

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Klára Putzová

CHARAKTERIZACE A POROVNÁNÍ NOVÝCH KOLON
V REVERZNÍM MÓDU HPLC

Characterization and comparison of new reversed-phase HPLC columns

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

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

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

V Praze dne 7. ledna 2021

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na zjištění a porovnání interakčních a separačních vlastností tří kolon, XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 určených pro reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Všechny kolony obsahují oktadecylový ligand, ale liší se v typu nosiče, na který je ligand vázaný. Kolony byly porovnány z hlediska jejich silanolové aktivity, indexu hydrofobicity, tvarové selektivity a účinnosti za použití jednoduchých testů podle autorů Walterse, Engelhardta a Galushky. Dále byly optimalizovány podmínky pro separace vybraných pesticidů acetochloru, fomesafenu, isoproturonu, metazachloru a triflumuronu v mobilních fázích obsahujících acetonitril nebo methanol jako organický modifikátor a vodu.

Testované kolony vykazovaly nízkou silanolovou aktivitu a střední až vysoký index hydrofobicity. Nízká silanolová aktivita všech tří kolon koreluje s tzv. endkapingem všech tří testovaných fází. Analyty byly více zadržovány v methanolové mobilní fázi, což souvisí s nižší eluční silou methanolu v porovnání s acetonitrilem v reverzním módu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Doba analýzy vybraných pesticidů se lišila pro jednotlivé kolony při použití stejných chromatografických podmínek. Nejkratší doba analýzy byla získána na koloně XBridge C18, která také vykazovala nejvyšší účinnost. Nejdelší dobu analýzy a zároveň nejnižší účinnost vykazovala kolona XSelect HSS C18.

Klíčová slova

vysokoúčinná kapalinová chromatografie

reverzní mód

stacionární fáze

chromatografické testy

pesticidy

Abstract

The aim of the bachelor thesis was to evaluate and compare interaction/separation properties of three chromatographic columns, namely XBridge C18, XSelect CSH C18 XSelect HSS C18, designed for reversed-phase high performance liquid chromatography. All the columns contain the same ligand, i.e. octadecyl but they differ in the stationary phase support. The columns were compared in terms of silanol activity, hydrophobicity, shape selectivity and efficiency. For this purpose, the simple chromatographic tests designed by Walters, Engelhardt and Galushko were used. Furthermore, the separation of five selected pesticides, namely acetochlor, fomesafen, isoproturon, metazachlor triflumuron, were optimized on tested columns in simple mobile phases composed of acetonitrile or methanol as organic modifiers and water.

All the tested columns showed low silanol activity and medium to high hydrophobicity according to the chromatographic tests used. The low silanol activity correlates with endcapping procedure used for all the columns. All pesticides were more retained in methanolic mobile phase due to the lower elution strength of methanol compared to acetonitrile in reversed-phase high performance liquid chromatography. The analysis time of separation varied for each column under the same chromatographic conditions. The shortest analysis time was achieved on the XBridge C18 column, which also showed the highest efficiency. On the other hand, the highest analysis time and the lowest efficiency were observed for XSelect HSS C18 column.

Keywords

high performance liquid chromatography

reversed-phase

stationary phase

chromatographic tests

pesticides

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při měření i zpracování. Dále děkuji za trpělivost a ochotu během konzultací.

Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky, číslo projektu 20-19655S.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Reverzní mód kapalinové chromatografie	9
2.2	Chromatografické kolony.....	11
2.2.1	Kolona XBridge C18	11
2.2.2	Kolona XSelect CSH C18.....	12
2.2.3	Kolona XSelect HSS C18	12
2.3	Chromatografické testy	13
2.3.1	Waltersův test	14
2.3.2	Engelhardtův test	15
2.3.3	Galushkův test.....	16
2.4	Pesticidy	17
3	Experimentální část	20
3.1	Seznam použitých chemikálií.....	20
3.2	Přístroje a programy	20
3.3	Příprava vzorků a mobilních fází	21
3.4	Postup měření.....	21
4	Výsledky a diskuse	23
4.1	Waltersův test.....	23
4.2	Engelhardtův test.....	24
4.3	Galushkův test.....	26
4.4	Separace vybraných pesticidů	27
5	Závěr.....	33
	Literatura.....	34

Seznam zkratek a symbolů

a	šířka píku v 10 % jeho výšky ke kolmici na základnu spuštěné z vrcholu píku z náběžné strany (min)
A_s	asymetrický faktor
b	šířka píku v 10 % jeho výšky ke kolmici na základnu spuštěné z vrcholu píku ze sestupné strany (min)
BEH	Ethylene-Bridged Hybrid
CSH	Charged Surface Hybrid
DETA	<i>N,N</i> -diethyl- <i>m</i> -toluamid
H	výškový ekvivalent teoretického patra (cm)
HI	index hydrofobicity
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
H_r	redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra
HSS	High Strength Silica
k	retenční faktor
L	délka kolony (cm)
n	počet teoretických pater
n_m	počet teoretických pater na metr
R	rozlišení píků
SI	silanolová aktivita
SI_A	silanolová aktivita
t_M	mrtvý čas (min)
t_R	retenční čas (min)
w	šířka píku při základně (min)
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky (min)
α	tvarová selektivita

1 Úvod

Chromatografie se hojně využívá a stále zdokonaluje už od svého objevu koncem 19. století. V dnešní době je nejvíce používán reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie, který se uplatňuje v různých vědeckých i průmyslových odvětvích. Užitím vysokého tlaku je zvyšována rychlost a účinnost separací, ale zároveň jsou s tím spojené i vyšší nároky na chromatografické kolony.

Vývojem nových chromatografických kolon se v dnešní době zabývá více výrobců a na trhu je k dostání mnoho kolon různých chemických i fyzikálních vlastností. Snahou je zdokonalit stacionární fáze v jejich selektivitě a stabilitě, zejména v odolnosti vůči vysokým tlakům a teplotám nebo možnosti použití v celém rozsahu pH. Za tímto účelem jsou vyvíjeny nové technologie plnění kolon, úprav povrchu částic a vazby ligandů.

Pro popis a porovnání kolon z hlediska jejich interakčních/separačních vlastností a následný výběr vhodné kolony je důležitá jejich charakterizace. K základnímu popisu těchto vlastností je možné využít jednoduché chromatografické testy, například od autorů Walterse, Engelhardta či Galushky. Testy porovnávají kolony podle interakcí stacionární fáze s analytem na základě silanolové aktivity, hydrofobicity, tvarové selektivity a účinnosti kolony. Testováním kolon se získává informace o vlastnostech a následně o vhodnosti použití kolony pro separace dané skupiny látek a je tedy důležité pro užití kolon v praxi.

Cílem této práce je zjištění a porovnání interakčních/separačních vlastností tří kolon pro reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie na základě Waltersova, Engelhardtova a Galushkova testu. Dílčím cílem práce je optimalizace separace směsi vybraných pesticidů na testovaných kolonách.

