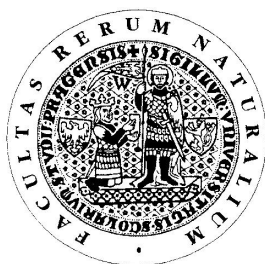


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Tomáš Vrzal

Charakterizace interakcí fluorované stacionární fáze
Rtx-200MS s analyty metodou inverzní plynové chromatografie

Characterization of interactions between Rtx-200MS fluorinated
stationary phase and analytes by inverse gas chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. dubna 2014.

Abstrakt

Fluorovaná stacionární fáze v koloně Rtx-200MS byla charakterizována pomocí systémových konstant Abrahamovy rovnice. Retence na této fázi je řízena disperzními a orientačními/indukčními silami. Významný příspěvek interakce volných elektronových párů nebo π -elektronů poskytuje unikátní selektivitu pro analyty s přebytkem elektronové hustoty. Neobvyklé chování této fáze bylo odhaleno pomocí studia separačního mechanismu polárních a nepolárních látek, v porovnání s jejich separací na polární a nepolární koloně. Toto chování je dáno středně velkou polaritou fáze (systémová konstanta s), která ale není natolik výrazná, aby při tvorbě indukčních sil s nepolárními látkami rušila jejich separaci. K tomu také může v některých případech přispívat interakce volných elektronových párů či π -elektronů.

Klíčová slova

fluorovaná stacionární fáze Rtx-200MS, inverzní plynová chromatografie, LFER metoda, Abrahamova rovnice

Abstract

Fluorinated stationary phase in Rtx-200MS column have been characterized by determination of system constants of Abraham equation. Retention on this phase is driven by dispersive and orientation/induction forces. Significant interaction contribution of lone pair electrons or π -electrons provides unique selectivity for analytes with excess of electron density. Unusual behavior of this phase have been determined by study of separation mechanism of polar and nonpolar analytes, in comparison of their separation on polar and nonpolar phases. This behavior is due to medium polarity of the phase (system constant s), which is not so pronounced to cancel separation of nonpolar analytes due to induction forces. In some cases contribution of lone pair electrons or π -electrons can contribute to this separations.

Key words

fluorinated stationary phase Rtx-200MS, inverse gas chromatography, LFER method, Abraham's equation

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Mezimolekulární interakce	9
1.1.1	Orientační síly	9
1.1.2	Indukční síly	10
1.1.3	Disperzní síly	10
1.1.4	Vodíková vazba	11
1.1.5	Halogenová vazba	12
1.2	Retence v plynové chromatografii	14
1.3	Abrahamův LFER model	16
1.3.1	Deskriptory	18
1.3.2	Systémové konstanty	20
1.3.3	Určení deskriptorů	21
1.4	Kvantitativní vztahy mezi strukturou a vlastnostmi	22
1.5	Systémové konstanty různých kolon	23
2	Experimentální část	24
2.1	Použité chemikálie	24
2.2	Přístroje	24
2.3	Příprava vzorků	24
2.4	Podmínky analýz	25
2.5	Zpracování dat	26
3	Výsledky a diskuze	27
3.1	Vícerozměrná lineární regrese	27
3.2	Teplotní závislost systémových konstant	37
3.3	Retenční příspěvky interakcí	38

3.4	Neobvyklé chování Rtx-200MS	43
3.5	Porovnání Rtx-200MS s jinými kolonami	45
4	Závěr	48

Seznam zkratek a symbolů

A – acidita vodíkové vazby

B – bazicita vodíkové vazby

C_{Me} – rovnovážná molární koncentrace analytu v mobilní fázi [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

C_{Se} – rovnovážná molární koncentrace analytu ve stacionární fázi [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

c' – zbytková interakce

E – přebytečná molární refrakce

E_{AB} – celková interakční energie [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

E_{ab} – energie vodíkových můstků [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

E_d – energie disperzních sil [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

E_i – energie indukčních sil [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

E_o – energie orientačních sil [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

e, s, a, b, l, v, c – regresní koeficienty Abrahamovy rovnice

F – Fisherovo kritérium

ΔG° – standardní změna Gibbsovy energie [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

K – rovnovážná distribuční konstanta

k' – retenční faktor

L – dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi n-hexadekan a vzduch při 25°C

LFER – lineární vztahy mezi Gibbsovou energií

MR – molární refrakce [$\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$]

N – počet atomů v molekule

n – počet analytů v sadě

QSPR – kvantitativní vztahy mezi strukturou a vlastnostmi

R – univerzální plynová konstanta [$8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$]

R_g – počet cyklů v molekule

R^2 – násobný korelační koeficient

S – bipolarita/polarizovatelnost

$S.D.$ – standardní odchylka

T – termodynamická teplota [K]

t_M – mrtvý retenční čas [min]

t_r – retenční čas [min]

V – McGowanův charakteristický objem [$(\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})/100$]

V_I – vlastní objem molekuly [$\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$]

WCOT – wall-coated open-tubular

α – selektivita stacionární fáze

β – fázový poměr kolony

η – index lomu

1 Úvod

Separace v plynové chromatografii je založena na rozdílné distribuci látek mezi stacionární (pevná nebo kapalná) a mobilní fází (plynná). Tato distribuce je určena především teplotou a interakcí analytu se stacionární fází, protože interakce analytu s mobilní fází je zanedbatelná. Mobilní fáze tedy slouží pouze k transportu analytů napříč kolonou, a nehraje roli v retenčním mechanismu. To lze předpokládat pouze za podmínek relativně nízkého tlaku na koloně, malých dávkovaných objemů vzorku a nízkomolekulárního plynu jako mobilní fáze. Z toho vyplývá ideální chování směsi plynu (mobilní fáze) a par analytu, kdy rozdílná selektivita pro různé stacionární fáze je zajištěna pouze interakcí analyt – stacionární fáze [1]. Znalost interakčních vlastností stacionární fáze a pochopení retenčního mechanismu různých analytů na této fázi, může být vhodným nástrojem pro výběr kolony a pro optimalizaci podmínek separace.

Rtx-200MS je kapilární kolona z taveného křemene typu WCOT (wall-coated open-tubular) s trifluoropropylmethyl polysiloxanovou stacionární fází. Stejně jako většina fluorovaných organických látek, tak i zmíněná stacionární fáze se chová neobvykle v porovnání s nefluorovanými látkami. V praxi se jedná především o fakt, kdy při separaci polárních analytů se tato stacionární fáze chová jako polární, avšak při separaci nepolárních analytů se naopak chová jako nepolární. Separuje tedy dobře jak polární, tak nepolární látky, což u jiných stacionárních fází není běžné. Tato kolona je v poslední době používána zejména pro účely analýzy perfluorovaných polutantů životního prostředí [2].

Cílem této práce je studium a charakterizace interakcí analytů se stacionární fází trifluoropropylmethyl polysiloxan v komerčně dostupné kapilární koloně Rtx-200MS, a odhalení, které ze slabých mezimolekulárních interakcí jsou touto fází preferovány, a tudíž se na retenci nejvíce podílejí. Prostředkem k samotnému stanovení byla zvolena Abrahamova metoda LFER (z anglického Linear Free Energy Relationships).

1.1 Mezimolekulární interakce

Mezimolekulární interakce jsou nekovalentní interakce mezi atomy či molekulami. Jsou relativně slabé a jsou základní hnací silou mnoha dějů v chemii, fyzice a biologii. V základě se jedná o elektrostatické přitahování mezi neutrálními částicemi, které nemají přímo náboj, ale pouze jeho distribuci – mají dipól. Tento distribuovaný náboj poté vede ke vzájemnému slabému přitahování molekul nebo jejich funkčních skupin. Dipóly mohou být permanentní nebo indukované. Permanentní dipóly se vyskytují v molekule vždy, dokonce i v nepřítomnosti externího elektrického pole. Oproti tomu indukovaný dipól vzniká pouze v přítomnosti vnějšího elektrického pole. Pro vznik indukovaného dipólu je důležitá vlastnost molekuly nazývaná polarizovatelnost. To je vlastnost molekuly, kdy přítomnost vnějšího elektrického pole (ze sousedního atomu nebo molekuly) vyvolá redistribuci jejího vnitřního náboje ve směru opačném k aplikovanému elektrickému poli. Indukovaný dipól je poté úměrný původnímu aplikovanému elektrickému poli a polarizovatelnosti molekuly [3]. Ze skutečnosti, že veškeré látky mohou existovat v kapalném nebo pevném skupenství, je zřejmé, že mezimolekulární interakce mohou existovat mezi všemi molekulami [4]. Většina látek může interagovat prostřednictvím několika typů interakcí najednou, avšak některá z nich může být převažující. Typ interakce určuje především struktura molekul. Jednotlivé typy interakcí, vodíkové můstky, orientační, indukční, a disperzní síly, se od sebe liší především jejich silou, kterou můžeme vyjádřit v jednotkách J/mol. Typické hodnoty energií interakcí jsou zapsány v tabulce 1.1.

Tab.1.1: Typické hodnoty energií mezimolekulárních interakcí [5].

interakce	energie [kJ/mol]
disperzní	$\ll 1$
indukční	1
orientační	3
vodíkový můstek	19

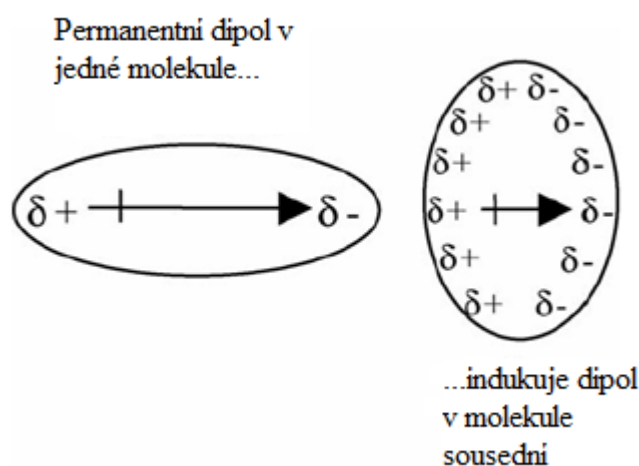
1.1.1 Orientační síly

Tento typ mezimolekulové interakce lze v literatuře nalézt pod názvem Keesomovy síly či interakce typu dipól-dipól. Principiálně jde o elektrostatické přitahování dvou permanentních dipólů v molekulách. Musí však nejprve dojít k prostorové orientaci těchto

dvou sousedících dipólů, což je značně narušováno náhodným tepelným pohybem jednotlivých molekul [6]. Dipól-dipól interakce je tedy vysoce závislá na vzájemné pozici obou interagujících molekul [4] a proto její síla značně závisí na teplotě.

1.1.2 Indukční síly

Debyeovy síly neboli indukční síly jsou interakcí typu dipól-indukovaný dipól, kdy permanentní dipól jedné molekuly vyvolá díky polarizovatelnosti druhé molekuly dipól v této sousední molekule. Vznik indukovaného dipólu a jeho interakce s permanentním dipólem je znázorněna na obr. 1.1. Oproti orientačním silám nejsou indukční síly prostorově závislé na vzájemné orientaci obou molekul. Z toho také vyplývá, že nejsou teplotně závislé [4].

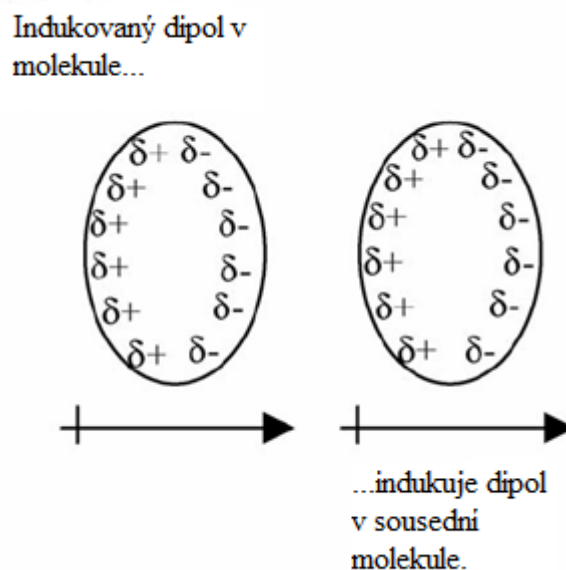


Obr. 1.1: Interakce dipól-indukovaný dipól. (Šipkou je znázorněna velikost a směr dipólového momentu) Převzato a upraveno z [4].

1.1.3 Disperzní síly

Disperzní síly (Londonovy síly) jsou interakcí typu indukovaný dipól-indukovaný dipól. Tento typ sil vzniká na základě neustálého pohybu elektronů, které mohou zaujmout velké množství pozic. Tak se vytváří elektrická disymetrie, kdy molekula má dipólový nebo multiplový moment. Tyto dipóly poté mohou indukovat dipóly v sousední molekule tím, že polarizují jeho elektronový oblak. Jelikož indukované dipóly v těchto dvou sousedících molekulách mají vůči sobě opačnou polaritu, začnou se slabě přitahovat [6].

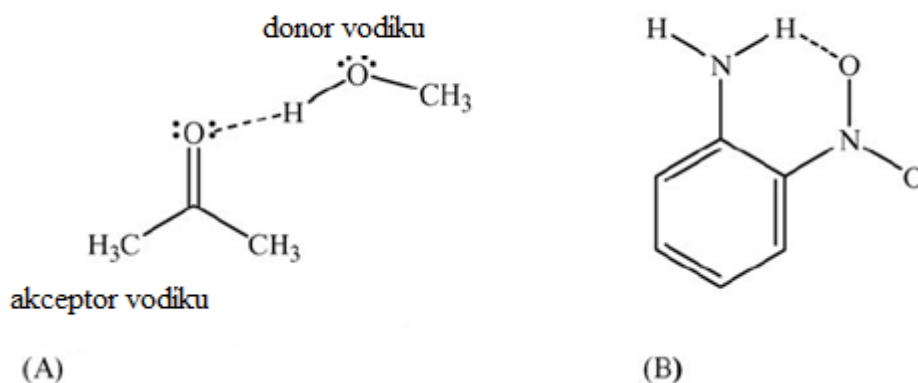
Vznik takovýchto indukovaných dipólů a jejich vzájemná interakce je naznačena na obr.1.2.



Obr.1.2: Polarizovatelnost a disperzní interakce. (Šipkou je znázorněna velikost a směr dipólového momentu) Převzato a upraveno z [4].

1.1.4 Vodíková vazba

Vodíková vazba neboli také vodíkový můstek je specifickou mezimolekulární interakcí, a patří mezi nejsilnější nevazebné interakce (viz Tab. 1.1). Tvoří se mezi molekulami obsahující vodíkový atom, přímo kovalentně vázaný na atomu s vysokou elektronegativitou, a atomem jiné molekuly, který má alespoň jeden volný elektronový pár. Elektronegativním atomem bývá nejčastěji kyslík, dusík a fluor. Díky vysoké elektronegativitě dochází k posunutí elektronové hustoty směrem k tomuto atomu. V důsledku toho vzniká na atomu vodíku parciální kladný náboj, který je přitahován záporným nábojem volného elektronového páru sousední molekuly či sousední funkční skupiny. Mezi molekulovými páry tvořící vodíkové můstky rozlišujeme kyselinu vodíkové vazby a bázi vodíkové vazby. Kyselinou je zde donor vodíku a bázi akceptor vodíku neboli dárce volného elektronového páru. Znázornění intermolekulárního a intramolekulárního vodíkového můstku je na obr. 1.3. Stejně jako orientační síly, tak i vodíkové můstky jsou závislé na vzájemné poloze dvou interagujících molekul. Proto jsou i vodíkové můstky teplotně závislou interakcí.



Obr. 1.3: (A) Intermolekulární a (B) intramolekulární vodíkový můstek. Převzato a upraveno z [4].

1.1.5 Halogenová vazba

Jedná se opět o slabou mezimolekulární interakci, která je charakterem podobná vodíkové vazbě. Akceptorem elektronové hustoty je zde atom halogenu, který při své polarizaci má parciální kladný náboj v podélném směru osy kovalentní vazby a parciální záporný náboj ve směru kolmém na tuto vazbu. Takováto distribuce elektronové hustoty kolem kovalentně vázaného halogenového atomu vytváří tzv. σ -díru, která má parciální kladný náboj, a záporný pás s parciálním záporným nábojem. Záporný pás náboje jiného atomu halogenu, volné elektronové páry a π -elektrony mohou interagovat se σ -dírou. Síla halogenové vazby klesá směrem k elektronegativnějším halogenům, které jsou zároveň méně polarizovatelné a nevytváří tak snadno distribuci elektronové hustoty. Důsledkem takovéto distribuce náboje je, že atom halogenu poté může vystupovat jako akceptor elektronového páru v halogenové vazbě, avšak může zároveň vystupovat jako donor elektronového páru ve vodíkové vazbě [7,8].

