

**FAZY STACJONARNE DO CHROMATOGRAFII  
CIECZOWEJ Z WBUDOWANYMI GRUPAMI  
POLARNYMI – SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI  
POWIERZCHNIOWE**

**CHEMICALLY BONDED STATIONARY PHASES WITH  
INCORPORATED POLAR GROUPS FOR LIQUID  
CHROMATOGRAPHY – THE SYNTHESIS AND  
SURFACE PROPERTIES**

**Szymon Bocian, Katarzyna Krzemińska**

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Chemicznie związane fazy stacjonarne o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, zawierających wiązania estrowe, fosfoestrowe oraz wiązanie fosforoamidowe
2. Fenyłowe fazy stacjonarne z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi
3. Dendrymerowe fazy stacjonarne do chromatografii jonowej
4. Właściwości powierzchniowe faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi – potencjał zeta na granicy faza stacjonarna/faza ruchoma
5. Procesy solwatacyjne na powierzchni faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr hab. Szymon Bocian** – w 2011 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor- prof. dr hab. Bogusław Buszewski) a w 2016 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Rozprawa habilitacyjna została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Obecnie pracuje jako adiunkt w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jest laureatem Stypendium "Start" Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. Autor 60

publikacji z zakresu chromatografii cieczowej, syntezy faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej i opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.



**Mgr Katarzyna Krzemińska** – w 2014 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra chemii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie wykonuje doktorat w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky (promotor - dr hab. Szymon Bocian) i pracuje w Boruta-Zachem Biochemia Sp. z o.o.. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy syntezy i badania właściwości powierzchniowych nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej z wbudowanymi grupami polarnymi. Jest autorką czterech publikacji naukowych.

## ABSTRACT

In recent years high performance liquid chromatography (HPLC) has gained a dominant position in the life sciences. The widespread use of this technique allows to perform an analysis of compounds which are used in various areas of human life. Currently, there are wide and fully untapped opportunities for synthesis of chromatographic packings with chemically bonded stationary phases.

Some of the liquid chromatographic analyses needs the application of water-rich mobile phases (more than 85% water or a buffer). In such condition the performance of hydrophobic stationary phases indicate that the bonded ligands might be collapsing. This problem could be solved by increasing of organic content in the mobile phase which should improve solvation and bring bonded ligands back to the original conformation. To avoid this procedure, which reduces the retention and selectivity of the separation, it is possible to apply stationary phases with incorporated polar groups mixed with the original alkyl ligands (polar embedded stationary phases). Another possibility is to add some polar groups during endcapping procedure (polar end-capped stationary phases). This produces variation in the bonding.

Chemically bonded stationary phases which include both hydrophobic and hydrophilic ligands are so-called mixed mode stationary phases. These materials can be used in reversed phase liquid chromatography (RPLC) and there is also a possibility to use them in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). They allow to separate polar and non-polar analytes.

Following the idea of green chemistry, especially green analytical chemistry, a series of stationary phases was synthesized. The obtained materials connect polar and hydrophobic groups in the structure of bonded ligands. These specific surface properties provide the stability of the stationary phase in pure water as a mobile phase. Surface properties of novel material were analyzed using various instrumental and chromatographic methods. Finally, the mixtures of various compounds were applied to test the separation selectivity of stationary phases in various chromatographic system, including purely aqueous conditions.

Keywords: liquid chromatography, stationary phases, polar embedded stationary phases, description of surface properties, solvation processes

Słowa kluczowe: chromatografia cieczowa, fazy stacjonarne, fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi, opis właściwości powierzchniowych, procesy solwatacyjne

---

---

## WPROWADZENIE

Specyficzne i niespecyficzne oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną, analitykami i składnikami fazy ruchomej determinują retencję i selektywność w chromatografii cieczowej i technikach pokrewnych. Historycznie, w zależności od właściwości powierzchniowych fazy stacjonarnej, chromatografia cieczowa została podzielona na normalny (NP) i odwrócony układ faz (RP) [1, 2]. W normalnym układzie faz, faza stacjonarna jest polarna (stanowi ją np. niemodyfikowany żel krzemionkowy), z kolei faza ruchoma to najczęściej mieszanina rozpuszczalników o niskiej polarności. W odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej faza stacjonarna ma charakter hydrofobowy (najczęściej zawiera łańcuchy C18 związane do powierzchni krzemionki), a fazę ruchomą stanowi mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego o znacznej polarności, jak np. metanol i acetonitryl [3, 4]. W ostatnich latach opracowano nowy układ chromatografii cieczowej – chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [5]. HILIC stanowi połączenie układów NP i RP, które opiera się na zastosowaniu polarnej fazy stacjonarnej i fazy ruchomej, która zawiera więcej niż 60% (v/v) rozpuszczalnika organicznego, najczęściej acetonitrylu w połączeniu z wodą. Układ ten umożliwia rozdzielanie substancji polarnych. Typowymi fazami stacjonarnymi dla HILIC są więc materiały stosowane dotychczas w normalnym układzie faz, takie jak niemodyfikowana krzemionka, fazy diolowe, aminowe, ect. [6]. Niemniej jednak istnieje zapotrzebowanie na nowe fazy stacjonarne do HILIC, charakteryzujące się większą selektywnością niż dotychczas stosowane. Efekt ten można osiągnąć poprzez opracowywanie materiałów zawierających w swej strukturze różnego rodzaju grupy funkcyjne, których specyficzne oddziaływania z rozdzielanymi substancjami zaowocują zwiększoną selektywnością rozdzielania.