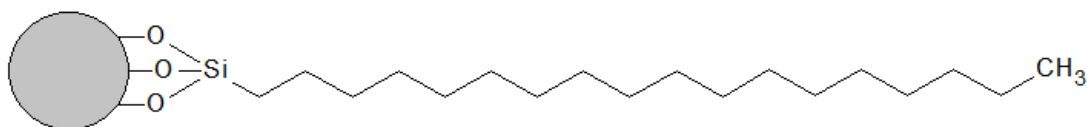
2 Teoretická část

2.1 Reverzní mód kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, která dělí látky na základě jejich distribuce mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi. Látky mají různou afinitu k mobilní i stacionární fázi, proto jsou odlišně zadržovány na stacionární fázi, což vede k jejich odlišné retenci.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z technik kapalinové chromatografie a vyznačuje se vysokou účinností separačních procesů, které je dosaženo použitím stacionárních fází o malé, dobře definované velikosti částic a přetlaku v řádu desítek MPa. [1]

Jedním z typů HPLC systémů je chromatografie na obrácených fázích, tzv. reverzní mód. Pro tento mód jsou nejnámější stacionární fáze na bázi silikagelu nebo hybridních nosičů, které jsou modifikované chemickým navázáním hydrofobních ligandů. Nejčastěji používané hydrofobní ligandy jsou oktadecylové, oktylové nebo fenylové. Struktura oktadecylové stacionární fáze je naznačena na obrázku 1. Silikagel je stabilní pouze v rozmezí pH 3–9 [2], proto jsou pro zvýšení stability stacionárních fází na celé stupnici pH nutné další úpravy. Zvýšení stability v kyselém prostředí je nejúčinnější vytvořením tzv. stericky chráněných silanů, kde jsou na atom křemíku kromě ligandu navázány isopropylové nebo isobutylové funkční skupiny, které stíní siloxanovou vazbu proti kyselé hydrolyze. Metodou endkapingu dochází k zakrytí volných silanolových skupin na povrchu nosiče. To zabraňuje rozpouštění silikagelové matrice a tak dochází ke zvýšení stability v alkalickém prostředí. Alternativou k silikagelovým nosičům stacionární fáze jsou například nosiče na bázi oxidu zirkoničitého, oxidu titaničitého nebo oxidu hlinitého. [2]

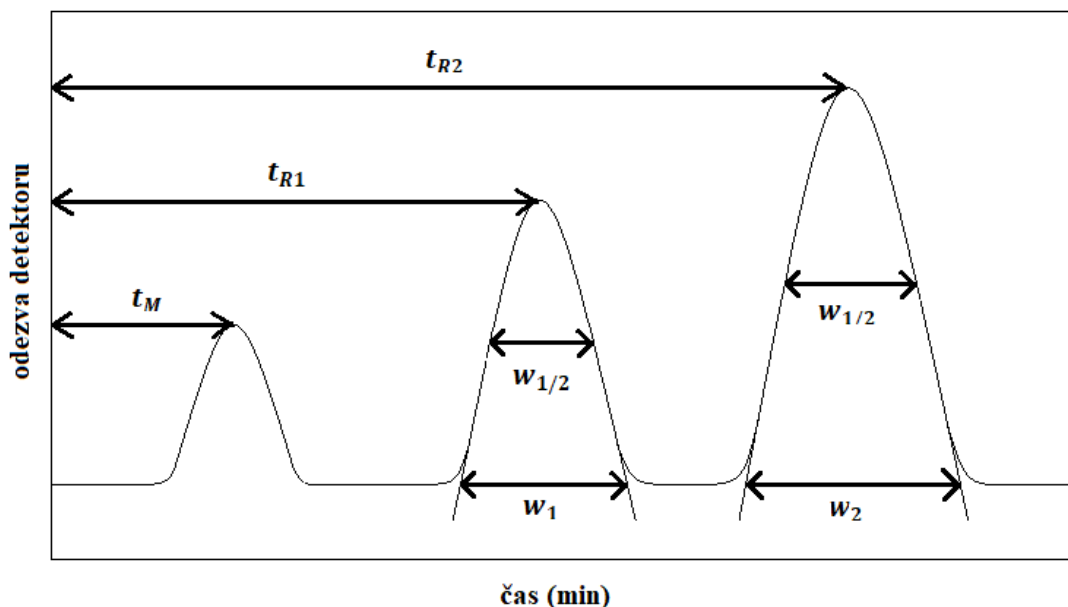


Obrázek 1: Struktura oktadecylové stacionární fáze

Mobilní fáze v reverzním módu HPLC je tvořena polárními rozpouštědly, nejčastěji směsí organického rozpouštědla, např. methanolu nebo acetonitrilu, s vodou nebo

vodným pufrům. Úprava pH mobilní fáze přidávkem pufru je nutná pro separaci ionizovatelných látek. Vhodnou změnou pH dojde k potlačení disociace, protonizace a ke zvýšení retence těchto látek. [3]

Výsledným záznamem separace je chromatogram (ukázka na obrázku 2), ze kterého lze získat parametry pro charakterizaci analytů a separačního systému. [4]



Obrázek 2: Schéma chromatogramu, kde t_M je mrtvý čas kolony (min), t_R retenční čas analytu (min), w šířka píku při základně (min) a $w_{1/2}$ šířka píku v polovině jeho výšky (min)

Retenční čas t_R udává čas od nadávkování vzorku po zaznamenání píku detektorem a je úměrný době, po kterou je analyt na koloně zadržován. t_M je tzv. mrtvý čas kolony, který je retenčním časem analytu na koloně nezadržovaném. Retenční faktor udává, kolikrát delší čas stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní a vypočítá se podle rovnice 1:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (1)$$

kde k je retenční faktor, t_R retenční čas analytu (min) a t_M mrtvý čas kolony (min).

Míru selektivity chromatografického systému pro dva analyty charakterizuje separační faktor, který je podílem retenčních faktorů analytů (rovnice 2).

$$\alpha_{1,2} = \frac{k_2}{k_1}, \quad (2)$$

kde $\alpha_{1,2}$ je separační faktor analytů 1, 2 a k_1, k_2 jsou retenční faktory analytů 1, 2.

Rozšiřování zón separovaných látek je popsáno účinností separačního systému, kterou udává počet teoretických pater kolony vypočítaný podle rovnice 3 a výškový ekvivalent teoretického patra (rovnice 4).

$$n = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \quad (3)$$

kde n je počet teoretických pater, t_R retenční čas analytu (min) a $w_{1/2}$ šířka píku v polovině výšky (min).

$$H = \frac{L}{n}, \quad (4)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra (cm), L délka kolony (cm) a n počet teoretických pater.

Rozlišení píků charakterizuje schopnost systému od sebe oddělit dva sousední analyty. Vypočítá se např. z rovnice 5. Pokud je hodnota rozlišení vyšší než 1,5, píky jsou považovány za rozdělené.

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}, \quad (5)$$

kde $R_{1,2}$ je rozlišení píků, t_{R1} a t_{R2} retenční časy analytů 1, 2 (min) a w_1 a w_2 šířky píků 1, 2 při základně (min).

2.2 Chromatografické kolony

V dnešní době se nejvíce využívají komerčně plněné kolony, kterých je na trhu mnoho značek a druhů. Dále se proto budu podrobněji zabývat chromatografickými kolonami XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 od firmy Waters, které byly použity v této práci.

