

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

---

# Chromatografické testování a porovnání reverzních HPLC kolon

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Veronika Leštinová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Mgr. Lucie Janečkové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne .....

.....

podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Lucii Janečkové za cenné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce. Také za poskytnutí materiálů a času, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat studentům doktorského studia z laboratoře č. 119 za ochotu vždy pomoci.

Poděkování patří následujícím finančním zdrojům: projekt MSM0021620857, MŠMT ČR a projekt IAAX00100903, GAAV ČR.

## **Abstrakt**

Za pomoci jednoduchých chromatografických testů (Waltersův a Engelhardtův) byly zjištěny základní vlastnosti tří moderních reverzních HPLC kolon, které byly následně porovnány na základě jejich hydrofobnosti, silanolové aktivity, účinnosti a selektivity.

## **Klíčová slova**

HPLC, chromatografické testy, moderní reverzní kolony

## **Abstract**

Simple chromatographic tests (Walters and Engelhardt) were used for determination of chromatographic characteristics of three modern reversed HPLC columns, which were consequently compared on the basis of hydrophobicity, silanol activity, efficiency and selectivity.

## **Keywords:**

HPLC, chromatographic tests, modern reversed column

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1 Kapalinová chromatografie.....	8
2.1.1 Princip chromatografie .....	8
2.1.2 Základní parametry separace .....	8
2.1.3 Mobilní fáze v HPLC .....	10
2.1.4 Stacionární fáze v HPLC .....	10
2.2 Příprava a testování kolon.....	11
2.3 Waltersův test .....	11
2.4 Engelhardtův test .....	14
2.5 Chromatografické kolony .....	15
2.5.1 XTerra <sup>®</sup> RP18.....	15
2.5.2 Symmetry <sup>®</sup> C18.....	15
2.5.3 SunFire <sup>™</sup> C18.....	16
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>17</b>
3.1 Použité chemikálie .....	17
3.2 Přístrojové vybavení .....	17
3.3 Použité kolony .....	18
3.4 Mobilní fáze .....	18
3.5 Waltersův test .....	18
3.6 Engelhardtův test .....	19
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>20</b>
4.1 Waltersův test .....	20
4.2 Engelhardtův test .....	25
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	<b>29</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>30</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$a$	přílehlá šířka píku v 10 % výšky
$\alpha$	tvarová selektivita, separační faktor
$A$	plocha píku
$A_S$	asymetrický faktor
ACN	acetonitril
$b$	odlehlá šířka píku v 10 % výšky
$C_8$	oktylová stacionární fáze
$C_{18}$	oktadecylová stacionární fáze
$d_p$	průměr částic stacionární fáze
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$H_r$	redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$HI$	index hydrofobnosti
$IP$	index polarity
$k$	retenční faktor
$L$	délka kolony
$n$	počet teoretických pater
$n_m$	počet teoretických pater na metr kolony
$N,N$ -DETA	$N,N$ -diethyl- $m$ -toluamid
$N,N$ -A	$N,N$ -dimethylanilin
$p$	tlak
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
$R_{1,2}$	rozlišení
$SI$	silanolový index
$t$	teplota
$t_M$	mrtvý čas kolony
$t_R$	retenční čas analytu
$t_R'$	redukovaný retenční čas
$V_R'$	redukovaný retenční objem
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky
$w_b$	šířka píku při základně

# 1. ÚVOD

Objev chromatografie spadá do 90. let 19. století, kdy ruský botanik Michail Semjonovič Cvět použil pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů skleněnou kolonu naplněnou uhlíčitánem vápenatým [1]. Chromatografie se stala jednou z nejvýznamnějších analytických metod, umožňující separaci, identifikaci a stanovení anorganických i organických látek.

Velice často využívanou technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kterou je možno aplikovat na separace širokého okruhu analytů. V dnešní analytické praxi je nejběžnější reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (RP-HPLC), umožňující separace a studium přírodních látek, peptidů a proteinů [2].

Mezi nejpoužívanější separační média v RP-HPLC patří kolony se silikagelovým nosičem a navázanou nepolární stacionární fází. Silikagel je používán pro svou mechanickou odolnost, snadný způsob modifikace a možnost přípravy homogenních částic o různých průměrech. Jednou z nevýhod silikagelu je jeho omezená stabilita vůči pH, ale také nežádoucí interakce analytů s volnými silanolovými skupinami silikagelu. Existují metody, které omezují vliv těchto nevýhod [3].

Nevýhodou v dnešní době je, že doposud nebyla dostatečně vyřešena otázka vhodného způsobu charakterizace separačních vlastností chromatografických kolon. Autoři Engelhardt, Tanaka, Walters, Galushko navrhli řadu jednoduchých testů pro charakterizaci základních vlastností kolon - hydrofobnosti, tvarové selektivity (methylenové selektivity) a aktivity volných silanolových skupin.

## CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo seznámení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, zjištění základních vlastností tří moderních reverzních HPLC kolon pomocí jednoduchých chromatografických testů a následné porovnání vlastností těchto kolon.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kapalinová chromatografie

#### 2.1.1 Princip chromatografie

Chromatografie je separační (dělicí) analytická metoda. Základem je rozdělení složek směsi mezi dvě fáze, mobilní – pohyblivou a stacionární – nepohyblivou fázi.

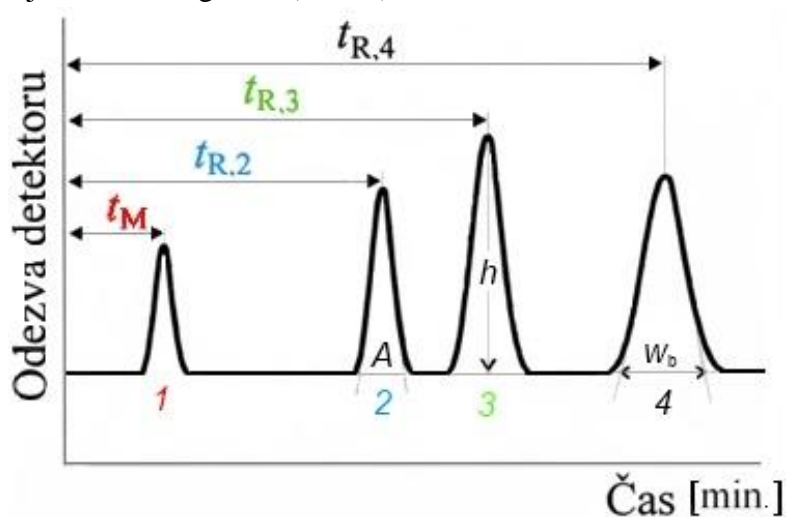
Mezi hlavní interakce v kapalinové chromatografii patří elektrostatické a hydrofobní interakce, vodíkové vazby a interakce dipól - dipól. Velkou výhodou HPLC je možnost ovlivnění separace vhodnou změnou složení mobilní fáze a volbou stacionární fáze.