Dodatkowym powodem dla syntezy nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej są oczekiwania tzw. zielonej chemii [7]. Prowadzone są badania nad zmniejszaniem zużycia rozpuszczalników organicznych poprzez miniaturyzację układów chromatograficznych czy też wymiarów kolumn. Ponadto rozpatruje się zastąpienie toksycznych rozpuszczalników innymi, które mogą ulegać biodegradacji, np. etanol [8] lub zmianę warunków chromatograficznych w celu zastosowania wody bez dodatku modyfikatora organicznego jako fazy ruchomej [9, 10]. Z tego właśnie powodu istotnym wydaje się możliwość syntezy materiałów, które będzie można wykorzystać do prowadzenia oznaczeń chromatograficznych z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej.

Kolejnym „problemem” współczesnych metod chromatograficznych jest powszechne zastosowanie oktadecylowej fazy stacjonarnej (C18) w odwróconym układzie faz do analiz substancji polarnych. O ile odwrócony układ faz miał służyć do rozdzielania substancji hydrofobowych, zastosowanie fazy C18 do analiz związków polarnych narzuca konieczność znacznych modyfikacji fazy ruchomej, takich jak dodatek soli buforujących, kwasów, odczynników tworzących pary jonowe, jonowych środków powierzchniowo czynnych itd. Zastosowanie powyższych dodatków komplikuje skład fazy ruchomej powodując problemy z jej odtwarzalnością, a przez

to z powtarzalnością wyników, jak również skraca czas pracy kolumn chromatograficznych. W związku z czym wydaje się być uzasadnione wprowadzenie alternatywnych materiałów o zwiększonej polarności, których zastosowanie w odwróconym układzie faz umożliwiłoby rozdzielanie substancji o znacznej polarności.

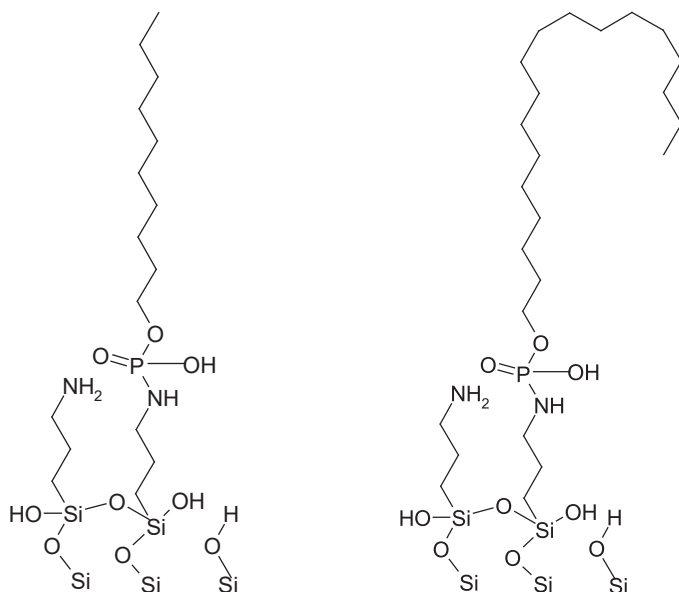
Obecnie znane są materiały chromatograficzne dla odwróconego układu faz, które w swojej strukturze zawierają polarne grupy funkcyjne wbudowane w łańcuch hydrofobowy (ang. *polar embedded*) lub dołączone są one do fazy stacjonarnej na etapie wtórnej silanizacji (ang. *polar endcapped*) [11]. Modyfikacje te miały zazwyczaj na celu zwiększenie stabilności materiału w fazie ruchomej o zwiększonej zawartości wody. Przykładem takiego wypełnienia mogą być fazy *N*-alkiloamidowe [12, 13], jak również komercyjnie dostępne materiały, dla których producenci nie podają rodzaju zastosowanych grup funkcyjnych. Wprowadzenie nowych faz stacjonarnych o specyficznych właściwościach jest jednocześnie powiązane z koniecznością pełnego/dokładniejszego opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących na granicy faz: faza stacjonarna/faza ruchoma w układzie chromatograficznym.

Z wyżej wymienionych powodów niniejsze badania miały na celu syntezę nowych faz materiałów oraz opis procesów w chromatografii cieczowej zachodzących na powierzchni fazy stacjonarnej. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi wykazują odmienne właściwości w stosunku do klasycznych faz alkilowych. Różnice te dotyczą głównie zdolności do pracy w szerokim zakresie stężeń rozpuszczalnika organicznego w fazach ruchomych, w tym również w warunkach czystej wody oraz w układzie HILIC. Stąd też podjęto próby syntezy nowego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane grupy funkcyjne oraz dokonano opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.

## 1. CHEMICZNIE ZWIĄZANE FAZY STACJONARNE O WŁAŚCIWOŚCIACH HYDROFOBOWO-HYDROFILOWYCH, ZAWIERAJĄCYCH WIĄZANIA ESTROWE, FOSFOESTROWE ORAZ WIĄZANIE FOSFOROAMIDOWE

Ideą przewodnią badań była synteza nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych. Właściwości powierzchniowe takich materiałów umożliwiają ich zastosowanie zarówno w odwróconym układzie faz i w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Specyfika dedykowana tym wypełnieniom przejawia się w ich unikalnych właściwościach powierzchniowych powodujących lepszą selektywność rozdzielania i stabilność w warunkach wysokiej zawartości wody w składzie fazy ruchomej. Nadrzędnym celem prowadzonych badań było opracowanie chemicznie związanych faz stacjonarnych, które w obrębie jednej struktury zawierają zarówno grupy hydrofobowe (alkilowe, aryłowe, itp.), jak i grupy polarne. Główne przeznaczenie tych adsorbentów to analiza związków chemicznych o znacznej polarności.