2.2.1 Kolona XBridge C18

Kolona XBridge C18 využívá tzv. technologii BEH (Ethylene-Bridged Hybrid). Hybridní nosič stacionární fáze je tvořen sloučením tetraethoxysilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem za vzniku anorganicko-organické částice polyethoxysilanu. Rozdílem mezi hybridními a klasickými silikagelovými nosiči jsou ethylenové můstky, které hybridní nosiče obsahují. Hybridní stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti polymerních sorbentů (pH stabilita, snížený efekt zbytkových silanolových skupin) a silikagelu (vysoká účinnost, mechanická stabilita). Na koloně XBridge C18 je chemicky

vázaný ligand C18, je stabilní na celé stupnici pH mobilní fáze, proto je tato kolona univerzální a vhodná pro vývoj nových metod. [2, 5]

2.2.2 Kolona XSelect CSH C18

Úpravou technologie BEH vznikla technologie použitá v hybridní koloně XSelect CSH (Charged Surface Hybrid) C18. Povrch CSH částic je modifikován ionizovatelným pyridylovým ligandem ($pK_a \sim 5-6$), jehož kladný náboj zabraňuje asymetriím píků bazických sloučenin. Při pH mobilní fáze < 6 vykazují tyto kolony výrazné zvýšení retence aniontových analytů oproti kolonám bez této povrchové modifikace. [6]

Kolony s CSH technologií mají zvýšenou nosnost, rychle se ekvilibrují po změně pH mobilní fáze a jsou velmi stabilní při nízkém pH. Tato kolona obsahuje oktadecylový ligand a je stabilní v rozmezí pH 1–11. [7]

2.2.3 Kolona XSelect HSS C18

XSelect HSS (High Strength Silica) C18 je univerzální oktadecylová kolona obsahující částice HSS podobné klasickému silikagelu. Na rozdíl od BEH a CSH částic HSS částice neobsahují ethylenové můstky, což vede k vyšší retenci polárních sloučenin a výrazně odlišné selektivitě. HSS částice jsou částice čistě na bázi oxidu křemičitého s mechanickou pevností vhodnou pro separace při vysokých tlacích. Kolona je použitelná pro mobilní fáze o pH v rozmezí 1–8. [5]

V tabulce 1 jsou porovnány fyzikální a chemické vlastnosti výše uvedených kolon.

Tabulka 1: Fyzikální a chemické vlastnosti kolon XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 použitých v této práci [5, 8, 9, 10]

	XBridge C18	XSelect CSH C18	XSelect HSS C18
Nosič	hybridní	hybridní	silikagelový
Pokrytí uhlíkem (%)	18	15	15
Délka kolony (mm)	150	150	150
Vnitřní průměr kolony (mm)	4,6	4,6	4,6
Velikost částic (μm)	5	5	5
Povrch částic (m ² /g)	185	185	230
Velikost pórů (Å)	130	130	100
Rozsah pH	1–12	1–11	1–8
Maximální tlak (psi)	6000	6000	6000

2.3 Chromatografické testy

Chromatografické kolony vykazují různé interakční a separační vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou ovlivněny typem, rozměry, způsobem navázání a způsobem zpracování stacionární fáze, velikostí částic a pórů, typem navázaných ligandů a jejich pokrytím povrchu, endkapingem. Jejich charakterizaci a vzájemné porovnání lze provést různými metodami, mezi které patří základní chromatografické testy. V těchto testech se využívají různé testovací analyty, které se používají k popisu jednotlivých interakcí se stacionární fází. Nejčastěji se používají jednoduché chromatografické testy podle Walterse, Engelhardta a Galushky, které popisují silanolovou aktivitu, hydrofobicitu a tvarovou selektivitu kolon za použití různých mobilních fází. [11, 12]

Testy hydrofobicity jsou založené na relativní retenci vybraných párů sloučenin odvozených od benzenu v mobilní fázi, jejíž složení se v jednotlivých typech testů liší. [13]

Tvarová selektivita je podle Galushky definována jako schopnost kolony separovat analyty podobné polaritě s různě hydrofobním povrchem. [11]

Silanolová aktivita a elektrostatické interakce jsou obvykle charakterizovány relativním zadržováním aminů, dusíkatých bází, peptidů, nebo slabě kyselých fenolů v organických mobilních fázích. Testy pro zjištění silanolové aktivity odrážejí schopnost

interakce mezi částečně záporně nabitou silanolovou skupinou stacionární fáze a kladně nabitou slabou bází v mobilní fázi. [13] Čím méně volných silanolových skupin kolona obsahuje, tím symetričtějších píků lze u separací bazických analytů dosáhnout. Disociaci volných silanolových skupin lze zabránit např. výběrem vhodného pH mobilní fáze. [14]

2.3.1 Waltersův test

Waltersův test je navržen pro charakterizace reverzních oktadecylových stacionárních fází. Kolony jsou hodnoceny podle tří parametrů. [15]

- Index hydrofobicity, který je dán podílem retenčních faktorů anthracenu a benzenu (rovnice 6) v mobilní fázi tvořené 65% acetonitrilem při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a teplotě 40 °C.

$$HI = \frac{k_{anthracen}}{k_{benzen}}, \quad (6)$$

kde HI je index hydrofobicity, $k_{anthracen}$ retenční faktor anthracenu a k_{benzen} retenční faktor benzenu.

- Účinnost kolony, která se zjišťuje nadávkováním toluenu do mobilní fáze tvořené 75% acetonitrilem při teplotě 40 °C. Vyjadřuje se pomocí počtu teoretických pater na metr (rovnice 7). Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra (rovnice 8) odpovídá kvalitě plnění kolony. Výpočty vychází z rovnic 3 a 4.

$$n_m = \frac{n \cdot 100}{L}, \quad (7)$$

kde n_m je počet teoretických pater na metr, n počet teoretických pater a L délka kolony (cm).

$$H_r = \frac{H}{d_p}, \quad (8)$$

kde H_r je redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra, H výškový ekvivalent teoretického patra (cm) a d_p průměr částic (cm).

- Aktivita volných silanolových skupin (silanolová aktivita), která je dána podílem retenčních faktorů *N,N*-diethyl-*m*-toluamidu (DETA) a anthracenu (rovnice 9) v mobilní fázi tvořené 100% acetonitrilem při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a teplotě 40 °C. S volnými silanolovými skupinami interaguje *N,N*-diethyl-*m*-toluamid. Retence anthracenu, která slouží jako referentní hodnota, se používá pro kompenzaci nepatrných změn chromatografických podmínek.

$$SI = \frac{k_{DETA}}{k_{anthracen}}, \quad (9)$$

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

Pro určení mrtvého času reverzních kolon se v těchto testech používá uracil.

Podle těchto tří kritérií se kolony dělí do tří skupin. První skupinou jsou kolony vykazující nízkou až střední silanolovou aktivitu a nízkou afinitu k nepolárním sloučeninám. Do druhé skupiny se řadí kolony o vysoké silanolové aktivitě a vysoké afinitě k nepolárním sloučeninám. Tyto kolony jsou vhodné pro separaci analytů s nízkou nebo střední polaritou. Třetí skupinu tvoří kolony s nízkou silanolovou aktivitou a vysokou afinitou k nepolárním látkám. [15]

2.3.2 Engelhardtův test

Test podle Engelhardta je navržen pro charakterizaci reverzních stacionárních fází s navázanými alkylovými ligandy. Zjišťují se hydrofobní vlastnosti kolony, silanolové interakce a tvarová selektivita. Testy se provádí ve smočeném stavu stacionární fáze, kterého je dosaženo při objemu vody v mobilní fázi nižší než 50 objemových procent. Alkylové skupiny stacionární fáze v tomto stavu neinteragují mezi sebou a jejich interakce s mobilní fází jsou silnější. V testech se proto používá mobilní fáze tvořená 55 % methanolu a 45 % vody bez přídavku pufru. Přídavek pufru do mobilní fáze by mohl vést k falešnému zpřesnění symetrie píků. [14]

Testovací směs obsahuje uracil, anilin, fenol, o -, m -, p -toluidin (methylanilin), N,N -dimethylanilin, toluen a ethylbenzen. Uracil slouží k určení mrtvého času kolony. Hydrofobicita a tvarová selektivita stacionární fáze je určena podílem retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu (rovnice 10). [16]

$$\alpha = \frac{k_{ethylbenzen}}{k_{toluen}}, \quad (10)$$

kde α je index hydrofobicity a tvarové selektivity, $k_{ethylbenzen}$ retenční faktor ethylbenzenu a k_{toluen} retenční faktor toluenu.

Asymetrie píků charakterizuje rozmytí píků a počítá se podle rovnice 11.

$$A_s = \frac{b}{a}, \quad (11)$$

kde A_s je asymetrický faktor, a , b šířky píku v 10 % jeho výšky ke kolmici na základnu spuštěné z vrcholu píku z náběžné strany (a) a strany opačné (b) (min).