#### 2.1.2 Základní parametry separace

K separaci dochází v koloně obsahující stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (eluent). Rozdílné analyty mají různou afinitu ke stacionární fázi, proto mohou podléhat různé distribuci mezi mobilní a stacionární fázi. Analyty jsou tedy rozdílně zadržovány a zpoždovány (retardovány) [4].

Výsledkem analýzy je záznam odezvy detektoru na čase, tzv. chromatogram.

Hodnoty parametrů, které charakterizují chromatografické chování separovaných analytů, se určují z chromatogramu (Obr. 1).



**Obr. 1:** Chromatogram inertní látky a tří látek směsi

$t_M$  - mrtvý čas kolony,  $t_R$  - retenční čas složky vzorku,  $A$  - plocha píku,  $h$  - výška píku,  $w_b$  - šířka píku při základně [4].



Retenční čas  $t_R$  je doba, kterou příslušný analyt setrvá v koloně. Tento časový interval se skládá z mrtvého času  $t_M$  a redukovaného retenčního času  $t'_R$ . Mrtvý čas je doba analytu, který není v koloně zadržován. Redukovaný retenční čas odpovídá času, který analyt stráví ve fázi stacionární. Je definován vztahem: [4]

$$t_R = t_M + t'_R \quad (1)$$

Retenční charakteristiky analytů lze také vyjádřit pomocí objemů. Obdobně je definován redukovaný retenční objem  $V'_R$ .

Výhodou redukovaných hodnot je jejich nezávislost na délce kolony a tudíž platí obecněji než pouhé hodnoty  $t_R$  a  $V_R$  [1].

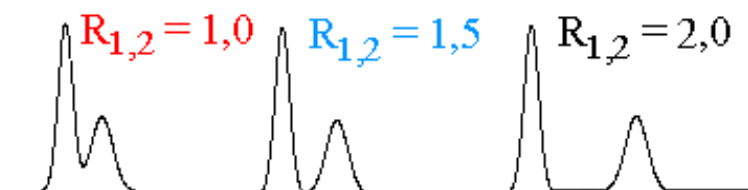
Další velice často používanou retenční charakteristikou je retenční faktor (kapacitní poměr), který udává poměr doby, kterou analyt stráví ve stacionární a mobilní fázi, neboli kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní. Platí vztah: [1]

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2)$$

Mírou selektivity chromatografického systému pro dvě látky je separační faktor. Je dán podílem retenčních faktorů dvou látek: [2, 4]

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

Veličina charakterizující schopnost chromatografického systému vzájemně oddělit dva analyty se nazývá rozlišení. Z obrázku je patrné, že čím jsou hodnoty rozlišení vyšší, tím budou těžiště elučních křivek dál od sebe a tím bude systém selektivnější. Píky jsou rozděleny, pokud je hodnota  $R_{1,2} \geq 1,5$ .



**Obr. 2:** Hodnoty rozlišení  $R_{1,2}$  pro separaci dvou látek

### 2.1.3 Mobilní fáze v HPLC

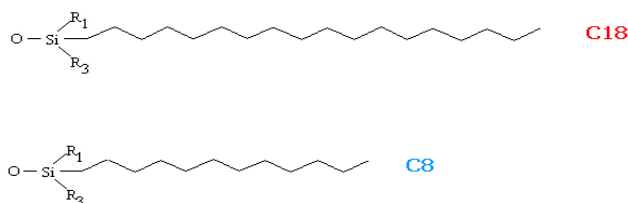
V kapalinové chromatografii je mobilní fáze aktivním činidlem v separačním procesu. Mobilní fáze se většinou skládá ze směsi dvou či více rozpouštědel. Její složení lze ovlivnit změnou obsahu a typu organického modifikátoru, typu pufru, jeho koncentrací, hodnotou pH a přidávkem iontově-párových činidel [2].

Mobilní fáze v RP-HPLC je polární povahy, nejčastěji se používají methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, které se v různých poměrech mísí s vodou či pufrem. Mobilní fáze je důležitá v ohledu detekce. Pro citlivější analýzu by měla mobilní fáze poskytovat co nejnižší signál.

### 2.1.4 Stacionární fáze v HPLC

Jedněmi z nejpoužívanějších stacionárních fází v HPLC jsou fáze chemicky vázané a z nich především nepolární reverzní fáze. Mezi jejich výhody můžeme zařadit aplikovatelnost v širokém rozsahu polarit (od látek nepolárních až k látkám polárním), reprodukovatelná příprava a rychlé a účinné separace [3].

Nejběžnějším nosičem chemicky vázaných fází je silikagel, polymerní oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ). Silikagel obsahuje silanolové skupiny, ve kterých může být aktivní vodík snadno nahrazen různými funkčními skupinami. V současné době nejběžněji komerčně dostupné jsou stacionární fáze siloxanového typu Si-O-Si-R. Tento typ se připravuje reakcí silanolových skupin silikagelu s organochlorsiloxany nebo s organochlorsilany [3]. Takto se připravují fáze např. Si-O-Si-hexyl, -oktyl, -oktadecyl, -fenyl a mnoho dalších. Na obr. 3 jsou zobrazeny nejpoužívanější stacionární fáze v RP-HPLC, oktylová ( $\text{C}_8$ ) a oktadecylová ( $\text{C}_{18}$ ) stacionární fáze.



**Obr. 3:** Stacionární fáze  $\text{C}_8$  a  $\text{C}_{18}$

Jednou z nevýhod chemicky vázaných fází na bázi silikagelu je nestabilita v bazickém a silně kyselém prostředí. Další nevýhodou může být přítomnost nezreagovaných silanolových skupin, která vede k nežádoucím interakcím zvláště s bazickými látkami a je příčinou chvostování jejich píků. Aby k tomuto jevu nedocházelo, používají se metody, kterými lze omezit vliv nezreagovaných silanolových skupin [1, 3, 6]. Mezi takové metody patří tzv. „endcapping“. Využívá silanizace trimethylchlorsilanem a dimethyldichlorsilanem [3].

Uvedené nežádoucí vlastnosti silikagelu vedly k vývoji nových alternativních nosičů stacionární fáze. Oxid zirkoničitý ( $ZrO_2$ ), oxid titaničitý ( $TiO_2$ ) a oxid hlinitý ( $Al_2O_3$ ) jsou stabilní v celém rozsahu pH a poskytují nové možnosti při vývoji analytických metod [7,8].

## 2.2 Příprava a testování kolon

Kolona je nejdůležitější částí chromatografického systému. Účinnost separace závisí na správném naplnění kolony. Distribuce stacionární fáze a samotná stacionární fáze by se ve správně naplněné koloně neměla měnit, a to ani při dlouhodobém používání kolony za vyšších tlaků. Proto se převážně používají komerčně plněné kolony [1].

Komerční kolony se v mnoha parametrech liší, např. typem a navázáním stacionární fáze, rozměry kolony, velikostí částic a pórů. Každá chromatografická kolona má různé separační vlastnosti. Proto došlo k rozvoji testování kolon, které poskytují informace o separačních vlastnostech jednotlivých kolon a umožňují jejich porovnání. Mezi předně známé chromatografické testy patří Engelhardtův, Waltersův, Tanakův a Galushkův test [9].