Pokud molekula interaguje s molekulami ve svém okolí, účastní se toho veškeré možné typy interakcí, které tyto molekuly mohou vzájemně poskytnout. Celkovou energii interakce molekuly A s okolní fází B můžeme zapsat následující obecnou rovnicí 1,

$$E_{AB} = E_d + E_o + E_i + E_{ab} \quad (1)$$

kde E_{AB} je celková interakční energie mezi molekulami A a B, E_d je energie disperzních sil, E_o je energie orientačních sil, E_i je energie indukčních sil a E_{ab} je energie vodíkových můstků. Obvykle ale nejsou jednotlivé interakční energie k dispozici, proto tuto rovnici v praxi nelze použít. Podobné znázornění celkové interakční energie ukazuje teorie skupinových interakcí. Pokud je molekula A například diethylether nekonečně zředěný v n-hexanu (molekula B), pak celková interakční energie molekuly A s molekulou B je dána součtem interakčních energií všech methylových skupin (E_{CH_3-B}), všech methylenových skupin (E_{CH_2-B}) a etherického kyslíku (E_{-O-B}) s okolními molekulami B. To lze opět zapsat do rovnice,

$$E_{AB} = E_{CH_3-B} + E_{CH_2-B} + E_{-O-B} \quad (2)$$

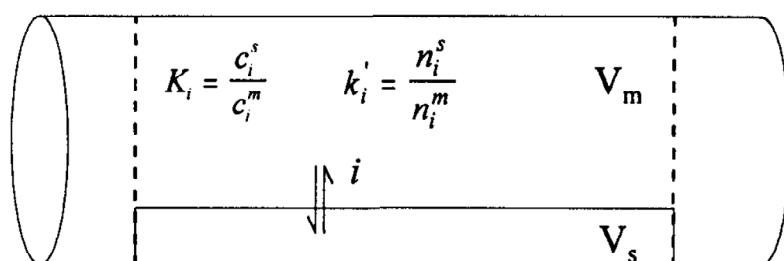
takovou rovnicí lze zapsat pro jakoukoliv molekulu A a jakoukoliv okolní fází B [6].

1.2 Retence v plynové chromatografii

Míru afinity analytu ke stacionární fázi lze vyjádřit zejména pomocí rovnovážné distribuční konstanty K_i , která je definována jako poměr rovnovážných koncentrací analytu ve stacionární a mobilní fázi. Tato konstanta je určena teplotou a energií interakcí molekul analytu se stacionární, případně i mobilní fází. V praxi se často používá místo distribuční konstanty retenční faktor k_i' , protože k hodnotě K_i je navíc zapotřebí znát poměr objemů obou fází v koloně, ten lze však jednoduše vypočítat z rozměrů kapilární kolony. Problém ovšem nastává v nerovnoměrnosti nanesení stacionární fáze v koloně, respektive v neznalosti této nerovnoměrnosti. Nepřesný fázový poměr poté ovlivňuje hodnotu distribuční konstanty. Retenční faktor lze jednoduše vypočítat z následující rovnice,

$$k_i' = \frac{t_{r_i} - t_M}{t_M} \quad (3)$$

kde t_{r_i} je retenční čas látky i [min] a t_M je mrtvý retenční čas [min]. Lze ho rovněž definovat jako poměr celkových látkových množství analytu ve stacionární fázi a v mobilní fázi při rovnováze [6]. Takovýto rovnovážný chromatografický stav je znázorněn na obrázku 1.4.



Obr. 1.4: Rovnovážný chromatografický stav [9].

Mrtvý retenční čas z rovnice 3 je eluční čas látky, která není stacionární fází zadržována. Pro jeho stanovení se využívají tzv. přímé nebo nepřímé metody. Přímé metody spočívají v dávkování látky, která se nezadržuje na stacionární fázi a která je zaznamenatelná příslušným detektorem. Takováto ideální látka však neexistuje, přesto použití některých permanentních plynů zaručuje výsledky s velmi malou chybou. Absenci takové ideální látky a časté používání plamenově ionizačního detektoru bylo impulzem pro vytvoření nepřímých metod.

Jednou z nich a nejvíce přijímanou metodou je lineární metoda tří homologních n-alkanů:

$$t_M = \frac{t_{R1} \cdot t_{R3} - t_{R2}^2}{t_{R3} + t_{R1} - 2t_{R2}} \quad (4)$$

kde t_{Rx} ($x = 1, 2$ a 3) je retenční čas [min] homologních uhlovodíků s n , $n+1$ a $n+2$ uhlíkovými atomy [10]. Pro studium vlastností v chromatografických měření je vhodné odečítat retenční čas v maximu symetrického píku. Takto získaná hodnota je rovnovážnou termodynamickou vlastností systému [4]. Systém se však musí nacházet v tzv. ideálním stavu, kdy plynná mobilní fáze se chová a stlačuje jako ideální plyn a stacionární fáze je nestlačitelná. Zároveň se předpokládá, že mobilní fáze není zadržována stacionární fází, rovnováha je ustavena prakticky okamžitě, je konstantní v každém bodě napříč kolonou a analyt v obou fázích je nekonečně zředěn. V takovém případě retence analytu kolonou závisí jen na interakci mezi analytem a stacionární fází. Rozdíly v těchto interakcích jsou základem plynově chromatografické separace [11]. V režimu nekonečného zředění je absorpční isoterma definována lineárním vztahem:

$$C_{Se} = K C_{Me} \quad (5)$$

kde C_{Se} je rovnovážná koncentrace analytu ve stacionární fázi [mol/l], C_{Me} je rovnovážná koncentrace analytu v mobilní fázi [mol/l] a K je rovnovážná distribuční konstanta. Ke vzájemné interakci molekul nedochází obvykle pokud vzdálenost jednotlivých molekul analytu je větší než 10 Å. Pokud zvýšíme množství analytu v koloně za určitou mez, dojde k tzv. předávkování kolony, kdy se zvýší koncentrace analytu a vzdálenost dvou molekul je menší než zmiňovaná hodnota 10 Å. V tomto případě spolu molekuly analytu interagují a absorpční isoterma se mění na polynomický tvar,

$$C_{Se} = K C_{Me} + K' C_{Me}^2 + \dots + K^n C_{Me}^n \quad (6)$$

kde K' je rovnovážná distribuční konstanta vztahující se k interakcím mezi molekulami analytů. V případě nelineární absorpční isotermy je retenční čas v maximu píku závislý na velikosti vzorku, respektive jeho koncentraci a píky jsou nesymetrické [12, 13].

1.3 Abrahamův LFER model

LFER je zkratkou z anglického Linear Free Energy Relationships (lineární vztahy mezi Gibbsovou energií) a je podmnožinou kvantitativních vztahů mezi strukturou a vlastnostmi molekul (Quantitative Structure – Properties Relationships, QSPR). Model je konstruovaný především pro predikci a charakterizaci procesů spojených s rozdělováním látek mezi dvě nemísitelné fáze. Hojně je využíván pro charakterizaci separačních systémů v chromatografických metodách. Lze ho však použít i pro popis biologických či biochemických procesů, jako je pronikání léčiv či drog skrz hematoencefalickou bariéru nebo kůži. Užitečným nástrojem se může stát například i při toxikologickém hodnocení environmentálních polutantů [14, 15] či jako podpora při objasňování struktury analytů [34]. Správně použitý model poskytuje způsob odhadu relativních příspěvků jednotlivých typů slabých mezimolekulárních interakcí k celkové změně Gibbsovy energie procesu přechodu látky mezi dvěma fázemi. Tato celková změna Gibbsovy energie je dána součtem energií jednotlivých interakcí účastnících se procesu. Tuto skutečnost lze zapsat analogicky dle rovnice 1 následovně,

$$\frac{\Delta G^0}{RT} = \frac{\Delta G_d^0 + \Delta G_p^0 + \Delta G_{hb}^0}{RT} \quad (7)$$

kde ΔG^0 je celková změna standardní Gibbsovy energie [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$], ΔG_d^0 , ΔG_p^0 a ΔG_{hb}^0 jsou standardní změny Gibbsových energií interakcí disperzního typu, orientačních a indukčních interakcí a vodíkových můstků [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$], R je univerzální plynová konstanta [$8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$] a T je termodynamická teplota [K]. Pokud tuto rovnici upravíme pomocí základních vztahů mezi rovnovážnou konstantou a Gibbsovou energií (za předpokladu rovnováhy je $\Delta G=0$):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (8)$$

$$K = k' \cdot \beta \quad (9)$$

kde K je rovnovážná konstanta procesu, k' je chromatografický retenční faktor a β je fázový poměr chromatografické kolony, získáme následující tvar rovnice.

$$\log k = -\frac{\Delta G^0}{2,303RT} - \log \beta \quad (10)$$

Nyní jsme dostali lineární vztah mezi $\log k'$ a změnou Gibbsovy energie, což je základem Abrahamovy rovnice pro přechod látky z plynné fáze do kapalné,

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + lL \quad (11)$$

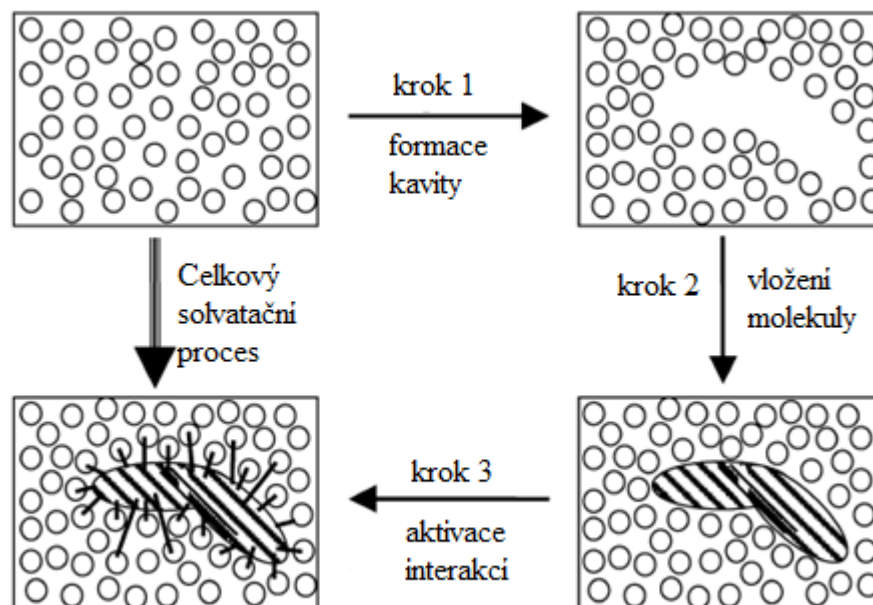
a pro rozdělování mezi dvě kapaliny,

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (12)$$

kde SP je vlastnost látky spjatá se změnou Gibbsovy energie. Při chromatografických studiích se za SP dosazují chromatografické vlastnosti látek, jakou je retenční faktor k' , relativní retenční čas t_{Rel} , nebo distribuční poměr K . Velké koeficienty E, S, A, B, L, V jsou deskriptory popisující interakční vlastnosti analytu. Malé koeficienty e, s, a, b, l, v, c jsou pro daný systém a teplotu konstantní. Popisují interakční vlastnosti systému a stanoví se na základě vícerozměrné lineární regrese. V případě plynové chromatografie popisují interakční vlastnosti dané stacionární fáze [1, 4, 16, 17]. Popis a význam jednotlivých deskriptorů a systémových konstant je uveden v podkapitolách 1.3.1 a 1.3.2.

Abrahamův model je založen na teorii kavity, která popisuje proces solvatace a kterou lze rozdělit na tři samostatné teoretické kroky:

- (1) V prvním kroku molekula A přechází z fáze 1 do fáze 2, na základě své větší afinity k fázi 2. Při tomto procesu se nejprve vytvoří ve fázi 2 prostor zvaný kavita, který je svou velikostí úměrný molekule A . To zahrnuje rozrušení interakcí mezi molekulami fáze 2, což vyžaduje dodání energie, a proto se jedná o endoergický proces.
- (2) Druhý krok zahrnuje vložení molekuly A do vzniklé kavity ve fázi 2 a reorganizaci molekul fáze 2 do jejich rovnovážných pozic pro interakci s molekulou A . Změna Gibbsovy energie této reorganizace je obvykle nevýznamná.
- (3) V třetím kroku začnou působit mezimolekulární interakce mezi molekulou A a molekulami fáze 2. Tyto interakce jsou exoergického charakteru a podporují proces vstupu molekuly A do fáze 2 [4, 16]. Celkový solvatační proces a jeho jednotlivé kroky jsou znázorněny na obr. 1.5.



Obr. 1.5: Schématické znázornění procesu solvatace látky A ve fázi 2. Převzato a upraveno z [4].

1.3.1 Deskriptory

Deskriptory obecně jsou parametry popisující molekulární strukturu. V případě chromatografického procesu úzce souvisí s retencí a poskytují popis jejího mechanismu na molekulární úrovni [29]. Deskriptory v Abrahamově rovnici E, S, A, B, L, V (viz. rovnice 11 a 12), jsou vstupními hodnotami do vícerozměrné lineární regrese. V průběhu historie se vyvíjely definice deskriptorů a také především znaky, kterými se jednotlivé deskriptory zapisují. Časový vývoj koncem dvacátého století je znázorněn v tabulce 1.2.

Tab. 1.2: Historický vývoj deskriptorů v Abrahamově rovnici [4].

období 20. století	deskriptory	charakteristika
konec 80. let	$\pi_2^*, \alpha_2^H, \beta_2^H, R_2, L^{16}, V_x$	původní deskriptory, π_2^* solvatochromicky založený, 1:1 vodíkové můstky
počátek 90. let	$\pi_2^H, \Sigma\alpha_2^H, \Sigma\beta_2^H, R_2, L^{16}, V_x$	plynově chromatograficky založené deskriptory a zahrnutí vícenásobných vazebných míst pro vodíkové můstky
konec 90. let	S, A, B, E, L, V	pouze nové symboly

Tyto deskriptory prošly značnou inovací zejména na počátku 90. let dvacátého století. Proto je velice důležité, aby byl brán zřetel na konzistenci deskriptorů, které vybíráme z literatury pro sadu testovacích látek. Mohlo by totiž snadno dojít k promíchání například hodnot původního deskriptoru π_2^* s hodnotami inovovaného π_2^H (neboli S dle nového značení). Oba deskriptory jsou rozdílně definované a jejich hodnoty se pro totožné látky liší.

Přebytečná molární refrakce E je definována jako molární refrakce analytu minus molární refrakce hypotetického n -alkanu o stejném charakteristickém objemu. Je konstruována za účelem vystihnout interakci polarizovatelných elektronů v molekule a zároveň vyloučit disperzní část, která je již obsažena v parametru L [18]. Je tedy mírou polarizovatelných elektronů v molekule a odráží schopnost molekuly interagovat s okolním prostředím prostřednictvím volných elektronových párů a π -elektronů [16]. Již z definice je zřejmé, že hodnoty deskriptoru E pro n -alkany budou rovny nule, pro více polarizovatelné molekuly budou větší než nula a pro molekuly méně polarizovatelné budou nabývat záporných hodnot.

Parametr L je dekadickým logaritmem rozdělovacího koeficientu mezi plynem a n -hexadekanem při 25°C. Zahrnuje jak endoergický příspěvek při tvorbě kavity, tak i exoergický příspěvek disperzní interakce [18]. Pro lepší pochopení tohoto parametru z fyzikálně-chemického hlediska slouží rovnice 13 [19], vysvětlující jednotlivé příspěvky:

$$L = 0,16 - 3,25V_I/100 + 0,165MR + 0,053\mu^2 \quad (13)$$

kde V_I je vlastní objem molekuly, MR je molární refrakce a μ je dipólový moment. Záporný koeficient objemu molekuly vysvětluje endoergický děj při formaci kavity, zatímco kladné koeficienty ostatních příspěvků vedou k exoergickým interakcím mezi konkrétní molekulou a n -hexadekanovou fází. Z rovnice vyplývá, že v případě látek s permanentními dipóly, k hodnotě L přispívají kromě disperzních sil také v malé míře indukční síly.

