

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

**STUDIUM CHROMATOGRAFICKÝCH  
VLASTNOSTÍ MODERNÍCH REVERZNÍCH KOLON  
NA BÁZI SILIKAGELU**

Bakalářská práce

obor Klinická a toxikologická analýza

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Jany Suchánkové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitelky RNDr. Jany Suchánkové, Ph.D.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště školitelky RNDr. Jany Suchánkové, Ph.D.).

V Praze dne...*6. 6. 2007*.....

*Marie Kvasová*  
.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Janě Suchánkové, Ph.D. za ochotu, pomoc, předání zkušeností a neocenitelné rady při vypracovávání této bakalářské práce.

Také bych ráda poděkovala svým rodičům za to, že mi umožnili studovat a podporovali mě při studiu.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory následujících finančních zdrojů:

GAUK 335/2005/B–CH/PřF,

MŠMT ČR, projekt MSM 0021620857.

## **Předmětová hesla**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC)

Kolony na bázi silikagelu

## **Klíčová slova**

Walterův test, Engelhardtův test

Discovery<sup>®</sup> HS F5

Pentafluorfenylpropylsiloxan

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Teoretická část</b>	<b>8</b>
2.1 Silikagel	8
2.2 Vliv pH na stabilitu silikagelu	10
2.3 Další typy stacionárních fází a nosičů	11
2.4 Separace a základní vztahy v kapalinové chromatografii	11
2.5 Testování kolon	12
2.6 Waltersův test	14
2.7 Engelhardtův test	16
2.8 Discovery <sup>®</sup> HHS F5	17
<b>3. Experimentální část</b>	<b>19</b>
3.1 Použité chemikálie	19
3.2 Waltersův test aktivity volných silanolových skupin	19
3.2.1 Příprava vzorků a mobilní fáze	19
3.2.2 Postup měření	20
3.3 Waltersův test – určení účinnosti a indexu hydrofobnosti	20
3.3.1 Příprava vzorků a mobilní fáze	20
3.3.2 Postup měření	20
3.4 Engelhardtův test	21
3.4.1 Příprava vzorků a mobilní fáze	21
3.4.2 Postup měření	21
3.5 Přístroje a programy	22
3.6 Kolona	23
<b>4. Výsledky a diskuse</b>	<b>24</b>
4.1 Waltersův test	24
4.2 Engelhardtův test	26
<b>5. Závěr</b>	<b>32</b>
<b>6. Literatura</b>	<b>34</b>

## Seznam zkratek

$\alpha$	separační faktor, tvarová selektivita
$a$	pološířka v 10 % výšky píku přilehlá k těžišti píku
$A_s$	asymetrický faktor
$b$	pološířka v 10 % výšky píku odlehlá od těžišť píku
$C_{18}$	oktadecylová stacionární fáze
DETA	N,N-diethyl-m-toluamid
$d_p$	průměr částic stacionární fáze
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$H_r$	redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervený
$k$	retenční faktor
$L$	délka kolony
$n_k$	počet teoretických pater na kolonu
$n_m$	počet teoretických pater na metr
NMR	nukleární magnetická rezonance
N,N-A	N,N-dimethylanilin
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
$pK_b$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty báze
$S_{AS}$	poměr asymetrie píku anilinu a fenolu
$t_M$	mrtvý čas kolony
$t_R$	retenční čas analytu
$w_{1/2}$	šířka píku při základně

# 1. Úvod

Reverzní kapalinová chromatografie nachází velké uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu, zejména při analýzách léčiv, drog a přírodních látek, které mají v mnoha případech bazický charakter.

Nejrozšířenějším typem reverzních kolon jsou silikagelové kolony. Silikagel je jako nosič používán hlavně pro svou mechanickou odolnost, možnost úpravy povrchu a možnost přípravy silikagelových částic o různých průměrech. Nevýhodou kolon na bázi silikagelu je omezená tepelná a chemická stabilita a nežádoucí interakce s bazickými látkami za vzniku nesymetrických píků [1,2].

Hlavně díky problémům se separací bazických látek došlo k rozvoji testovacích postupů, které využívají látek, jejichž chemická povaha zajišťuje testování různých typů interakcí mezi analytem a stacionární fází. Vyhodnocením těchto testů získáváme informace o vhodnosti použití testované kolony pro separaci požadované skupiny látek.

Dalším důvodem k vývoji chromatografických testů je skutečnost, že výrobci kolon používají pro ukázkové separace hlavně neutrální látky, jejichž retence bývá na reverzních kolonách bezproblémová. Takže pokud si zakoupíme novou kolonu, je vhodné nejprve zjistit její skutečné separační vlastnosti [3]. V neposlední řadě lze výsledky těchto testů využít při porovnávání chromatografických vlastností kolon.

Nejpoužívanějším typem stacionárních fází na bázi silikagelu jsou oktadecylová a oktylová fáze. Vzhledem k velké hydrofobnosti těchto alkylových řetězců a stále rostoucí potřebě dostatečné selektivity při separaci komplexních vzorků dochází k rozvoji nových typů silikagelových stacionárních fází, mezi které patří i Discovery<sup>®</sup> HS F5 s chemicky vázanými pentafluorfenylpropylovými funkčními skupinami [4].

Cílem této bakalářské práce je testování kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 Waltersovým a Engelhardtovým testem a následné vyhodnocení vlastností této kolony.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Silikagel

Silikagel je nejpoužívanějším typem nosiče v kapalinové chromatografii. Jde o polymerní oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ), který je nejčastěji modifikován navázáním funkčních skupin o různé polaritě.

Syntézu silikagelu je možné provést několika způsoby [1,5], při nichž vznikají porézní či neporézní částice s různým obsahem stop kovů. Podle výsledného obsahu stop kovů se silikagely dělí na typ A s vysokým obsahem a typ B s nízkým obsahem stop kovů. Nejznámější typy syntézy silikagelu jsou:

- kyselá hydrolyza anorganických silikátů – vznikají nepravidelné částice s vysokým obsahem stop kovů
- hydrolyza alkoxysilanů – vznikají nepravidelné, nebo kulovité částice s nižším obsahem stop kovů
- polyethoxysiloxanová metoda – nejméně používaná metoda, vznikají částice s nízkou odolností
- sol-gelová metoda – nejpoužívanější, vznikají chemicky i teplotně stabilní kulovité částice.

Na povrchu silikagelu rozlišujeme silanolové ( $\text{Si-OH}$ ) a siloxanové ( $\text{Si-O-Si}$ ) skupiny. Silanolové skupiny jsou hydrofilní, siloxanové skupiny jsou hydrofobní. Silanolové skupiny se dělí na čtyři základní typy: volné silanoly, asociované silanoly, zdvojené silanoly (silandioly) a silantrioly. Každý typ silanolů se liší kyselostí. Průměrná hodnota  $\text{p}K_a$  silanolů je 7,1 [1, 2, 5].

Pro účely reverzní chromatografie se povrch silikagelu nejčastěji upravuje navázáním nepolárních alkylových řetězců. Nejpoužívanějším typem je 18-ti uhlíkatý řetězec, oktadecyl. Syntéza chemicky vázaných fází se nejčastěji provádí metodou povrchové modifikace. Povaha výsledné fáze je závislá na přítomnosti vody během syntézy. Bez přítomnosti vody vznikají reakcí s mono-, di- či tri- funkčními silany monomerní vrstvy. Výsledná vrstva má strukturu podobnou buněčné



membráně. Za přítomnosti vody vznikají složitější polymerní vrstvy, které vykazují lepší separační vlastnosti pro izomerní látky [1].

Vzhledem k hydrofilní povaze silanolových skupin je nutné tyto skupiny po syntéze chemicky vázané fáze odstranit, či stericky chránit vytvořením polymerní vrstvy nad chemicky vázanou fází. Mezi metody, kterými lze snížit množství volných silanolových skupin, nebo omezit jejich vliv patří [1, 5]:

- end-capping – nejpoužívanějším činidlem je trimethylchlorsilan, z volných silanolových skupin vznikají trimethyl-substituované skupiny  $((\text{CH}_3)_3\text{Si}-)$ , novější typ end-cappingu se provádí při vysoké teplotě [6]
- rehydroxylace – provádí se například zahřátím silikagelu, nebo působením kyselin a bází na povrch silikagelu, dochází ke snížení počtu volných silanolových skupin a zvýší se počet asociovaných silanolových skupin, které způsobují menší problémy při analýze bazických látek
- syntéza příčně vázaného silikagelu – na povrch silikagelu se po povrchové modifikaci naváží molekuly s dlouhými řetězci, například skvalen, a za přítomnosti katalyzátoru dochází k jejich polymerizaci.

