

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**STUDIUM CHROMATOGRAFICKÝCH VLASTNOSTÍ
MODERNÍCH REVERZNÍCH KOLON NA BÁZI OXIDU
ZIRKONIČITÉHO**

**EVALUATION OF CHROMATOGRAPHIC PROPERTIES OF MODERN
REVERSED COLUMNS BASED ON ZIRCONIUM DIOXIDE**

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Vypracovala: Miroslava Bursová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Suchánková, Ph.D.

Praha 2007

Prohlášení

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

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

V Praze dne... 8.6.2007.....

.....*Miroslava Bursová*.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí bakalářské práce, RNDr. Janě Suchánkové, Ph. D. za odborné vedení a velkou pomoc při zpracování této práce. Můj dík patří také mé rodině za podporu během studia.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory následujících finančních zdrojů:
GAUK 335/2005/B - CH/ PřF
MŠMT ČR, projekt MSM 0021620857.

Předmětová hesla

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC)

Kolony na bázi oxidu zirkoničitého

Klíčová slova

charakterizace kolon

Waltersův test

Engelhardtův test

Obsah

<u>1. Úvod</u>	7
<u>2. Teoretická část</u>	9
2.1. Stacionární fáze v HPLC.....	9
2.2. Chemické a fyzikální vlastnosti stacionárních fází.....	10
2.3. Oxid zirkoničitý modifikovaný polybutadienem.....	12
2.4. Chromatografické testy.....	14
<u>3. Experimentální část</u>	17
3.1. Použité chemikálie.....	17
3.2. Použité přístroje.....	18
3.3. Příprava vzorků a mobilních fází.....	19
<u>4. Výsledky a diskuse</u>	21
4.1. Waltersův test.....	21
4.2. Engelhardtův test.....	23
4.3. Engelhardtův test s pufrovanou mobilní fází.....	26
<u>5. Závěr</u>	29
<u>6. Seznam použité literatury</u>	31

Seznam zkratek a symbolů

a	přílehlá pološířka v 10 % výšky píku
α	separační faktor
A_s	asymetrický faktor
ACN	acetonitril
b	odlehlá pološířka v 10 % výšky píku
d_p	průměr částice (cm)
DETA	N,N – diethyl – m - toluamid
h	výškový ekvivalent teoretického patra
h_r	redukovaná výška teoretického patra
HP	index hydrofobicity
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
k	retenční faktor
L	délka kolony (cm)
n	počet teoretických pater
n/m	počet teoretických pater na metr
PBD	polybutadien
pK_B	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty zásady
RP- HPLC	reverzní vysokoučinná kapalinová chromatografie
SI	silanolový index, index polarity
Si	křemík
t	teplota (°C)
t_M	mrtvý retenční čas kolony (min)
t_R	retenční čas analytu (min)
UV	ultrafialový
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky (mm)
Zr	zirkonium
ZrO ₂	oxid zirkoničitý

1. Úvod

Chromatografie založena na obrácených fázích se začala rozvíjet v sedmdesátých letech minulého století a přinesla mnoho poznatků o stacionárních fázích, polárních rozpouštědlech a vzájemném vlivu na separaci zkoumaných látek. Jako první účinná stacionární fáze byl vytvořen silikagel, který měl spoustu nesporných výhod. V průběhu používání silikagelu se však vyskytlo několik ne příliš vhodných vlastností, jako je nestabilita povrchu při velmi vysokém nebo naopak nízkém pH a tepelná labilita, které brzdily další chromatografické využití, přestože byl vytvořen velký počet modifikací povrchu silikagelu. Proto se začalo s výzkumem jiných materiálů, které by sloužily jako lepší stacionární fáze. Velká pozornost byla věnována oxidům kovů, konkrétně zirkoniu, titanu, hliníku a v menší míře také thoriu a ceru. Nejúspěšnější z nich se stal oxid zirkoničitý (ZrO_2).

Oxid zirkoničitý je amfoterní materiál se schopností aniontové výměny v neutrálních a kyselých roztocích, a kationtové výměny v alkalickém prostředí [1]. ZrO_2 vykazuje obdivuhodnou stálost v celém rozmezí pH škály a rovněž i schopnost vydržet extrémní teploty a tlaky.

To dovoluje použití kolon z oxidu zirkoničitého pro metody rychlé (fast) HPLC za vyšších teplot. Tyto vlastnosti oxidu zirkoničitého jsou způsobeny naprosto jiným mechanismem probíhajícím na jeho povrchu oproti silikagelu. Tento proces má rovněž několik nevýhod, z nich nejproblematičtější je přítomnost Lewisových kyselin na povrchu zirkonia. Ty na sebe silně adsorbují eluenty nebo i analyty chovající se jako Lewisovy zásady. Proto se skupina odborníků vedená M.P. Rigneyem pokusila připravit a prozkoumat kolonu z oxidu zirkoničitého, kterou úspěšně modifikovali polymerem (polybutadien) [2]. Spojením oxidu zirkoničitého a polymeru vznikl povrch, jenž převzal vlastnosti od obou reagujících látek, a hlavně se alespoň částečně omezila místa Lewisových kyselin.

V dnešní době jsou známy všechny druhy interakcí odehrávající se na povrchu oxidu zirkoničitého. Je prozkoumán jejich chemismus i všechny podmínky za jakých se uskuteční. Rovněž jsou popsány přesné kroky při modifikaci ZrO_2 různými polymery. Díky těmto poznatkům lze říci, že kolony z oxidu zirkoničitého modifikované polymerem se dají použít k separaci všech druhů látek, velmi dobře oddělují proteiny [1,2, 3].

V současné době existuje velké množství firem vyrábějících různé typy kolon s různými modifikacemi, které mají odlišné vlastnosti. Proto je těžké vybrat si správnou

stacionární fázi pro určitou analytickou aplikaci. Z tohoto důvodu byly vytvořeny chromatografické testy, které charakterizují kolony a umožňují srovnání mezi nimi.

Cílem této bakalářské práce bylo studium chování reverzní chromatografické kolony obsahující jako stacionární fázi oxid zirkoničitý modifikovaný polybutadienem. Chromatografické vlastnosti kolony byly zjišťovány pomocí testů (Waltersův a Engelhardtův test), které byly původně vytvořeny pro porovnávání silikagelových kolon. Tyto testy se zaměřují na charakterizaci retenčního mechanismu, na určení převládajícího typu interakcí mezi stacionární fází a různým typem sloučenin (kyselé, zásadité, nepolární). Zabývají se také vlivem složení mobilní fáze na chování testovaných kolon [4,5,6].

Problematikou reverzních kolon, a zejména chromatografickými předpoklady využití kolon z oxidu zirkoničitého pokrytého vrstvou polybutadienu, se zabývalo mnoho vědců. Nejznámějšími z nich jsou J. Nawrocki, J. W. Li a P. M. Carr.

2. Teoretická část

2.1. Stacionární fáze ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Mezi dva základní typy kapalinové chromatografie patří chromatografie s normálními fázemi a chromatografie s obrácenými fázemi nebo-li reverzní chromatografie (reversed-phase chromatography, RP-HPLC) [7]. Od sedmdesátých let minulého století se staly reverzní kolony v systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jednou z nejpoužívanějších analytických metod, ve které se jako mobilní fáze používají polární kapaliny jako např. methanol, acetonitril, voda a jejich směsi. Stacionární fáze je tvořena různými typy nepolárních povrchů [5]. Velkou výhodou RP-HPLC je účinná separace vzorků s velmi rozdílnou polaritou, molekulární hmotností a dalšími chemickými vlastnostmi [1].

Rozmanitost reverzních fází (RP) je způsobena rozdílnými fyzikálními vlastnostmi (např. specifický povrch, průměr pórů aj.) a chemickými vlastnostmi (např. typ a koncentrace ligandu či přítomnost nečistot na povrchu) [5]. Výběrem vhodné mobilní a stacionární fáze lze ovlivnit vzájemné interakce mezi molekulami vzorku a stacionární fáze. Právě na tomto principu je založen chromatografický proces [8].

