

Separation of Parabens by the RP HPLC on Cyanopropyl Chromatographic Phases from Different Manufacturers, using a Mobile Phase with High Water Content

O.A. Syrotchuk[†], I.R. Didukh[‡], V.N. Zaitsev^{*‡}

[†]Central laboratory for quality control of medicines and medical products, Kudryavska 10-G, 04053 Kyiv, Ukraine

[‡]Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente 225, Rio de Janeiro, RJ – Brasil;

*e-mail: vnzaitsev@puc-rio.br

Received: December 21, 2017; Accepted: April 12, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

Chromatographic phases with silica immobilized cyanopropyl fragments (CN-phases) are a modern alternative to the common octadecyl phases. They permit reduce separation time of lipophilic compounds when mobile phases with a high content of water is used and thus improve the efficiency of the chromatographic analysis and reduce its cost. However, the reproducibility of analytical techniques for separation of lipophilic compounds on the columns from different manufacturers can be problematic. Using model compounds containing phenolic, carboxyl and alkyl fragments (methyl- and propyl parabens), six chromatographic columns of different manufacturers were compared. It has been shown that the retention factors of parabens can vary up to seven times, and the value of hydrophobic selectivity of some columns is abnormally high. This indicates the non-equivalence of the columns of different manufacturers, which may be due to changing in partition mechanisms of the analytes on different CN-columns, which in turn is determined by the peculiarities of the structure of the immobilized layer.

Keywords: CN-column, methylparaben, propylparaben, HPLC

Особливості розділення парабенів методом ОФ ВЕРХ на ціанопропільних хроматографічних фазах різних виробників, із використанням рухомої фази з високим вмістом води

O.A. Сиротчук[†], I.P. Дідух[‡], В.М. Зайцев^{*‡}

[†]Центральна лабораторія з аналізу якості лікарських засобів та медичної продукції, вул. Кудрявська 10-Г, 04053 Київ, Україна

[‡]Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente 225, Rio de Janeiro, RJ – Brasil;

*e-mail: vnzaitsev@puc-rio.br

Надійшла: 21 грудня 2017 р; Прийнята: 12 квітня 2018 р

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

Нерухомі хроматографічні фази на основі силікагелю з іммобілізованими ціанопропільними фрагментами (CN-фази) є сучасною альтернативою октадецильних фаз. Вони дозволяють зменшити час утримування ліпофільних сполук при використанні рухомих фаз із високим вмістом води і, таким чином, підвищити ефективність хроматографічного аналізу та зменшити його вартість. Проте, відтворюваність аналітичних методик розділення ліпофільних сполук на колонках різних виробників проблематична. Із використанням модельних сполук що містять фенольні, карбоксильні та алкільні фрагменти (метил- та пропілпарабенів) було проведено порівняння шести хроматографічних колонок різних виробників. Продемонстровано, що фактори утримування парабенів можуть змінюватися у сім разів, а значення гідрофобної селективності деяких колонок аномально завищені. Це вказує на нееквівалентність колонок різних виробників, яка, може бути пов'язана із зміною механізмів утримування аналітів на різних CN-колонках, що у свою чергу визначається особливостями будови іммобілізованого шару.

Ключові слова: CN-колонки, метилпарабен, пропілпарабен, ВЕРХ

В обернено-фазовому режимі (ОФ) високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), час утримування сполук на хроматографічних колонках із гідрофобною нерухомою фазою

визначається, в основному, рівнем дисперсійних взаємодій між адсорбатом та адсорбентом [1–3]. З метою зменшення впливу специфічної взаємодії (наприклад, за рахунок утворення

небажаних водневих зв'язків між донорними групами адсорбату та залишковими силанольними групами поверхні кремнеземного носія [4–6]), сучасні хроматографічні колонки мають високу густину іммобілізованого покриття [2]. Висока гідрофобність таких колонок зумовлює значні часи утримування аналітів, або необхідність збільшення вмісту органічного компонента в рухомій фазі. Обидва зазначені підходи погіршують аналітичні параметри методу, збільшуючи тривалість аналізу, ціну та екобезпечність. Одним із підходів до покращення параметрів ОФ ВЕРХ є використання хроматографічних колонок, що мають високу густину закріпленого шару, але меншу гідрофобність, ніж класичні C18[7]. Для розділення малополярних сполук пропонуються хроматографічні фази, що містять на поверхні одночасно полярні та неполярні функціональні групи, а також фази, що містять в одній молекулі як полярний (наприклад аміногрупу) такі неполярний (наприклад октацетильний) фрагменти [8–10]. Цей підхід обмежується високою ціною хроматографічних колонок нового типу та їх доступністю. Іншим напрямком покращення ОФ ВЕРХ є використання колонок з прищепленими ціанопропільними групами (Cyano, CN) [2]. Їх застосування дозволяє зменшити вміст органічного компонента рухомої фази до 20 [15] і навіть до 10 %, що дуже важливо при рутинному фармацевтичному аналізі [11–13].

Недоліком CN-колонок є суттєва зміна їх хроматографічних властивостей в залежності від температури, складу рухомої фази та густини іммобілізованого шару [14,16]. Вважається, що така залежність пов'язана із можливою зміною геометрії прищеплених груп[17–19].