Pierwszy otrzymany nowatorskim materiałem chromatograficznym stanowią fazy *N,O*-dialakilofosforoamidowe [14, 15]. Jako nośnik do syntezy wykorzystano żel krzemionkowy ze względu na jego bardzo dobrze poznane i opisane właściwości chromatograficzne [16, 17]. Otrzymanie tego materiału miało przebieg stopniowy. W pierwszym etapie żel krzemionkowy został zmodyfikowany grupami aminopropylowymi [18, 19]. Następnie do grup aminowych poprzez grupę fosforanową (wprowadzaną jako tlenochlorek fosforu) przyłączono łańcuch organiczny (pochodzący z alkoholu). Tak otrzymany materiał chromatograficzny zawierał w swej strukturze hydrofobowy łańcuch węglowodorowy (dekanowy C10 lub oktadecylowy C18 w zależności od zastosowanego alkoholu), oraz polarną grupę fosforanową wbudowaną w łańcuch a także grupy aminowe, związane z grupą fosforanową, jak i w formie wolnej. Struktury opracowanych faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Struktury faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych

Figure 1. Structures of *N,O*-dialkylphosphoramidate stationary phases

Kluczowymi parametrami charakteryzującymi fazę stacjonarną są hydrofobowość i polarność (mierzona jako np. aktywność silanolowa). W tym celu zastosowano test opracowany przez Galushko [20]. Następnie sprawdzono możliwości zastosowania otrzymanych materiałów w odwróconym układzie faz chromatografii ciekowej. Niezależnie od obecności w strukturze *N,O*-dialkilofosforoamidowych faz stacjonarnych polarnych grup funkcyjnych (aminowych i fosforanowych), wypełnienia te spełniają warunki stawiane chemicznie związanym fazom stacjonarnym do chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz [14]. Zastosowanie

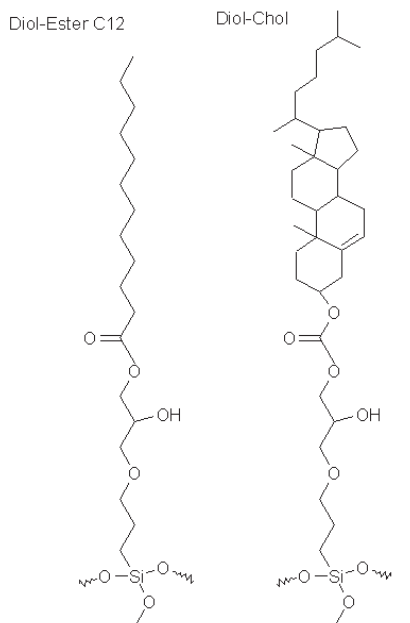
otrzymanych materiałów umożliwiło rozdzielanie alkilowych pochodnych benzenu, co świadczy o dobrej selektywności metylenowej. Ponadto używanie tych materiałów umożliwi również rozdzielanie wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Warto wspomnieć, iż istnieje możliwość prowadzenia analiz stosując zdecydowanie mniejszą ilość rozpuszczalnika organicznego w składzie fazy ruchomej (50% lub 60% objętościowych) niż stosując tradycyjne fazy oktadecylowe. Selektywność fenyłowa wyznaczona dla tych materiałów w stosunku do konwencjonalnych faz C18 odznacza się niższą wartością. Wynika to z faktu, iż gęstość pokrycia powierzchni fazy stacjonarnej chemicznie związanymi ligandami jest niższa. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż poprawę parametrów chromatograficznych, np. wyższą sprawność, fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe wykazują kiedy składnikiem binarnej wodno-organiczej fazy ruchomej jest metanol a nie acetonitryl jak w przypadku faz oktadecylowych. Wynika to z preferencyjnej solwatacji polarnych grup funkcyjnych – głównie aminowych, przez metanol [15]. Fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej (bez dodatku rozpuszczalnika organicznego) również są bardzo dobrze solwatowane. W takim układzie możliwe było ich zastosowanie do rozdzielania mieszaniny nukleozydów. Otrzymanie materiału umożliwiającego wykonywanie rozdzieleń chromatograficznych w warunkach czystej wody jest niewątpliwie pożądane z kilku powodów. Przede wszystkim wpływa to na wartości ekonomiczne jak i ekologiczne, poprzez ograniczenie zużycia toksycznych rozpuszczalników organicznych.

Interesującą własnością faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych są właściwości pseudomembranowe [21], które umożliwiają zastosowanie chromatografii cieczowej do badania oddziaływań substancji z błoną biologiczną [22–25]. Dotychczas, jako materiał referencyjny w tego typu obserwacjach była stosowana faza IAM (ang. *Immobilized Artificial Membrane*) [26, 27]. Eksperyment przeprowadzony dla czterech grup związków o różnym charakterze chemicznym (nukleozydów i zasad azotowych, alkilowych pochodnych benzenu, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz flawonoidów) wykazał bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem  $\log k_w$  otrzymanym z wykorzystaniem kolumny IAM oraz fazą stacjonarną *N,O*-dialkilofosforoamidową z łańcuchem C18. Zaobserwowano również bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem  $\log k_w$  a parametrem  $\log P$ , stanowiącym o hydrofobowości substancji. Otrzymane wyniki świadczą o zbliżonych właściwościach powierzchniowych tych materiałów, jak również potwierdzają założenie, że otrzymana faza stacjonarna, dzięki kombinacji odpowiednio dobranych grup funkcyjnych, symuluje w równie dobry sposób właściwości błony biologicznej. Badania potwierdzają również możliwość zastosowania otrzymanej fazy stacjonarnej do przewidywania oddziaływań substancji z błoną biologiczną ze zbliżoną skutecznością, jak obecnie stosowana faza IAM. Należy dodać, że niewątpliwą zaletą fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowej w stosunku do IAM jest fakt, iż posiada ona mniej skomplikowaną strukturę przez co jej synteza jest łatwiejsza. [21].