Velmi účinnou stacionární fází se stal silikagel s chemicky vázanou fází, který vykazoval velkou univerzálnost a vysokou účinnost [5]. Povrch silikagelu je pokryt hydroxylovými skupinami, které jsou polární, a tvoří tedy vodíkové vazby se separovanými látkami. Během výzkumů se zjistilo, že se na povrchu silikagelu objevuje nežádoucí chování např. silná retardace bazických látek [8]. Proto se v osmdesátých letech začaly používat kolony založené na oxidech kovů, mezi něž patří oxid zirkoničitý, oxid hlinitý nebo oxid titaničitý [1].

Aby bylo možno použít v současné době stacionární fázi k analytickým účelům, byly stanoveny určité podmínky a cíle [3]:

- 1) Metoda syntézy částic musí být reprodukovatelná a poskytovat částice s úzkým rozdělením velikosti částic tj. částice musí být monodisperzní, s požadovanou pórovitostí, průměrem pórů a dostatečným specifickým povrchem.
- 2) Kolona musí být vysoce odolná v nepříznivých podmínkách (hlavně vysoké a nízké pH a zvýšená teplota).
- 3) Musí se zlepšit reprodukovatelnost vlastností kolon při porovnávání mezi kolonami z jedné výrobní šarže a mezi šaržemi.
- 4) Částice stacionární fáze by měly mít vlastnosti, které by umožnily co nejrychlejší analýzy.

- 5) Mělo by dojít ke zlepšení retenčních parametrů (šířka píku a symetrie) u kladně či záporně nabitých analytů.
- 6) Kolony by se měly dát použít pro specifické aplikace např. (LC-MS), kde je základní podmínkou dlouhodobá stabilita stacionární fáze.

2.2. Chemické a fyzikální vlastnosti stacionárních fází

Silikagel se považuje za vynikající chromatografickou fázi z mnoha důvodů. Částice jsou monodisperzní, mechanicky odolné a mají velký povrch. Nejvíce užívané silikagelové kolony jsou chemicky vázané fáze pomocí organosilanu. Jsou chemicky stabilní, pokud se hodnota pH mobilní fáze pohybuje v rozmezí 3 až 9, často se uvádí jen 3-7. Když pH poklesne pod 3, kyselina začíná katalyzovat hydrolyzu siloxanu mezi silikagelovým povrchem a organosilanem. Je-li pH vyšší než 9, nedostatečně chráněný silikagelový povrch se začíná rozpouštět a chemicky vázaná fáze je oddělena od povrchu, z čehož vyplývá, že pH větší než 9 způsobuje kolaps kolony a úplnou ztrátu chromatografické účinnosti [3]. Z tohoto důvodu se postupně přechází k jiným typům stacionárních fází, jako například k oxidu zirkoničitému, hlinitému nebo titaničitému, které prokazují mnohem lepší chromatografické vlastnosti ve srovnání silikagelovými kolonami. Kolony z oxidů zmíněných kovů mají delší životnost, která ve výsledku znamená nižší cenu analýzy. Lepší chemická a teplotní stabilita těchto kolon znamená větší možnosti při vývoji analytických metod zejména pro látky bazické povahy. Další výhodou je možnost čištění a regenerace zirkoniových kolon použitím extrémních podmínek (pH nebo vysoké teploty) bez poškození povrchu [9].

Silikagelové kolony jsou obecně stabilní přibližně do teploty 60 °C. Teplotní stabilita ZrO_2 je mnohem vyšší (asi do 200°C), avšak navázáním různých druhů polymerů na povrch ZrO_2 se teplotní odolnost poněkud snižuje. Ze zmiňovaných oxidů je pro přípravu stacionární fáze nejvhodnější oxid zirkoničitý, jehož vlastnosti jsou nejvíce prostudovány. Ve srovnání s ostatními oxidy je ZrO_2 stabilní při pH v rozmezí 1 – 14 [10,11].

Při nízkém pH se silikagel chová jako měnič kationtů, zatímco ZrO_2 se chová amfoterně tj. může měnit kationty nebo anionty podle hodnoty pH mobilní fáze. Další rozdíl mezi silikagelem a ZrO_2 je existence míst s vlastnostmi Lewisových kyselin na povrchu ZrO_2 . Tato místa jsou zodpovědná za schopnost ligandové výměny na oxidu zirkoničitém [3, 12]. Separační mechanismus na fázích na bázi ZrO_2 je založen

na odlišnosti atomu zirkonia (Zr) od atomu křemíku (Si). Výsledkem je, že vazby Zr-O-Zr mají jinou elektronovou konfiguraci. Ionizovatelné analyty interagují s povrchem ZrO₂, zatímco u silikagelu jsou tyto interakce nežádoucí. Atom Zr ve vazbě Zr-O-Zr má volné d-orbitaly, čímž se stává akceptorem elektronového páru. Podle Lewisovy teorie kyselin a zásad se Zr atom chová jako Lewisova kyselina. Schopnost ligandové výměny ZrO₂ vzniká přítomností míst Lewisových kyselin na povrchu ZrO₂, které jsou reprezentovány koordinačně nenasycenými Zr⁴⁺ atomy a dále přítomností molekul vody či jiných ligandů koordinačně vázaných na místa Lewisových kyselin. Mechanismus ligandové výměny byl objasněn pro nemodifikovaný oxid zirkoničitý, ale významně se uplatňuje i na ZrO₂ modifikovaném polymerem. Modifikace přesto nezabraňuje úplnému blokování všech míst Lewisových kyselin na povrchu, a tak modifikovaný ZrO₂ skoro vždy poskytuje smíšený retenční mechanismus [3,9,12].

Koordinačně vázané molekuly vody hrají rovněž důležitou roli při procesu ligandové výměny. Hydroxidový aniont je nejsilnější Lewisova báze, která vytěsňuje ostatní Lewisovy báze z povrchu ZrO₂. Ligandová výměna neprobíhá na silikagelu, protože neobsahuje koordinačně vázanou vodu [3].

Síla interakce Lewisovy báze s místy pevných Lewisových kyselin je závislá na elektronové hustotě a polarizovatelnosti báze. Síla interakce Lewisových bází klesá v řadě: fosforečnan – fluorid – citronan – síran - octan - dusičnan - chlorid. Přítomnost fluoridů nebo fosforečnanů v mobilní fázi zlepšuje separaci vzorků s vlastnostmi bází, protože blokují přítomná místa Lewisových kyselin a Lewisovy báze mohou být děleny mnohem účinněji [1,3, 13].

Pro látky iontové povahy existují sekundární interakce (iontově-výměnné) s povrchem nosiče, které významně ovlivňují selektivitu a retenci analytu. Povrch ZrO₂ je velmi aktivní a sekundární interakce se dají úspěšně použít k optimalizaci separace. Schopnost iontové výměny ZrO₂ je založena na disociaci či protonizaci hydroxylových skupin přítomných na povrchu ZrO₂ v závislosti na pH mobilní fáze. V neutrálním pH se povrch ZrO₂ se negativně nenabíjí a neinteraguje tak s nabitými bázemi pomocí elektrostatických interakcí. ZrO₂ je také stabilní při vysokém pH, při kterém dochází k deprotonizaci nabitých bází, což opět vede k omezení iontové výměny [9,11, 12].

Přítomnost Lewisových bází v mobilní fázi umožňuje separaci kyselých, neutrálních a bazických proteinů na čistém ZrO₂. Retence je kombinací mechanismu iontové výměny a ligandové výměny. Převládající retenční mechanismus je závislý

na použité mobilní fázi, především na jejím pH, typu použitého pufru, iontové síle a množství organického modifikátoru obsaženého v eluentu [9].

