	1,7557	1,7614	1,7562	1,7563	1,7600	1,7516	1,7524	1,7249	1,6664	
	Konec krom. vrha [min]	2,1402	2,1559	2,1610	2,1499	2,1511	2,1653	2,1555	2,1737	2,1639	2,1472	2,1391	2,1400	
	A_s	1,104	1,104	1,104	1,103	1,112	1,111	1,106	1,107	1,108	1,107	1,061	0,799	
	T_f	1,160	1,159	1,161	1,162	1,166	1,168	1,164	1,165	1,164	1,161	1,112	0,845	
	N [št. teoretskih podov]	8577,3	8552,0	8541,3	8505,3	8465,7	8403,7	8290,7	8185,7	8055,7	7633,3	5343,7	1947,0	
	PP	t_R [min]	4,1315	4,1272	4,1243	4,1207	4,1186	4,1175	4,1130	4,1114	4,1075	4,1017	4,0902	4,0790
h [mAU]	46,8	47,6	47,7	47,8	47,5	47,7	47,7	47,7	47,8	47,5	45,1	33,4		
Površina [mAU*s]	349,2	350,6	350,9	351,4	351,1	351,6	352,0	351,4	353,7	353,6	356,1	355,2		
$W_{1/2}$ [min]	0,1111	0,1111	0,1114	0,1108	0,1116	0,1112	0,1111	0,1111	0,1113	0,1121	0,1191	0,1673		
Začetek krom. vrha [min]	3,9337	3,9147	3,9242	3,9192	3,9386	3,9372	3,9063	3,9268	3,9183	3,8887	3,8861	3,8087		
Konec krom. vrha [min]	4,5149	4,5208	4,4917	4,5577	4,5493	4,5169	4,5162	4,4964	4,5285	4,5231	4,5726	4,4914		
A_s	1,075	1,078	1,078	1,083	1,089	1,081	1,077	1,073	1,080	1,078	1,070	0,893		
T_f	1,117	1,121	1,120	1,125	1,132	1,123	1,122	1,115	1,123	1,122	1,110	0,932		
N [št. teoretskih podov]	7668,3	7646,3	7593,7	7659,0	7548,0	7597,3	7587,3	7589,7	7548,0	7420,3	6530,0	3294,7		

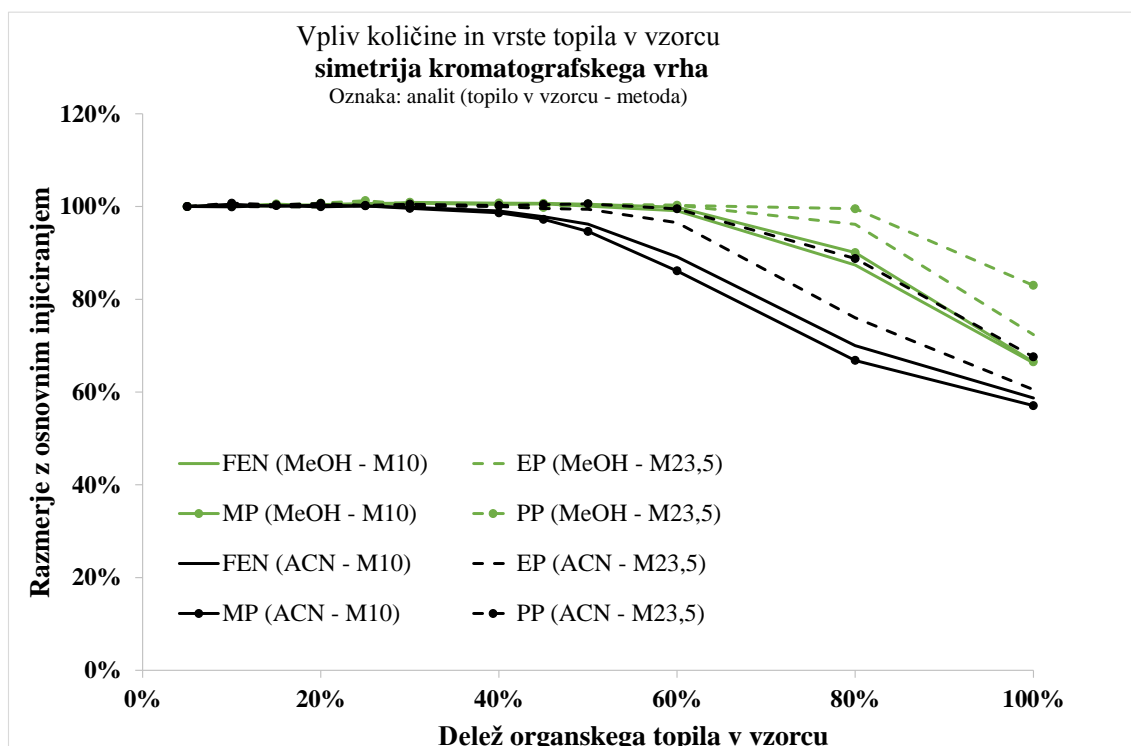
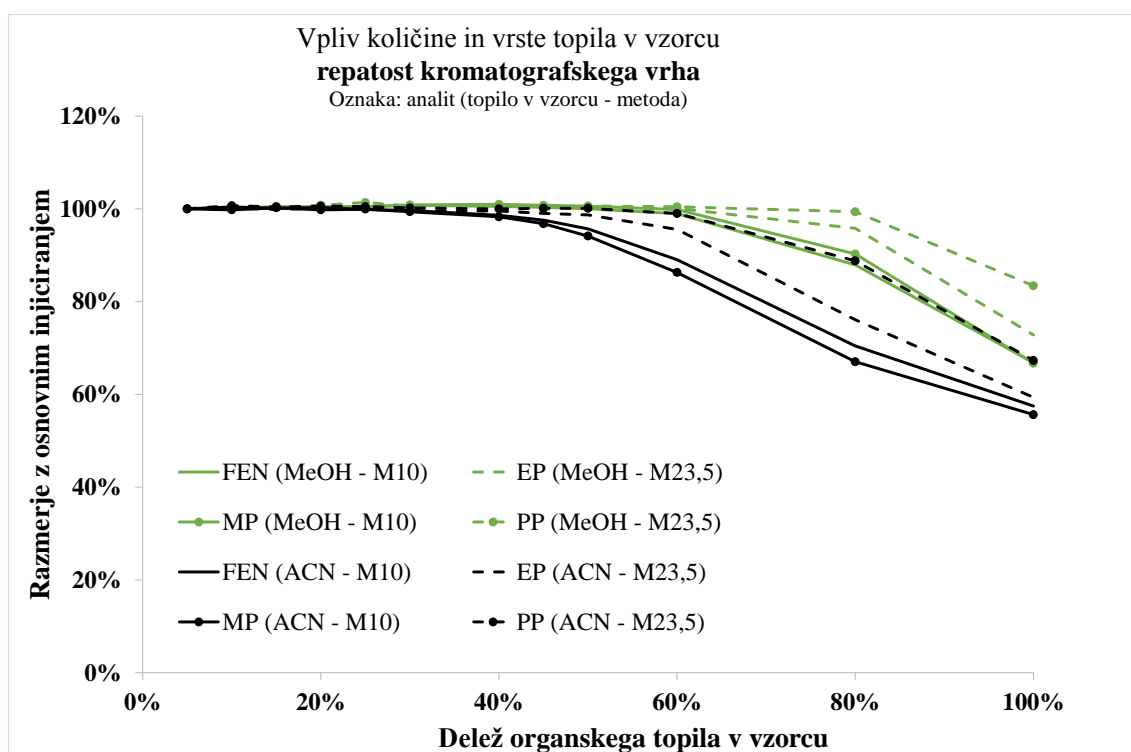
Parametri kromatografskega vrha		Spreminjanje deleža organskega topila v vzorcu - ACN												
		5%	10%	15%	20%	25%	30%	40%	45%	50%	60%	80%	100%	
M ₁₀	RES	t _R [min]	0,6364	0,6354	0,6337	0,6317	0,6292	0,6275	0,6274	0,6295	0,6302	0,6297	0,6323	0,6334
	h [mAU]	579,7	558,9	523,7	471,3	411,4	345,3	244,1	211,4	182,8	149,4	109,5	84,1	
	Površina [mAU*s]	712,0	714,5	716,8	713,1	719,7	718,3	722,8	726,9	719,8	725,9	765,0	717,1	
	W _{1/2} [min]	0,0171	0,0179	0,0193	0,0217	0,0257	0,0314	0,0471	0,0562	0,0666	0,0870	0,1014	0,0909	
	Začetek krom. vrha [min]	0,5962	0,5917	0,5921	0,5926	0,5769	0,5739	0,5546	0,5485	0,5273	0,4844	0,3240	0,3107	
	Konec krom. vrha [min]	0,9852	0,9750	0,9754	0,9819	1,0142	0,9819	0,9683	1,0367	1,0454	1,0191	1,0614	1,0416	
	A _s	1,254	1,279	1,274	1,278	1,241	1,179	0,923	0,835	0,768	0,685	0,601	0,566	
	T _f	1,440	1,454	1,437	1,428	1,381	1,307	1,022	0,921	0,840	0,737	0,635	0,590	
	N [št. teoretskih podov]	7712,0	7018,3	5972,3	4689,0	3316,3	2207,3	984,7	694,7	495,7	290,3	215,7	271,3	
	FEN	t _R [min]	1,8539	1,8543	1,8532	1,8512	1,8493	1,8477	1,8410	1,8434	1,8402	1,8313	1,8390	1,8425
h [mAU]	74,8	74,8	74,5	73,2	72,4	70,5	65,7	62,2	57,3	48,7	34,3	26,4		
Površina [mAU*s]	243,8	243,7	245,0	242,9	244,3	243,8	244,0	244,5	241,9	244,2	245,7	244,8		
W _{1/2} [min]	0,0481	0,0482	0,0486	0,0492	0,0500	0,0513	0,0556	0,0592	0,0643	0,0782	0,1217	0,1555		
Začetek krom. vrha [min]	1,7519	1,7646	1,7646	1,7593	1,7606	1,7512	1,7406	1,7335	1,7313	1,7169	1,6611	1,5142		
Konec krom. vrha [min]	2,1728	2,1266	2,1580	2,1282	2,1378	2,1510	2,1154	2,1176	2,1179	2,1095	2,1171	2,0714		
A _s	1,105	1,110	1,105	1,108	1,106	1,103	1,094	1,080	1,063	0,985	0,773	0,649		
T _f	1,163	1,168	1,165	1,167	1,162	1,159	1,147	1,135	1,113	1,036	0,819	0,669		
N [št. teoretskih podov]	8238,7	8207,3	8045,7	7850,7	7572,0	7183,7	6083,3	5365,3	4542,3	3035,7	1266,0	778,0		
MP	t _R [min]	3,8713	3,8737	3,8718	3,8689	3,8644	3,8622	3,8456	3,8532	3,8454	3,8248	3,8440	3,8501	
h [mAU]	53,9	54,0	54,0	53,3	53,1	52,0	49,0	46,3	42,4	35,1	24,3	18,4		
Površina [mAU*s]	376,0	375,4	375,9	372,7	376,0	373,8	374,2	375,2	370,8	373,1	373,2	366,3		
W _{1/2} [min]	0,1042	0,1044	0,1046	0,1051	0,1063	0,1081	0,1106	0,1173	0,1283	0,1483	0,2539	0,3112		
Začetek krom. vrha [min]	3,7017	3,6940	3,6808	3,6839	3,6791	3,6792	3,6507	3,6509	3,6367	3,5828	3,4460	3,0468		
Konec krom. vrha [min]	4,3004	4,3035	4,2741	4,2590	4,3133	4,2722	4,2536	4,2751	4,2892	4,2606	4,2371	4,2453		
A _s	1,078	1,077	1,080	1,077	1,080	1,074	1,063	1,048	1,020	0,928	0,720	0,615		
T _f	1,122	1,119	1,125	1,120	1,121	1,115	1,103	1,086	1,056	0,968	0,752	0,624		
N [št. teoretskih podov]	7652,3	7620,7	7592,3	7501,0	7327,3	7077,7	6135,7	5407,7	4542,3	2860,0	1091,3	1055,0		
M _{23,5}	EP	t _R [min]	1,8358	1,8347	1,8325	1,8300	1,8290	1,8273	1,8232	1,8213	1,8174	1,8113	1,8090	1,8143
	h [mAU]	113,2	116,0	114,9	114,0	113,0	111,9	107,0	105,1	97,4	84,7	56,5	40,6	
	Površina [mAU*s]	357,8	360,3	359,9	357,8	357,8	357,2	356,6	361,2	353,3	355,3	360,5	363,5	
	W _{1/2} [min]	0,0461	0,0461	0,0461	0,0463	0,0467	0,0471	0,0494	0,0511	0,0543	0,0640	0,1045	0,1515	
	Začetek krom. vrha [min]	1,7469	1,7426	1,7377	1,7356	1,7426	1,7413	1,7234	1,7210	1,7132	1,6999	1,6519	1,4726	
	Konec krom. vrha [min]	2,1257	2,1008	2,1226	2,1171	2,1298	2,1079	2,1109	2,1020	2,0967	2,1096	2,0955	2,0729	
	A _s	1,105	1,105	1,104	1,104	1,107	1,106	1,105	1,100	1,098	1,066	0,840	0,669	
	T _f	1,169	1,172	1,167	1,171	1,169	1,164	1,163	1,157	1,154	1,117	0,889	0,694	
	N [št. teoretskih podov]	8795,7	8778,3	8752,7	8699,3	8609,0	8523,7	7549,0	7042,3	6207,3	4436,7	1662,3	794,7	
	PP	t _R [min]	4,0752	4,0730	4,0695	4,0660	4,0642	4,0605	4,0565	4,0528	4,0477	4,0376	4,0199	4,0296
h [mAU]	45,9	47,1	46,8	46,5	46,5	46,3	45,8	45,8	44,0	41,8	32,0	22,0		
Površina [mAU*s]	339,2	342,3	340,0	338,6	337,9	336,8	336,2	339,2	334,5	335,1	340,0	341,9		
W _{1/2} [min]	0,1093	0,1090	0,1089	0,1088	0,1086	0,1092	0,1104	0,1117	0,1140	0,1211	0,1671	0,2633		
Začetek krom. vrha [min]	3,8886	3,8939	3,8694	3,8853	3,8615	3,8595	3,8570	3,8696	3,8606	3,8333	3,7692	3,5974		
Konec krom. vrha [min]	4,5147	4,5126	4,4922	4,4846	4,4704	4,4473	4,4587	4,4383	4,4156	4,4918	4,4626	4,4220		
A _s	1,070	1,078	1,074	1,078	1,073	1,076	1,073	1,075	1,077	1,065	0,951	0,723		
T _f	1,114	1,122	1,119	1,121	1,120	1,117	1,114	1,116	1,116	1,103	0,989	0,750		
N [št. teoretskih podov]	7701,7	7732,0	7738,7	7744,0	7757,3	7571,0	7437,0	7185,3	6986,5	6156,0	3207,3	1298,7		