## 2.3 Waltersův test

Ke zjištění základních charakteristik reverzních stacionárních fází slouží Waltersův test [10]. Chromatografické kolony se kvalitativně dělí na tři hlavní skupiny, které jsou hodnoceny na základě tří kritérií – hydrofobnosti, účinnosti a aktivity volných silanolových skupin.

1. Index hydrofobnosti ( $HI$ ) – je dán podílem retenčního faktoru anthracenu a retenčního faktoru benzenu, při použití mobilní fáze ACN/voda, 65:35 (v/v). Vztah je definován:

$$HI = \frac{k_{\text{anthracen}}}{k_{\text{benzen}}} \quad (4)$$

2. Účinnost kolony, která je vyjádřena počtem teoretických pater ( $n$ ) a výškovým ekvivalentem teoretického patra ( $H$ ). Výpočet je vztažen k retenčnímu chování toluenu.

- Počet teoretických pater ( $n$ ) se vypočítá z rovnice:

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

kde  $t_R$  je retenční čas toluenu a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky.

- Výškový ekvivalent patra ( $H$ ), je dán vztahem:

$$H = \frac{L}{n} \quad (6)$$

kde  $L$  je délka kolony.

- Počet teoretických pater na metr ( $n_m$ ) se vypočítá z rovnice:

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

- Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra ( $H_r$ ) lze získat ze vztahu:

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

kde  $d_p$  je průměr částic.

3. Aktivita volných silanolových skupin – silanolový index ( $SI$ ) je získán jako podíl retenčního faktoru  $N,N$ -diethyl- $m$ -toluamidu ( $N,N$ -DETA) a retenčního faktoru anthracenu, mobilní fází je čistý acetonitril.

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

**Tab. 1:** Klasifikační kritéria kolon, převzato z [10].

<b>Kritéria</b>	<b>Rozsah hodnot</b>	<b>Kategorie</b>
<b><i>HI</i></b>	< 3,6	nízký
	3,6 - 4,0	střední
	> 4,0	vysoký
<b><i>SI</i></b>	< 0,9	nízký
	0,9 - 1,2	střední
	> 1,2	vysoký
<b>Účinnost</b> ( $n_m$ )	< 30 000	nízká
	30 000 - 50 000	střední
	> 50 000	vysoká

Jak už bylo zmíněno, na základě výsledků těchto kritérií se kolony kvalitativně dělí do tří skupin. První skupina kolon je charakterizována relativně nízkou afinitou k nepolárním sloučeninám a nízkou až střední aktivitou silanolových skupin. Tato skupina kolon je běžněji používána oproti kolonám z druhé a třetí skupiny. Kolony ve druhé skupině se vyznačují vysokou afinitou k nepolárním sloučeninám a také značně vysokou hodnotou silanolového indexu. Tyto kolony obecně vykazují dobré separační vlastnosti pro molekuly o nízké až střední polaritě. U aminů a dalších bazických sloučenin se mohou projevit nežádoucí interakce v důsledku vysoké hodnoty silanolového indexu. Třetí skupina zahrnuje kolony, které mají nejvyšší afinitu k nepolárním sloučeninám a zároveň mají nízkou hodnotu silanolového indexu [10].

## 2.4 Engelhardtův test

Engelhardtův test je dalším testem pro reverzní stacionární fáze. Využívá jinou mobilní fázi oproti Waltersovu testu. Mobilní fáze je nepufrovaná směs methanolu a vody [11].

Prostřednictvím Engelhardtova testu zjišťujeme a hodnotíme index polaritu, tvarovou selektivitu a hydrofobní vlastnosti kolony.

Hydrofobnost kolony se zjišťuje pomocí retenčního faktoru ethylbenzenu.

Tvarová selektivita  $\alpha$  (pro methylovou skupinu) se vypočítá z podílu retenčního faktoru ethylbenzenu a retenčního faktoru toluenu:

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

Asymetrie píku je nežádoucí a souvisí s účinností kolony. Vyhodnocuje se u látek s bazickým charakterem, jako je např. anilin. Hodnota asymetrického faktoru u gaussovského píku se rovná jedné. Pokud tuto hodnotu převýší, dochází k rozmytí (chvostování) píků. Asymetrický faktor se vypočítá z rovnice: [12]

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

kde  $a$  je přílehlá šířka píku v 10 % jeho výšky,  $b$  je odlehlá šířka píku v 10 % jeho výšky.

Index polaritu  $IP$  se vypočítá z poměrů asymetrických faktorů anilinu a fenolu, popř. retenčních faktorů anilinu a fenolu. Je dán rovnicí:

$$IP = \frac{A_{S(\text{anilin})}}{A_{S(\text{fenol})}} \quad \left( \text{popř. } \frac{k_{\text{anilin}}}{k_{\text{fenol}}} \right) \quad (12)$$

Testování kolon v Engelhardtově testu je prováděno při smočeném stavu stacionární fáze, kdy jsou vzájemné interakce alkylových řetězců slabší než interakce těchto řetězců se složkami mobilní fáze. Toto pravidlo bude platit, pokud obsah vody v mobilní fázi nepřesáhne 50 objemových procent. V testu se proto používá mobilní fáze o složení methanol/voda, 55/45 (v/v) [12].

Podle Engelhardta by se měla dobrá chromatografická kolona chovat následovně: anilin by měl eluovat vždy před fenolem, podíl asymetrie píků anilinu a fenolu by měl být menší než 1,3 a *N,N*-dimethylanilin má eluovat před toluenem.

## 2.5 Chromatografické kolony

### 2.5.1 XTerra<sup>®</sup> RP18

XTerra kolony jsou založeny na hybridní anorganicko-organické stacionární fázi. Kombinuje vlastnosti silikagelu, to je vysoká účinnost, mechanická stabilita, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů (pH stabilitou). Syntéza je založena na reakci dvou organosilanů, konkrétně jde o reakci tetraethoxysilanu s methyltriethoxysilanem. Navázáním methylpolyetoxysilanu se na povrchu nosiče snižuje počet silanolových skupin. Díky tomu, že na povrchu nosiče nedochází k disociaci silanolových skupin, jsou omezeny nežádoucí interakce s bazickými látkami a také rozpouštění silikagelu, čímž je relativně prodloužena životnost kolony. Nosič se stává homogenním, a proto lze kolony používat v širokém rozsahu pH (2-12) [3, 5].

Povrch kolony XTerra<sup>®</sup> RP18 je modifikován monofunkčními silany s vloženými karbamáty, optimalizovanými pro minimální chvostování látek bazického charakteru. Na obrázku 4 je zobrazen způsob vazby řetězce kolony XTerra<sup>®</sup> RP18.



