

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie

**Studium separačních podmínek vybraných derivátů  
3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů pro HPLC a transfer podmínek  
na (semi)preparativní separace**

*Bakalářská práce*

Autor:	Martin Pavelka
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Kamil Motyka, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením Ing. Kamila Motyky, Ph.D. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 5. 5. 2014

.....  
Podpis

### **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval Ing. Kamilu Motykovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracovávání bakalářské práce.

## **Bibliografická identifikace:**

**Jméno a příjmení autora:** Martin Pavelka

**Název práce:** Studium separačních podmínek vybraných derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů pro HPLC a transfer podmínek na (semi)preparativní separace

**Typ práce:** Bakalářská práce

**Pracoviště:** Katedra organické chemie

**Školitel:** Ing. Kamil Motyka, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2014

**Abstrakt:** Byly hledány optimální podmínky pro separaci vybraných derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů v systému RP-HPLC. Byl sledován vliv složení mobilní fáze a pH mobilní fáze na vybrané chromatografické parametry a naměřené výsledky byly diskutovány. Hledání vhodných podmínek bylo provedeno na třech analytických kolonách a získané výsledky byly aplikovány pro semipreparativní kolonu.

**Klíčová slova:** RP-HPLC, 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolon, aktivita silanolových skupin, chvostování píků, Nucleosil-C<sub>18</sub>, Nucleodur-C<sub>18</sub>, Synergi Hydro-RP, YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>

**Počet stran:** 54

**Počet příloh:** 1

**Jazyk:** čeština

## **Bibliographical identification:**

**Author's first name and surname:** Martin Pavelka

**Title:** The study of HPLC separation conditions for selected derivatives of 3-hydroxy-4(1*H*)-quinolones and scale-up to the (semi)preparative chromatography

**Type of thesis:** Bachelor thesis

**Department:** Department of Organic Chemistry

**Advisor:** Ing. Kamil Motyka, Ph.D.

**The year of presentation:** 2014

**Abstract:** Optimal separation conditions for selected derivatives of 3-hydroxy-4(1*H*)-quinolones in RP-HPLC were studied. The effects of mobile phase composition and mobile phase pH on chosen chromatographic parameters were investigated and the results were discussed. The measurements were performed for three analytical columns and obtained results were applied for separation on semipreparative column.

**Keywords:** RP-HPLC, 3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone, silanole activity, peak tailing, Nucleosil-C<sub>18</sub>, Nucleodur-C<sub>18</sub>, Synergi Hydro-RP, YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>

**Number of pages:** 54

**Number of appendixes:** 1

**Language:** Czech

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>10</b>
2.1. Popis chromatografické separace .....	10
2.1.1. Retenční čas .....	10
2.1.2. Retenční faktor .....	10
2.1.3. Šířka píku .....	10
2.1.4. Asymetrie .....	10
2.1.5. Počet teoretických pater .....	11
2.1.6. Výška teoretického patra .....	12
2.2. RP-HPLC kolony .....	12
2.2.1. Výroba RP-fází .....	12
2.2.2. Zbytkové silanolové skupiny .....	13
2.2.3. Mechanismy separace v RP-HPLC .....	14
2.2.4. Termodynamické a kinetické faktory separačního procesu .....	15
2.2.5. Parametry kolon a sorbentů .....	16
2.3. Vliv pH .....	17
2.3.1. Úprava pH .....	18
2.4. Vliv aniontů .....	19
2.5. Metody separace 3-HQ popsané v literatuře .....	20
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>21</b>
3.1. Zkoumané látky .....	21
3.2. Instrumentální vybavení .....	22
3.2.1. pH metr .....	22
3.2.2. Kapalinový chromatograf .....	22
3.2.3. Chromatografické kolony .....	22
3.3. Chemikálie .....	23
3.4. Příprava vzorků .....	23
3.5. Úprava pH mobilních fází .....	23
<b>4 Výsledky a diskuse</b> .....	<b>25</b>
4.1. Analytické kolony .....	25

4.1.1	Kolona Nucleosil .....	25
4.1.2	Kolona Nucleodur.....	30
4.1.3	Kolona Synergi Hydro-RP.....	34
4.1.4	Srovnání analytických kolon .....	39
4.2	Semipreparativní kolona YMC-Pack Pro C <sub>18</sub> .....	43
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>48</b>
7.1	Příloha 1: Tabulky.....	48

## Použité zkratky

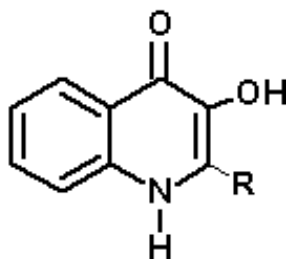
3-HQ	3-hydroxy-4(1 <i>H</i> )chinolon
A	asymetrie
EDTA	kyselina ethylen-1,2-diamintetraoctová
k	retenční faktor
H	výška teoretického patra
Me	methyl
N	počet teoretických pater
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
THF	tetrahydrofuran
t <sub>R</sub>	retenční čas
w <sub>h</sub>	šířka píku v 50 % výšky píku



# 1. Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography, HPLC) patří mezi základní techniky analytické chemie. Metoda procházela v posledních desetiletích velkým rozvojem, díky němuž je v současné době pomocí HPLC možné analyzovat širokou škálu látek nejrůznějších vlastností, nízkomolekulární, vysokomolekulární, nepolární, polární i iontové. RP-HPLC (Reversed-phase HPLC, HPLC na obrácených fázích) je nejpoužívanějším typem HPLC, který používá jako stacionární fázi oxid křemičitý chemicky modifikovaný různě dlouhými alkylovými řetězci.

3-hydroxy-4(1*H*)chinolony (3-HQ) jsou látky, u nichž byla studována biologická účinnost [1] a vykazují rovněž zajímavé fluorescenční vlastnosti [2]. Při chromatografické separaci 3-HQ na obrácených fázích dochází k rozmývání píků na chromatogramu, což může vést k problémům při kvalitativní i kvantitativní analýze vzorků obsahujících 3-HQ. Cílem bakalářské práce bylo nalezení optimálních podmínek separace některých derivátů 3-HQ substituovaných v poloze 2 (Obr. 1.1), pro metodu RP-HPLC.



Obr. 1.1: Obecný vzorec 3-hydroxy-4(1*H*)chinolonu substituovaného v poloze 2.

V teoretické části byly popsány vybrané chromatografické parametry, výroba stacionárních fází používaných v RP-HPLC a jejich vlastnosti, mechanismy separace na těchto stacionárních fázích a vliv pH mobilní fáze na separaci analytů.

Experimentální část se zabývala studiem vlivu různého složení mobilní fáze a především různého pH mobilní fáze na chromatografické chování 3-HQ na třech analytických kolonách a podmínky, které vykazovaly nejvýhodnější separační parametry, byly ověřeny na semipreparativní koloně.

## 2. Teoretická část

V Teoretické části jsou nejprve stručně definovány chromatografické parametry používané k popisu chromatografických separací, pozornost je dále věnována sorbentům používaným v RP-HPLC, mechanismům separace, vlivu pH mobilní fáze a vlivu aniontů přítomných v mobilní fázi.

### 2.1. Popis chromatografické separace

K popisu chromatografického chování látek a především tvaru píku byly zvoleny tyto parametry: retenční čas, retenční faktor, šířka píku, asymetrie, počet teoretických pater a výška teoretického patra.

#### 2.1.1. Retenční čas

Retenční čas ( $t_R$ ) je doba od začátku analýzy po maximum píku. Mrtvý retenční čas ( $t_M$ ), je čas potřebný pro eluci látky, která není vůbec zadržována stacionární fází [3].

#### 2.1.2. Retenční faktor

Retenční (kapacitní) faktor ( $k$ ) charakterizuje míru interakce dané sloučeniny v chromatografickém systému, tzn. jak se analyty na koloně zdržují a zpožďují. Retenční faktor je závislý na parametrech, které souvisí s interakcí analytu se stacionární fází (typ stacionární fáze, složení mobilní fáze, teplota). Je tudíž nezávislý na průtoku mobilní fáze i délce kolony, proto se dá s výhodou použít k porovnání výsledků získaných na různých kolonách [4]. Je dán vztahem (1) [5].

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (1)$$

#### 2.1.3. Šířka píku

Rozlišuje se několik druhů šířky píku. Šířka píku u základny ( $w_b$ ) je úsek, který na základní linii vytínají dvě tečny vedené inflexními body na obou stranách píku. Šířka v polovině výšky píku ( $w_h$ ,  $w_{50\%}$ ) je délka úsečky vedené rovnoběžně se základní linií v 50 % výšky píku a ohraničené rameny píku. Šířka mezi inflexními body ( $w_i$ ) je délka úsečky vzniklé spojením inflexních bodů píku [3].

#### 2.1.4. Asymetrie

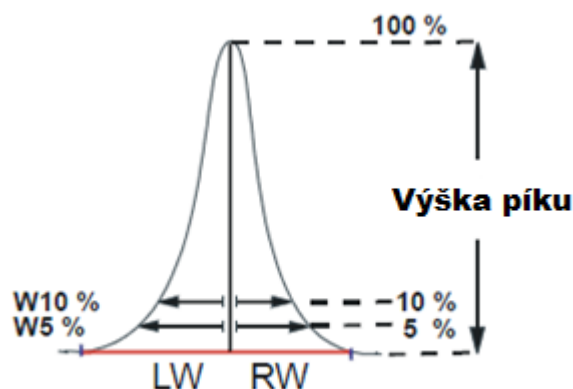
Asymetrie píku ( $A$ ) je bezrozměrný parametr, popisující tvar chromatografického píku. Pro jeho výpočet se užívá dvou různých vztahů. Americký lékopis (United States

Pharmacopeia, USP) a Evropský lékopis (European Pharmacopeia, EP) definují parametr asymetrie vztahem (2), jiný způsob výpočtu uvádí vztah (3) [6],

$$A = \frac{RW_{5\%} + LW_{5\%}}{2 \cdot LW_{5\%}} \quad (2)$$

$$A = \frac{RW_{10\%}}{LW_{10\%}} \quad (3)$$

kde  $LW_{5\%}$  a  $LW_{10\%}$  jsou levé šířky píku ve výšce píku 5 %, resp. 10 %, analogicky  $RW_{5\%}$  a  $RW_{10\%}$  jsou pravé šířky píku ve výšce 5 %, resp. 10 % (Obr. 2.1).



Obr. 2.1: Výpočet asymetrie, upraveno podle [6].

Pro ideální píky je  $A = 1$ . Pokud je hodnota  $A > 1$ , jedná se o chvostující pík (tailing), při hodnotách  $A < 1$  se hovoří o frontující pík (fronting). Hodnoty  $A > 5$  obvykle neumožňují dobré kvantitativní stanovení látky [6]. Asymetrické píky také mohou překrývat jiné píky na chromatogramu a tím znemožnit jejich stanovení.

### 2.1.5. Počet teoretických pater

Počet teoretických pater ( $N$ ) charakterizuje účinnost separace, tzn. míru rozšířování zón separovaných látek na koloně. Čím více teoretických pater, tím je separace účinnější. Počítá se podle vztahu (4) nebo (5) [3].

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (4)$$

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (5)$$

### 2.1.6. Výška teoretického patra

Výška teoretického patra ( $H$ ), někdy označována jako výškový ekvivalent teoretického patra, je definována jako podíl délky kolony  $L$  a počtu teoretických pater  $N$ , vztah (6) [3].

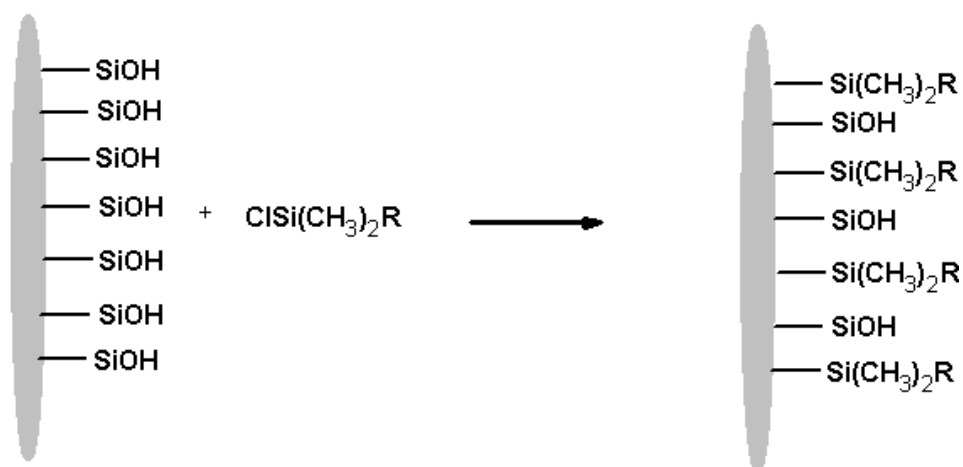
$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

## 2.2. RP-HPLC kolony

Chromatografie na obrácených fázích nejčastěji používá jako stacionární fázi částice porézního silikagelu, který je povrchově modifikovaný. Rozlišuje se silikagel typu A a B. Silikagel typu A je připravován z anorganických prekurzorů (např. křemičitan sodný) a obsahuje větší množství kovových iontů oproti silikagelu typu B, který se připravuje z organických prekurzorů (např. tetraalkoxysilan) [5,7]. Nejčastěji se vyskytující modifikace je zavedení oktadecylových skupin  $C_{18}H_{35}$  ( $C_{18}$ ), mezi další fáze patří např. fáze oktylové ( $C_8$ ), butylové ( $C_4$ ) a methylové.

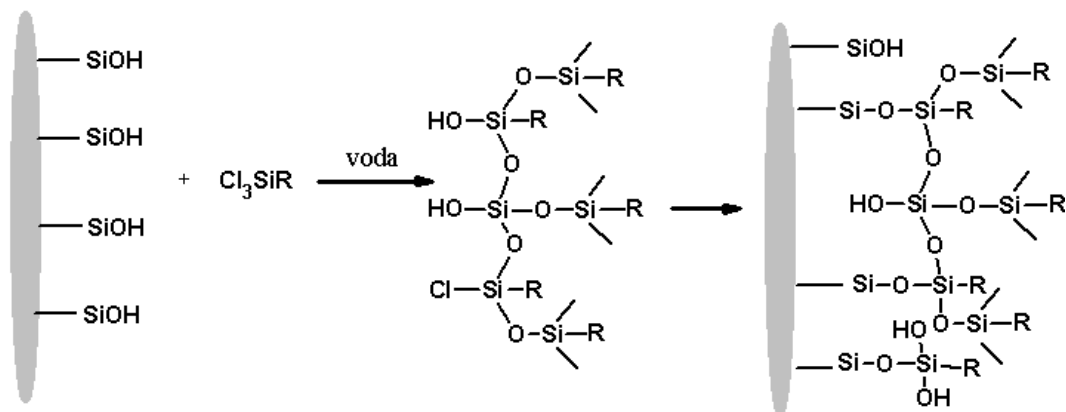
### 2.2.1. Výroba RP-fází

Výroba spočívá v reakci silikagelu s reaktivním organosilanem (halogensilan, hydroxysilan, aminosilan) v inertním rozpouštědle. Monohalogenovaný organosilan v bezvodém prostředí, obvykle za přítomnosti katalyzátoru, poskytuje monomerně vázanou fázi (Obr. 2.2) [5].

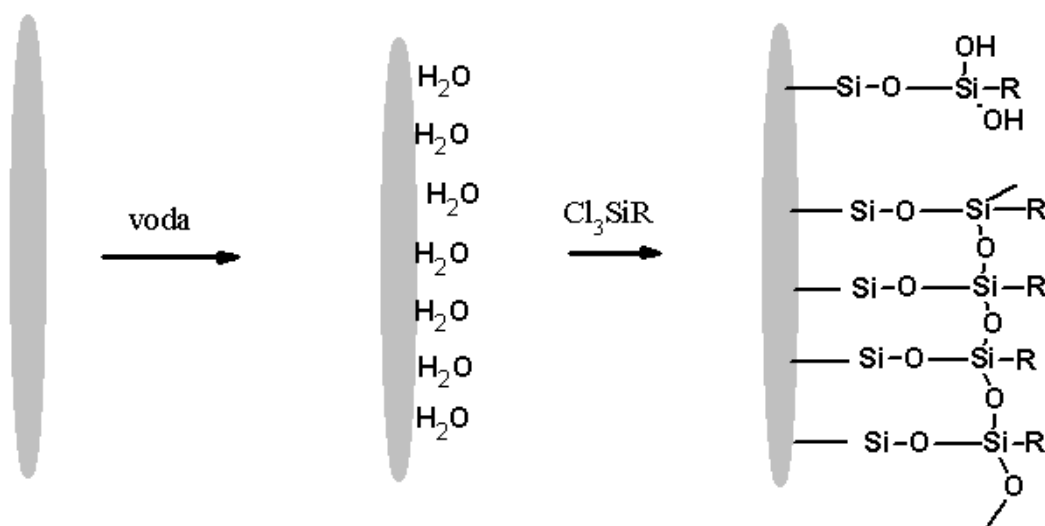


Obr. 2.2: Příprava monomerně vázané fáze, upraveno podle [5].