Před začátkem experimentů se zirkoniovou kolonou je důležité odstranit oxid uhličitý z mobilní fáze. Oxid uhličitý nebo uhličitany by mohly blokovat místa Lewisových kyselin na povrchu ZrO_2 a změnit tak celkový charakter povrchu [1]. Zirkoniový povrch obsahuje mnoho adsorpčních míst, kde může docházet k iontové a ligandové výměně. V některých případech je nutné počet adsorpčních míst snížit pomocí modifikace. ZrO_2 kolonu lze modifikovat třemi metodami [1,3]:

- 1) Dynamická chemická modifikace: pokud se použije mobilní fáze, která obsahuje silně interagující Lewisovy zásady.
- 2) Permanentní chemická modifikace: nevyužívá se z důvodu malé účinnosti.
- 3) Fyzikální modifikace: pokrytí povrchu oxidu zirkoničitého vrstvou polymeru nebo uhlíku.

2.3. Oxid zirkoničitý modifikovaný PBD

Polymery na stacionárních fázích kombinují vlastnosti samotných oxidů kovů (křemík, zirkonium, hliník, titan) s univerzálností organických polymerů. Jako kombinované materiály mají velkou možnost stát se ideálními chromatografickými povrchy. Jsou mechanicky a chemicky stabilní a mají minimální nespecifickou adsorpci. [15, 16]

Polymery se používají na chemicky nestabilním silikagelu jako ochrana proti agresivním eluentům a k zamezení nežádoucím silanofilním interakcím. Pro více stabilní ZrO_2 se polymery používají ke snížení počtu míst Lewisových kyselin na povrchu a k napodobení polaritý reverzních silikagelových kolon. Například polybutadien se podobá oktylovým nebo oktadecylovým skupinám [9,17].

Oxidy se pokrývají mnoha různými polymery (polybutadien, polystyren, ale i polyether, polysacharidy, polypeptidy a proteiny) [13,14,15]. Jeden z nejvíce používaných polymerů je polybutadien, protože má jedinečné fyzikální vlastnosti jako je ohebnost a trvanlivost. V HPLC se využívá jako povlak silikagelových částic a dává stacionárním fázím stabilitu a účinnost [15,16].

Oxid zirkoničitý modifikovaný polybutadienem (ZrO_2 -PBD) je nejvíce prozkoumaný zirkoniový materiál ze všech zirkoniových kolon. Je úspěšný pro separaci nepolárních a polárních analytů v celém rozsahu pH. Hlavní rozdíl mezi zirkoniovými a silikagelovými stacionárními fázemi je v jejich povrchové chemii. Zatímco různé druhy

silanolových skupin jsou největší komplikace na silikagelových fázích, velký počet míst s vlastnostmi Lewisových kyselin na ZrO_2 povrchu, i když je značná část povrchu pokryta vrstvou PBD, zůstává přístupný pro interakce s analyty typu Lewisových bází a Lewisovými bázemi obsaženými v mobilní fázi [3,9].

Hydrofobní interakce molekul analytů se stacionární fází a iontově–výměnné interakce s adsorbovanou Lewisovou bází lze nazvat smíšeným retenčním módem, který se nejvíce využívá k separaci peptidů

Oxid zirkoničitý modifikovaný různými druhy polymerů má velkou budoucnost jako moderní stacionární fáze. V následující tabulce jsou ukázány hlavní výhody a nevýhody tohoto typu stacionární fáze [9].

Tabulka 1: Výhody a nevýhody silikagelové a zirkoniové stacionární fáze

	Silikagel	ZrO₂
Výhody	<ul style="list-style-type: none"> velký rozsah velikosti částic mnoho typů chemicky vázané fáze známé chemické procesy na povrchu komerční dostupnost 	<ul style="list-style-type: none"> extrémně vysoká teplotní stabilita vysoká stabilita v pH = 1-14 známé chemické procesy na povrchu komerční dostupnost
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> nestabilita při nízkém a vysokém pH malá teplotní stabilita citlivost na anorganické pufrů v neutrálním pH citlivost mobilní fáze na koordinačně vázanou vodu několik druhů silanolových skupin 	<ul style="list-style-type: none"> interakce Lewisova kyselina-Lewisova báze malá velikost částic malý počet výrobců

2.4. Chromatografické testy

Smyslem Waltersova a Engelhardtova testu je pomocí jednoduchých testovacích látek zjistit základní retenční charakteristiky reverzních silikagelových kolon z důvodu velkého množství nominálně identických kolon, které mají odlišné fyzikální a chemické vlastnosti. Zmíněné testy jsou zaměřeny k určení hydrofobní aktivity silanolových skupin v mobilních fázích ACN-voda a methanol-voda [18].

Podle Waltersova testu se dají kolony třídit na základě indexu hydrofobnosti, indexu volných silanolových skupin a účinnosti kolony [4]. Právě tato kritéria pomáhají zvolit si vhodnou kolonu pro danou analytickou aplikaci. Hydrofobní interakce se dají charakterizovat podle poměru retenčních faktorů anthracenu a benzenu v mobilní fázi acetonitril- voda (65:35 v/v). Aktivita silanolových skupin je vyjádřena poměrem retenčních faktorů N,N – dimethyl –m- toluamidu a anthracenu v čistém acetonitrilu. Účinnost kolony, která závisí na velikosti částic a účinnosti naplnění, se určuje z chromatografických údajů toluenu.

Všechny retenční časy testovaných látek byly vypočítány podle vzorce (1):

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

kde k označuje retenční faktor, t_R – retenční čas analytu a t_M označuje mrtvý retenční čas uracilu.

Index hydrofobnosti lze vyjádřit na základě vztahu (2):

$$\text{HP index} = \frac{k(\text{antracen})}{k(\text{benzen})} \quad (2)$$

a index volných silanolových skupin podle vztahu (3):

$$\text{SiOH index} = \frac{k(\text{DETA})}{k(\text{antracen})} \quad (3)$$

Pro zjištění účinnosti kolony slouží retenční čas toluenu a šířka jeho píku v polovině výšky, jak je vidět ze vztahu (4):

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

kde n vyjadřuje počet teoretických pater a $w_{1/2}$ šířku v polovině píku.

Účinnost kolony je rovněž charakterizována výškovým ekvivalentem teoretického patra h , který dovoluje porovnávat účinnost kolon s různou délkou. Výškový ekvivalent teoretického patra lze vyjádřit vztahem (5) :

$$h = \frac{L}{n} \quad (5)$$

kde L je délka kolony.

Pro lepší hodnocení účinnosti mezi kolonami byl vytvořen vztah (6):

$$\frac{n}{m} = \frac{n \cdot 100}{L} \quad (6)$$

kde n / m vyjadřuje vztah počtu pater na 1 metr kolony.

Poslední rovnice popisující účinnost kolony je dána vztahem (7):

$$h_r = \frac{h}{d_p} \quad (7)$$

kde h_r označuje redukovanou výšku teoretického patra a d_p je průměr částice.

Engelhardt a jeho kolegové se pokusili vytvořit standardní test pro reverzní kolony. Stanovili takové podmínky, aby chemikálie použité v testu byly v laboratoři běžně postupné a aby bylo možné ukázat rozdíly mezi jednotlivými stacionárními fázemi [5,6]. Chromatografické kolony jsou podle Engelhardta charakterizovány účinností (počet teoretických pater), hydrofobními vlastnostmi, silanofilními interakcemi (chování bazických látek). Dále se může určit tvarová selektivita (důležitá pouze při separaci polyaromatických uhlovodíků) a obsah kovů (pokud se separují analyty s komplexotvornými vlastnostmi). Hydrofobní vlastnosti jsou určovány z retenčních časů, respektive z poměru retenčních faktorů toluenu a ethylbenzenu. Fenol je používán jako neutrální látka pro kontrolu rozsahu polárních interakcí. Různě silné báze, tj. anilin, toluidiny a N, N-dimethylanilin, slouží k určení rozsahu silanofilních interakcí. Určil se používá jako inertní látka k určení mrtvého času [5, 6].