Kolejnym zastosowaniem fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowej jest rozdzielanie fosfolipidów względem ich polarności w układzie RP HPLC. Pomiaru wykonano

w układzie off-line dwuwymiarowej chromatografii cieczowej [28]. Ze względu na ortogonalne właściwości w porównaniu do fazy oktadecylowej, otrzymany układ dwuwymiarowy wykazał bardzo dobrą rozdzielczość względem fosfolipidów. Faza *N,O*-dialkilofosforoamidowa zastosowana została również z powodzeniem w układzie HILIC [29].

Kolejną grupę materiałów z wbudowanymi grupami polarnymi stanowią fazy estrowe i fosfoestrowe. W przypadku syntezy faz z wiązaniem estrowym [30] oraz z wiązaniem fosfoestrowym [31], materiałem wyjściowym do syntezy była krzemionka zmodyfikowana silanem zawierającym grupy hydroksylowe (diolowe). W przypadku faz estrowych modyfikację powierzchni wykonano poprzez reakcję z chlorkiem kwasu dodecylowego lub chloromrówczanem cholesterolu. Otrzymane w ten sposób chemicznie związane fazy stacjonarne zawierające łańcuch dodekanowy (Diol-Ester C12) lub cząsteczkę cholesterolu (Diol-Chol) związane z nośnikiem poprzez wiązanie estrowe. Struktury estrowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Struktury estrowych faz stacjonarnych  
Figure 2. Structures of ester bonded stationary phases

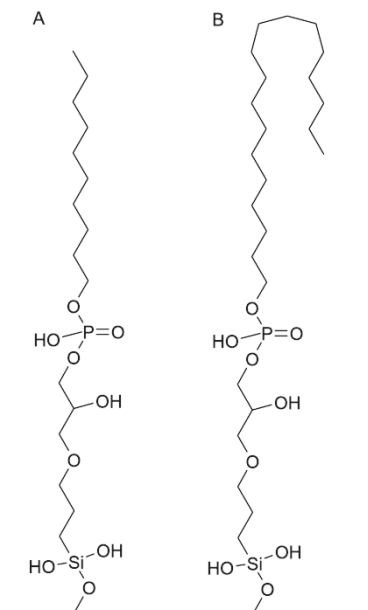
Otrzymane fazy estrowe wpisują się doskonale w ideę materiałów, zawierających wbudowane grupy polarne w strukturę związanych ligandów. Jednocześnie, nieprzereagowane ligandy diolowe stanowią dodatkowe polarne centra aktywne.

Modelowanie molekularne otrzymanych materiałów, potwierdza zróżnicowanie właściwości powierzchniowych z punktu widzenia polarności i hydrofobowości. W otrzymanych fazach stacjonarnych można wyróżnić regiony oddziaływań polar-



nych przy powierzchni nośnika i w obrębie grup diolowych a także region oddziaływań hydrofobowych. W konsekwencji w zależności od zastosowanego składu fazy ruchomej możliwe jest rozdzielanie zarówno cząsteczek hydrofobowych, jak i polarnych [30]. Właściwości te powodują, iż fazy te można zastosować do rozdzielania m.in. alkilowych pochodnych benzenu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Świadczy to o dostatecznej hydrofobowości materiału, aby mógł on być zastosowany w odwróconym układzie faz chromatografii cieczonej [30]. Ponadto materiały te umożliwiają również rozdzielanie substancji polarnych w układzie RP oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej.

Żel krzemionkowy modyfikowany ligandami diolowymi wykorzystano również jako nośnik do syntezy faz fosfoestrowych [31]. Materiały te otrzymano poprzez modyfikację nośnika diolowego tlenochlorkiem fosforu i długołańcuchowym alkoholem. Łańcuch alkilowy (C10 lub C18) związany był z nośnikiem diolowym poprzez grupę fosforanową tworzącą dwa wiązania estrowe. Struktury otrzymanych faz przedstawia Rysunek 3.



Rysunek 3. Struktury fosfo-estrowych faz stacjonarnych z różnymi długościami łańcuchów alkilowych: A-C10 i B-C18

Figure 3. Structures of phospho-ester stationary phases with various length of alkyl ligands: A-C10 and B-C18

W porównaniu do faz estrowych, obecność grupy fosforanowej w strukturze związanego ligandu w znacznym stopniu wpływa na zwiększenie polarności powierzchni chemicznie związanej fazy stacjonarnej. Spotęgowanie polarności skutkuje zmianą procesów solwatacyjnych zachodzących na powierzchni adsorbentu podczas analiz chromatograficznych. W rezultacie obecność grupy fosfora-

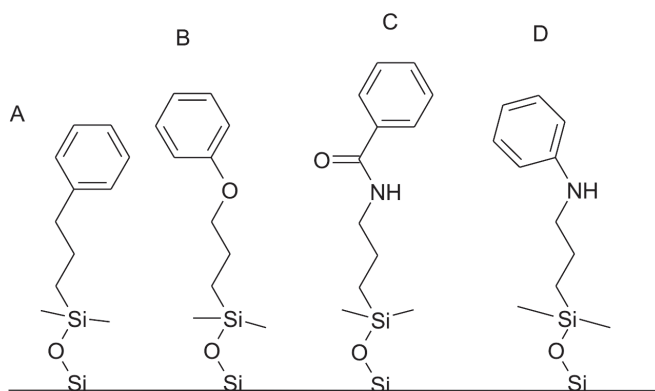
nowej powoduje silną adsorpcję wody, czego efektem jest tworzenie poliwarstwy cząsteczek wody, najprawdopodobniej od powierzchni nośnika do wysokości grup fosforanowych. W wyniku preferencyjnej adsorpcji wody możliwe jest zastosowanie fosfoestrowych faz stacjonarnych w chromatografii oddziaływań hydrofilowych [31]. Zastosowanie fazy z Diol-P-C18 w układzie HILIC umożliwi rozdzielenie m.in. nukleozydów i zasad azotowych.