**Obr. 4:** Způsob vazby řetězce C18 na silikagelový nosič u kolony XTerra<sup>®</sup> RP18, převzato z [5]

### 2.5.2 Symmetry<sup>®</sup> C18

Tyto kolony vykazují vysokou reprodukovatelnost a dlouhou životnost. Jsou navrženy s vysokou čistotou surovin, které jsou důsledně kontrolovány výrobními procesy a postupy. Stacionární fáze kolony je vázána klasicky, tzn. stejně jako u kolony XTerra<sup>®</sup> RP18, ovšem bez vložené polární skupiny. Nosičem Symmetry<sup>®</sup> C18 kolony, jako u všech tří použitých kolon, je silikagel. Je vysoce hydrofobní a v dnešní době poměrně používaná [13].

### 2.5.3 SunFire™ C18

Jako u kolony Symmetry® C18, poskytuje kolona SunFire™ C18 vysokou reprodukovatelnost a dlouhou životnost kolony. Vykazují poměrně vysokou stabilitu při nízkých hodnotách pH a vysokou účinnost. SunFire kolony představují novou moderní technologii kolon od firmy Waters. Využívají nové patentované technologie vazby ligandů na silikagelové částice.

Tyto moderní reverzní kolony představují různé generace oktadecylových kolon od firmy Waters. Nejstarší z těchto tří zmíněných kolon je Symmetry® C18, dále následuje novější XTerra® RP18 a nejnovější z těchto tří kolon je SunFire™ C18. V dnešní době nejnovější generace jsou kolony XBridge, které se v této práci netestovaly a neporovnávaly.

V tabulce 2 jsou uvedeny a porovnány základní chemicko-fyzikální vlastnosti použitých kolon: XTerra® RP18, Symmetry® C18 a SunFire™ C18.

**Tab. 2:** Chemicko-fyzikální vlastnosti použitých kolon, hodnoty dodané výrobcem.

	<b>XTerra® RP18</b>	<b>Symmetry® C18</b>	<b>SunFire™ C18</b>
<b>Délka kolony [mm]</b>	150	150	150
<b>Vnitřní průměr [mm]</b>	3	3	3
<b>Průměr částic [µm]</b>	3,5	3,5	3,5
<b>Povrch [m<sup>2</sup>/g]</b>	172	343	356
<b>Průměrná velikost pórů [Å]</b>	144	93	89
<b>Celkový uhlík [%]</b>	14,89	19,54	16,89
<b>Konc. kovů v částicích [ppm]</b>	Na < 1	Na - 1	Na < 1
	Al < 1	Al < 1	Al < 1
	Fe - 3	Fe - 5	Fe - 3
<b>End-capping</b>	ano	ano	ano
<b>Tvar částic</b>	kulovitý	kulovitý	kulovitý
<b>Nosič</b>	silikagel	silikagel	silikagel



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

- Acetonitril - CHROMASOLV<sup>®</sup> pro HPLC, čistota gradient grade, Sigma - Aldrich (Steinheim, Německo)
- Methanol - CHROMASOLV<sup>®</sup> pro HPLC, čistota gradient grade, Sigma - Aldrich (Steinheim, Německo)
- Anthracen - 97%, Sigma - Aldrich (Steinheim, Německo)
- Anilin - 99,5%, Sigma - Aldrich (St.Louis, USA)
- Benzen - 99,7%, HPLC grade, Sigma - Aldrich (St.Louis, USA)
- Deionizovaná voda - Milli Q, Millipore (Milford, USA)
- Ethylbenzen - 99%, Sigma - Aldrich (St.Louis, USA)
- Fenol - 99%, Sigma - Aldrich (St.Louis, USA)
- *N,N* - dimethylanilin - 97%, Sigma - Aldrich (Steinheim, Německo)
- *N,N* - diethyl-*m*-toluamid - purum, >99%, GC, (Fluka Chemie AG, Švýcarsko)
- Toluén - 99,7%, HPLC grade, Sigma - Aldrich (St.Louis, USA)

### 3.2 Přístrojové vybavení

HPLC systém – kapalinový chromatograf

- vakuový odplyňovač mobilní fáze DG 301, Ecom (Praha, ČR)
- gradientní čerpadlo Ecom Beta 10, Ecom (Praha, ČR)
- kolonový termostat LCO 101, Ecom (Praha, ČR)
- UV-VIS spektrofotometrický detektor Sapphire 800, Ecom (Praha, ČR)
- dávkovací ventil Rheodyne 7725i s dávkovací smyčkou o objemu 5 $\mu$ l, Cotati (USA)
- počítačový program Clarity, verze 2.3.0.174, Data Apex (Praha, ČR)

Vzorky byly naváženy na analytických vahách typu 262 SMA – FR od firmy Precisa (Dietikon, Švýcarsko) a dávkovány injekční stříkačkou typu Hamilton o objemu 5 µl od firmy Hamilton (USA).

Všechny zásobní roztoky a vzorky, které byly připravovány pro analýzy, byly skladovány v lednici.

### 3.3 Použité kolony

- XTerra<sup>®</sup> RP18, 3 x 150 mm, velikost částic 3,5 µm, Waters (Milford, USA)
- Symmetry<sup>®</sup> C18, 3 x 150 mm, velikost částic 3,5 µm, Waters (Milford, USA)
- SunFire<sup>™</sup> C18, 3 x 150 mm, velikost částic 3,5 µm, Waters (Milford, USA)

### 3.4 Mobilní fáze

- Waltersův test aktivity volných silanolových skupin – 100% ACN
- Waltersův test pro určení účinnosti a hydrofobnosti – ACN/voda, 65/35 (v/v)
- Engelhardtův test – methanol/voda, 55/45 (v/v)

### 3.5 Waltersův test

Příprava zásobních roztoků vzorků pro test aktivity volných silanolových skupin

- Anthracen – zásobní roztok anthracenu byl připraven rozpuštěním standardu v mobilní fázi, koncentrace vzorku byla 1 mg/ml.
- *N,N*-diethyl-*m*-toluamid – zásobní roztok *N,N*-DETA byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml rozpuštěním 0,125 ml *N,N*-DETA v mobilní fázi, koncentrace vzorku byla 4,6 mg/ml.

Příprava zásobních roztoků vzorků pro zjištění indexu hydrofobnosti a účinnosti

- Anthracen – zásobní roztok anthracenu byl připraven rozpuštěním standardu v mobilní fázi, jeho koncentrace byla 1 mg/ml.
- Benzen – zásobní roztok benzenu byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml smícháním 0,125 ml benzenu s mobilní fází, koncentrace vzorku byla 4,39 mg/ml.

- Toluen – zásobní roztok toluenu byl připraven stejným způsobem jako zásobní roztok benzenu, koncentrace vzorku byla 4,32 mg/ml.

### Postup analýzy

Kolona byla před analýzami promývána delší dobu mobilní fází, aby byl systém dostatečně ekvilibrovaný. Poté byly na kolonu dávkovány jednotlivé vzorky a vhodně připravená směs všech tří analytů. Analyty byly před analýzou vhodně zředěny tak, aby poskytovaly přibližně stejné odezvy. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a objem dávkovaných vzorků činil 5  $\mu$ l. Všechny vzorky byly detekovány při vlnové délce 254 nm.