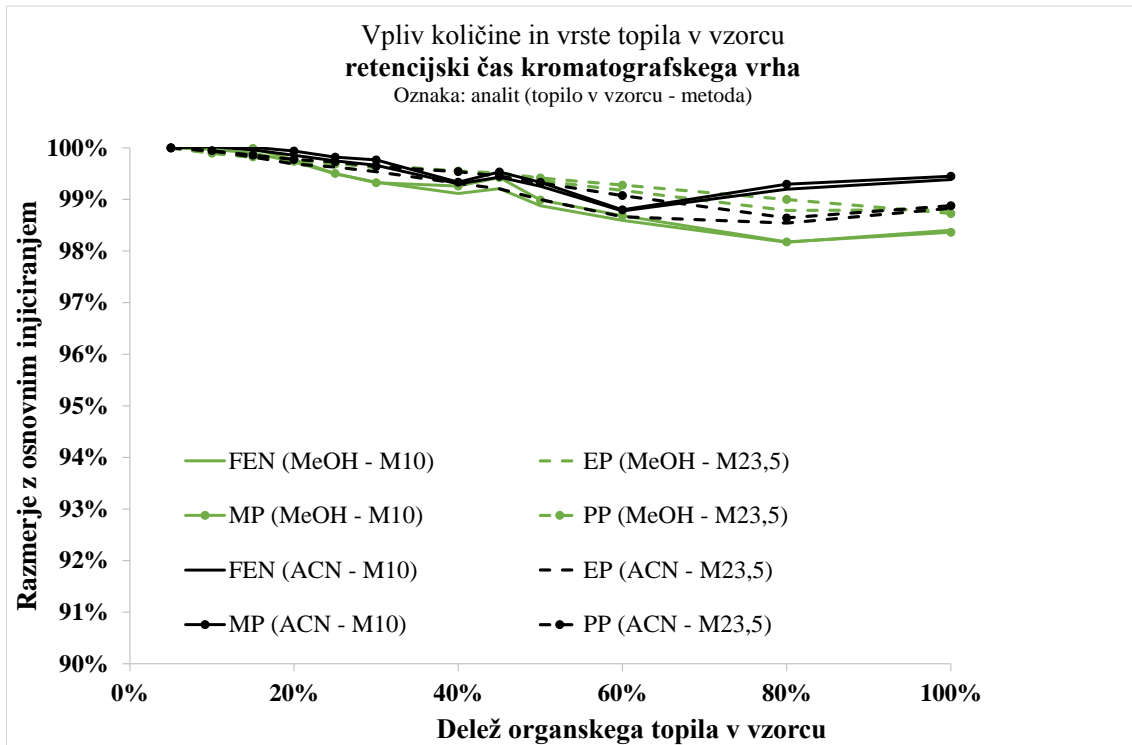
Priloga 3



Slika 25: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na h.

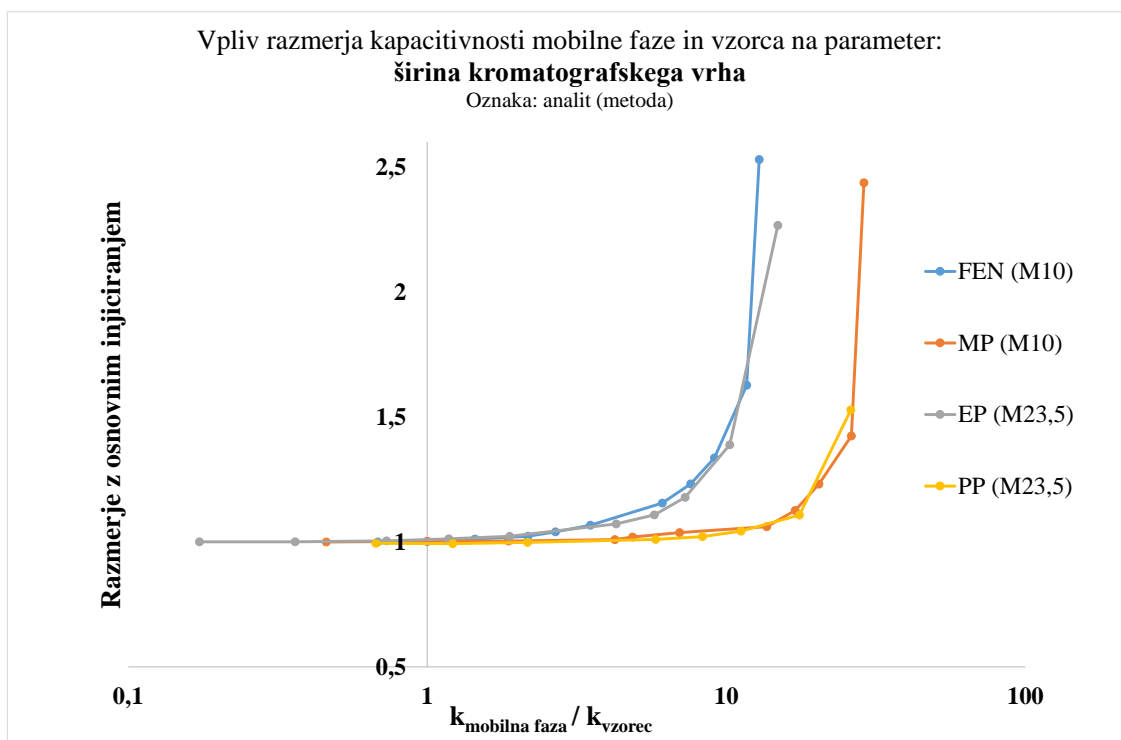
Slika 26: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na $W_{1/2}$.