Pomimo znacznej polarności faz fosfoestrowych, ich hydrofobowości są wystarczające do zastosowania ich w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej. Materiały te w układzie RP wykazują dobrą selektywność metylenową, jak również umożliwiają rozdzielenie wybranych WWA. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż mechanizm rozdzielania w układzie RP dla faz estrowych, fosfoestrowych i *N,O*-dialkilo-fosforanowych jest odmienny w stosunku do typowych faz alkilowych. Obecność polarnych grup funkcyjnych powoduje silną adsorpcję wody i wytworzenie warstwy wodnej, nazywanej poduszką hydroilową [12, 32]. Konsekwencją jej obecności jest fakt, iż polarne grupy funkcyjne stają się niedostępne dla hydrofobowych analitów, które oddziałują jedynie z hydrofobowymi grupami fazy stacjonarnej.

Podsumowując, odpowiedni dobór hydrofobowych i polarnych grup funkcyjnych w znaczący sposób wpływa na proces solwatacji powierzchni fazy stacjonarnej w układzie chromatograficznym. Poprzez odpowiednie modyfikacje powierzchni, możliwe jest otrzymanie materiałów umożliwiających ich szerokie zastosowanie chromatograficzne zarówno w układzie RP, jak i HILIC oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej.

## 2. FENYLOWE FAZY STACJONARNE Z WBUDOWANYMI POLARNYMI GRUPAMI FUNKCYJNYMI

Wykonano również syntezę serii faz stacjonarnych zmieniając polarną grupę funkcyjną wbudowaną w krótki łańcuch alkilowy (propylowy), zachowując niezmienną grupę hydrofobową, którą był pierścień fenyłowy [33]. Fazy fenyłowe są znane i dostępne komercyjnie [34–38], ale celem podjętych badań było określenie wpływu polarnych grup funkcyjnych na retencję i selektywność przy zachowaniu stałego fragmentu hydrofobowego związanych ligandów. Seria materiałów fenyłowych obejmowała następujące fazy stacjonarne: fenylo-propylową, fenoksy-propylową, fenylo-aminową i fenylo-amidową. Dla wszystkich materiałów otrzymano bardzo zbliżone wartości gęstości pokrycia powierzchni ligandami. Umożliwiło to wnioskowanie, że za zmiany retencji i selektywności otrzymanych materiałów odpowiada rodzaj wbudowanych polarnych grup funkcyjnych, a nie są one efektem różnej gęstości pokrycia powierzchni nośnika. Struktury otrzymanych materiałów fenyłowych przedstawia Rysunek 4.



Rysunek 4. Fenylove fazy stacjonarne: fenylo-propylova (A), fenoksy-propylova (B), fenylo-amidova (C) i fenylo-aminova (D)

Figure 4. Phenyl-bonded stationary phases: phenyl-propyl (A), phenoxy-propyl (B), phenyl-amide (C) and phenyl-amine (D)

Obecność grup funkcyjnych o charakterze polarnym – aminowej i amidowej, zmniejsza w sposób istotny hydrofobowość fazy stacjonarnej, a w rezultacie obserwowana jest mniejsza retencja dla hydrofobowych analitów na tych fazach. Szczególnie uwidacznia się to wtedy, gdy modyfikatorem organicznym fazy ruchomej jest metanol. Nieco odmienna sytuacja miała miejsce w przypadku zastąpienia metanolu acetonitrylem. Mniejsze powinowactwo acetonitrylu do polarnych grup funkcyjnych (aminowej i amidowej), powoduje względnie słabszą siłę elucyjną acetonitrylu, co skutkuje zbliżoną retencją i mniejszym zróżnicowaniem chemicznie związanych faz stacjonarnych. Zmiana modyfikatora organicznego wpływała znacząco również na selektywność metylenową i selektywność fenyłową otrzymanych materiałów, co potwierdza tezę, że dobór odpowiednich grup funkcyjnych w strukturze fazy stacjonarnej umożliwia sterowanie procesem solwatacji. W wyniku tych zmian obserwuje się zmiany siły elucyjnej rozpuszczalników względem szeregu eluotropowego [33].

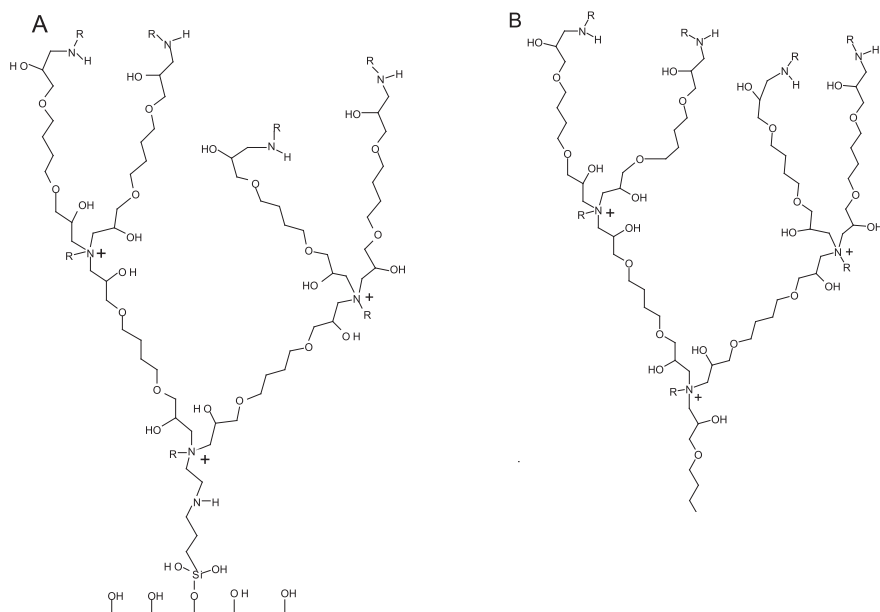
W przypadku zastosowania serii fenyłowych faz stacjonarnych do rozdzielania wybranych WWA, znacznie większą retencję zaobserwowano na fazach: fenylo-propylowej i fenoksy-propylowej. Obecność aminowej i amidowej grupy funkcyjnej znacznie zmniejszała retencję, jednak obniżenie zawartości procentowej modyfikatora organicznego w fazie ruchomej umożliwiało uzyskanie satysfakcjonującej selektywności rozdzielania. Dodatkowo należy wskazać fakt, iż fazy z polarnymi grupami umożliwiały uzyskanie podobnych parametrów rozdzielania przy mniejszym zużyciu rozpuszczalników organicznych w porównaniu z fazą stacjonarną fenylo-propylową [33].

