

255

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie



# Zirkoniové stacionární fáze pro HPLC

**Bakalářská práce**

Chemie životního prostředí

Monika Pospíšilová

Školitel: RNDr. Jana Suchánková, PhD.

Praha 2007

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233146097

Za odborné vedení a pomoc při zpracování děkuji své školitelce RNDr. Janě Suchánkové, PhD. Dále děkuji Bc. Tomáši Koubovi za cenné rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za veškerou podporu v průběhu studia.

Tato práce vznikla za částečné finanční podpory projektu MŠMT ČR MSM 0021620857.

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

Praha, 29.5.2007

Monika Pospíšilová

A handwritten signature in black ink, reading 'Monika Pospíšilová', written in a cursive style.

## Obsah

<b>1. Seznam zkratk</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Moderní stacionární fáze pro HPLC a jejich chemická a teplotní stabilita</b> .....	<b>9</b>
4.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu .....	9
4.2. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého .....	10
4.3. Srovnání vlastností a stability fází na bázi oxidu zirkoničitého a silikagelu .....	11
<b>5. Modifikace povrchu oxidu zirkoničitého</b> .....	<b>14</b>
<b>6. Chemie povrchu ZrO<sub>2</sub> pro chromatografii</b> .....	<b>16</b>
6.1. Iontová výměna na povrchu ZrO <sub>2</sub> .....	17
6.2. Ligandová výměna na povrchu ZrO <sub>2</sub> .....	18
6.3. Retence na povrchu ZrO <sub>2</sub> .....	19
<b>7. Příklady použití stacionárních fází na bázi ZrO<sub>2</sub> v praxi</b> .....	<b>22</b>
7.1. Separace ibuprofenu, parabenů a jejich degradačních produktů na reverzní stacionární fázi na bázi ZrO <sub>2</sub> .....	22
7.2. Separace enkefalinů na reverzní stacionární fázi na bázi ZrO <sub>2</sub> .....	24
7.3. Separace triazolových fungicidů na PBD-ZrO <sub>2</sub> stacionární fázi vysokoteplotní kapalinovou chromatografií .....	26
7.4. Separace isomerů koňských konjugovaných estrogenů pomocí uhkíkem obalené stacionární fáze na bázi ZrO <sub>2</sub> .....	27
7.5. Separace syntetických blokových kopolymerů oxyethylenu a oxypropylenu na reverzní stacionární fázi na bázi ZrO <sub>2</sub> .....	29
<b>8. Závěr</b> .....	<b>31</b>
<b>9. Použitá literatura</b> .....	<b>32</b>

## 1. Seznam zkratek

17 $\alpha$ EqS	17 $\alpha$ -dihydroequilin sulfát
Å	Ångstrom ( $1 \cdot 10^{-10}$ m)
ACN	acetonitril
Bopa	2-(4-isobutyrylphenyl)-propionová kyselina
BUDGE	1,4 butandiol diglycidyl ether
C/ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub> modifikovaný uhlíkem
D-Ala	D-alanin, aminokyselina
DHES	$\Delta^{8,9}$ - dehydroestron sulfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELSD	odpařovací světelný detektor
EO	oxyethylen
EqS	equilin sulfát
ES	estron sulfát
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
Gly	glycin, aminokyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ibap	4-isobutylacetofenon
Ibu	ibuprofen
IS	interní standard
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	LC s detekcí hmotnostní spektrometrií
Leu	leucin, aminokyselina
Leu NH <sub>2</sub>	leucinamid, aminokyselina
MeOH	methanol
MeP	metylparaben
Met	methionin, aminokyselina
NP	normální fáze
PBD	polybutadien
PBD-ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub> modifikovaný polybutadienem
P-EDTA	propofol EDTA
PEI	polyetherimid
PhBa	4-hydroxybenzoová kyselina
Phe	fenylalanin, aminokyselina
PO	oxypropylen
PrP	propylparaben
PS	polystyren
PS-ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub> modifikovaný polystyrenem
RP	reverzní fáze
RPLC	reverzní fáze v kapalinové chromatografii
Tyr	tyrosin, aminokyselina
USD	americký dolar
UV	ultrafialové záření

## 2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je literární rešerše na téma zirkoniové stacionární fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Práce se zabývá srovnáním klasických stacionárních fází na bázi silikagelu a nových stacionárních fází na bázi  $ZrO_2$ . Popisuje mechanismus separace na zirkoniových stacionárních fázích a představuje některá jejich využití v praxi.

### 3. Úvod

Oxidy kovů konkrétně zirkonia, titanu, hliníku a v menším míře také thoria a ceru jsou jako materiál pro náplně kolon pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) relativně mladé, první zmínky o nich byly před několika lety [1]. Od té doby roste počet aplikací těchto nových stacionárních fází.

Díky odlišnosti oxidů zmíněných kovů od silikagelu v chromatografickém zadržování, selektivitě a chemii povrchů, mohou být oxidy kovů velmi výhodně použity k dosažení odlišné a tedy úspěšné separace. Oxidy kovů mají účinnost srovnatelnou se silikagelem, ale v parametrech chemické a teplotní stability jsou lepší.  $ZrO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $Al_2O_3$  jsou nejzajímavější oxidy kovů z hlediska chromatografie [2].

V porovnání s ostatními stacionárními fázemi (oxidy kovů, uhlík a polymery) mají reverzní fáze na bázi silikagelu v HPLC dominantní postavení. Chemie povrchu silikagelu a jeho reakce jsou dobře známy i s jeho limitacemi. Silikagel se rozpouští při  $pH > 8$ . Při  $pH < 2$  se odštěpuje stacionární fáze vázané přes siloxánovou vazbu [3].

Polymerní materiály mohou být použity v HPLC jako nosič navázané fáze, nebo jako fáze samotná. Polymerní reverzní fáze jsou stabilní při  $pH$  1 až 13 [3]. Polymerní materiál ale bobtná a má nízkou mechanickou stabilitu v běžně používaných podmínkách. Většina polymerních fází má nižší chromatografickou účinnost než silikagel, navzdory létům vývoje a studování. Z tohoto krátkého souhrnu je patrné, že ideální náplň kolon po HPLC neexistuje. Ideální stacionární fáze v HPLC by měla mít následující charakteristiky [2]:

- Lehce variabilní fázový koeficient, to znamená možnost změny zadržování separovaného analytu.
- Dlouhotrvající chemickou stabilitu proti vysoce agresivní mobilní fázi (s velmi nízkým nebo s velmi vysokým  $pH$ ).
- Mechanická pevnost vzdorující vysokým tlakům působících při používání a plnění kolon.
- Částice materiálu by měly mít úzkou distribuci velikostí a vysoký relativní povrch. Struktura částic by měla mít porézní charakter.
- Póry musí mít průměr vhodný pro průměr analyzovaných molekul a musí mít dobré spojení umožňující rychlý přesun hmoty.
- Moderní HPLC náplně musí být sférické a nestlačitelné, aby poskytly mechanicky stabilní uložení.

- Materiál nosiče by měl být odolný proti teplotním a chemickým změnám.
- Materiál nosiče by měl být homogenní, ale zároveň umožňující chemickou modifikaci jeho povrchu.
- Materiál by měl co nejméně bobtnat v případě polymerní stacionární fáze, nebo polymerního potažení.

Vlastnosti kolon nové generace a technologie jejich výroby lze shrnout v následujících bodech [2]:

- Metody syntézy částic musí být vysoce reprodukovatelné. Pevná fáze musí mít uniformní distribuci velikosti částic, musí mít vhodnou poréznost, s relativním povrchem a průměrem pórů odpovídajícím zkoumaným analytům.
- Kolony musí být stabilní při nepříznivých podmínkách (vysokém či nízkém pH a zvýšené teplotě).
- Opakovatelnost separací musí být při posuzování kolona ke koloně a série k sérii vylepšena.
- Částice chromatografického materiálu by měli umožňovat co možná nejrychlejší analýzu.
- Chromatografické chování bazických analytů by mělo být vylepšeno (výška a symetrie píků).
- Současná dostupná selektivita kolon se značně liší od takové, která je velmi žádoucí.
- Kolony budou navrženy pro specifické aplikace, např. jako LC-MS, a pro specifické účely, jako je minimalizace spotřeby rozpouštědla a vyšší účinnost ve vysoce vodném prostředí.
- Velká pozornost je věnována novým formátům kolon se speciálními monolitickými fázemi a s lepšími průtokovými charakteristikami pro zvýšení rychlosti analýzy.

Požadavky na materiály pro kolony nové generace lépe splňují oxidy kovů na bázi zirkonia, titanu, hliníku a v menším rozsahu na bázi thoria a ceru [1]. Nejvhodnější se ze jmenovaných kovů jeví zirkonium, respektive oxid zirkoničitý. Kromě vynikající chemické a teplotní stability probíhají na povrchu  $ZrO_2$  zcela jiné chemické procesy než na povrchu silikagelu. Probíhající procesy, které jsou podstatou dělení, ovlivňují selektivitu a zadržování separovaných látek a mohou být s výhodou využity k ovlivňování a kontrole separace na  $ZrO_2$  stacionárních fázích.



## 4. Moderní stacionární fáze pro HPLC a jejich chemická a teplotní stabilita

Většina HPLC separací je v současnosti prováděna v systému s reverzní fází. Postup výroby velmi čistého silikagelu a způsoby vazby funkčních skupin na povrchu silikagelu jsou známy více než 20 let. V dnešní době je dostupná široká nabídka stacionárních fází na bázi silikagelu modifikovaného oktadecylovou a oktylovou funkční skupinou. Jejich účinnost, stabilita a reprodukovatelnost se mění podle výrobce [4]. Stále se ovšem pracuje na vývoji nových a odolnější kolon, které budou vyhovovat moderním analytickým potřebám. Vylepšení stability stacionárních fází bylo a zůstává viditelnou hnací silou pro výzkum a vývoj nových stacionárních fází.

### 4.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu

Mikročástečkový polymerní  $\text{SiO}_2$  je nejpoužívanější jako nosič HPLC stacionární fáze [5].  $\text{SiO}_2$  je oblíbený nosič z mnoha důvodů:

1. částice jsou monodisperzní, mechanicky odolné, mají velký povrch a dají se vyrobit s různými velikostmi pórů.
2. široká škála silanů dovoluje kovalentní modifikaci povrchu, což nabízí různorodé chromatografické vlastnosti. To umožňuje separovat analyty na reverzní nebo normální fázi, použitím iontové výměny nebo molekulového síta [6].