Pro děje spojené s rozdělováním mezi dvě kapaliny se místo parametru L zařazuje McGowanův charakteristický objem V (viz. rovnice 12). Tento parametr je mírou kavitačního efektu při rozrušování interakcí mezi molekulami rozpouštědla, zahrnuje však i příspěvek disperzních sil [16].

Bipolarita/polarizovatelnost molekuly je vyjádřena pomocí deskriptoru S . Ten je konstruován k popisu interakcí typu dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól. V minulosti

byla snaha tyto dvě vlastnosti oddělit do dvou samostatných parametrů, to se však ukázalo jako nemožné [20]. Deskriptor S je pro n -alkany definován jako $S=0$, podobně jako parametr E . Proto může deskriptor S nabývat krom kladných hodnot také hodnoty záporné.

Poslední z deskriptorů Abrahamovy rovnice jsou parametry popisující aciditu a bazicitu látek. Parametr A popisuje schopnost látky tvořit vodíkový můstek s okolním prostředím prostřednictvím vlastního vodíkového atomu a tedy být akceptorem elektronového páru ve vodíkové vazbě. Naopak parametr B popisuje schopnost látky tvořit takovýto vodíkový můstek pomocí vlastních volných elektronových párů (případně delokalizovaných π -elektronů) a tedy vystupovat jako donor elektronové hustoty ve vodíkové vazbě [4].

1.3.2 Systémové konstanty

Systémové konstanty e, s, a, b, l, c lze stanovit vícerozměrnou lineární regresí a charakterizují vlastnosti separačního systému. Obecně je každá z těchto konstant definována jako rozdíl dané vlastnosti dvou prostředí. V plynové chromatografii za určitých podmínek předpokládáme, že interakce mezi mobilní fází a molekulami analytu je nevýznamná, proto v tomto případě systémové konstanty vyjadřují komplementární vlastnost stacionární fáze účastnit se daných typů interakcí [21].

Konstanta e odráží tendenci stacionární fáze interagovat s analytem prostřednictvím jeho volných elektronových párů a π -elektronů. Míru bipolarity/polarizovatelnosti stacionární fáze vyjadřuje konstanta s , popisuje schopnost interagovat mezimolekulárními interakcemi dipólového typu. Konstanta a určuje míru bazicity stacionární fáze, schopnost přijímat vodík z molekuly analytu a tvořit s ním vodíkovou vazbu. Oproti tomu konstanta b určuje míru kyselosti fáze a schopnost být donorem vodíku ve vodíkové vazbě. Kombinaci práce potřebné pro vytvoření kavity ve stacionární fázi a schopnosti interagovat skrze disperzní interakce vyjadřuje konstanta l . Jelikož se látky v homologických řadách liší zejména v hodnotách deskriptoru L , konstanta l indikuje schopnost separovat členy homologických řad. Posledním výrazem rovnice je konstanta c , tj. úsek na ose y . Nezastupuje konkrétní typ interakce, ale závisí na volbě závisle proměnné (SP) a jeho hodnota zahrnuje příspěvky k retenci, které nejsou vystihnuty ostatními parametry v rovnici [4,22,23].

Abrahamova rovnice (viz rovnice 11) je tvořena počtem součinů, které definují příspěvky mezimolekulárních interakcí k celkové retenční charakteristice. Součin eE definuje příspěvek interakce volných elektronových párů či π -elektronů, sS zahrnuje příspěvek orientačních a indukčních sil, aA a bB jsou příspěvky vodíkových můstků a součin lL je mírou příspěvku disperzních interakcí a formování kavity [21]. Velká písmena odpovídají analytu a malá stacionární fázi.

1.3.3 Určení deskriptorů

Deskriptory pro jednotlivé látky nejčastěji získáváme z literatury a různých databází. Přestože se množství látek, jejichž deskriptory jsou známé, stále rozšiřuje, můžeme se setkat s látkami, jejichž hodnoty deskriptorů ještě nejsou známy. Jednotlivé deskriptory lze stanovit několika v principu velmi podobnými způsoby. Deskriptor E se primárně stanovuje výpočtem z experimentálně získaných hodnot indexů lomu při 20°C (sodíkový dublet, 598 nm) na základě rovnice:

$$E = 10V \left(\frac{\eta^2 - 1}{\eta^2 + 2} \right) - 2,832V + 0,526 \quad (14)$$

kde η je index lomu, E je přebytečná molární refrakce $[(\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})/10]$ a V je McGowanův charakteristický objem $[(\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})/100]$, který se vypočítá na základě příspěvků jednotlivých atomů, vazeb a kruhů v molekule podle rovnice:

$$V = \frac{[\sum(\text{příspěvek atomu}) - 6,56(N - 1 + Rg)]}{100} \quad (15)$$

kde N je celkový počet atomů v molekule a Rg je počet cyklů v molekule. Příspěvky jednotlivých atomů lze nalézt v literatuře [24].

Tento přístup však vyžaduje čisté a kapalné látky při 20°C. Absence čistých látek a zejména pevné skupenství při 20°C bylo impulsem pro vytvoření softwarů pro predikci indexů lomu (například ChemSketch od Advanced Chemistry Development, jehož balíček Absolv predikuje zároveň i hodnoty všech deskriptorů z rovnice 11 a 12). Deskriptory E a V jsou jedinými, které se stanovují přímo výpočtem, ostatní se nejčastěji stanovují na základě zpětného výpočtu z Abrahamovy rovnice. Rozšířené je zejména stanovení pomocí plynové chromatografie, kdy na základě známých systémových konstant pro danou stacionární fázi a retenční charakteristiky konkrétní látky lze deskriptory vypočítat. Deskriptor L se primárně stanovuje z jeho definice jako dekadický logaritmus

rozdělovacího koeficientu dané látky na hexadekanové stacionární fázi při 25°C. Lze ho však stanovit pomocí jiných nepolárních stacionárních fází za teploty větší než 25°C, kdy $s \approx a \approx b = 0$ a hodnota E je již známá. Obvykle se k tomuto účelu používá poly(methyloktylsiloxan), který poskytuje nejlepší výsledky. Lze však také použít poly(dimethylsiloxan), který ale není až tak vhodný, díky jeho významným hodnotám systémových konstant a a s . Poté následuje stanovení deskriptoru S , k tomu se využívá polárních stacionárních fází za podmínek kdy příspěvek vodíkových můstků lze ignorovat. Zejména vhodné jsou stacionární fáze, jejichž poměr konstant s/a je velký. Naopak polární stacionární fáze s velkým poměrem a/s je vhodný pro stanovení deskriptoru A . Deskriptor B obvykle nelze pomocí plynově chromatografického měření na běžných stacionárních fází stanovit, což vyplývá z faktu, že pouze velice omezené množství stacionárních fází pro plynovou chromatografii má kyselý vodík pro tvorbu vodíkové vazby s analyty, a tudíž nenulovou hodnotu systémové konstanty b . K tomuto účelu se často sahá po znalosti rozdělovacího koeficientu dané látky mezi vodu a organické rozpouštědlo [16, 25].

Výše popsany způsob stanovení deskriptorů Abrahamovy rovnice je nejčastěji používaný, avšak není zcela jedinou možností. Lze například využít přístupu skupinových příspěvků [26, 27], predikce pomocí neuronové sítě [28] nebo výpočet na základě molekulární struktury a jednoduchých vlastností [32].

1.4 Kvantitativní vztahy mezi strukturou a vlastnostmi

Hlavním cílem všech QSPR studií je nalézt matematický model, charakterizující vztah mezi strukturou látek, která je popisována pomocí jednoho nebo více deskriptorů, a konkrétní studovanou vlastností. Tyto studie obecně předpokládají, že jakákoliv vlastnost látky je funkcí její chemické struktury. Toho lze využít například pro predikce různých fyzikálních či fyzikálně-chemických vlastností, jako je například bod varu nebo bod tání, rozdělovací koeficient mezi oktanol a vodu, či pro predikci retenčních dat. V případě chromatografie, modely založené na QSPR nejsou příliš vhodné pro účely identifikace látek, ale mohou posloužit, jako užitečný nástroj při studiu retenčního mechanismu nebo při optimalizaci separace složitých směsí [29,30].

Pro nalezení matematického vztahu se hojně využívá lineární regrese (metoda nejmenších čtverců), to ovšem pouze pokud je vztah mezi závisle proměnnou a nezávisle proměnnými lineární. V opačném případě se volí jiné nelineární modelování. Pokud

závisle proměnná závisí na více než jedné nezávisle proměnné, jednoduchá lineární regrese zde nestačí a používá se regrese ve vícerozměrném uspořádání. Jejím výsledkem jsou regresní koeficienty, vyjadřující do jaké míry a kterým směrem daná nezávisle proměnná přispívá k závisle proměnné. Model se poté statisticky hodnotí pomocí násobného korelačního koeficientu R^2 , standardní odchylky $S.D.$ a Fisherovým kritériem F . Abychom zajistili, že výsledek vícerozměrné regrese nebude závislý na sadě vstupních dat (deskriptorů), platí pro jejich výběr několik doporučení. Především by měli hodnoty deskriptorů zahrnovat široký prostor bez nadměrného shlukování. Velikost sady látek se doporučuje v počtu alespoň 25-30. Měli bychom zamezit velké korelaci mezi jednotlivými deskriptory napříč sadou. To by mohlo způsobit špatnou identifikaci jednotlivých příspěvků interakcí. Hodnoty závisle proměnných by měly pokrývat rozsah alespoň jednoho řádu. Látky musejí být použitelné za daných experimentálních podmínek, speciálně u plynové chromatografie musí být stabilní při vyšších teplotách, lehce získatelné ve vysoké čistotě a relativně levné [30,31].

1.5 Systémové konstanty různých kolon

V odborné literatuře lze nalézt systémové konstanty různých kolon a stacionárních fází ve velkém rozsahu jejich polarit. Největší sborník zaměřený na charakterizaci kapilárních kolon pro plynovou chromatografii vydal Poole a kol. [21], kde je porovnáváno padesát kapilárních kolon s různými stacionárními fázemi od různých výrobců. V tabulce 1.3 je vybráno šest kolon s polysiloxanovými stacionárními fázemi (nepolární, středně polární, polární, fluorovaná) a jedna polyethylenglykolová stacionární fáze. Pro porovnání konstant c s kolonami o různých fázových poměrech, je v tabulce zařazena konstanta c' , která vystihuje pouze interakci a není závislá na hodnotě fázového poměru, jak se zřejmě z rovnice 16 a 17.

$$c = c' - \log \beta \quad (16)$$

$$\log k' = -\log \beta + c' + eE + sS + aA + bB + lL \quad (17)$$

Tab. 1.3: Systémové konstanty vybraných kapilárních kolon, teplota 100°C [21].

	stacionární fáze	e	s	a	l	c	c'
DB-1	dimethyl polysiloxan	-0,02	0,23	0,22	0,56	-2,02	-0,11
DB-35	35% difenyl dimethyl polysiloxan	0,04	0,70	0,33	0,58	-2,51	-0,41
DB-1301	6% kyanopropylfenyl dimethyl polysiloxan	-0,08	0,51	0,55	0,59	-2,11	-0,32
DB-23	kyanopropylmethyl polysiloxan	-0,06	1,60	1,63	0,50	-3,15	-0,75
SP-2340	biskyanopropyl polysiloxan	0,06	1,90	2,05	0,45	-3,22	-0,72
DB-200	dimethylmethyltrifluoropropyl polysiloxan	-0,39	1,12	0,21	0,51	-2,48	-0,39
HP-20M	polyethylenglykol	0,22	1,46	2,20	0,52	-3,19	-0,76

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Hexan ($\geq 97\%$), methanol ($\geq 99,9\%$), acetonitril (99,9%), tetrachloroethylen ($\geq 99,9\%$, vše od Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), heptan ($\geq 99\%$), nonanol ($\geq 98\%$), methylacetát ($\geq 99\%$), ethylacetát ($\geq 99\%$), etylbenzen ($\geq 99\%$, vše od Fluka, Steinheim, Německo), oktan ($> 99\%$), nonan (99%), dekan ($> 99\%$), undekan ($> 99\%$), dodekan ($> 99\%$), tridekan ($> 99\%$), hexanol (98%), oktanol ($> 99\%$), 2-butanon ($> 99\%$), 2-pentanon (97%), 2-hexanon (98%), 2-heptanon (98%), 2-oktanon (98%), cyklohexanon (99,8%), propionitril (99%), nitroethan (96%), nitropropan (98%), nitrobutan (99%), nitropentan (99%), oktanal ($> 99\%$), ethylformiát (97%), pyridin (99%), fenol (99%), o-kresol ($> 99\%$), benzylalkohol (99%), anilin (99,5%), benzaldehyd ($> 99\%$), benzonitril (99%), nitrobenzen ($> 99\%$, vše od Aldrich, Steinheim, Německo), butanol (99,9%, Merck, Darmstadt, Německo), benzen (p.a.), toluen (99%), xylen (p.a., Lachema, Neratovice, Česká republika), vodík (99,9%), vzduch stlačený (oba od Linde, Praha, Czech Republic).

2.2 Přístroje

Pro všechny analýzy byl použit plynový chromatograf GC 8160 s plamenově ionizačním detektorem (Fisons Instruments Inc, Parkton, USA) vybavený kapilární kolonou Rtx-200MS (30m, 0,25mm ID, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 μ m, trifluoropropylmethyl polysiloxan, Restek, Bellefonte, USA) a autosamplerem AS 800 (Fisons Instruments Inc, Parkton, USA), signál z detektoru byl zesilován pomocí zesilovače EL 980 (Fisons Instruments Inc, Parkton, USA).

2.3 Příprava vzorků

Pevné látky (fenol a o-kresol) byly naváženy v množství 0,0049 g a 0,0029 g. Tyto navážky byly rozpuštěny ve 2 ml hexanu ve skleněné vialce. Takto vznikl zásobní roztok, ze kterého byl pro přípravu vzorku odebrán 10 μ l a převeden do 990 μ l hexanu. Vzniklý roztok byl analyzován. Kapalné látky byly podle předběžně změřených retenčních časů při 100°C (kolona Rtx-200MS) rozděleny do sedmi samostatných skupin, tak aby píky

jednotlivých látek ve skupinách nebyly překryté a byla možná jejich jednoduchá identifikace. Jednotlivé skupiny a jejich členy jsou zapsány v tabulce 2.1. Zásobní roztoky jednotlivých skupin byly připraveny do skleněných vialek odpipetováním 100 μl každé látky do předem vypočítaného objemu příslušného rozpouštědla, tak aby výsledný součet objemů byl 1 ml. Z takto připravených zásobních roztoků bylo pro přípravu vzorku odebráno 10 μl a převedeno do 990 μl příslušného rozpouštědla. Při analýzách byl dbán zřetel na symetričnost píků v chromatogramu (nikoliv na koncentraci samotných vzorků), proto v případě potřeby byly vzorky ještě dále 100x ředěny. K tomu docházelo zejména u vzorků skupiny č. 1 obsahující n-alkany, a který byl používán zejména ke stanovení mrtvého retenčního času. Tento vzorek byl, pro účely kontroly, zařazován pravidelně vždy na začátku, v průběhu a na konci každého dne měření, či po každé změně experimentálních podmínek.

Tab. 2.1: Rozložení analytů ve skupinách a použitá rozpouštědla

skupina	1	2	3	4	5	6	7
rozp.	hexan	methanol	hexan	methanol	methanol	dekan	methanol
analyty	heptan	butanol	benzen	nitroethan	acetonitril	ethylformiát	xylen
	oktan	toluen	2-butanon	nitropropan	propionitril	methylacetát	benzylalkohol
	nonan	pyridin	2-pentanon	nitrobutan	anilin	ethylacetát	oktanal
	dekan	ethylbenzen	2-hexanon	nitropentan	benzonitril		nonanol
	undekan	hexanol	2-heptanon				tetrachloroethylen
	dodekan	oktanol	cyklohexanon				
	tridekan	nitrobenzen	benzaldehyd				
			2-oktanon				

2.4 Podmínky analýzy

Plynově chromatografické analýzy byly provedeny isotermálně při teplotách kolony 60, 70, 80, 90 a 100°C. Do injektoru byl vstřikován pomocí autosampleru vzorek o objemu 0,1 μl , teplota injektoru byla 250°C, průtok plynu na oplachu septa byl 4ml/min a průtok děličem toku 50ml/min. Nosným plynem byl vodík s nastavenou hodnotou tlaku 55 kPa. Teplota plamenově ionizačního detektoru byla 250°C, pomocnými plyny pro detektor byly vodík s tlakem 50 kPa a vzduch o tlaku 90 kPa. Průtoky byly měřeny pomocí bublinkového průtokoměru.