### 3. DENDRYMEROWE FAZY STACJONARNE DO CHROMATOGRAFII JONOWEJ

Chromatografia jonowa jest bardzo szybko rozwijającą się techniką analityczną. Rozwój ten powiązany jest z otrzymywaniem nowych faz stacjonarnych zawierających centra aniono- i kationowymienne. Z tego też powodu podjęto prace nad otrzymaniem dendrymerowej anionowymiennej fazy stacjonarnej syntetyzowanej na bazie żelu krzemionkowego do chromatografii jonowej [39, 40]. Pierwotna metoda syntezy dendrymerowej fazy anionowymiennej wewnątrz kapilar kwarcowych została opracowana przez Pohl'a i in. [41–43]. W dalszych pracach została rozwinięta metodologię syntezy fazy dendrymerowej na powierzchni sferycznego porowatego polimeru [44–46].

Otrzymanie dendrymeru zawierającego czwartorzędowe grupy amoniowe jako centra anionowymienne polega na kondensacji epoksydu z aminą. W przypadku syntezy materiału na powierzchni nośników polimerowych warstwa wiążąca do powierzchni tworzona była przez pokrywanie powierzchni polimerem. Wadą tej metody był brak wiązań kowalencyjnych między warstwą polimeru a powierzchnią nośnika. Powodowało to odrywanie się fazy stacjonarnej przy dużych wartościach przepływu fazy ruchomej. Stąd też podjęto prace nad kowalencyjnym związaniem dendrymerowych ligandów do powierzchni żelu krzemionkowego. Cel ten osiągnięto poprzez silanizację powierzchni krzemionki ligandem zawierającym dwie grupy aminowe, który wcześniej został zastosowany do syntezy fazy cholesterolowej. Przyłączone do powierzchni grupy aminowe stały się punktem wyjściowym do polikondensacji z epoksydem [40]. Dalszy etap syntezy dendrymeru był analogiczny jak w przypadku na nośniku polimerowym. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 5.

Tworzenie dendrymeru o zwiększonej liczbie warstw powoduje zmiany w mechanizmie retencji. W przypadku krótkich ligandów retencja jest wynikiem oddziaływań jonów z fazy ruchomej z centrami jonowymiennymi na powierzchni fazy. W przypadku wydłużania ligandu i zapełniania porów, centra jonowymienne znajdują się na całej długości ligandów powodując migrację jonów pomiędzy ligandami w stronę powierzchni nośnika. Proces ten w znaczny sposób zwiększa parametry retencyjne. Tak więc do celów analitycznych wystarczające są materiały o 3 warstwach dendrymeru. Zapewniają one dobrą selektywność przy krótkim czasie analizy [40].



Rysunek 5. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych: A – na nośniku krzemionkowym, B – na nośniku polimerowym

Figure 5. Structures of dendrimer stationary phases: A – using silica gel support, B – using polymer support

Porównując fazy otrzymane na nośniku krzemionkowym z analogicznymi materiałami syntetyzowanymi na bazie polimeru, znacznie lepsze parametry analityczne (sprawność, symetria pików) uzyskano dla faz krzemionkowych. Wynika to z lepszych parametrów geometrycznych nośnika krzemionkowego, zapewniającego znacznie poprawienie sprawności. Umożliwiają one rozdzielanie 9 anionów nieorganicznych w czasie 20 minut [40].

Dendrymerowe fazy anionowymienne zastosowano w analizie monofosforanów nukleotydów [40]. Retencja i rozdzielczość monofosforanów nukleotydów zwiększała się wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru (od 1 do 4 warstw). W przypadku anionów nieorganicznych, do rozdzielania fluorków, chlorków, bromków, azotanów(III) i azotanów(V) potrzebna była faza stacjonarna z dwoma warstwami dendrymeru. W celu rozdzielania 4 monofosforanów nukleotydów wystarczająca okazała się faza ze związaną tylko warstwą. Podane przykłady nie wykluczają aplikacji, dla których wymagana będzie większa liczba warstw dendrymeru, którą można w prosty sposób uzyskać opracowaną metodą.