Vliv silanolových skupin na tvary píků bazických látek je dán poměrem asymetrického faktoru píku anilinu a fenolu (rovnice 12) nebo také poměrem retenčních faktorů anilinu a fenolu [12] (rovnice 13). Fenol redukuje vlivy asymetrie píku způsobené jinými interakcemi než silanolovými.

$$SI_A = \frac{A_{s_{anilin}}}{A_{s_{fenol}}}, \quad (12)$$

kde SI_A je silanolová aktivita, $A_{s_{anilin}}$ asymetrický faktor anilinu, $A_{s_{fenol}}$ asymetrický faktor fenolu.

$$SI = \frac{k_{anilin}}{k_{fenol}}, \quad (13)$$

kde SI je silanolová aktivita, k_{anilin} retenční faktor anilinu, k_{fenol} retenční faktor fenolu.

Vhodná kolona by se podle Engelhardta měla chovat podle následujících kritérií [16]:

- anilin eluuje vždy před fenolem,
- podíl asymetrického faktoru píku anilinu a fenolu by měl být menší než 1,3.

2.3.3 Galushkův test

Testy podle Galushky jsou založeny na stanovení retencí aromatických sloučenin na reverzních kolonách na základě struktury analytu. Porovnávají hydrofobicitu, tvarovou selektivitu a silanolovou aktivitu. Provádí se v mobilní fázi tvořené 60% methanolem.

Index hydrofobicity je definován jako průměr retenčních faktorů toluenu a benzenu (rovnice 14). Silanolová aktivita se vypočítá z rovnice 15. [12]

$$HI = \frac{k_{toluen} + k_{benzen}}{2}, \quad (14)$$

kde HI je index hydrofobicity, k_{toluen} retenční faktor toluenu a k_{benzen} retenční faktor benzenu.

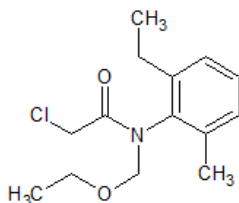
$$SI = 1 + 3 \left(\frac{k_{anilin}}{k_{fenol}} - 1 \right), \quad (15)$$

kde SI je silanolová aktivita, k_{anilin} retenční faktor anilinu a k_{fenol} retenční faktor fenolu.

2.4 Pesticidy

Pesticidy jsou přípravky sloužící k hubení nežádoucích rostlin, hub nebo živočichů, podle čehož se dělí do různých skupin. Pesticidy ve většině případů negativně ovlivňují životní prostředí, proto je jejich používání regulováno. Dále budou popsány pouze vybrané pesticidy, které byly použity jako modelové sloučeniny v této práci.

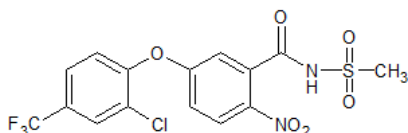
Acetochlor



Obrázek 3: Struktura acetochloru

Acetochlor je herbicid odvozený od acetanilidu. Tento herbicid je dráždivý, řadí se mezi podezřelé karcinogeny a látky poškozující reprodukční schopnosti. Také vykazuje vysokou toxicitu pro vodní živočichy a rostliny. [17] Používá se preemergentně nebo předset'ově pro odstranění širokolistých plevelů a různých trav při pěstování zemědělských plodin, např. kukuřice, brambor, sóji a cukrové třtiny. Acetochlor je absorbován převážně výhonky klíčících rostlin, ale také jejich kořeny, a následně je transportován do vegetativních orgánů. Inhibuje buněčné dělení. [18]

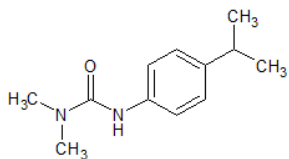
Fomesafen



Obrázek 4: Struktura fomesafenu

Fomesafen je herbicid odvozený od difenyletheru. Byl vyvinut speciálně pro postemergentní likvidaci širokolistých plevelů při pěstování sóji. Inhibuje protoporphyrinogen oxidasu, čímž blokuje tvorbu hemu. [18]

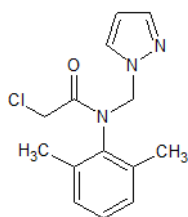
Isoproturon



Obrázek 5: Struktura isoproturonu

Isoproturon je herbicid spadající do třídy fenyльмоčovín. Patří mezi podezřelé karcinogeny a je velmi toxický pro vodní organismy. Používání isoproturonu bylo v Evropské unii zakázáno. Používal se preemergentně i postemergentně pro odstranění plevelů při pěstování obilovin. Isoproturon je absorbován převážně kořeny rostlin a následně transportován s vodou do míst fotosyntézy. Inhibuje přenos elektronů ve fotosystému II. [17, 18, 19]

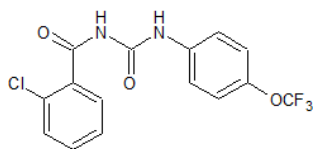
Metazachlor



Obrázek 6: Struktura metazachloru

Metazachlor je herbicid patřící do skupiny acetanilidů, který je podezřelý z karcinogenity, dráždivý a toxický pro vodní organismy. Používá se na preemergentní nebo postemergentní odstraňování trav a dvouděložných plevelů při pěstování řepky, brambor nebo tabáku. [18, 20]

Triflumuron



Obrázek 7: Struktura triflumuronu

Triflumuron je insekticid odvozený od benzoylmočoviny. Je akutně toxický při vdechnutí. Využívá se pro likvidaci dvoukřídlého hmyzu, brouků a motýlů při pěstování bavlny, ovoce a sóji. Inhibuje syntézu chitinu, čímž zabraňuje vývoji hmyzu. [18, 21]

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

- acetonitril, Chromasolv® gradient grade, $\geq 99,9\%$, Honeywell (Charlotte, USA)
- methanol, gradient grade, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- anilin, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- anthracen, 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- benzen, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- ethylbenzen, 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- fenol, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- *N,N*-dimethyl-*m*-toluamid, 97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- toluen, 99,8%, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- uracil, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- acetochlor, analytický standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- fomesafen, analytický standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- isoproturon, analytický standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- metazachlor, analytický standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- triflumuron, analytický standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.2 Přístroje a programy

Vysokoučinný kapalinový chromatograf

- separační modul Waters 2690, Alliance HPLC System, Waters (Milford, USA)
- detektor Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector, Waters (Milford, USA)
- autosampler 717 Plus, Waters (Milford, USA)
- kolonový termostat, Waters Alliance series column heater, Waters (Milford, USA)
- kolona XBridge® BEH™ C18, rozměry 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm , velikost pórů 130 Å, Waters (Milford, USA)

- kolona XSelect® CSH™ C18, rozměry 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm, velikost pórů 130 Å, Waters (Milford, USA)
- kolona XSelect® HSS C18, rozměry 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm, velikost pórů 100 Å, Waters (Milford, USA)

Ostatní přístroje

- zařízení Ultrapur a Rowapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, Watrex® (Praha, Česká republika)
- váhy Mettler AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)

Počítačové programy

- Empower 2, Chromatography Data System, Waters (Milford, USA)
- Origin, verze 6.1, OriginLab Corporation (Northampton, USA)
- ACD/ChemSketch, verze 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc. (Toronto, Kanada)

3.3 Příprava vzorků a mobilních fází

Kapalné vzorky byly připraveny ředěním methanolem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 10 μl/ml. Pevné vzorky byly připraveny rozpuštěním 1 mg vzorku v 1 ml methanolu. Dále byly vzorky anilinu, anthracenu, ethylbenzenu, *N,N*-dimethyl-*m*-toluamidu, triflumuronu a uracilu 10x zředěny methanolem kvůli vysoké odezvě detektoru.