## 3.6 Engelhardtův test

### Příprava zásobních roztoků vzorků

- Anilin - zásobní roztok anilinu byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml smícháním 0,125 ml anilinu v mobilní fází. Koncentrace byla 5,11 mg/ml.
- *N,N*-dimethylanilin - zásobní roztok *N,N*-A byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml smícháním 0,125 ml *N,N*-A v mobilní fází. Koncentrace byla 4,78 mg/ml.
- Fenol - zásobní roztok fenolu byl připraven rozpuštěním standardu v mobilní fází, koncentrace vzorku byla 1 mg/ml.
- Ethylbenzen - zásobní roztok ethylbenzenu byl připraven stejným způsobem jako zásobní roztok anilinu, koncentrace vzorku byla 4,34 mg/ml
- Toluen - zásobní roztok toluenu byl připraven též stejným způsobem jako zásobní roztok anilinu, koncentrace vzorku činila 4,32 mg/ml.

### Postup analýzy

Postup byl obdobný jako v případě Waltersova testu. Pouze průtok mobilní fáze byl snížen z 1 ml/min na 0,4 ml/min, kvůli vysokému tlaku, který působil na kolonu.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Jako první byla pro Waltersův a Engelhardtův test použita kolona XTerra® RP18, poté následovala kolona Symmetry® C18 a poslední byla otestována kolona SunFire™ C18. Na základě získaných výsledků byly vlastnosti těchto kolon zhodnoceny a porovnány.

### 4.1 Waltersův test

Experimentální podmínky, předepsané pro tento test a použité v dřívějších studiích, bylo nutno upravit vzhledem k rozměrům kolon a velikosti částic. Předepsaný průtok mobilní fáze byl snížen z 1 ml/min na 0,5 ml/min, z důvodu koeluce analytů a vysokému tlaku na koloně. Při použití čistého acetonitrilu jako mobilní fáze byly změřeny retenční časy *N,N*-DETA a anthracenu. Z těchto časů byly spočítány retenční faktory, které posloužily k výpočtu silanolového indexu. Výsledné hodnoty tohoto indexu poskytují informaci o aktivitě volných silanolových skupin na povrchu silikagelu.

V druhé části Waltersova testu byly analyzovány benzen, toluen a anthracen při použití mobilní fáze o složení ACN/voda, 65/35 (v/v) a průtoku 0,5 ml/min. Z vypočítaných retenčních faktorů anthracenu a benzenu byl získán index hydrofobnosti. Chromatografické charakteristiky píku toluenu byly použity pro zhodnocení účinnosti kolony.

Výsledky Waltersova testu pro kolonu XTerra® RP18 shrnuje tabulka 3.

**Tab. 3:** Vypočítané charakteristiky Waltersova testu pro kolonu XTerra® RP18

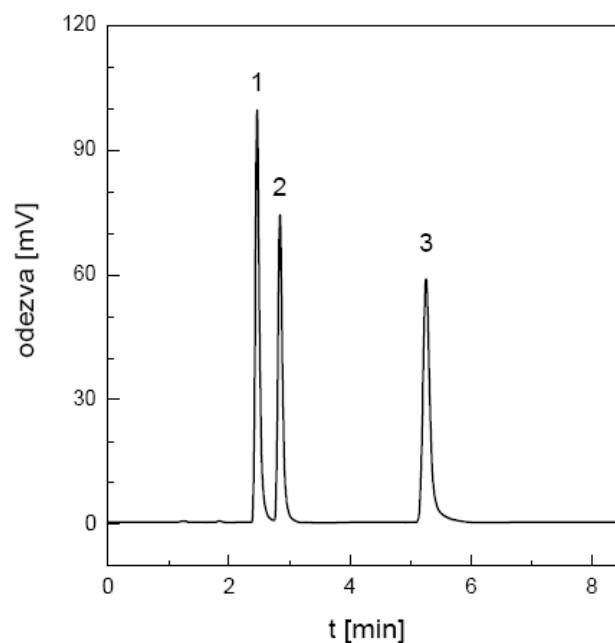
( $k$  – retenční faktor,  $t_M$  – mrtvý čas,  $w_{1/2}$  – šířka píku v polovině výšky,  $L$  – délka kolony,  $H$  – výškový ekvivalent teor. patra,  $d_p$  – průměr částic v koloně,  $H_r$  – redukovaný výškový ekvivalent teor. patra,  $n$  – počet teor. pater,  $n_m$  – počet teor. pater na metr kolony)

<b>Aktivita volných silanolových skupin</b>			
$t_M$ [min]	$k_{N,N-DETA}$	$k_{anthracen}$	$SI$
1,5	0,113	0,26	0,43
<b>Hydrofobnost</b>			
$t_M$ [min]	$k_{anthracen}$	$k_{benzen}$	$HI$
1,3	3,1	0,89	3,48
<b>Účinnost kolony</b>			
$t_R$ (toluen) [min]	$w_{1/2}$ (toluen) [min]	$L$ [cm]	$d_p$ [μm]
2,8	0,080	15	3,5
$n$	$H$ [μm]	$n_m$	$H_r$
6 786,5	22	45 243	6,29

Hodnota silanolového indexu pro kolonu XTerra® RP18 je menší než hodnota 0,9. Podle Walterse tedy kolona vykazuje nízkou aktivitu silanolových skupin. Index hydrofobnosti u kolony XTerra® RP18 činil 3,48, což je nižší než hodnota čtyři, která se nejčastěji objevuje u C18 kolon. Toto srovnání znamená, že tato kolona je méně hydrofobní než klasické C18 kolony.

Pomocí Waltersova testu byla také zjištěna účinnost kolony zařazující se do střední kategorie podle testovacích kritérií, které jsou shrnuty v tabulce 1. Z těchto kritérií pro klasifikaci C18 kolon lze určit, že kolona XTerra® RP18 spadá do první skupiny kolon, které se vyznačují nízkou afinitou k nepolárním sloučeninám a nízkou až střední aktivitou silanolových skupin.

Na obrázku 5 je znázorněn chromatogram obsahující směs benzenu, toluenu a anthracenu. Je patrné, že během analýzy se všechny analyty oddělily a píky jsou symetrické, jen lehce rozmyté vzadu. Nejvíce rozmytý pík patří anthracenu, který má retenční čas 5,3 minut.



**Obr. 5:** Separace Waltersovy testovací směsi určující účinnost a hydrofobnost na koloně XTerra® RP18; mobilní fáze ACN/voda, 65/35 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota 40 °C; tlak 8,3 MPa; UV detekce 254 nm; dávkovací smyčka 5  $\mu$ l. 1 - benzen, 2 - toluen, 3 - anthracen.

Pomocí Waltersova testu byla následně po koloně XTerra® RP18 testována kolona Symmetry® C18. Hodnoty z analýzy jsou uvedeny v tabulce 4.