Použití di- a trihalogenovaných organosilanů za přítomnosti malého množství vody vede ke vzniku polymerně vázané fáze. K polymeraci může docházet buď v roztoku, nebo přímo na povrchu silikagelu (Obr. 2.3 a 2.4) [5].



Obr. 2.3: Příprava polymerně vázané fáze s polymerací v roztoku, upraveno podle [5].



Obr. 2.4: Příprava polymerně vázané fáze s polymerací na povrchu částice, upraveno podle [5].

### 2.2.2. Zbytkové silanolové skupiny

Stupeň přeměny je obvykle 50–70 %, z čehož plyne, že značná část silanolových skupin zůstává nezreagovaných [4]. Volné silanolové skupiny mohou interagovat s analytem, což může, obzvláště u bazických sloučenin, vést k chvostování píků [8]. Z tohoto důvodu se používá metoda endcapping, kdy se zbytkové skupiny nechají zreagovat s malou molekulou, např. trimethylchlorsilan či hexamethyldisilazan [5]. Kolony, které jsou určeny pro použití mobilní fáze s vysokým obsahem vody, mají

často hydrofilní endcapping [9]. V mnoha případech jsou však interakce se silanolovými skupinami důležité pro úspěšnou separaci, proto výrobci nabízejí také fáze bez endcappingu.

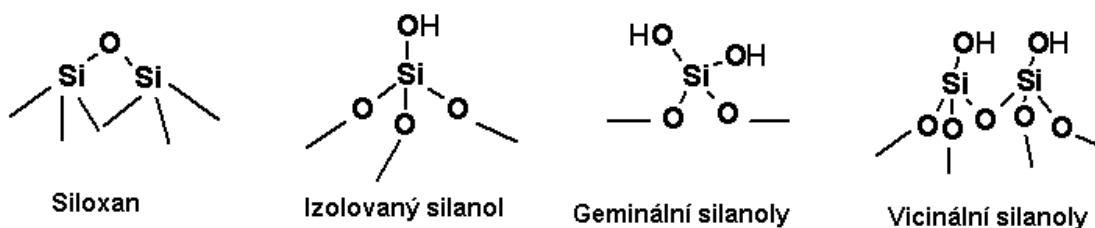
Jinou metodou omezení nežádoucího vlivu silanolových skupin je tzv. embedding. Polární molekuly jako jsou amidy, karbamáty či močovina, zabudované přímo do alkylového řetězce, vytvářejí vodíkové můstky s volnými silanolovými skupinami a tím zabraňují interakcím silanolových skupin s molekulami analytu [5].

### 2.2.3. Mechanismy separace v RP-HPLC

Při separaci na obrácených fázích působí několik druhů interakcí, jejichž příspěvek závisí na typu stacionární fáze a na struktuře analytu.

*Hydrofobní interakce* působí mezi dlouhými alkylovými řetězci stacionární fáze a nepolárními molekulami analytu [4]. Hydrofobní interakce je tím větší, čím menší je počet volných silanolových skupin interagujících s analytem, tzn. čím je vyšší hustota vázaných alkylových řetězců a čím je důkladnější endcapping.

*Polární interakce* mají v RP-HPLC významnou roli. Většina analytů totiž obsahuje polární skupiny (především atomy kyslíku a dusíku), které jsou schopny polárních nebo iontových interakcí: vodíkové můstky, iontová výměna, interakce dipól-dipól a dipól-ion. Pro polární interakce je významná koncentrace volných silanolových skupin, jejich typ (volné, vicinální, geminální, Obr. 2.5) i koncentrace a typ stopových nečistot kovových iontů (alkalické kovy, těžké kovy, hliník) [4].



Obr. 2.5: Charakteristické funkční skupiny na povrchu silikagelu, upraveno podle [5].

*Sterické interakce* umožňují rozlišit molekuly podle jejich velikosti a tvaru, což je výhodné např. pro separaci aromatických látek. Na sterickou selektivitu má vliv hustota pokrytí alkylovými řetězci i polymerní charakter fáze [4].

#### 2.2.4 Termodynamické a kinetické faktory separačního procesu

Tvar píku je při chromatografickém procesu určen především termodynamickými a kinetickými faktory. Termodynamika adsorpce je charakterizována pomocí adsorpční izotermy, což je závislost koncentrace analytu ve stacionární fázi na koncentraci analytu v mobilní fázi. V ideálním případě je tento vztah lineární a výsledný pík je dokonale symetrický. Často však dochází k odchýlkám od linearity. V jednodušších případech nelineární adsorpci popisuje Langmuirova izoterma, která je dána vztahem (7), kde  $Q$  je koncentrace analytu ve stacionární fázi,  $C$  je koncentrace analytu v mobilní fázi,  $a$  a  $b$  jsou experimentální konstanty [5].

$$Q = \frac{a.C}{1+b.C} \quad (7)$$

Některé analyty se na sorbenty v RP-HPLC kolonách vážou na dva (nebo i více) různé typy adsorpčních míst. Místa prvního typu jsou přítomna v chemicky vázané organické fázi těchto sorbentů a zaujímají většinu plochy sorbentu. Interakce analytu s těmito místy má hydrofobní charakter a relativně nízkou energii. Místa druhého typu jsou umístěna na povrchu silikagelu a zaujímají malé procento z celkové plochy sorbentu. Jedná se o interakce s polárními skupinami na povrchu silikagelu, které mají charakter polární nebo iontový (Kap. 2.2.3) a mají poměrně vysokou energii [10,11]. Tuto složitější adsorpci popisuje bi-Langmuirova izoterma (8), která vznikne rozšířením vztahu (7) [10].

$$Q = \frac{a_1.C}{1+b_1.C} + \frac{a_2.C}{1+b_2.C} \quad (8)$$

Konstanty  $a_1$ ,  $b_1$  odpovídají 1. typu adsorpčních míst a konstanty  $a_2$ ,  $b_2$  2. typu adsorpčních míst.

Kinetika adsorpce je kvantitativně určena rychlostními konstantami, které určují rychlost adsorpce/desorpce. Pokud k adsorpci dochází na dvou místech sorbentu, pro každé z nich existuje jiná rychlostní konstanta. Adsorpce na polární silanolové skupiny na povrchu silikagelu jsou charakteristické pomalejší kinetikou oproti adsorpcím na hydrofobní alkylové řetězce [10].

Výpočty ukazují, že při pomalé rychlosti adsorpce na místech 2. typu je chvostování píků pouze kinetického původu, při vysoké rychlosti adsorpce pouze termodynamického původu a při střední rychlosti adsorpce se na chvostování podílí oba

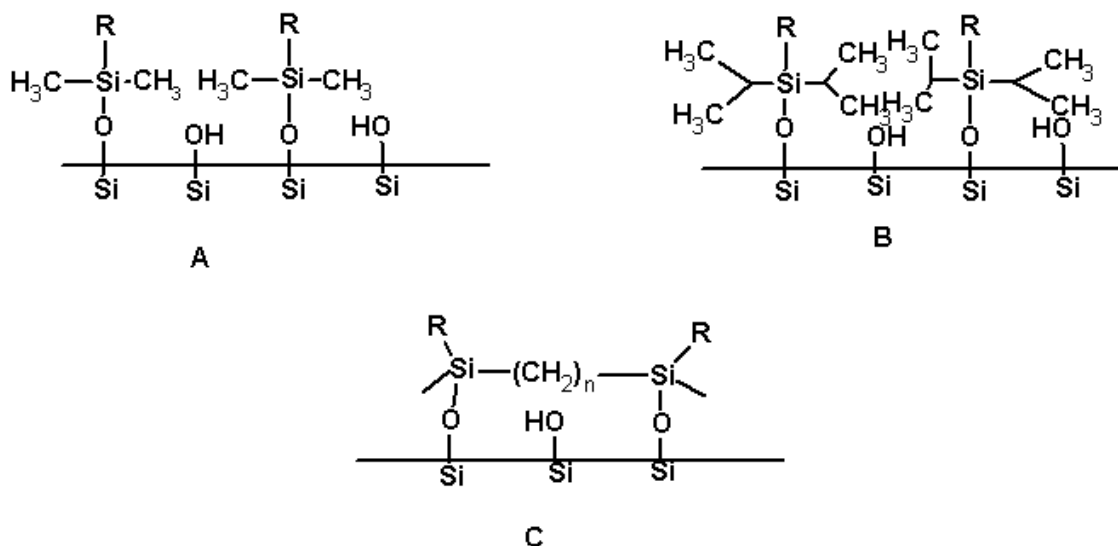
faktory. Existence dvou typů adsorpčních míst proto obecně vede k heterogenní termodynamice i kinetice separačního procesu, což má za následek chvostování píků některých analytů [10]. Z toho důvodu potlačení vlivu polárních skupin na povrchu silikagelu má velký význam pro zlepšení separace těchto analytů. Na druhou stranu polární interakce obecně zvyšují selektivitu polárních analytů, tzn. schopnost rozlišit jednotlivé polární analyty od sebe [4]. Z toho důvodu výrobci nabízí stacionární fáze i bez endcappingu, s polárním endcappingem nebo s nízkou hustotou organicky vázané fáze.

### 2.2.5 Parametry kolon a sorbentů

U kolony se udává její *délka* (mm) a *vnitřní průměr* (internal diameter, ID, mm). U sorbentů se udává *velikost částic* ( $\mu\text{m}$ ), *specifický povrch* ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), *velikost pórů* ( $\text{\AA}$ ) a *specifický objem pórů* ( $\text{ml/g}$ ). Dále bývá kromě základního údaje o typu vázané fáze (např.  $\text{C}_{18}$ ) uveden i *procentický obsah uhlíku* (carbon content), orientačně i *hustota vázané fáze* (vysoká hustota, střední hustota) a údaj o *endcappingu*, kdy se může jednat o jednoduchý, vícenásobný nebo polární endcapping. Výrobci však často nezveřejňují přesné informace o struktuře sorbentů, takže obvykle nespecifikují, jaká látka byla pro endcapping použita.

Důležitým údajem je také rozmezí pH, ve kterém mohou být kolony používány. Běžné kolony založené na silikagelu lze používat v rozmezí pH 2–8. Při  $\text{pH} < 2$  dochází k hydrolyze siloxanové vazby, která připojuje organosilan k povrchu silikagelu. Při  $\text{pH} > 8$  dochází přímo k rozpouštění silikagelu [5]. Nahrazení methylových skupin v alkyldimethylsilanových skupinách (Obr. 2.6, A) objemnějšími isopropylovými nebo isobutylovými skupinami (Obr. 2.6, B) poskytuje lepší sterickou ochranu siloxanové vazby před hydrolyzou při nízkém pH. Podobné výsledky mají i bidentátně vázané fáze (Obr. 2.6, C). Pro zvýšení odolnosti při vyšším pH se používají fáze založené na plně hydroxylovaném silikagelu s nízkou porozitou. Rozpouštění v zásadité oblasti odolávají také sorbenty s velmi čistým silikagelem [5].





Obr. 2.6: A – struktura silikagelu s navázaným dimethylalkylsiloxanem, B – struktura silikagelu stericky chráněného objemnými isopropyllovými skupinami, C – bidentátní alkylsiloxanová fáze, upraveno podle [5].

### 2.3 Vliv pH

Velká část analytů v RP-HPLC jsou látky obsahující ionizovatelné funkční skupiny, jak kyselé (karboxylovou, sulfonovou), tak bazické (aminoskupina). Retence těchto látek silně závisí na ionizaci jejich funkčních skupin a lze ji ovlivnit změnou pH mobilní fáze. Obecně platí, že neionizovaná molekula má vyšší  $t_R$  než molekula s nábojem. Kromě retenčního času může mít pH vliv i na rozšiřování píku a jeho symetrii, zvláště u sloučenin s bazickými skupinami. Protonizovaná bazická sloučenina skupina nebude, na rozdíl od své neutrální formy, interagovat se zbytkovými silanolovými skupinami [4].

Pro jednoduchou kyselinu nebo bázi lze retenci vypočítat podle vztahu (9), kde  $k_0$  je retenční faktor protonované formy,  $k_1$  retenční faktor deprotonované formy a  $d$  je stupeň deprotonace analytu [12].

$$k = \frac{k_0 + k_1 \times d}{1+d} \quad (9)$$

Stupeň deprotonace  $d$  závisí na pH mobilní fáze a disociační konstantě ( $pK_a$ ) analytu, vztah (10) [12].

$$d = 10^{pH-pK_a} \quad (10)$$

Pro dvojsytné kyseliny či báze se rovnice (10) jednoduše rozšíří na vztah (11) [12].

$$k = \frac{k_0 + k_1 \times d_1 + k_2 \times d_1 \times d_2}{1 + d_1 + d_1 \times d_2} \quad (11)$$

Z rovnice (10) plyne, že pro jednoduchý elektrolyt se retence mění v rozsahu  $pH = pK_a \pm 2$ , mimo tento interval je analyt prakticky úplně disociovaný či úplně nedisociovaný [12].

Kromě molekul analytu ovlivňuje pH i stacionární fázi. Při nízkém pH bude potlačena ionizace silanolových skupin. Při vysokém pH dochází k odštěpení  $H^+$  z volných silanolových skupin a vzniklý atom kyslíku se záporným nábojem se může účastnit iontově-výměnných reakcí a tak ovlivňovat retenci zvláště u kladně nabitých analytů [8,12]. Záporně nabitě analyty bude záporný atom kyslíku naopak odpuzovat a tím snižovat jejich retenci. Tento děj se označuje jako iontově-vytěsňovací efekt [12].

### 2.3.1 Úprava pH

Úprava pH mobilní fáze se provádí pomocí pufrů, nebo volných kyselin či bazí. Pufry jsou směsi slabých kyselin a jejich solí, nebo slabých zásad a jejich solí. pH pufru udává Henderson-Hasselbachova rovnice (12) [13].  $pK_a$  je disociační konstanta kyseliny,  $c_{deprot}$  je koncentrace deprotonované formy analytu,  $c_{prot}$  je koncentrace protonované formy analytu.

$$pH = pK_a + \log \frac{c_{deprot}}{c_{prot}} \quad (12)$$

Každý roztok pufru je charakterizovaný puфраční kapacitou, což je počet molů silné kyseliny nebo zásady, potřebných k vyvolání jednotkové změny pH jednoho litru roztoku pufru. Puфраční kapacita závisí na koncentraci pufru a na vzdálenosti pH od  $pK_a$  pufru. Oblast pH, ve které je pufr účinný je definována vztahem (13) [4].

$$pH = pK_a \pm 1,5 \quad (13)$$

Dostatečná kapacita pufru je důležitá pro dobrou reprodukovatelnost výsledků. Vhodná koncentrace pufru je kolem 50 mM. Pokud se však používá mobilní fáze s velkým zastoupením organického rozpouštědla, hrozí vysrážení pufru a je potřeba použít koncentraci nižší, např. 10 mM [4]. Místo pufrů se v HPLC běžně používají i volné kyseliny jako kyselina mravenčí či octová. Naposledy zmíněné kyseliny se často

používají v systémech, kdy je kapalinový chromatograf spojený s hmotnostním detektorem, kdy používání především anorganických netěkavých pufrů by vedlo k zanášení hmotnostního spektrometru. Tab. 2.1 udává seznam pufrů běžně používaných v HPLC.

Pufr	pKa
Fosfátový I	2,15
Formiátový	3,75
Acetátový	4,75
Fosfátový II	7,20
Amonný	9,24
Triethylamoniový	10,72
Fosfátový III	12,38

Tab. 2.1: Pufry používané v HPLC, hodnoty převzaty z [4].

## 2.4 Vliv aniontů

Bylo zjištěno, že některé malé ionty přítomné v mobilní fázi způsobují zvýšení retence protonovaných forem bazických sloučenin a zároveň s tím dochází i ke zlepšení symetrie píku. Jedná se např. o ionty  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  [14].