Měření byla prováděna v mobilních fázích o složení 100 % acetonitril, acetonitril/voda 80/20, 65/35, 60/40 (v/v) nebo methanol/voda 60/40, 55/45 (v/v). Výsledná dvousložková mobilní fáze byla smíchána v daném poměru z čistých rozpouštědel použitým chromatografem.

3.4 Postup měření

Waltersův test

Před stanovením indexu hydrofobicity byly kolony 20 minut ekvilibrovány mobilní fází o složení acetonitril/voda 65/35 (v/v). Při teplotě kolony 40 °C a průtoku mobilní

fáze 1 ml/min byly na kolony dávkovány vzorky uracilu, anthracenu a benzenu o objemu nástřiku 5 μ l a teplotě vzorku 25 °C.

Kolony byly 20 minut ekvilibrovány do mobilní fáze tvořené 100% acetonitrilem pro stanovení silanolové aktivity. Za stejných podmínek byly na kolony dávkovány vzorky uracilu, anthracenu a *N,N*-dimethyl-*m*-toluamidu.

Analyty byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

Engelhardtův test

Kolony byly 20 minut ekvilibrovány mobilní fází o složení methanol/voda 55/45 (v/v). Při teplotě kolony 40 °C a průtoku mobilní fáze 1 ml/min byly na kolony dávkovány vzorky anilinu, ethylbenzenu, fenolu, toluenu a uracilu o objemu 5 μ l a teplotě 25 °C. Analyty byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

Galushkův test

Kolony byly 20 minut ekvilibrovány mobilní fází o složení methanol/voda 60/40 (v/v). Při teplotě kolony 40 °C a průtoku mobilní fáze 1 ml/min byly na kolony dávkovány vzorky anilinu, benzenu, fenolu, toluenu a uracilu o objemu 5 μ l a teplotě 25 °C. Analyty byly detekovány při vlnových délkách 254 nm pro test hydrofobicity a 280 nm pro test silanolové aktivity.

Separace pesticidů

Na kolony byly dávkovány směsi pesticidů nejprve při složení mobilní fáze acetonitril/voda 80/20 (v/v), poté při složení mobilní fáze acetonitril/voda 60/40 (v/v) a následně při složení mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v). Vzorky byly v jednotlivých mobilních fázích dávkovány i samostatně pro zjištění jejich elučního pořadí. Teplota kolony byla 40 °C, průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota vzorků 25 °C a objem nástřiku 5 μ l. Mrtvý čas kolon byl určen nadávkováním uracilu. Analyty byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

4 Výsledky a diskuse

Na chromatografických kolonách XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 byly provedeny testy podle Walterse, Engelhardta a Galushky. Vlastnosti kolon byly na základě těchto testů porovnány z hlediska indexu hydrofobicity, tvarové selektivity, silanolové aktivity a účinnosti. Následně byla na každé z kolon optimalizována separace směsi vybraných pesticidů.

4.1 Waltersův test

V mobilní fázi o složení acetonitril/voda 65/35 (v/v) byly za experimentálních podmínek uvedených v kapitole 3.4 změřeny retenční časy anthracenu a benzenu. Následně byly vypočítány jejich retenční faktory a hodnota indexu hydrofobicity, která je dána poměrem retenčního faktoru anthracenu a benzenu.

Retenční časy anthracenu a *N,N*-dimethyl-*m*-toluamidu byly změřeny v mobilní fázi tvořené 100% acetonitrem za podmínek uvedených v kapitole 3.4. Poměr retenčních faktorů *N,N*-dimethyl-*m*-toluamidu a anthracenu udává index silanolové aktivity.

Pro určení mrtvého času kolon byl do jednotlivých mobilních fází dávkován uracil.

Výsledky Waltersova testu pro kolony XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Vypočítané hodnoty indexu hydrofobicity (*HI*) a silanolové aktivity (*SI*) na základě Waltersova testu kolon XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18, kde t_M je mrtvý čas určený z uracilu (min) a k retenční faktor.

	XBridge C18	XSelect CSH C18	XSelect HSS C18
t_M (min)	1,5	1,6	1,4
$k_{\text{anthracen}}$	3,7	3,7	6,2
k_{benzen}	0,97	0,97	1,6
<i>HI</i>	3,8	3,8	3,9
t_M (min)	1,6	1,7	1,5
$k_{\text{anthracen}}$	0,34	0,33	0,56
k_{DETA}	0,15	0,14	0,23
<i>SI</i>	0,44	0,42	0,41

Kolony XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 vykazují hodnotu indexu hydrofobicity mezi hodnotami 3,6–4,0, což podle Waltersova testu odpovídá střední afinitě k nepolárním sloučeninám. Kolona XSelect HSS C18 vykazuje hodnotu hydrofobicity nejvyšší. Index hydrofobicity podle Walterse souvisí také s procentem pokrytí kolony uhlíkem. Čím vyšší je pokrytí uhlíkem, tím vyšší hydrofobicitu by kolona měla vykazovat, což platí pro kolony, které se liší pouze pokrytím uhlíkem a ostatní parametry mají shodné. Kolona XBridge C18 má oproti dalším dvěma testovaným kolonám pokrytí uhlíkem vyšší, ale hodnotu HI má stejnou jako kolona XSelect CSH C18 a mírně nižší než kolona XSelect HSS C18. Tyto výsledky ukazují, že hodnota HI souvisí s procentuálním pokrytím uhlíkem, ale je ovlivněna i ostatními parametry kolon.

Hodnoty silanolového indexu $< 0,9$ podle Walterse odpovídají nízké aktivitě silanolových skupin všech tří kolon. To vypovídá o kvalitním zakrytí volných silanolů endkapingem. Nejnižší silanolovou aktivitu vykazuje kolona XSelect HSS C18, nejvyšší kolona XBridge C18.

Testované kolony se nedají zařadit ani do jedné skupiny Waltersova dělení kolon [15]. Nicméně všechny tři vykazují nízkou silanolovou aktivitu a střední afinitu k nepolárním sloučeninám.

4.2 Engelhardtův test

V mobilní fázi o složení methanol/voda 55/45 (v/v) byly za podmínek uvedených v kapitole 3.4 změřeny retenční časy anilinu, ethylbenzenu, fenolu a toluenu, z nichž byly následně vypočítány jejich retenční faktory. Poměr retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu udává index hydrofobicity neboli tvarovou selektivitu. Z poměru retenčních faktorů a asymetrických faktorů anilinu a fenolu byla vypočítána aktivita volných silanolových skupin. Retenční čas toluenu posloužil pro zjištění účinnosti kolon. Mrtvý čas kolon byl určen nadávkováním uracilu.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky Engelhardtova testu pro kolony XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18.

Tabulka 3: Vypočítané hodnoty tvarové selektivity (α) a silanolové aktivity (SI , SI_A) na základě Engelhardtova testu kolon XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18, kde t_M je mrtvý čas určený z uracilu (min), k retenční faktor, A_S asymetrický faktor píku, n počet teoretických pater, n_m počet teoretických pater na metr, H_r redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra.