Slika 27: Vpliv količine in vrste topila v injiciranem vzorcu na A_s Slika 28: Vpliv količine in vrste topila v vzorcu na T_f

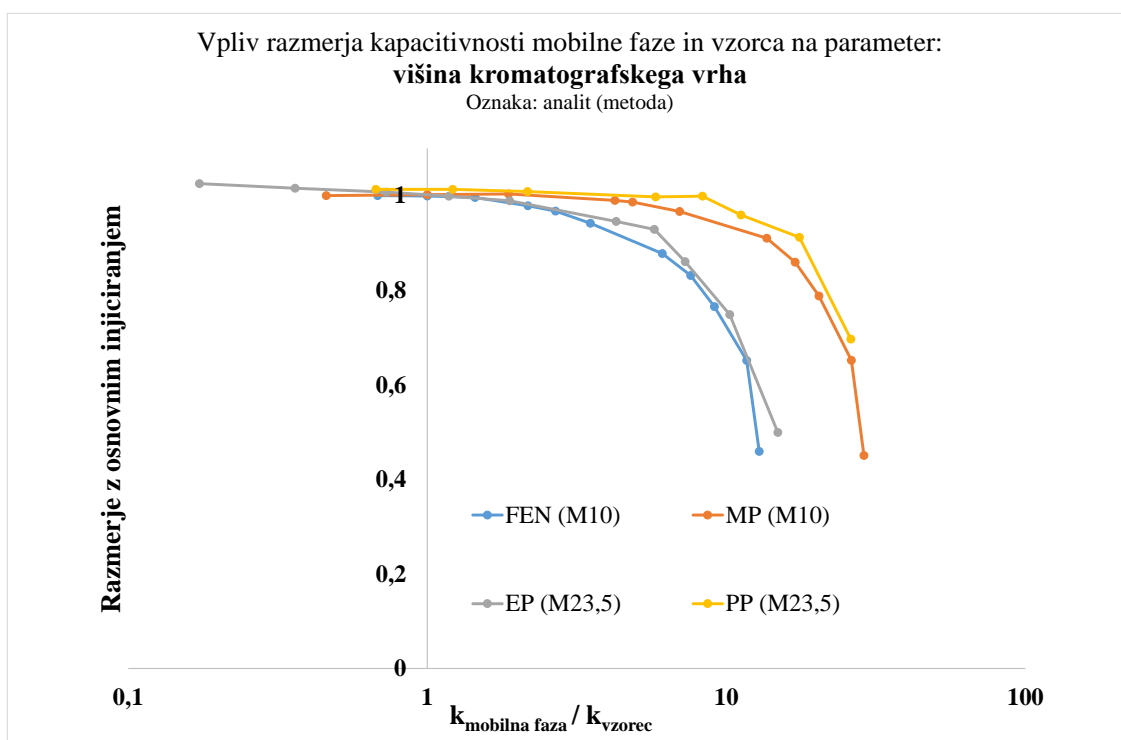


Slika 29: Vpliv količine in vrste topila v vzorcu na t_R .

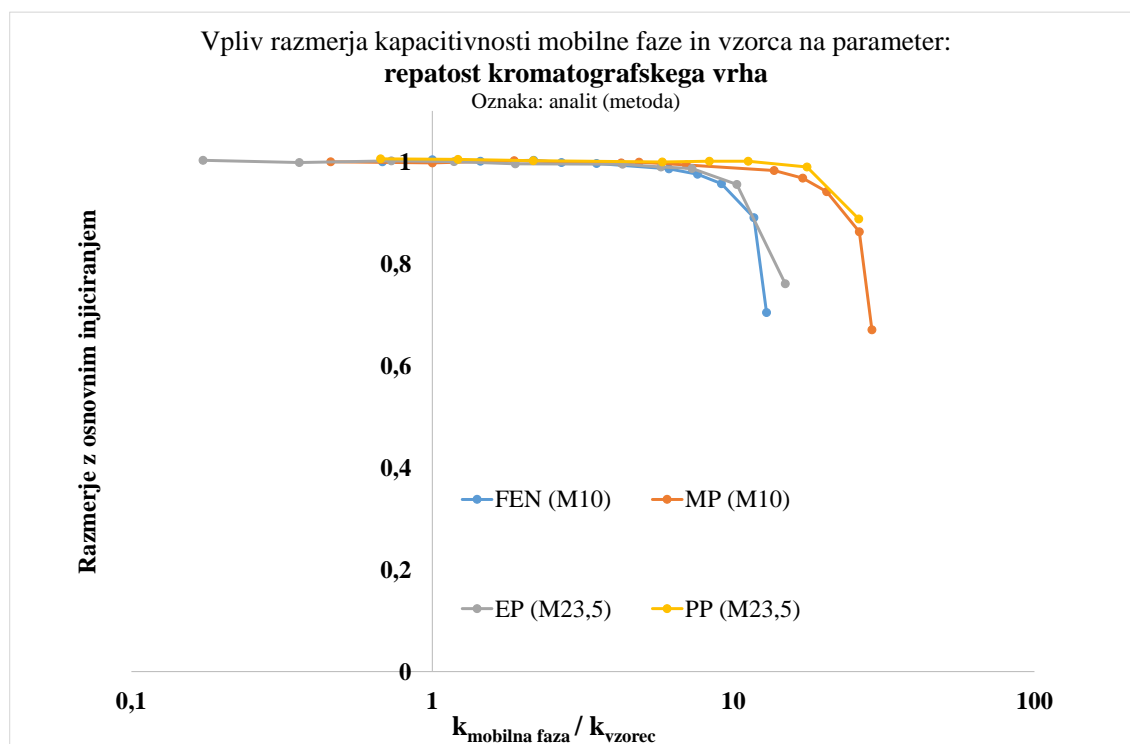
Priloga 4



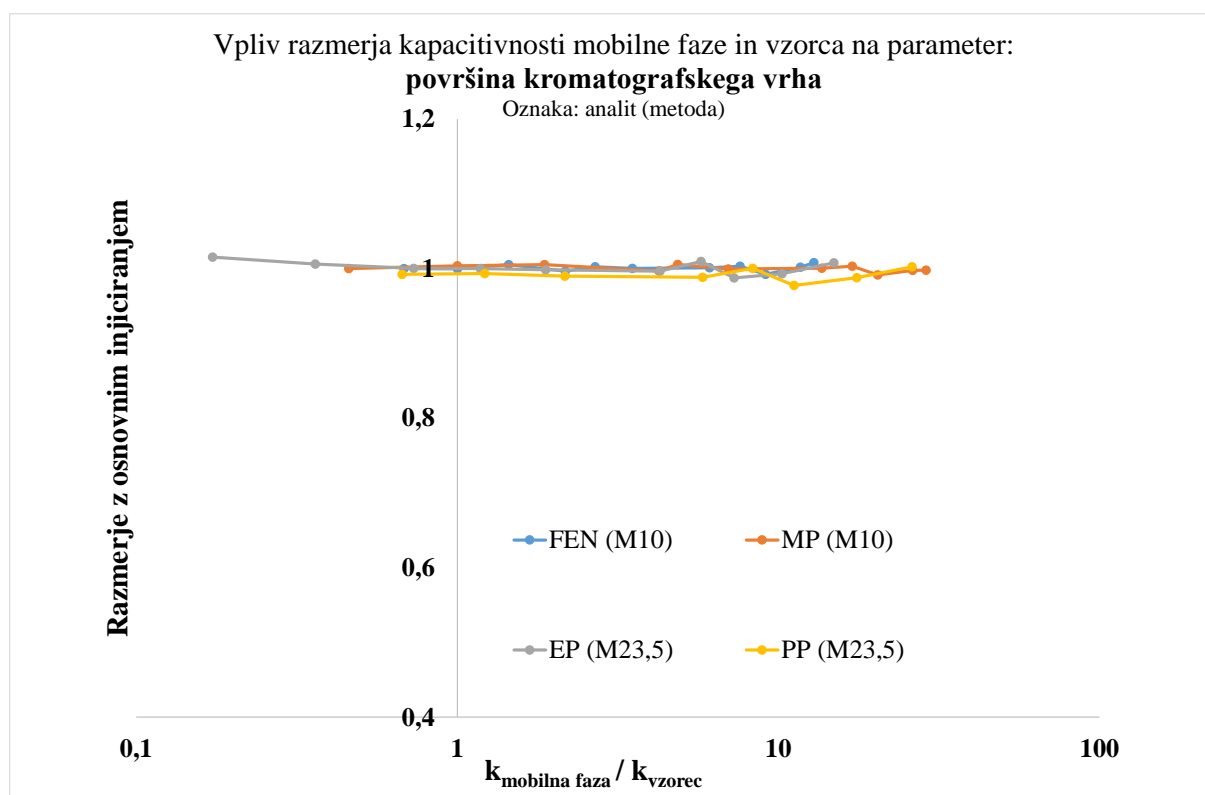
Slika 30: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter $W_{1/2}$.



Slika 31: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter h .



Slika 32: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na parameter T_f .



Slika 33: Vpliv razmerja kapacitivnostnega faktorja MF s kapacitivnostnim faktorjem vzorca na površino kromatografskega vrha.

Priloga 5

Prikazani so podatki za izračun vpliva volumna injiciranja v odvisnosti od deleža ACN v vzorcu.