W celu pełnej charakterystyki otrzymanych faz stacjonarnych do chromatografii jonowej zarówno na nośniku polimerowym, jak i krzemionkowym zastosowano nowatorską metodę pomiaru potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer [39]. Potencjał zeta jest wartością charakterystyczną dla powierzchni pozostającej w kontakcie z roztworem. W poniższych rozważaniach dla uproszczenia podawany

jest termin „potencjał zeta fazy stacjonarnej”. Zgodnie z oczekiwaniami, chemicznie związane fazy stacjonarne obdarzone trwałym ładunkiem dodatnim wykazały dodatnie wartości potencjału zeta, podczas gdy nośniki (polimerowy i krzemionkowy) wykazywały ujemne wartości potencjału zeta. Zaobserwowano również wzrost wartości potencjału zeta wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru, co jest efektem większej ilości trwałych ładunków dodatnich w strukturze związanych ligandów. Wzrost ten nie jest jednak liniowy. Potencjały zeta dendrymerowych faz anionowymiennych zmieniały się również wraz ze zmianą eluentu (rosły w kolejności: NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>). Dodać należy, że w przypadku faz otrzymanych na nośniku krzemionkowym nie można stosować faz ruchomych o alkalicznym pH, stąd pewne ograniczenia zarówno dla pomiarów potencjałów zeta, jak i dla zastosowania analitycznego otrzymanych materiałów. Nie zmienia to jednak faktu, że dla materiałów otrzymanych na nośniku krzemionkowym można zastosować szereg faz ruchomych umożliwiających rozdzielenie anionów nieorganicznych [40].

Pomiar potencjału zeta faz jonowymiennych wydaje się być kluczowym parametrem ich charakterystyki. Mierzona wartość potencjału na granicy faza stacjonarna – roztwór wydaje się być siłą przyciągającą jony z roztworu. Ponadto, rozkład potencjału zeta daje dodatkową wiedzę na temat homogeniczności ziaren chemicznie modyfikowanej fazy stacjonarnej [39]. Dla faz stacjonarnych nie posiadających trwałych ładunków w strukturze związanych ligandów również można zastosować pomiar potencjału zeta.

#### **4. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE FAZ STACJONARNYCH Z WBUDOWANYMI GRUPAMI POLARNYMI – POTENCJAŁ ZETA NA GRANICY FAZA STACJONARNA / FAZA RUCHOMA**

Pomiar potencjału zeta zastosowany do charakterystyki powierzchniowej chemicznie związanych faz stacjonarnych pozwala na uzyskanie informacji, które nie są dostępne dla innych technik [47–50]. Poza zastosowaniem pomiaru potencjału zeta do charakterystyki faz do chromatografii jonowej, możliwe jest również zastosowanie tej techniki do charakteryzowania typowych faz stacjonarnych dla normalnego i odwróconego układu faz [51]. Szczególnie interesujące wydają się być badania potencjałów zeta chemicznie związanych faz stacjonarnych zawierających w swej strukturze polarne grupy funkcyjne [52]. Pośród testowanej grupy chemicznie związanych faz stacjonarnych znajdowały się fazy alkilowe, fenyłowe, fazy z wiązaniem amidowym, fosforoamidowym oraz fazy aminowe. Pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer podzielił testowane materiały na fazy z dodatnią i ujemną wartością potencjału zeta. Dla większości faz stacjonarnych potencjał zeta ma wartość ujemną. Jest to związane z obecnością na powierzchni krzemionki ujemnych ładunków pochodzących z jonizacji grup silanolowych oraz ligandów nieobdarzonych ładunkiem. Dodatkowo wartości potencjałów zeta wykazały fazy aminowe i fazy posiadające resztkowe grupy aminowe nie zmodyfikowane na etapie

syntezy. Należy zwrócić uwagę, że pomiary wykonywane były w rozpuszczalnikach organicznych i ich mieszaninach z wodą. Zatem przeprowadzone badania wykazały, że grupy aminowe obecne w strukturze chemicznie związanych faz stacjonarnych w warunkach RP HPLC mają przyłączony proton i mogą oddziaływać jak słabe wymieniacze jonowe, modyfikując mechanizm retencji wielu analitów. Porównując wpływ modyfikatorów organicznych faz ruchomych na potencjał zeta można zauważyć, że w środowisku metanolu obserwuje się wyższe (bardziej dodatnie) wartości potencjału zeta, a w przypadku zastosowania acetonitrylu wartości te są niższe (bardziej ujemne) [52].

## 5. PROCESY SOLWATACYJNE NA POWIERZCHNI FAZ STACJONARNYCH Z WBUDOWANYMI GRUPAMI POLARNYMI

W przypadku faz o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych istotne są badania powiązane z tematyką procesów solwatacyjnych, szczególnie w układzie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Przeprowadzono pomiary adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu, ponieważ wiadomym było, że proces ten pełni istotną rolę w mechanizmie retencji. Przeprowadzone badania potwierdzają, że na fazach stacjonarnych stosowanych w układzie HILIC tworzy się warstwa zaadsorbowanej wody, a retencja analitów odbywa się na zasadzie podziału substancji między fazę ruchomą, a warstwę zaadsorbowanej wody. Dzięki tym badaniom udało się uzyskać korelację pomiędzy ilością zaadsorbowanej wody na powierzchni fazy stacjonarnej, a retencją analitu [53]. Opracowana metoda pomiaru adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu posłużyła również do opracowania testu przydatności fazy stacjonarnej dla układu HILIC.

Opracowaną metodę zastosowano również do charakterystyki chemicznie związanych faz stacjonarnych, w których grupy silanolowe zostały zastąpione wiązaniem krzem-wodór (Si-H). Materiały syntezowane w ten sposób także znajdują zastosowanie w układzie HILIC [54]. Do pełnej charakterystyki nowych materiałów chromatograficznych wykorzystano również mikrokalorymetryczne pomiary ciepła adsorpcji rozpuszczalników, na podstawie których możliwe jest obliczenie ilości centrów na powierzchni fazy stacjonarnej, które są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych [55]. Przeprowadzone badania dowiodły, że pomiar procesów solwatacyjnych, zarówno poprzez wyznaczenie izoterm adsorpcji jak i mikrokalorymetryczne pomiary ciepła zwilżania są bardzo dobrymi metodami do charakteryzowania powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych w układzie HILIC [53, 54].