V Engelhardtově testu se pracuje s veličinami, z nichž za nejdůležitější se považují separační a asymetrický faktor [5, 6]. Separační faktor α , který udává selektivitu systému a je dán rovnicí (8):

$$\alpha = \frac{k(\text{ethylbenzen})}{k(\text{toluen})} \quad (8)$$

Asymetrický faktor A_s charakterizuje tvar píku a je definován vztahem (9):

$$A_s = \left(\frac{b}{a} \right) \quad (9)$$

kde a je pološířka v 10 % výšky části píku přilehlé k těžisti píku, b je pološířka v 10 % výšky píku odlehlá od těžiště píku.

Claessens a kol. navrhl úpravu Engelhardtova testu ve smyslu určování indexu hydrofobnosti. Poměr retenčních faktorů toluenu a ethylbenzenu ve skutečnosti vypovídá o hydrofobní selektivitě, schopnosti dělit látky lišící se methylenovou skupinou jako toluen a ethylbenzen. Claessens navrhl jako ukazatel míry hydrofobnosti stacionární fáze použití retenčního faktoru nepolární látky, konkrétně ethylbenzenu [19].

Pomocí Waltersova a Engelhardtova testu nelze určit rozsah silanofilních interakcí na koloně Discovery ZrO₂ – PBD, protože tato kolona neobsahuje silanolové skupiny. Místo k určení silanolového indexu lze test použít na této koloně k určení rozsahu polárních interakcí, k určení indexu polarity.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie:

Použité chemikálie pro Waltersův a Engelhardtův test jsou uvedeny v následujících tabulkách 2 a 3. Další chemikálie potřebné pro provedení testů jsou v tabulce 4.

Tabulka 2: Chemikálie pro Waltersův test

Chemikálie	Čistota	Výrobce
anthracen	purum (> 98 %, HPLC)	Fluka Chemie AG (Busch, Švýcarsko)
benzen	HPLC grade	Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA)
N,N-diethyl-m-toluamid	purum (99 %, GC)	Fluka Chemie AG
toluen	p.a.	Lachema (Brno, ČR)
uracil	99 %	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tabulka 3: Seznam chemikálií potřebných pro Engelhardtův test

Chemikálie	Čistota	Výrobce
anilin	99,5 + %	A.C.S. REAGENT, Aldrich
ethylbenzen	99 %	Aldrich
fenol	p.a.	Ing. Petr Švarc, PENTA (Chrudim, ČR)
N,N- dimethylanilin	čistý	Lachema
<i>m</i> -toluidin	99 + %	Aldrich
<i>o</i> -toluidin	99 + %	Aldrich
<i>p</i> - toluidin	99 + %	Aldrich
toluen	HPLC grade	Aldrich
uracil	99 %	Sigma Aldrich

Tabulka 4: Další chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
acetonitril (Chromasolv® pro HPLC)	gradient grade	Sigma Aldrich
methanol (Chromasolv® pro HPLC)	gradient grade	Sigma Aldrich
deionizovaná voda		Milli Q, Millipore (Milford, USA)
dihydrogenfosforečnan sodný NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	p.a.	Ing. Petr Švarc, PENTA
hydroxid sodný NaOH	p.a.	Lach/Ner (Neratovice, ČR)

3.2. Použité přístroje

V experimentech byla charakterizována kolona Discovery Zr- PBD od firmy Supelco Park (Bellefonte, PA 16823-0048 USA) s rozměry 25 cm x 4,6 mm a velikostí částic 5 μm . Kolona byla skladována v mobilní fázi složené z 50 % acetonitrilu a 50 % deionizované vody.

Pro Waltersův a Engelhardtův test byl použit kapalinový chromatograf Unicam s pumpou LC – XPD pump od firmy Pye UNICAM (Cambridge, Velká Británie) a jako detektor LC-UV detector PYE UNICAM, který byl nastaven na vlnovou délku 254 nm. K dávkování vzorku byl použit ventil Rheodyne (Cotati, California, USA) model 7725 i s dávkovací smyčkou 10 μl .

Při Engerhardtově testu byla kolona vložena do termostatu COLUMN OVEN LCO 101 (ECOM Praha, ČR) a teplota byla nastavena na 40 $^{\circ}\text{C}$ z důvodu snížení viskozity mobilní fáze, aby bylo možno použít průtok mobilní fáze 1 ml/min. Pro Engelhardtův test s 10 mM fosforečnanovým pufrům byl použit kapalinový chromatograf složený z gradientového čerpadla Beta Gradient pump, odplyňovače mobilní fáze DG 3014, UV detektoru Sapphire-variable wavelegh detector, který měřil odezvu při vlnové délce 254 nm. Všechny přístroje byly od firmy ECOM (Praha, ČR). Dávkování bylo prováděno dávkovacím ventilem Rheodyne (Cotati, California, USA) model 7725; s dávkovací smyčkou 5 μl . Průtok byl nastaven na hodnotu 1 ml/ min.

Ke sběru a vyhodnocení dat byly použity počítačové programy CSW32 a Clarity od firmy Data Apex (ČR). Pro grafickou prezentaci naměřených dat byl použit program Microcal Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA)

3.3. Příprava vzorků a mobilních fází

Příprava zásobních roztoků testovacích látek, které byly použity ve Waltersově testu, a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Příprava a koncentrace zásobních roztoků vzorků pro Waltersův test.

Chemikálie	Příprava zásobního roztoku vzorku	Koncentrace
Anthracen	10 mg anthracenu do 50 ml čistého acetonitrilu	0,2 g/l
N,N- diethyl- m toluamid	0,1 ml DETA do 100 ml čistého acetonitrilu	1 g/l
Benzen	2 ml benzenu do 100 ml mobilní fáze (65:35 v/v ACN- voda)	17,5 g/l
Toluen	0,2 ml toluenu do 100 ml mobilní fáze	1,7 g/l
Uracil	1,5 mg uracilu do 100 ml mobilní fáze	15,0 mg/l

Z roztoků uracilu, benzenu, toluenu a anthracenu byla připravena směs. Vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 5 °C. Dávkování bylo prováděno 25 µl injekční stříkačkou od firmy Hamilton, USA.

Pro první část testu (test polarity) byl použit jako mobilní fáze čistý acetonitril, který byl odplyněn více jak 10 minut v ultrazvukové lázni Ultrasonic LC30H (Elma, ČR).

V další části testu (test hydrofobnosti) byla mobilní fáze složena z acetonitrilu a deionizované vody v poměru 65:35 v/v ACN-voda . Mobilní fáze byla rovněž odplyněna v ultrazvuku.