Зважаючи на наявність великої кількості комерційних хроматографічних колонок, що містять однакову функціональну групу, та значну

варіабельність хроматографічних властивостей цих колонок, важливим є визначення еквівалентності колонок, відтворюваності методики аналізу на CN-колонках різних виробників, з'ясування граничних умов, що призводять до суттєвих змін властивостей колонки. Дослідження цих параметрів було проведено для валідованої методики визначення парабенів у продукції фармацевтичних підприємств.

Матеріали та методи досліджень

У дослідженні були використані стандартні зразки Європейської фармакопеї: метилпарабен та пропілпарабен, деіонізовану воду (Simplicity, Milli-Q, Millipore), ацетонітрил (HPLC grade, Sigma-Aldrich), фосфорну кислоту 85 % (analyticalgrade, Merck). Для приготування розчину стандартних зразків, в мірну колбу об'ємом 100 мл додавали по 20 мг метилпарабену та пропілпарабену, 15 мл ацетонітрилу та доводили до мітки деіонізованою водою. Рухому фазу готували змішуючи 150 мл ацетонітрилу, 850 мл деіонізованої води і 1 мл ортофосфорної кислоти (85 %).

Хроматографічні дослідження проведено на рідинному хроматографі HP 1100 (Agilent Technologies), обладнаному діодно-матричним детектором, чотирьох-канальним насосом, дегазатором, термостатованим автоматичним пробовідбірником і термостатом колонок. Перелік колонок, що були використані у дослідженні, та основні характеристики нерухомих фаз наведено в Табл.1. Швидкість потоку рухомої фази складала 1.3 мл/хв. Температура термостату колонки 30 °С, об'єм інжекції 10 μ л, довжина хвилі детектування: 254 нм. Мертвий об'єм колонок визначали експериментально за часом виходу урацилу, при використанні рухомої фази $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=1:1$.

Таблиця 1. Використані колонки та їх характеристики.

ID	Компанія	Колонка	Вміст карбону		Розмір пор, А	Площа поверхні, м ² /г	End-capping
			%	%/m ²			
1	MACHEREY-NAGEL (www.mn-net.com/)	Nucleosil CN-RP	5.0	0.014	100	350	-
2	Waters www.waters.com	Spherisorb CN	3.1	0.014	80	220	-
3	Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com)	Discovery Cyano	4.5	0.022	180	200	+
4		Supelcosil CN	4.0	0.023	120	170	+
5	Phenomenex (www.phenomenex.com)	Luna CN	7.0	0.017	100	400	+
6	ThermoFisherScientific (www.thermofisher.com)	Hypersil CN	4.0	0.023	130	170	+

Значення рKa та logP парабенів розраховували в програмі ACD labs. Фактори утримування(k) розраховували за формулою (1):

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

де t_R, t_M – час утримування речовини та час для елюювання мертвого об'єму, відповідно.

Коефіцієнти гідрофобної селективності (α) розраховували за формулою (2):

$$\alpha_{CH_2} = 1/2 (k_{PP} / k_{MP}) \quad (2)$$

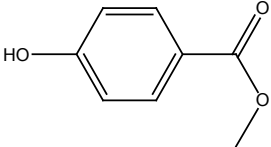
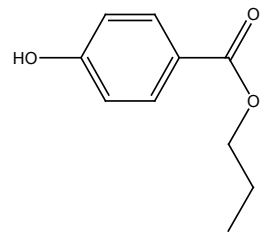
де k_{PP}, k_{MP} – фактори утримування пропіл- та метилпарабенів, відповідно.

Результати і обговорення

Через залежність хроматографічних властивостей CN-нерухомих фаз від температури, усі дослідження проводили з використанням термостату колонок, за однакових умов. Як видно з таблиці 1, для дослідження були обрані сучасні хроматографічні колонки, нерухомі фази яких суттєво різняться густиною закріпленого шару (містять від 3.1 до 7.0 % карбону), площею поверхні (170-400 м²/г) та вмістом залишкових силанольних груп. Відповідно до цього хроматографічні властивості обраних колонок можуть суттєво різнитися, можуть змінюватися, особливо у полярних рухомих фазах при розділенні сполук, що містять групи, які здатні до диполь-дипольних взаємодій чи утворювати водневі зв'язки. В якості аналітів було обрано метилпарабен (MP) та пропілпарабен (PP), які мало різняться між собою значеннями рKa (є слабкими органічними кислотами), але при цьому мають різну

гідрофобність, Таблиця 2. Як модифікатор рухомої фази використовували фосфорну кислоту, щоб забезпечити знаходження аналітів виключно в молекулярній формі.

Таблиця 2. Структурні формули та значення рKa та logP вибраних аналітів.