Další možností redukce vlivu volných silanolových skupin je použití ukotvených stacionárních fází. U těchto fází dochází ke snížení aktivity silanolových skupin díky ukotvené polární funkční skupině. Výsledkem je, že silanolové skupiny interagují s ukotvenou funkční skupinou a samotný separační proces ovlivňují jen minimálně [7,8].

Volné silanolové skupiny se bohužel nedají zcela odstranit žádnou metodou. Tento fakt je dán jednak prostorovým uspořádáním vázaných fází, ale také rozměry vznikajících trimethyl-substituovaných skupin v případě provedení end-cappingu pomocí trimethylchlorsilanu. Trimethyl-substituovaná skupina  $((\text{CH}_3)_3\text{Si}-)$  zaujímá ve dvojrozměrném prostoru plochu  $0,43 \text{ nm}^2$ , z čehož vyplývá, že dvě sousedící trimethyl-substituované skupiny mají mezi sebou vzdálenost  $0,65 \text{ nm}$ . Silanolová skupina zaujímá plochu  $0,2 \text{ nm}^2$ , takže vzdálenost mezi dvěma silanolovými skupinami je  $0,4 \text{ nm}$ . Použitím této představy je jasné, že některé silanolové skupiny nemohou díky nedostatku prostoru zreagovat s trimethylchlorsilanem a zůstávají na povrchu silikagelu jako takzvané zbytkové silanolové skupiny. Tato představa je potvrzena zjištěním, že použitím trimethylchlorsilanu je i při maximálním

povrchovém pokryvu vznikajícími trimethyl-substituovanými skupinami výsledná vzdálenost skupin asi 0.7 nm [9, 10].

Metody určování silanolových skupin se v zásadě dají rozdělit na chemické a fyzikální. Mezi fyzikální metody patří například IR spektroskopie a NMR spektrometrie. Výhodou těchto metod je schopnost rozlišit typy silanolových skupin. I když tato schopnost je omezená pouze na rozlišování mezi volnými silanolovými skupinami a ostatními typy silanolů. Mezi chemické metody patří titrace roztokem NaOH v přítomnosti soli, reakce s alkyl lithiem, reakce s Grignardovými činidly a další. Pomocí chemických metod získáme informaci o celkovém obsahu silanolů [5].

## 2.2 Vliv pH na stabilitu silikagelu

Obecně lze říci, že při nízké hodnotě pH dochází k hydrolyze chemicky vázaných řetězců stacionární fáze a při vysoké hodnotě pH dochází k rozpouštění silikagelu. Ve skutečnosti jsou tyto jevy ovlivněny dalšími faktory jako je typ organické fáze, obsah vody v mobilní fázi apod., což potvrzuje i studie Kirklanda a kol.[11]. V této studii bylo zjištěno, že:

- hustě vázané monomerní dimethyl-C18 ligandy lépe chrání silikagelový nosič před rozpuštěním než objemné substituenty
- při vysokých hodnotách pH dochází k rozpouštění samotného silikagelu, zatímco siloxanové skupiny na povrchu se nerozpadají, takže výsledný kolaps kolony je způsoben ztrátou nosiče
- při nízkých hodnotách pH dochází ke kolapsu kolony pouze vlivem hydrolyzy siloxanových skupin
- monomerní, nebo polymerní povaha vázané oktadecylové fáze významně neovlivňuje stabilitu při vysokých hodnotách pH
- silikagely syntetizované sol-gelovou metodou jsou odolnější proti rozpouštění
- silikagely typu B se rozpouští rychleji, než více znečištěné silikagely typu A
- při používání acetonitrilu v mobilní fázi je životnost kolony delší, než při používání methanolu.

## 2.3 Další typy stacionárních fází a nosičů

Kvůli nevýhodám, tzn. omezené chemické a tepelné stabilitě, klasických stacionárních fází na bázi silikagelu s vázanými uhlovodíkovými řetězci byly hledány nové typy nosičů. Nejpoužívanějšími alternativními nosiči jsou oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a polymerní stacionární fáze [1, 12-15].

Kolony na bázi oxidu zirkoničitého vykazují stabilitu v celém rozsahu hodnot pH. Povrch oxidu zirkoničitého lze modifikovat navázáním alkylových řetězců, polybutadienu, polystyrenu a uhlíku. Obecně je tento typ kolon vhodný pro separaci bazických látek, strukturních izomerů a vysokomolekulárních látek.

Kolony na bázi oxidu hlinitého jsou stabilní při hodnotách pH 2-12, lze je modifikovat navázáním alkylových a perfluoroalkylových řetězců, polybutadienu a kyanopolymeru. Jejich nevýhodou je nestálost v prostředí fosforečnanového pufru.

Polymerní stacionární fáze jsou díky své struktuře stabilní v celém rozsahu hodnot pH. U tohoto typu fází je eliminován vznik nesymetrických píků bazických látek, protože na povrchu těchto stacionárních fází nejsou přítomny silanolové skupiny. Nejpoužívanějším typem polymeru je polystyren-divinylbenzenový kopolymer. Mezi další typy nosičů patří oxid titaničitý a porézní grafitizovaný uhlík.

## 2.4 Separace a základní vztahy v kapalinové chromatografii

Hlavními interakcemi, které se uplatňují v kapalinové chromatografii jsou hydrofobní interakce, elektrostatické interakce, vodíkové vazby a interakce dipól-dipól [16]. Zastoupení a vliv jednotlivých interakcí je ovlivňováno především složením mobilní fáze, typem stacionární fáze a typem analytu [2,9].

Různé typy stacionárních fází se liší svojí selektivitou k analytům. Kolony se zakotvenými polárními skupinami nejvíce zadržují analyty, které snadno tvoří vodíkové vazby (fenoly, sulfonamidy a nedisociované karboxylové kyseliny). Kolony s fenylovými ligandy více zadržují kladně nabitě analyty a  $\pi$ -akceptory. Kolony s pentafluorfenylovými skupinami zadržují nejvíce analyty bazické povahy, které ochotně interagují se zbytkovými silanolovými skupinami [17].

Komerční silikagelové kolony se liší v mnoha parametrech, např. délkou, průměrem, velikostí částic a typem stacionární fáze (vázaného ligandu). Mezi základní charakteristiky každé kolony patří separační účinnost, která je vyjádřena

počtem teoretických pater ( $n$ ) a výškovým ekvivalentem teoretického patra ( $H$ ) viz. 2.6 Waltersův test. Přitom platí, že čím je počet teoretických pater vyšší, tím je kolona účinnější a čím nižší je výškový ekvivalent teoretického patra, tím je separační proces na koloně účinnější. Tyto vztahy vyplývají z předpokladu, že separační proces v reverzní kapalinové chromatografii je založen na ustavování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Podle typu analytu dochází buď k retenci, nebo k eluci daného analytu. Stacionární fáze v reverzní chromatografii mají nepolární charakter a mobilní fáze jsou polární. Na koloně jsou tedy více zadržovány látky nepolární a dříve jsou eluovány látky polární. Tento předpoklad není bohužel zcela splněn jak bylo již dříve zmíněno například u bazických látek [2].

Každý analyt je charakterizován retenčním časem  $t_R$ , což je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně. U analytu, který není na koloně zadržován, se tento čas nazývá mrtvým časem  $t_M$ . Pomocí retenčního času a mrtvého času lze vypočítat redukovaný retenční čas analytu  $t'_R$ . Redukovaný retenční čas odpovídá času, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi, rovnice (1) [16].