Metoda: M₁₀

		Parametri kromatografskega vrha	Volumen ACN v vzorcu [mL]													
			0,5	0,1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10		
Volumen injiciranja: 10 µL	RES	t _R [min]	0,6364	0,6354	0,6337	0,6317	0,6292	0,6275	0,6274	0,6295	0,6302	0,6297	0,6323	0,6334		
		h [mAU]	579,70	558,89	523,68	471,28	411,39	345,26	244,07	211,39	182,85	149,38	109,50	84,14		
		Površina [mAU*s]	712,01	714,54	716,84	713,06	719,73	718,34	722,76	726,87	719,78	725,91	765,01	717,14		
		W _{1/2} [min]	0,0171	0,0179	0,0193	0,0217	0,0257	0,0314	0,0471	0,0562	0,0666	0,0870	0,1014	0,0909		
		Začetek krom. vrha [min]	0,5962	0,5917	0,5921	0,5926	0,5769	0,5739	0,5546	0,5485	0,5273	0,4844	0,3240	0,3107		
		Konec krom. vrha [min]	0,9852	0,9750	0,9754	0,9819	1,0142	0,9819	0,9683	1,0367	1,0454	1,0191	1,0614	1,0416		
		A _s	1,2539	1,2792	1,2741	1,2778	1,2414	1,1795	0,9234	0,8350	0,7684	0,6852	0,6012	0,5663		
		T _f	1,4397	1,4540	1,4369	1,4279	1,3814	1,3073	1,0216	0,9209	0,8404	0,7367	0,6351	0,5899		
		N [št. teoretskih podov]	7712,00	7018,33	5972,33	4689,00	3316,33	2207,33	984,67	694,67	495,67	290,33	215,67	271,33		
		t _R [min]	1,8539	1,8543	1,8532	1,8512	1,8493	1,8477	1,8410	1,8434	1,8402	1,8313	1,8390	1,8425		
		h [mAU]	74,82	74,77	74,53	73,21	72,37	70,46	65,66	62,18	57,25	48,74	34,35	26,37		
		Površina [mAU*s]	243,77	243,67	245,05	242,90	244,34	243,81	244,00	244,55	241,88	244,20	245,67	244,80		
W _{1/2} [min]	0,0481	0,0482	0,0486	0,0492	0,0500	0,0513	0,0556	0,0592	0,0643	0,0782	0,1217	0,1555				
Začetek krom. vrha [min]	1,7519	1,7646	1,7646	1,7593	1,7606	1,7512	1,7406	1,7335	1,7313	1,7169	1,6611	1,5142				
Konec krom. vrha [min]	2,1728	2,1266	2,1580	2,1282	2,1378	2,1510	2,1154	2,1176	2,1179	2,1095	2,1171	2,0714				
A _s	1,1047	1,1100	1,1053	1,1078	1,1058	1,1031	1,0942	1,0804	1,0630	0,9848	0,7735	0,6489				
T _f	1,1633	1,1681	1,1648	1,1667	1,1615	1,1594	1,1471	1,1350	1,1132	1,0359	0,8194	0,6686				
N [št. teoretskih podov]	8238,67	8207,33	8045,67	7850,67	7572,00	7183,67	6083,33	5365,33	4542,33	3035,67	1266,00	778,00				
Volumen injiciranja: 10 µL	MP	t _R [min]	3,8713	3,8737	3,8718	3,8689	3,8644	3,8622	3,8456	3,8532	3,8454	3,8248	3,8440	3,8501		
		h [mAU]	53,85	53,95	54,03	53,31	53,12	52,04	48,99	46,28	42,42	35,09	24,26	18,40		
		Površina [mAU*s]	373,99	375,37	375,93	372,74	376,03	373,78	374,16	375,17	370,82	373,08	373,21	366,25		
		W _{1/2} [min]	0,1042	0,1044	0,1046	0,1051	0,1063	0,1081	0,1156	0,1233	0,1343	0,1683	0,2739	0,2558		
		Začetek krom. vrha [min]	3,7017	3,6940	3,6808	3,6839	3,6791	3,6792	3,6507	3,6509	3,6367	3,5828	3,4460	3,0468		
		Konec krom. vrha [min]	4,3004	4,3035	4,2741	4,2590	4,3133	4,2722	4,2536	4,2751	4,2892	4,2606	4,2371	4,2453		
		A _s	1,0780	1,0772	1,0803	1,0775	1,0797	1,0737	1,0634	1,0483	1,0203	0,9284	0,7205	0,6153		
		T _f	1,1218	1,1194	1,1245	1,1196	1,1212	1,1149	1,1026	1,0859	1,0561	0,9680	0,7522	0,6241		
		N [št. teoretskih podov]	7652,33	7620,67	7592,33	7501,00	7327,33	7077,67	6135,67	5407,67	4542,33	2860,00	1091,33	1255,00		
		Volumen injiciranja: 5 µL	RES	t _R [min]	0,6337	0,6318	0,6298	0,6279	0,6265	0,6264	0,6268		0,6282			
				h [mAU]	575,28	537,87	486,37	414,94	364,65	298,03	227,50		158,34			
				Površina [mAU*s]	708,12	708,38	713,00	714,60	716,14	719,89	723,97		733,59			
W _{1/2} [min]	0,0172			0,0185	0,0210	0,0253	0,0298	0,0377	0,0535		0,0801					
Začetek krom. vrha [min]	0,5964			0,5885	0,5869	0,5758	0,5615	0,5569	0,5344		0,4690					
Konec krom. vrha [min]	0,9483			0,9617	0,9756	0,9853	0,9767	1,0352	1,0062		0,9783					
A _s	1,2456			1,2488	1,2496	1,2117	1,1397	1,0074	0,8291		0,6680					
T _f	1,4265			1,4173	1,4054	1,3525	1,2727	1,1268	0,9185		0,7176					
N [št. teoretskih podov]	7546,67			6440,67	4984,00	3401,50	2545,33	1593,33	846,00		340,67					
Volumen injiciranja: 5 µL	FEN			t _R [min]	1,8527	1,8505	1,8487	1,8474	1,8448	1,8410	1,8344		1,8304			
				h [mAU]	74,52	74,20	73,81	72,43	71,20	67,96	60,10		49,10			
				Površina [mAU*s]	242,21	242,63	243,31	243,17	243,22	243,48	244,38		245,97			
		W _{1/2} [min]	0,0480	0,0483	0,0488	0,0497	0,0507	0,0535	0,0617		0,0783					
		Začetek krom. vrha [min]	1,7690	1,7541	1,7574	1,7601	1,7418	1,7500	1,7305		1,7048					
		Konec krom. vrha [min]	2,1387	2,1371	2,1208	2,1239	2,1283	2,1390	2,1275		2,0745					
		A _s	1,1030	1,1040	1,1049	1,1065	1,1010	1,0968	1,0583		0,9596					
		T _f	1,1637	1,1623	1,1657	1,1643	1,1602	1,1508	1,1118		1,0134					
		N [št. teoretskih podov]	8242,00	8121,67	7943,67	7644,33	7342,67	6561,00	4902,67		3030,00					
		Volumen injiciranja: 5 µL	MP	t _R [min]	3,8723	3,8685	3,8639	3,8613	3,8560	3,8463	3,8310		3,8242			
				h [mAU]	53,61	53,42	53,37	52,83	52,15	50,01	43,79		34,54			
				Površina [mAU*s]	372,59	372,65	374,06	373,06	373,10	373,35	374,10		373,14			
W _{1/2} [min]	0,1043			0,1046	0,1050	0,1063	0,1076	0,1126	0,1310		0,1728					
Začetek krom. vrha [min]	3,6949			3,6906	3,6889	3,6742	3,6792	3,6656	3,5978		3,5656					
Konec krom. vrha [min]	4,2768			4,3058	4,2982	4,2658	4,2718	4,2729	4,2309		4,1745					
A _s	1,0762			1,0777	1,0766	1,0749	1,0739	1,0656	1,0255		0,8898					
T _f	1,1195			1,1222	1,1179	1,1181	1,1166	1,1043	1,0611		0,9270					
N [št. teoretskih podov]	7636,33			7579,67	7502,00	7317,00	7111,33	6460,33	4740,00		2712,67					

Parametri kromatografskega vrha		Volumen ACN v vzorcu [mL]															
		0,1	1,5	2	3	4	4,5	5	6	8	10	12					
Volumen injiciranja: 7,5 µL	RES	t_R [min]	0,6299		0,6250		0,6271		0,6289								
		h [mAU]	502,66		309,02		191,83		139,63								
		Površina [mAU*s]	707,81		712,68		717,09		743,23								
		$W_{1/2}$ [min]	0,0200		0,0353		0,0629		0,0906								
		Začetek krom. vrha [min]	0,5873		0,5613		0,5265		0,3591								
		Konec krom. vrha [min]	0,9901		1,0266		1,0047		1,0307								
		A_s	1,2692		1,0840		0,7714		0,6516								
		T_f	1,4270		1,2051		0,8456		0,6991								
		N [št. teoretskih podov]	5514,33		1739,33		550,33		267,00								
		FEN	t_R [min]	1,8448		1,8398		1,8319		1,8288							
		h [mAU]	73,42		68,99		58,61		44,09								
		Površina [mAU*s]	241,34		241,57		242,04		242,32								
	$W_{1/2}$ [min]	0,0486		0,0521		0,0626		0,0872									
	Začetek krom. vrha [min]	1,7510		1,7428		1,7228		1,6997									
	Konec krom. vrha [min]	2,1165		2,1227		2,1274		2,1109									
	A_s	1,1089		1,0985		1,0644		0,9170									
	T_f	1,1681		1,1590		1,1179		0,9697									
	N [št. teoretskih podov]	7970,33		6910,67		4746,33		2435,00									
	MP	t_R [min]	3,8512		3,8415		3,8245		3,8171								
	h [mAU]	53,27		50,88		43,06		31,14									
	Površina [mAU*s]	371,03		370,52		369,49		370,02									
	$W_{1/2}$ [min]	0,1047		0,1097		0,1317		0,1932									
	Začetek krom. vrha [min]	3,6792		3,6591		3,6158		3,5234									
	Konec krom. vrha [min]	4,2683		4,2790		4,2460		4,2185									
	A_s	1,0778		1,0750		1,0224		0,8476									
	T_f	1,1214		1,1141		1,0618		0,8866									
	N [št. teoretskih podov]	7492,67		6790,67		4674,67		2163,00									
Volumen injiciranja: 15 µL	RES	t_R [min]	0,6341		0,6298		0,6256		0,6284				0,5256				
		h [mAU]	540,13		443,21		248,19		168,87				55,09				
		Površina [mAU*s]	713,84		733,38		726,62		729,70				477,77				
		$W_{1/2}$ [min]	0,0185		0,0241		0,0454		0,0727				0,0812				
		Začetek krom. vrha [min]	0,5946		0,5844		0,5630		0,5201				0,3200				
		Konec krom. vrha [min]	0,9984		1,0211		1,0279		1,0147				0,8242				
		A_s	1,2935		1,2936		0,9999		0,7679				0,7754				
		T_f	1,4660		1,4358		1,1168		0,8423				0,7997				
		N [št. teoretskih podov]	6522,00		3793,00		1050,67		414,33				247,33				
		FEN	t_R [min]	1,8464		1,8434		1,8364		1,8301				1,8351			
		h [mAU]	74,14		74,11		65,70		55,46				24,46				
		Površina [mAU*s]	242,37		248,50		242,55		242,85				243,28				
	$W_{1/2}$ [min]	0,0483		0,0497		0,0553		0,0671				0,1847					
	Začetek krom. vrha [min]	1,7628		1,7529		1,7370		1,7228				1,5436					
	Konec krom. vrha [min]	2,1280		2,1237		2,1298		2,1115				2,0935					
	A_s	1,1076		1,1065		1,0965		1,0611				0,6520					
	T_f	1,1657		1,1662		1,1521		1,1133				0,6801					
	N [št. teoretskih podov]	8087,00		7615,00		6121,00		4122,33				547,00					
	MP	t_R [min]	3,8508		3,8423		3,8307		3,8175				3,8259				
	h [mAU]	54,03		54,78		49,47		41,76				17,51					
	Površina [mAU*s]	374,52		383,38		371,59		371,73				367,29					
	$W_{1/2}$ [min]	0,1040		0,1050		0,1132		0,1374				0,2815					
	Začetek krom. vrha [min]	3,6727		3,6519		3,6459		3,6025				3,1097					
	Konec krom. vrha [min]	4,2998		4,2693		4,2610		4,2378				4,1965					
	A_s	1,0782		1,0782		1,0711		1,0288				0,6158					
	T_f	1,1207		1,1202		1,1104		1,0646				0,6337					
	N [št. teoretskih podov]	7590,33		7419,00		6344,67		4278,33				1023,67					
Volumen injiciranja: 20 µL	RES	t_R [min]	0,6375		0,6353		0,6314		0,6275		0,6249		0,6260		0,6337	0,6356	
		h [mAU]	564,04		522,60		438,79		347,72		252,10		213,32		130,61	99,20	
		Površina [mAU*s]	714,06		718,14		718,14		722,07		719,42		737,70		729,34	748,87	
		$W_{1/2}$ [min]	0,0175		0,0193		0,0237		0,0313		0,0446		0,0552		0,0989	0,1383	
		Začetek krom. vrha [min]	0,5971		0,5928		0,5878		0,5717		0,5643		0,5562		0,4974	0,3306	
		Konec krom. vrha [min]	1,0215		1,0002		1,0131		1,0164		1,0255		1,0140		1,0514	1,0356	
		A_s	1,2791		1,2962		1,3080		1,2710		1,0982		0,9431		0,6947	0,6152	
		T_f	1,4642		1,4635		1,4488		1,3990		1,2094		1,0383		0,7507	0,6564	
		N [št. teoretskih podov]	7313,67		6019,00		3937,00		2225,00		1088,33		713,67		225,67	116,33	
		FEN	t_R [min]	1,8470		1,8478		1,8450		1,8418		1,8378		1,8351		1,8267	1,8298
		h [mAU]	74,78		74,31		72,71		70,24		65,93		63,64		46,41	33,75	
		Površina [mAU*s]	243,53		243,68		243,88		243,89		243,50		248,79		245,02	244,37	
	$W_{1/2}$ [min]	0,0482		0,0486		0,0497		0,0516		0,0553		0,0589		0,0832	0,1204		
	Začetek krom. vrha [min]	1,7572		1,7547		1,7548		1,7501		1,7410		1,7340		1,7112	1,6637		
	Konec krom. vrha [min]	2,1255		2,1256		2,1395		2,1305		2,1201		2,1204		2,1052	2,1199		
	A_s	1,1099		1,1126		1,1061		1,1110		1,1074		1,0986		1,0091	0,8177		
	T_f	1,1711		1,1730		1,1657		1,1680		1,1623		1,1523		1,0620	0,8668		
	N [št. teoretskih podov]	8130,33		8006,67		7626,67		7067,00		6126,00		5377,67		2671,00	1279,33		
	MP	t_R [min]	3,8486		3,8504		3,8461		3,8397		3,8325		3,8275		3,8092	3,8156	
	h [mAU]	54,10		53,67		52,78		52,78		50,13		48,88		34,80	24,61		
	Površina [mAU*s]	374,10		376,12		374,28		375,24		372,01		381,66		374,90	371,27		
	$W_{1/2}$ [min]	0,1038		0,1038		0,1047		0,1071		0,1119		0,1185		0,1710	0,2619		
	Začetek krom. vrha [min]	3,6693		3,6697		3,6665		3,6551		3,6387		3,6358		3,5649	3,4509		
	Konec krom. vrha [min]	4,2819		4,3030		4,2587		4,2595		4,2476		4,2887		4,2433	4,2095		
	A_s	1,0775		1,0792		1,0761		1,0752		1,0697		1,0628		0,9523	0,7600		
	T_f	1,1202		1,1217		1,1156		1,1148		1,1084		1,1020		0,9904	0,7959		
	N [št. teoretskih podov]	7623,33		7629,00		7470,67		7123,33		6493,67		5782,67		2750,00	1175,33		