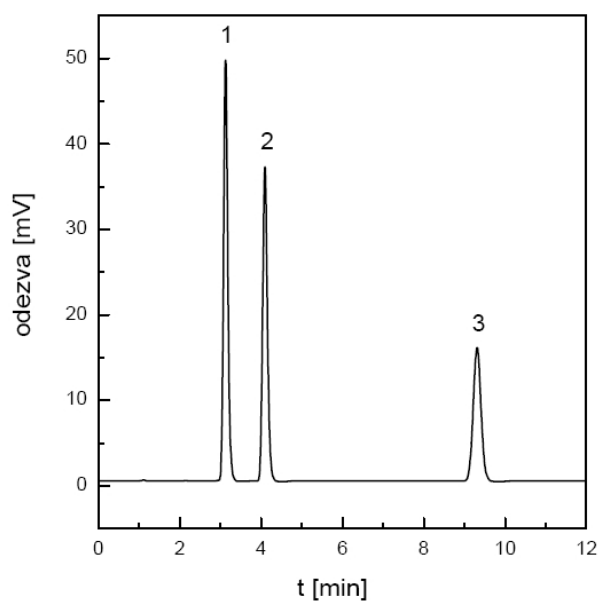
**Tab. 4:** Vypočítané charakteristiky Waltersova testu pro kolonu Symmetry® C18, symboly zde mají tentýž význam jako v tabulce 3.

<b>Aktivita volných silanolových skupin</b>			
$t_M$ [min]	$k_{N,N-DETA}$	$k_{anthracen}$	$SI$
1,45	0,117	0,44	0,27
<b>Hydrofobnost</b>			
$t_M$ [min]	$k_{anthracen}$	$k_{benzen}$	$HI$
1,1	7,55	1,85	4,08
<b>Účinnost kolony</b>			
$t_R$ (toluen) [min]	$w_{1/2}$ (toluen) [min]	$L$ [cm]	$d_p$ [ $\mu$ m]
4,1	0,13	15	3,5
$n$	$H$ [ $\mu$ m]	$n_m$	$H_r$
5 510,5	27	36 737	7,7

Hodnota silanolového indexu kolony Symmetry<sup>®</sup> C18 je 0,27, téměř o polovinu menší než hodnota kolony XTerra<sup>®</sup> RP18. Index hydrofobnosti je téměř roven hodnotě, při které se pohybuje většina oktadecylových kolon. Kolonu Symmetry<sup>®</sup> C18 můžeme také zařadit do první skupiny.

V porovnání s kolonou XTerra<sup>®</sup> RP18 má tato kolona menší účinnost, ale i silanolový index, což znamená, že kolona Symmetry<sup>®</sup> C18 vykazuje nižší aktivitu silanolových skupin.

Na obrázku 6 je uveden chromatogram obsahující směs benzenu, toluenu a anthracenu. Na tomto obrázku je vidět, že oproti koloně XTerra<sup>®</sup> RP18 se na této koloně posunuly retenční časy. Výrazněji se liší retenční časy anthracenu, a to o 4 minuty. Symetrie všech píků na koloně Symmetry<sup>®</sup> C18 byla lepší než na koloně XTerra<sup>®</sup> RP18.



**Obr. 6:** Separace Waltersovy testovací směsi určující účinnost a hydrofobnost na koloně Symmetry<sup>®</sup> C18; mobilní fáze ACN/voda, 65/35 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota 40 °C; tlak 8,4 MPa; UV detekce 254 nm; dávkovací smyčka 5  $\mu$ l. 1 - benzen, 2 - toluen, 3 - anthracen.

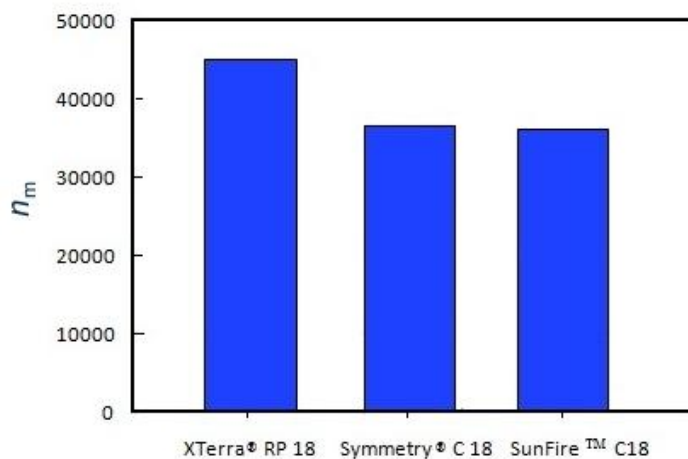
Jako poslední byla pro Waltersův test použita kolona SunFire™ C18. Tato kolona si je s kolonou Symmetry® C18 podobná. Má téměř stejně nízký silanolový index, který charakterizuje jako předešlé dvě kolony nízkou aktivitu silanolových skupin.

**Tab. 5:** Vypočítané charakteristiky Waltersova testu pro kolonu SunFire™ C18, symboly zde mají tentýž význam jako v tabulce 3 a 4.

Aktivita volných silanolových skupin			
$t_M$ [min]	$k_{N,N-DETA}$	$k_{anthracen}$	$SI$
1,5	0,113	0,41	0,28
Hydrofobnost			
$t_M$ [min]	$k_{anthracen}$	$k_{benzen}$	$HI$
1	8,3	2,3	3,6
Účinnost kolony			
$t_R$ (toluen) [min]	$w_{1/2}$ (toluen) [min]	$L$ [cm]	$d_p$ [μm]
4,3	0,137	15	3,5
$n$	$H$ [μm]	$n_m$	$H_r$
5 458	27,5	36 387	7,86

Hodnoty silanolového indexu se od kolony Symmetry® C18 liší o 0,01. Hydrofobnost kolony SunFire™ C18 je menší než kolony Symmetry® C18, ale zároveň větší než kolony XTerra® RP18.

Ve Waltersově testu byly porovnány tři moderní reverzní HPLC kolony. Na obr. 7 je zobrazeno porovnání účinnosti těchto testovaných kolon. Nejúčinnější kolonou je XTerra® RP18 a zbylé dvě kolony mají účinnost velice podobnou.



**Obr. 7:** Porovnání účinnosti testovaných kolon XTerra® RP18, Symmetry® C18 a SunFire™ C18 Waltersovým testem.



## 4.2 Engelhardtův test

V Engelhardtově testu, stejně jako v předcházejícím testu, bylo nutno snížit průtok mobilní fáze z předepsaného 1 ml/min. Kvůli koeluci některých analytů a vysokému tlaku působícímu na kolonách, při 40 °C, byl tedy průtok mobilní fáze snížen na 0,4 ml/min. Při tomto průtoku se tlak pohyboval u použitých kolon od 12 do 15 MPa (XTerra<sup>®</sup> RP18 - 14 MPa; Symmetry<sup>®</sup> C18 - 14,9 MPa; SunFire<sup>™</sup> C18 - 12,5 MPa). Maximální povolený tlak na koloně je dán výrobcem, a tento tlak nesmí být převyšěn. Proto bylo nutné upravit podmínky tak, aby nedošlo k poškození kolon v důsledku vysokého tlaku.