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M \quad (1)$$

kde  $t'_{R,i}$  je redukovaný retenční čas  $i$ -tého analytu [min],  $t_{R,i}$  je retenční čas  $i$ -tého analytu [min],  $t_M$  je mrtvý čas [min]

Další charakteristikou analytu je retenční faktor, který udává poměr doby, kterou analyt stráví ve stacionární a mobilní fázi, rovnice (2).

$$k_i = t'_{R,i} / t_M \quad (2)$$

kde  $k_i$  je retenční faktor  $i$ -tého analytu,  $t'_{R,i}$  je redukovaný retenční čas  $i$ -tého analytu [min],  $t_M$  je mrtvý čas [min].

## 2.5 Testování kolon

Ani dvě kolony stejného typu nemají identické separační vlastnosti, a to i pokud provádíme analýzu za stejných experimentálních podmínek. Proto došlo k rozvoji testovacích metod, které umožňují podrobnější charakterizaci dané kolony a následné vyhodnocení použitelnosti kolony pro určitý typ separace. Mezi tyto metody patří i chromatografické testy. V těchto testech jsou využívány různé testovací látky, které reprezentují odlišné typy interakcí se stacionární fází a podávají nám informace

o separačních vlastnostech kolony. Přehled nejznámějších chromatografických testů je uveden v publikaci Stelly a kol. [18].

Každý z testů využívá nejen odlišné analyty, ale i odlišné mobilní fáze, a proto Cleassens a kol. provedli srovnávací studii Engelhardtova [3,19], Tanakova [20], Galushkova [21] a Waltersova [22] testů s 20 různými kolonami. Bylo zjištěno, že [23]:

- výsledky hydrofobní selektivity jsou prakticky shodné u Engelhardtova, Tanakova a Waltersova testu
- výsledky hydrofobnosti měřené jako absolutní retence jsou v různých testech zaměnitelné a jsou v dobré shodě, tudíž tyto výsledky nejsou ovlivněny použitým testem
- pufování mobilní fáze významně ovlivňuje výsledky aktivity silanolových skupin, proto pokud chceme zajistit srovnatelné výsledky aktivity silanolových skupin, tak je nutné mobilní fáze těchto testů pufovat. Zároveň výsledky silanolové aktivity jsou i při pufování mobilní fáze ovlivněny použitím různých testovacích látek a mobilních fází v různých testech, takže na rozdíl od testování hydrofobicity nejsou výsledky aktivity silanolových skupin zaměnitelné a shodné při použití různých testů.

Důležitým parametrem při testování kolon a vyhodnocení výsledků je teplota kolony, která je z velké části ovlivněna použitím různých typů termostatů. Smith a kol. provedli srovnávací studii [24], které se účastnilo osm různých laboratoří. V této studii byly jednotlivým laboratořím zaslány ampule, které obsahovaly stejnou testovací směs a každá laboratoř provedla testování této směsi na dvou různých kolonách při dodržení požadovaných testovacích podmínek. Bylo zjištěno, že výsledky jednotlivých laboratoří se příliš neliší, a že největší odchylky v měření jsou způsobeny použitím různých termostatů. Nejvhodnějším typem termostatů jsou ty, ve kterých dochází k cirkulaci vody. Při použití ostatních typů termostatů docházelo k významnému ovlivňování výsledků separace.

Kromě zmiňovaných komplexních testů se používají i testy zaměřené na určení jedné specifické vlastnosti kolony. Příkladem takového testu je Engelhardtův a Lobertův test [25], který slouží k určení obsahu kovových nečistot ve stacionární

fázi. Tento test využívá 2,2'-bipyridylu jako kvalitativního indikátoru kovových nečistot ve stacionární fázi. Pomocí tohoto testu bylo prokázáno, že během používání se kovové nečistoty usazují ve stacionárních fázích. Tyto kovové stopy mají původ v kovových součástech kolony, ale i při použití vybavení, které neobsahuje kovy dochází ke kontaminaci stacionárních fází díky mobilním fázím, které obsahují kovové nečistoty v řádu koncentrací ppb a během používání dochází k jejich postupné akumulaci.

Dalším příkladem může být test využívající vysokomolekulární látky k testování homogenity povrchu a hustoty pokrytí silikagelových chemicky vázaných stacionárních fází [26].

## 2.6 Waltersův test

U Waltersova testu, který je navržen pro charakterizaci reverzních stacionárních fází, jsou kolony hodnoceny podle tří kritérií [22]:

1. indexu hydrofobnosti, který je dán poměrem retenčního faktoru anthracenu a benzenu (rovnice 3), při použití mobilní fáze acetonitril-voda v poměru 65:35 (obj./obj.) a prouku mobilní fáze 1 ml/min.

$$HPI\ index = k_{anthracen} / k_{benzen} \quad (3)$$

kde HPI index je index hydrofobnosti,  $k_{anthracen}$  je retenční faktor anthracenu,  $k_{benzen}$  je retenční faktor benzenu.

2. účinnosti, která se vypočítá podle následujících vztahů z retenčního chování toluenu:

Počet teoretických pater kolony ( $n_k$ ) se vypočítá z rovnice (4).

$$n_k = 5,54 \cdot (t_R / w_{1/2})^2 \quad (4)$$

kde  $n_k$  je počet teoretických pater kolony,  $t_R$  je retenční čas toluenu [min],  $w_{1/2}$  je šířka píku toluenu v polovině jeho výšky [min].

Výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) se vypočítá z rovnice (5).

$$H = L / n \quad (5)$$

kde  $H$  je výškový ekvivalent teoretického patra [cm],  $L$  je délka kolony [cm],  $n$  je počet teoretických pater kolony.

Počet teoretických pater kolony na jeden metr ( $n_m$ ) určíme z rovnice (6).

$$n_m = (n \cdot 100) / L \quad (6)$$

kde  $n_m$  je počet teoretických pater kolony na jeden metr,  $n$  je počet teoretických pater kolony,  $L$  je délka kolony [cm].

Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra ( $H_r$ ) vypočítáme z rovnice (7).

$$H_r = H / d_p \quad (7)$$

kde  $H_r$  je redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra,  $H$  je výškový ekvivalent teoretického patra [cm],  $d_p$  je průměr částic [cm].

Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra  $H_r$  vyjadřuje účinnost plnicí techniky. U testovaných komerčních kolon se jeho hodnota pohybuje v rozmezí 2.5 – 4.0. Tyto hodnoty odpovídají přijatelné kvalitě plnění kolon.

3. aktivity volných silanolových skupin, kde SiOH index získáme z poměru retenčních faktorů N,N-diethyl-m-toluamidu a anthracenu při použití 100 % acetonitrilu jako mobilní fáze a průtoku mobilní fáze 1 ml/min. N,N-diethyl-m-toluamid interaguje s volnými silanolovými skupinami a anthracen slouží k redukcí chyb, které by mohly být způsobeny změnami v podmínkách měření. Mrtvý retenční čas je určen retenčním časem uracilu, který byl získán při určování indexu hydrofobnosti. Hodnotu SiOH indexu vypočítáme z rovnice (8).

$$SiOH \text{ index} = k_{DETA} / k_{anthracen} \quad (8)$$

kde  $k_{DETA}$  je retenční faktor N,N-diethyl-m-toluamidu,  $k_{anthracen}$  je retenční faktor anthracenu.

Na základě výsledků těchto kritérií se kolony dělí na tři skupiny. První skupina kolon se vyznačuje nízkou afinitou k nepolárním látkám a nízkou až střední hodnotou silanofilních interakcí. Kolony zařazené do druhé skupiny se vyznačují vysokou afinitou pro nepolární látky a relativně vysokou hodnotou SiOH indexu, což naznačuje, že nebyly v dostatečné míře odstraněny volné silanolové skupiny. Při použití těchto kolon se dají očekávat komplikace při analýze látek bazické povahy. Třetí skupina reprezentuje kolony, které mají největší afinitu k nepolárním látkám a zároveň se vyznačují nízkým obsahem volných silanolových skupin.

## 2.7 Engelhardtův test

Dalším z chromatografických testů navržených pro reverzní stacionární fáze je Engelhardtův test [3,19], který využívá jako mobilní fázi nepufrovanou směs methanolu a vody. Jako organická fáze je zvolen methanol, protože acetonitril a methanol poskytují odlišnou selektivitu zejména pro bazické látky a při použití methanolu jsou silanofilní interakce více zřejmé.