Bylo navrženo několik mechanismů pro tento jev [15]:

- a) Tvorba iontových párů mezi kladně nabitým analytem a aniontem a jejich retence na základě hydrofobních interakcí.
- b) Adsorpce aniontů na povrch stacionární fáze a jejich následná interakce s kladně nabitými molekulami analytu (iontoměničový mechanismus).
- c) Anionty narušují solvatační vrstvu molekul vody okolo analytu, tím zvyšují zdánlivou hydrofobicitu analytu a jeho retenci. Na základě tohoto možného mechanismu účinku se tyto anionty také označují jako chaotropní činidla.

Je pravděpodobné, že se uplatňují všechny tři uvedené mechanismy současně, avšak jen jeden je dominantní v závislosti na složení mobilní fáze, typu analytu i vlastnostech stacionární fáze [15].

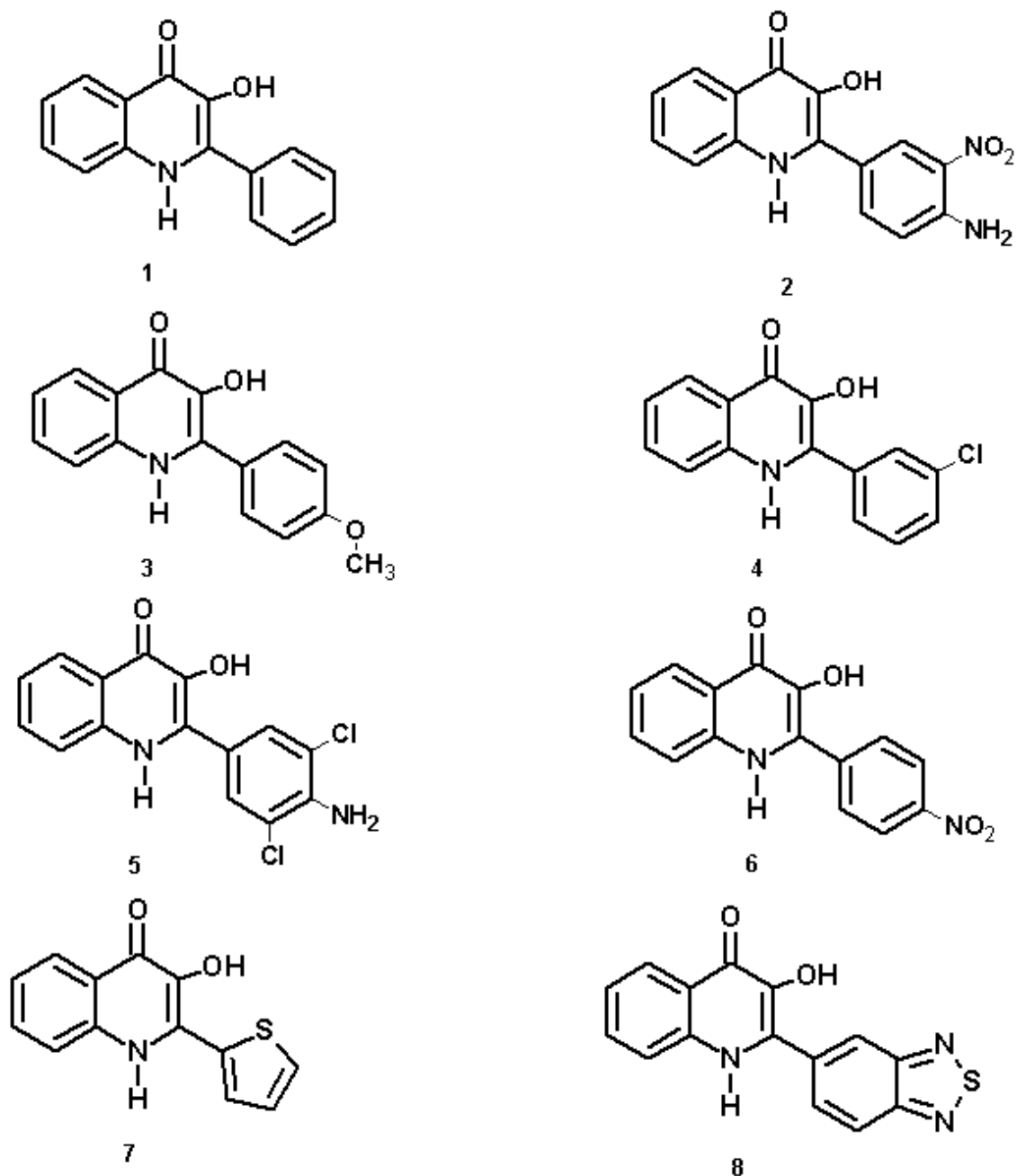
## **2.5 Metody separace 3-HQ popsané v literatuře**

V literatuře jsme našli pouze jeden článek, ve kterém se popisuje separace 3-HQ metodou RP-HPLC [16]. Je zde popsáno zlepšení tvaru píku molekuly 3-HQ přidáním EDTA do kyselé mobilní fáze. Byla použita kolona Phenomenex Gemini C<sub>18</sub>, temperovaná na 50 °C. Zlepšení separace autoři vysvětlují snížením interakce molekul 3-HQ s podložním silikagelem vlivem EDTA, kdy EDTA komplexuje ionty kovů přítomné v podložním silikagelu, čímž znemožňuje vytváření komplexů iontů kovů s molekulami 3-HQ.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Zkoumané látky

Bylo zkoumáno 8 vybraných 3-hydroxy-4(*1H*)-chinolonů syntetizovaných na Katedře organické chemie (Obr. 3.1) [1,17,18].



Obr. 3.1: Struktury zkoumaných látek.

## 3.2 Instrumentální vybavení

### 3.2.1 pH metr

Měření pH byla prováděna na pH metru Orion A410 s kombinovanou pH elektrodou Schott BlueLine.

### 3.2.2 Kapalinový chromatograf

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu HPLC Dionex s pumpou P680 a PDA detektorem (PDA 100) a na semipreparativním vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent Series s UV-VIS detektorem. Dávkování bylo prováděno stříkačkou Hamilton pomocí šesticestného manuálního ventilu s dávkovacími smyčkami 20  $\mu$ l (HPLC Dionex) a 1000  $\mu$ l (HPLC Agilent). Průtok byl 0,8 ml/min pro kolonu Nucleodur, 1 ml/min pro kolonu Nucleosil, 1,5 ml/min pro kolonu Synergi Hydro-RP a 10 ml/min pro kolonu YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>. Všechna měření byla provedena izokratickou elucí, objemové složení mobilní fáze bylo 60 % voda – 40 % organická fáze. Typ organické fáze je blíže specifikován v Kap. 4 Výsledky a diskuse.

Měření bylo záznamem pro vlnovou délku 262 nm. Chromatogramy byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programu Chromeleon, verze 6.60.

### 3.2.3 Chromatografické kolony

Byly použity kolony Nucleosil C<sub>18</sub>, Nucleodur C<sub>18</sub> Gravity (obě Macherey-Nagel) a Synergi Hydro-RP (Phenomenex) pro separaci na HPLC Dionex. Kolona YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> sloužila pro ověření podmínek pro semipreparativní separaci na HPLC Agilent.

#### 3.2.3.1 *Nucleosil C<sub>18</sub>*

Parametry kolony: délka 125 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 3  $\mu$ m, velikost pórů 100 Å, specifický objem pórů 1,0 ml/g, specifický povrch 350 m<sup>2</sup>/g, obsah uhlíku 15 %. Silikagel je plně porézní, sférický a velmi čistý. Kolona má střední hustotu oktadecylové modifikace a endcapping. Je stabilní v rozmezí pH 2–8. Při separaci se uplatňují hydrofobní interakce a polární interakce se zbytkovými silanolovými skupinami [8].

#### 3.2.3.2 *Nucleodur C<sub>18</sub> Gravity*

Parametry kolony: délka 150 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 3  $\mu$ m, velikost pórů 110 Å, specifický objem pórů 0,9 ml/g, specifický povrch 340 m<sup>2</sup>/g, obsah uhlíku 18 %. Silikagel má plně sférický tvar částic a vysokou odolnost vůči tlaku (až 800 barů).

Oktadecylová modifikace má vysokou hustotu a několikanásobný endcapping. Tím jsou výrazně potlačeny polární interakce. Díky nízké koncentraci stopových prvků a speciální technologii povrchové modifikace je kolona stabilní v rozmezí pH 1–11 [8].

### **3.2.3.3 Synergi Hydro-RP**

Parametry kolony: délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, velikost částic 4  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 80 Å, specifický objem pórů 1.05 ml/g, specifický povrch 475  $\text{m}^2/\text{g}$ , obsah uhlíku 19 %. Silikagel je hustě modifikovaný oktadecylovými skupinami, jako endcapping je použita polární látka. Kolona je stabilní v rozmezí pH 1,5–7,5. Při separaci se uplatňují převážně hydrofobní interakce, avšak díky polárnímu endcappingu jsou přítomny i polární interakce [9]. Výrobce neuvádí, o jaký polární endcapping se jedná.

### **3.2.3.4 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>**

Parametry kolony: délka 100 mm, vnitřní průměr 20 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 120 Å, specifický povrch 330  $\text{m}^2/\text{g}$ , obsah uhlíku 16 %. Vysoce čistý silikagel je modifikovaný oktadecylovými skupinami a následným endcappingem. Stabilita kolony je v rozmezí pH 2–8 [19].

## **3.3 Chemikálie**

Acetonitril pro HPLC, voda pro HPLC, methanol pro HPLC, tetrahydrofuran pro HPLC, kyselina trifluoroctová 99% p. a., kyselina mravenčí 50% pro HPLC, kyselina octová 99% p. a., octan amonný p. a., chlorid amonný p. a., hydroxid draselný p. a., disodná sůl EDTA (Chelaton 3) p. a., testovací směs pro HPLC s uracilem ( $c = 7 \mu\text{g}/\text{ml}$ ).

## **3.4 Příprava vzorků**

Byly připraveny roztoky zkoumaných látek v methanolu o koncentraci 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (HPLC Dionex) a 1  $\text{mg}/\text{ml}$  (HPLC Agilent).

## **3.5 Úprava pH mobilních fází**

Při úpravě mobilních fází bylo pH měřeno pH metrem, který byl kalibrován pomocí pufrů o hodnotách pH 4,00 a 7,01.

Pomocí kyseliny trifluoroctové byly upraveny mobilní fáze na hodnoty pH 1,7 a 2,1. Kyselina trifluoroctová byla následně přidána i do acetonitrilu tak, aby koncentrace kyseliny ve vodě i acetonitrilu byly totožné.

Pomocí kyseliny mravenčí byly upraveny mobilní fáze na hodnoty pH 2,8 a 2,7. Úprava byla provedena analogickým způsobem jako v případě kyseliny trifluoroctové.

Hodnoty pH 3 bylo dosaženo formiátovým pufrem, pH 5 acetátovým pufrem, pH 7,8 a pH 9 amonným pufrem. Koncentrace pufrů byla 0,01 M. Na rozdíl od úpravy kyselinami, pufrы byly přidány pouze do vody, nikoli do acetonitrilu. Pro úpravu pH mobilní fáze byly voleny především těkavé pufrы s ohledem na možnou aplikaci podmínek separace pro HPLC s hmotnostní detekcí.



## 4 Výsledky a diskuse

Chromatografické chování jednotlivých 3-HQ bylo sledováno pomocí vybraných chromatografických parametrů: retenční čas ( $t_R$ ), asymetrie píku ( $A$ ), šířka píku ( $w_h$ ), počet teoretických pater ( $N$ ), výška teoretického patra ( $H$ ) a retenční faktor ( $k$ ). Hodnoty asymetrie píku uvedené v této práci byly vypočítány podle vztahu (3), uvedeného v Kap. 2.1.4, hodnoty počtu teoretických pater byly vypočítány podle vztahu (5) v Kap. 2.1.5. Hodnoty šířky píku byly změřeny v 50 % výšky píku. Mrtvý čas pro výpočet retenčního faktoru byl určen experimentálně pomocí uracilu.

### 4.1 Analytické kolony

Pro studium analytické separace 3-HQ byly vybrány tři kolony se silikagelem modifikovaným oktadecylovými skupinami (C18), které se lišily některými vlastnostmi (délka kolony, velikost částic, hustota modifikace silikagelu, typ endcappingu). Jednotlivé kolony jsou blíže popsány v Kap. 3.2.3. Tabulky s konkrétními hodnotami chromatografických parametrů jsou uvedeny pro přehlednost v Příloze (Kap. 7).

#### 4.1.1 Kolona Nucleosil

Na této koloně byl nejprve zjištěn vliv složení mobilní fáze a pH na chromatografické chování látky **1** a poté byly pro nejlepší nalezené podmínky proměřeny všechny zkoumané látky.

##### 4.1.1.1 Vliv složení mobilní fáze

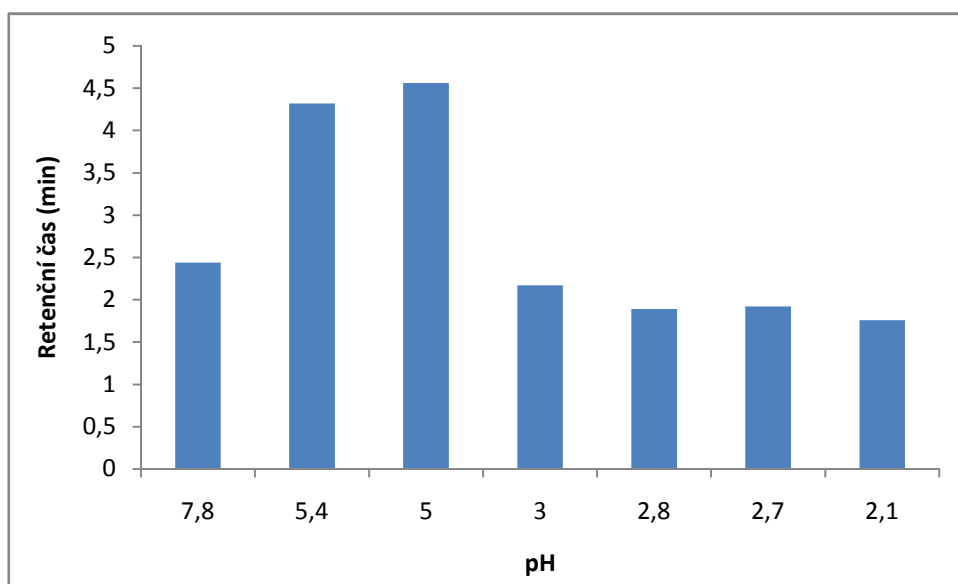
Nejprve byly testovány různé mobilní fáze (voda/acetonitril, voda/methanol, voda/tetrahydrofuran) a jejich vliv na sledované chromatografické parametry při pH 5,4 (Tab. 7.1). *Retenční čas* pro různé mobilní fáze (při objemovém poměru 60 % voda, 40 % organické rozpouštědlo) klesal v pořadí voda/tetrahydrofuran, voda/methanol, voda/acetonitril. Ve stejném pořadí klesaly i hodnoty *asymetrie píku* a *šířky píku* a naopak rostl *počet teoretických pater*. Relativně nejlepší výsledek ( $A = 6,15$ ,  $w_h = 2,03$ ,  $N = 25$ ) poskytovala mobilní fáze ve složení voda/acetonitril. Následně byl zkoumán vliv pH při konstantním poměru voda/acetonitril v mobilní fázi. Všechna následující měření proto byla provedena při složení mobilní fáze 60 % vody, 40 % acetonitrilu a bylo pouze měněno pH mobilní fáze.