Stacionární fáze na bázi silikagelu jsou nejčastěji používané v kapalinové chromatografii. Nejrozšířeněji používaná reverzní stacionární fáze na bázi silikagelu je fáze vázaná pomocí organosilanu, protože jejich syntéza je vysoce reprodukovatelná [6]. Běžně chemicky vázané fáze jsou stabilní, pokud je pH mobilní fáze mezi 3–9. Pro dlouhodobější stabilitu je limit mezi 3–7 [7]. Jsou ale vyvinuty i kolony se stabilitou až do pH 11,5. Podobně jsou popsány pokusy o zlepšení stability při nízkém pH. Při pH mobilní fáze menší než 4 se výrazně projevuje kysele katalyzovaná hydrolyza siloxanové vazby mezi silikagelovým povrchem a organosilanem [3,7]. Z toho plyne ztráta vázané fáze a ztráta chromatografické retence. Při pH mobilní fáze větší než 9 se začíná silikagelový nosič rozpouštět, což způsobuje odštěpení vázané fáze z nosiče [3,7]. Rozpuštění silikagelové podvrstvy vede k postupující, značně velké ztrátě účinnosti kolon, a k vytvoření mrtvého prostoru na začátku kolony. Dlouhodobé používání mobilní fáze o pH 9 nebo vyšší vede ke kolapsu kolony a

kompletní ztrátě chromatografické účinnosti. Nejednodušší řešení omezené chemické stability silikagelových fází je použití mobilní fáze v rozsahu pH 3–7, popřípadě 9. To ovšem značně limituje optimalizaci separace změnou pH mobilní fáze pro mnoho typů analytů nejen v systému s reverzními fázemi. Například malé bazické farmaceuticky významné sloučeniny je třeba dělit při vysokém nebo při velmi nízkém pH [3]. Snižování pH vede k potlačení nežádoucích interakcí mezi analytem a zbytkovými silanovými skupinami na povrchu silikagelu, což vede k lepším tvarům píků a zlepšení účinnosti. Analýza bazických látek ve formě volných bází často vede k větší chromatografické retenci a k lepší symetrii píků [3].

Teplotní stabilita běžně používaných silikagelových kolon je uváděna do 60–80 °C v závislosti na typu mobilní fáze. Při vyšší teplotě začíná povrch silikagelu kondenzovat a jeho chemické vlastnosti povrchu se mění. Silikagel se rozpuští i v přítomnosti známých znehodnocujících sloučenin jako jsou fosforečnany nebo uhličitany.

#### **4.2. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého**

Při hledání nových materiálů pro stacionární fáze, které budou chemicky a teplotně odolnější než silikagelové, byla pozornost zaměřena na následující oxidy kovů:  $ZrO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $Al_2O_3$ . Nejperspektivnější se z uvedených materiálů jeví oxid zirkoničitý.  $ZrO_2$  se zdá být teplotně i chemicky nejstabilnější oxid uvedených kovů, používá se tedy například i při uchovávání radiochemického odpadu. Teplotní stabilita  $ZrO_2$  je velmi vysoká. Zirkonium má velmi vysokou teplotu tání (2750 °C).  $ZrO_2$  může být v HPLC použit při teplotě až do 200 °C [8]. Teplotní stabilita je výhodou, protože při vyšší teplotě je nižší viskozita mobilní fáze a může se použít rychlejší průtok média v koloně, což umožňuje 3–5 krát rychlejší analýzu. Můžeme zlepšovat selektivitu i tím, že současně měníme teplotu a další jiné parametry [8].  $ZrO_2$  je stabilní při nízkém i při vysokém pH a absolutně stabilní v rozmezí pH 1–14 [1]. Povrch  $ZrO_2$  obsahuje hydroxylové skupiny –OH. Jejich umístění a množství se liší od povrchu silikagelu. Dále povrch  $ZrO_2$  obsahuje místa Lewisových kyselin. Pro použití při separaci na reverzní fázi je možné povrch  $ZrO_2$  modifikovat. Modifikací se dosáhne snížení polaritu povrchu.

Dříve nebyly  $ZrO_2$  náplně používané, protože je nikdo komerčně nevyráběl. Používali se pouze takové, které si výzkumné laboratoře vyráběly samy. Kolony pro HPLC ze sférických, monodisperzních částic s výbornou morfologií pórů jsou nyní komerčně dostupné [2]. V tabulce 1 jsou uvedeny některé dostupné náplně na bázi  $ZrO_2$ .

**Tabulka 1** Komerčně dostupné náplně na bázi zirkonia a jejich základní fyzikálně chemické vlastnosti [2].

Způsob použití	Chemie povrchu	Velikost pórů (nm)	Velikost částic (μm)	Povrch (m <sup>2</sup> /g)	pH rozmezí	Max. teplota (°C)
RP	ZrO <sub>2</sub> obalený modifikovaným uhlíkem	30	3, 5, 7, 10	30	1–14	200
RP	ZrO <sub>2</sub> obalený uhlíkem	30	3, 5, 7, 10	30	1–14	150
NP	Holý ZrO <sub>2</sub>	30	3, 5, 7, 10	30	1–14	150
RP	ZrO <sub>2</sub> obalený PBD	30	3, 5, 7, 10	30	1–14	150
Slabý měnič kationtů	ZrO <sub>2</sub> obalený PEI a zesíťovaným BUDGE	30	3, 5, 7, 10	30	1–10	50
Slabý měnič aniontů	ZrO <sub>2</sub> obalený PEI	30	3, 5, 7, 10	30	3–9	50
Silný měnič aniontů	ZrO <sub>2</sub> obalený kvartérní solí methyl jodidu s PEI zesíťovaným BUDGE	30	3, 5, 7, 10	30	1–12	50
Silný měnič aniontů	ZrO <sub>2</sub> obalený kvartérní solí methyl jodidu s PEI zesíťovaným s diiododekanem	30	3, 5, 7, 10	30	1–12	50
Měnič kationtů	ZrO <sub>2</sub> chemicky modifikovaný P-EDTA	30	3, 5, 7, 10	30	1–10	50
RP	ZrO <sub>2</sub> obalený PS	30	3, 5, 7, 10	30	1–13	150
RP	ZrO <sub>2</sub> obalený PBD chemicky modifikovaným P-EDTA	30	3, 5, 15, 25	30	1–10	50

PBD: polybutadien, PEI: polyetherimid, BUDGE: 1,4 butandiol diglycidyl ether, P-EDTA: propofol EDTA, EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina

### 4.3. Srovnání vlastností a stability fází na bázi oxidu zirkoničitého a silikagelu

Srovnání vlastností náplní kolon pro HPLC na bázi silikagelu a ZrO<sub>2</sub> je shrnuto v tabulce 2. V této tabulce jsou navíc srovnávány i náplně na bázi TiO<sub>2</sub> a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Z tabulky je vidět, že silikagel je komerčně dostupný v nejširší škále typů pórů i velikosti částic, ale jeho teplotní a chemická stabilita je nižší než u ostatních srovnávaných náplní. Reálné srovnání komerčně dostupných stacionárních fází na bázi ZrO<sub>2</sub> a silikagelu je v tabulce 3.

**Tabulka 2** Srovnání vlastností náplní kolon pro HPLC na bázi SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a ZrO<sub>2</sub> [2].

Vlastnosti	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ZrO <sub>2</sub>
Monodisperzita	++	++	++	++
Struktura pórů	++	?	?	++
Povrch, průměr pórů	++++	++	+++	++
Kontrola chemie povrchu	++++	?	++	++
Mechanická odolnost	++	?	?	+++
Chemická stabilita	-	++ (?)	+++	++++
Teplotní stabilita	-	?	?	+++
Účinnost kolony	+++	?	++	+++
Homogenost	++	+	+	+

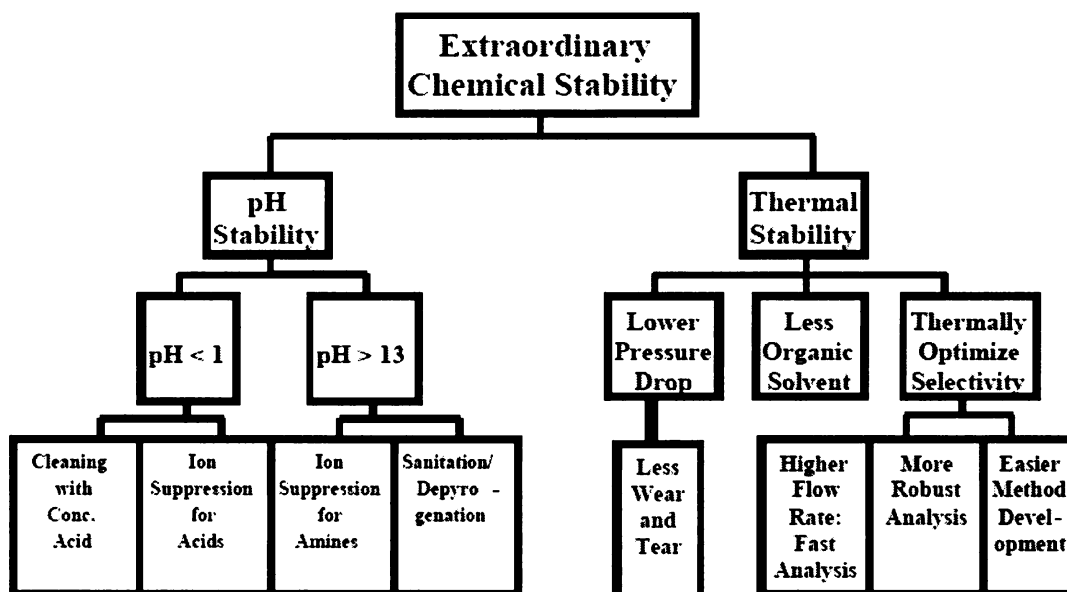
Tabulka 3 Vybrané komerčně dostupné chromatografické náplně pro RPLC, stabilní při vysokém pH [2].

Výrobce	ZirChrom	ZirChrom	Supelco	Supelco	Supelco	Supelco	Phenomenex	Waters	Zorbax
Název kolony	Diamond BondC18	ZirChrom-PBD	Discovery Zr-PBD	Discovery Zr-PS	Discovery Zr-Carbon	Discovery Zr-Carbon C18	Luna	Xterra	Extend
Nosič	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>
Velikost částic (μm)	3	3	3 a 5	3 a 5	3 a 5	3 a 5	3	3 a 5	3 a 5
Velikost pórů (Å)	300	300	300	300	300	300	100	130	80
Rozměry (mm)	50 x 46	150 x 4,6	?	?	?	?	150 x 4,6	150 x 4,6	150 x 4,6
Cena (USD)	675	595	?	?	?	?	435	425	540
Nízké pH	1	1	1	1	1	1	1,5	1	2
Vysoké pH	14	13	13	13	14	14	10	12	11,5
Max. teplota (°C)	200	150	150	150	200	200	?	80	60

Kolony z oxidu zirkoničitého nabízejí větší stabilitu náplně [9], z čehož plyne:

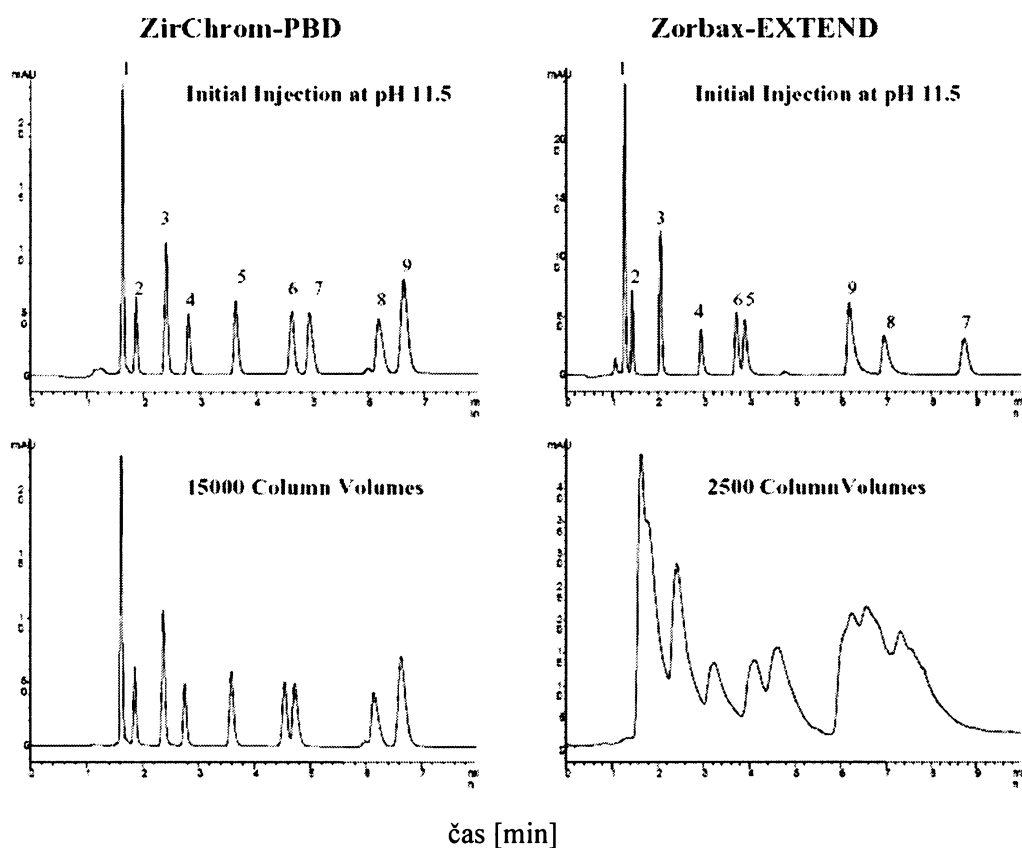
- Delší životnost kolony a nižší cena analýzy.
- Možnost použití většího rozmezí pH a teploty, což umožňuje vývoj robustnějších analytických metod.
- Možnost separovat silné kyseliny a zásady v nedisociované formě
- Vyšší rychlost analýzy použitím vyšší průtokové rychlosti a teploty separace.
- Jednodušší optimalizace chromatografické separace.
- Menší únik stacionární fáze z kolony, který vede k snadnějšímu vývoji kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí nebo použitím optických detektorů.
- Možnost čištění kolony použitím extrémně „hrubých“ podmínek (extrémní pH nebo vysoká teplota ) bez nebezpečí zničení kolony.

Tyto výhody jsou schématicky znázorněny na obr. 1.



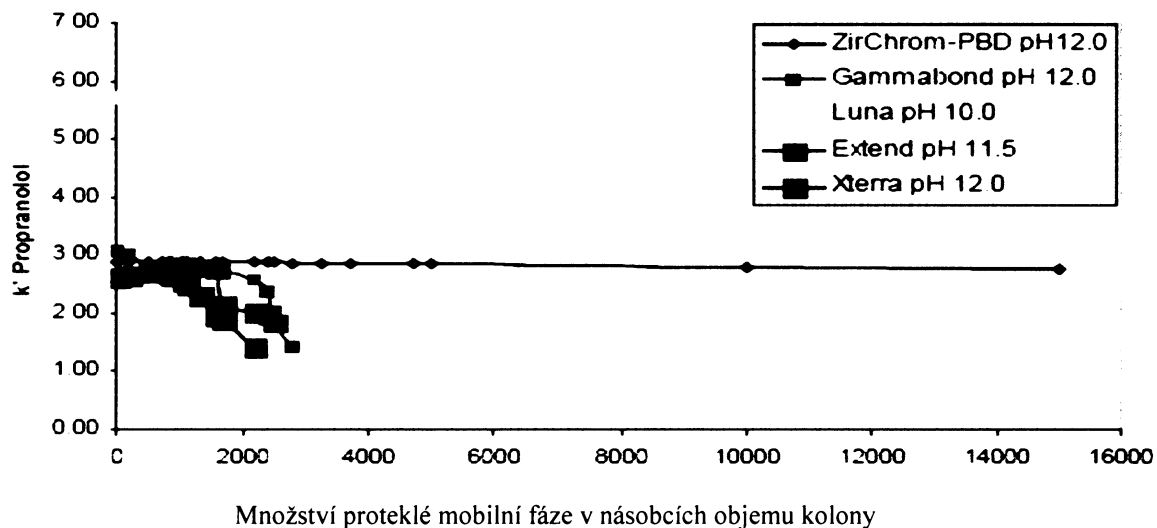
Obr.1 Výhody plynoucí z chemické a teplotní stability ZrO<sub>2</sub> stacionárních fází [2].

Omezenou chemickou stabilitu reverzních silikagelových kolon se snaží výrobci zlepšit různými modifikacemi při výrobním postupu. Na trhu jsou tedy dostupné silikagelové kolony, které lze používat při pH 11,5 až 12. Přesto u těchto „chemicky stabilních“ silikagelových kolon dochází ke ztrátě separačních vlastností mnohem dříve než u zirkoniových kolon. Dlouhodobá stabilita reverzní fáze na bázi silikagelu (Zorbax-EXTEND) a fáze na bázi  $ZrO_2$  (ZirChrom-PBD) byla srovnávána pomocí separace řady bazických farmaceutik při vysokém pH (obr. 2). Na obrázku je vidět separace látek na úplně nových kolonách a na stejných kolonách po promytí fosforečnanovým pufrem 15000 násobkem (ZirChrom-PBD) a 2500 násobkem (Zorbax-EXTEND) objemu kolony. Tyto studie byly ale prováděny v přítomnosti fosforečnanů, které destabilizují silikagel.



**Obr. 2** Stabilita kolon ZirChrom-PBD a Zorbax-EXTEND při vysokém pH. Chromatografické podmínky: ZirChrom-PBD – mobilní fáze 28 % ACN a 72 % 20 mM fosforečnan draselný, pH 11,5; Zorbax-EXTEND – mobilní fáze 45 % ACN a 55 % 20 mM fosforečnan draselný, pH 11,5; teplota 40 °C; průtoková rychlost 1ml/min; UV detekce při 254 nm. 1-labetolol, 2-atenolol, 3-acebutolol, 4-metoprolol, 5-oxprenolol, 6-quinidine, 7-lidocaine, 8-aldrenolol, 9-propranolon [2].

Následující obr. 3 srovnává dlouhodobou stabilitu kolon při jejich maximálním operačním pH. Je sledován měnící se retenční faktor  $k$  propranololu v závislosti na objemu mobilní fáze proteklé kolonou. Z obrázku je opět zřejmá vynikající chemická stabilita kolon na bázi  $ZrO_2$ .



**Obr. 3** Srovnání stability kolon na bázi silikagelu (Luna, Extend, Xterra),  $Al_2O_3$  (Gammabond) a kolony PBD- $ZrO_2$  při jejich maximálním operačním pH [2].

## 5. Modifikace povrchu oxidu zirkoničitého

K dosažení fungování  $ZrO_2$  jako reverzní fáze je potřeba povrch  $ZrO_2$  modifikovat. Existují tři druhy modifikace povrchu [1]:

1. dynamická modifikace – to je chemická modifikace vyvolaná látkou silně interagující s povrchem. Tato látka je přítomna v mobilní fázi.
2. permanentní kovalentní chemická modifikace – například silanizace povrchu, nebo jiná forma přímé vazby.
3. fyzikální odstínění – například ukládání polymerů na oxidy, nebo obalení oxidu vrstvou uhlíku.

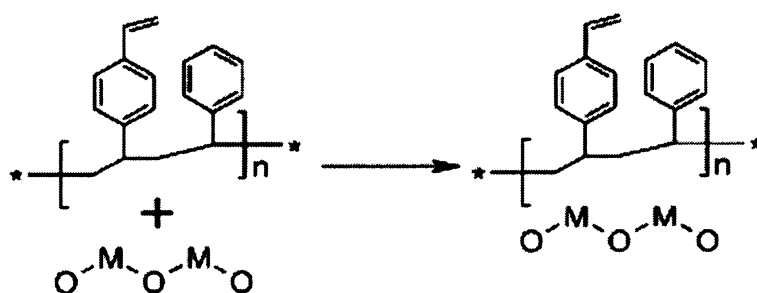
Dynamická modifikace povrchu může být použita k potlačení nežádoucích míst na povrchu, nebo k vytvoření dočasně vázané fáze na povrch nosiče. U  $ZrO_2$  se dá jako dynamická modifikace považovat blokování míst Lewisových kyselin. Jako modifikující látky se používají silné Lewisovy báze, např.: fosforečnany, fluoridy, nebo silně komplexotvorné látky jako EDTA a její analogy obsažené v mobilní fázi [10]. Takto navázané modifikující

látky mohou být stabilní při mnoha podmínkách, ale v silně alkalickém prostředí jsou vytěsňeny hydroxidovým aniontem, jakožto nejsilnější Lewisovskou bází u  $ZrO_2$ .

Jednou z možností dosažení permanentní kovalentní modifikace  $ZrO_2$  je silanizace [1]. Silanizace je navázání organických zbytků na kov přes vazbu s křemíkem podle M-O-Si-R. Hydrolytická stabilita této vazby klesá v pořadí: Si-O-Si-R  $\gg$  Zr-O-Si-R > Ti-O-Si-R  $\gg$  Al-O-Si-R [11]. Z této sekvence vyplývá, že silanizované oxidy kovů mnohem snadněji podléhají hydrolyze, než oxidy nesilanizované, což limituje dosažení permanentní modifikace. Navíc  $ZrO_2$  obsahuje zesíťované hydroxyly, které nemohou podlehnout silanizaci.

Fyzikální odstínění je obalení nosiče dalším materiálem, například polymery nebo uhlíkem [12]. Ideální obalení by mělo tvořit tenký film na povrchu nosiče, který neblokuje ani jinak nemění strukturu pórů. Obalení by mělo být ve všech místech uniformní (stejně tenké) a nemělo by bránit v pohybu hmoty ve stacionární fázi. V neposlední řadě by mělo poskytovat kompletní zakrytí nežádoucích nespecifických interakčních míst na nosiči (místa Lewisových kyselin na povrchu  $ZrO_2$ ).

Polymerem obalené stacionární fáze kombinují mechanické vlastnosti porézních oxidů kovů s mnohostranností organických polymerů. Polymerní obalení u oxidů kovů napodobuje chemicky vázanou organickou fázi u silikagelu. Například polybutadienové obalení ( $PBD-ZrO_2$ ) se podobá svým chováním oktanovým a oktadecylovým zbytkům navázaným na silikagel a obalení polystyrenem ( $PS-ZrO_2$ ) se podobá fenylovým stacionárním fázím [12]. Na obr. 4 je vidět polystyrenem obalený  $ZrO_2$ .