Mobilní fáze pro Engelhardtův test je nepufrovaná směs methanol/voda, 55/45 (v/v). Po ekvilibraci systému byly změřeny retenční časy toluenu, ethylbenzenu, anilinu, fenolu a *N,N*-dimethylanilinu. Z retenčních časů se vypočítaly retenční faktory. Hydrofobnost kolony je daná retenčním faktorem ethylbenzenu. Z poměru retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu se vypočítá tvarová selektivita  $\alpha$ . Index polarity je v Engelhardtově testu dán poměrem faktorů asymetrie píku anilinu a fenolu. Faktor asymetrie je definován v 10 % výšky píku. Získané charakteristiky pro kolonu X Terra<sup>®</sup> RP18 jsou shrnuty v tabulce 6.

Dobrá kolona by se měla podle Engelhardta chovat tak, že anilin eluuje vždy před fenolem, podíl asymetrie píků anilinu a fenolu bude menší než 1,3 a že *N,N*-dimethylanilin eluuje před toluenem.

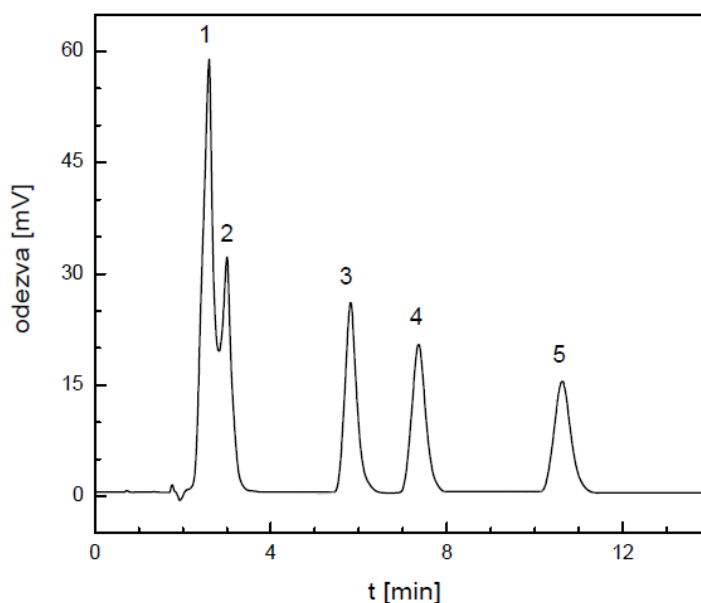
**Tab. 6:** Vypočítané charakteristiky Engelhardtova testu pro kolonu X Terra<sup>®</sup> RP18

( $k$  - retenční faktor,  $t_M$  - mrtvý čas,  $\alpha$  - separační faktor,  $k_{N,N-A}$  – retenční faktor *N,N*-dimethylanilinu)

Retenční faktory analytů					
$t_M$ [min]	$k_{\text{toluen}}$	$k_{\text{ethylbenzen}}$	$k_{\text{anilin}}$	$k_{\text{fenol}}$	$k_{N,N-A}$
1,8	3,06	4,83	0,44	0,67	2,22
Index polarity		Hydrofobnost		Tvarová selektivita	
$IP$		$k_{\text{ethylbenzen}}$		$\alpha$	
0,66		4,83		1,58	

Retenční faktory toluenu, ethylbenzenu a *N,N*-dimethylanilinu převyšují retenční faktory ostatních dvou analytů. Jde o látky, které jsou na koloně déle zadržovány. Čím jsou látky méně polární, tím jsou na koloně déle zadržovány. Nejdéle zadržovaný analyt je v této směsi ethylbenzen. Retenční faktor ethylbenzenu je použit pro vyjádření hydrofobních vlastností. Pro většinu C18 kolon se hodnoty retenčních faktorů pohybují v rozmezí od 5-15. Ethylbenzen vykazuje na koloně XTerra® RP18 retenční faktor 4,83, což je o 0,17 menší.

Na obrázku 8 je vidět anilin, který eluuje před fenolem a *N,N*-dimethylanilin, který eluuje před toluenem. Z tabulky lze vyčíst, že poměr asymetrie píků anilinu a fenolu, tedy index polaritý má hodnotu 0,66. Kolona XTerra® RP18 podle Engelhardta vykazuje nízkou aktivitu silanolových skupin.



**Obr. 8:** Separace směsi látek, určujících tvarovou selektivitu, index polaritý a hydrofobnost podle Engelhardta; kolona XTerra® RP18; mobilní fáze methanol/voda, 55/45 (v/v); průtok 0,4 ml/min; teplota 40 °C; tlak 14 MPa; UV detekce 254 nm; dávkovací smyčka 5 µl. 1 - anilin, 2 - benzen, 3 - *N,N*-dimethylanilin, 4 - toluen, 5 - ethylbenzen.

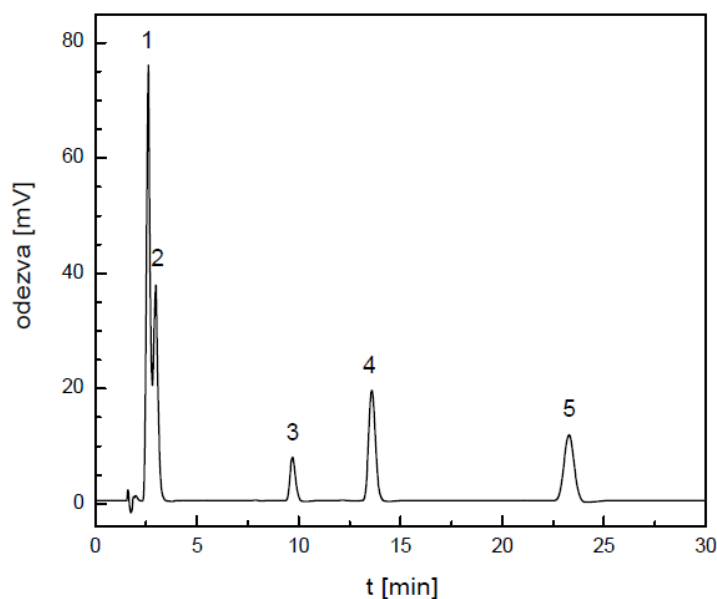
Druhá kolona, Symmetry<sup>®</sup> C18, vykazovala kratší mrtvý čas oproti koloně XTerra<sup>®</sup> RP18. Retenční časy všech analytů se prodloužily, tím se zvýšily hodnoty indexu polarity a separačního faktoru, charakterizujícího tvarovou selektivitu. Výsledky Engelhardtova testu na této koloně shrnuje tabulka 7.

**Tab. 7:** Vypočítané charakteristiky Engelhardtova testu pro kolonu Symmetry<sup>®</sup> C18, symboly zde mají tentýž význam jako v tabulce 6.

Retenční faktory analytů					
$t_M$ [min]	$k_{\text{toluen}}$	$k_{\text{ethylbenzen}}$	$k_{\text{anilin}}$	$k_{\text{fenol}}$	$k_{N,N-A}$
1,6	7,75	13,88	0,63	0,88	5,06
Index polarity		Hydrofobnost		Tvarová selektivita	
$IP$		$k_{\text{ethylbenzen}}$		$\alpha$	
0,72		13,88		1,8	

Kolona Symmetry<sup>®</sup> C18 splňuje Engelhardtovy předpoklady pro dobrou a účinnou kolonu: poměr asymetrie píků anilinu a fenolu je menší než 1 a *N,N*-dimethylanilin eluuje před toluenem.