2.5 Zpracování dat

Signál z detektoru byl zaznamenáván počítačovým programem Chrom-Card verze 1.19 a ve stejném programu byly výsledné chromatogramy zpracovány. Všechna měření byla opakována třikrát a opakovatelnost se pohybovala řádově v desetinách procent. Z naměřených dat byly vypočítány retenční faktory dle rovnice 3 a jejich dekadické logaritmy, mrtvý retenční čas byl vypočítán na základě rovnice 4. Hodnoty $\log k'$ menší než -0,75 byly ze sady dat odstraněny, protože tyto hodnoty jsou příliš zatíženy chybou stanovení mrtvého retenčního času [32]. Zbylé hodnoty $\log k'$ byly spolu s hodnotami deskriptorů uspořádány do matice pro vícerozměrnou lineární regresi, pomocí níž byly stanoveny systémové konstanty (regresní koeficienty) z rovnice 11. Veškeré výpočty, statistické zpracování (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) a grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel 2007.

3 Výsledky a diskuze

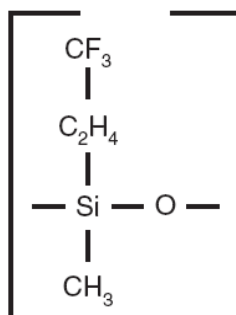
3.1 Vícerozměrná lineární regrese

Pro sadu testovacích analytů byly vybrány látky různých vlastností a funkčních skupin, kdy hlavním kritériem výběru byla snadná použitelnost pro plynovou chromatografii, dostupnost látky v čisté formě a zejména dostupnost deskriptorů v odborné literatuře. Tyto látky a hodnoty jejich deskriptorů jsou uvedeny v tabulce 3.1, jejich experimentální hodnoty $\log k'$ při teplotách 60, 70, 80, 90 a 100°C, měřeny na koloně Rtx-200MS, jsou uvedeny v tabulce 3.2. Hodnoty z obou tabulek byly vstupními daty do vícerozměrné lineární regrese. Deskriptor *B* byl ze vstupních dat vyřazen, protože parametr kyselosti *b* byl shledán statisticky nevýznamným. To je zřejmé již ze základní struktury stacionární fáze, která neobsahuje žádný kyselý vodík, viz obrázek 3.1, kromě nevýznamného množství předpokládaných terminálních hydroxylových skupin.

V tabulce 3.3 jsou korelační koeficienty mezi jednotlivými deskriptory z tabulky 3.1. Z těchto hodnot je patrné, že hodnoty deskriptorů mezi sebou příliš nekorelují a ve výsledku tedy neruší stanovení příspěvků jednotlivých interakcí. Největší korelační koeficient byl nalezen mezi deskriptory E a S s hodnotou 0,58, která odpovídá středně silné korelaci.

Tab. 3.3: Korelační koeficienty mezi deskriptory.

	E	S	A	L
E	1,00			
S	0,58	1,00		
A	0,32	0,14	1,00	
L	0,04	-0,39	0,15	1,00



Obr. 3.1: Struktura stacionární fáze v koloně Rtx-200MS dle výrobce. Převzato z [39].

Tab. 3.4: Rozsah vstupních dat do vícerozměrné lineární regrese.

	E	S	A	L
nejnižší	0,000	0,00	0,00	1,739
nejvyšší	0,955	1,12	0,60	6,156
rozdíl	0,955	1,12	0,60	4,417

	log k'				
	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
nejnižší	-0,675	-0,706	-0,726	-0,723	-0,675
nejvyšší	1,329	1,114	0,823	0,742	0,560
rozdíl	2,004	1,819	1,550	1,465	1,235

Silnější korelace mezi těmito dvěma deskriptory (*E* a *S*) je dána charakterem obou deskriptorů a nelze ji příliš významně ovlivnit. Rozsah hodnot z tabulek 3.1 a 3.2, jejichž nejnižší a nejvyšší hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.4. Z této tabulky je zřejmé, že rozsah hodnot retenčních faktorů je v případě všech studovaných teplot větší než jeden řád a s rostoucí teplotou klesá. Z tohoto hlediska jsou použita data vhodná pro vícerozměrnou regresi, viz. podkapitola 1.4.

Tab. 3.1: Sada testovacích analytů, hodnoty deskriptorů a jejich zdroje.

	E	S	A	L	zdroj
n-heptan	0,000	0,00	0,00	3,173	[35]
n-oktan	0,000	0,00	0,00	3,677	[35]
n-nonan	0,000	0,00	0,00	4,182	[35]
n-dekan	0,000	0,00	0,00	4,686	[35]
n-undekan	0,000	0,00	0,00	5,185	[21]
n-dodekan	0,000	0,00	0,00	5,684	[21]
n-tridekan	0,000	0,00	0,00	6,156	[21]
butanol	0,224	0,42	0,37	2,601	[35]
hexanol	0,210	0,42	0,37	3,610	[35]
oktanol	0,199	0,42	0,37	4,619	[35]
nonanol	0,199	0,446	0,336	5,097	[21]
2-butanon	0,166	0,70	0,00	2,287	[35]
2-pentanon	0,143	0,68	0,00	2,755	[35]
2-hexanon	0,136	0,68	0,00	3,286	[35]
2-heptanon	0,123	0,68	0,00	3,760	[35]
2-oktanon	0,108	0,68	0,00	4,257	[35]
Cyklohexanon	0,403	0,86	0,00	3,792	[35]
acetonitril	0,237	0,90	0,07	1,739	[35]
propionitril	0,162	0,90	0,02	2,082	[35]
nitroethan	0,270	0,95	0,02	2,414	[35]
nitropropan	0,242	0,95	0,00	2,894	[35]
nitrobutan	0,227	0,904	0,042	3,383	[21]
nitropentan	0,212	0,906	0,033	3,897	[21]
oktanal	0,160	0,65	0,00	4,361	[35]
ethylformiát	0,146	0,66	0,00	1,845	[35]
methylacetát	0,142	0,64	0,00	1,911	[35]
ethylacetát	0,106	0,62	0,00	2,314	[35]
tetrachloroethylen	0,639	0,44	0,00	3,584	[35]
pyridin	0,631	0,842	0,000	3,006	[21]
benzen	0,610	0,52	0,00	2,786	[35]
toluen	0,601	0,52	0,00	3,325	[35]
ethylbenzen	0,613	0,51	0,00	3,778	[35]
m-xylen	0,613	0,52	0,00	3,839	[35]
p-xylen	0,623	0,52	0,00	3,839	[35]
o-xylen	0,663	0,56	0,00	3,939	[35]
fenol	0,805	0,89	0,60	3,766	[35]
o-kresol	0,840	0,86	0,52	4,218	[35]
benzylalkohol	0,803	0,878	0,406	4,251	[21]
anilin	0,955	0,96	0,26	3,934	[35]
benzaldehyd	0,813	1,025	0,00	4,006	[21]
benzonitril	0,742	1,120	0,00	4,053	[21]
nitrobenzen	0,871	1,11	0,00	4,557	[35]

Tab. 3.2: Experimentálně získané hodnoty logaritmu retenčního faktoru na koloně Rtx-200MS.

	log k				
	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
n-heptan	-0,562	-0,706	-	-	-
n-oktan	-0,259	-0,415	-0,554	-0,723	-
n-nonan	0,050	-0,122	-0,278	-0,447	-0,555
n-dekan	0,360	0,170	-0,002	-0,178	-0,308
n-undekan	0,669	0,462	0,274	0,086	-0,061
n-dodekan	0,978	0,753	0,549	0,348	0,184
n-tridekan	1,287	1,043	0,823	0,608	-
butanol	-0,382	-0,525	-0,667	-	-
hexanol	0,271	0,091	-0,080	-0,215	-0,375
oktanol	0,907	0,690	0,487	0,313	0,137
nonanol	1,223	0,992	0,771	0,572	0,394
2-butanon	-0,286	-0,457	-0,574	-0,702	-
2-pentanon	-0,001	-0,177	-0,314	-0,452	-0,550
2-hexanon	0,329	0,140	-0,017	-0,169	-0,292
2-heptanon	0,646	0,442	0,266	0,100	-0,044
2-oktanon	0,962	0,742	0,547	0,366	0,206
Cyklohexanon	0,740	0,544	0,374	0,214	0,075
acetonitril	-0,468	-0,595	-0,702	-	-
propionitril	-0,190	-0,332	-0,458	-0,557	-
nitroethan	0,034	-0,125	-0,271	-0,379	-0,507
nitropropan	0,300	0,129	-0,029	-0,156	-0,293
nitrobutan	0,617	0,430	0,256	0,110	-0,041
nitropentan	0,941	0,736	0,545	0,381	0,216
oktanal	0,925	0,718	0,520	0,343	0,191
ethylformiát	-0,675	-	-	-	-
methylacetát	-0,621	-	-	-	-
ethylacetát	-0,369	-	-0,662	-	-
tetrachloroethylen	-	-	-	-0,490	-0,607
pyridin	0,083	-0,080	-0,248	-0,363	-0,517
benzen	-0,460	-0,628	-0,726	-	-
toluen	-0,122	-0,272	-0,418	-0,518	-0,675
ethylbenzen	0,153	-0,014	-0,172	-0,304	-0,451
m-xylen	0,154	-0,006	-0,165	-0,297	-0,418
p-xylen	0,196	0,031	-0,131	-0,267	-0,393
o-xylen	0,295	0,127	-0,038	-0,177	-0,308
fenol	0,630	0,433	0,256	0,079	-0,073
o-kresol	0,862	0,653	0,464	0,283	0,115
benzylalkohol	0,901	0,698	0,471	0,328	0,181
anilin	0,774	0,577	0,397	0,235	0,075
benzaldehyd	0,851	0,648	0,471	0,305	0,158
benzonitril	1,042	0,840	0,654	0,486	0,322
nitrobenzen	1,329	1,114	-	0,742	0,560

Výsledkem vícerozměrné lineární regrese jsou systémové konstanty, odpovídající regresním koeficientům lineární rovnice a spolu se statistikou jsou uvedeny v tabulce 3.5, 3.6 a v tabulce 3.7 jsou uvedeny meze opakovatelnosti určující interval spolehlivosti.

Tab. 3.5: Výsledek regrese a statistika; kolona Rtx-200MS.

t [°C]	systémové konstanty						statistika			
	e	s	a	l	c	c'	R ²	S.D.	F	n
60	-0,52	1,30	0,25	0,63	-2,59	-0,19	0,9976	0,03	3799	41
70	-0,49	1,25	0,23	0,60	-2,62	-0,23	0,9974	0,03	3130	38
80	-0,47	1,19	0,21	0,56	-2,64	-0,24	0,9975	0,02	3165	37
90	-0,43	1,17	0,15	0,53	-2,67	-0,27	0,9957	0,03	1721	35
100	-0,42	1,12	0,12	0,51	-2,70	-0,30	0,9943	0,03	1132	31

R² – násobný korelační koeficient, S.D. – standardní odchylka odhadu při regresi, F – Fisherovo kritérium, n – počet látek

Tab. 3.6: Směrodatné odchylky stanovení systémových konstant

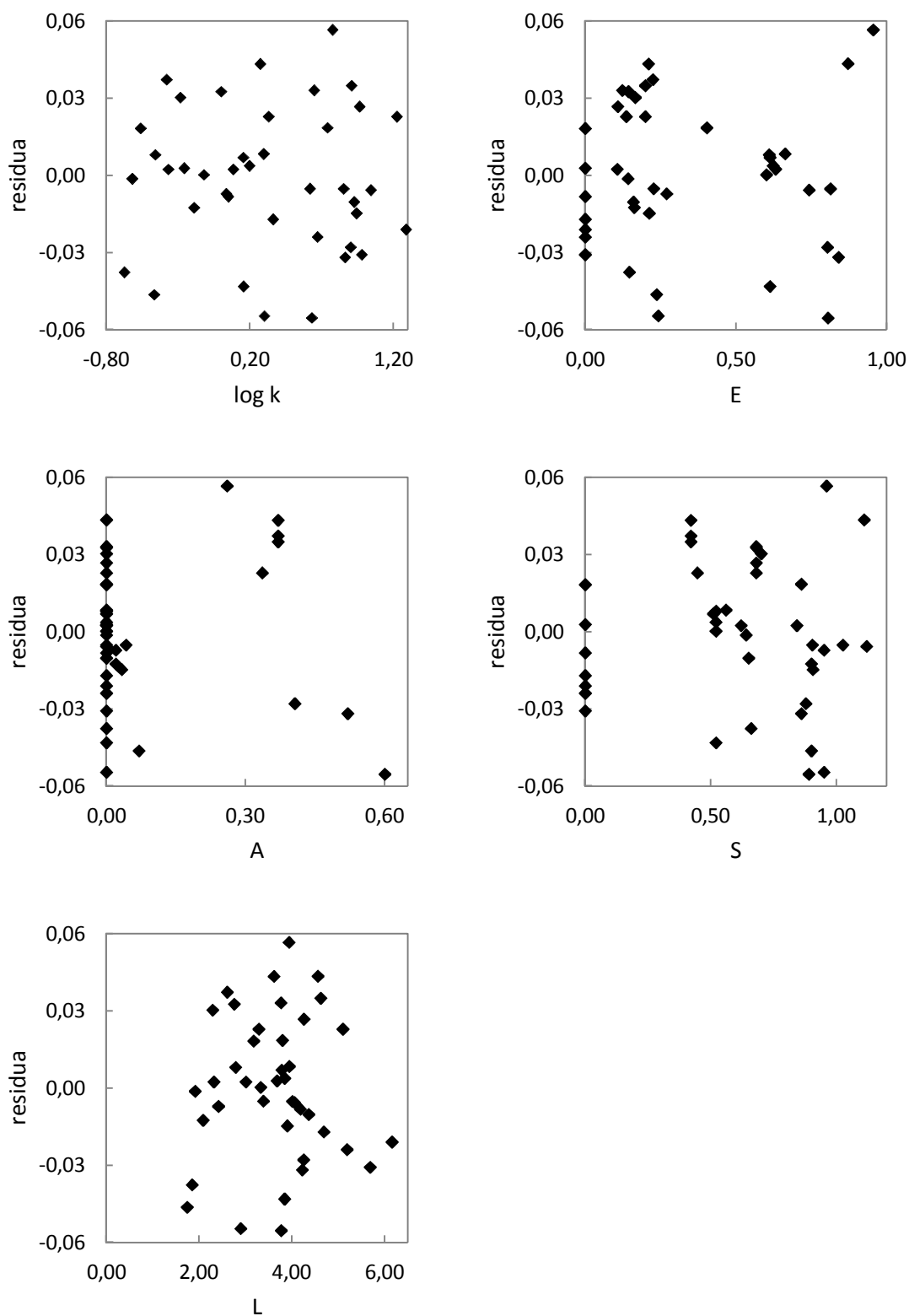
t [°C]	e	s	a	l	c
60	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03
70	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03
80	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03
90	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03
100	0,02	0,02	0,03	0,01	0,04

Tab. 3.7: Meze opakovatelnosti systémových konstant, na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