	XBridge C18	XSelect CSH C18	XSelect HSS C18
t_M (min)	1,6	1,7	1,6
$k_{\text{ethylbenzen}}$	1,0	1,0	1,5
k_{toluen}	5,1	4,7	8,3
α	0,20	0,21	0,18
t_M (min)	1,6	1,7	1,5
$A_{S, \text{anilin}}$	1,4	1,2	1,2
$A_{S, \text{fenol}}$	1,2	1,1	1,1
SI_A	1,2	1,1	1,1
k_{anilin}	0,43	0,44	0,62
k_{fenol}	0,58	0,63	0,88
SI	0,74	0,70	0,70
n	14300	13500	12300
n_m	95000	90000	82000
H_r	2,1	2,2	2,4

Podle Engelhardta je kolona považována za vhodnou pro separace bazických látek, pokud anilin eluuje před fenolem a zároveň je poměr asymetrických faktorů píků anilinu a fenolu $< 1,3$. Všechny tři testované kolony splňují obě tyto podmínky, proto je lze považovat za vhodné pro separace bazických látek. Pro kolony obsahující oktadecylový ligand je dle Engelhardta typické, že ethylbenzen eluuje vždy před toluenem. Tento předpoklad je také splněn u všech tří kolon.

Hodnoty silanolového indexu < 1 odpovídají nízké aktivitě volných silanolových skupin [22]. Všechny tři testované kolony toto kritérium splňují. Kolona XBridge C18 vykazuje nejvyšší silanolovou aktivitu, což koreluje s výsledky Waltersova testu. Kolony XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 mají silanolový index stejný.

Nejnižší tvarovou selektivitu vykazuje kolona XSelect HSS C18, nejvyšší kolona XSelect CSH C18.

Účinnost kolon je vyjádřena počtem teoretických pater na metr délky kolony. Nejvyšší účinnost vykazovala kolona XBridge C18, nejnižší kolona XSelect HSS C18.

4.3 Galushkův test

V mobilní fázi o složení methanol/voda 60/40 (v/v) za podmínek uvedených v kapitole 3.4 byly změřeny retenční časy anilinu, benzenu, fenolu a toluenu, dále z nich byly vypočítány jejich retenční faktory. Hodnoty indexu hydrofobicity byly vypočítány z retenčních faktorů toluenu a benzenu podle rovnice 14. Pro výpočet silanolové aktivity z retenčních faktorů anilinu a fenolu byla použita rovnice 15. Mrtvý čas kolon byl určen nadávkováním uracilu.

Tabulka 4: Vypočítané hodnoty indexu hydrofobicity (*HI*) a silanolové aktivity (*SI*) na základě Galushkova testu pro kolony XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18, kde t_M je mrtvý čas určený z uracilu (min) a k retenční faktor.

	XBridge C18	XSelect CSH C18	XSelect HSS C18
t_M (min)	1,6	1,7	1,5
k_{benzen}	1,9	1,8	3,0
k_{toluen}	3,5	3,3	5,8
<i>HI</i>	2,7	2,6	4,4
t_M (min)	1,6	1,7	1,5
k_{anilin}	0,33	0,34	0,49
k_{fenol}	0,44	0,48	0,66
<i>SI</i>	0,25	0,13	0,23

Kolony XBridge C18 a XSelect CSH C18 vykazují střední hodnoty hydrofobicity. Kolona XSelect HSS C18 by se dala považovat podle tohoto testu za vysoce hydrofobní. [22]

Hodnoty silanolového indexu < 1 odpovídají nízké aktivitě volných silanolových skupin [22]. Všechny tři testované kolony vykazují nízkou silanolovou aktivitu. Nejnižší aktivitu volných silanolů vykazuje kolona XSelect CSH C18. Nejvyšší silanolovou aktivitu vykazuje kolona XBridge C18, což koreluje s výsledky Waltersova i Engelhardtova testu.

Porovnáním výsledků testů podle Walterse, Engelhardta a Galushky nebylo dosaženo zcela stejných výsledků. Rozdíly mezi testy mohou být způsobeny rozdílnými podmínkami a způsoby stanovení, jako jsou rozdílné mobilní fáze i testovací analyty.

Test hydrofobicity podle Walterse využívá anthracen, který má díky třem benzenovým jádrům výrazně nižší polaritu než benzen. Engelhardtův test stanovuje hydrofobicitu jako tvarovou selektivitu ethylbenzenu a toluenu, které se liší jen délkou postranního řetězce. V testu hydrofobicity podle Galushky je použit benzen a toluen, které oba obsahují jen jedno benzenové jádro, a tudíž není rozdíl v polaritě tak velký jako při použití analytů pro Waltersův test. Nicméně se benzen a toluen liší ve struktuře jednou methylovou skupinou. Výsledky proto mohou být interpretovány jako tvarová selektivita pro methylovou skupinu.

V testech podle Walterse a Galushky bylo dosaženo podobných výsledků při stanovení silanolové aktivity i hydrofobicity, nicméně výsledky testů nelze kvůli rozdílným podmínkám porovnávat mezi sebou. Testy se proto nedají považovat za univerzální.

4.4 Separace vybraných pesticidů

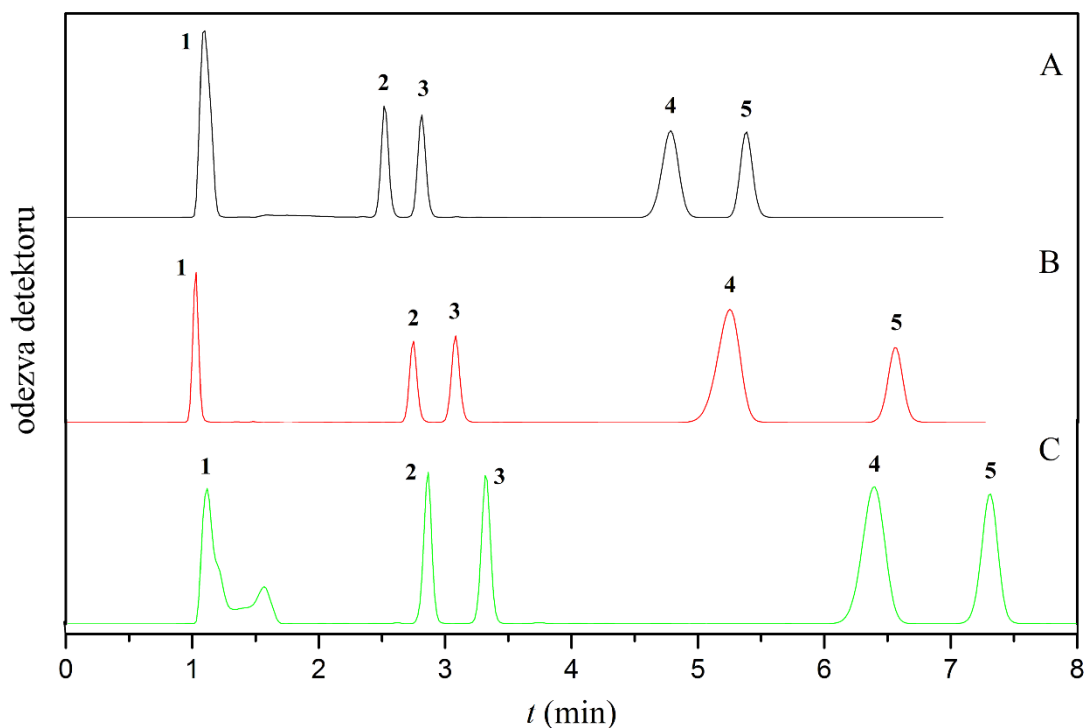
Směs vybraných pesticidů obsahující acetochlor, fomesafen, isoproturon, metazachlor a triflururon byla nejprve separována na koloně XSelect CSH C18. Jako výchozí mobilní fáze byl zvolen acetonitril/voda 80/20 (v/v) a separace byla provedena za podmínek uvedených v kapitole 3.4. Separace neproběhla úplně, došlo ke koeluci isoproturonu s metazachlorem a acetochloru s triflururonem. Poměr složek mobilní fáze byl následně upraven na acetonitril/voda 60/40 (v/v) a separace byla za výše uvedených podmínek zopakována. Za těchto podmínek došlo k separaci všech pesticidů na základní linii.