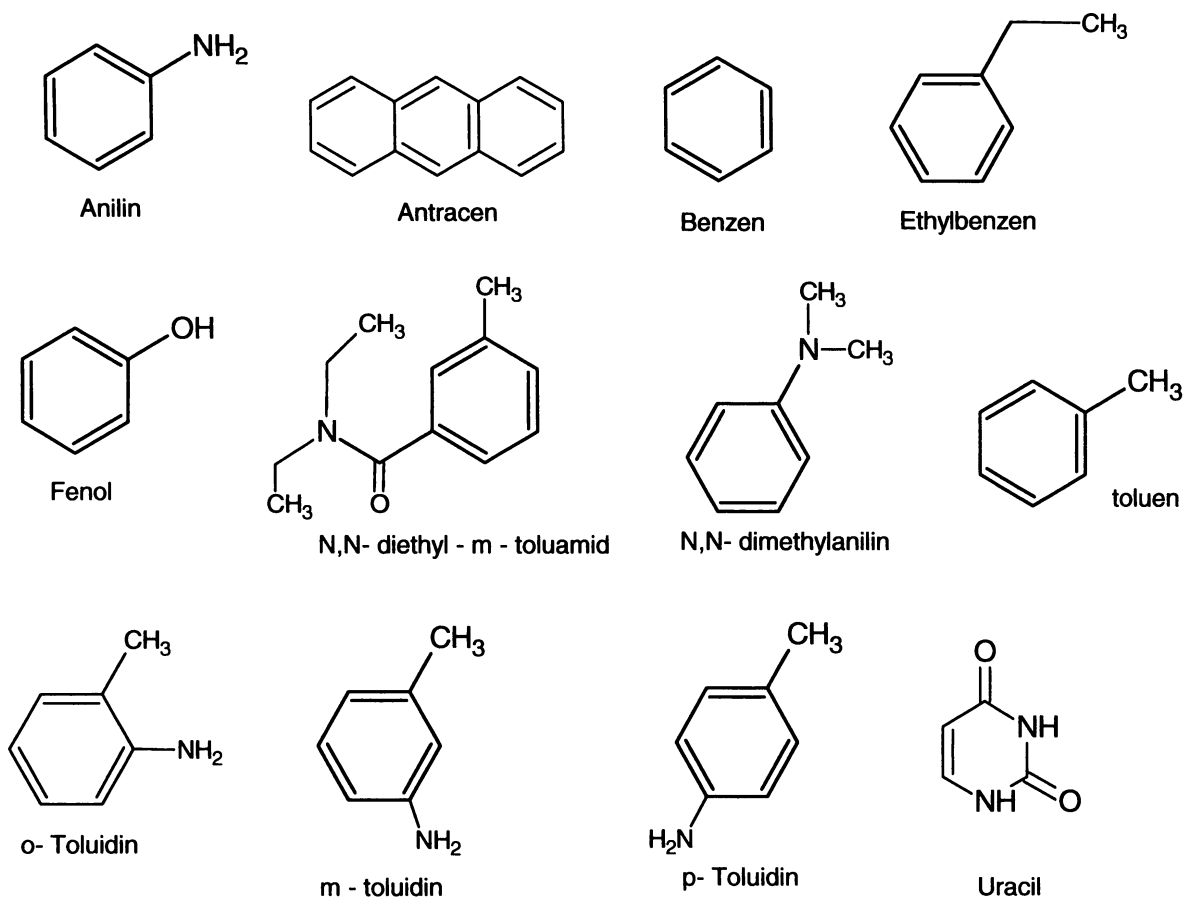
Příprava zásobních roztoků testovacích látek, které byly použity v Engelhardtově testu, a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 6.

Mobilní fáze byla připravena z methanolu a deionizované vody v poměru 55:45 v/v. Pro Engelhardtův test s pufrovanou mobilní fází byla vytvořena mobilní fáze složena z 55:45 v/v methanol- 10 mM fosforečnanový pufr. Pufr byl připraven rozpuštěním 0,7800 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O, který byl odvážen na analytických vahách APX- 100, Denver Instrument (USA). Dihydrogenfosforečnan byl rozpuštěn 0,5 l deionizované vody, aby koncentrace roztoku byla 10 mM. pH pufru bylo upraveno na hodnotu 6 pomocí 1 M roztoku NaOH a kontrolováno pH metrem 3510 pH meter od firmy Jenway (Velká Británie).

Na obr. 1 jsou uvedeny struktury všech chemických sloučenin použitých ve Waltersově a Engelhardtově testu k charakterizaci kolony.

Tabulka 6: Příprava a koncentrace zásobních roztoků pro Engelhardtův test.

Chemikálie	Příprava zásobních roztoku vzorku	Koncentrace
anilin	12,3 μ l anilinu do 50 ml mobilní fáze (55:45 v/v methanol- voda)	0,5 g/l
ethylbenzen	53 μ l ethylbenzenu do 50 ml mobilní fáze	1 g/l
fenol	0,005 g fenolu do 50 ml mobilní fáze	0,1 g/l
N,N- dimethylanilin	10,5 μ l N,N- dimethylanilinu do 50 ml mobilní fáze	0,2 g/l
<i>m</i> -toluidin	5 μ l <i>m</i> -toluidinu do 50 ml mobilní fáze	0,1 g/l
<i>o</i> -toluidin	5 μ l <i>o</i> -toluidinu do 50 ml mobilní fáze	0,1 g/l
<i>p</i> -toluidin	5 μ l <i>p</i> -toluidinu do 50 ml mobilní fáze	0,1 g/l
toluen	57,8 μ l toluenu do 50 ml mobilní fáze	1 g/l
uracil	1,5 mg uracilu do 100 ml mobilní fáze	15,0 mg/l



Obr. 1: Struktury látek používaných ve Waltersově a Engelhardtově testu.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Waltersův test

Proměřením Waltersova testu byly získány retenční časy anthracenu a N, N-diethyl-m-toluamidu (DETA) v mobilní fázi tvořené čistým acetonitrilem. Z těchto dat byl vypočítán SiOH index jako podíl retenčních faktorů anthracenu a N, N-diethyltoluamidu. Mrtvý retenční čas byl určen pomocí uracilu a měl hodnotu 2,58 min. Volné silanolové skupiny se ale v charakterizované koloně Discovery Zr-PBD nevyskytují, proto SiOH index bude nadále označován jako index polarity.

V mobilní fázi složené z 65:35 v/v ACN-deionizované vody byly změřeny retenční časy uracilu, benzenu, toluenu a ethylbenzenu. Uracil, benzen a toluen posloužily k výpočtu indexu hydrofobnosti. Z retenčního času toluenu, šířky jeho píku v polovině výšky, délky kolony a průměru částic stacionární fáze byla určena účinnost kolony s využitím vztahů (4 - 7).

Výsledky získané pomocí Waltersova testu jsou shrnuty v tabulkách 7 a 8.

Tabulka 7: Vypočítané hodnoty retenčních faktorů, indexu hydrofobnosti a indexu polarity

analyt	k – retenční faktor	Index hydrofobnosti
anthracen	0,57	25,3
benzen	0,02	

analyt	k – retenční faktor	Index polarity
anthracen	0,04	3,7
DETA	0,15	

Index hydrofobnosti u Discovery Zr-PBD kolony je 25,3. Tato hodnota je velmi vysoká v porovnání s výsledky silikagelových kolon uvedených v literatuře [3], kde jsou hodnoty v rozmezí od 3,5 do 4,5. Tento velký rozdíl je způsoben koelucí benzenu s uracilem, tedy elucí benzenu v mrtvém čase.

Hodnota indexu polarity u ZrO₂-PBD je 3,7. U silikagelových kolon je hodnota nižší, údaje v literatuře se pohybují v rozmezí (0,5 – 1,4), což může být způsobeno jiným typem vzájemných polárních interakcí (ligandová výměna, iontová výměna) mezi zkoumanými látkami a zirkoniovou kolonou.

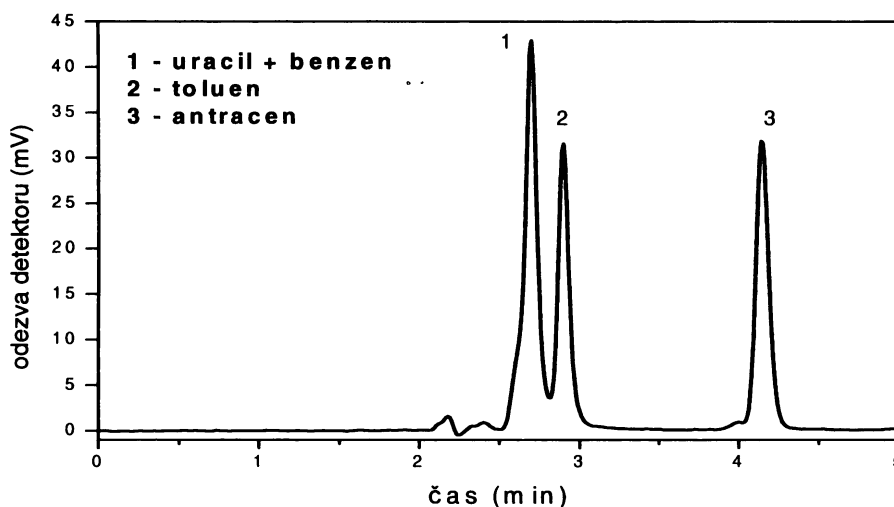
Z retenčních faktorů DETA a anthracenu můžeme vidět, že oba analyty strávily méně času ve stacionární fázi než v mobilní fázi.