Pomocí Engelhardtova testu zjišťujeme účinnost kolony (počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra, který počítáme z píku toluenu) stejně jako u Waltersova testu, hydrofobní vlastnosti kolony, silanofilní interakce a tvarovou selektivitu stacionární fáze.

Testovací směs se skládá z uracilu, toluenu, ethylbenzenu, fenolu, N,N-dimethylanilinu, anilinu a isomerních toluidinů. Toluén a ethylbenzen slouží ke zjištění hydrofobních interakcí a tvarové selektivity stacionární fáze. Tvarovou selektivitu vypočítáme ze vztahu (9):

$$\alpha = \frac{k_{\text{ethylbenzen}}}{k_{\text{toluen}}} \quad (9)$$

kde  $\alpha$  je tvarová selektivita,  $k_{\text{ethylbenzen}}$  je retenční faktor ethylbenzenu,  $k_{\text{toluen}}$  je retenční faktor toluenu.

Silanofilní interakce jsou testovány pomocí N,N-dimethylanilinu, který je silnou bází ( $pK_b = 5,15$ ) a anilinu, který je slabou bází ( $pK_b = 9,37$ ). Isomerní toluidiny slouží jako speciální ukazatele silanofilních interakcí, protože mají stejné hydrofobní vlastnosti, ale liší se hodnotou  $pK$ . *o*-toluidin ( $pK_b = 9,56$ ), *m*-toluidin ( $pK_b = 9,27$ ), *p*-toluidin ( $pK_b = 8,92$ ).

U bazických látek (anilinu a N,N-dimethylanilinu) vyhodnocujeme asymetrii píku. Asymetrie píku se měří v 5 nebo 10 % výšky píku. U Gaussovského píku je hodnota asymetrie rovna jedné. Hodnota asymetrie větší než jedna odpovídá rozmytým píkům, které jsou typické pro kapalinovou chromatografii. Asymetrii píku v 10 % výšky píku počítáme podle vztahu (10).

$$A_s = (b/a)_{10\%} \quad (10)$$

kde  $A_s$  je asymetrický faktor,  $b$  je pološířka v 10 % výšky píku odlehlejší od těžiště píku [mm],  $a$  je pološířka v 10 % výšky píku přilehlá k těžišti píku [mm].

Pro vyhodnocení vlivu silanolových skupin na výsledné tvary píků bazických látek počítáme poměr asymetrie píku anilinu a fenolu. Anilin je bazickou látkou a



jeho píkova asymetrie je ovlivněna interakcemi se zbytkovými silanolovými skupinami. Fenol je nepolární látkou, je na koloně také zadržován, a slouží k redukci vlivu asymetrie píku vzniklé jinými faktory než silanofilními interakcemi. Vztah pro výpočet poměru asymetrie píku anilinu a fenolu je uveden v rovnici (11).

$$S_{\lambda} = (A_{\lambda, \text{anilin}} / A_{\lambda, \text{fenol}}) \quad (11)$$

kde  $S_{\lambda}$  je poměr asymetrie píku anilinu a fenolu,  $A_{\lambda, \text{anilin}}$  je asymetrie píku anilinu,  $A_{\lambda, \text{fenol}}$  je asymetrie píku fenolu.

Testování kolon by mělo být prováděno při smáčeném stavu stacionární fáze, kdy jsou interakce vázaných alkylových řetězců se složkami mobilní fáze silnější než interakce řetězců samotných. Tento požadavek platí, pokud obsah vody v mobilní fázi nepřekročí 50% objemových. Při vyšší koncentraci vody jsou interakce mezi řetězci silnější a dochází vzhledem k hydrofobnosti vázané fáze k ireverzibilnímu kolapsu řetězců. Jako mobilní fáze je tedy u Engelhardtova testu použita směs methanolu a vody v objemovém poměru 55:45 a průtok mobilní fáze je 1 ml/min.

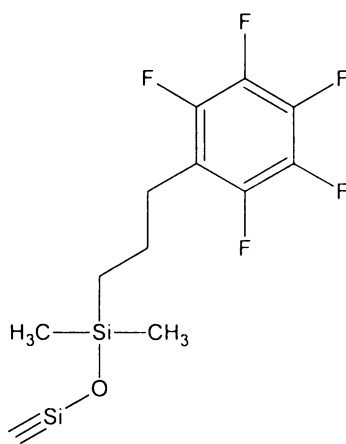
Podle Engelhardta by se dobrá kolona měla chovat takto:

- anilin by měl vždy eluovat před fenolem
- podíl asymetrie píku anilinu a fenolu by měl být menší než 1,3
- u isomerních toluidinů by nemělo dojít k jejich separaci a měli by být eluováni v rámci jednoho symetrického píku
- N,N-dimethylanilin má být eluován před toluenem.

## 2.8 Discovery<sup>®</sup> HS F5

Stacionární fáze u kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 je tvořena silikagelem, na jehož povrch jsou chemicky navázány pentafluorfenylpropylové funkční skupiny. Struktura pentafluorfenylpropylsiloxanu je uvedena na obr. 1. Podle výrobce by tato kolona měla poskytovat podobné retenční časy jako klasická oktadecylová kolona. Avšak látky bazické povahy jsou na Discovery<sup>®</sup> HS F5 více zadržovány a i celkově platí, že většina látek je eluována v mírně delším čase, což je u mnoha separací výhodou. Látky, které s použitím klasické oktadecylové kolony elují v mrtvém čase, jsou při použití této kolony déle zadržovány a eluovány až za mrtvým časem [4].

Stacionární fáze kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 je přednostně smáčena mobilní fází obsahující acetonitril a objem složek absorbovaný z mobilní fáze acetonitril-voda je významně vyšší než při použití mobilní fáze methanol:voda. [27].



Obr.1: Struktura pentafluorofenylpropylsiloxanu

V následující tabulce (tabulka 1) jsou uvedeny základní fyzikálně chemické vlastnosti kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5.

Tabulka 1: Základní fyzikálně chemické vlastnosti kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5. Údaje v tabulce byly získány z práce [4].

Vázaná fáze	Pentafluorofenylpropyl
Endcapping	Ano
Nosič	Silikagel
Tvar částic	Kulovitý
Obsah kovů v částicích	< 10 ppm
Velikost pórů [Å]	120
Povrch [m <sup>2</sup> /g]	300
%C	12
Stabilita při pH	2 - 8
Stabilita při teplotě	≤ 70 °C
Délka kolony [cm]	25
Vnitřní průměr [mm]	4,6
Průměr částic [μm]	5

## 3. Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

- acetonitril – Chromasolv<sup>®</sup> pro HPLC, čistota gradient grade, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- methanol – Chromasolv<sup>®</sup> pro HPLC, čistota gradient grade, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- deionizovaná voda – Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)
- uracil – 99%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- anthracen – purum (>98%, HPLC), Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- N,N-diethyl-m-toluamid – purum (>99%, GC), Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- benzen – HPLC grade, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- toluen – p.a., Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- fenol – p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- anilin – 99,5+% A.C.S. Reagent, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- N,N-dimethylanilin – čistý, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- *o*-toluidin – 99%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- *m*-toluidin – 99%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- *p*-toluidin – 99%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- toluen – p.a. Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- ethylbenzen – 99%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)

### 3.2 Waltersův test aktivity volných silanolových skupin

#### 3.2.1 Příprava vzorků a mobilní fáze

Příprava mobilní fáze

100% acetonitril byl před použitím vždy odplyněn 10 minut v ultrazvukové lázni.

### Příprava vzorků

- N,N-diethyl-m-toluamid v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo rozpuštěno 0,10 ml DETA v mobilní fázi, vzorek byl před použitím odplyněn 10 minut v ultrazvukové lázni.
- anthracen, 0,2 g/l v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 10,0 mg anthracenu v mobilní fázi, vzorek byl 10 minut odplyněn v ultrazvukové lázni a před použitím byl filtrován.

### 3.2.2 Postup měření

Kolona byla při laboratorní teplotě promývána 40 minut mobilní fází (čistý acetonitril). Poté byly na kolonu dávkovány jednotlivé vzorky. Objem nástřiku činil 10  $\mu$ l. Detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Mrtvý retenční čas byl určen retenčním časem uracilu. Retenční čas uracilu byl získán při určování indexu hydrofobnosti.