Dále byla směs pesticidů separována v mobilní fázi acetonitril/voda 60/40 (v/v) i na kolonách XBridge C18 a XSelect HSS C18. Výsledky separací jsou uvedeny v tabulce 5. Chromatogramy separací jsou ukázány na obrázku 8.

Tabulka 5: Výsledky separace směsi pesticidů na kolonách XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 v mobilní fázi acetonitril/voda 60/40 (v/v), kde t_M je mrtvý čas kolony (min), t_R retenční čas (min), k retenční faktor, A_s asymetrický faktor píku, R rozlišení sousedních píků.

t_M (min)	XBridge C18						XSelect CSH C18						XSelect HSS C18					
	1,5						1,6						1,4					
	t_R (min)	k	A_s	R	t_R (min)	k	A_s	R	t_R (min)	k	A_s	R	t_R (min)	k	A_s	R		
Fomesafen	1,1	„-0,27“	1,4		1,0	„-0,35“	1,2		1,1	„-0,20“	-		1,1	„-0,20“	-			
Isoprotruron	2,5	0,68	1,1	10	2,8	0,76	1,1	18	2,9	1,1	0,93	-	2,9	1,1	0,93	-		
Metazachlor	2,8	0,88	1,1	2,5	3,1	0,98	1,1	2,7	3,3	1,4	1,0	3,7	3,3	1,4	1,0	3,7		
Acetochlor	4,8	2,2	0,91	11	5,3	2,4	0,82	9,2	6,4	3,6	0,88	13	6,4	3,6	0,88	13		
Triflumuron	5,4	2,6	1,1	2,8	6,7	3,3	0,98	4,9	7,3	4,3	0,93	3,1	7,3	4,3	0,93	3,1		

Hodnoty asymetrického faktoru pro pík fomesafenu a rozlišení píků fomesafenu a isoproturonu na koloně XSelect HSS C18 nebyly určeny z důvodu rozmytí fomesafenu do dvojpíku (viz obrázek 8).



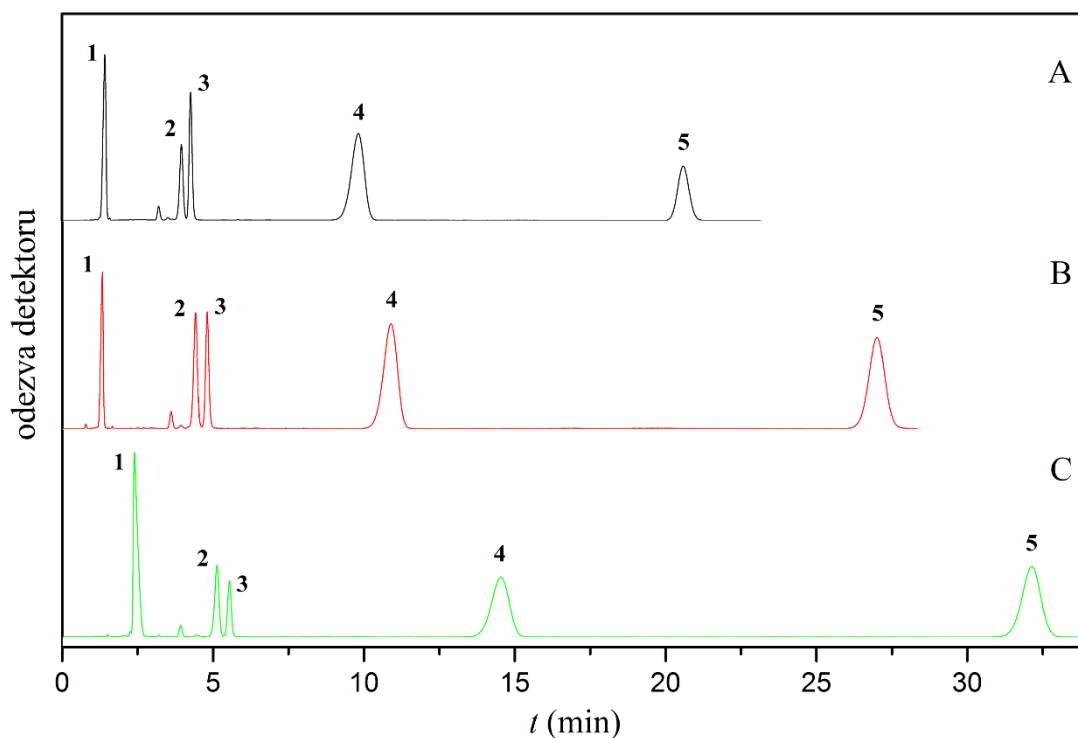
Obrázek 8: Separace směsi pesticidů na kolonách A – XBridge C18, B – XSelect CSH C18, C – XSelect HSS C18, mobilní fáze: acetonitril/voda 60/40 (v/v), průtok 1 ml/min, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku 10 μ l, detekce při 280 nm, 1 – fomesafen, 2 – isoproturon, 3 – metazachlor, 4 – acetochlor, 5 – triflumuron.

Fomesafen eluoval na všech testovaných kolonách před markerem mrtvého času, následoval isoproturon, metazachlor, acetochlor a triflumuron. Hodnoty asymetrických faktorů byly u téměř všech analytů blízké jedné, nedocházelo tedy k žádnému výraznému rozmytí píků. V případě fomesafenu na koloně XSelect HSS C18 dochází k rozdělení píku. To je pravděpodobně způsobeno koelucí s píkem rozpouštědla. Nejvíce symetrické píky poskytuje za těchto podmínek kolona XSelect CSH C18. Hodnoty rozlišení všech sousedních píků byly větší než 1,5, tudíž se analyty dají považovat za separované na základní linii.

Separace proběhla nejrychleji na koloně XBridge C18, zatímco nejdelší doba analýzy byla na koloně XSelect HSS C18. Tyto výsledky korespondují s účinností kolon

stanovené v testu podle Engelhardta, kde nejvyšší účinnost vykazovala kolona XBridge C18 a nejnižší kolona XSelect HSS C18.

Následně byl testován vliv organického modifikátoru na separaci směsi vybraných pesticidů. Separace probíhala na kolonách XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 v mobilní fázi methanol/voda 60/40 (v/v). Výsledky separací jsou uvedeny v tabulce 6. Chromatogramy separací jsou ukázány na obrázku 9.



Obrázek 9: Separace směsi pesticidů na kolonách A – XBridge C18, B – XSelect CSH C18, C – XSelect HSS C18, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), průtok 1 ml/min, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku 10 µl, detekce při 280 nm, 1 – fomesafen, 2 – metazachlor, 3 – isoproturon, 4 – acetochlor, 5 – triflumuron.

Fomesafen i v mobilní fázi obsahující methanol eluoval před markerem mrtvého času následován metazachlorem, isoproturonem, acetochlorem a triflumuronem. Oproti mobilní fázi s acetonitrilem v prostředí methanolu eluoval metazachlor před isoproturonem a retence analytů byla podstatně vyšší, což je dáno nižší eluční silou methanolu oproti acetonitrilu. Asymetrie píků byla v methanolvé mobilní fázi větší, zejména u píků fomesafenu a acetochloru. Píky metazachloru a fomesafenu v prostředí methanolu frontovaly oproti acetonitrilové mobilní fázi, kde docházelo ke chvostování. Výjimku tvořil fomesafen na koloně XSelect HSS C18, který výrazně chvostoval i v methanolvé mobilní fázi. Rozlišení všech píků odpovídá píkům rozděleným na základní linii. Hodnoty rozlišení jsou v obou mobilních fázích podobné s výjimkou rozlišení acetochloru a triflumuronu, které se na všech kolonách řádově liší, což je dáno vysokou retencí triflumuronu na všech kolonách v mobilní fázi s methanolem.