Metoda: M_{23,5}

Parametri kromatografskega vrha		Volumen ACN v vzorcu [mL]												
		0,5	0,1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	
Volumen injiciranja: 10 μ L	EP	t _R [min]	1,8358	1,8347	1,8325	1,8300	1,8290	1,8273	1,8232	1,8213	1,8174	1,8113	1,8090	1,8143
	h [mAU]	113,15	116,00	114,91	114,00	113,04	111,91	106,97	105,08	97,37	84,70	56,49	40,64	
	Površina [mAU*s]	354,80	363,28	359,92	357,84	357,77	357,21	356,58	361,15	353,31	355,34	360,50	363,47	
	W _{1/2} [min]	0,0461	0,0461	0,0461	0,0463	0,0467	0,0471	0,0494	0,0511	0,0543	0,0640	0,1045	0,1515	
	Začetek krom. vrha [min]	1,7469	1,7426	1,7377	1,7356	1,7426	1,7413	1,7234	1,7210	1,7132	1,6999	1,6519	1,4726	
	Konec krom. vrha [min]	2,1257	2,1008	2,1226	2,1171	2,1298	2,1079	2,1109	2,1020	2,0967	2,1096	2,0955	2,0729	
	A _s	1,1048	1,1048	1,1043	1,1042	1,1075	1,1064	1,1049	1,1000	1,0982	1,0663	0,8400	0,6689	
	T _f	1,1687	1,1722	1,1672	1,1707	1,1692	1,1642	1,1634	1,1570	1,1535	1,1171	0,8893	0,6936	
	N [št. teoretskih podov]	8795,67	8778,33	8752,67	8669,33	8509,00	8323,67	7549,00	7042,33	6207,33	4436,67	1662,33	794,67	
	PP	t _R [min]	4,0752	4,0730	4,0695	4,0660	4,0642	4,0605	4,0565	4,0528	4,0477	4,0376	4,0199	4,0296
	h [mAU]	45,89	47,09	46,82	46,50	46,50	46,29	45,76	45,85	44,01	41,84	31,97	22,04	
	Površina [mAU*s]	334,19	342,33	340,01	336,55	336,90	335,76	335,23	339,22	331,53	335,07	340,02	341,92	
	W _{1/2} [min]	0,1093	0,1090	0,1089	0,1088	0,1086	0,1092	0,1104	0,1117	0,1140	0,1211	0,1671	0,2633	
	Začetek krom. vrha [min]	3,8886	3,8939	3,8694	3,8853	3,8615	3,8595	3,8570	3,8696	3,8606	3,8333	3,7692	3,5974	
Konec krom. vrha [min]	4,5147	4,5126	4,4922	4,4846	4,4704	4,4473	4,4587	4,4383	4,4156	4,4918	4,4626	4,4220		
A _s	1,0704	1,0782	1,0743	1,0777	1,0730	1,0758	1,0728	1,0750	1,0766	1,0651	0,9505	0,7233		
T _f	1,1143	1,1220	1,1192	1,1207	1,1196	1,1166	1,1140	1,1157	1,1155	1,1031	0,9894	0,7502		
N [št. teoretskih podov]	7701,67	7732,00	7738,67	7744,00	7757,33	7571,00	7437,00	7185,33	6986,50	6156,00	3207,33	1298,67		
Volumen injiciranja: 5 μ L	EP	t _R [min]	1,8295	1,8277	1,8253	1,8231	1,8216	1,8179	1,8118		1,8060			
	h [mAU]	113,56	113,29	113,37	112,30	112,05	106,00	94,30		74,73				
	Površina [mAU*s]	355,62	355,16	357,09	357,81	363,88	356,38	358,39		356,61				
	W _{1/2} [min]	0,0460	0,0462	0,0465	0,0470	0,0480	0,0499	0,0571		0,0742				
	Začetek krom. vrha [min]	1,7418	1,7394	1,7305	1,7237	1,7319	1,7237	1,6915		1,6787				
	Konec krom. vrha [min]	2,1296	2,0992	2,0917	2,1103	2,1074	2,0980	2,1109		2,0904				
	A _s	1,1031	1,1047	1,1024	1,1028	1,1027	1,1005	1,0770		0,9821				
	T _f	1,1727	1,1672	1,1682	1,1647	1,1628	1,1578	1,1331		1,0363				
	N [št. teoretskih podov]	8753,00	8681,33	8542,33	8343,33	7973,33	7365,33	5577,00		3282,33				
	PP	t _R [min]	4,0630	4,0613	4,0570	4,0537	4,0527	4,0466	4,0385		4,0245			
	h [mAU]	46,18	46,21	46,36	46,37	47,00	45,54	43,69		38,71				
	Površina [mAU*s]	333,94	334,96	335,21	336,28	342,81	335,64	338,00		335,23				
	W _{1/2} [min]	0,1083	0,1085	0,1088	0,1093	0,1096	0,1108	0,1165		0,1324				
	Začetek krom. vrha [min]	3,8628	3,8756	3,8669	3,8759	3,8646	3,8469	3,8412		3,8019				
Konec krom. vrha [min]	4,4590	4,4793	4,4333	4,4608	4,4626	4,4619	4,4869		4,4238					
A _s	1,0777	1,0745	1,0737	1,0750	1,0763	1,0761	1,0653		1,0353					
T _f	1,1204	1,1194	1,1191	1,1194	1,1195	1,1189	1,1047		1,0702					
N [št. teoretskih podov]	7793,33	7766,67	7710,67	7619,33	7577,00	7385,00	6654,33		5121,67					