Tabulka 8: Vypočítané hodnoty k určení účinnosti kolony.

retenční čas toluenu t_R (s)	174,6
šířka píku v polovině výšky $w_{1/2}$ (mm)	4
počet teoretických pater n	10 555
počet teoretických pater na metr n / m	42 222
délka kolony L (cm)	25
výškový ekvivalent teoretického patra h (μm)	24
průměrný průměr částice d_p (μm)	5
redukováná výška teoretického patra h_r	4,8

Porovnáním účinností kolony Discovery Zr-PBD se silikagelovými kolonami testovaných Waltersovým testem lze usoudit, že účinnost Discovery kolony je srovnatelná s oktadecylovými stacionárními fázemi, kdy se průměrná hodnota n/m pohybuje kolem 50 000.

Na obr. 2 je znázorněna separace testovacích látek Waltersova testu hydrofobnosti.



Obr. 2: Separace testovacích látek Waltersova testu hydrofobnosti. Kolona Discovery Zr- PBD; mobilní fáze (65:35 v/v) ACN - voda; průtoková rychlost 1 ml/min; detekce při 254 nm; $t = 25^\circ\text{C}$; dávkování 10 μl

Zadržování nepolárních molekul roste se zvyšující se molekulovou hmotností, takže látky eluují v pořadí benzen, toluen, anthracen [3], což odpovídá stejnému pořadí jako na oktadecylové silikagelové koloně. Uracil a benzen eluují v jednom píku na ZrO_2 koloně. Na chromatogramu je vidět, že se některé analyzované látky neoddělily na základní linii. K retenci anthracenu mohou významně přispívat interakce planární

polyaromatické struktury (benzenového jádra) s organickým polymerem (polybutadienem) na ZrO₂ stacionární fázi [18].

Podle podmínek ve Waltersově testu nelze kolonu Discovery Zr-PBD zařadit do žádné ze skupin silikagelových kolon, protože výsledky jednotlivých indexů se v porovnání s výsledky u silikagelových kolon výrazně liší.

4.2. Engelhardtův test

Engelhardtův test charakterizuje stacionární fázi z hlediska hydrofobnosti a aktivity volných silanolových skupin. Jak již bylo zmíněno v předešlé části, pro zirkoniovou kolonu místo aktivity silanolů již vyhodnocen index polarity.

Engelhardtova testovací směs obsahuje toluen a ethylbenzen pro vyhodnocení kolonové hydrofobnosti, fenol jako neutrální značkovací polárních interakcí, anilin jako slabou bázi a N, N- dimethylanilin jako silnou bázi pro určení rozsahu silanofilních interakcí. Tři izomerní toluidiny se používají jako speciální ukazatele silanofilních interakcí, protože jsou mnohem citlivější než silné báze [5,9].

Jako mobilní fáze byla v Engelhardtově testu použita směs methanolu a vody v objemovém poměru 55:45 v/v. Methanol se liší proti acetonitrilu kromě polarity také v toxicitě, je totiž méně toxický než acetonitril. Testování kolony bylo prováděno při 40 °C z důvodu větší reprodukovatelnosti naměřených dat v porovnání s laboratorní teplotou. Použití zvýšené teploty navíc přináší výhodu v podobě snížení viskozity mobilní fáze.

Reverzní silikagelové stacionární fáze, které se považují dle výsledků Engelhardtova testu za dobré, by měly splňovat následující podmínky [5,9]:

- 1) Anilin je vždy eluován před fenolem. V některých případech fenol může eluovat s anilinem současně.
- 2) Vzájemný poměr mezi asymetrií anilinového a fenolového píku je vždy nižší než 1,3.
- 3) Tři izomerní toluidiny mající stejnou hydrofobnost ale lišící se svojí bazicitou, eluují se symetrickými píky a na „dobré koloně“ nedochází k jejich separaci.
- 4) N,N – dimethylanilin eluuje dříve než toluen.

Pokud jsou splněny první dvě podmínky, pak se kolona hodí pro dělení bazických analytů. [5, 9]. Výsledky Engelhardtova testu jsou shrnuty v tabulce 9, 10 a 11.

Tabulka 9: Vypočítané hodnoty retenčních faktorů u Engelhardtova testu

analyt	<i>k</i> – retenční faktor
uracil	0
anilin	0,01
fenol	0,04
<i>o</i> -toluidin	0,05
<i>m</i> -toluidin	0,08
<i>p</i> -toluidin	0,13
N,N-dimethylanilin	0,71
toluen	1,21
ethylbenzen	2,24

Tabulka 10: Účinnost kolony

retenční čas toluenu t_R (s)	342
šířka píku v polovině výšky $w_{1/2}$ (mm)	3
počet teoretických pater n	72 063
počet teoretických pater na metr n / m	288251
délka kolony L (cm)	25
výškový ekvivalent teoretického patra h (μm)	3,5
průměrný průměr částice d_p (μm)	5
redukovaná výška teoretického patra h_r	0,7

Tabulka 11: Vypočítaná hodnota tvarové selektivity a asymetrických faktorů.

analyt	retenční faktor <i>k</i>	Tvarová selektivita α
toluen	1,21	1,85
ethylbenzen	2,24	

analyt	retenční faktor <i>k</i>	asymetrický faktor A_S	A_S (anilin) / A_S (fenol)
anilin	0,01	0,8	0,5
fenol	0,04	1,5	

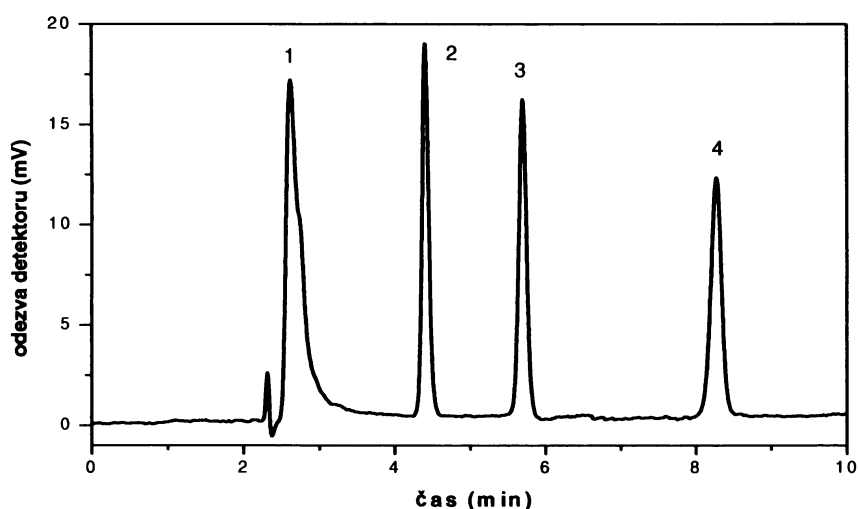
Podle retenčních faktorů uvedených v tabulce 9 můžeme vidět, že nejprve probíhá eluce anilinu (slabá báze), v těsném závěsu se separuje fenol, který má polární vlastnosti, ale je neutrální. První podmínka z výše uvedených bodů je tedy splněna. Následují toluidiny s velmi blízkými hodnotami, což potvrzuje třetí podmínku pro dobrou kolonu. Nejsilnější bázi je N,N- dimethylanilin, jenž eluuje jako poslední ze zásad. Jako poslední se uvolňují nepolární toluen a ethylbenzen, které na rozdíl od bazických sloučenin strávily ve stacionární fázi delší dobu než ve fázi mobilní ($k > 1$).