#### 4.1.1.2 Vliv pH

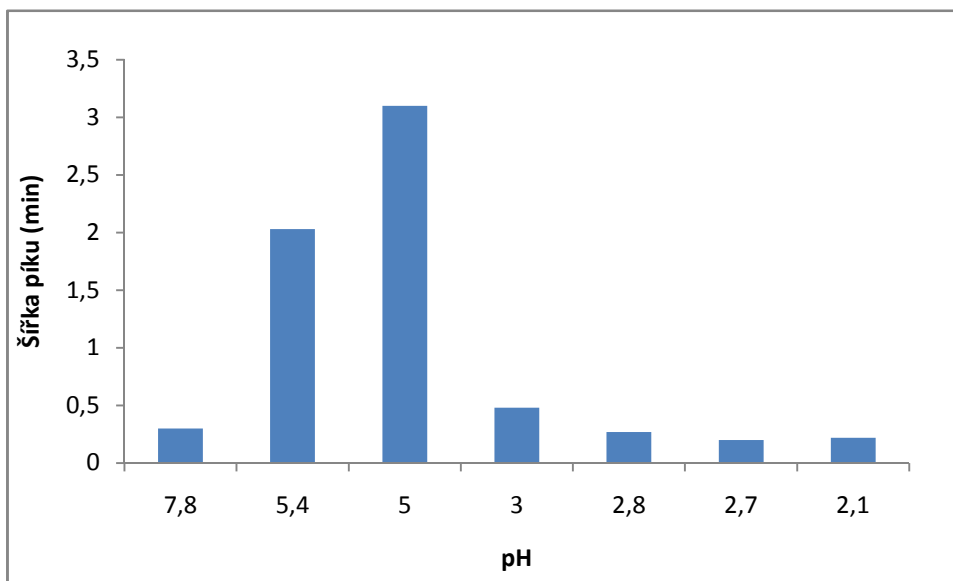
Naměřené výsledky vlivu pH na chromatografické chování látky **1** jsou uvedeny v Tab. 7.2. Závislost *retenčního času* na pH (Obr. 4.1) dosáhla maxima při hodnotě pH 5. Při použití kyselé mobilní fáze s hodnotou pH 3 došlo k výraznému poklesu retenčního času, při dalším snižování hodnoty pH se již retence výrazněji neměnila. V mírně alkalické oblasti (pH 7,8) došlo také k výraznému poklesu retenčního času oproti maximální hodnotě při pH 5. Vyšší hodnoty pH nebyly testovány s ohledem na výrobcem doporučené rozmezí pH.

Velmi podobnou závislost na pH vykazovala i *šířka píku* (Obr. 4.2). Maximální hodnoty dosáhla při pH 5 a při změně pH směrem do kyselé i zásadité oblasti dochází k poklesu, nejnižší hodnotu má při pH 2,7.

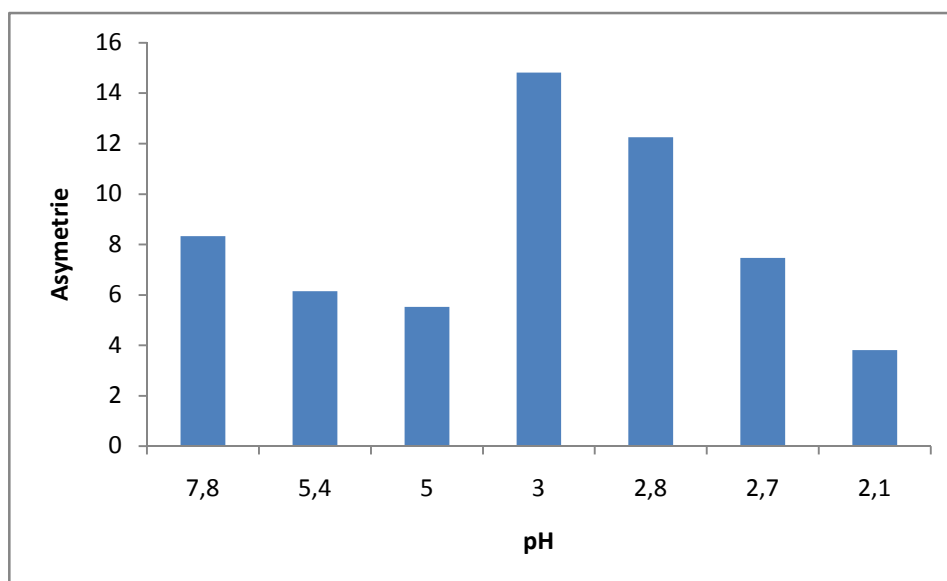
*Asymetrie píku* (Obr. 4.3) má nejvyšší hodnotu při pH 3 ( $A = 14,82$ ), avšak i při nejnižší hodnotě pH 2,1 dosahuje poměrně vysoké hodnoty ( $A = 3,81$ ). *Počet teoretických pater* (Obr. 4.4) má nejvyšší hodnotu při pH 2,7 ( $N = 515$ ) a nejnižší hodnotu při pH 5 ( $N = 12$ ).



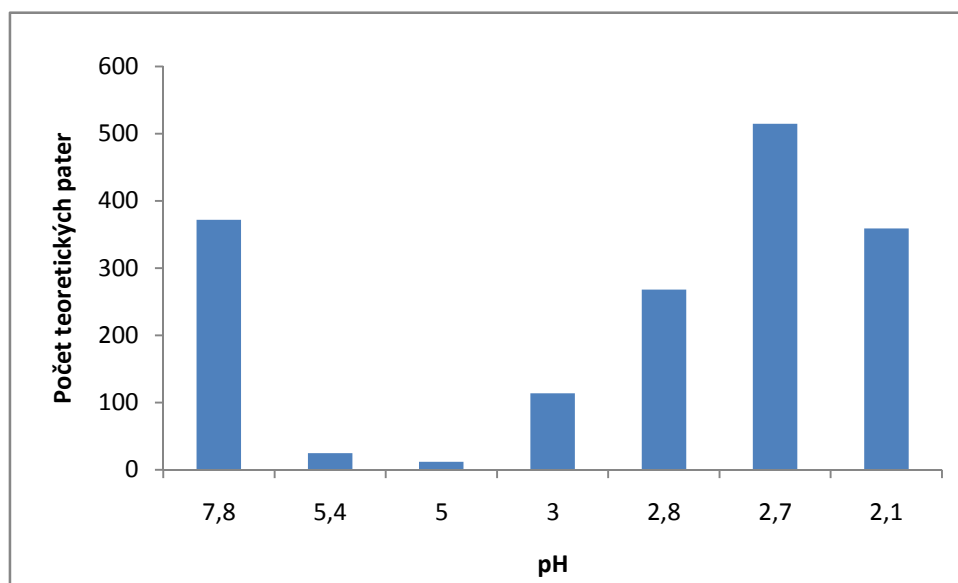
Obr. 4.1: Závislost retenčního času na pH pro látku **1**, kolona Nucleosil.



Obr. 4.2: Závislost šířky píku na pH pro látku 1, kolona Nucleosil.

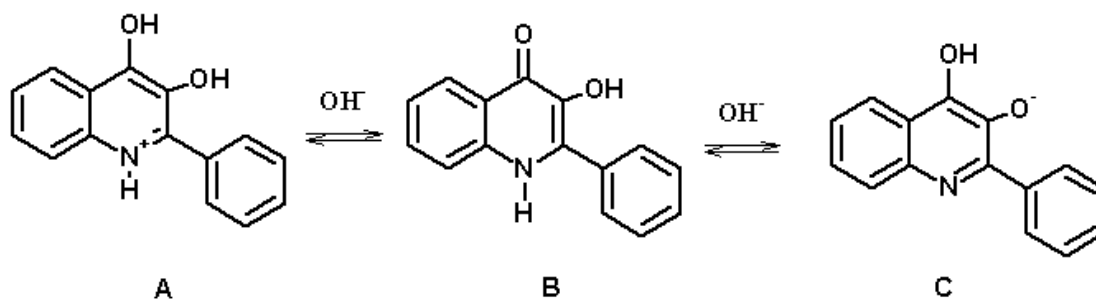


Obr. 4.3: Závislost asymetrie píku na pH pro látku 1, kolona Nucleosil.



Obr. 4.4: Závislost počtu teoretických pater na pH pro látku **1**, kolona Nucleosil.

V literatuře nebyly nalezeny žádné údaje popisující acidobazické chování 3-HQ (zejména disociační konstanty), ze kterých by bylo možno vycházet při vysvětlení popsaného chromatografického chování. Nicméně byly publikovány data o acidobazickém chování 3-hydroxychinolinu [20]. Protože se jedná o strukturně blízkou látku, předpokládáme podobné acidobazické chování také pro 3-HQ (Obr. 4.5).

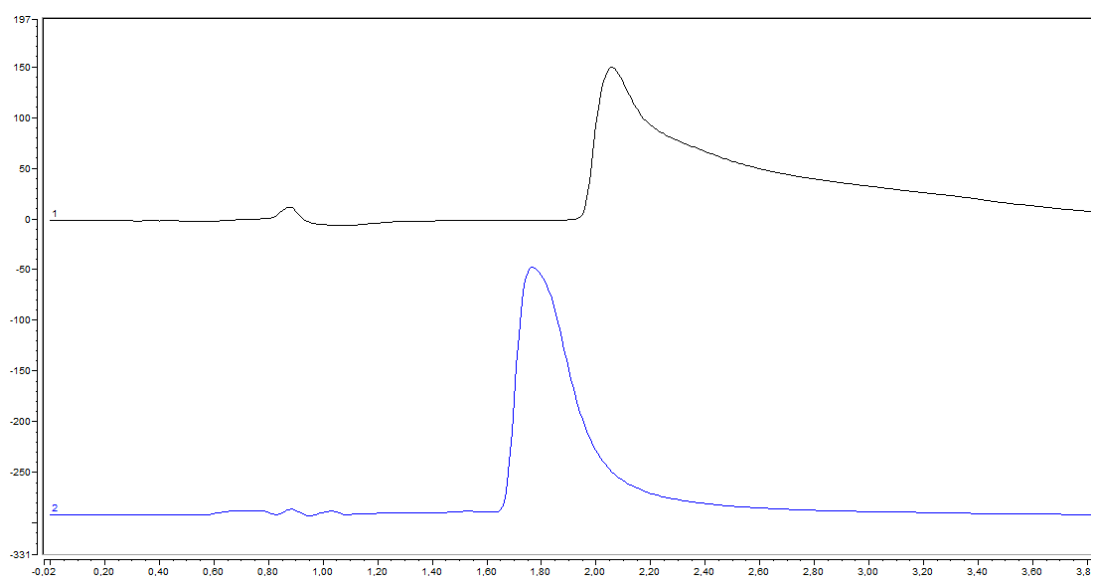


Obr. 4.5: Předpokládané acidobazické chování látky **1**.

Je-li předpokládáno podobné chování 3-hydroxychinolinu a 3-HQ ( $pK_{A1, 3\text{-hydroxychinolin}} = 4,30$ ,  $pK_{A2, 3\text{-hydroxychinolin}} = 8,06$ ), potom v silně kyselém pH (pH 2,3 a nižší) převažuje kladně nabitá struktura A, při pH okolo 4,3 se vyskytují struktury A a B v poměru 1:1, při pH 6 převažuje neutrální struktura B, při pH okolo 8 se vyskytují struktury B a C v poměru 1:1 a v zásadité oblasti pH (10 a více) převažuje záporně nabitá struktura C. Struktury s nábojem jsou poté na koloně zadržovány méně než nenabitá struktura. Zároveň jsou ionizací molekul analytu minimalizovány interakce se zbytkovými

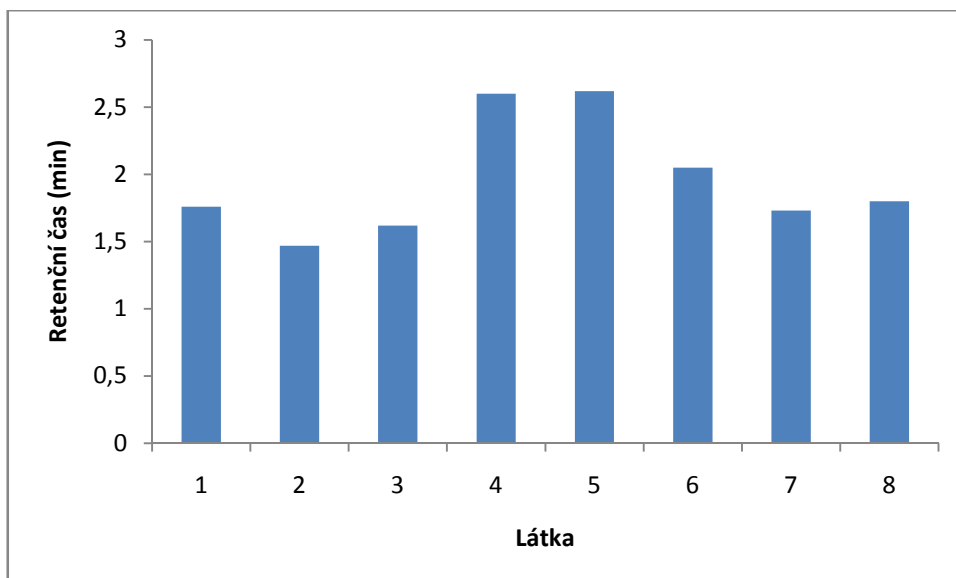
silanolovými skupinami, tím dochází ke zjednodušení mechanismu adsorpce, což vede ke zlepšení parametru asymetrie i k nižší hodnotě šířky píku.

Z uvedených hodnot sledovaných chromatografických parametrů vyplývá, že nejlepší hodnoty pro látku **1** byly zjištěny pro silně kyselé pH (nejvyšší počet teoretických pater a nejnižší hodnota šířky píku při pH 2,7, nejnižší hodnota asymetrie při pH 2,1, Obr. 4.6).



Obr. 4.6: Srovnání chromatogramů látky **1** při pH 3,0 (nahore) a pH 2,1 (dole), kolona Nucleosil.

Při pH 2,1 byla provedena měření dalších zkoumaných látek (Tab. 7.3). Bylo zjištěno, že pro žádnou ze zkoumaných látek nebylo dosaženo nízké hodnoty asymetrie ani příliš velkého počtu teoretických pater. Nejnižší hodnota  $A$  byla naměřena pro látku **1**, nejvyšší hodnota pro látku **8**. Ze srovnání retenčních časů všech látek při pH = 2,1 (Obr. 4.7) vyplývá, že nejvyšších retenčních časů bylo dosaženo pro látky obsahující v molekule atomy chloru (látky **4** a **5**), nejnižší hodnota  $t_R$  byla pozorována pro látku **2**.

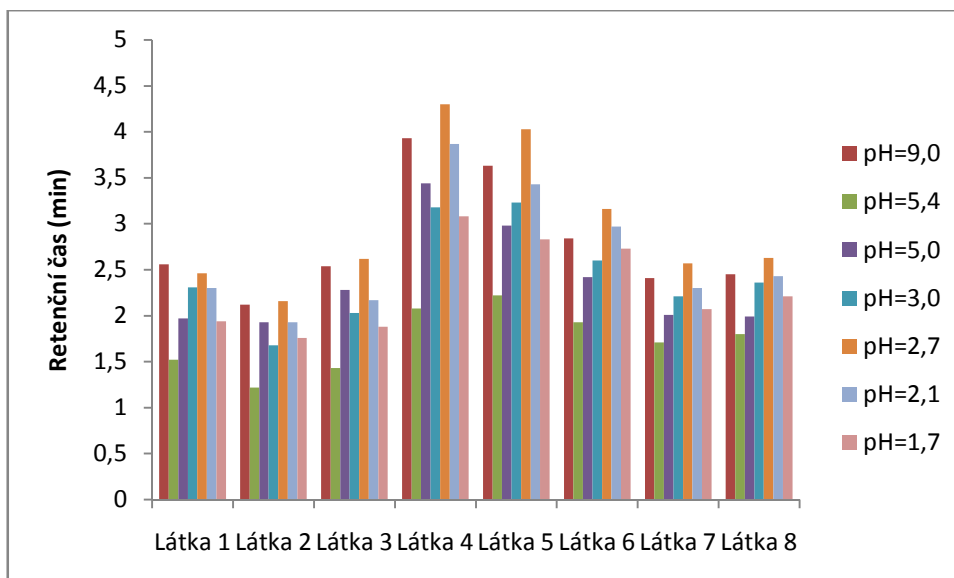


Obr. 4.7: Srovnání retenčních časů pro všechny měřené látky při pH 2,1, kolona Nucleosil.

#### 4.1.2 Kolona Nucleodur

Na koloně Nucleodur byl sledován vliv pH na chromatografické chování všech studovaných látek při konstantním složení mobilní fáze (60 % voda, 40 % acetonitril).

Závislost *retenčního času* na pH (Tab. 7.4, Obr. 4.8) vykazovala nejnižší hodnotu pro všechny látky při pH 5,4. U většiny látek byla pozorována nejvyšší hodnota  $t_R$  při pH 2,7 (látky **2** až **8**), u látky **1** byla nejvyšší hodnota při pH 9,0. U všech látek bylo pozorováno, že pro nízké hodnoty pH (1,7, 2,1, 2,7)  $t_R$  klesá s klesající hodnotou pH. Srovnáním retenčních časů jednotlivých látek při stejném pH je vidět podobná závislost jako u kolony Nucleosil. Opět dochází k největšímu zadržování látek **4** a **5**.