Parameter		Volumen ACN v vzorcu [ml]															
		0,1	1,5	2	3	4	4,5	5	6	8	10	12					
Volumen injiciranja: 7,5µL	EP	t_R [min]	1,8263		1,8230		1,8141		1,8075								
		h [mAU]	112,68		108,90		95,66		71,92								
		Površina [mAU*s]	353,57		353,42		352,60		352,32								
		$W_{1/2}$ [min]	0,0462		0,0480		0,0552		0,0765								
		Začetek krom. vrha [min]	1,7438		1,7318		1,7156		1,6881								
		Konec krom. vrha [min]	2,1255		2,0937		2,0907		2,0885								
		A_s	1,1081		1,1044		1,0950		0,9886								
		T_f	1,1722		1,1647		1,1495		1,0396								
		N [št. teoretskih podov]	8644,33		7985,33		5977,67		3096,67								
		PP	Retencijski čas [min]	4,0558		4,0544		4,0411		4,0281							
			Višina krom. vrha [mAU]	45,97		45,57		43,64		38,07							
			Površina krom. vrha [mAU*s]	332,35		332,59		332,05		331,99							
			Širina krom. vrha [min]	0,1086		0,1097		0,1149		0,1333							
			Začetek krom. vrha [min]	3,8517		3,8610		3,8434		3,8114							
		Konec krom. vrha [min]	4,4430		4,4694		4,4674		4,4568								
		Simetrija krom. vrha	1,0769		1,0739		1,0744		1,0376								
		Repatost krom. vrha	1,1220		1,1160		1,1131		1,0721								
		Učinkovitost kolone	7726,00		7564,67		6856,33		5056,33								
Volumen injiciranja: 15 µL	EP	t_R [min]	1,8341		1,8315		1,8265		1,8177				1,8123				
		h [mAU]	113,85		120,94		108,48		100,56				38,76				
		Površina [mAU*s]	357,34		379,44		352,84		354,91				353,38				
		$W_{1/2}$ [min]	0,0461		0,0462		0,0481		0,0527				0,1646				
		Začetek krom. vrha [min]	1,7406		1,7339		1,7360		1,7224				1,5706				
		Konec krom. vrha [min]	2,1347		2,1392		2,1155		2,0974				2,0931				
		A_s	1,1083		1,1102		1,1097		1,1040				0,6948				
		T_f	1,1752		1,1737		1,1711		1,1604				0,7302				
		N [št. teoretskih podov]	8765,33		8701,67		8001,67		6602,33				672,00				
		PP	t_R [min]	4,0677		4,0633		4,0580		4,0451				4,0220			
			h [mAU]	46,36		49,47		45,50		44,82				21,77			
			Površina [mAU*s]	335,88		357,89		332,07		334,22				331,36			
			$W_{1/2}$ [min]	0,1089		0,1086		0,1096		0,1124				0,2626			
			Začetek krom. vrha [min]	3,8849		3,8669		3,8767		3,8528				3,6591			
		Konec krom. vrha [min]	4,4493		4,5011		4,4760		4,4428				4,4028				
		A_s	1,0797		1,0777		1,0754		1,0760				0,7591				
		T_f	1,1236		1,1218		1,1189		1,1142				0,7921				
		N [št. teoretskih podov]	7731,67		7754,00		7597,00		7180,33				1300,33				
Volumen injiciranja: 20µL	EP	t_R [min]	1,8382		1,8365		1,8333		1,8319		1,8281		1,8278	1,8177	1,8075	1,8091	
		h [mAU]	113,14		115,04		113,63		113,46		110,36		116,28	94,12	68,70	50,86	
		Površina [mAU*s]	355,03		361,16		357,01		358,29		354,92		375,64	358,20	354,96	362,18	
		$W_{1/2}$ [min]	0,0462		0,0461		0,0463		0,0465		0,0475		0,0478	0,0573	0,0812	0,1174	
		Začetek krom. vrha [min]	1,7419		1,7294		1,7266		1,7417		1,7365		1,7317	1,7071	1,6908	1,6367	
		Konec krom. vrha [min]	2,1160		2,1275		2,1290		2,1243		2,1137		2,1126	2,1104	2,1022	2,0761	
		A_s	1,1074		1,1100		1,1096		1,1093		1,1070		1,1084	1,0997	1,0282	0,8344	
		T_f	1,1777		1,1783		1,1727		1,1737		1,1672		1,1701	1,1566	1,0794	0,8824	
		N [št. teoretskih podov]	8777,33		8777,00		8690,00		8592,00		8201,67		8114,00	5585,00	2747,33	1316,00	
		PP	t_R [min]	4,0725		4,0688		4,0622		4,0625		4,0566		4,0580	4,0466	4,0300	4,0126
			h [mAU]	46,07		46,92		46,39		46,54		45,94		48,70	44,17	38,20	30,72
			Površina [mAU*s]	334,35		339,44		334,66		338,13		333,75		354,01	337,97	332,86	341,19
			$W_{1/2}$ [min]	0,1088		0,1088		0,1086		0,1089		0,1094		0,1092	0,1154	0,1339	0,1761
			Začetek krom. vrha [min]	3,8810		3,8769		3,8783		3,8688		3,8772		3,8637	3,8454	3,8158	3,7633
		Konec krom. vrha [min]	4,4832		4,4789		4,4412		4,4915		4,4619		4,4768	4,5039	4,4220	4,4436	
		A_s	1,0789		1,0807		1,0792		1,0759		1,0751		1,0717	1,0725	1,0473	0,9566	
		T_f	1,1212		1,1245		1,1216		1,1214		1,1179		1,1154	1,1113	1,0808	0,9936	
		N [št. teoretskih podov]	7769,33		7754,33		7749,67		7711,67		7611,33		7655,33	6810,00	5020,00	2876,67	

Priloga 6

Rezultati vpliva volumna injiciranja so razvrščeni v preglednicah po analitih in količini injiciranega vzorca. V prvi vrstici preglednice je navedena količina organskega topila (ACN) v injiciranem vzorcu. Vpliv je izražen kot delež ujemanja z osnovnim injiciranjem. Vrednosti obarvane z rdečo, predstavljajo manjše ali večje popačenje kromatografskega vrha. Za vsak volumen injiciranja smo preverili le izbrane deleže organskega topila v vzorcu. V primeru praznih polj, primerjave nismo izvedli. Namenomo smo jih pustili v preglednici, zaradi lažje primerjave trendov popačenja med posameznimi sklopi analiz.

Preglednica XVI: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov FEN v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.

	količina topila [μL]	Mno - FEN												
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12
injiciranje: 5 μL	t_R	99,9%	99,8%	99,7%	99,6%	99,5%	99,3%	98,9%		98,7%				
	h	99,6%	99,2%	98,6%	96,8%	95,2%	90,8%	80,3%		65,6%				
	površina kromatografskega vrha	99,4%	99,5%	99,8%	99,8%	99,8%	99,9%	100,3%		100,9%				
	$W_{1/2}$	99,9%	100,5%	101,5%	103,4%	105,5%	111,3%	128,3%		162,8%				
	začetek kromatografskega vrha	101,0%	100,1%	100,3%	100,5%	99,4%	99,9%	98,8%		97,3%				
	konec kromatografskega vrha	98,4%	98,4%	97,6%	97,8%	98,0%	98,4%	97,9%		95,5%				
	A_s	99,8%	99,9%	100,0%	100,2%	99,7%	99,3%	95,8%		86,9%				
	T_r	100,0%	99,9%	100,2%	100,1%	99,7%	98,9%	95,6%		87,1%				
	N	100,0%	98,6%	96,4%	92,8%	89,1%	79,6%	59,5%		36,8%				
injiciranje: 7,5 μL	t_R			99,5%			99,2%		98,8%		98,6%			
	h			98,1%			92,2%		78,3%		58,9%			
	površina kromatografskega vrha			99,0%			99,1%		99,3%		99,4%			
	$W_{1/2}$			101,2%			108,3%		130,2%		181,4%			
	začetek kromatografskega vrha			99,9%			99,5%		98,3%		97,0%			
	konec kromatografskega vrha			97,4%			97,7%		97,9%		97,2%			
	A_s			100,4%			99,4%		96,4%		83,0%			
	T_r			100,4%			99,6%		96,1%		83,4%			
	N			96,7%			83,9%		57,6%		29,6%			
injiciranje: 10 μL	t_R	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%	99,7%	99,7%	99,3%	99,4%	99,3%	98,8%	99,2%	99,4%	
	h	100,0%	99,9%	99,6%	97,8%	96,7%	94,2%	87,8%	83,1%	76,5%	65,1%	45,9%	35,2%	
	površina kromatografskega vrha	100,0%	100,0%	100,5%	99,6%	100,2%	100,0%	100,1%	100,3%	99,2%	100,2%	100,8%	100,4%	
	$W_{1/2}$	100,0%	100,2%	101,2%	102,3%	104,0%	106,7%	115,6%	123,2%	133,7%	162,7%	253,1%	323,4%	
	začetek kromatografskega vrha	100,0%	100,7%	100,7%	100,4%	100,5%	100,0%	99,3%	98,9%	98,8%	98,0%	94,8%	86,4%	
	konec kromatografskega vrha	100,0%	97,9%	99,3%	97,9%	98,4%	99,0%	97,4%	97,5%	97,5%	97,1%	97,4%	95,3%	
	A_s	100,0%	100,5%	100,1%	100,3%	100,1%	99,9%	99,1%	97,8%	96,2%	89,1%	70,0%	58,7%	
	T_r	100,0%	100,4%	100,1%	100,3%	99,8%	99,7%	98,6%	97,6%	95,7%	89,1%	70,4%	57,5%	
	N	100,0%	99,6%	97,7%	95,3%	91,9%	87,2%	73,8%	65,1%	55,1%	36,8%	15,4%	9,4%	
injiciranje: 15 μL	t_R			99,6%			99,4%		99,1%		98,7%			99,0%
	h			99,1%			99,1%		87,8%		74,1%			32,7%
	površina kromatografskega vrha			99,4%			101,9%		99,5%		99,6%			99,8%
	$W_{1/2}$			100,5%			103,4%		114,9%		139,5%			384,2%
	začetek kromatografskega vrha			100,6%			100,1%		99,1%		98,3%			88,1%
	konec kromatografskega vrha			97,9%			97,7%		98,0%		97,2%			96,3%
	A_s			100,3%			100,2%		99,3%		96,1%			59,0%
	T_r			100,2%			100,3%		99,0%		95,7%			58,5%
	N			98,2%			92,4%		74,3%		50,0%			6,6%
injiciranje: 20 μL	t_R		99,6%		99,7%		99,5%	99,3%		99,1%	99,0%	98,5%	98,7%	99,0%
	h		99,9%		99,3%		97,2%	93,9%		88,1%	85,1%	62,0%	45,1%	36,7%
	površina kromatografskega vrha		99,9%		100,0%		100,0%	100,1%		99,9%	102,0%	100,5%	100,2%	101,5%
	$W_{1/2}$		100,3%		101,1%		103,4%	107,3%		114,9%	122,5%	173,0%	250,5%	338,0%
	začetek kromatografskega vrha		100,3%		100,2%		100,2%	99,9%		99,4%	99,0%	97,7%	95,0%	92,2%
	konec kromatografskega vrha		97,8%		97,8%		98,5%	98,1%		97,6%	97,6%	96,9%	97,6%	97,1%
	A_s		100,5%		100,7%		100,1%	100,6%		100,2%	99,5%	91,3%	74,0%	64,5%
	T_r		100,7%		100,8%		100,2%	100,4%		99,9%	99,1%	91,3%	74,5%	64,5%
	N		98,7%		97,2%		92,6%	85,8%		74,4%	65,3%	32,4%	15,5%	8,6%

Preglednica XVIII: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov EP v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.