Chromatogram testovací směsi na koloně Symmetry C18 ukazuje obrázek 9.



**Obr. 9:** Separace směsi látek, určujících tvarovou selektivitu, index polarity a hydrofobnost podle Engelhardta; kolona Symmetry<sup>®</sup> C18 ; mobilní fáze methanol/voda, 55/45 (v/v); průtok 0,4 ml/min; teplota 40 °C; tlak 14,9 MPa; UV detekce 254 nm; dávkovací smyčka 5  $\mu$ l. 1 - anilin, 2 - benzen, 3 - *N,N*-dimethylanilin, 4 - toluen, 5 - ethylbenzen.

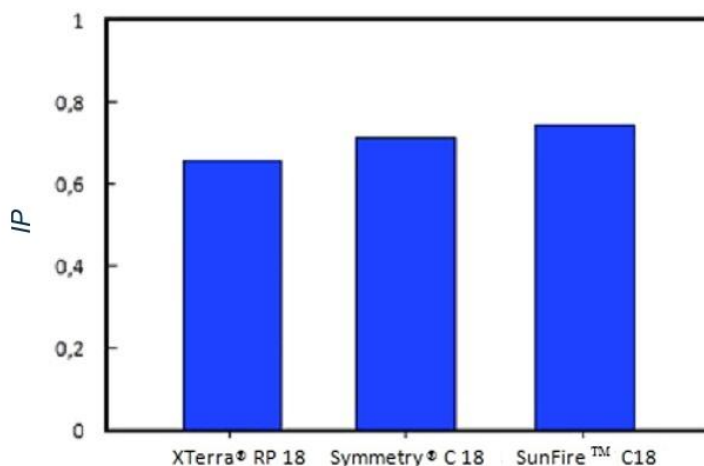
Poslední kolona pro Engelhardtův test byla použita kolona SunFire™ C18. Z výsledků, které jsou uvedeny v tabulce 8, je vidět velká podobnost s kolonou Symmetry® C18.

**Tab. 8:** Vypočítané charakteristiky Engelhardtova testu pro kolonu SunFire™ C18, symboly zde mají tentýž význam jako v tabulce 6 a 7.

Retenční faktory analytů					
$t_M$ [min]	$k_{\text{toluen}}$	$k_{\text{ethylbenzen}}$	$k_{\text{anilin}}$	$k_{\text{fenol}}$	$k_{\text{N,N-A}}$
1,6	8,63	15,75	0,75	1	5,88
Index polarity		Hydrofobnost		Tvarová selektivita	
$IP$		$k_{\text{ethylbenzen}}$		$\alpha$	
0,75		15,75		1,83	

Hodnota separačního faktoru i indexu polarity se u těchto dvou kolon liší pouze o 0,03. Z hodnot uvedených v tabulce 8 vyplývá, že kolona SunFire™ C18, jako předešlé dvě kolony, je podle Engelhardta vhodná pro separaci bazických látek.

Prostřednictvím Engelhardtova testu byly pro zmíněné kolony zjištěny a následně porovnány hydrofobní vlastnosti, index polarity a tvarová selektivita. Na obrázku 10 je porovnání polarity testovaných kolon. Z obrázku je patrné, že nejvyšší index polarity má kolona SunFire™ C18.



**Obr. 10:** Porovnání indexu polarity testovaných kolon XTerra® RP18, Symmetry® C18 a SunFire™ C18 Engelhardtovým testem.

## 5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo testování tří moderních reverzních kolon na bázi silikagelu a následné porovnání vlastností těchto kolon, jako je hydrofobnost, aktivita silanolových skupin, účinnost a tvarová selektivita. Kolony XTerra<sup>®</sup> RP18, Symmetry<sup>®</sup> C18 a SunFire<sup>™</sup> C18 byly testovány pomocí dvou chromatografických testů, Waltersova a Engelhardtova.

Z Waltersova testu bylo zjištěno, že všechny tři použité kolony spadají do první skupiny kolon, které se vyznačují nízkou afinitou k nepolárním sloučeninám a nízkou aktivitou silanolových skupin. V porovnání účinnosti všech tří testovaných kolon je nejúčinnější kolonou XTerra<sup>®</sup> RP18. Zbylé dvě kolony mají účinnost velice podobnou. Hodnoty indexu hydrofobnosti u všech tří kolon jsou srovnatelné s většinou běžných oktadecylových kolon.

Pomocí Engelhardtova testu byly pro zmíněné kolony zjištěny a porovnány charakteristiky jako index polarity, tvarová selektivita a hydrofobnost. Hydrofobnost všech tří kolon odpovídá průměrné hodnotě, uváděné pro oktadecylové stacionární fáze. Nízké hodnoty indexu polarity (menší než 1,3) svědčí o velmi omezené aktivitě silanolových skupin, a tedy vhodnosti pro separace bazických látek. Tvarová selektivita je dána retenčním faktorem ethylbenzenu a toluenu, která je u všech tří kolon podobná. Z Engelhardtových předpokladů můžeme o všech testovaných kolonách říci, že jsou vhodné pro separace bazických látek.

## LITERATURA

- [1] Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004
- [2] Pacáková, V.; Štulík, K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, Praha 1986
- [3] Tesařová, E.; Sýkora, D.; Vosmanská, M.; Zvolánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chemické listy* 101, 190-199 (2007)
- [4] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha 2007
- [5] Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog 2010-2011
- [6] <[http://aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM\\_HPLC\\_3.pdf](http://aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM_HPLC_3.pdf)> [cit. 17. 3. 2010]
- [7] Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormick, A.; Carr, P. W.: Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases, *Journal of Chromatography A* 1028, Part I, 1-30 (2004)
- [8] Jandera, P.; Novotná, K.; Jiša, K.; Beldean-Galea, M. S.: Retention and selektivita tests of silica-based and metal-oxide bonded stationary phases for RP-HPLC, *J. Sep. Sci.*, Vol. 29, 856-871, (2006)
- [9] Cleashes, H. A.; M. A. van Straten; Cramers, C. A.; Jezierska, M.; Buszewski, B.: Comparative study of test methods of reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 826, 135-156 (1998)
- [10] Walters, M. J.: Classification of octadecyl-bonded liquid chromatography columns, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 70, No. 3, 465-469, (1987)
- [11] Engelhardt, H.; Arangio, M.; Lobert, T.: A Chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation, *LC-GC*, Vol. 15, No. 9, 856-862 (1997)
- [12] Krásová, M.: *Bakalářská práce*, Praha 2007
- [13] <[http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_US&cid=51150](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=51150)> [cit. 25. 3. 2010]
- [14] Aguilar, M. I.: *Methods in Molecular Biology, vol. 251, HPLC of Peptides and Proteins, Methods and Protocols*, 2004 Humana Press Inc., Totowa, NJ