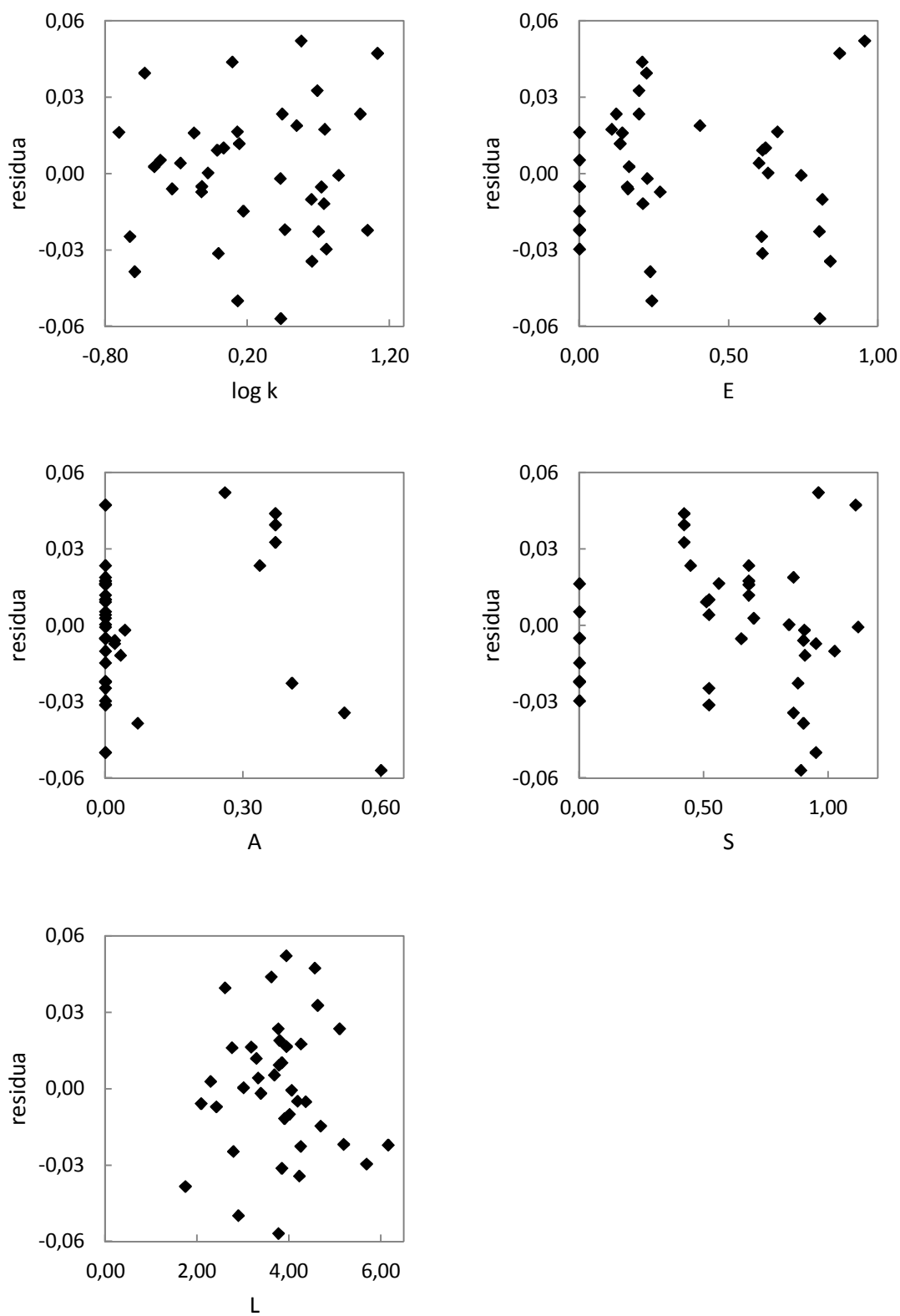
t [°C]	e	s	a	l	c
60	0,04	0,04	0,06	0,01	0,05
70	0,04	0,04	0,06	0,01	0,05
80	0,04	0,04	0,05	0,01	0,05
90	0,04	0,04	0,06	0,01	0,07
100	0,04	0,05	0,06	0,02	0,08

Hodnoty standardních odchylek v tabulce 3.5 vyjadřují míru přesnosti odhadu závisle proměnné pomocí regresního vztahu, který byl získán. Jednotlivé regresní koeficienty byly na základě párového t-testu shledány jako statisticky významně odlišné od nuly. Zatímco pro testování statistické významnosti proložení funkce lineární rovnicí jako celku je používáno tzv. Fisherovo kritérium F , které testuje nulovou hypotézu, že všechny koeficienty mají stejnou nulovou hodnotu a tedy nemají vliv na závisle proměnnou [36]. Pokud hodnota F překročí určitou mez, pak nulovou hypotézu zamítáme. V našem případě je tato mez v intervalu 2,63-2,74 (v závislosti na počtu použitých látek), což získané hodnoty F mnohonásobně převyšují, proto lze nulovou hypotézu zamítnout. Pomocí získaných systémových konstant lze pro každou studovanou teplotu sestavit Abrahamovu rovnici pro systém mobilní plynná fáze – stacionární fáze trifluoropropylmethyl polysiloxan, která bude kvantitativně popisovat retenci. Tato rovnice bude mít tvar rovnice 11, kdy logaritmovanou závisle proměnnou bude retenční faktor k' . V případě správného modelování retence pomocí získané Abrahamovy rovnice by měly hodnoty predikovaných závisle proměnných co nejvíce odpovídat hodnotám experimentálně získaným. To popisují standardní odchylky a násobný korelační koeficient v tabulce 3.5.

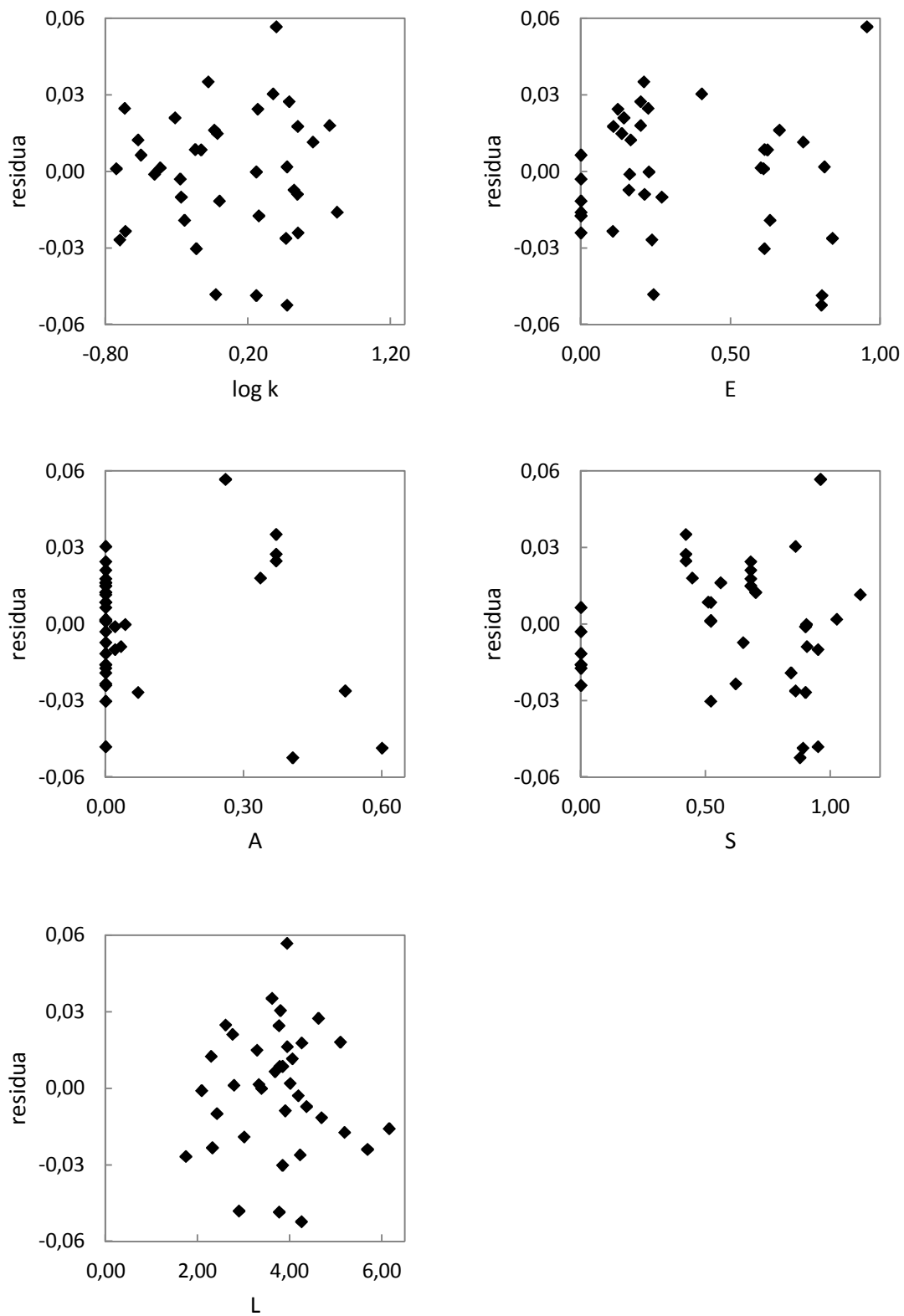
Pro jednoduché zhodnocení, zda je proložení lineárních funkcí konzistentní s naměřenými daty, byla použita grafická analýza residuálních hodnot. Kdy residua získané jako rozdíl mezi hodnotami $\log k'$ experimentálně získanými a vypočítanými z Abrahamovy rovnice byly proloženy do grafů proti vstupním datům [36, 37]. Tedy proti závisle proměnné $\log k'$ a proti deskriptorům E , S , A , L , viz obr. 3.2 až 3.6. Rozložení bodů v těchto grafech nenaznačuje žádný trend mezi residui a závisle a nezávisle proměnnými. Chyby jsou tedy náhodné a nezávislé na vstupních datech. Na základě toho lze předpokládat kvalitní proložení vstupních dat lineární funkcí.



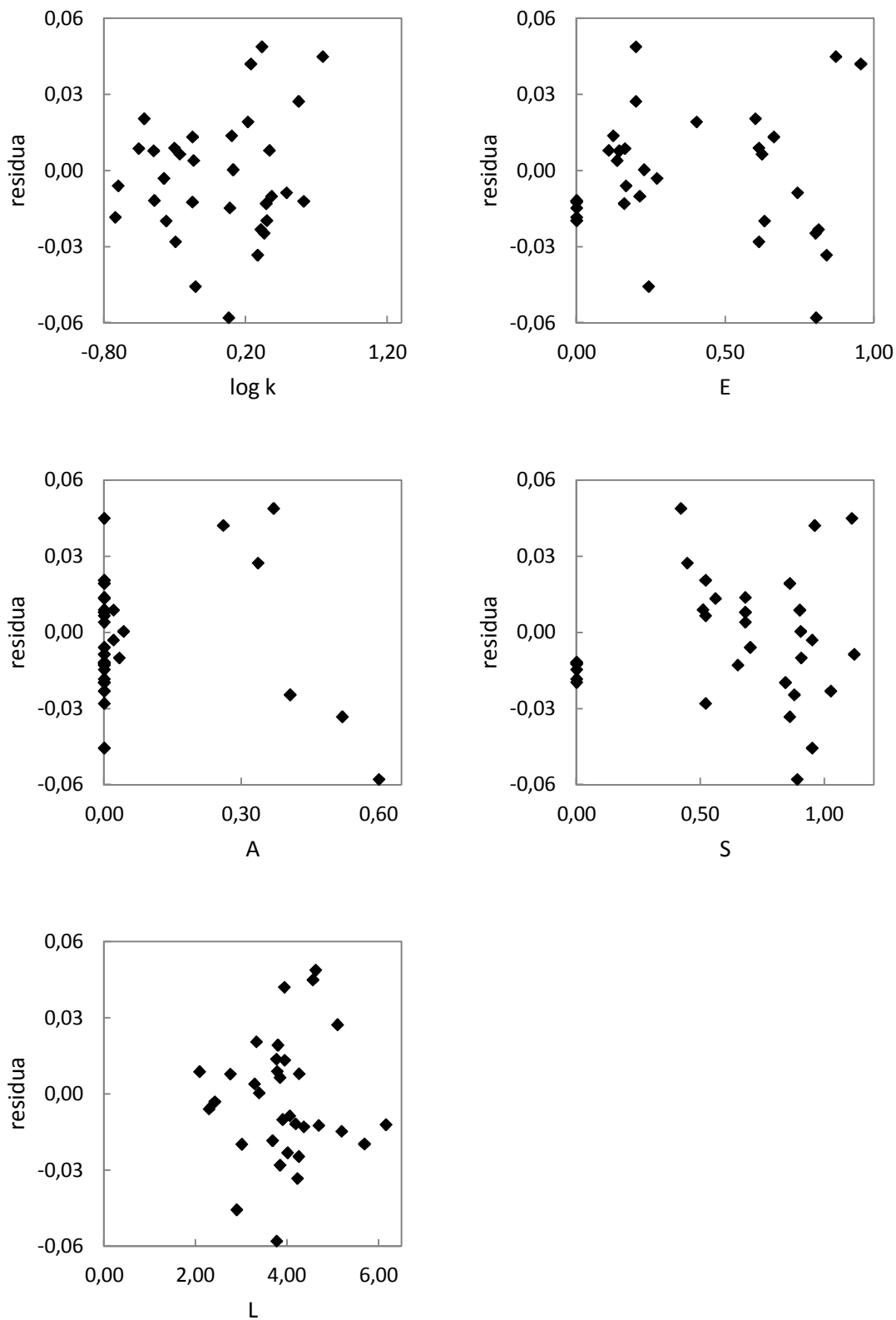
Obr. 3.2: Rozložení residuí vůči závisle a nezávisle proměnnými pro teplotu 60°C.



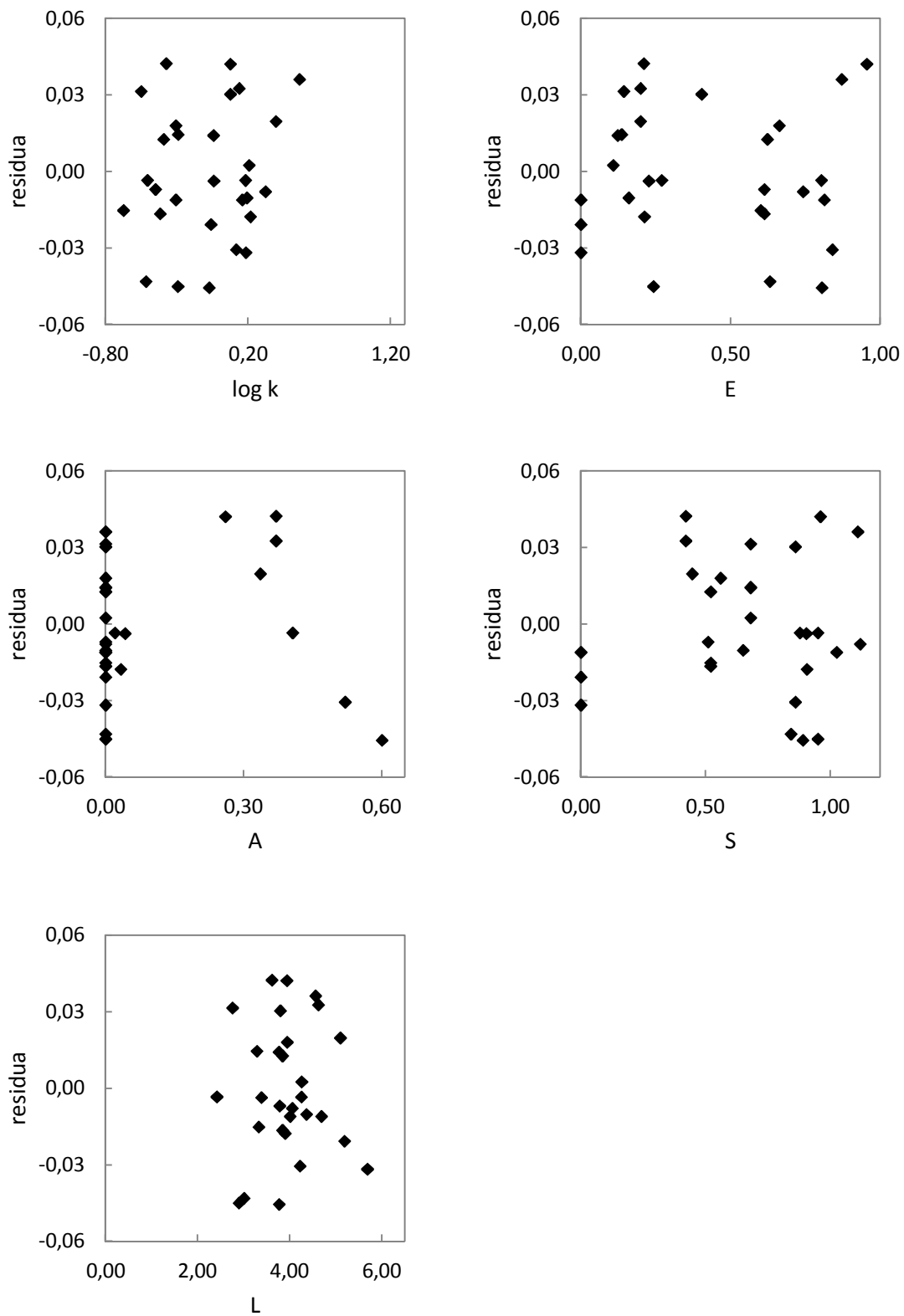
Obr. 3.3: Rozložení residuí vůči závisle a nezávisle proměnnými pro teplotu 70°C.