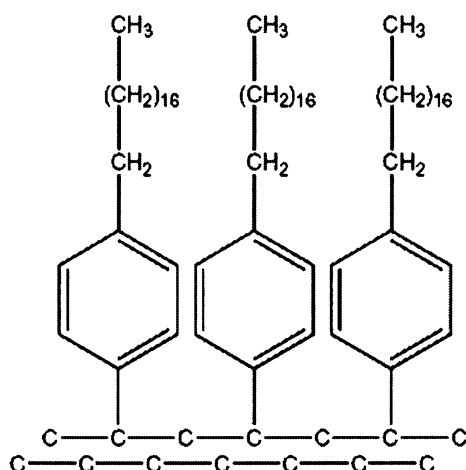


Obr. 4 Struktura polystyrenem obaleného  $ZrO_2$  [12].

Tyto dva polymery jsou nejvíce používané, ale k modifikaci povrchu lze použít i např. polyethery, polysacharidy či polyamidy.

Dalším typem modifikace je obalení uhlíkem [12]. Uhlík chemicky odolává kyselinám, bázím a organickým rozpouštědlům. Je mechanicky stabilní a poskytuje různorodé a užitečné chromatografické vlastnosti. Pro HPLC použití se nejvíce používá

uhlíkem pokrytý  $ZrO_2$  ( $C/ZrO_2$ ), kde lze dosáhnout až 97 % pokrytí. Pokrytí se dá dále modifikovat diazoniovými solemi (obr. 5). Mechanismus retence na těchto fázích vychází ze specifické adsorpce na povrch uhlíku a z elektronových ( $\pi$ - $\pi$ ) interakcí.  $C/ZrO_2$  je více hydrofobní než fáze s navázanými alkyly. Separace na uhlíkem obaleném zirkonu poskytuje větší selektivitu pro polární i nepolární geometrické izomery, analyzují se tak například diastereoizomery.



Obr. 5 Struktura modifikovaného pokrytí uhlíkem [12].

## 6. Chemie povrchu $ZrO_2$ pro chromatografii

Chemie povrchu  $ZrO_2$  se výrazně liší od chemie povrchu  $SiO_2$ . Silikagel funguje kvůli nízké pH stabilitě jen jako kationtový měnič, zatímco  $ZrO_2$  jako amfoterní iontový měnič. Může být kationtovým nebo aniontovým měničem v závislosti na pH [2]. Další odlišnost, která má velký dopad na použití oxidových fází je existence míst Lewisových kyselin (obr. 6). Tato místa jsou zodpovědná za schopnost ligandové výměny na molekulách  $ZrO_2$  [2]. Pro použití v RPLC se používá modifikace povrchů látkami s nízkou polaritou (polybutadien, polystyren, uhlík). Žádná modifikace neblokuje všechny Lewisovská místa, proto většina modifikovaných oxidů poskytuje kombinovaný způsob retence. Jaký mechanismus retence převáží, záleží na typu rozpouštědla, pH, typu pufru, iontové síle a obsahu organických modifikantů. Např.: PBD modifikovaný oxid interaguje s nenabitými látkami především mechanismem RP, ale s organickými bázemi interaguje smíšeným způsobem, to znamená iontovou výměnou a RP.



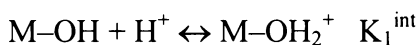


**Obr. 6** Struktura povrchu  $ZrO_2$  s červeně znázorněnými místy Lewisových kyselin a vázanými -OH skupinami [13].

### 6.1. Iontová výměna na povrchu $ZrO_2$

Vlastnosti iontové výměny jsou postaveny na schopnosti disociace, nebo protonace povrchových hydroxylů (obr. 6). Disociace a protonace se děje v závislosti na pH použité mobilní fáze.

Následující rovnice popisují protonaci a disociaci hydroxylů [2]:



Kde  $K_1^{int}$  a  $K_2^{int}$  jsou rovnovážné ionizační konstanty. Když je počet pozitivně nabitých skupin ( $M-OH_2^+$ ) roven počtu negativně nabitých skupin ( $M-O^-$ ), pak má povrch nulový náboj. pH, při kterém má povrch nulový náboj je  $pH_{pzc}$  (point of zero charge) a závisí na ionizační konstantě podle vztahu:

$$pH_{pzc} = 0,5 (pK_1^{int} + pK_2^{int})$$

Prakticky, když je  $pH < pK_1^{int}$ , oxid se bude chovat jako měnič aniontů, když je  $pH < pK_2^{int}$ , bude se chovat jako měnič kationtů. V jednoduchém elektrolytickém systému, to znamená bez iontů specificky se adsorbujících na povrch, se rovná izoelektrický bod pH, při kterém má povrch nulový náboj  $pH_{pzc}$ . Izoelektrické body (pI) oxidů kovů lze určit různými metodami [1]. Podle použité metody se hodnoty pI pro  $ZrO_2$  pohybují v intervalu 6,4–13, pro  $Al_2O_3$  v intervalu 7–9,1, pro  $TiO_2$  v intervalu 5–6,5.

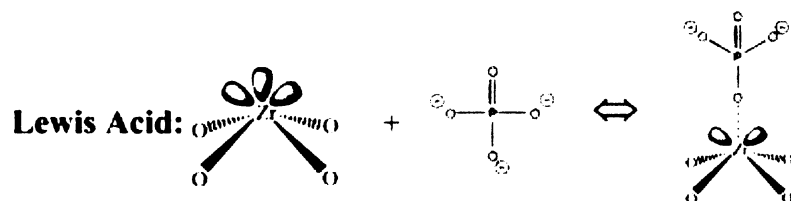
Při chromatografickém dělení aminů je zásadní problém nízká hodnota pI nosičů na bázi silikagelu. Silanoly jsou disociovány při neutrálním pH a jejich povrch získává záporný náboj (tento stav přetrvává až do pH 2) [14]. Alifatické báze jsou v neutrálním prostředí protonizovány, a proto silně interagují se silikonovým povrchem přes elektrostatické interakce (iontové výměny). Tento problém se dá řešit následujícími možnostmi:

- snížením pH, což vede ke snížení disociace silanolů. Ale při  $pH < 3$  nejsou navázané fáze stabilní.
- zvýšením pH, což vede k deprotonizaci organické báze, ale při  $pH > 9$  se rozpouští silikagelová kostra.

ZrO<sub>2</sub> nabízí vyšší hodnotu pH<sub>pzc</sub>. To znamená, že v neutrálním pH povrch oxidu nemá negativní náboj, a proto nebude elektrostaticky interagovat s nabitými bázemi. ZrO<sub>2</sub> je také stabilní při vyšším pH než silikagel [1,9], a tak umožňuje deprotonizaci nabitých bází. Organické báze se tedy dají dělit na ZrO<sub>2</sub> nosičích v módu normální chromatografie. Iontová výměna na ZrO<sub>2</sub> se dá také výhodně využít při separaci anorganických iontů.

## 6.2. Ligandová výměna na povrchu ZrO<sub>2</sub>

Schopnost ZrO<sub>2</sub> ligandové výměny pochází z přítomnosti míst Lewisových kyselin na povrchu (obr. 6 a obr. 7). Místa Lewisových kyselin jsou tvořeny koordinačně nesaturovanými ionty Al<sup>3+</sup>, Zr<sup>4+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, nebo koordinační místa těchto iontů, kde jsou vázány molekuly vody nebo jiné jednoduše odštěpitelné koordinační ligandy.



Obr. 7 Vazba ligandu na Lewisovu kyselinu [13].

Proces ligandové výměny byl důkladně studován pro HPLC pouze pro zirkoniové povrchy [15]. Bylo prokázáno, že ZrO<sub>2</sub> je silnější Lewisova kyselina než Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Důležité k porozumění vlastností zirkoniových kolon modifikovaných polymery nebo elementárním uhlíkem je, že potažení netvoří uniformní nepropustnou vrstvu, která kompletně neblokuje přístup k povrchu. Proces ligandové výměny, který probíhá na nativním ZrO<sub>2</sub> probíhá částečně i na obalených materiálech. Proto se ligandově výměnné interakce významně uplatňují v chromatografii na reverzní fázi. Koordinačně vázaná voda na ZrO<sub>2</sub>, hraje v tomto procesu velmi významnou roli. Bylo prokázáno, že povrch ZrO<sub>2</sub> obsahuje zhruba 20 μmol/m<sup>2</sup> molekul vody. Tyto molekuly mohou být vyměňovány s ostatními molekulami Lewisových bází. Čím je báze silnější, tím lépe se molekuly vyměňují [12].

Procesu ligandové výměny se zúčastňují molekuly vody či ionty OH<sup>-</sup> v závislosti na pH mobilní fáze. U zirkoniových povrchů je právě OH<sup>-</sup> iont nejsilnější monovalentní Lewisova báze a vytěsňuje všechny ostatní jednoduché Lewisovy báze.

Jak je řečeno výše, koordinačně vázaná voda umožňuje výměnu za jiné ligandy. Pokud povrch takovou vodu neobsahuje, nemůže na něm ligandová výměna probíhat, jako je tomu u silikagelů.

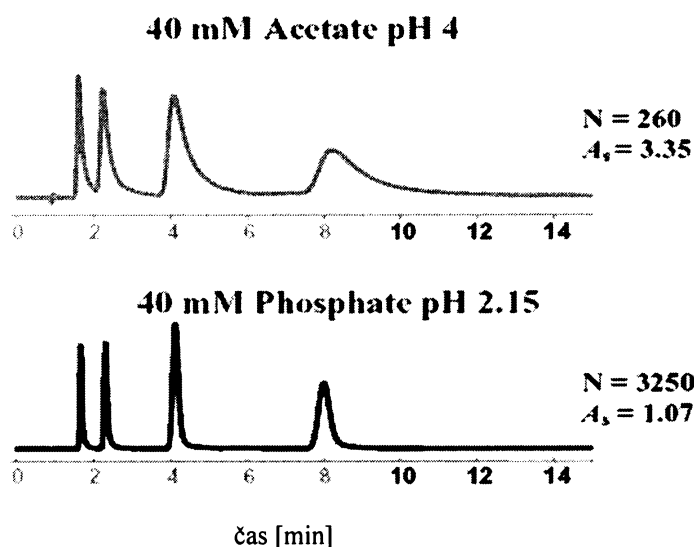
Síla interakce Lewisovy báze se silnou Lewisovou kyselinou na povrchu  $ZrO_2$  závisí na elektronové hustotě a schopnosti polarizace báze. Nízká polarizace a vysoká elektronová hustota vede k silnější interakci. Síla interakce vybraných bází používaných v HPLC jako součást mobilní fáze klesá následovně [1]:

fosforečnan > fluorid > citronan > síran > octan > mravenčan > dusičnan > chlorid.