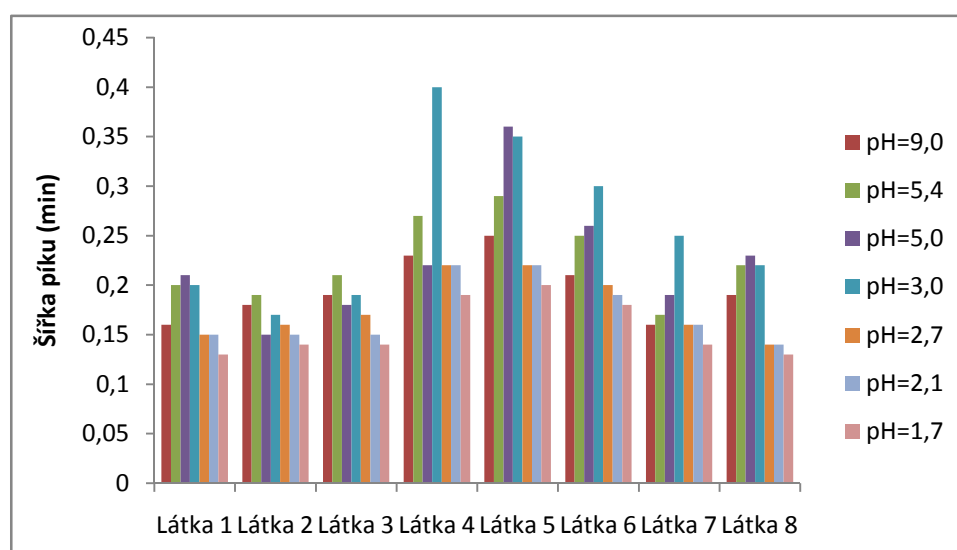
Obr. 4.8: Závislost retenčního času na pH, kolona Nucleodur.

Pozorovaná závislost  $t_R$  na pH je značně odlišná ve srovnání s kolonou Nucleosil, kdy naopak nejvyšší hodnota  $t_R$  byla pozorována pro slabě kyselý pH (5) a s klesajícím i vzrůstajícím pH retence klesala. Rozdíl mezi oběma kolonami je možné vysvětlit odlišnými vlastnostmi stacionárních fází, kolona Nucleodur má vyšší hustotu organicky vázané fáze a důkladnější endcapping oproti koloně Nucleosil (Kap. 3.2.3). U kolony Nucleodur proto nehrají tak velkou roli interakce analytu s polárními skupinami na povrchu silikagelu. Tyto interakce se týkají především nenabitých molekul analytu, což by vysvětlovalo nízkou retenci na koloně Nucleodur oproti koloně Nucleosil v oblasti slabě kyselého pH (5,4). Významný vliv mohou mít i anionty z přidávaných pufrů či kyselin. Např. interakcí formiátového aniontu s kladně nabitým atomem dusíku v molekule 3-HQ by mohlo docházet k tvorbě slabého iontového páru a tím ke zvýšení retence, což by vysvětlovalo velkou retenci zkoumaných látek při pH 2,7, při kterém byla použita k okyselení mobilní fáze kyselina mravenčí. Možné jsou i jiné mechanismy účinku aniontů (Kap. 2.4). Z naměřených výsledků je zřejmé, že chromatografické chování 3-HQ nelze vysvětlit jen jejich acidobazickým chováním.

Nejvyšší hodnoty *šířky píků* (Tab. 7.5, Obr. 4.9) byly pozorovány pro hodnoty pH 3 u látek **4**, **6** a **7**, pH 5 u látek **1**, **5**, a **8**, a pH 5,4 u látek **2** a **3**. Nejnižší hodnoty byly naměřeny pro všechny zkoumané látky při pH 1,7. Pozorované závislosti hodnot šířky píku na pH jsou podobné výsledkům naměřeným pro kolonu Nucleosil.

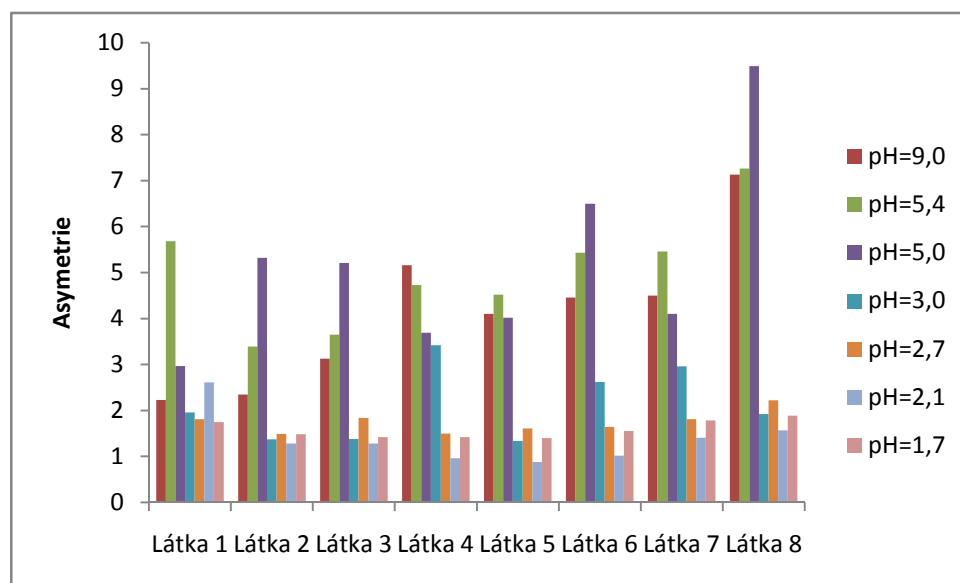
Nízké hodnoty *asymetrie* (Tab. 7.6, Obr. 4.10) byly pozorovány při pH v rozmezí od 1,7 do 2,7 (Obr. 4.11). V tomto rozmezí pH dosahovala asymetrie píků hodnot menších než 2 (kromě látky **1** při pH 2,1 a látky **8** při pH 2,7). V případě látek **4** a **5** při pH 2,1 byla hodnota asymetrie dokonce nižší než 1, tzn. docházelo k mírnému frontování. Při pH 9 je pro látky **1**, **2** a **3** asymetrie poměrně nízká, pro ostatní pH však dosahuje vysokých hodnot.

*Počet teoretických pater* (Tab. 7.7, Obr. 4.12) dosahoval vysokých hodnot při nízkých hodnotách pH, zvláště při pH 2,7, při pH 9 dosahoval s výjimkou látky **8** také relativně vysokých hodnot.

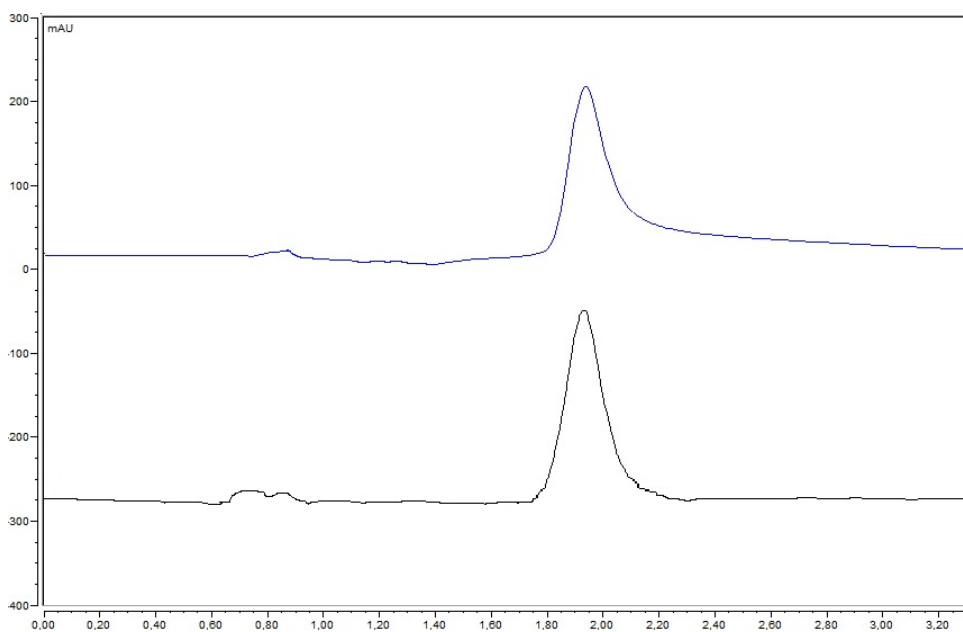


Obr. 4.9: Závislost šířky píku na pH, kolona Nucleodur.

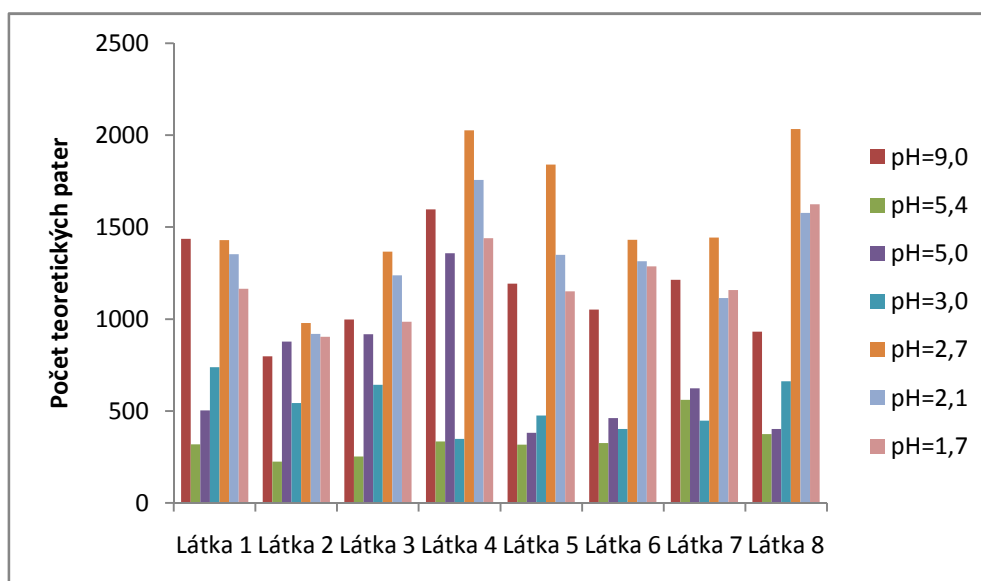




Obr. 4.10: Závislost asymetrie na pH, kolona Nucleodur.



Obr. 4.11: Srovnání chromatogramů pro látku 2 při pH 5 (nahore) a 2,1 (dole), kolona Nucleodur.



Obr. 4.12: Závislost počtu teoretických pater na pH, kolona Nucleodur.

#### 4.1.3 Kolona Synergi Hydro-RP

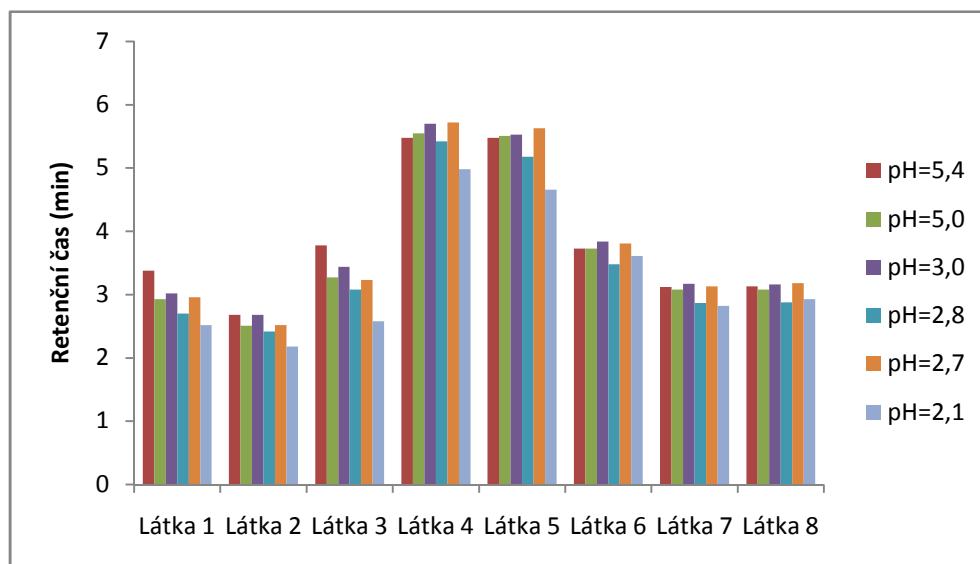
Na koloně Synergi Hydro-RP byl sledován vliv pH a vliv EDTA na chromatografické chování studovaných látek, složení mobilní fáze bylo stejné jako v případě kolon Nucleosil a Nucleodur (60 % voda, 40 % acetonitril).

##### 4.1.3.1 Vliv pH

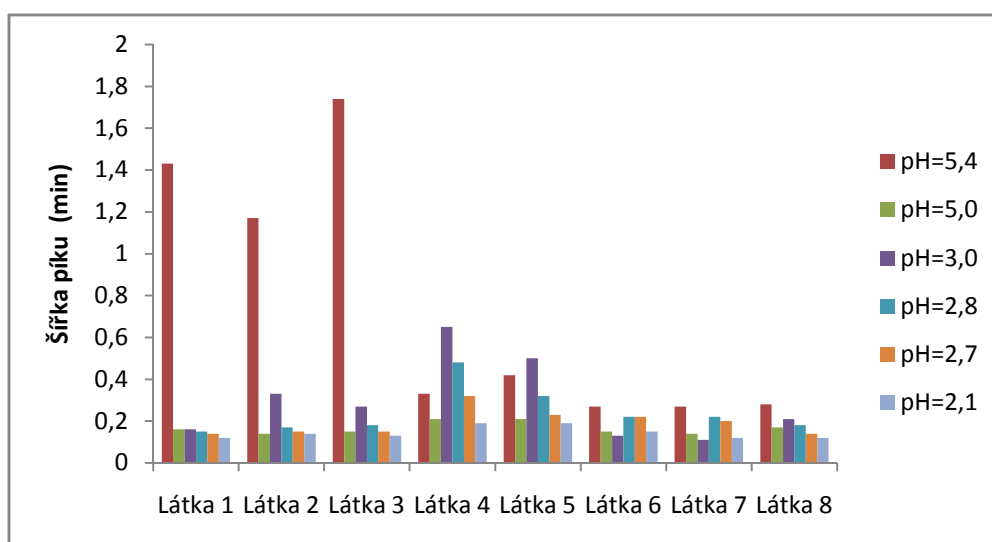
Překvapivě bylo pozorováno, že *retenční časy* (Tab. 7.8, Obr. 4.13) se pro jednotlivá pH příliš neliší. Byl zde patrný trend mírného snižování  $t_R$  s klesajícím pH, avšak při pH 2,7 docházelo ke zvýšení  $t_R$ , a v případě látek **4**, **5** a **8** bylo dokonce  $t_R$  nejvyšší při této hodnotě pH. Vysvětlením by opět mohl být vznik iontových párů mezi formiátovým aniontem a chinoloniovým kationtem (Kap. 2.4). Hodnoty pH 2,7 i 2,8 bylo dosaženo pomocí kyseliny mravenčí. Při vyšší koncentraci kyseliny při pH 2,7 docházelo i ke zvýšení retence, což podporuje předpoklad o vlivu formiátového iontu na chromatografické chování chinolonů.

*Šířka píku* (Tab. 7.9, Obr. 4.14) vykazovala klesající hodnoty se snižujícím se pH. S poklesem pH docházelo také ke snižování *asymetrie* (Tab. 7.10, Obr. 4.15 a 4.16). Pro hodnoty pH 2,8, 2,7 a 2,1 byly hodnoty asymetrie většinou pod hodnotou 2,0 a v mnoha případech docházelo i k frontování (hodnoty nižší než 1). Naměřené hodnoty byly v souladu s diskutovanými daty pro předchozí testované kolony.