## 3.3 Waltersův test – určení účinnosti a indexu hydrofobnosti

### 3.3.1 Příprava vzorků a mobilní fáze

#### Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 325 ml acetonitrilu + 175 ml deionizované vody, což odpovídá 65 % (obj.) acetonitrilu a 35 % (obj.) vody. Připravená mobilní fáze byla před každým použitím odplyněna 10 minut v ultrazvukové lázni.

#### Příprava vzorků

- uracil, 15,0 mg/l v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo rozpuštěno 1,50 mg uracilu v mobilní fázi
- benzen, 17,5 g/l v odměrné baňce o objemu 100 ml byly rozpuštěny 2,0 ml benzenu v mobilní fázi
- toluen, 1,7 g/l v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo rozpuštěno 0,20 ml toluenu v mobilní fázi

Všechny tyto vzorky byly před použitím odplyněny 10 minut v ultrazvukové lázni.

- anthracen, 0,2 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 10,0 mg anthracenu v čistém acetonitrilu, vzorek byl 10 minut odplyněn v ultrazvukové lázni a před použitím byl filtrován. Vzorek byl rozpuštěn v čistém acetonitrilu kvůli nedostatečné rozpustnosti v mobilní fázi.

### 3.3.2 Postup měření

Kolona byla při laboratorní teplotě promývána 40 minut mobilní fází o složení acetonitril:voda, 65:35 (obj./obj.). Poté byly na kolonu dávkovány jednotlivé vzorky. Objem nástřiku činil 10 µl. Detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

## 3.4 Engelhardtův test

### 3.4.1 Příprava vzorků a mobilní fáze

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 550 ml methanolu + 450 ml deionizované vody, což odpovídá 55 % (obj.) methanolu a 45 % (obj.) vody. Připravená mobilní fáze byla před každým použitím odplyněna 10 minut v ultrazvukové lázni.

Příprava vzorků

- uracil, 15,0 mg/l - v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo rozpuštěno 1,50 mg uracilu v mobilní fázi
- anilin, 0,5 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 24,5 µl anilinu v mobilní fázi
- fenol, 0,1 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 5,0 mg fenolu v mobilní fázi
- *o*-toluidin, 1,0 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 50,0 µl *o*-toluidinu v mobilní fázi
- *m*-toluidin, 1,0 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 50,0 µl *m*-toluidinu v mobilní fázi
- *p*-toluidin, 1,0 g/l - v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 50,0 mg *p*-toluidinu v mobilní fázi

- toluen, 1.0 g/l v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 57,8  $\mu$ l toluenu v mobilní fázi
- N,N-dimethylanilin, 0,2 g/l v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 10,5  $\mu$ l N,N-dimethylanilinu v mobilní fázi
- ethylbenzen, 1,0 g/l v odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 53  $\mu$ l ethylbenzenu ve 100% methanolu. Vzorek byl rozpuštěn ve 100 % methanolu kvůli nedostatečné rozpustnosti v mobilní fázi.

Všechny vzorky byly umístěny na 10 minut do ultrazvukové lázně a před použitím byly filtrovány do vialek.

### 3.4.2 Postup měření

Kolona byla umístěna v termostatu, který ji vyhříval na 40 °C. Před měřením byla kolona 40 minut promývána mobilní fází při průtoku 0,8 ml/min, který byl snížen oproti předepsanému průtoku 1 ml/min. Důvodem pro toto snížení byl velký tlak na koloně, který se pohyboval na horním tlakovém limitu kolony. Poté byly dávkovány jednotlivé vzorky, které byly detegovány při vlnové délce 254 nm. Objem nástřiku činil 10  $\mu$ l.

### 3.5 Přístroje a programy

Pevné vzorky byly navažovány na analytických vahách APX-100 (Denver Instruments, USA). Pro odplynění vzorků a mobilních fází byl použit ultrazvuk Ultrasonic-LC 30 II. Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu složeném z čerpadla LC-XPD pump (Pye Unicam, UK), dávkovacího ventilu Rheodyne, model 7725i s 10  $\mu$ l dávkovací smyčkou (Cotati, CA, USA) a detektoru LC-UV detector (Pye Unicam, UK). Kolona byla vyhřívána v termostatu Column Oven LCO 101 (Ecom, ČR). Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program CSW 32, verze 1.4.7 (Data Apex, ČR). Pro grafickou prezentaci naměřených dat sloužil program Microcal<sup>TM</sup> Origin<sup>®</sup>, verze 6.0 (Microcal Software, Inc, MA, USA)

### **3.6 Kolona**

V této práci byla testována kolona Discovery<sup>®</sup> HS F5. Fyzikálně chemické vlastnosti této kolony jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 18).

Výrobce: SUPELCO, Supelco Park, Bellefonte, PA 16823-0048, USA

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Waltersův test

Za předepsaných experimentálních podmínek, tedy v čistém acetonitrilu jako mobilní fázi, průtoku mobilní fáze 1 ml/min, detekci při vlnové délce 254 nm a objemu nástřiku 10  $\mu$ l, byly změřeny retenční časy N,N-diethyl-m-toluamidu a anthracenu. Pomocí těchto dat byl vypočítán silanolový index, který je dán poměrem retenčních faktorů N,N-diethyl-m-toluamidu a anthracenu a podává nám informaci o aktivitě volných silanolových skupin na povrchu stacionární fáze.

V mobilní fázi složené z 65 % (obj.) acetonitrilu a 35 % (obj.) vody byly při průtoku 1 ml/min, detekci při vlnové délce 254 nm a objemu nástřiku 10  $\mu$ l změřeny retenční časy uracilu, benzenu, toluenu a anthracenu. Poměr retenčních faktorů anthracenu a benzenu byl použit pro výpočet indexu hydrofobnosti. Z retenčního času toluenu a parametru jeho píku byla vyhodnocena účinnost kolony jako počet teoretických pater na kolonu ( $n_k$ ), počet teoretických pater na metr ( $n_m$ ), výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) a také redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra ( $H_r$ ). Mrtvý čas kolony je dán retenčním časem uracilu. Všechny zmíněné naměřené hodnoty a z nich vypočítané charakteristiky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Naměřené a vypočítané charakteristiky Waltersova testu

#### Aktivita volných silanolových skupin

$t_M$ (uracil) [min]	$k$ -DETA	$k$ -anthracen	SiOH index
2,22	0,41	0,52	0,79

#### Index hydrofobnosti

$t_M$ (uracil) [min]	$k$ -anthracen	$k$ -benzen	HP index
2,22	3,52	1,18	2,99

#### Účinnost kolony – parametry použité při výpočtu

$t_R$ toluen [min]	$w_{1/2}$ toluen [min]	$L$ [cm]	$d_p$ [ $\mu$ m]
5,57	0,16	25	5

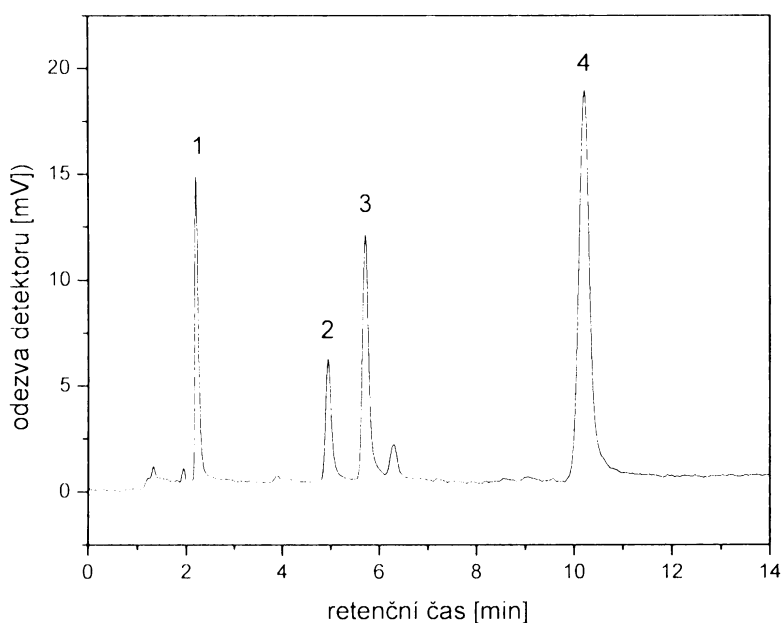
#### Účinnost kolony

$n_k$	$n_m$	$H$ [ $\mu$ m]	$H_r$
6714	26 856	37,24	7,44



Hodnota SiOH indexu menší než 0,9 poukazuje na nízkou aktivitu silanolových skupin [22]. Z retenčních faktorů N,N-diethyl-m-toluamidu a anthracenu vidíme, že oba tyto analyty strávily ve stacionární fázi méně času než v mobilní fázi a N,N-diethyl-m-toluamid tedy významným způsobem neinteragoval se stacionární fází. Hodnota indexu hydrofobnosti vypovídá o menším uplatnění hydrofobních interakcí u této stacionární fáze za zvolených experimentálních podmínek. Index hydrofobnosti u oktadecylových kolon se nejčastěji pohybuje okolo hodnoty 4. Toto zjištění potvrzuje polárnější charakter pentafluorfenylpropylsiloxanu oproti klasickým oktadecylovým stacionárním fázím.