$ZrO_2$  silně interaguje se silnými Lewisovými bázemi, jako fluoridem, hydroxylem a ionty karboxylátů [16]. Nejvíce se anionty adsorbují, když je pH rovno jejich  $pK_a$  [1]. Pokud jsou analyty silné Lewisovy báze, silně se váží na povrch  $ZrO_2$  a špatně se dělí. Přidáním silnější Lewisovy báze se analyty z povrchu vyváží, což přispívá k zlepšení jejich separace [10]. Přítomnost fluoridů, fosforečnanů, polyvalentních organických ligandů, nebo organofosforečnanů v mobilní fázi umožňuje separaci velké škály kyselých, neutrální a bazických nízkomolekulárních látek i proteinů na modifikovaných i neupravených  $ZrO_2$  površích [16]. Citronany a fosforečnany umožňují eluci proteinů z nativních zirkoniových nosičů. Fluoridy nemůžou být použity při nízkém pH, protože rozpouští  $ZrO_2$ .

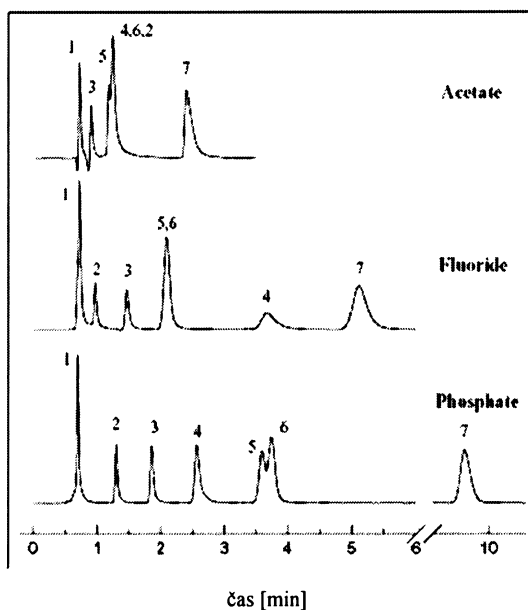
### 6.3. Retence na povrchu $ZrO_2$

Retence je při separaci na  $ZrO_2$  kolonách ovlivněna hlavně kombinací iontové a ligandové výměny. Pochopení retenčního mechanismu je nezbytné ke kontrole chromatografie běžných analytů [2]. Obr. 8 ukazuje zlepšení separace alkoxidů na PBD potaženém povrchu  $ZrO_2$  po přidavku fosforečnanu nebo octanu. Karboxylové zbytky alkoxidů silně interagují s povrchem, a proto přidání silnější Lewisové báze zlepšuje jejich separaci. Fosforečnany jsou silnější Lewisovy báze než octany, proto poskytují lepší dělení.



**Obr. 8** Separace alkoxidů na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub>. Chromatografické podmínky: mobilní fáze 25 % ACN a 40 mM octan (pH 4) nebo fosforečnan (pH 2,15), 5 mM NH<sub>4</sub>F; teplota 30 °C; průtoková rychlost 0,6 ml/min; UV detekce 254 nm [2].

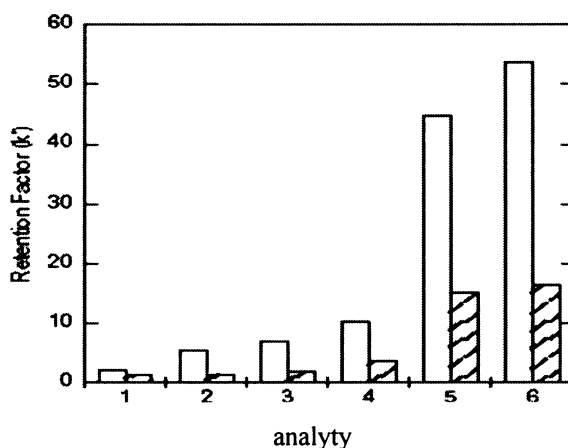
Kontrola eluce typem Lewisovy báze je také vidět na obr. 9.



**Obr. 9** Chromatografická separace směsi bazických sloučenin na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub> v mobilní fázi obsahující: 1. octan amonný, 2. fluorid amonný, 3. hydrogenfosforečnan amonný; mobilní fáze 30 % ACN a 70 % 20 mM Lewisova báze (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); pH 7,0; teplota 40 °C; průtoková rychlost 0,8 ml/min; 1-theophylin, 2-albuterol, 3-efedrin, 4-norefedrin, 5-chlorfeniramin, 6-difenhydramin, 7-prometazin [2].

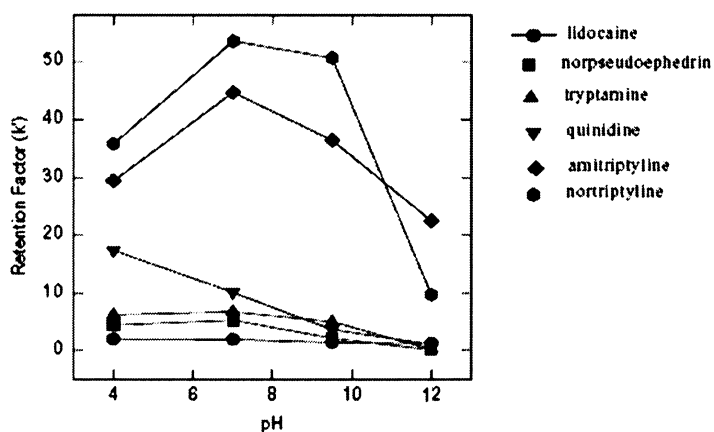
Nejkratší retenční čas je u octanu, protože je nejslabší Lewisova báze. Tím, že se na ZrO<sub>2</sub> váže fluorid a fosforečnan, povrch se stává díky jejich náboji silnějším kationtovým měničem. Tento mechanismus přispívá výrazně k interakcím mezi dělenými látkami a povrchem. Fosforečnanem modifikovaný PBD-ZrO<sub>2</sub> proto poskytuje, jak vlastnosti reverzní fáze, tak kationtového měniče i při kyselém pH [2].

Ovlivnění retence výběrem různé iontové síly pufru obsahujícího Lewisovy báze je vidět na obr. 10. Zvýšení koncentrace pufru z 20 mM na 100 mM, má za následek snížení retenčního času na méně než polovinu.



**Obr. 10** Ovlivnění retence bazických sloučenin iontovou silou na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub>; mobilní fáze 30 % ACN a 70 % pufru, pH 7,0; teplota 40 °C; průtoková rychlost 0,8 ml/min; UV detekce při 210 nm. Bílé sloupce: 20 mM dihydrogenfosforečnan amonný. Šrafované sloupce: 100 mM dihydrogenfosforečnan amonný. 1-lidocaine, 2-norpseudoefedrin, 3-tryptamin, 4-quinidine, 5-amitriptylin, 6-nortriptyline [2].

pH je další proměnná používaná ke kontrole retence, pokud je iontová výměna hlavní retenční mechanismus jak je vidět na obr. 11. Amitriptylin a nortriptylin jsou silně zadržovány iontovou výměnou. Zvýšením pH z 4 na 12 se sníží příspěvek iontové výměny k retenci a retence na reverzní fázi se stane dominantní. Eluční pořadí těchto dvou látek se proto prohodí.

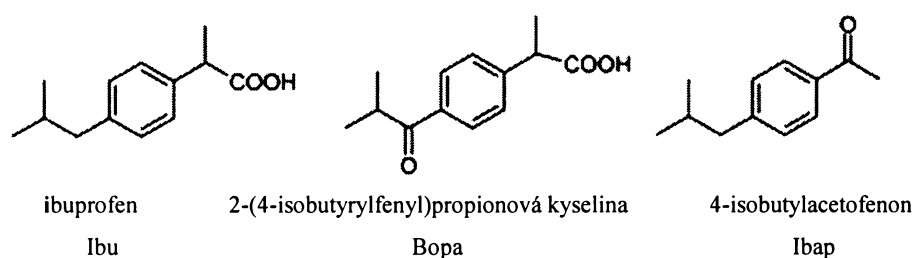


**Obr. 11** Závislost retenčního faktoru bazických sloučenin na pH mobilní fáze na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub>; mobilní fáze 30 % ACN a 70 % 20 mM pufr fosforečnanu amonného; teplota 40 °C; průtoková rychlost 0,8 ml/min; UV detekce při 210 nm. pH se mění od 4 do 12 přidávkem 20 mM pufru fosforečnanu sodného [2].

## 7. Příklady použití stacionárních fází na bázi $ZrO_2$ v praxi

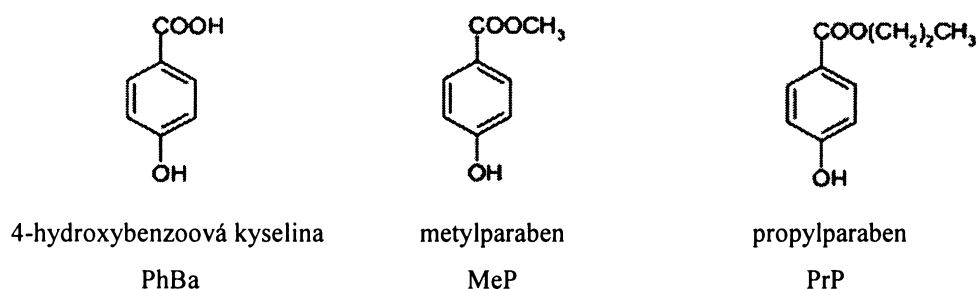
### 7.1. Separace ibuprofenu, parabenů a jejich degradačních produktů na reverzní stacionární fázi na bázi $ZrO_2$ [17]

Ibuprofen (Ibu) je nesteroidní léčivo s protizánětlivými, analgetickými, antipyretickými a protisrážlivými účinky. Je relativně stabilní, ale může se oxidovat a fotolyticky rozkládat na 4-isobutylacetofenon (Ibap) a 2-(4-isobutyrylfenyl)-propionovou kyselinu (Bopa). Struktura Ibu, Ibap a Bopa je uvedena na obr. 12.



Obr. 12 Ibuprofen a jeho rozkladné produkty [17].

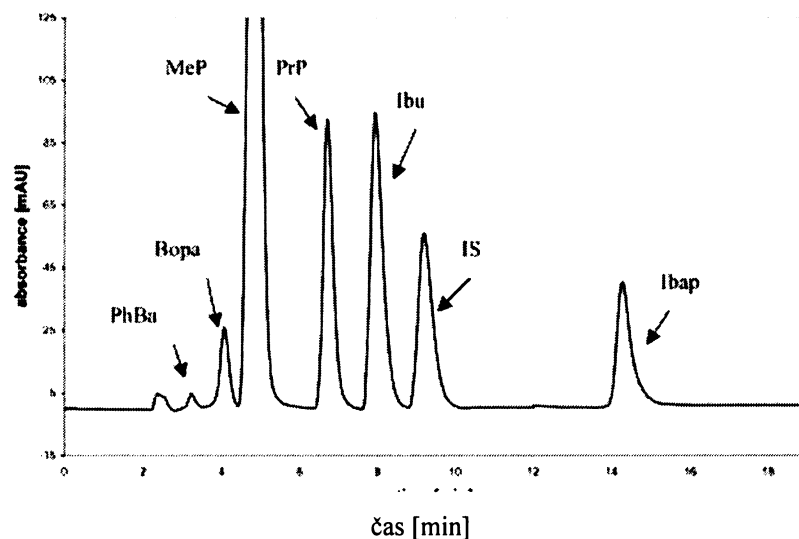
Parabeny jsou metyl (MeP), etyl, propyl (PrP) nebo butyl estery kyseliny 4-hydroxybenzoové. Jejich struktura je na obr. 13. Jsou používány jako antimikrobiální konzervační prostředky ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Parabeny se hydrolyticky rozkládají na kyselinu 4-hydroxybenzoovou (PhBa), (obr. 13).