Z retenčních faktorů můžeme pozorovat, že bazické látky elují podle vzrůstající bazicity. Nejlépe je tento jev vidět u *o*-toluidinu ($pK_B = 9,56$), který je v koloně méně zadržován než *p*-toluidin ($pK_B = 8,92$).

K testování hydrofobních vlastností kolony se používá poměr retenčních faktorů ethylbenzenu a toluenu, ale tento vztah spíše popisuje tvarovou selektivitu pro methylenovou skupinu. Hydrofobnost se lépe vyjádří retenčním faktorem ethylbenzenu, jak to bylo navrženo Claessensem [19]. U zkoumané stacionární fáze je index hydrofobnosti roven 2,24. Retenční faktor ethylbenzenu je nižší než hodnoty u oktylových silikagelových kolon (Hodnoty se pohybují v rozmezí 3 až 6.). Tvarová selektivita zkoumané kolony je 1,85, což odpovídá oktadecylovým silikagelovým kolonám.

Index polarity je u zkoumané kolony vyjádřen poměrem asymetrie píku anilinu a fenolu, jeho hodnota je 0,5, což splňuje podmínku, že hodnota tohoto poměru by neměla přesáhnout hodnotu 1,3.

Na obr. 3 je ukázána separace silné báze N, N – dimethylanilinu a nepolárních analytů toluenu a ethylbenzenu. Toluidiny, anilin a fenol byly měřeny samostatně z důvodu retence velice blízké mrtvému času.



Obr. 3: Separace testovacích látek Engelhardtova testu (1- uracil, 2 - N,N- dimethylanilin, 3 - toluen, 4 – ethylbenzen). Kolona Discovery Zr- PBD; mobilní fáze (55:45 v/v) methanol - voda; průtoková rychlost 1 ml/min; detekce při 254 nm; t= 40°C; dávkování 10 µl.

Z uvedených výsledků vyplývá, že stacionární fáze kolony Discovery Zr- PBD je vhodná pro separaci látek bazického charakteru, protože splnila všechny určené podmínky pro „dobrou“ kolonu podle Engelhardta.

4.3. Engelhardtův test s pufrovanou mobilní fází

Pro tento test byla použita stejná testovací směs jako u předešlého testu. Mobilní fáze byla připravena z methanolu, ale místo deionizované vody byl použit fosforečnanový pufr. Pufr měl koncentraci 10 mM a pH upraveno na hodnotu 6 pomocí hydroxidu sodného. pH 6 odpovídá změřenému pH deionizované vody.

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv silné Lewisovy báze v mobilní fázi na chování testovacích látek. V tabulce číslo 12 a 13 jsou uvedeny výsledky Engelhardtova testu.

Tabulka 12: Vypočítané hodnoty retenčních faktorů

analyt	<i>k</i> - retenční faktor
uracil	0
fenol	0,00
anilin	0,06
<i>o</i> -toluidin	0,07
<i>m</i> -toluidin	0,13
<i>p</i> -toluidin	0,25
N,N-dimethylanilin	0,48
toluen	0,73
ethylbenzen	1,25

Tabulka 13: Vypočítaná hodnota separačního faktoru a asymetrických faktorů.

analyt	retenční faktor <i>k</i>	Tvarová selektivita α
toluen	0,73	1,7
ethylbenzen	1,25	

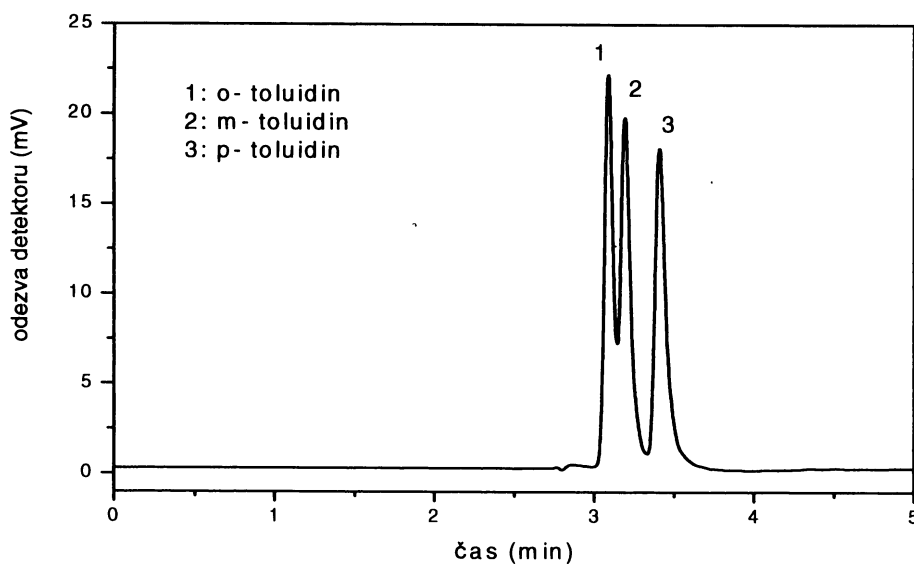
analyt	retenční faktor <i>k</i>	asymetrický faktor A_S	A_S (anilin) / A_S (fenol)
anilin	0,06	2	1,7
fenol	0,00	1,2	

Použitím pufrované mobilní fáze došlo k přehození elučního pořadí anilinu a fenolu. Použitím pufru fenol eluluje před anilinem. Anilin má v aminové skupině volný elektronový pár, který má slabé zásadité vlastnosti podle Lewisovy teorie, a proto byl na koloně zadržen déle. V porovnání mezi pufrovanou a nepufrovanou mobilní fází pozorujeme, že retenční faktory *m*-toluidinu, *p*-toluidinu a anilinu v pufrovaném prostředí jsou přibližně dvojnásobné než u nepufrované mobilní fáze. Naopak u fenolu, N,N-dimethylanilinu, toluenu a ethylbenzenu došlo k výraznému snížení. Retenční faktor *o*-toluidinu se výrazně nezměnil.

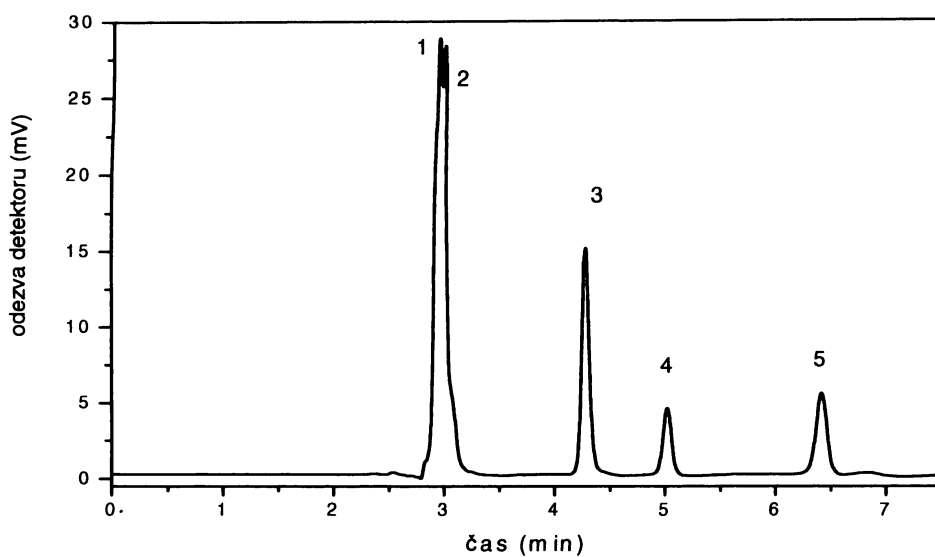
Index hydrofobnosti (retenční faktor ethylbenzenu) má hodnotu 1,25 v pufrované mobilní fázi, zatímco v nepufrované mobilní fázi je index přibližně dvakrát vyšší. Na indexu hydrofobnosti můžeme pozorovat jaký vliv má silná Lewisova báze v mobilní fázi na zadržování uhlovodíků.