Obr. 3.4: Rozložení residuí vůči závisle a nezávisle proměnnými pro teplotu 80°C.



Obr. 3.5: Rozložení residuí vůči závisle a nezávisle proměnnými pro teplotu 90°C.

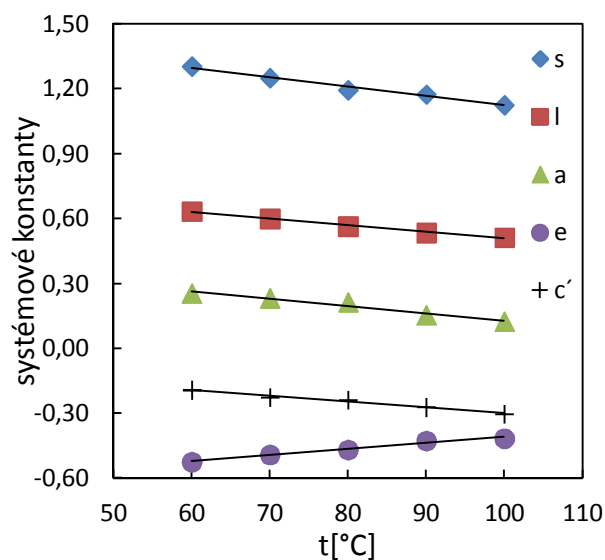


Obr. 3.6: Rozložení residuí vůči závislé a nezávislé proměnnými pro teplotu 100°C.

Nejvyšších hodnot systémových konstant (viz. tabulka 3.5) dosahuje parametr s , což je dáno silným dipólovým momentem vazeb C-CF₃ ve stacionární fázi. V Abrahamově rovnici je tedy přiřazena největší váha deskriptoru S , bipolaritě/polarizovatelnosti molekuly analytu. To ale nutně nemusí znamenat největší příspěvky dipólových interakcí k celkové retenci. Naopak nejnižších absolutních hodnot dosahuje konstanta a , jejíž hodnota je dána celkovou schopností stacionární fáze přijímat kyselý vodík analytu a tvořit s ním vodíkový můstek. Tuto schopnost mají ve studované stacionární fázi atomy fluoru a kyslíku. Záporné hodnoty konstant e jsou důsledkem těsně vázaných nevazebných elektronových párů na atomech fluorů. Deskriptor E je pro hypotetické n-alkany definován jako $E=0$, takže záporná hodnota e poskytuje informaci, že daná stacionární fáze je méně polarizovatelná, než hypotetický n-alkan. To je v důsledku již zmíněných těsně vázaných nevazebných elektronových párů, které jsou díky vysoké elektronegativitě atomu fluoru velmi málo polarizovatelné. Konstanta c je úsekem na ose y a její hodnoty jsou z části dány fázovým poměrem chromatografické kolony a z části příspěvky interakcí, které nejsou vystiženy pomocí zbylých členů Abrahamovy rovnice. Příspěvek těchto interakcí je znázorněn pomocí konstanty c' , která je nezávislá na rozměrech kolony, ale přesnost jejího výpočtu je značně ovlivněna nepřesnostmi při výpočtu fázového poměru.

3.2 Teplotní závislost systémových konstant

Grafické znázornění závislosti jednotlivých systémových konstant na teplotě je v obrázku 3.7 a parametry proložení přímkou jsou uvedeny v tabulce 3.8.



Obrázek 3.7: Teplotní závislost systémových konstant kolony Rtx-200MS

Tab. 3.8: Parametry lineární závislosti systémových konstant kolony Rtx-200MS na teplotě.

systémová konstanta	směrnice $\cdot 10^3$ [°C ⁻¹]	úsek	R ²
e	2,8	-0,69	0,9784
s	-4,3	1,56	0,9807
a	-3,4	0,47	0,9587
l	-3,1	0,81	0,9923
c'	-2,7	-0,03	0,9838

Tyto závislosti jsou v intervalu studovaných teplot (60-100°C) lineární. Z grafu i z hodnot směrnice je patrné, že hodnoty systémových konstant s rostoucí teplotou klesají, výjimkou je konstanta e , která naopak roste. S vyšší teplotou tedy příspěvky vodíkových můstků, dipólových a disperzních interakcí jsou menší a celková retence se snižuje. Zatímco příspěvky interakcí z přebytečné elektronové hustoty analytu s teplotou rostou a tedy z pohledu této interakce relativně zvyšují retenci oproti nižším teplotám. Záporné směrnice

jsou důsledkem zvyšování kinetických energií (rotační, vibrační) molekul s rostoucí teplotou, díky čemuž se mezimolekulární interakce oslabují. Z termodynamického pohledu je snižování retence se zvyšující se teplotou patrné z van't Hoffovy rovnice pro exoergické děje. Oproti tomu kladná směrnice konstanty e je ve smyslu kinetických energií molekul nelogická. Avšak předpokládá se, že při vyšších teplotách stacionární fáze váže své ne vazebné elektronové páry méně těsně a ty jsou tedy více polarizovatelné [31].

Směrnice všech systémových konstant stacionární fáze jsou řádově srovnatelné. Avšak nejvyšší závislost na teplotě vykazuje konstanta s , bipolarita/polarizovatelnost. To vyplývá z faktu, že interakce typu dipól-dipól jsou oproti ostatním interakcím, značně závislé na vzájemné orientaci dvou interagujících molekul, která je se zvyšující se teplotou narušována.

3.3 Retenční příspěvky interakcí

Zatímco koeficienty a , s a l poskytují kladné příspěvky k retenci aA , sS a lL , koeficient e poskytuje příspěvky v záporném směru (pokud je hodnota deskriptoru E kladná). Čím více má konkrétní analyt polarizovatelnější ne vazebné elektronové páry nebo π -elektrony, tím je více jeho retence snižována na základě jejich interakce se stacionární fází. Poznatky o repulsní interakci mezi kovalentně vázanými atomy fluoru a π -elektronovým systémem publikoval již Kawahara a kol. [38]. Může to být vysvětleno tak, že ne vazebné elektronové páry na atomech fluoru ve stacionární fázi jsou natolik těsně vázané a nepolarizovatelné, že polarizovatelné elektrony jiné molekuly jsou fází odpuzovány. Naopak pokud analytem bude látka se zápornou hodnotou deskriptoru E , pak kladný příspěvek eE bude zvyšovat retenci. Toto nastává zejména u vysoce fluorovaných látek a kladný příspěvek lze vysvětlit jako specifickou interakci mezi atomy fluorů, či jako známou poučku *similia similibus solvuntur*. Příklady dvou fluorovaných látek, jejich hodnoty deskriptorů a příspěvky interakcí při 100°C jsou v tabulce 3.9, spolu s porovnáním s jejich nefluorovanými analogy. Záporný příspěvek eE u 2-propanolu je, vnesením atomů fluoru do molekuly, převrácen na příspěvek kladný. Podobně je tomu i u butanu, který z definice, neposkytuje příspěvek eE , avšak jeho fluorinací získáváme příspěvek relativně zvyšující jeho retenci na fluorované stacionární fázi.

Tab. 3.9: Deskriptory fluorovaného a nefluorovaného 2-propanolu a butanu a jejich příspěvky interakcí k celkové retenci na Rtx-200MS při 100°C. Deskriptory převzaty z [35].

	deskriptory				příspěvky interakcí			
	E	S	A	L	eE	sS	aA	IL
2-propanol	0,212	0,36	0,33	1,764	-0,09	0,40	0,04	0,90
hexafluoro-2-propanol	-0,240	0,55	0,77	1,392	0,10	0,62	0,10	0,71
butan	0,000	0,00	0,00	0,672	0,00	0,00	0,00	0,34
perfluorobutan	-0,750	-0,76	0,00	0,343	0,31	-0,85	0,00	0,18

Atomy fluoru v molekule mohou mít i efekt na jiné interakce, např. díky indukčnímu efektu dojde k nárůstu příspěvku vodíkových můstků u 2-propanolu a zároveň poklesu disperzních interakcí, což je způsobeno velmi malou polarizovatelností fluoru. Záporný příspěvek dipólových interakcí perfluorobutanu je dán samotnou definicí deskriptoru S , jenž je pro

n -alkany roven nule. Méně polarizovatelný perfluorobutan nabývá tedy záporných hodnot tohoto deskriptoru a bude interagovat se stacionární fází prostřednictvím indukčních sil méně, než n -alkan se stejným molárním objemem. Příspěvek indukční interakce n -alkanu je již zahrnuta v konstantě c (respektive c') a proto musí od ní být odečtena příslušná hodnota odpovídající menší polarizovatelnosti perfluorobutanu.

V tabulce 3.10 jsou uvedeny příspěvky interakcí látek z testovací sady se stacionární fází v koloně Rtx-200MS a jejich procento z celkové interakce. Největší příspěvky tvoří disperzní interakce vyjádřená pomocí členu IL . Již z předešlých publikací je známo, že se tato interakce obecně z velké části podílí na celkové interakční energii nejen mezi nepolárními látkami, ale i těmi, které mají značný polární charakter [4, 27]. Nulová hodnota příspěvku dipólových interakcí (člen sS) u n -alkanů ovšem neznamená, že tyto látky neinteragují se stacionární fází prostřednictvím indukčních sil. Jejich molekulu lze permanentním dipólem ve stacionární fází polarizovat za vzniku indukovaného dipólu. Tato interakce je zahrnuta v konstantě c' a proto je při posuzování procentuálního příspěvku interakce tato konstanta zahrnuta do členu $(IL+c')$, jako celková interakce n -alkanů. Zároveň je tak celkový endoergický příspěvek formování kavity zahrnut v jednom členu. Na retenci se také velkým dílem podílejí orientační a indukční síly, zatímco vodíkové můstky hrají minoritní roli. Příspěvek interakce volných elektronových párů a π -elektronů přispívá k retenci látek, v tabulce 3.10, v záporném směru, takže selektivně snižuje retenci analytů s přebytkem polarizovatelných elektronů v molekule.

Nenabývá takové významnosti jako dipólové a disperzní interakce, ale u látek s velkým počtem polarizovatelných volných elektronových párů nebo π -elektronů hraje důležitou roli. Příspěvek eE u těchto látek nabývá hodnot, které jsou řádově srovnatelné s jejich příspěvkem sS , zatímco u ostatních látek je tento příspěvek řádově srovnatelný s příspěvkem vodíkových můstků aA . Obzvláště velkou roli mohou hrát interakce volných elektronových párů a π -elektronů v případě separace pozičních izomerů aromatických látek. Takovým příkladem uvedeným v tabulce 3.10 jsou ortho, meta a para xyleny. Již na hodnotách jejich deskriptorů, tak i na interakčních příspěvcích je zřejmé, že o-xylen se od zbylých dvou liší disperzními a indukčními interakcemi, na základě kterých je od nich separován. Avšak meta a para xylen se od sebe liší pouze rozložením elektronové hustoty delokalizovaných π -elektronů (rozdílná hodnota deskriptoru E), takže jejich separace je možná jen na základě interakce těchto elektronů se stacionární fází. V takových případech hraje příspěvek eE nezastupitelnou roli při separaci a fluorovaná stacionární fáze v koloně Rtx-200MS svými relativně velkými absolutními hodnotami konstanty e tuto separaci dovoluje i za podmínek relativně vysokých teplot. Je však nutno dodat, že záporná hodnota eE může i smývat rozdíl v retenci dvou látek, které by byly jinak rozděleny na základě ostatních interakcí. To záleží na velikostech jednotlivých příspěvků v konkrétních případech, respektive na vlastnostech jednotlivých analytů. Takovými analyty mohou být např. meta a para kresol, u kterých pokud vypočítáme příspěvky interakcí, pak zjistíme, že příspěvek disperzních sil, vodíkových můstků, dipólových sil a jejich součet se při 100°C liší. Hodnoty eE se mezi těmito látkami taktéž liší, ale přibližně o stejnou absolutní hodnotu a v opačném směru než ostatní interakční příspěvky. To vede k přibližně stejné retenci obou izomerů, které by se v případě nevýznamného příspěvku eE separovali lépe.

Tab. 3.10: Příspěvky jednotlivých interakcí testovacích látek se stacionární fází Rtx-200MS a jejich procento z celkové interakce při 100°C. Chybějící hodnoty odpovídají nule.

	eE	sS	aA	IL	%eE	%sS	%aA	%(IL+c')
n-heptan	-	-	-	1,63	-	-	-	100,00
n-oktan	-	-	-	1,89	-	-	-	100,00
n-nonan	-	-	-	2,15	-	-	-	100,00
n-dekan	-	-	-	2,40	-	-	-	100,00
n-undekan	-	-	-	2,66	-	-	-	100,00
n-dodekan	-	-	-	2,92	-	-	-	100,00
n-tridekan	-	-	-	3,16	-	-	-	100,00
butanol	-0,09	0,47	0,05	1,33	-6,16	32,19	3,42	70,55

Tab. 3.10: pokračování

	eE	sS	aA	IL	%eE	%sS	%aA	%(IL+c')
hexanol	-0,09	0,47	0,05	1,85	-4,55	23,74	2,53	78,28
oktanol	-0,08	0,47	0,05	2,37	-3,19	18,73	1,99	82,47
nonanol	-0,08	0,50	0,04	2,61	-2,89	18,05	1,44	83,39
2-butanon	-0,07	0,79	-	1,17	-4,40	49,69	-	54,72
2-pentanon	-0,06	0,76	-	1,41	-3,31	41,99	-	61,33
2-hexanon	-0,06	0,76	-	1,69	-2,87	36,36	-	66,51
2-heptanon	-0,05	0,76	-	1,93	-2,14	32,48	-	69,66
2-oktanon	-0,04	0,76	-	2,18	-1,54	29,23	-	72,31
Cyklohexanon	-0,17	0,97	-	1,95	-6,94	39,59	-	67,35
acetonitril	-0,10	1,01	0,01	0,89	-6,62	66,89	0,66	39,07
propionitril	-0,07	1,01	-	1,07	-4,09	59,06	-	45,03
nitroethan	-0,11	1,07	-	1,24	-5,79	56,32	-	49,47
nitropropan	-0,10	1,07	-	1,48	-4,65	49,77	-	54,88
nitrobutan	-0,09	1,02	0,01	1,74	-3,78	42,86	0,42	60,50
nitropentan	-0,09	1,02	-	2,00	-3,42	38,78	-	64,64
oktanal	-0,07	0,73	-	2,24	-2,69	28,08	-	74,62
ethylformiát	-0,06	0,74	-	0,95	-4,51	55,64	-	48,87
methylacetát	-0,06	0,72	-	0,98	-4,48	53,73	-	50,75
ethylacetát	-0,04	0,70	-	1,19	-2,58	45,16	-	57,42
tetrachloroethylen	-0,27	0,49	-	1,84	-15,34	27,84	-	87,50
pyridin	-0,26	0,95	-	1,54	-13,47	49,22	-	64,25
benzen	-0,25	0,58	-	1,43	-17,12	39,73	-	77,40
toluen	-0,25	0,58	-	1,71	-14,37	33,33	-	81,03
ethylbenzen	-0,25	0,57	-	1,94	-12,76	29,08	-	83,67
m-xylen	-0,25	0,58	-	1,97	-12,50	29,00	-	83,50
p-xylen	-0,26	0,58	-	1,97	-13,07	29,15	-	83,92
o-xylen	-0,28	0,63	-	2,02	-13,53	30,43	-	83,09
fenol	-0,33	1,00	0,07	1,93	-13,92	42,19	2,95	68,78
o-kresol	-0,35	0,97	0,06	2,16	-13,78	38,19	2,36	73,23
benzylalkohol	-0,33	0,99	0,05	2,18	-12,74	38,22	1,93	72,59
anilin	-0,40	1,08	0,03	2,02	-16,46	44,44	1,23	70,78
benzaldehyd	-0,34	1,15	-	2,05	-13,28	44,92	-	68,36
benzonitril	-0,31	1,26	-	2,08	-11,36	46,15	-	65,20
nitrobenzen	-0,36	1,25	-	2,34	-12,29	42,66	-	69,62