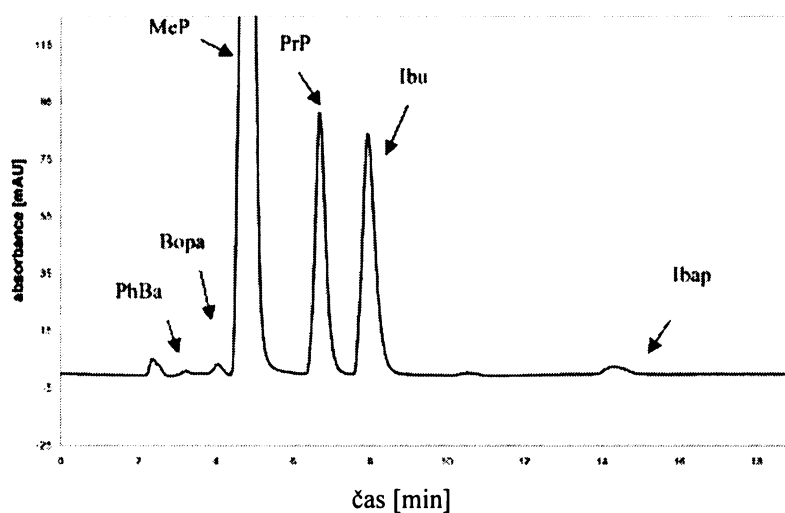
Obr. 13 Parabeny a jejich rozkladný produkt [17].

Rozkladný proces může vést ke ztrátě síly a kvality léku. Může dojít i ke ztrátě bezpečnosti jeho složení kvůli vytváření neefektivních, nebo toxických rozkladných produktů. Analýza ibuprofenu, parabenů a jejich rozkladných produktů je na reverzní silikagelové stacionární fázi neúčinná. K separaci těchto látek lze použít stacionárních fází na bázi  $ZrO_2$  a

to modifikovanou polystyrenem (PS-ZrO<sub>2</sub>) a uhlíkem s navázanými C18 skupinami (Zr-Carbon C18). Na obr. 14 je znázorněna úspěšná separace ibuprofenu, parabenů a jejich rozkladných produktů na koloně Zr-Carbon C18. Tato aplikace může být prakticky využita při farmaceutických analýzách. Na obr. 15 je separace reálného vzorku farmaceutického krému po uplynutí jeho minimální doby použitelnosti na koloně Zr-Carbon C18.



**Obr. 14** Chromatogram kvantitativního stanovení všech analytů včetně interního standardu (IS) na koloně Zr-Carbon C18; mobilní fáze 27 % ACN (obj.), 56 % (obj.) 50 mM fosforečnanový pufr (pH 4,8) a 17 % propan-2-ol, teplota 70 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 258 nm [17].



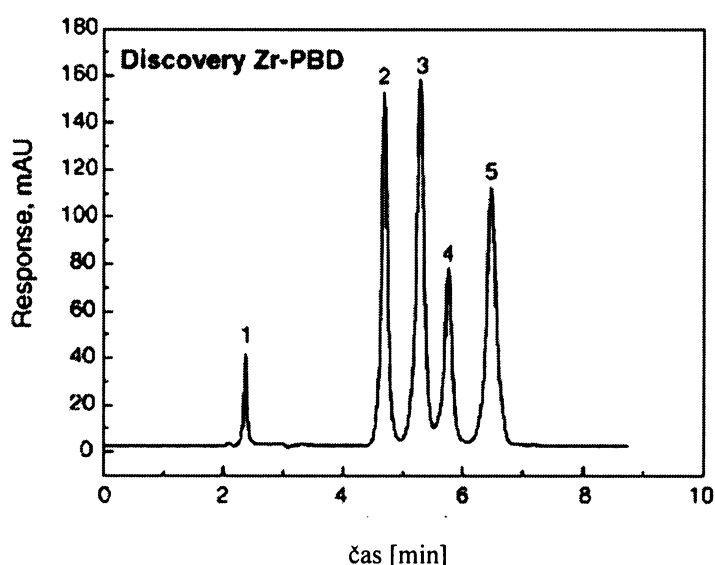
**Obr. 15** Chromatogram reálného vzorku farmaceutického krému po uplynutí jeho minimální doby použitelnosti na koloně Zr-Carbon C18; mobilní fáze 27 % ACN (obj.), 56 % (obj.) 50 mM fosforečnanový pufr (pH 4,8) a 17 % propan-2-ol, teplota 70 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 258 nm [17].

## 7.2. Separace enkefalinů na reverzní stacionární fázi na bázi ZrO<sub>2</sub> [18]

Enkefaliny jsou pentapeptidy, které patří mezi biologicky aktivní látky, konkrétně mezi neurotransmitery. V lidském těle (mozku) reagují s opiátovými receptory, hrají tedy důležitou roli v regulaci bolesti. Zdrojem enkefalinů je adrenokortikotropní hormon. Poruchy v synézě mohou být příčinou různých neurodegenerativních chorob. Enkefaliny patří mezi endogenní, tělu vlastní, peptidy s opiátovou aktivitou. Jsou charakterizovány následujícím sledem aminokyselin:

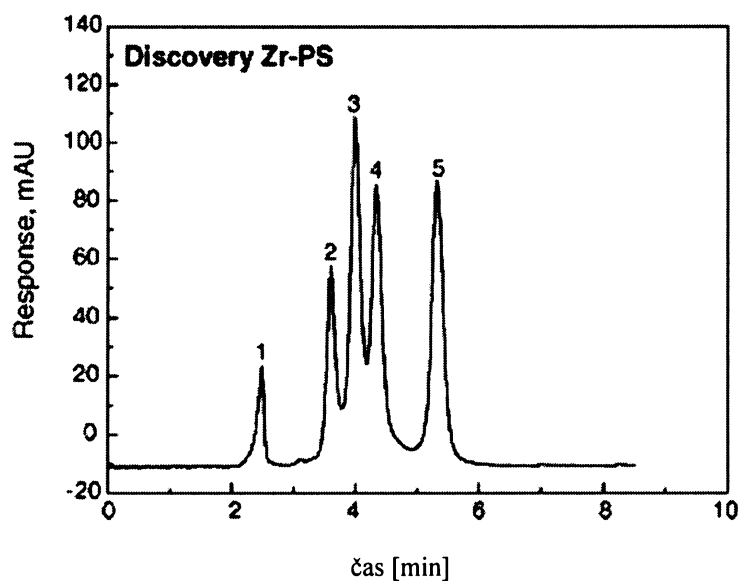
Methionin-enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leucin-enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Leucin-enkefalinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH <sub>2</sub>
D-Alanin, leucin-enkefalin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu

Separace těchto pentapeptidů na PBD-ZrO<sub>2</sub>, PS-ZrO<sub>2</sub> a Supelcosil C<sub>18</sub> byla zkoumána při různých podmínkách. Postupně byl měněn typ, koncentrace a pH elučního pufru, typ a obsah organické složky v pufru a teplota při separaci. Ideální podmínky pro separaci enkefalinů byly nalezeny na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub> jak je vidět na obr. 16, na koloně PS-ZrO<sub>2</sub> na obr. 17 a na koloně Supelcosil C<sub>18</sub> na obr. 18. Z experimentu vyplývá, že enkefaliny se na stacionárních fázích na bázi ZrO<sub>2</sub> dělí mechanismem iontové výměny a donor-akceptorovými interakcemi, oproti tomu separace na Supelcosil C<sub>18</sub> probíhá mechanismem hydrofobních interakcí.

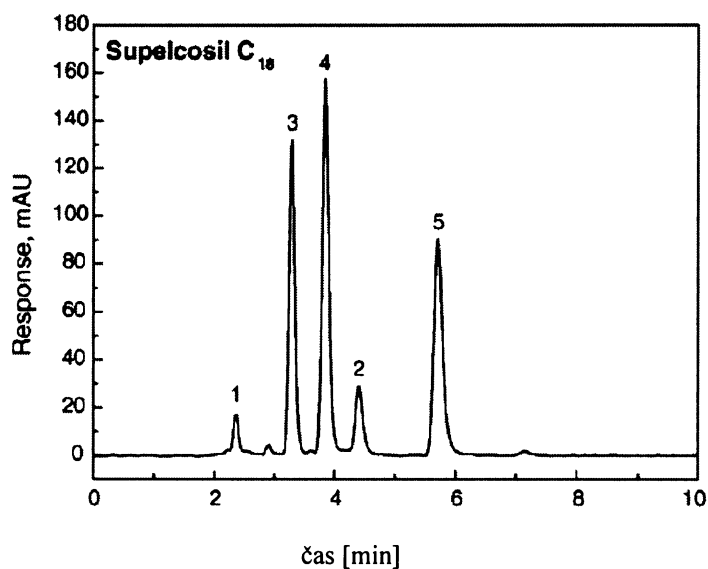


**Obr. 16** Optimalizovaná separace enkefalinů na koloně Discovery Zr-PBD; mobilní fáze 45 % ACN (obj.) a 55 % (obj.) 50 mM fosforečnanový pufr (pH 2,0), teplota 70 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; dávkovací smyčka 10 µl; UV detekce při 214 nm. 1-Uracil, 2-D-Ala-Leu-enkefalin, 3-Met-enkefalin, 4-Leu-enkefalin, 5-Leu-enkefalinamid [18].





**Obr. 17** Optimalizovaná separace enkefalinů na koloně Discovery Zr-PS; mobilní fáze 45 % ACN (obj.) a 55 % (obj.) 80 mM fosforečnanový pufr (pH 3,5), teplota 40 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; dávkovací smyčka 10  $\mu$ l; UV detekce při 214 nm. 1-Uracil, 2-D-Ala-Leu-enkefalin, 3-Met-enkefalin, 4-Leu-enkefalin, 5-Leu-enkefalinamid [18].