Pomocí pufru bylo možno separovat směs toluidinů, jak je vidět na obrázku číslo 4. Na obr. 5 je ukázán chromatogram Engelhardtovy směsi testovacích látek v pufrované mobilní fázi.

Také byl zkoušen vliv zvýšení iontové síly mobilní fáze. Byla připravena mobilní fáze složená z 55:45 v/v methanol-20 mM fosforečnanový pufr o pH 6. Výsledky byly velmi podobné hodnotám získaných v 10 mM pufru, proto se s touto mobilní fází dále nepracovalo.



Obr.4: Separace směsi toluidinů. Kolona Discovery Zr- PBD; mobilní fáze (55:45 v/v) methanol – 10 mM fosforečnanový pufr; průtoková rychlost 1 ml/min; detekce při 254 nm; t= 40 °C; dávkování 5 µl.



Obr.5: Separace Engelhardtovy směsi testovaných látek (1 – uracil, 2- anilin, 3- N,N- dimethylanilin, 4- toluen, 5- ethylbenzen). Kolona Discovery Zr- PBD; mobilní fáze (55:45 v/v) methanol – 10 mM fosforečnanový pufr; průtoková rychlost 1 ml/min; detekce při 254 nm; t= 40 °C; dávkování 5 μ l.

5. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium chromatografických vlastností moderní reverzní kolony na bázi oxidu zirkoničitého – kolony Discovery Zr-PBD. Tato kolona obsahuje jako stacionární fázi oxid zirkoničitý modifikovaný polybutadienem. Kolona je považována za výbornou alternativu silikagelových kolon pokud je nutná separace za extrémních podmínek, které vyžadují vysoké teploty nebo kyselé či bazické pH.

Chromatografické vlastnosti byly zkoumány pomocí dvou testů (Waltersův a Engelhardtův test), které byly vytvořeny pro silikagelové kolony. Tyto testy zjišťují základní parametry kolony jako jsou hydrofobní a silanofilní interakce a účinnost kolony.

Výsledky Waltersova testu ukázaly, že hodnoty indexu polaritity a indexu hydrofobnosti jsou mnohem vyšší než odpovídají silikagelovým kolonám. Je to způsobeno tím, že na modifikované zirkoniové koloně probíhá jiný retenční mechanismus než na silikagelovém povrchu.

Účinnost kolony, vyjádřená počtem teoretických pater, odpovídá u Zr- PBD kolony středně účinným silikagelovým kolonám modifikovaným oktadecylem. Redukovaná výška teoretického patra vychází nepatrně vyšší než doporučený interval 2,5 – 4. Přesto zjištěná hodnota vypovídá o dobré kvalitě naplnění testované kolony. Vyšší hodnota redukované výšky teoretického patra je pravděpodobně způsobena menší velikostí částic oxidu zirkoničitého (5 μm) oproti silikagelovým částicím (10 μm), pro které byl získán výše uvedený doporučený interval.

Engelhardtův test dokazuje, že kolona Discovery Zr –PBD je vhodná pro dělení bazických analytů, protože splňuje všechny podmínky pro „dobrou“ kolonu. To znamená, že anilin je vždy eluován před fenolem, vzájemný poměr mezi asymetrií anilinového a fenolového píku je vždy nižší než 1,3 a N,N – dimethylanilin eluuje dříve než toluen.

Z testů lze odvodit, že zirkoniová kolona pracuje stejně dobře v mobilní fázi ACN-voda jako methanol – voda.

Kolona Discovery Zr- PBD vykazuje podobné retenční chování jako oktadecylové kolony pouze pro nepolární látky. U polárních a bazických sloučenin probíhá separace jiným způsobem, a právě díky tomu je Discovery Zr- PBD považována za vhodnou alternativu k silikagelovým stacionárním fázím.

6. Seznam použité literatury

- 1) Nawrocki, J. et al.: Chemistry of Zirconia and its Use in Chromatography. J. Chromatogr. A, 657 (1993) 229 – 282
- 2) Rigney, M.; Weber, T. P.; Carr, P.W.: Preparation and evaluation of a polymer – coated zirconia reversed – phase chromatographic support, J. Chromatogr. A, 484 (1989) 273- 291
- 3) Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormic, A.; Carr, P.W.: Part I. Chromatography Using Ultra – Stable Metal Oxide – Based Stationary Phases for HPLC. J. Chromatogr. A, 1028 (2004) 1 – 30
- 4) Walters, M.J.: Chromatographic instrumentation : Classification of octadecyl – bonded liquid chromatography columns. Anal. Chem., 70(3) (1987) 465 – 469
- 5) Engelhardt, H.; Jungheim, M.: Comparison and characterization of reversed phases. Chromatographia, 29 (1/2) (1990) 59 – 68
- 6) Engelhardt, H.; Arangio, M. et al: A chromatographic test procedure for reversed- phase HPLC columns evaluation. LC-GC, 15(9) (1997) 856 – 867
- 7) Štulík, K. a kol.: Analytické separační metody, 1.vyd. Praha, Karolinum 2004, str. 141
- 8) Holzbecher, Z., Churáček, J. a kol.: Analytická chemie, 1.vyd. Praha, SNTL/ALFA 1984, str. 256
- 9) Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormic, A.; Carr, P.W.: Part II.. Chromatography Using Ultra – Stable Metal Oxide – Based Stationary Phases for HPLC. J. Chromatogr. A, 1028 (2004) 31 - 62
- 10) Li, J.; Carr, P.W.: Retention characteristics of polybutadiene – coated zirconia and comparison to conventional bonded phases. Anal. Chem., 68 (1996) 2857 – 2868
- 11) Li, J.; Carr, P.W.: A study of the efficiency of polybutadiene – coated zirconia as a reversed – phase chromatographic support. Anal. Chem., 69 (1997) 2193 – 2201
- 12) Yang, X., J.; Carr, P.W.: Analysis and Critical Comparison of the Reversed – phase and Ion – exchange contribution to Retention on Polybutadiene Coated Zirconia and Octadecyl Silane Bonded Silica Phases. J. Chromatogr. A, 996 (2003) 13 – 31
- 13) Zhao, J.; Carr, P.W.: A Comparative Study of the Chromatographic Selectivity of Polystyrene- Coated Zirconia and Related Reversed – Phase Materials. Anal. Chem., 72 (2000) 302 – 309
- 14) Zhao, J.; Carr, P.W.: Synthesis and Evaluation of an Aromatic Polymer – coated Zirconia for Reversed – Phase Liquid Chromatography. Anal Chem., 71 (1999) 5217 – 5224

- 15) Lopes, N.P. et al.: Influence of air on polybutadiene used in the preparation of stationary phases for high – performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 231 – 236
- 16) Li, J.; Reeder, D. et al.: Factors influencing polybutadiene deposition within porous chromatographic zirconia. *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 45 – 52
- 17) Hu, Y.; Yang, X., J.; Carr, P.W.: Mixed – mode Reversed – phase and Ion – exchange Separations of Cationic Analytes on Polybutdiene – coated Zirconia. *J.Chromatogr. A*, 968 (2002) 17 – 29
- 18) Jandera, P. et al.: Retention and selectivity tests of silica – based and metal – oxide bonded stationary phases for RP- HPLC. *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 856 – 871
- 19) Claessens, H.A.; van Straten, M.; Cramers, C. A.; Jezierska, M.; Buszewski, B.: *J. Chromatogr. A*, 826 (1998) 135.
- 20) Li, J.; Carr, P.W.: Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene – coated Zirconia. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2202 - 2206