	količina topila [μL]	M ₁₀ - EP												
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12
injiciranje: 5 μL	t _R	99,7%	99,6%	99,4%	99,3%	99,2%	99,0%	98,7%		98,4%				
	h	100,4%	100,1%	100,2%	99,2%	99,0%	93,7%	83,3%		66,0%				
	površina kromatografskega vrha	100,2%	100,1%	100,6%	100,8%	102,0%	100,4%	101,0%		100,5%				
	W _{1/2}	99,9%	100,2%	100,9%	102,0%	104,2%	108,2%	123,9%		161,0%				
	začetek kromatografskega vrha	99,7%	99,6%	99,1%	98,7%	99,1%	98,7%	96,8%		96,1%				
	konec kromatografskega vrha	100,2%	98,8%	98,4%	99,3%	99,1%	98,7%	99,3%		98,3%				
	A _s	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	97,5%		88,9%				
	T _f	100,3%	99,9%	100,0%	99,7%	99,5%	99,1%	97,0%		88,7%				
	N	99,5%	98,7%	97,1%	94,9%	90,7%	83,7%	63,4%		37,3%				
injiciranje: 7,5 μL	t _R			99,5%			99,3%		98,8%		98,5%			
	h			99,6%			96,2%		84,5%		63,6%			
	površina kromatografskega vrha			99,7%			99,6%		99,4%		99,3%			
	W _{1/2}			100,3%			104,2%		119,8%		165,9%			
	začetek kromatografskega vrha			99,8%			99,1%		98,2%		96,6%			
	konec kromatografskega vrha			100,0%			98,5%		98,4%		98,2%			
	A _s			100,3%			100,0%		99,1%		89,5%			
	T _f			100,3%			99,7%		98,4%		89,0%			
	N			98,3%			90,8%		68,0%		35,2%			
injiciranje: 10 μL	t _R	100,0%	99,9%	99,8%	99,7%	99,6%	99,5%	99,3%	99,2%	99,0%	98,7%	98,5%	98,8%	
	h	100,0%	102,5%	101,5%	100,7%	99,9%	98,9%	94,5%	92,9%	86,0%	74,9%	49,9%	35,9%	
	površina kromatografskega vrha	100,0%	102,0%	101,4%	100,9%	100,8%	100,7%	100,5%	101,8%	99,6%	100,2%	101,6%	102,4%	
	W _{1/2}	100,0%	100,0%	100,1%	100,4%	101,3%	102,3%	107,2%	110,9%	117,8%	138,9%	226,7%	328,9%	
	začetek kromatografskega vrha	100,0%	99,8%	99,5%	99,3%	99,8%	99,7%	98,7%	98,5%	98,1%	97,3%	94,6%	84,3%	
	konec kromatografskega vrha	100,0%	98,8%	99,9%	99,6%	100,2%	99,2%	99,3%	98,9%	98,6%	99,2%	98,6%	97,5%	
	A _s	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%	100,2%	100,1%	100,0%	99,6%	99,4%	96,5%	76,0%	60,5%	
	T _f	100,0%	100,3%	99,9%	100,2%	100,0%	99,6%	99,5%	99,0%	98,7%	95,6%	76,1%	59,3%	
	N	100,0%	99,8%	99,5%	98,6%	96,7%	94,6%	85,8%	80,1%	70,6%	50,4%	18,9%	9,0%	
injiciranje: 15 μL	t _R		99,4%		99,5%		99,4%	99,2%		99,0%	98,9%	98,4%	98,6%	98,8%
	h		100,5%		100,9%		99,7%	98,0%		93,1%	90,8%	64,6%	45,7%	37,2%
	površina kromatografskega vrha		100,0%		100,6%		100,1%	100,3%		99,5%	101,9%	100,2%	99,3%	100,8%
	W _{1/2}		99,6%		99,6%		100,5%	102,8%		107,5%	113,7%	164,1%	251,5%	348,7%
	začetek kromatografskega vrha		99,1%		99,1%		99,0%	98,7%		98,3%	98,2%	96,3%	93,2%	90,0%
	konec kromatografskega vrha		99,6%		100,1%		99,0%	99,1%		98,8%	99,7%	98,7%	97,9%	98,5%
	A _s		100,0%		100,1%		99,8%	99,7%		99,2%	98,6%	88,3%	70,5%	62,0%
	T _f		99,9%		100,0%		99,4%	99,4%		98,8%	98,2%	88,3%	70,9%	62,0%
	N		99,6%		99,7%		97,6%	93,1%		84,9%	75,6%	35,9%	15,4%	8,0%
injiciranje: 20 μL	t _R		100,1%		100,0%		99,9%	99,8%		99,6%	99,6%	99,0%	98,5%	98,5%
	h		100,0%		101,7%		100,4%	100,3%		97,5%	102,8%	83,2%	60,7%	44,9%
	površina kromatografskega vrha		100,1%		101,8%		100,6%	101,0%		100,0%	101,9%	101,0%	100,0%	102,1%
	W _{1/2}		100,2%		100,1%		100,5%	101,0%		103,1%	103,7%	124,3%	176,2%	254,8%
	začetek kromatografskega vrha		99,7%		99,0%		98,8%	99,7%		99,4%	99,1%	97,7%	96,8%	93,7%
	konec kromatografskega vrha		99,5%		100,1%		100,2%	99,9%		99,4%	99,4%	99,3%	98,9%	97,7%
	A _s		100,2%		100,5%		100,4%	100,4%		100,2%	100,3%	99,5%	93,1%	75,5%
	T _f		100,8%		100,8%		100,3%	100,4%		99,9%	100,1%	99,0%	92,4%	75,5%
	N		99,8%		99,8%		98,8%	97,7%		93,2%	92,2%	63,5%	31,2%	15,0%

Preglednica XIX: Vpliv količine injiciranega vzorca na popačenje parametrov oblike kromatografskih vrhov PP v odvisnosti od količine organskega topila v vzorcu.

M ₀ - PP	injiciranje: 5 μ L		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12	
	količina topila [μ L]		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12	
	t _R		99,7%	99,7%	99,6%	99,5%	99,4%	99,3%	99,1%		98,8%					
	h		100,6%	100,7%	101,0%	101,1%	102,4%	99,2%	95,2%		84,4%					
	površina kromatografskega vrha		99,9%	100,2%	100,3%	100,6%	100,3%	100,4%	101,1%		100,3%					
	W _{1/2}		99,1%	99,2%	99,5%	100,0%	100,3%	101,4%	106,6%		121,1%					
	začetek kromatografskega vrha		99,3%	99,7%	99,4%	99,7%	99,4%	98,9%	98,8%		97,8%					
	konec kromatografskega vrha		98,8%	99,2%	98,2%	98,8%	98,8%	98,8%	99,4%		98,0%					
	A _s		100,7%	100,4%	100,3%	100,4%	100,5%	100,5%	99,5%		96,7%					
	T _f		100,6%	100,5%	100,4%	100,5%	100,5%	100,4%	99,1%		96,0%					
	N		101,2%	100,8%	100,1%	98,9%	98,4%	95,9%	86,4%		66,5%					
	injiciranje: 7,5 μ L		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12	
	količina topila [μ L]		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12	
	t _R				99,5%			99,5%		99,2%		98,8%				
	h				100,2%			99,3%		95,1%		83,0%				
	površina kromatografskega vrha				99,4%			99,4%		99,4%		99,3%				
W _{1/2}				99,4%			100,4%		105,1%		122,0%					
začetek kromatografskega vrha				99,1%			99,3%		98,8%		98,0%					
konec kromatografskega vrha				98,4%			99,0%		99,0%		98,7%					
A _s				100,6%			100,3%		100,4%		96,9%					
T _f				100,7%			100,2%		99,9%		96,2%					
N				100,3%			98,2%		89,0%		65,7%					
injiciranje: 10 μ L		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
količina topila [μ L]		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
t _R		100,0%	99,9%	99,9%	99,8%	99,7%	99,6%	99,5%	99,5%	99,3%	99,1%	98,6%	98,9%			
h		100,0%	102,6%	102,0%	101,3%	101,3%	100,9%	99,7%	99,9%	95,9%	91,2%	69,7%	48,0%			
površina kromatografskega vrha		100,0%	101,4%	101,7%	100,7%	100,8%	100,5%	100,3%	101,5%	99,2%	100,3%	101,7%	102,3%			
W _{1/2}		100,0%	99,7%	99,6%	99,5%	99,4%	99,9%	101,0%	102,2%	104,3%	110,8%	152,9%	240,9%			
začetek kromatografskega vrha		100,0%	100,1%	99,5%	99,9%	99,3%	99,3%	99,2%	99,5%	99,3%	98,6%	96,9%	92,5%			
konec kromatografskega vrha		100,0%	100,0%	99,5%	99,3%	99,0%	98,5%	98,8%	98,3%	97,8%	99,5%	98,8%	97,9%			
A _s		100,0%	100,7%	100,4%	100,7%	100,2%	100,5%	100,2%	100,4%	100,6%	99,5%	88,8%	67,6%			
T _f		100,0%	100,7%	100,4%	100,6%	100,5%	100,2%	100,0%	100,1%	100,1%	99,0%	88,8%	67,3%			
N		100,0%	100,4%	100,5%	100,5%	100,7%	98,3%	96,6%	93,3%	90,7%	79,9%	41,6%	16,9%			
injiciranje: 15 μ L		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
količina topila [μ L]		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
t _R				99,8%			99,7%		99,6%		99,3%				98,7%	
h				101,0%			107,8%		99,1%		97,7%				47,4%	
površina kromatografskega vrha				100,5%			99,8%		99,4%		100,0%				99,2%	
W _{1/2}				99,6%			99,4%		100,3%		102,8%				240,3%	
začetek kromatografskega vrha				99,9%			99,4%		99,7%		99,1%				94,1%	
konec kromatografskega vrha				98,6%			99,7%		99,1%		98,4%				97,5%	
A _s				100,9%			100,7%		100,5%		100,5%				70,9%	
T _f				100,8%			100,7%		100,4%		100,0%				71,1%	
N				100,4%			100,7%		98,6%		93,2%				16,9%	
injiciranje: 20 μ L		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
količina topila [μ L]		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	4,5	5	6	8	10	12		
t _R			99,9%		99,8%		99,7%		99,5%		99,6%		99,3%		98,5%	
h			100,4%		102,2%		101,1%		101,4%		100,1%		96,2%		83,2%	
površina kromatografskega vrha			100,0%		101,6%		100,1%		101,2%		99,9%		101,1%		99,6%	
W _{1/2}			99,5%		99,5%		99,4%		99,6%		100,1%		99,9%		105,6%	
začetek kromatografskega vrha			99,8%		99,7%		99,7%		99,5%		99,7%		99,4%		98,9%	
konec kromatografskega vrha			99,3%		99,2%		98,4%		99,5%		98,8%		99,2%		99,8%	
A _s			100,8%		101,0%		100,8%		100,5%		100,4%		100,1%		100,2%	
T _f			100,6%		100,9%		100,7%		100,6%		100,3%		100,1%		99,7%	
N			100,9%		100,7%		100,6%		100,1%		98,8%		99,4%		88,4%	
															65,2%	
															37,4%	

Priloga 7

Preglednica XX: Površina pod krivuljo tlaka ob injiciranju vodnih mešanic MeOH z različno koncentracijo saharoze in pripadajoče viskoznosti.