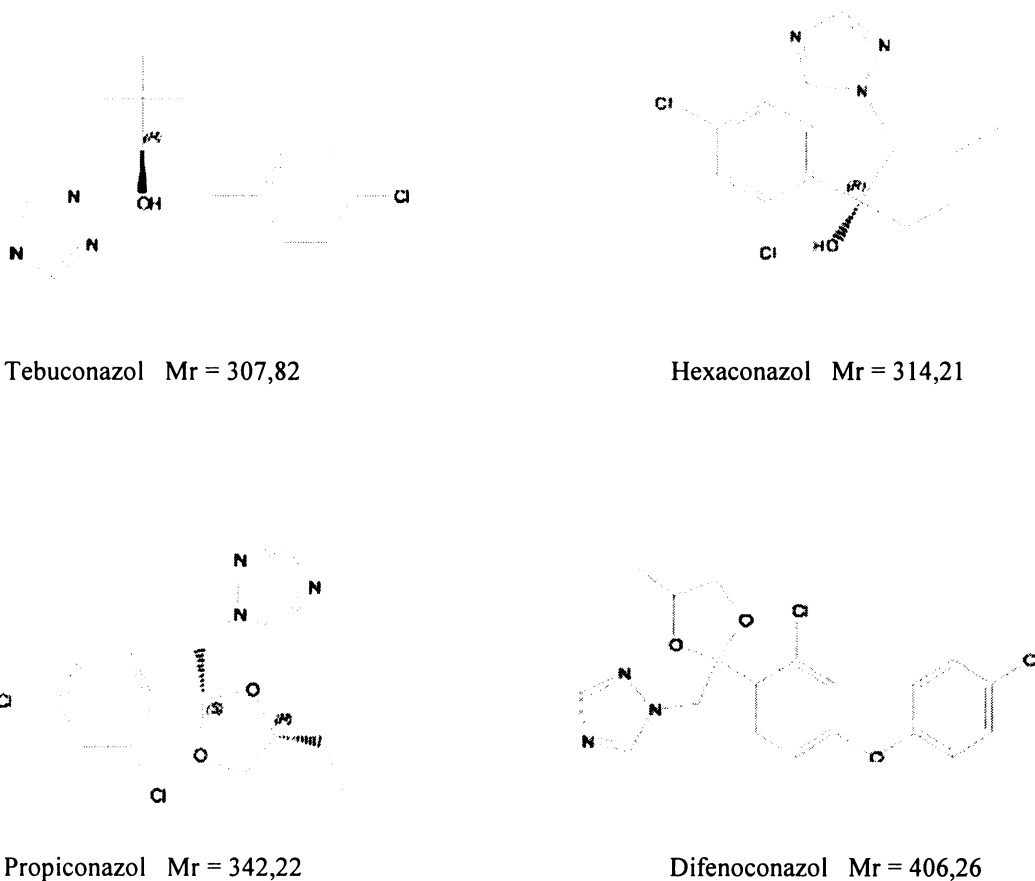


**Obr. 18** Optimalizovaná separace enkefalinů na koloně Supelcosil C<sub>18</sub>; mobilní fáze 22 % ACN (obj.) a 78 % (obj.) 50 mM fosforečnanový pufr (pH 5,0), teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; dávkovací smyčka 10  $\mu$ l; UV detekce při 214 nm. 1-Uracil, 2-D-Ala-Leu-enkefalin, 3-Met-enkefalin, 4-Leu-enkefalin, 5-Leu-enkefalinamid [18].

### 7.3. Separace triazolových fungicidů na PBD-ZrO<sub>2</sub> stacionární fázi vysokoteplotní kapalinovou chromatografií [19]

Triazolové fungicidy jsou dobře známé pro své léčivé účinky u rostlin. Poskytují výbornou ochranu a malé riziko vzniku rezistence oproti ostatním fungicidům. Většina triazolových fungicidů se používá proti rzi, strupovitosti a dalším plísňovým chorobám. Jejich struktura je odvozena od 1,2,4-triazolového kruhu, který je spojen hydrofobní kostrou přes pozici N<sub>1</sub>.

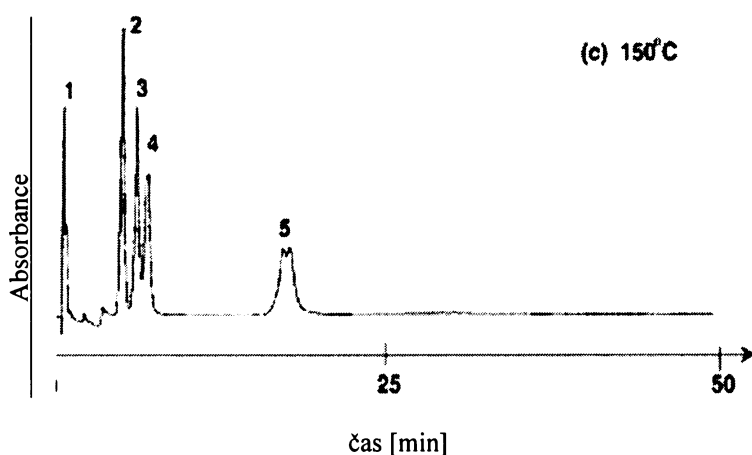
Analýzu vybraných triazolových fungicidů lze provádět vysokoteplotní HPLC na koloně PBD-ZrO<sub>2</sub>, tedy ZrO<sub>2</sub> potaženém vrstvou polybutadienu. Byly separovány tyto fungicidy: Tebuconazol, Hexaconazol, Propiconazol a Difenoconazol. Struktury těchto fungicidů jsou uvedeny na obr. 19.



Obr. 19 Strukturální vzorce separovaných fungicidů [19].

Separace byla prováděna za zvýšené teploty (100 – 150 °C) a za použití mobilní fáze obsahující vodu a acetonitril v různých objemových poměrech (ACN/voda: 10:90, 5:95, 0:100). V tomto uspořádání byly fungicidy vymývány v pořadí podle vzrůstající molekulové

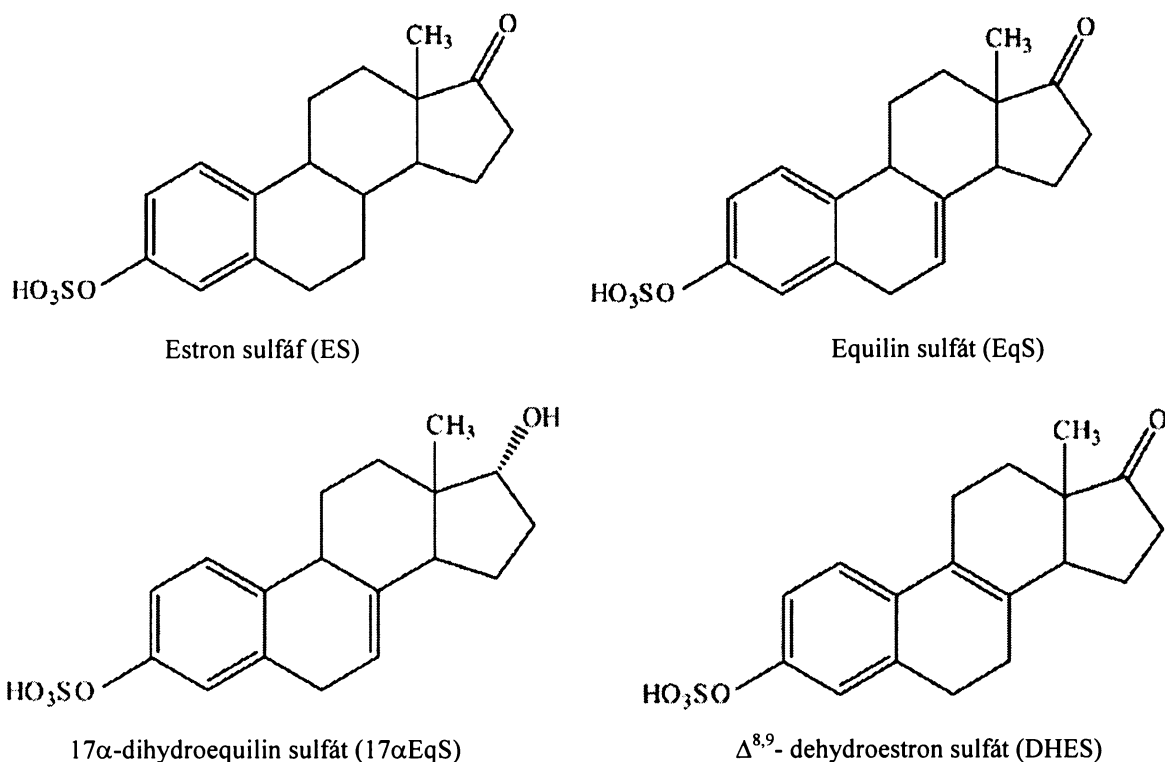
hmotnosti. Pro každý analyt byla zkoumána závislost retenčního faktoru na teplotě a složení mobilní fáze. Bylo pozorováno, že retenční faktor klesá se vzrůstající teplotou a že zvýšení koncentrace ACN o 1% má na retenční faktor stejný efekt jako zvýšení teploty o 4 °C. Stejně separace bylo dosaženo při teplotě 110 °C v 10 % ACN, 130 °C v 5 % ACN a 150 °C v 100 % vodě (obj.). Z toho vyplývá, že retence může být kontrolována obsahem organického rozpouštědla v mobilní fázi nebo teplotou kolony. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při použití čisté vody. Separace je vidět na obr. 20. Touto metodou lze určovat množství fungicidů až množství desítek pikogramů (pg).



**Obr. 20** Separace triazolových fungicidů na koloně ZirChrom-PBD; mobilní fáze 100 % voda (obj.); průtoková rychlost 0,5 ml/min; teplota 150 °C; dávkovací smyčka 1 µl; UV detekce při 220 nm. 1-acetonitril, 2-tebuconazol, 3-hexaconazol, 4-propiconazol, 5-difenoconazol [19].

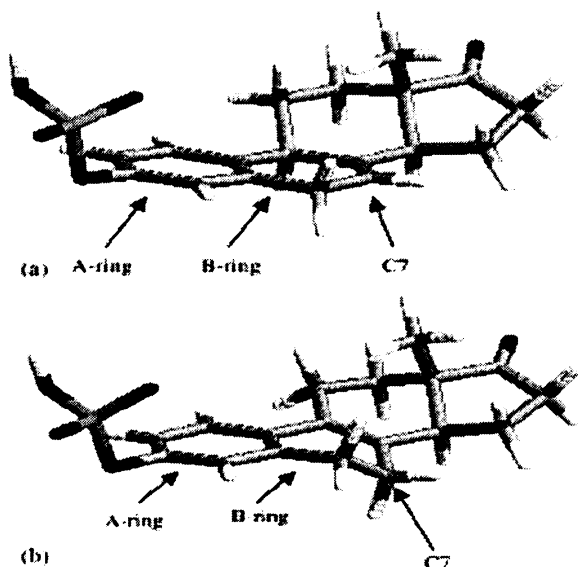
#### **7.4. Separace isomerů koňských konjugovaných estrogenů pomocí uhlíkem obalené stacionární fáze na bázi ZrO<sub>2</sub> [20]**

Konjugované estrogény se získávají z moči těhotných klisen a používají se k léčbě symptomů menopauzy a prevenci osteoporózy při menopauze u žen. Jakožto přírodní produkt obsahují mnoho steroidních látek. Nás z hlediska léčby zajímají estron sulfát (ES), equilin sulfát (EqS) a 17 $\alpha$ -dihydroequilin sulfát (17 $\alpha$ EqS), jejichž struktury jsou na obr. 21. Množství těchto látek ve směsi konjugovaných estrogenů se stanovuje kapalinovou chromatografií na koloně C<sub>18</sub> na bázi silikagelu s detekcí hmotnostní spektrometrií. Směs ale obsahuje i  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestron sulfát (DHES), (obr. 21), který se liší od EqS pozicí dvojně vazby na steroidním kruhu. Při analýze se DHES vymývá spolu s EqS, a navíc se jejich molekuly nedají rozlišit ani hmotnostní spektrometrií, protože mají shodné molekulové hmotnosti. DHES je ve směsi v nezanedbatelném množství, a proto ruší kvantitativní analýzu EqS.