Konstanta $c' = -0,30$

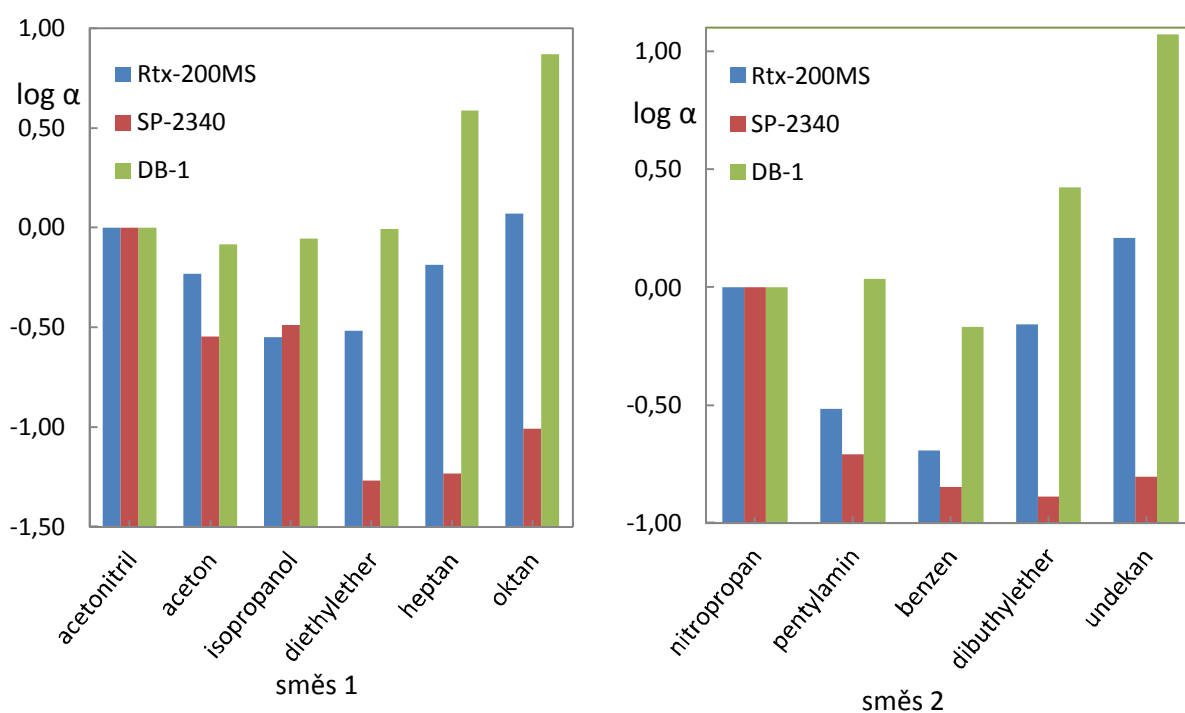
Směrnice závislostí interakčních příspěvků na teplotě, pro látky z testovací sady jsou uvedeny v tabulce 3.11. Tyto hodnoty jsou dány směrnici závislosti konkrétní systémové konstanty na teplotě, viz. tabulka 3.8, a hodnotou deskriptoru konkrétního analytu.

Tab. 3.11: Směrnice p závislostí příspěvku interakcí na teplotě (chybějící hodnoty odpovídají nule).

	$p \cdot 10^4$ (eE) [°C ⁻¹]	$p \cdot 10^4$ (sS) [°C ⁻¹]	$p \cdot 10^4$ (aA) [°C ⁻¹]	$p \cdot 10^4$ (IL) [°C ⁻¹]
n-heptan	-	-	-	-96,9
n-oktan	-	-	-	-112,2
n-nonan	-	-	-	-127,7
n-dekan	-	-	-	-143,1
n-undekan	-	-	-	-158,3
n-dodekan	-	-	-	-173,5
n-tridekan	-	-	-	-187,9
butanol	6,3	-18,2	-12,5	-79,4
hexanol	5,9	-18,2	-12,5	-110,2
oktanol	5,6	-18,2	-12,5	-141,0
nonanol	5,6	-19,3	-11,4	-155,6
2-butanon	4,7	-30,4	-	-69,8
2-pentanon	4,0	-29,5	-	-84,1
2-hexanon	3,8	-29,5	-	-100,3
2-heptanon	3,5	-29,5	-	-114,8
2-oktanon	3,0	-29,5	-	-130,0
Cyklohexanon	11,4	-37,3	-	-115,8
acetonitril	6,7	-39,0	-2,4	-53,1
propionitril	4,6	-39,0	-0,7	-63,6
nitroethan	7,6	-41,2	-0,7	-73,7
nitropropan	6,8	-41,2	-	-88,3
nitrobutan	6,4	-39,2	-1,4	-103,3
nitropentan	6,0	-39,3	-1,1	-119,0
oktanal	4,5	-28,2	-	-133,1
ethylformiát	4,1	-28,6	-	-56,3
methylacetát	4,0	-27,8	-	-58,3
ethylacetát	3,0	-26,9	-	-70,6
tetrachloroethylen	18,0	-19,1	-	-109,4
pyridin	17,8	-36,5	-	-91,8
benzen	17,2	-22,5	-	-85,0
toluen	17,0	-22,5	-	-101,5
ethylbenzen	17,3	-22,1	-	-115,3
m-xylen	17,3	-22,5	-	-117,2
p-xylen	17,6	-22,5	-	-117,2
o-xylen	18,7	-24,3	-	-120,2
fenol	22,7	-38,6	-20,3	-115,0
o-kresol	23,7	-37,3	-17,6	-128,8
benzylalkohol	22,7	-38,1	-13,7	-129,8
anilin	27,0	-41,6	-8,8	-120,1
benzaldehyd	23,0	-44,4	-	-122,3
benzonitril	21,0	-48,6	-	-123,7
nitrobenzen	24,6	-48,1	-	-139,1

3.4 Neobvyklé chování Rtx-200MS

Jedním z hlavních cílů této práce bylo vysvětlit neobvyklé chování trifluoropropylmethyl polysiloxanu, jako stacionární fáze pro plynovou chromatografii, které není běžné u jiných fází, viz úvod. Bylo tedy potřeba porovnat mechanismy retence na této fluorované stacionární fázi s polární a nepolární fází. Pro tento účel byly sestaveny dvě hypotetické směsi obsahující polární i nepolární látky (směs 1 a 2). Jejich retence na koloně Rtx-200MS byla porovnávána s retencí na nejběžnější nepolární koloně DB-1 (dimethyl polysiloxan), a na nejběžnější silně polární koloně SP-2340 (biskyanopropyl polysiloxan). Tyto retence při 100°C nebyly získány experimentálně, ale byly vypočítány na základě Abrahamových rovnic a jejich koeficienty pro polární a nepolární kolonu byly získány z literatury. Tyto hodnoty jsou rovněž uvedeny v tabulce 1.3. Látky do hypotetických směsí byly vybrány tak, aby se za daných podmínek polární či nepolární látky ve směsích neseperoali na koloně opačné polarity. Složení těchto směsí je naznačeno v tabulce 3.12 a je patrné i z obrázku 3.8. Pro grafické znázornění rozdílné retence analytů na rozdílných stacionárních fázích byly vypočítány hodnoty selektivity α , jako dekadický logaritmus z podílu (k_i' / k'_{ref}), kde referenční látkou byl nejpolarnější analyt ze směsi (acetonitril ve směsi 1 a nitropropan ve směsi 2). Tyto hodnoty jsou vyneseny v obrázku 3.8 a je z nich patrné běžné chování polárních a nepolárních stacionárních fází, kdy polární látky se dobře separují na polárních fázích a špatně na nepolárních fázích a opačně je tomu u nepolárních látek. Tento charakter je běžně znám.



Obr. 3.8: Selektivita tří stacionárních fází pro analyty ve směsi 1 a 2 při 100°C.

Z obrázku 3.8 je také patrné, že všechny tři porovnávané stacionární fáze separují členy homologických řad přibližně stejně (viz. heptan a oktan ve směsi 1 - rozdíly v logaritmech selektivity jsou 0,26 pro Rtx-200MS, 0,22 pro SP-2340 a 0,28 pro DB-1). Neobvyklé chování nastává u fluorované stacionární fáze, která dobře separuje jak skupinu polárních tak i nepolárních látek. V oblasti polárních látek de facto kopíruje průběh hodnot polární stacionární fáze a v oblasti nepolárních látek kopíruje průběh hodnot nepolární fáze. Z toho je na první pohled patrný její neobvyklý charakter. Zodpovězení na otázku, co takové chování způsobuje a která interakce je za to zodpovědná, bylo následujícím úkolem. Pro jednotlivé analyty byly vypočítány jejich interakční příspěvky k retenci na již zmíněných stacionárních fázích, tabulka 3.12. Pro lepší přehlednost jsou zde uvedeny hodnoty jen na jedno desetinné místo.

Tab. 3.12: Interakční příspěvky k retenci vybraných analytů na fluorované, nepolární a polární stacionární fázi při 100°C.

směs 1					směs 2				
Rtx-200MS (fluorovaná stacionární fáze)									
	eE	sS	aA	IL		eE	sS	aA	IL
acetonitril	-0,1	1,0	0,0	0,9	pentylamin	-0,1	0,4	0,0	1,6
aceton	-0,1	0,8	0,0	0,9	nitropropan	-0,1	1,1	0,0	1,5
isopropanol	-0,1	0,4	0,0	0,9	benzen	-0,3	0,6	0,0	1,4
diethylether	0,0	0,3	0,0	1,0	dibuthylether	0,0	0,3	0,0	2,0
heptan	0,0	0,0	0,0	1,6	undekan	0,0	0,0	0,0	2,7
oktan	0,0	0,0	0,0	1,9					
DB-1 (nepolární stacionární fáze)									
	eE	sS	aA	IL		eE	sS	aA	IL
acetonitril	0,0	0,2	0,0	1,0	pentylamin	0,0	0,1	0,0	1,8
aceton	0,0	0,2	0,0	1,0	nitropropan	0,0	0,2	0,0	1,6
isopropanol	0,0	0,1	0,1	1,0	benzen	0,0	0,1	0,0	1,6
diethylether	0,0	0,1	0,0	1,1	dibuthylether	0,0	0,1	0,0	2,2
heptan	0,0	0,0	0,0	1,8	undekan	0,0	0,0	0,0	2,9
oktan	0,0	0,0	0,0	2,1					
SP-2340 (polární stacionární fáze)									
	eE	sS	aA	IL		eE	sS	aA	IL
acetonitril	0,0	1,7	0,1	0,8	pentylamin	0,0	0,7	0,3	1,4
aceton	0,0	1,3	0,0	0,8	nitropropan	0,0	1,8	0,0	1,3
isopropanol	0,0	0,7	0,7	0,8	benzen	0,0	1,0	0,0	1,2
diethylether	0,0	0,5	0,0	0,9	dibuthylether	0,0	0,5	0,0	1,7
heptan	0,0	0,0	0,0	1,4	undekan	0,0	0,0	0,0	2,3
oktan	0,0	0,0	0,0	1,6					

Již při prvním pohledu na tabulku 3.12 je očividné, že Rtx-200MS se od ostatních fází liší zejména významným příspěvkem eE k retenci. Tato vlastnost je jedním z důvodů jejího retenčního chování, který je popsán v úvodu. Nejprve je však nutné si uvědomit retenční mechanismus na polární a nepolární stacionární fázi. Z interakčních příspěvků na koloně SP-2340 je zřejmé, že polární látky se zde separují zejména na základě polárních interakcí (orientační/indukční síly a vodíkové můstky). Zatímco nepolární látky se separují špatně, protože k disperzním silám (na základě, kterých by se tyto látky rozdělili) přispívají ještě silné polární interakce, které rozdíl v retenci smývají. Nepolární látky se na koloně DB-1 separují pomocí disperzních sil a k retenci polárních látek přispívají jen malé polární interakce a proto se nedělí. Fluorovaná stacionární fáze v koloně Rtx-200MS kombinuje vlastnosti obou předchozích fází, které vedou k separaci příslušných skupin látek. Má dostatečně velkou schopnost tvořit dipólové interakce (systémová konstanta s), takže dělí polární látky na základě polárních interakcí – analogie s polární fází. Zároveň však není tato schopnost natolik výrazná, aby smývala rozdíly v retenci nepolárních látek (dělí se disperzními silami) – analogie s nepolární fází. Navíc pokud by příspěvek polární interakce byl u nepolárních látek velký (díky polarizovatelným elektronovým párům či π -elektronům), což by znamenalo opět částečné smývání rozdílů v retenci, pak záporný interakční příspěvek těchto elektronů vede ke zlepšení separace analytů.

Neobvyklé chování kolony Rtx-200MS tedy vyplývá ze středně velké polarizability její stacionární fáze a zároveň z těsně vázaných volných elektronových párů. Obě tyto vlastnosti jsou důsledkem přítomnosti atomů fluoru v polysiloxanovém řetězci.

3.5 Porovnání Rtx-200MS s jinými kolonami

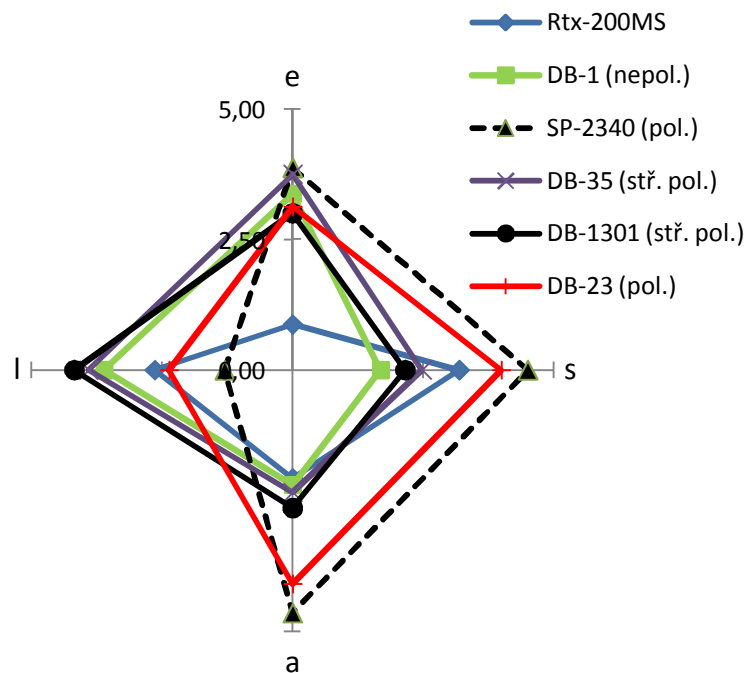
Pro porovnání vlastností fluorované stacionární fáze v koloně Rtx-200MS s vybranými kolonami z tabulky 1.3, byly standardizované hodnoty systémových konstant vloženy do hvězdicového diagramu, viz. obrázek 3.9. Tyto standardizované hodnoty byly vypočítány dle rovnice 18,

$$x_{st} = \frac{x - \bar{x}}{S.D.} + 3 \quad (18)$$

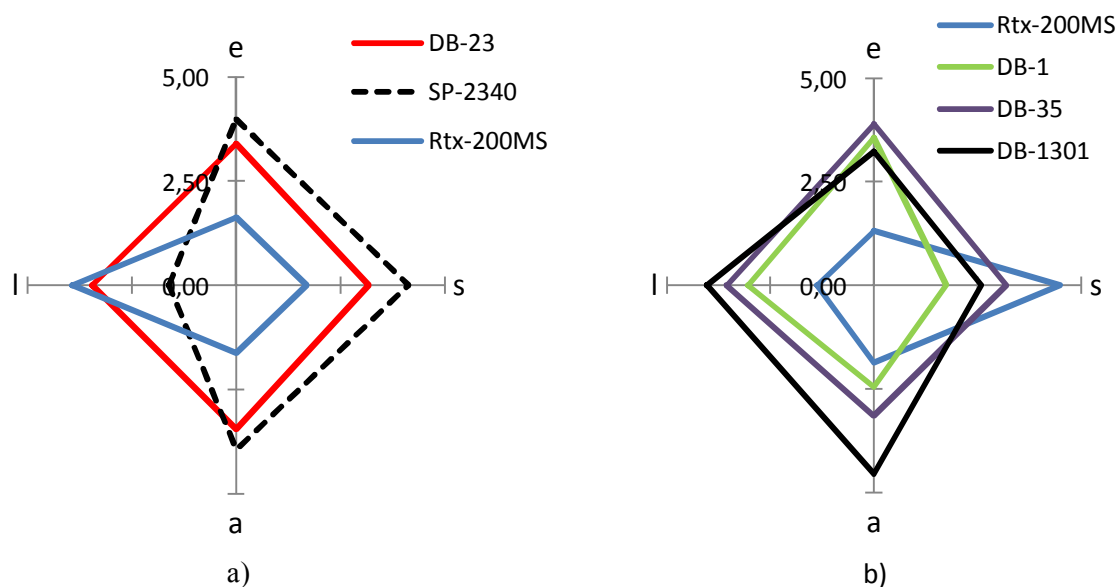
kde x_{st} je standardizovaná hodnota, x je konkrétní hodnota systémové konstanty, \bar{x} a $S.D.$ jsou průměr a směrodatná odchylka z výběru hodnot. Hodnota 3 byla přičítána aby se

zamezilo výskytu záporných standardizovaných hodnot. Hodnoty standardizovaných systémových konstant, které byly použity pro sestavení hvězdicových diagramů v obrázcích 3.9, 3.10 a 3.11 jsou uvedeny v příloze.