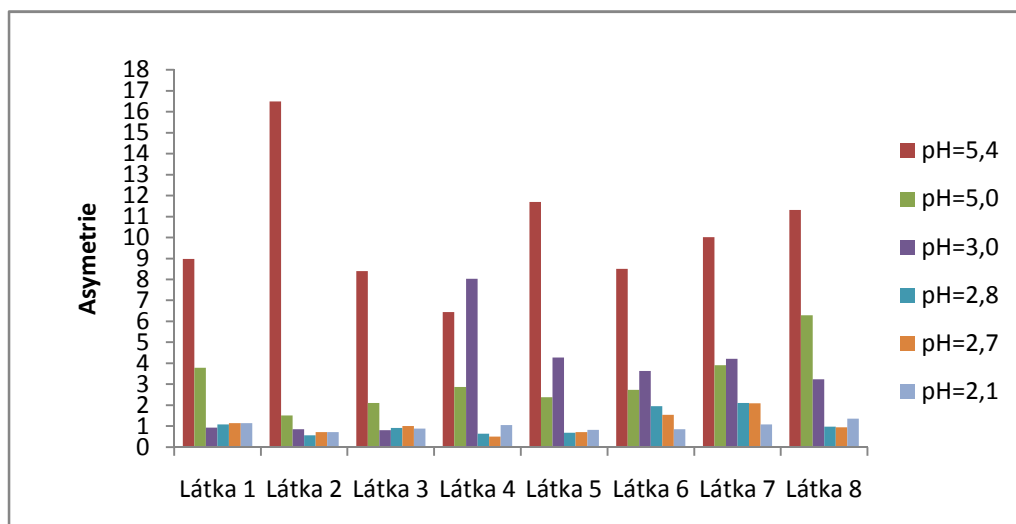
Nejvyššího počtu teoretických pater (Tab. 7.11, Obr. 4.17) bylo dosaženo pro látku 1 při pH 2,7, pro látky 2, 3, 4 a 5 při pH 5, pro látky 6 a 7 při pH 3 a pro látku 8 při pH 2,1. Pro všechny látky byla hodnota nízká při pH 5,4.



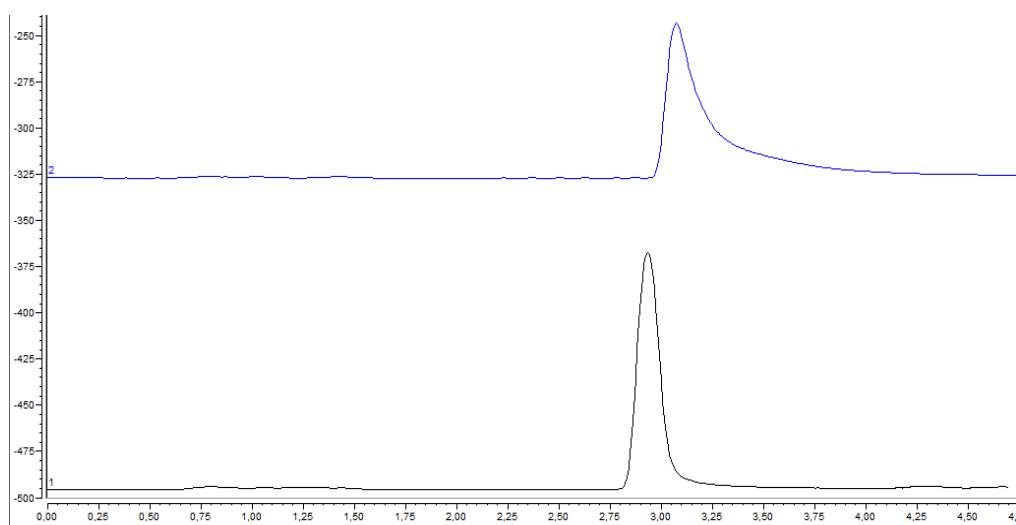
Obr. 4.13: Závislost retenčního času na pH, kolona Synergi Hydro-RP.



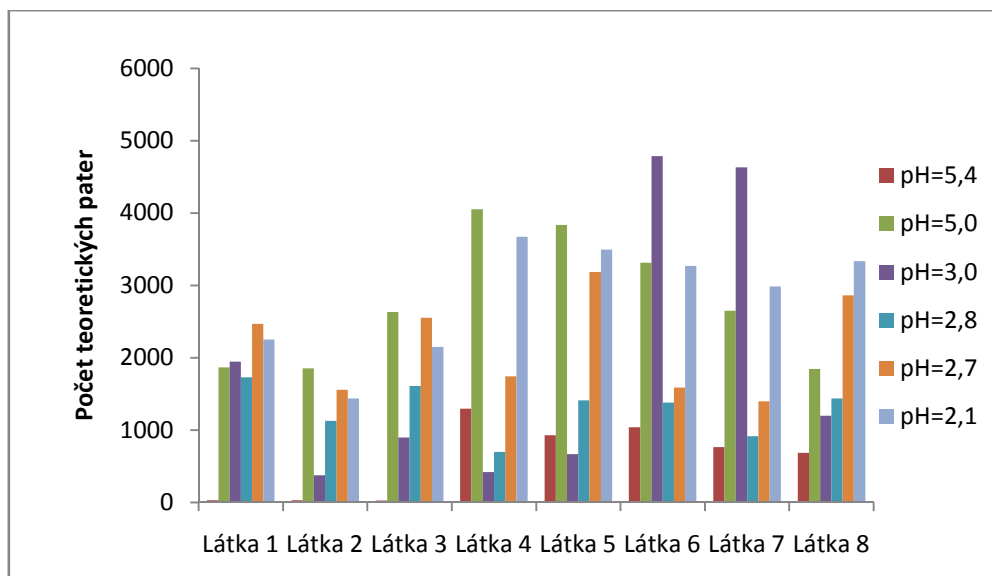
Obr. 4.14: Závislost šířky píku na pH, kolona Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.15: Závislost asymetrie na pH, kolona Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.16: Srovnání chromatogramů pro látku 8 při pH 5,0 (nahore) a 2,1 (dole), kolona Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.17: Závislost počtu teoretických pater na pH, kolona Synergi Hydro-RP.

#### 4.1.3.2 Vliv EDTA

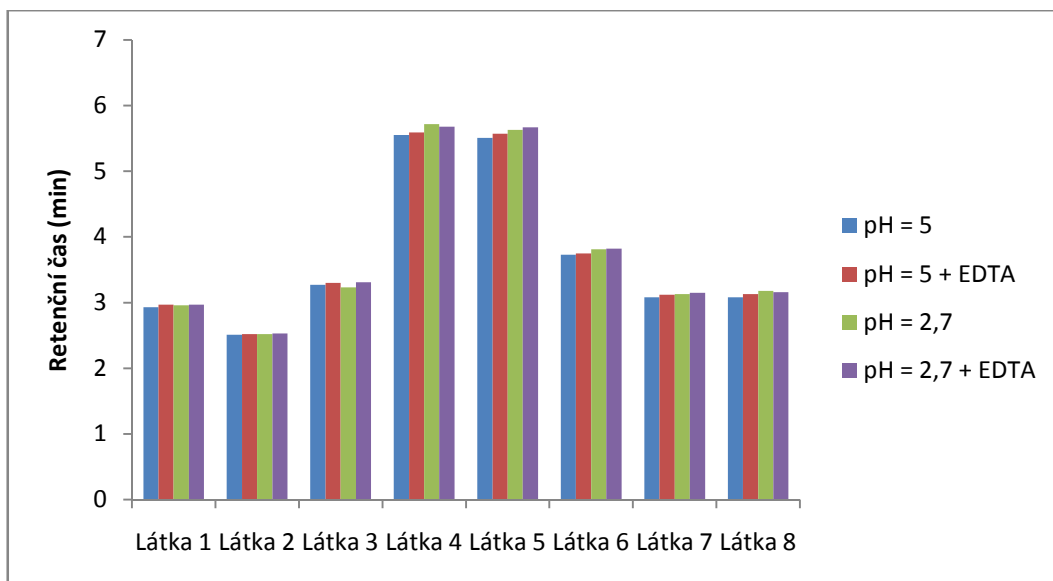
V literatuře byla publikována separace 3-HQ s použitím ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), která měla eliminovat vznik chelátů chinolonů s kovy přítomnými v koloně a tím zlepšovat parametry separace [20] (Kap. 2.5). Rozhodli jsme se vyzkoušet vliv EDTA na chromatografické chování chinolonů na koloně Synergi Hydro-RP.

Vliv EDTA ( $c_{\text{EDTA}} = 200 \mu\text{M}$ ) byl měřen při pH 5 a pH 2,7. Ze srovnání *retenčních časů* (Tab. 7.12, Obr. 4.18) plyne, že přidavek EDTA měl jen minimální vliv na retenci analytů.

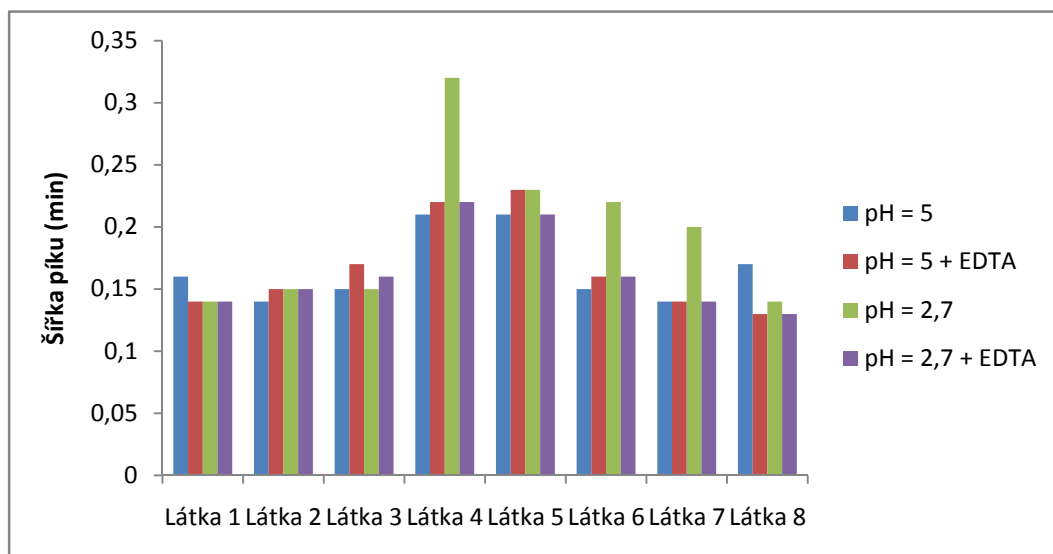
Pro hodnoty *šířky píků* (Tab. 7.13, Obr. 4.19) byl výsledek pro mobilní fázi s EDTA nižší při pH 2,7 u látek **4**, **5**, **6**, **7** a **8** a při pH 5 u látek **1** a **8**, v ostatních případech neměl přidavek EDTA prakticky vliv. U parametru *asymetrie píku* (Tab. 7.14, Obr. 4.20) také nebyl pozorován jednoznačný vliv přidavku EDTA na jeho hodnotu.

*Počet teoretických pater* (Tab. 7.15, Obr. 4.21) je u látek **2**, **4**, **5**, **6**, **7** a **8** při pH 2,7 nižší bez přidavku EDTA, pro látky **1**, **2** a **3** je N při tomto pH přibližně stejné. Přidavek EDTA dále zvyšuje hodnotu N při pH 5 pro látky **1**, **7** a **8**.

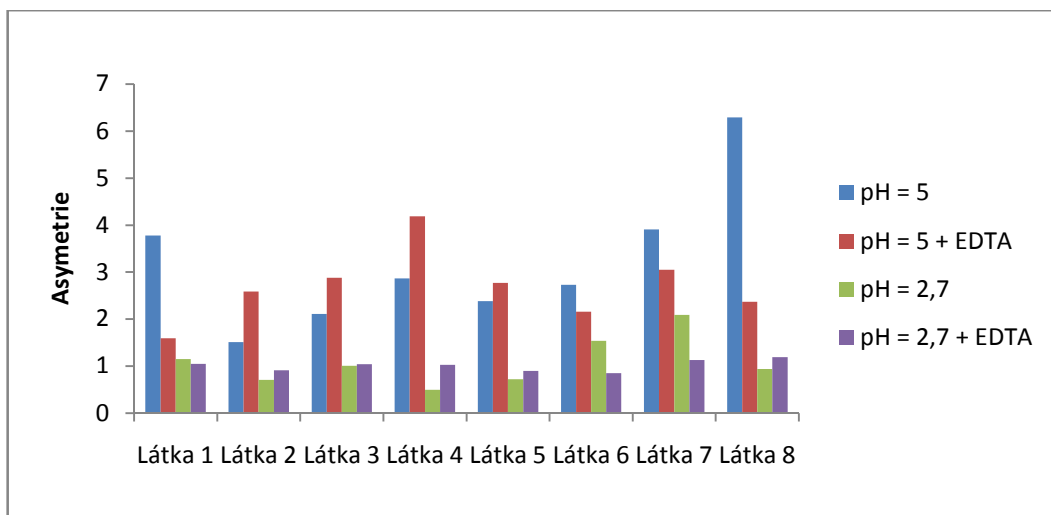
Z naměřených hodnot nevyplývá jednoznačný pozitivní vliv EDTA na sledované chromatografické parametry.



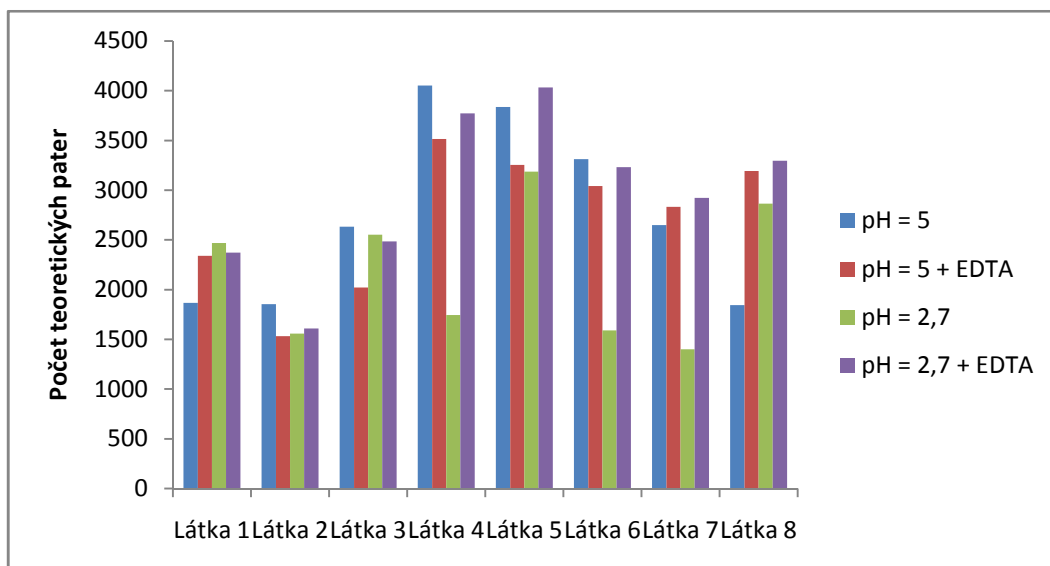
Obr. 4.18: Vliv EDTA na retenční čas, kolona Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.19: Vliv EDTA na šířku píku, kolona Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.20: Vliv EDTA na asymetrii, kolona Synergi Hydro-RP.

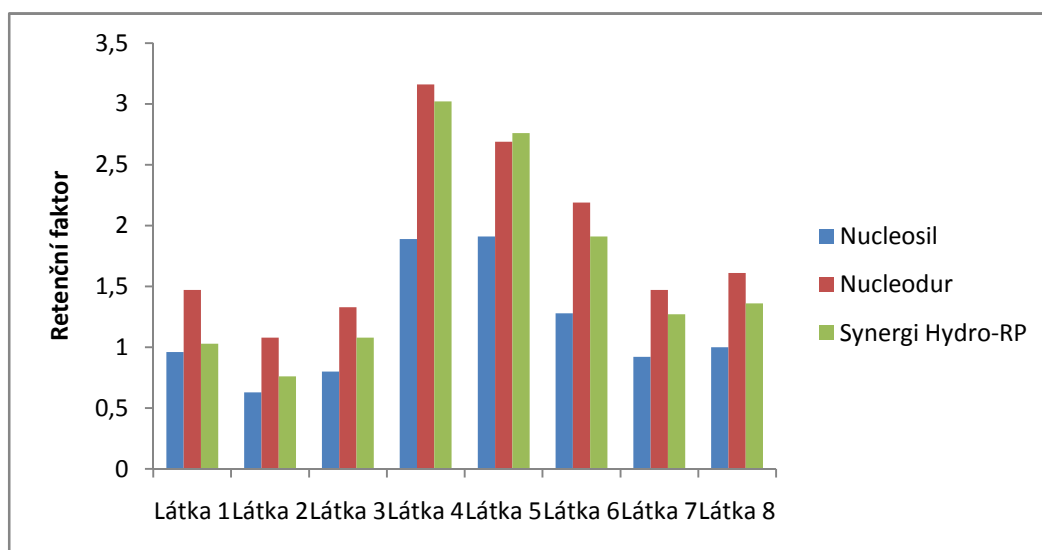


Obr. 4.21: Vliv EDTA na počet teoretických pater, kolona Synergi Hydro-RP.