V porovnání s ostatními kolonami testovanými Waltersovým testem má kolona Discovery<sup>®</sup> HS F5 velice nízkou účinnost (typické hodnoty  $n_m$  se pro oktadecylové stacionární fáze pohybují okolo 60 000), na základě čehož můžeme očekávat, že bude docházet k rozmyívání píků nejen vlivem nežádoucích interakcí se zbytkovými silanolovými skupinami, ale také s přispěním nízké účinnosti kolony. Chromatogram testovací směsi složené z uracilu, benzenu, toluenu a anthracenu je uveden na obr. 2.



Obr. 2: Chromatogram testovací směsi Waltersova testu při určování účinnosti a indexu hydrofobnosti. Kolona: Discovery<sup>®</sup> HS F5, 25 cm×4,6 mm×5 μm, průtok: 1 ml/min, tlak na koloně 10 MPa. Identifikace píků: 1-uracil, 2-benzen, 3-toluen, 4-anthracen, mobilní fáze: 65: 35 (obj./obj.) acetonitril – voda. Detekce při 254 nm.

Z chromatogramu je vidět, že během analýzy došlo k oddělení všech analytů až na základní linii. Také je zřejmé, že dochází k částečnému rozmývání píků všech analytů. Nejméně je zřetelný proces rozmývání na píku uracilu, který slouží pro určení mrtvého času. Podle testovaných kritérií Waltersova testu patří kolona Discovery<sup>®</sup> HS F5 do první skupiny kolon, což znamená, že kolona vykazuje nízkou afinitu k nepolárním látkám a nízkou až střední hodnotu silanofilních interakcí.

## 4.2 Engelhardtův test

Při testování kolony Engelhardtovým testem nebylo možno dosáhnout požadovaného průtoku 1 ml/min. Při laboratorní teplotě a průtoku mobilní fáze, 55 % (obj.) methanolu a 45 % (obj.) vody, 0.5 ml/min byl tlak na koloně 12,1 MPa. Výrobce uvedeno, že maximální tlak na koloně nesmí přesáhnout 27 MPa.

Pro dosažení průtoku co nejbližšího předepsané hodnotě byla kolona nejprve promývána čistým methanolem. Při průtoku 1 ml/min byl tlak na koloně 7,8 MPa při laboratorní teplotě a při teplotě 40 °C tlak klesl na 6,5 MPa. Při použití mobilní fáze o složení 55:45 (obj./obj.) methanol:voda byl maximální možný průtok pouze 0,8 ml/min, kterému odpovídal tlak na koloně 14,1 MPa. Při vyšším průtoku by byl překročen povolený tlakový limit kolony a mohlo by dojít k jejímu poškození. Takto vysoký tlak souvisí s viskozitou mobilní fáze, a především s poměrem organického rozpouštědla methanolu a vody. Tento poměr je prakticky 1:1 a takováto směs má nejvyšší viskozitu. Pokud stoupá podíl methanolu či naopak vody v mobilní fázi, viskozita této směsi klesá.

V mobilní fázi o složení 55:45 (obj./obj.) methanol:voda při průtoku 0,8 ml/min, teplotě kolony 40 °C, detekci při vlnové délce 254 nm a objemu nástřiku 10 µl byly změřeny retenční časy uracilu, fenolu, anilinu, N,N-dimethylanilinu, *o*-toluidinu, *m*-toluidinu, *p*-toluidinu, toluenu a ethylbenzenu. Z retenčního času toluenu a parametrů jeho píku byla vyhodnocena účinnost kolony jako počet teoretických pater na kolonu ( $n_k$ ), počet teoretických pater na metr ( $n_m$ ) a výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ). Tvarová selektivita studované stacionární fáze byla zjištěna z podílu retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu. Pro charakterizaci silanofilních interakcí byly vyhodnoceny asymetrie píku anilinu a N,N-dimethylanilinu v 10 %

výšky píku a k vyhodnocení vlivu silanolových skupin na výsledné tvary píků bazických látek byl zjištěn poměr asymetrie píku anilinu a fenolu v 10 % výšky píku. Všechny zmíněné naměřené hodnoty a z nich vypočítané charakteristiky jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3: Naměřené a vypočítané charakteristiky Engelhardtova testu

**Retenční faktory látek Engelhardtova testu**

$k_{\text{fenol}}$	$k_{\text{anilin}}$	$k_{\text{N,N-A}}^*$	$k_{o\text{-toluidin}}$	$k_{m\text{-toluidin}}$	$k_{p\text{-toluidin}}$	$k_{\text{toluen}}$	$k_{\text{ethylbenzen}}$
0,99	3,06	10,32	3,44	4,69	7,85	4,47	6,88

**Účinnost kolony – parametry použité při výpočtu**

$t_R$ toluen [min]	$w_{1/2}$ toluen [min]	$L$ [cm]
17,95	0,81	25

**Účinnost kolony**

$n_k$	$n_m$	$H$ [ $\mu\text{m}$ ]
2719	10876	91,94

**Asymetrie píků anilinu, N,N-A\* a fenolu**

$A_s$ (anilin)	$A_s$ (N,N-A)*	$A_s$ (fenol)
4,2	5,4	1,5

**Tvarová selektivita, hydrofobnost a poměr asymetrie píku anilinu a fenolu**

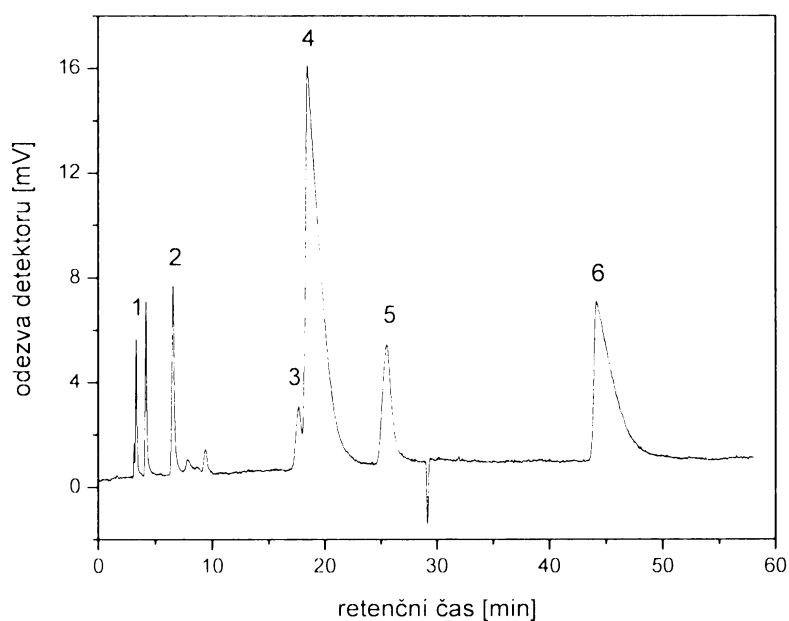
$\alpha$	$k$ -ethylbenzen	$S_{As}$
1,54	6,88	2,8