V porovnání s vybranými kolonami má kolona Rtx-200MS výrazně nízkou hodnotu systémové konstanty e , hodnota konstanty a je nízká a blíží se spíše k hodnotám nepolárních a středně polárních fází. Polární fáze jsou tvarem spojnice bodů v obrázku 3.9 výrazně posunuty k vyšším hodnotám ve směru osy s , zatímco nepolární a středně polární fáze jsou posunuty k vyšším hodnotám ve směru osy l . Fluorovaná stacionární fáze v koloně Rtx-200MS je zhruba rovnoměrně rozmítnuta podél obou os s a l . Porovnání této fáze pouze s polárními nebo nepolárními fázemi (středně polární fáze zahrnutý do grafu s nepolárními fázemi, protože z obrázku 3.9 vyplývá, že jejich vlastnosti jsou víceméně podobné nepolární fázi) je v obrázku 3.10.

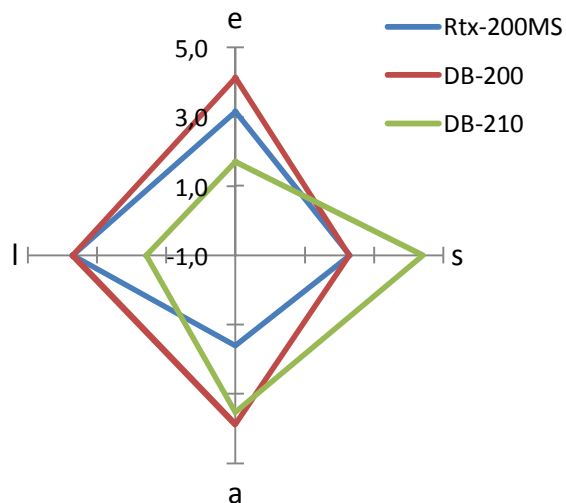


Obr. 3.9: Porovnání systémových konstant vybraných stacionárních fází, teplota 100°C.

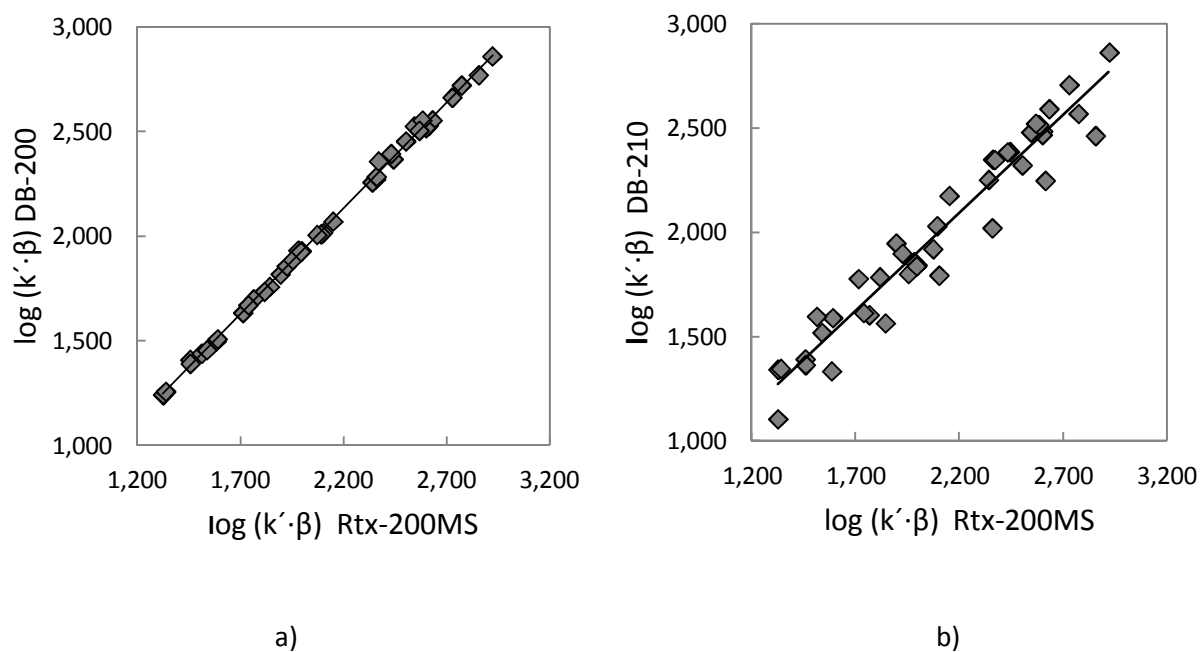


Obr. 3.10: Porovnání Rtx-200MS s polárními (a) a nepolárními (b) kolonami, teplota 100°C.

V obrázku 3.10 není tvar spojnice bodů kolony Rtx-200MS podobný ani polárním, ani nepolárním fázím. Při porovnání s polárními fázemi vykazuje značný nepolární charakter, při porovnání s nepolárními fázemi naopak značný polární charakter. Z toho je patrný jedinečný středně polární charakter trifluoropropylmethyl polysiloxanu jako stacionární fáze. V obrázku 3.11 jsou proloženy standardizované hodnoty systémových konstant fluorovaných stacionárních fází DB-200, DB-210 a Rtx-200MS. Stacionární fáze v koloně DB-200 je 35% trifluoropropylmethyl dimethyl polysiloxan a DB-210 je trifluoropropylmethyl polysiloxan [21]. Z tohoto pohledu by Rtx-200MS měla být ekvivalentní s DB-210. Avšak z obrázku 3.11 a 3.12 je patrné ekvivalentní retenční chování s kolonou DB-200. Z toho lze usuzovat, že Rtx-200MS není ze sto procent složen trifluoropropylmethyl siloxanových jednotek, jak vyplývá z popisu stacionární fáze uváděný výrobcem.



Obr. 3.11: Porovnání fluorovaných stacionárních fází.



Obr. 3.12: Porovnání retencí analytů z testovací sady na koloně DB-200 (a) a DB-210 (b) s retencemi na koloně Rtx-200MS.

4 Závěr

Pomocí vícerozměrné lineární regrese byly stanoveny systémové konstanty Abrahamovy rovnice pro fluorovanou stacionární fázi v koloně Rtx-200MS při teplotách 60-100°C. Na základě těchto konstant byla tato stacionární fáze charakterizována z pohledu jejích interakčních vlastností a tedy jejího retenčního mechanismu. Bylo zjištěno, že retence analytů na koloně Rtx-200MS je řízena především disperzními a orientačními/indukčními silami. Oproti jiným stacionárním fázím zde hraje významnou roli i interakce volných elektronových párů či π -elektronů analytu. Stacionární fáze tedy selektivně snižuje retenci analytu na základě této interakce. Z tohoto pohledu je Rtx-200MS vhodná k separacím analytů s rozdíly v rozložení elektronové hustoty π -systému. Zároveň se díky této interakci, kterou ostatní fáze poskytují jen omezeně, nabízí jako primární či sekundární kolona v komprehenzivní plynové chromatografii. S rostoucí teplotou kolony je faktor této interakce oslabován, stejně jako ostatní poskytované interakce, avšak oproti jiným interakcím toto vede k relativnímu zvýšení retence.

Neobvyklé chování trifluoropropylmethyl polysiloxanu v koloně Rtx-200MS bylo objasněno na základě studia separačního mechanismu polárních a nepolárních látek (z pohledu separace polárních látek se chová jako polární a z pohledu separace nepolárních látek se chová jako nepolární stacionární fáze). Bylo zjištěno, že stacionární fáze poskytuje kombinaci vlastností polárních i nepolárních fází – středně velkou polaritu vyjádřenou konstantou s , která ale není natolik velká, aby rušila separaci nepolárních analytů, čemuž v některých případech napomáhá i interakce volných elektronových párů či π -elektronů.

I z porovnání této fluorované stacionární fáze s jinými fázemi vyplývají její unikátní vlastnosti a její středně polární charakter. Při porovnání Rtx-200MS s již charakterizovanými fluorovanými kolonami bylo zjištěno, že její retenční chování je ekvivalentní s kolonou DB-200.

Soupis bibliografických citací

- [1] M. H. Abraham, C. F. Poole, S. K. Poole, Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography; *J. Chromatogr. A*, 824 (1999) 79-114
- [2] V. Dufková, R. Čabala, V. Ševčík, Determination of C₅-C₁₂ perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration, *Chemosphere*, 87 (2012) 463-469
- [3] Dill K. A., Bromberg S., *Molecular driving forces; Statistical thermodynamics in chemistry and biology*. Garland Science, New York 2003
- [4] M. Vitha, P. W. Carr, The Chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1126 (2006) 143-194
- [5] Taylor T.: *CHROMacademy Resolver Issue 3: Column Choice for Capillary GC*. Dostupné z URL: <<http://www.chromacademy.com/resolver-june2010.asp>> [cit. 9.11.2013]
- [6] Ahuja S., *Chromatography and separation science*. 4. vydání, Academic press, San Diego 2003
- [7] A. G. Dikundwar, T. N.G. Row, Evidence for the „Amphoteric“ nature of fluorine in halogen bonds: An instance of Cl···F contact, *Cryst. Growth. Des.*, 12 (2012) 1713-1716
- [8] M. Palusiak, On the nature of halogen bond – The Kohm-Sham molecular orbital approach, *J. Mol. Struct.*, 845 (2010) 89-92
- [9] J. F. Parcher, Fundamental relationships in gas chromatography, *Chromatographia*, 47 (1998) 570-574
- [10] J.A.G. Domínguez, J. C. Díez-Masa, Retention parameters in chromatography, Part A. Hold-up volume concept in chromatography, *Pure App. Chem.*, 73 (2001) 969-992
- [11] V.A. Davankov, Retention parameters in chromatography, Part B. Retention parameters in gas chromatography, *Pure App. Chem.*, 73 (2001) 969-992

-
- [12] C. F. Poole, S. K. Poole, Foundations of retention in partition chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1530-1550
- [13] F.R. González, Theoretical aspects of retention in overloaded columns, *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 262-272
- [14] M.H. Abraham, H.S. Chadha, F. Martins, R. C. Mitchell, M. W. Bradbury, J. A. Gratton, Hydrogen bonding part 46: A review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability, *Pestic. Sci.*, 55 (1999) 78-88
- [15] M.H. Abraham, G.S. Whiting, Y. Alarie, J. J. Morris, P. J. Taylor, R. M. Doherty, R. W. Taft, G. D. Nielsen, Hydrogen bonding 12: A new QSAR for upper respiratory tract irritation by airborne chemicals in mice, *Quant. Struct.*, 9 (1990) 6-10
- [16] M. H. Abraham, A. I. Ibrahim, A. M. Zissimos, Determination of set of solute descriptors from chromatographic measurements, *J. Chromatogr. A*, 1037 (2004) 29 – 47
- [17] C. Panayiotou, Partial solvation parameters and mixture thermodynamics, *J. Phys. Chem. B*, 116(2012) 7302 – 7321
- [18] M. H. Abraham, G. S. Whiting, R. M. Doherty, W. S. Shuely, Hydrogen bonding part 13: A new method for characterization of GLC stationary phases – The Laffort data set, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 2 (1990) 1451-1460
- [19] A. J. Dallas, P. W. Carr, Critical evaluation of predicted and measured gas-liquid partition coefficients in n-hexadecane, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 4927-4939
- [20] M. H. Abraham, G. S. Whiting, Hydrogen bonding: XVI. A new solute solvation parameter, π_2^H , from gas chromatographic data, *J. Chromatogr. A*, 587 (1991) 213-228
- [21] C. F. Poole, S. K. Poole, Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns for gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 254-280

- [22] F. Mutelet, J. N. Jaubert, Accurate measurements of thermodynamic properties of solutes in ionic liquids using inverse gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1102 (2006) 256-267
- [23] E.A. Hoffman, R. Rajkó, Z. A. Fekete, T. Körtvélyesi, Quantum chemical characterization of Abraham solvation parameters for gas-liquid chromatographic stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8535-8544
- [24] Y.H. Zhao, M.H. Abraham, A.M. Zissimos, Determination of McGowan volumes for ions and correlation with van der Waals volumes, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43 (2003) 1848-1854
- [25] C.F. Poole, S.N. Atapattu, S.K. Poole, A.K. Bell, Determination of solute descriptors by chromatographic methods, *Analytica Chimica Acta*, 652 (2009) 32-53
- [26] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, Estimation of molecular linear free energy relation descriptors using group contribution approach, *J. Chem. Inf. Sci.*, 39 (1999) 835-845
- [27] P. Havelec, J.G.K. Ševčík, Extended additivity model of parameter $\log(L^{16})$, *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, 25 (1996) 1483-1493
- [28] D. Svozil, J.G.K. Ševčík, V. Kvasnička, Neural network prediction of the solvatochromic polarity/polarizability parameter π_2^H , *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 37 (1997) 338-342
- [29] K. Héberger, Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships, *J. Chromatogr. A*, 1158 (2007) 273-305
- [30] A.R. Katritzky, M. Kvanar, S. Slavov, C.D. Hall, Quantitative correlation of physical and chemical properties with chemical structure: Utility for prediction, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 5714-5789
- [31] S.N. Atapattu, C.F. Poole, Solute descriptors for characterizing retention properties of open-tubular columns of different selectivity in gas chromatography at intermediate temperatures, *J. Chromatogr. A*, 1195 (2008) 136-145

- [32] J. Jover, R. Bosque, J. Sales, Determination of Abraham solute parameters from molecular structure, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 44 (2004) 1098-1106
- [33] C.F. Poole, H. Ahmed, W. Kiridena, C.C. Patchett, W.W. Koziol, Revised solute descriptors for characterizing retention properties of open-tubular column in gas chromatography and their application to carborane-siloxane copolymer stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1104 (2006) 299-312
- [34] N. Ulrich, J. Mühlenberg, H. Retzbach, G. Schüürmann, W. Brack, Linear solvation energy relationships as classifiers in non-target analysis – a gas chromatographic approach, *J. Chromatogr. A*, 1264 (2012) 95-103
- [35] M.H. Abraham, A. Ibrahim, W.E. Acree Jr., Partition of compounds from gas to water and from gas to physiological saline at 310 K: Linear free energy relationships, *Fluid Phase Equilibria*, 251 (2007) 93-109
- [36] Hendl J.: *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat*. 4. rozšířené vyd. Praha, Portál 2012
- [37] Weisberg S.: *Applied linear regression*. 3. vydání, Hoboken, John Wiley & Sons, 2005
- [38] S. Kawahara, S. Tsuzuki, T. Uchimaru, Theoretical study of the C-F/ π interaction: Attractive interaction between fluorinated alkane and an electron-deficient π -system, *J. Phys. Chem. A*, 108 (2004) 6744-6749
- [39] *Restek GC capillary column catalogue*. Dostupné z URL <<http://www.restek.com/catalog/view/1338>> [cit. 16.4.2014]