#### 4.1.4 Srovnání analytických kolon

Srovnání analytických kolon bylo provedeno pro pH 2,1, při kterém bylo pro jednotlivé kolony dosaženo nízkých hodnot asymetrie, šířky píků a vysokého počtu teoretických pater. Při porovnání *retenčních faktorů* (Tab. 7.16, Obr. 4.22), které jsou oproti retenčním časům vhodnější k porovnávání výsledků získaných na různých kolonách při různých průtocích, byly zjištěny nejvyšší hodnoty (tzn. nejvyšší retence) pro kolonu

Nucleodur, s výjimkou látky **5**, kdy byla hodnota nejvyšší pro kolonu Synergi Hydro-RP.



Obr. 4.22: Retenční faktor pro různé kolony při pH 2,1.

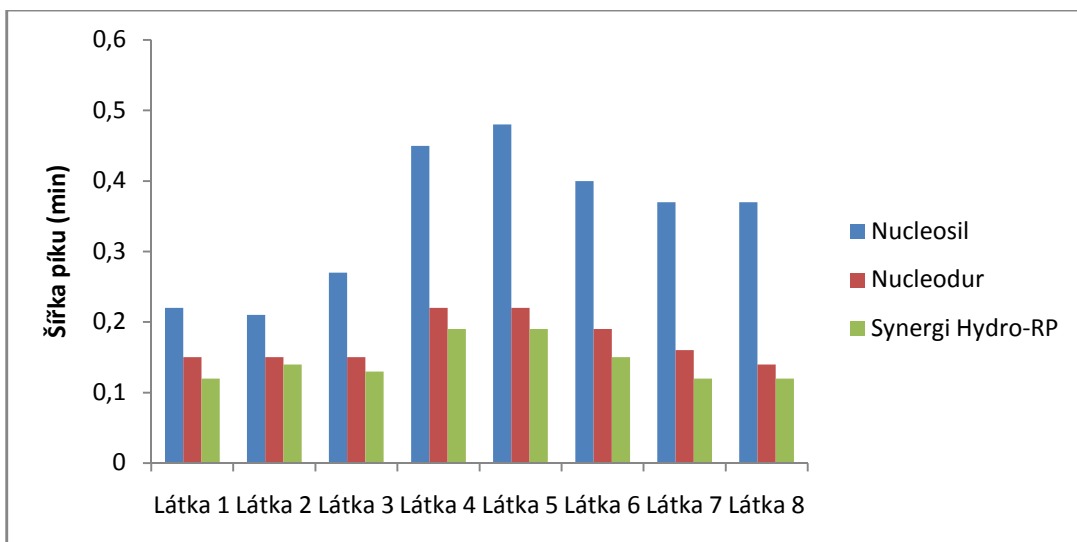
Hodnoty *šířky píků* (Tab. 7.17, Obr. 4.23) byly nejnižší pro kolonu Synergi Hydro-RP, větší u kolony Nucleodur a největší u kolony Nucleosil.

Parametr *asymetrie* (Tab. 7.18, Obr. 4.24) dosahoval jednoznačně nejvyšších hodnot pro kolonu Nucleosil, pro kolony Nucleodur a Synergi Hydro-RP byly naměřeny přijatelné hodnoty kolem 1, přičemž pro kolonu Synergi Hydro-RP byly celkově nejnižší.

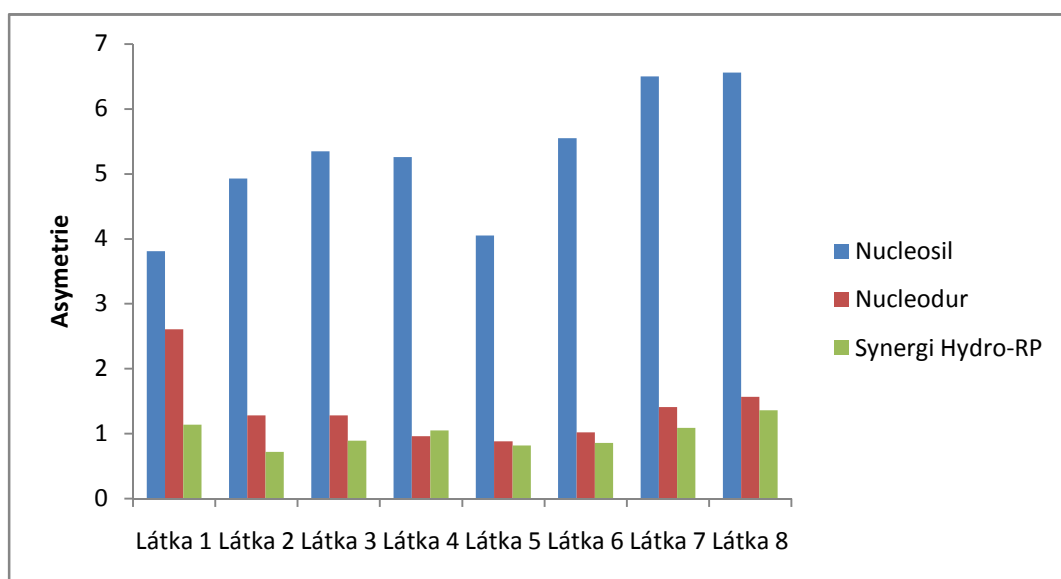
V souladu s předchozími výsledky dosahoval *počet teoretických pater* (Tab. 7.19, Obr. 4.25) nejvyšších hodnot pro kolonu Synergi Hydro-RP.

*Výška teoretického patra* (Tab. 7.20, Obr. 4.26), která je výhodná pro hodnocení účinnosti separace bez ohledu na délku kolony, byla zdaleka nejnižší pro kolonu Synergi Hydro-RP.

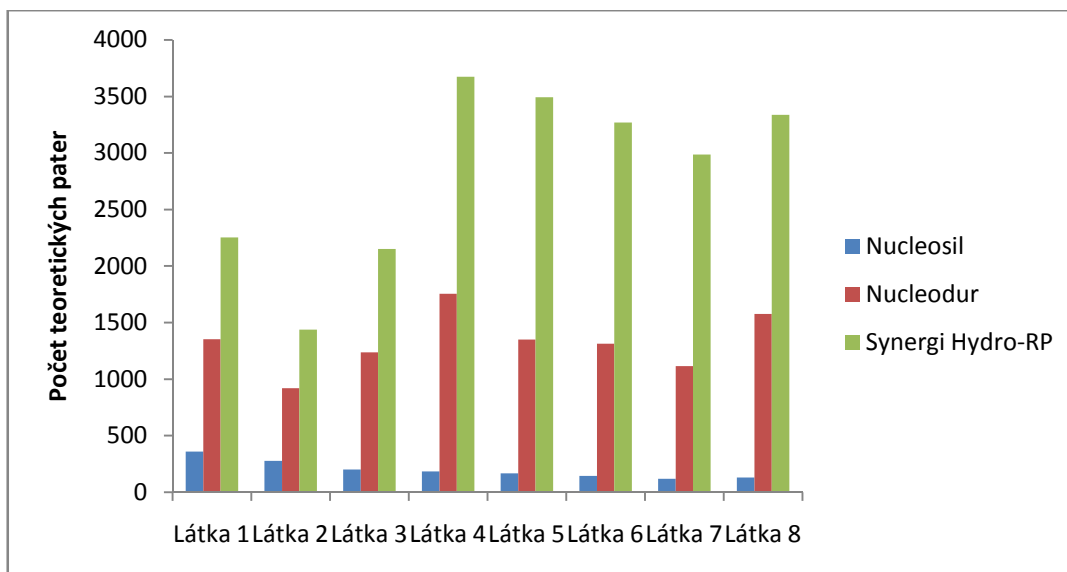




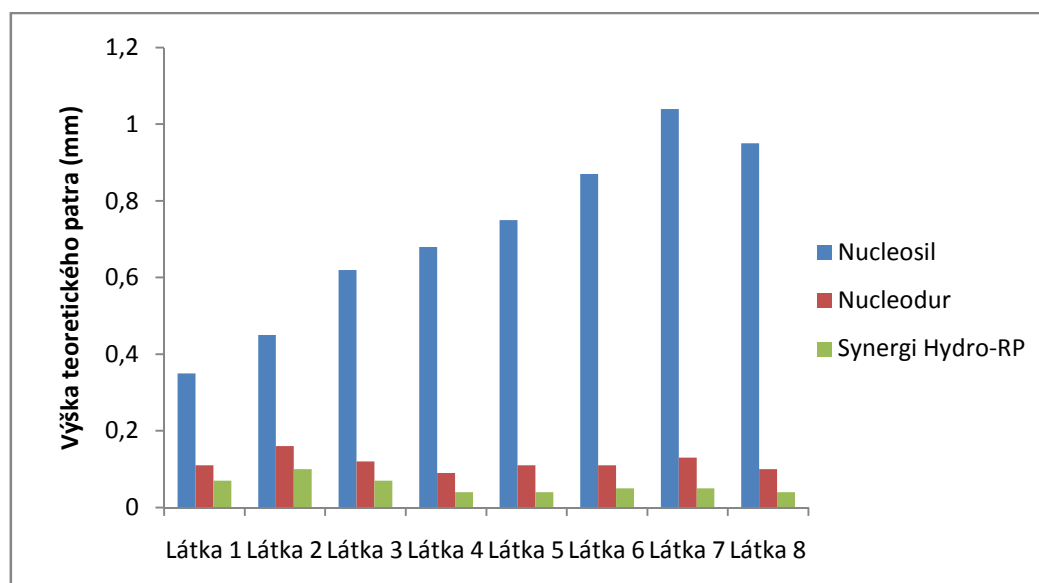
Obr. 4.23: Šířka píku pro různé kolony při pH 2,1.



Obr. 4.24: Asymetrie pro různé kolony při pH 2,1.



Obr. 4.25: Počet teoretických pater pro různé kolony při pH 2,1.



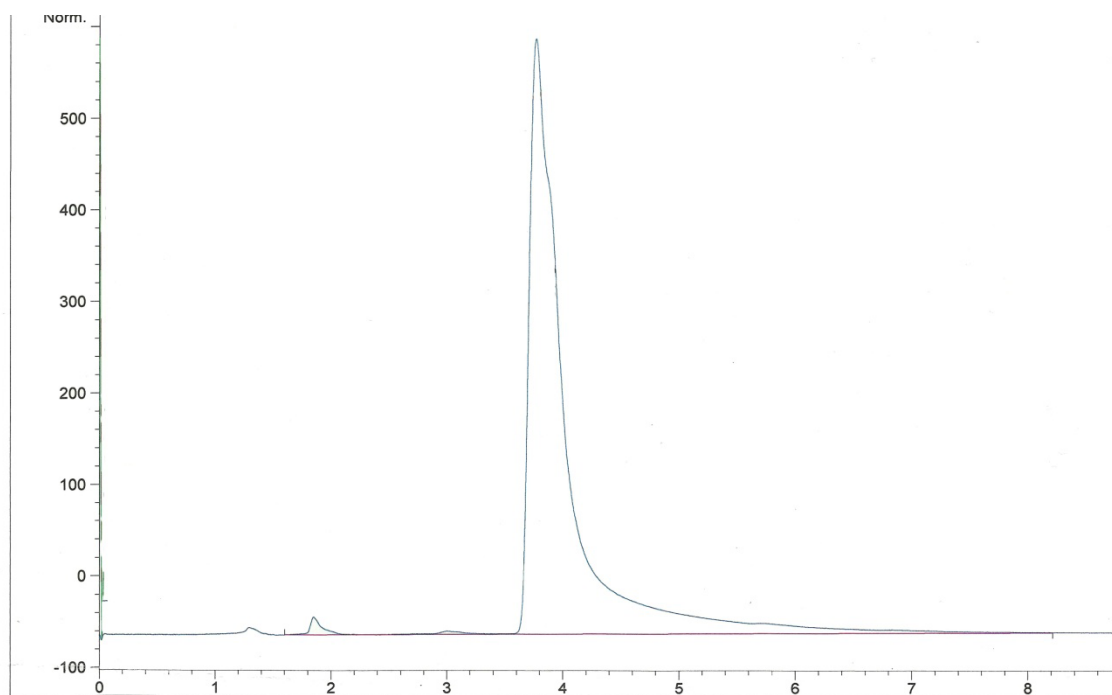
Obr. 4.26: Výška teoretického patra pro různé kolony při pH 2,1.

Obecně lze na základě naměřených výsledků pro jednotlivé analytické kolony s oktadecylovou modifikací konstatovat, že chromatografické parametry při separaci 3-HQ závisí nejen na pH mobilní fáze a s tím souvisejícím nábojem analytu, ale i na typu stacionární fáze (hustota oktadecylové modifikace, endcapping a jeho typ) a na druhu pufrů a kyselin používaných pro úpravu mobilní fáze.

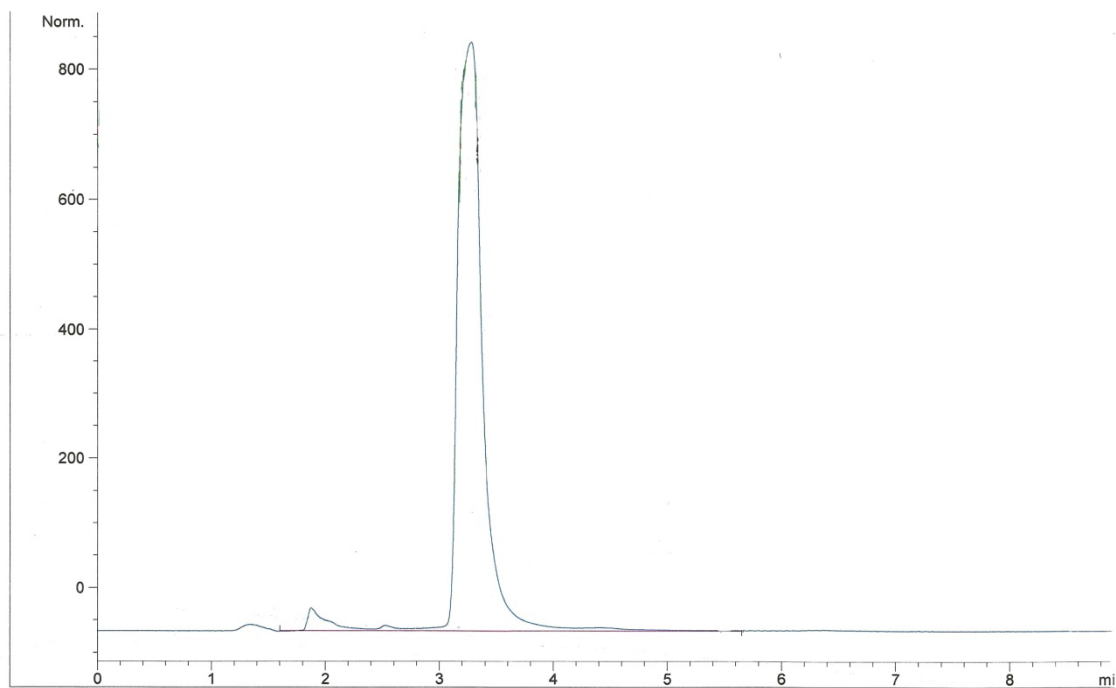
## 4.2 Semipreparativní kolona YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>

Údaje získané měřením na třech analytických kolonách jsme aplikovali pro separaci na semipreparativní koloně. Složení mobilní fáze bylo stejné jako v předchozích případech (60 % voda, 40 % acetonitril). Měření byla provedena pro látku **1** při pH 5,4, 5 a 2,1 (Tab. 7.21). Nejvyšší *retenční čas* byl pozorován pro pH 5, nejnižší pro pH 2,1. Hodnoty *šířky píku* i *asymetrie píku* klesaly s klesajícím pH, obdobně jako u analytických kolon. Počet teoretických pater byl nejvyšší pro pH 5 (Obr. 4.27 a 4.28).