\*N,N-A je N,N-dimethylanilin

Z retenčních faktorů látek vidíme, že látky bazické povahy jsou na koloně zadržovány významným způsobem. Porovnáním retenčních faktorů a hodnot disociačních konstant N,N-dimethylanilinu ( $pK_b = 5,15$ ) anilinu ( $pK_b = 9,37$ ) a toluidinu je zřejmé, že tyto látky jsou zadržovány ve stacionární fázi podle vzrůstající bazicity. U toluidinů je tento jev nejvíce viditelný. *o*-toluidin s  $pK_b = 9,56$  je zadržován ve stacionární fázi méně než *p*-toluidin s  $pK_b = 8,92$ . Zároveň vidíme, že slabší báze jsou ve stacionární fázi zadržovány přibližně stejný čas jako nepolární látky a nejsilnější báze N,N-dimethylanilin je ve stacionární fázi zadržován mnohem déle než nepolární látky. Vyhodnocením poměru asymetrie píku anilinu a fenolu je

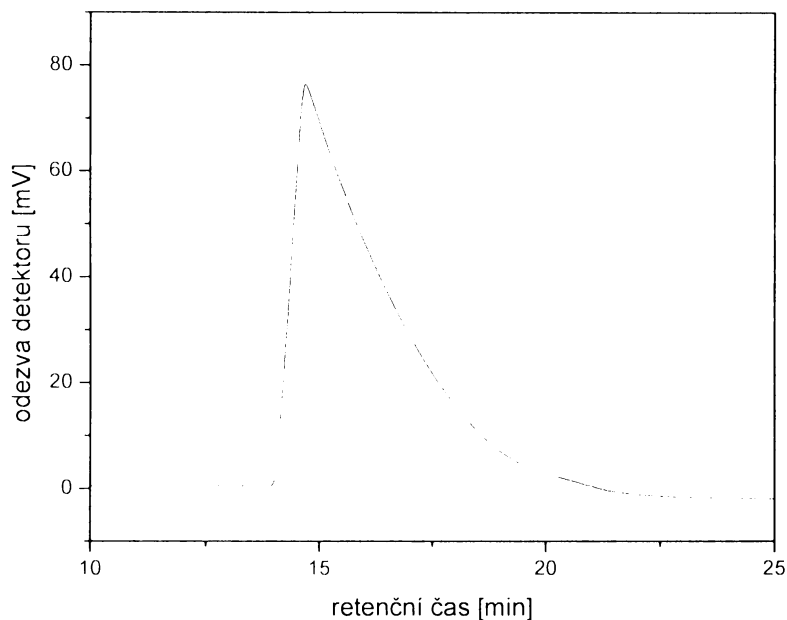
potvrzen nežádoucí vliv volných silanolových skupin na tvary píků bazických látek. Hodnota tohoto podílu by u dobře deaktivované stacionární fáze neměla přesáhnout hodnotu 1.3. V případě stacionární fáze kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 je tento podíl více jak dvojnásobný. Celkově tedy platí, že stacionární fáze bude obsahovat velké množství zbytkových silanolových skupin, díky kterým dochází k významnému zdržování bazických látek a dokonce k významnému rozdílu v retenčním chování látek s malým rozdílem v bazicitě (toluidiny). Toluidiny, které se používají jako speciální ukazatele silanofilních interakcí, na dobře deaktivované oktadecylové stacionární fázi eluují v jednom píku, často bez náznaku jakéhokoliv štěpení. Výsledek Engelhardtova testu potvrzuje, že v methanolickém prostředí se mnohem více projevuje aktivita silanolových skupin než v prostředí acetonitrilu. Při vyhodnocení Waltersova testu byla totiž kolona Discovery<sup>®</sup> HS F5 klasifikována jako stacionární fáze s nízkou až střední aktivitou silanolových skupin.

Na obr. 3 je uveden chromatogram testovací směsi podle Engelhardta.



Obr. 3: Chromatogram testovací směsi Engelhardtova testu. Kolona: Discovery<sup>®</sup> HS F5, 25 cm×4,6 mm×5 μm, průtok: 0,8 ml/min, tlak na koloně 14,1 MPa. Identifikace píků: 1-uracil, 2-fenol, 3-anilin, 4-toluen, 5-ethylbenzen, 6-N,N-dimethylanilin. Mobilní fáze: 55:45 (obj./obj.) methanol:voda. Detekce při 254 nm.

Hodnoty asymetrie píku *N,N*-dimethylanilinu a anilinu jsou větší než jedna, což opět potvrzuje aktivitu zbytkových silanolových skupin. Na obr. 4 je uveden pík *o*-toluidinu, jehož šířka při základně je okolo 8 minut. Stejný tvar píku měly i ostatní toluidiny a bazické látky, docházelo tedy ke značnému rozmývání.



Obr. 4: Pík *o*-toluidinu. Kolona: Discovery™ HS F5, 25 cm×4,6 mm×5 μm, průtok: 0,8 ml/min, tlak na koloně 14,1 MPa. Mobilní fáze: 55: 45 (obj./obj.) methanol:voda. Detekce při 254 nm.

Podle Engelhardta slouží ethylbenzen a toluen k testování hydrofobních vlastností kolony, ale bylo zjištěno, že poměr retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu spíše než hydrofobnost charakterizuje tvarovou selektivitu pro methylenovou skupinu a hydrofobnost je lépe vyjádřit jako retenční faktor ethylbenzenu [23]. Hodnoty retenčního faktoru ethylbenzenu byly pro klasické oktadecylové fáze při průtoku 1 ml/min a teplotě 40°C v rozmezí hodnot 5-15. Studovaná stacionární fáze má hodnotu retenčního faktoru ethylbenzenu 6,88. Vzhledem k hodnotě retenčního faktoru a ke sníženému průtoku mobilní fáze, lze předpokládat, že i při průtoku 1 ml/min by tato hodnota ležela ve zmiňovaném rozmezí. Kolona Discovery® HS F5 má podobné hydrofobní chování jako klasické C<sub>18</sub> kolony.

U N,N-dimethylanilinu a anilinu docházelo k postupnému prodlužování retenčních času a ke zmenšování výšky píku. Tento jev je pravděpodobně výsledkem velice silných silanofilních interakcí, jejichž vlivem docházelo k sorpci těchto látek na stacionární fázi. Prodlužování retenčních časů pro anilin je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Změny retenčního chování anilinu s dobou používání kolony

Dny	$t_r$ (anilin) [min]	Výška píku [mV]
1.	13.23	44
3.	15.99	33
7.	17.21	30

Tento jev může být částečně ovlivněn i přípravou nové mobilní fáze mezi 1. a 3. dnem měření. Toto ovlivnění by však nemělo být příliš významné, protože mobilní fáze byla připravena z methanolu od stejného výrobce a byl dodržen stejný postup přípravy. Ostatní látky testovací směsi, které byly součástí chromatogramu, měly naprosto stejné retenční časy i při použití nové mobilní fáze.

Tvarová selektivita kolony zjištěná pomocí retenčních časů toluenu a ethylbenzenu odpovídá dostatečně tvarové selektivitě studované stacionární fáze. Hodnota tvarové selektivity je 1,54. Pro  $C_{18}$  kolony se hodnota tvarové selektivity pohybuje při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a teplotě kolony 40 °C v rozmezí hodnot 1,75-1,82. Vzhledem k nižšímu průtoku při provedení Engelhardtova testu se dá říci, že tvarová selektivita studované kolony je určitě menší než u oktadecylových stacionárních fází a dá se předpokládat (i vzhledem k vzhledu chromatogramu na obr. 3), že při vyšším průtoku by mohlo dojít až ke koeluci toluenu a ethylbenzenu. Účinnost kolony je stejně jako u Waltersova testu poměrně nízká, a přispívá tak k rozmývání separovaných látek a následnému vzniku nesymetrických píků.

Ke zlepšení separačních vlastností kolony by mohlo přispět pufování mobilní fáze, při nižších hodnotách pH by mělo dojít k omezení disociace silanolových skupin a píky bazických látek by měly eluovat v podobě píků s lepší symetrií. Použitím pufované mobilní fáze by pravděpodobně došlo k dalšímu zvýšení tlaku na koloně, a proto nebyla tato mobilní fáze studována.