## UWAGI KOŃCOWE

Fazy stacjonarne z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi stanowią interesującą alternatywę dla tradycyjnych wypełnień chromatograficznych. Oferują one specyficzne właściwości powierzchniowe, które mogą umożliwić selektywne rozdzielanie związków organicznych, również takich o znaczącej polarności. Dodatkowo, obecność polarnych grup funkcyjnych powoduje, że materiały te mogą być stosowane w znacznie szerszym składzie faz ruchomych, np. zarówno w układzie odwróconych faz chromatografii ciekowej jak i w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Prowadzone badania pokazały, że ich zastosowanie umożliwia również rozdzielanie polarnych substancji z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej.

## PIŚNIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam 1979.
- [2] U.D. Neue, *HPLC Columns. Theory, technology and practice*, Wiley-VCH, New York 1997.
- [3] B. Buszewski, K. Krupczyńska, R.M. Gadzała-Kopciuch, G. Rychlicki, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 313.
- [4] M. Jaroniec, *J. Chromatogr. A*, 1993, **656**, 37.
- [5] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 1990, **449**, 177.
- [6] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 231.
- [7] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A.*, 2013, **1370**, 1.
- [8] P. Sandra, K. Sandra, A. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, *LC-GC Eur.*, 2010, **23**, 242.
- [9] K. Hartonen, M.-L. Riekkola, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 2008, **27**, 1.
- [10] W. Hu, K. Hasebe, D.M. Reynolds, H. Haraguchi, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **353**, 143.
- [11] J. Layne, *J. Chromatogr. A.*, 2002, **957**, 149.
- [12] B. Buszewski, J. Schmid, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 1991, **552**, 415.
- [13] B. Buszewski, M. Jezierska-Świtła, S. Kowalska, *J. Chromatogr. B*, 2003, **792**, 279.
- [14] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 731.
- [15] S. Bocian, M. Paca, B. Buszewski, *Analyst*, 2013, **138**, 5221.
- [16] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 1997, **779**, 29.
- [17] J. Nawrocki, B. Buszewski, *J. Chromatogr.*, 1988, **449**, 1.
- [18] B. Buszewski, M. Jezierska, M. Wełniak, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A*, 1999, **845**, 433.
- [19] B. Buszewski, M. Jezierska, B. Ostrowska-Gumkowska, *Mater. Chem. Phys.*, 2001, **72**, 30.
- [20] S.V. Galushko, *Chromatographia*, 1993, **36**, 39.
- [21] S. Bocian, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2015, **990**, 198.
- [22] A. Taillardat-Bertschinger, P.-A. Carrupt, F. Barbato, B. Testa, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 655.
- [23] S. Ong, S. Cai, C. Bernal, D. Rhee, X. Qiu, C. Pidgeon, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 782.
- [24] S. Ong, H. Liu, X. Qiu, G. Bhat, C. Pidgeon, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 755.
- [25] M. De Vrieze, D. Verzele, R. Szucs, P. Sandra, F. Lynen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 6179.
- [26] R. Kaliszan, A. Kaliszan, I.W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 505.
- [27] F. Barbato, G. di Martino, L. Grumetto, M.I. La Rotonda, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, **22**, 261.
- [28] J. Walczak, S. Bocian, B. Buszewski, *Food Anal. Methods*, 2015, **8**, 661.



- [29] K. Krzemińska, S. Bocian, *Analyst*, 2018, **143**, 1217.
- [30] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Talanta*, 2014, **131**, 684.
- [31] S. Bocian, B. Buszewski, *Talanta*, 2015, **143**, 35.
- [32] R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1273.
- [33] S. Bocian, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 3435.
- [34] R.M. Gadzała-Kopciuch, M. Kluska, M. Welniak, W. Kroszczyński, B. Buszewski, *Polish J. Environ. Studies*, 1999, **8**, 383.
- [35] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1069**, 217.
- [36] J. Horak, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1045**, 43.
- [37] K. Kimata, K. Hosoya, H. Kuroki, N. Tanaka, J.R. Barr, P.C. Mc-Clure, D.G.J. Patterson, E. Jakobsen, A. Bergman, *J. Chromatogr. A*, 1997, **786**, 237.
- [38] B. Buszewski, Z. Suprynowicz, R. Lodkowski, R. Nasuto, K. Szymańska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1983, **28**, 731.
- [39] B. Buszewski, M. Jaćkowska, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.*, 2013, **36**, 156.
- [40] S. Bocian, S. Studzińska, B. Buszewski, *Talanta*, 2014, **127**, 133.
- [41] P. Kubań, P.K. Dasgupta, C. Pohl, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 5462.
- [42] C. Pohl, C. Saini, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1213**, 37.
- [43] M.B. Smith, J. March, *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, Wiley-Interscience Publication, New York 2001.
- [44] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Gawdzik, M. Grochowicz, B. Buszewski, *Matter. Chem. Phys.*, 2011, **130**, 644.
- [45] B. Buszewski, M. Jaćkowska, S. Bocian, P. Kosobucki, B. Gawdzik, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 601.
- [46] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Buszewski, *Analyst*, 2012, **137**, 4610.
- [47] O. Stern, *Z. Elektrochem.*, 1924, **30**, 508.
- [48] D.J. Shaw, *Electrophoresis*, Academic Press, London 1969.
- [49] F. Foret, P. Bocek, *Adv. Electrophoresis*, 1990, **3**, 272.
- [50] K. Salomon, D.S. Burgi, J.C. Helmer, *J. Chromatogr.*, 1991, **559**, 69.
- [51] B. Buszewski, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 1529.
- [52] S. Bocian, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 2625.
- [53] S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1278**, 89.
- [54] S. Bocian, G. Rychlicki, M. Matyska, J. Pesek, B. Buszewski, *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, **416**, 161.
- [55] B. Buszewski, S. Bocian, G. Rychlicki, M. Matyska, J. Pesek, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1232**, 43.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 czerwca 2018