Z výsledků měření na semipreparativní koloně a na analytických kolonách vyplývá, že obecně lepších výsledků separace 3-HQ na kolonách s obrácenými fázemi je dosahováno při nižších hodnotách pH a podmínky separace jsou přenositelné mezi jednotlivými kolonami.



Obr. 4.27: Chromatogram při pH 5,4, kolona YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>.



Obr. 4.28: Chromatogram při pH 2,1, kolona YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>.

## 5 Závěr

Práce se zabývala studiem vlivu složení mobilní fáze a pH mobilní fáze na vybrané chromatografické parametry při separaci 3-HQ metodou RP-HPLC.

Chromatografické chování 3-HQ bylo studováno na třech analytických kolonách. Nejprve bylo určeno vhodné složení mobilní fáze 60 % voda, 40 % acetonitril a poté už bylo pouze měněno pH mobilní fáze. Byly zjištěny zajímavé rozdíly v závislosti  $t_R$  na pH pro jednotlivé kolony a byly diskutovány možné příčiny těchto rozdílů. Nejlepších parametrů asymetrie píku, šířky píku a počtu teoretických pater bylo pro všechny tři kolony dosaženo v oblasti silně kyselého pH. Při srovnání kolon bylo zjištěno, že kolona Nucleosil vykazovala celkově nejhorší výsledky (vysoké hodnoty parametrů A a  $w_h$ , nízká hodnota parametru N). Hodnoty těchto parametrů pro kolony Nucleodur a Synergi Hydro-RP byly uspokojivé. Kromě vlivu pH mobilní fáze na chromatografické chování studovaných látek byl rovněž studován vliv přídavku EDTA, jeho příznivý vliv na separaci 3-HQ nebyl potvrzen.

Výsledky získané na analytických kolonách byly použity při separaci na semipreparativní koloně, která vykazovala stejný trend, tzn. zlepšování parametrů asymetrie a šířky píku s klesajícím pH.

## 6 Seznam literatury

1. P. Hradil, P. Krejčí, J. Hlaváč, I. Wiedermannová, A. Lyčka, V. Bertolasi, *J. Heterocyclic Chem.*, **2004**, *41*, 375 – 379.
2. K. Motyka, J. Hlaváč, M. Sural, P. Hradil, P. Krejčí, L. Kvapil, M. Weiss, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 715 – 717.
3. Compendium of Chemical Terminology, Gold Book, verze 2.3.2, IUPAC.  
[Dostupné online: <http://goldbook.iupac.org/index.html>, citace 15. 1. 2014]
4. S. Kromidas et al., *HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization*. Wiley-VCH, **2006**.
5. C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science BV, **2003**.
6. Chromeleon Chromatography Management System, Tutorial and User Manual, verze 6.70, Dionex, **2005**.
7. T. Reid, *Three Generations of Silica Technology*, Restek, **2002**.  
[Dostupné online: <http://chromtech.com.au/pdf/Winter02-Silica-1.pdf>, citace 17. 2. 2014]
8. HPLC Columns, Adsorbents for Liquid Chromatography, Macherey-Nagel.  
[Dostupné online: <http://www.greyhoundchrom.com/images/file/Macherey%20Nagel/Macherey%20Nagel%20HPLC%20Brochure.pdf>, citace 18. 11. 2013]
9. Synergi, Full Range Selectivity for Reversed Phase Separation, Phenomenex.  
[Dostupné online: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/9df83c96-26ac-4df6-9b61-1c381e13cf8c.pdf>, citace 18. 11. 2013]
10. T. Fornstedt, G. Zhong, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1996**, *742*, 55 – 68.
11. E. A. Smith, M. J. Wirth: *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1060*, 127 – 134.
12. U. D. Neue, C. H. Phoebe, K. Tran, Y. Cheng, Z. Lu: *J. Chromatogr. A*, **2001**, *925*, 49 – 67.
13. F. Regner, J. Kalous, *Analytická chemie I.*, Univerzita Pardubice, **2004**.
14. C. M. Phechkrajang, *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, **2010**, *37*, 1-7.
15. Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1064*, 9 – 18.

16. C. A. Ortori, J. F. Dubern, S. R. Chhabra, M. Cámara, K. Hardie, P. Williams, D. A. Barrett, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 839 – 850.
17. P. Hradil, J. Jirman, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1995**, 60, 1357 – 1366.
18. P. Hradil, J. Hlaváč, K. Lemr, *J. Heterocyclic Chem.*, **1999**, 36, 141 – 144.
19. YMC ProFamily, YMC. [Dostupné online:  
[http://www.ymc.de/ymceurope/files/catalogue/YMC%20ProFamily\\_LQ.pdf](http://www.ymc.de/ymceurope/files/catalogue/YMC%20ProFamily_LQ.pdf),  
citace 10. 1. 2014]
20. S. F. Mason, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 674 – 685.

## 7 Přílohy

### 7.1 Příloha 1: Tabulky

Složení mobilní fáze	$t_R$ (min)	$w_h$ (min)	A	N
60% H <sub>2</sub> O - 40% MeCN	4,32	2,03	6,15	25
60% H <sub>2</sub> O - 40% MeOH	4,57	2,43	7,9	20
60% H <sub>2</sub> O - 40% THF	4,86	2,65	11,23	19

Tab. 7.1: Vliv složení mobilní fáze, látka **1**, pH 5,4, kolona Nucleosil.

pH	$t_R$ (min)	$w_h$ (min)	A	N
7,8	2,44	0,3	8,33	372
5,4	4,32	2,03	6,15	25
5	4,56	3,1	5,53	12
3	2,17	0,48	14,82	114
2,8	1,89	0,27	12,26	268
2,7	1,92	0,2	7,47	515
2,1	1,76	0,22	3,81	359

Tab. 7.2: Naměřené výsledky pro látku **1**, kolona Nucleosil.

Látka	$t_R$ (min)	$w_h$ (min)	A	N
<b>1</b>	1,76	0,22	3,81	359
<b>2</b>	1,47	0,21	4,93	278
<b>3</b>	1,62	0,27	5,35	201
<b>4</b>	2,6	0,45	5,26	184
<b>5</b>	2,62	0,48	4,05	166
<b>6</b>	2,05	0,4	5,55	143
<b>7</b>	1,73	0,37	6,5	120
<b>8</b>	1,8	0,37	6,56	131

Tab. 7.3: Výsledky pro všechny látky při pH 2,1, kolona Nucleosil.



pH	$t_R$ (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
9	2,56	2,12	2,54	3,93	3,63	2,84	2,41	2,45
5,4	1,52	1,22	1,43	2,08	2,22	1,93	1,71	1,8
5	1,97	1,93	2,28	3,44	2,98	2,42	2,01	1,99
3	2,31	1,68	2,03	3,18	3,23	2,6	2,21	2,36
2,7	2,46	2,16	2,62	4,3	4,03	3,16	2,57	2,63
2,1	2,3	1,93	2,17	3,87	3,43	2,97	2,3	2,43
1,7	1,94	1,76	1,88	3,08	2,83	2,73	2,07	2,21

Tab. 7.4: Závislost retenčního času na pH, kolona Nucleodur.

pH	$w_h$ (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
9	0,16	0,18	0,19	0,23	0,25	0,21	0,16	0,19
5,4	0,2	0,19	0,21	0,27	0,29	0,25	0,17	0,22
5	0,21	0,15	0,18	0,22	0,36	0,26	0,19	0,23
3	0,2	0,17	0,19	0,4	0,35	0,3	0,25	0,22
2,7	0,15	0,16	0,17	0,22	0,22	0,2	0,16	0,14
2,1	0,15	0,15	0,15	0,22	0,22	0,19	0,16	0,14
1,7	0,13	0,14	0,14	0,19	0,2	0,18	0,14	0,13

Tab. 7.5: Závislost šířky píku na pH, kolona Nucleodur.

pH	A							
	1	2	3	4	5	6	7	8
9	2,23	2,35	3,13	5,16	4,1	4,46	4,5	7,13
5,4	5,68	3,39	3,65	4,73	4,52	5,43	5,46	7,26
5	2,97	5,32	5,21	3,69	4,02	6,5	4,1	9,49
3	1,96	1,37	1,38	3,42	1,34	2,62	2,96	1,92
2,7	1,81	1,49	1,84	1,5	1,61	1,64	1,81	2,22
2,1	2,61	1,28	1,28	0,96	0,88	1,02	1,41	1,57
1,7	1,75	1,48	1,42	1,42	1,4	1,55	1,78	1,89

Tab. 7.6: Závislost asymetrie na pH, kolona Nucleodur.

pH	N							
	1	2	3	4	5	6	7	8
9	1437	797	998	1597	1192	1052	1214	931
5,4	318	225	253	334	317	325	561	375
5	503	877	918	1358	382	462	623	402
3	738	543	642	348	476	403	448	661
2,7	1430	979	1366	2026	1840	1431	1444	2034
2,1	1353	920	1237	1756	1349	1314	1114	1578
1,7	1164	904	986	1439	1151	1287	1157	1624

Tab. 7.7: Závislost počtu teoretických pater na pH, kolona Nucleodur.

pH	$t_R$ (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5,4	3,38	2,68	3,78	5,48	5,48	3,73	3,12	3,13
5	2,93	2,51	3,27	5,55	5,51	3,73	3,08	3,08
3	3,02	2,68	3,44	5,7	5,53	3,84	3,17	3,16
2,8	2,7	2,42	3,08	5,42	5,18	3,48	2,87	2,88
2,7	2,96	2,52	3,23	5,72	5,63	3,81	3,13	3,18
2,1	2,52	2,18	2,58	4,98	4,66	3,61	2,82	2,93

Tab. 7.8: Závislost retenčního času na pH, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	$w_h$ (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5,4	1,43	1,17	1,74	0,33	0,42	0,27	0,27	0,28
5	0,16	0,14	0,15	0,21	0,21	0,15	0,14	0,17
3	0,16	0,33	0,27	0,65	0,5	0,13	0,11	0,21
2,8	0,15	0,17	0,18	0,48	0,32	0,22	0,22	0,18
2,7	0,14	0,15	0,15	0,32	0,23	0,22	0,2	0,14
2,1	0,12	0,14	0,13	0,19	0,19	0,15	0,12	0,12

Tab. 7.9: Závislost šířky píku na pH, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	A							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5,4	8,98	16,49	8,39	6,45	11,69	8,5	10,01	11,32
5	3,78	1,51	2,11	2,87	2,38	2,73	3,91	6,29
3	0,93	0,86	0,81	8,03	4,28	3,64	4,21	3,24
2,8	1,08	0,56	0,92	0,64	0,69	1,95	2,11	0,98
2,7	1,15	0,71	1,01	0,5	0,72	1,54	2,09	0,94
2,1	1,14	0,72	0,89	1,05	0,82	0,86	1,09	1,36

Tab. 7.10: Závislost asymetrie na pH, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	N							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5,4	31	29	26	1296	930	1042	766	688
5	1867	1853	2633	4054	3836	3313	2649	1845
3	1945	377	899	420	666	4789	4633	1201
2,8	1729	1128	1611	700	1412	1380	917	1440
2,7	2468	1559	2551	1744	3188	1589	1399	2864
2,1	2252	1438	2151	3674	3494	3271	2986	3338

Tab. 7.11: Závislost počtu teoretických pater na pH, kolona Synergi Hydro-RP.

Mobilní fáze	$t_R$ (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH = 5	2,93	2,51	3,27	5,55	5,51	3,73	3,08	3,08
pH = 5 + EDTA	2,97	2,52	3,3	5,59	5,57	3,75	3,12	3,13
pH = 2,7	2,96	2,52	3,23	5,72	5,63	3,81	3,13	3,18
pH = 2,7 + EDTA	2,97	2,53	3,31	5,68	5,67	3,82	3,15	3,16

Tab. 7.12: Vliv EDTA na retenční čas, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	w <sub>h</sub> (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH = 5	0,16	0,14	0,15	0,21	0,21	0,15	0,14	0,17
pH = 5 + EDTA	0,14	0,15	0,17	0,22	0,23	0,16	0,14	0,13
pH = 2,7	0,14	0,15	0,15	0,32	0,23	0,22	0,2	0,14
pH = 2,7 + EDTA	0,14	0,15	0,16	0,22	0,21	0,16	0,14	0,13

Tab. 7.13: Vliv EDTA na šířku píku, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	A							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH = 5	3,78	1,51	2,11	2,87	2,38	2,73	3,91	6,29
pH = 5 + EDTA	1,59	2,59	2,88	4,19	2,77	2,16	3,05	2,37
pH = 2,7	1,15	0,71	1,01	0,5	0,72	1,54	2,09	0,94
pH = 2,7 + EDTA	1,05	0,91	1,04	1,03	0,9	0,85	1,13	1,19

Tab. 7.14: Vliv EDTA na asymetrii, kolona Synergi Hydro-RP.

pH	N							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH = 5	1867	1853	2633	4054	3836	3313	2649	1845
pH = 5 + EDTA	2341	1532	2020	3515	3255	3043	2833	3193
pH = 2,7	2468	1559	2551	1744	3188	1589	1399	2864
pH = 2,7 + EDTA	2373	1609	2486	3771	4034	3233	2922	3295

Tab. 7.15: Vliv EDTA na počet teoretických pater, kolona Synergi Hydro-RP.

Látka	k		
	Nucleosil	Nucleodur	Synergi Hydro-RP
<b>1</b>	0,96	1,47	1,03
<b>2</b>	0,63	1,08	0,76
<b>3</b>	0,8	1,33	1,08
<b>4</b>	1,89	3,16	3,02
<b>5</b>	1,91	2,69	2,76
<b>6</b>	1,28	2,19	1,91
<b>7</b>	0,92	1,47	1,27
<b>8</b>	1	1,61	1,36

Tab. 7.16: Retenční faktor pro různé kolony při pH 2,1.

Látka	w <sub>h</sub> (min)		
	Nucleosil	Nucleodur	Synergi Hydro-RP
<b>1</b>	0,22	0,15	0,12
<b>2</b>	0,21	0,15	0,14
<b>3</b>	0,27	0,15	0,13
<b>4</b>	0,45	0,22	0,19
<b>5</b>	0,48	0,22	0,19
<b>6</b>	0,4	0,19	0,15
<b>7</b>	0,37	0,16	0,12
<b>8</b>	0,37	0,14	0,12

Tab. 7.17: Šířka píku pro různé kolony při pH 2,1.

Látka	A		
	Nucleosil	Nucleodur	Synergi Hydro-RP
<b>1</b>	3,81	2,61	1,14
<b>2</b>	4,93	1,28	0,72
<b>3</b>	5,35	1,28	0,89
<b>4</b>	5,26	0,96	1,05
<b>5</b>	4,05	0,88	0,82
<b>6</b>	5,55	1,02	0,86
<b>7</b>	6,5	1,41	1,09
<b>8</b>	6,56	1,57	1,36

Tab. 7.18: Asymetrie pro různé kolony při pH 2,1.

Látka	N		
	Nucleosil	Nucleodur	Synergi Hydro-RP
<b>1</b>	359	1353	2252
<b>2</b>	278	920	1438
<b>3</b>	201	1237	2151
<b>4</b>	184	1756	3674
<b>5</b>	166	1349	3494
<b>6</b>	143	1314	3271
<b>7</b>	120	1114	2986
<b>8</b>	131	1578	3338

Tab. 7.19: Počet teoretických pater pro různé kolony při pH 2,1.

Látka	H (mm)		
	Nucleosil	Nucleodur	Synergi Hydro-RP
<b>1</b>	0,35	0,11	0,07
<b>2</b>	0,45	0,16	0,1
<b>3</b>	0,62	0,12	0,07
<b>4</b>	0,68	0,09	0,04
<b>5</b>	0,75	0,11	0,04
<b>6</b>	0,87	0,11	0,05
<b>7</b>	1,04	0,13	0,05
<b>8</b>	0,95	0,1	0,04

Tab. 7.20: Výška teoretického patra pro různé kolony při pH 2,1.

pH	$t_R$ (min)	$w_h$ (min)	A	N
5,4	3,887	1	4	84
5	3,971	0,9	3,6	108
2,1	3,291	0,8	1,28	94

Tab. 7.21: Naměřené výsledky pro látku **1**, kolona YMC-Pack Pro C<sub>18</sub>.