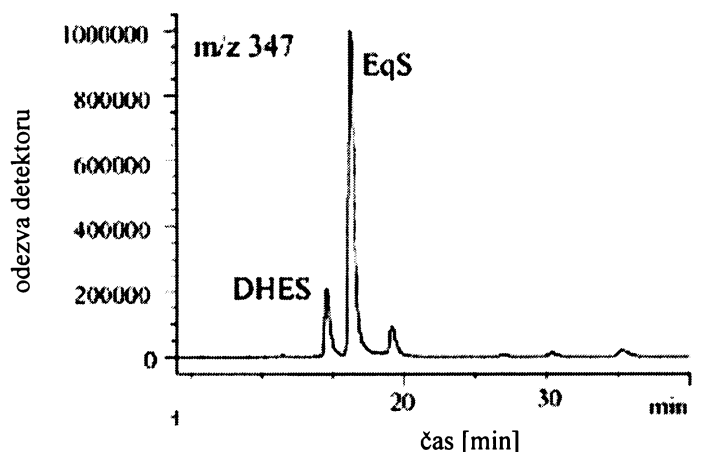


**Obr. 21** Struktury studovaných konjugovaných estrogenů [20].

EqS a DHES lze separovat na koloně Zr-CARB. Kolona Zr-CARB obsahuje ZrO<sub>2</sub> nosič obalený z 1 % porézním uhlíkem se strukturou grafitu. Toto obalení tvoří na nosiči velké ploché vrstvy hexagonálně uspořádaného uhlíku. Látky se na této koloně dělí díky různé schopnosti vázat se na tyto vrstvy. Z prostorového uspořádání struktury obou látek na obr. 22 je vidět, že EqS je více planární než DHES, a proto se déle zadržuje na koloně. Úspěšná separace na koloně Zr-CARB je vidět na obr. 23.



**Obr. 22** Prostorové uspořádání struktury (a) EqS a (b) DHES [20].



**Obr. 23** Separace konjugovaných estrogenů na koloně Zr-CARB; mobilní fáze: vodný roztok 50 mM NH<sub>3</sub>, gradient 19-38 % ACN (obj.) během 30 minut; teplota 80 °C; průtoková rychlost 0,2 ml/min; dávkovací smyčka 5 µl; detekce ESI-MS [20].

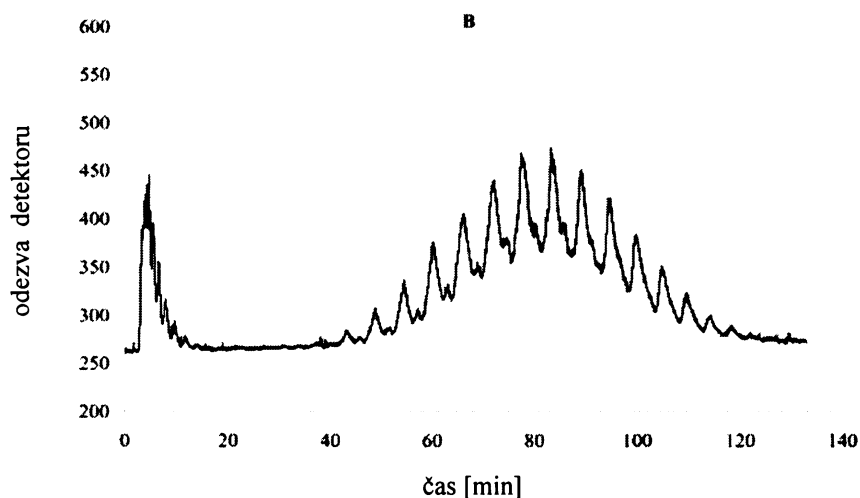
### 7.5. Separace syntetických blokových kopolymerů oxyethylenu a oxypropylenu na reverzní stacionární fázi na bázi ZrO<sub>2</sub> [21]

Blokové kopolymery oxyethylenu (EO) a oxypropylenu (PO) se používají v domácnostech i v průmyslu jako nenabitě povrchově aktivní látky. Uplatnění nacházejí jako detergenty v mycích prostředcích, nebo jako emulgátory a rozpouštědla vůní v kosmetických výrobcích. Jejich smáčivost, schopnost tvorby pěny a další vlastnosti jsou ovlivněny molekulovou hmotností, chemickým složením a sekvencí bloků polymeru. Proto je jejich analýza důležitá při kontrole kvality komerčních produktů.

Reálné vzorky směsi kopolymerů obecných vzorců (EO)<sub>n</sub>(PO)<sub>m</sub>(EO)<sub>n</sub> (Slovanik 1010) a (PO)<sub>m</sub>(EO)<sub>n</sub>(PO)<sub>m</sub> (Novanik 1010), kde *n* je 2-4 a *m* je 10-20 monomerních jednotek, byly analyzovány na kolonách Discovery Zr-PS, Discovrey Zr-Carbon a Discovery Zr-Carbon C18. Ve směsi vzorků bylo obsaženo i zbytkové množství homopolymerů EO a PO. Eluce jednotlivých složek byla prováděna gradientem složení mobilní fáze, teploty, nebo obou těchto parametrů zároveň. Jednotlivé kopolymery se od sebe dělí na základě hydrofobních interakcí. Kopolymery obsahují více polární skupinu EO a také méně polární skupinu PO. V separaci se tedy mnohem více projevuje počet skupin PO než skupin EO. V některých podmínkách se například počet skupin EO vůbec neprojevuje a kopolymery se separují pouze na základě počtu skupin PO.

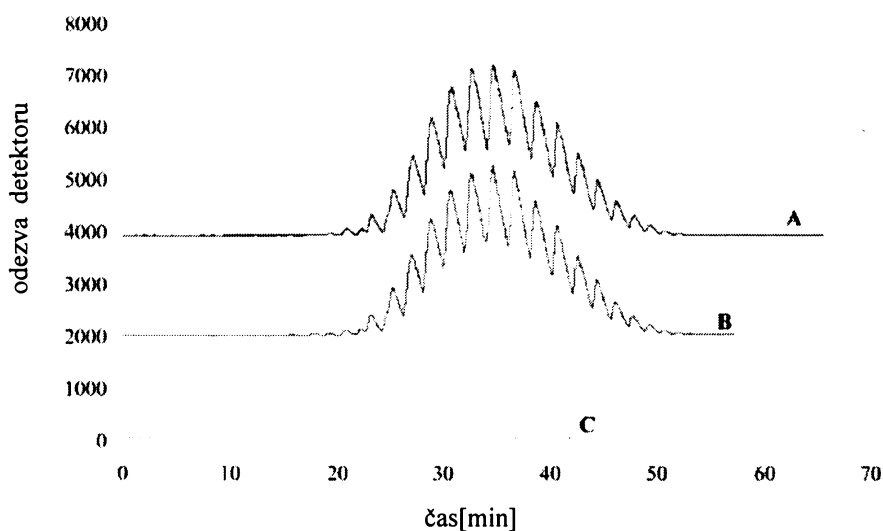
Nejllepší separace vzorku Slovanik bylo dosaženo na koloně Zr-PS. Eluce jednotlivých složek byla prováděna gradientem obsahu methanolu v rozsahu 10–50 % a zároveň gradientem teploty v rozsahu 40-80 °C. Separace vzorku Slovanik je vidět na obr. 24.

Z chromatogramu je patrné, že vzorek obsahuje homopolymer (píky v čele) a že při těchto podmínkách lze odseparovat nejen kopolymery lišící se v počtu skupin PO, ale zároveň i EO.



**Obr. 24** Separace kopolymeru Slovanik na koloně Zr-PS; mobilní fáze: voda, gradient 10-50 % MeOH (obj.) během 120 minut; teplota 40-80 °C, 0,5 °C/min; průtoková rychlost 0,75 ml/min; detekce ELSD [21].

Nejllepší separace vzorku Novanik bylo dosaženo na koloně Zr-Carbon C18, jak je vidět na obr. 25. Eluce jednotlivých složek byla prováděna gradientem obsahu methanolu v rozsahu 50–100 % a zároveň gradientem teploty v rozsahu 40-80 °C. Při těchto podmínkách bylo identifikováno 20 složek směsi.



**Obr. 25** Separace kopolymeru Novanik na koloně Zr-Carbon C18; mobilní fáze: voda, gradient 50-100 % (obj.) MeOH během: A-100 minut, B-60 minut, C-30 minut; teplota 40-80 °C, průtoková rychlost 0,75 ml/min; detekce ELSD [21].

## 8. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla literární rešerše o oxidu zirkoničitém jako moderním nosiči stacionární fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

V bakalářské práci jsou diskutovány odlišnosti mezi chováním silikagelu, jako klasického materiálu pro nosič stacionární fáze a moderního a perspektivního média oxidu zirkoničitého  $ZrO_2$ .

Vzhledem k tomu, že stacionární fáze na bázi  $ZrO_2$  jsou relativně „mladé“, množství aplikací v literatuře není tak velká jako v případě silikagelových kolon. Přesto byly nalezeny zajímavé příklady využití  $ZrO_2$  stacionárních fází v praxi a z uvedených aplikací je více než zřejmé, že  $ZrO_2$  materiály jsou velmi perspektivní a využitelné pro širokou oblast analytů.

## 9. Použitá literatura

1. J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCocmick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229.
2. J. Nawrocki, C.J. Dunlap, A. McCocmick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1.
3. L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, second ed. Wiley-Interscience, New York, 1996.
4. K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 1.
5. A. Berthod, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 1.
6. U.D. Neue, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 2001.
7. J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
8. J.D. Thompson, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4150.
9. C. McNeff, L. Zigan, K. Jonson, P.W. Carr, A.M. Weber-Main, *LC-GC* 18 (5) (2000) 515.
10. J. Blackwell, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 43.
11. F. Schindler, H. Schmidbaur, *Angew. Chem.* 79 (1967) 697.
12. J. Nawrocki, C.J. Dunlap, A. McCocmick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31.
13. <http://www.zirchrom.com/newsletters/2005-11.asp>. Staženo 26. 5. 2007.
14. J.J. Hetem, *Chemically Modified Silica Surfaces in Chromatography: A Fundamental Study*, Huthig Buch Verlag, Heidelberg, 1993.
15. V. Bolis, C. Morterra, M. Volante, L. Orio, B. Fubini, *Langmuir* 6 (1990) 695.
16. J.A. Blackwell, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 596 (1992) 27.
17. R. Kučera, V. Žižkovský, J. Klimeš, J. Sochor, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1307.
18. K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 104.
19. M.M. Sanagi, H.H. See, W.A. Wan Ibrahim, A. Abu Naim, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 95.
20. J.C. Reepmeyer, J.F. Brower, H. Ye, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 42.
21. T. Welerowicz, P. Jandera, K. Novotná, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1155.