Z uvedených faktů vyplývá, že stacionární fáze kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 není vhodná pro separaci látek bazického charakteru za podmínek použitých v Engelhardtově testu, tj. v mobilní fázi o složení 55:45 (obj./obj.) methanol:voda. Tato kolona nesplnila ani jeden z požadavků pro dobrou kolonu Engelhardtova testu, tzn. anilin nebyl eluován před toluenem, podíl asymetrie píku anilinu a fenolu je větší než 1,3 (má hodnotu 2,8), u isomerních toluidinů došlo k jejich separaci a N,N-dimethylanilin nebyl eluován před toluenem. Všechny zjištěné hodnoty Waltersova a Engelhardtova testu se přibližně shodují s výsledky studie [28], kde bylo testování provedeno s 15 cm kolonou a průtokem 1 ml/min.

## 5. Závěr

V předkládané bakalářské práci jsou shrnuty výsledky získané při charakterizaci moderní reverzní kolony na bázi silikagelu, kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5. Tato kolona obsahuje jako stacionární fázi silikagel modifikovaný pentafluorfenylpropylovými skupinami. Tato kolona je doporučována jako alternativa ke klasickým oktadecylovým kolonám a, dle údajů výrobce, by měla být vhodná pro analyty, které na klasických C<sub>18</sub> kolonách nelze spolehlivě analyzovat.

Kolona Discovery<sup>®</sup> HS F5 byla charakterizována dvěma chromatografickými testy, které zjišťují základní parametry kolony jako rozsah hydrofobních a silanofilních interakcí a účinnost kolony. U Waltersova testu se méně projevoval vliv volných silanolových skupin, zjištěná hodnota SiOH indexu dle Walterse poukazuje na nízkou koncentraci volných silanolových skupin na povrchu stacionární fáze. Pomocí retenčního chování nepolárních látek a následným vyhodnocením indexu hydrofobnosti bylo potvrzeno, že stacionární fáze Discovery<sup>®</sup> HS F5 má polárnější charakter, než klasické C<sub>18</sub> stacionární fáze. Dle kritéria Waltersova testu patří testovaná kolona do první skupiny kolon, tzn. že tato kolona vykazuje nízkou afinitu k nepolárním látkám a má nízkou až střední hodnotu silanofilních interakcí.

U Engelhardtova testu bylo potvrzeno, že silanofilní interakce se více projevují v mobilní fázi obsahující methanol. U tohoto testu se vliv a míra silanofilních interakcí zjišťuje vyhodnocováním asymetrie píku anilinu, N,N-dimethylanilinu a fenolu. Všechny výsledky testování silanofilních interakcí naznačují, že stacionární fáze kolony Discovery<sup>®</sup> HS F5 se vyznačuje velice silnými silanofilními interakcemi. S dobou používání kolony docházelo pravděpodobně k odkrývání dalších silanolových skupin, což se projevilo na rostoucí nesymetrii píků a postupnému prodlužování retenčních časů bazických látek. Obecně byla analýza bazických látek s použitím této kolony velice obtížná. Problémy s retenčním chováním bazických látek mohou být kromě vlivu volných silanolových skupin způsobeny strukturální povahou pentafluorfenylpropylových skupin. Díky přítomnosti benzenového jádra může docházet k  $\pi$ - $\pi$  interakcím mezi stacionární fází a analyty [28]. Dalším faktorem přispívajícím k problematice analýze bazických látek může být i přítomnost atomu fluoru. Zjištěná účinnost kolony byla u obou použitých testů



velice nízká. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že testovaná kolona nebyla nová. Kolona Discovery<sup>®</sup> H5 F5 vykazuje podobné retenční chování jako klasické oktadecylové kolony a je vhodnou alternativou k těmto kolonám.

## 6. Literatura

- [1] C. Stella, S. Rudaz., J.L. Veuthey, A. Tchaplá, Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and their Importance for Evaluating these Supports Part I, *Chromatographia Supplement*, Vol. 53, 113-131, (2001)
- [2] K. Štulík a kol., *Analytické separační metody*, Karolinum 2004
- [3] H.Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and Characterization of Reversed Phases, *Chromatographia* Vol. 29, No. 1/2, 59-68, (January 1990)
- [4] <[http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HIS\\_F5.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HIS_F5.html)>  
[cit. 25.1. 2007]
- [5] J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 779, 29-71, (1997)
- [6] Y. Sudo, T. Wada, Characteristics of octadecylsilylated silica gels end-capped by high temperature silylation, *J. Chromatogr. A*, 813, 239-246, (1998)
- [7] M. R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis, *J. Chromatogr. A*, 1088, 1-15, (2005)
- [8] J. Layne, Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases, *J. Chromatogr. A* 957, 149-164, (2002)
- [9] H.Engelhardt, Ch.Blay, J.Saar, Reversed Phase Chromatography-the Mystery of Surface Silanols, *Chromatographia Supplement* Vol. 62, 19-29, (2005)
- [10] H. Engelhardt, G. Ahr, Properties of Chemically Bonded Phases, *Chromatographia* Vol. 14 No. 4, 227-233, (April 1981)
- [11] J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Cleassens, High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr. A*, 691, 3-19, (1995)
- [12] C. McNeff, L. Zigan, K. Johnson, P. W. Carr, A. Wang, A. M. Weber-Main, Analytical Advantages of Highly stable Stationary Phases for Reversed-Phase LC, *LCGC*, Vol. 18, No. 5, 514-529, (May 2000)
- [13] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A* 1028, 1-30, (2004)
- [14] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, A. McCormick, P. W. Carr, Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A* 1028, 31-62, (2004)
- [15] B. Gawdzik, J. Osypiuk, Characterization of the Porous Structure of Polymeric Packings for HPLC, *Chromatographia* Vol. 54 , No. 9/10, 595-599, (November 2001)

- [16] <<http://www.natur.cuni.cz/pcoufal/hplc.html>> [cit. 25.2. 2006]
- [17] U. D. Neue, J. E. O'Gara, A. Méndez, Selectivity in reversed-phase separations Influence of the stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1127, 161-174, (2006)
- [18] C. Stella, S. Rudaz., J.L. Veuthey, A. Tchaplá, Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and their Importance for Evaluating these Supports Part II, *Chromatographia Supplement*, Vol. 53, 132-140, (2001)
- [19] H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, A Chromatographic Test Procedure for Reversed-Phase HPLC Column Evaluation, *LC-GC*, Vol. 15, No. 9, (September 1997)
- [20] K. Kimata, K. Iwaguci, S. Onishi, Chromatographic Characterisation of Silica C<sub>18</sub> Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.*, Vol. 27, 721-728, (December 1989)
- [21] S.V. Galushko, The Calculation of Retention and Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography, II. Methanol-Water Eluents, *Chromatographia* Vol. 36, (1993)
- [22] M. J. Walters, Classification of Octadecyl-Bonded Liquid Chromatography Columns, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 70, No. 3, 465-469, (1987)
- [23] H.A. Cleassens, M.A. van Straten, C.A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski, Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 826, 135-156, (1998)
- [24] R.M. Smith, S. Dube, A Certified Reference Material for HPLC, *Chromatographia*, Vol. 61, No. 7/8, April, 325-332, (2005)
- [25] H. Engelhardt, T. Lobert, Chromatographic Determination of Metallic Impurities in Reverse-Phase HPLC Columns, *Anal. Chem.*, vol. 71, 1885-1892, (1999)
- [26] B. Buszewski, K. Krupeczynska, G. Rychlicky, R. Lobinski, Effect of coverage density and structure of chemically bonded silica stationary phases on the separation of compounds with various properties, *J. Sep. Sci.*, No. 29, 829-836, (2006)
- [27] W. Kiridena, C. DeKay, W.W. Koziol, Z. Ali, H. Ahmed, C.F. Poole, Insights into the Retention Mechanism on a Pentafluorophenylpropylsiloxane-Bonded Silica Stationary Phase (Discovery HS F5) in RP-LC, *Chromatographia*, Vol. 63, No. 9/10, 407-417, (May 2006)
- [28] P. Jandera, K. Novotná, M. S. Beldean-Galea, K. Jiša, Retention and selectivity tests of silica-based and metal-oxide bonded stationary phases for RP-HPLC, *J. Sep. Sci.*, Vol. 29, 856-871, (2006)