		površina pod krivuljo tlaka				viskoznost [mPa·s]			
		% MeOH				% MeOH			
		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%
koncentracija saharoze [g/L]	0	0,079	0,162	0,423	0,678	1,240	1,336	1,638	1,933
	40	0,200	0,312	0,626	0,845	1,380	1,509	1,873	2,126
	80	0,326	0,436	0,794	1,075	1,526	1,652	2,066	2,392
	120	0,465	0,637	1,019	1,336	1,686	1,886	2,327	2,693
	160	0,663	0,837	1,254	1,643	1,915	2,116	2,598	3,048
	200	0,874	1,099	1,606	2,026	2,159	2,420	3,006	3,491
	240	1,130	1,388	1,959	2,474	2,455	2,753	3,413	4,009
	280	1,419	1,738	2,438	2,988	2,790	3,158	3,967	4,603
	320	1,803	2,183	2,965	3,666	3,234	3,673	4,577	5,387
	360	2,264	2,651	3,647	4,490	3,767	4,214	5,364	6,340
	400	2,890	3,342	4,593	5,712	4,490	5,013	6,459	7,752

Preglednica XXI: Površina pod krivuljo tlaka ob injiciranju vodnih mešanic ACN z različno koncentracijo saharoze in pripadajoče viskoznosti.

		površina pod krivuljo				viskoznost [mPa·s]			
		% ACN				% ACN			
		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%
koncentracija saharoze [g/L]	0	0,005	0,059	0,073	-0,017	1,155	1,217	1,233	1,129
	18				0,022				1,174
	32			0,168				1,343	
	36				0,089				1,252
	40	0,111	0,153			1,277	1,326		
	60				0,171				1,347
	64			0,225				1,409	
	80	0,256	0,307			1,445	1,504		
	84				0,302				1,498
	96			0,378				1,586	
	120	0,416	0,460		0,414	1,630	1,680		1,628
	128			0,509				1,737	
	160	0,590	0,644	0,680		1,831	1,893	1,935	
	192			0,840				2,120	
	200	0,806	0,860			2,080	2,144		
	224			1,048				2,361	
	240	1,056	1,124			2,370	2,449		
	256			1,303				2,655	
	280	1,378	1,437			2,742	2,810		
	288			1,635				3,040	
320	1,718	1,837	1,954		3,135	3,273	3,408		
360	2,169	2,316			3,657	3,827			
400	2,748	2,936			4,325	4,543			

Priloga 8

Prikazani so podatki za izračun vpliva viskoznosti v odvisnosti od deleža topila v vzorcu po metodi M₁₀ in M_{23,5}.

		MeOH												ACN			
		2 mPa·s				4 mPa·s				2 mPa·s				4 mPa·s			
		5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%		
M ₁₀	Vrsta organskega topila	MeOH												ACN			
	Viskoznost	2 mPa·s												4 mPa·s			
	Delež organskega topila	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%	23,5%	40%	5%	10%		
	RES	t _R [min]	0,6395	0,6382	0,6357	0,6300	0,6392	0,6403	0,6380	0,6308	0,6378	0,6373	0,6313	0,6373	0,6358		
		h [mAU]	656,57	649,92	613,38	459,82	618,85	606,11	571,27	426,69	564,03	542,33	420,04	538,22	510,85		
		Površina [mAU*s]	863,78	865,86	865,43	874,57	864,32	863,52	867,77	875,59	745,09	747,60	753,38	749,39	747,84		
		W _{1/2} [min]	0,0186	0,0188	0,0201	0,0285	0,0196	0,0201	0,0217	0,0309	0,0187	0,0196	0,0267	0,0196	0,0208		
		Začetek krom. vrha [min]	0,5718	0,6020	0,5938	0,5709	0,6034	0,5823	0,5708	0,5609	0,5826	0,5811	0,5613	0,5792	0,5740		
		Konec krom. vrha [min]	0,8694	0,8682	0,9715	0,9998	0,8685	0,8740	0,8731	0,8654	0,8639	0,8691	0,8637	0,8635	0,8623		
		A _s	1,3355	1,3303	1,3102	1,1991	1,3573	1,3616	1,3461	1,1936	1,3154	1,3117	1,2518	1,3578	1,3634		
		T _f	1,4627	1,4564	1,4298	1,2992	1,4878	1,4868	1,4664	1,2973	1,4408	1,4301	1,3503	1,4829	1,4812		
		N [št. teoretskih podov]	6577,0	6360,7	5517,3	2707,7	5906,7	5644,7	4809,7	2313,7	6477,0	5851,3	3092,7	5878,3	5199,3		
	FEEN	t _R [min]	1,8573	1,8537	1,8480	1,8369	1,8579	1,8644	1,8575	1,8391	1,8550	1,8568	1,8514	1,8560	1,8535		
		h [mAU]	92,84	92,67	92,25	87,33	90,42	88,98	88,51	84,75	90,58	90,13	87,94	89,66	88,97		
		Površina [mAU*s]	304,88	304,57	305,02	305,74	303,78	302,78	304,38	305,18	296,04	295,44	296,95	295,90	294,82		
		W _{1/2} [min]	0,0489	0,0489	0,0493	0,0524	0,0500	0,0507	0,0511	0,0539	0,0487	0,0490	0,0506	0,0492	0,0495		
		Začetek krom. vrha [min]	1,7764	1,7652	1,7582	1,7328	1,7706	1,7701	1,7635	1,7364	1,7640	1,7723	1,7623	1,7710	1,7675		
		Konec krom. vrha [min]	2,1653	2,1474	2,1356	2,1174	2,1158	2,1472	2,1785	2,1220	2,1541	2,1196	2,1090	2,1250	2,1315		
		A _s	1,1071	1,1063	1,1063	1,1062	1,1107	1,1083	1,1119	1,1086	1,1056	1,1041	1,1028	1,1136	1,1085		
		T _f	1,1615	1,1618	1,1591	1,1558	1,1690	1,1652	1,1696	1,1623	1,1573	1,1539	1,1502	1,1698	1,1638		
		N [št. teoretskih podov]	7988,0	7947,7	7797,3	6803,0	7639,3	7507,0	7319,3	6441,7	8029,3	7960,7	7403,7	7892,3	7780,0		
	MP	t _R [min]	3,8696	3,8618	3,8511	3,8306	3,8711	3,8998	3,8849	3,8368	3,8659	3,8697	3,8631	3,8664	3,8614		
		h [mAU]	51,80	51,92	51,96	51,01	50,71	49,87	50,03	50,01	53,43	53,33	52,89	53,21	53,11		
		Površina [mAU*s]	359,17	360,08	360,37	361,84	358,46	356,67	357,87	361,35	370,02	369,01	371,39	368,39	369,19		
		W _{1/2} [min]	0,1047	0,1046	0,1044	0,1068	0,1064	0,1081	0,1081	0,1088	0,1044	0,1047	0,1061	0,1047	0,1047		
		Začetek krom. vrha [min]	3,7056	3,6928	3,6718	3,6555	3,6867	3,7147	3,7106	3,6446	3,6887	3,6860	3,6665	3,6924	3,6933		
		Konec krom. vrha [min]	4,2558	4,2594	4,2558	4,2561	4,2771	4,2878	4,2774	4,2590	4,2733	4,2426	4,2623	4,2398	4,2709		
		A _s	1,0866	1,0836	1,0801	1,0786	1,0835	1,0810	1,0842	1,0815	1,0784	1,0737	1,0790	1,0845	1,0809		
		T _f	1,1299	1,1272	1,1247	1,1204	1,1297	1,1260	1,1284	1,1235	1,1201	1,1144	1,1164	1,1260	1,1244		
		N [št. teoretskih podov]	7566,3	7545,3	7535,3	7131,3	7337,3	7208,7	7155,0	6894,0	7600,0	7571,7	7351,3	7552,7	7531,3		
	M _{23,5}	EP	t _R [min]	1,8588	1,8574	1,8569	1,8532	1,8584	1,8583	1,8568	1,8516	1,8547	1,8535	1,8496	1,8522	1,8504	
			h [mAU]	114,77	114,70	114,36	112,74	113,09	112,39	112,95	110,40	111,86	111,97	111,52	110,98	110,87	
			Površina [mAU*s]	367,26	368,23	367,56	368,94	367,13	365,20	367,42	368,98	358,59	358,36	359,89	358,33	357,52	
			W _{1/2} [min]	0,0474	0,0475	0,0476	0,0485	0,0477	0,0479	0,0478	0,0493	0,0474	0,0473	0,0479	0,0476	0,0475	
			Začetek krom. vrha [min]	1,7704	1,7635	1,7639	1,7542	1,7678	1,7699	1,7686	1,7609	1,7673	1,7511	1,7655	1,7621	1,7585	
			Konec krom. vrha [min]	2,1308	2,1522	2,1635	2,1426	2,1763	2,1611	2,1815	2,1645	2,1583	2,1578	2,1417	2,1380	2,1740	
A _s			1,1101	1,1055	1,1057	1,1061	1,1111	1,1149	1,1126	1,1127	1,1113	1,1072	1,1055	1,1157	1,1102		
T _f			1,1676	1,1646	1,1615	1,1604	1,1736	1,1755	1,1743	1,1716	1,1676	1,1621	1,1568	1,1767	1,1691		
N [št. teoretskih podov]			8532,0	8481,7	8448,3	8073,0	8398,3	8349,3	8347,7	7810,3	8498,0	8489,3	8258,0	8390,3	8403,0		
PP		t _R [min]	4,1309	4,1289	4,1288	4,1243	4,1315	4,1298	4,1286	4,1220	4,1225	4,1202	4,1147	4,1157	4,1121		
		h [mAU]	47,13	47,03	46,79	47,00	46,63	46,26	46,63	46,53	47,86	48,02	48,35	48,06	47,85		
		Površina [mAU*s]	347,55	347,68	346,50	347,22	346,42	343,44	345,75	347,97	353,95	352,80	355,38	353,33	352,07		
		W _{1/2} [min]	0,1110	0,1111	0,1115	0,1117	0,1116	0,1119	0,1114	0,1123	0,1114	0,1109	0,1108	0,1106	0,1106		
		Začetek krom. vrha [min]	3,9461	3,9483	3,9407	3,9383	3,9401	3,9532	3,9478	3,9384	3,9217	3,9260	3,9291	3,9253	3,9138		
		Konec krom. vrha [min]	4,5479	4,5496	4,5360	4,4921	4,5536	4,5239	4,5315	4,5445	4,5330	4,4910	4,5106	4,5111	4,5102		
		A _s	1,0846	1,0775	1,0827	1,0765	1,0817	1,0894	1,0795	1,0789	1,0744	1,0754	1,0793	1,0747	1,0793		
		T _f	1,1285	1,1187	1,1241	1,1179	1,1268	1,1333	1,1227	1,1250	1,1179	1,1169	1,1199	1,1189	1,1241		
		N [št. teoretskih podov]	7676,3	7650,0	7594,3	7558,0	7597,7	7546,7	7613,7	7465,7	7593,7	7648,0	7635,0	7678,7	7652,3		