Nejrychleji separace proběhla na koloně XBridge C18, nejpomaleji na koloně XSelect HSS C18 stejně jako při použití mobilní fáze s acetonitrilem.

Nejdelší dobu analýzy poskytovala v obou mobilních fázích kolona XSelect HSS C18. Vyšší retence analytů na koloně XSelect HSS C18 je dána větším povrchem kolony (menší velikostí pórů) v porovnání s kolonami XBridge C18 a XSelect CSH C18. Kolona XSelect HSS C18 také vykazuje v testu podle Engelhardta nejnižší účinnost, což úzce souvisí s nejvyšší retencí a šířkou píků. Nejdelší retence získané na této koloně korelují s nevyššími hodnotami indexu hydrofobicity získanými z Waltersova a Galushkova testu. Zejména dle Galushkova testu je index hydrofobicity pro tuto kolonu výrazně vyšší než pro kolony XBridge C18 a XSelect CSH C18.

5 Závěr

V této práci byly zjišťovány a porovnávány interakční a separační vlastnosti kolon XBridge C18, XSelect CSH C18 a XSelect HSS C18 určených pro reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Následně byly na těchto kolonách optimalizovány separace vybraných pesticidů.

Kolony byly testovány chromatografickými testy podle Walterse, Engelhardta a Galushky, které popisují silanolovou aktivitu, index hydrofobicity, tvarovou selektivitu a účinnost kolon. Dle všech tří provedených testů mají testované kolony nízkou aktivitu volných silanolových skupin. Nejvyšší silanolovou aktivitu vykazovala kolona XBridge C18. Z hlediska indexu hydrofobicity vykazovala v testu podle Walterse a Galushky nejvyšší afinitu k nepolárním sloučeninám kolona XSelect HSS C18. Engelhardtovým testem byla zjištěna nejvyšší tvarová selektivita u kolony XSelect CSH C18 a nejnižší u kolony XSelect HSS C18. Všechny tři testované kolony jsou podle výsledků Engelhardtova testu vhodné pro separace bazických látek. Engelhardtovým testem byla zjištěna nejvyšší účinnost kolony XBridge C18. Nejnižší účinnost vykazovala kolona XSelect HSS C18. Nestejně výsledky testů dokazují, že tyto testy nejsou univerzální a nelze je z důvodu užití rozdílných testovacích analytů a podmínek vzájemně porovnávat.

Na testovaných kolonách byla optimalizována separace vybraných pesticidů v mobilních fázích tvořených acetonitrilem a vodou a methanolem a vodou za isokratické eluce. V prostředí methanolu probíhaly separace kvůli nižší eluční síle mobilní fáze pomaleji než v acetonitrilu. Nejrychleji byly pesticidy separovány v obou mobilních fázích na koloně XBridge C18. Nejdéle probíhala separace na koloně XSelect HSS C18. Tato kolona má z testovaných kolon nejvyšší povrch, což vede k nejvyšší retenci analytů. Nejdější čas analýzy na koloně XSelect HSS C18 odpovídá nejvyššímu indexu hydrofobicity stanovenému Waltersovým a Galushkovým testem. Směs pěti pesticidů byla rozdělena na základní linii na všech třech testovaných kolonách.

Literatura

- [1] F. Opekar, *Základní analytická chemie*, 2. Karolinum, 2010.
- [2] E. Tesařová, D. Sýkora, M. Vosmanská, a M. Zvolánková, „Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC“, *Chem. Listy*, roč. 2007, č. 101, s. 190–199.
- [3] „Vliv pH mobilní fáze na retenci solutů“.
http://www.hplc.cz/Teorie/iont_suppres.htm (viděno lis. 17, 2020).
- [4] P. Coufal, „HPLC“. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> (viděno lis. 17, 2020).
- [5] Waters, „Colonnas ACQUITY UPLC“. Waters, 2015, [Online]. Dostupné z:
https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=fr_FR&cid=134618105&lid=1528981.
- [6] Z. Kadlecová, K. Kalíková, D. Folprechtová, E. Tesařová, a M. Gilar, „Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1625, s. 461301, srp. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461301.
- [7] Pamela C. Iraneta, Kevin D. Wyndham, Douglas R. McCabe, Thomas H. Walter, „Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography“, *Waters White Pap.*, 2011.
- [8] „XBridge BEH C18 Column, 130Å, 5 µm, 4.6 mm X 150 mm, 1/pk“.
<https://www.waters.com/nextgen/cz/en/shop/columns/186003116-xbridge-beh-c18-column-130a-5--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html> (viděno říj. 26, 2020).
- [9] „XSelect CSH C18 Column, 130Å, 5 µm, 4.6 mm X 150 mm, 1/pk“.
<https://www.waters.com/nextgen/cz/en/shop/columns/186005290-xselect-csh-c18-column-130a-5--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html> (viděno říj. 26, 2020).
- [10] „XSelect HSS C18 Column, 100Å, 5 µm, 4.6 mm X 150 mm, 1/pk“.
<https://www.waters.com/nextgen/cz/en/shop/columns/186004773-xselect-hss-c18-column-100a-5--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html> (viděno říj. 26, 2020).
- [11] H. A. Claessens, M. A. van Straten, C. A. Cramers, M. Jeziarska, a B. Buszewski, „Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A*, roč. 826, č. 2, s. 135–156, lis. 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00749-3.
- [12] L. Janečková, K. Kalíková, Z. Bosáková, a E. Tesařová, „Study of interaction

- mechanisms on zirconia-based polystyrene HPLC column", *J. Sep. Sci.*, roč. 33, č. 19, s. 3043–3051, jen 2010, doi: 10.1002/jssc.201000391.
- [13] P. Jandera, K. Novotná, M. S. Beldean-Galea, a K. Jiša, „Retention and selectivity tests of silica-based and metal-oxide bonded stationary phases for RP-HPLC", *J. Sep. Sci.*, roč. 29, č. 6, s. 856–871, dub. 2006, doi: 10.1002/jssc.200500489.
- [14] H. Engelhardt, H. Löw, a W. Götzinger, „Chromatographic characterization of silica-based reversed phases", *J. Chromatogr. A*, roč. 544, s. 371–379, kvě. 1991, doi: 10.1016/S0021-9673(01)83996-0.
- [15] M. J. Walters, „Classification of Octadecyl-Bonded Liquid Chromatography Columns", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, roč. 70, č. 3, s. 465–469, kvě. 1987, doi: 10.1093/jaoac/70.3.465.
- [16] H. Engelhardt a M. Jungheim, „Comparison and characterization of reversed phases", *Chromatographia*, roč. 29, č. 1, s. 59–68, led. 1990, doi: 10.1007/BF02261141.
- [17] „Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006".
- [18] R. J. Hance a C. R. Worthing, *The Pesticide manual a world compendium*, 9. Farnham: British Crop Protection Council, 1991.
- [19] „Isoproturon | 34123-59-6", *Chemical Book*.
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1113929
(viděno lis. 26, 2020).
- [20] National Center for Biotechnology Information, „PubChem Compound LCSS for CID 49384, Metazachlor", *PubChem*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/49384> (viděno lis. 26, 2020).
- [21] National Center for Biotechnology Information, „PubChem Compound LCSS for CID 47445, Triflumuron", *PubChem*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/47445> (viděno lis. 24, 2020).
- [22] K. Vyňuchalová a P. Jandera, „Selectivity Tests of Stationary Phases for Reversed-Phase HPLC", *Anal. Lett.*, roč. 44, č. 9, s. 1640–1662, erven 2011, doi: 10.1080/00032719.2010.520393.