Назва	Формула	рKa	logP
Метил-парабен (MP)		8.3±0.1	1.9 ± 0.2
Пропіл-парабен (PP)		8.2±0.1	2.9 ± 0.2

Було встановлено, що в умовах ОФ ВЕРХ, коли вміст полярного розчинника дуже значний (85%), хроматографічні властивості CN-колонок різних виробників суттєво різняться між собою. Зокрема, фактор утримування метилпарабену, може змінюватися у сім разів, рис.1.3, з практичної точки зору це означає, що аналітична методика, яка була розроблена на колонці Luna CN буде невідтворюваною на колонці Supelcosil CN, оскільки утримування метилпарабену на останній наближується до мертвого об'єму системи.

Якщо методика була розроблена для Supelcosil CN, застосування колонки Luna CN призведе до

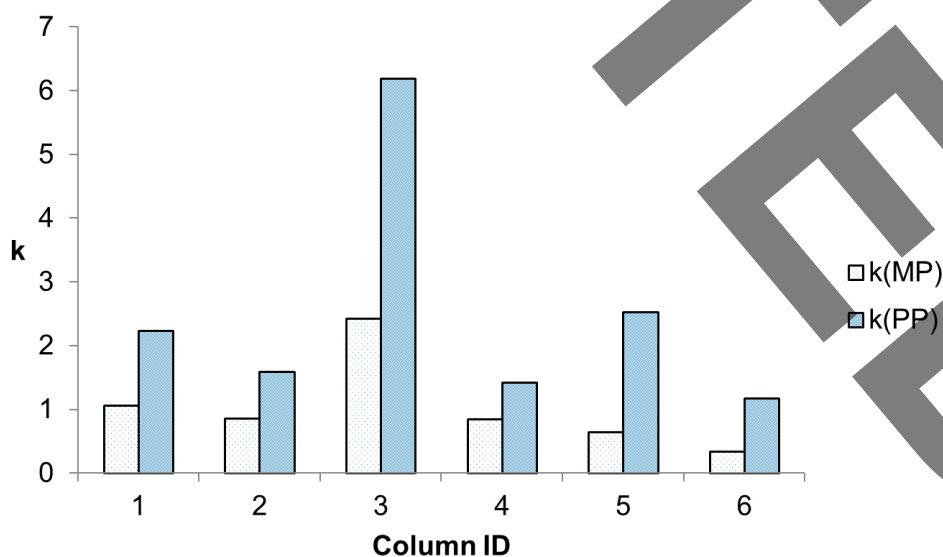


Рис.1. Фактори утримування метилпарабену (MP) та пропілпарабену (PP) на досліджених хроматографічних колонках (ідентифікатори колонок наведені у Таблиці 1).

непомірних витрат часу та розчинників.

З метою встановлення причин суттєвої зміни хроматографічних властивостей нерухомих фаз були розраховані фактори утримування, та коефіцієнти гідрофобної селективності колонок, Табл. 3.

Таблиця 3. Коефіцієнти гідрофобної селективності (α_{CH_2}) та фактори утримування метилпарабену (k_{MP}) для досліджених колонок у порівнянні з літературними даними [20].

ID	Нерухома фаза	Функціональна група*	α_{CH_2}	k_{MP}
1	Nucleosil	CN	1.05	1.06
2	Spherisorb	CN	0.93	0.85
3a	Discovery	CN/C1	0.84	0.84
3b		CN/C1**	1.0	-
4	Supelcosil	CN/C1	1.76	0.33
5a	Luna	CN/C1	1.28	2.42
5b		CN/C1**	1.14	-
6	Hypersil	CN/C1	1.97	0.64

*- CN – одноmodalьна фаза, що містить на поверхні ціанопропільні фрагменти; CN/C1 – біmodalьна фаза, що одночасно містить ціанопропільні та триметилсилільні фрагменти; ** - дані отримані у дослідженні [20].

Фактор гідрофобної селективності дозволяє визначити вплив дисперсійних взаємодій на утримування сполук хроматографічною фазою. Відомо [20], що значення α_{CH_2} для CN-фаз змінюються в межах 1.00 – 1.18, що суттєво менше ніж для C18 фаз – від 1.44 до 1.51. Як видно з таблиці 3, для чотирьох з шести досліджених колонок значення α_{CH_2} співпадають з літературними даними, що свідчить про незначний вклад дисперсійних взаємодій в утримування парабенів на зазначених CN-фазах. Саме з цієї причини вплив ендкепінгу на значення α_{CH_2} не було виявлено. Наприклад, для колонки Discovery CN, поверхня якої додатково гідрофобізована триметилсилільними групами, значення α_{CH_2} менше ніж у негідрофобізованих Nucleosil CN та Spherisorb CN, Табл.3. Для колонок Hypersil CN (4) та Supelcosil CN (6) значення α_{CH_2} навіть перевищують гідрофобну селективність C18 фаз. На нашу думку аномальність значень α_{CH_2} для колонок 4 та 6 свідчить про зміну у механізмі утримування на них парабенів із довголанцюговими замісниками, із значним зростанням вкладу дисперсійної взаємодії.

Фактори утримування сполук на CN-колонці важко передбачити, тому, що вони визначаються сукупністю диполь-дипольних, іонних та дисперсійних взаємодій між іммобілізованими

групами та молекулами аналіту [5]. Проте, якщо фактор утримування сполуки знайдено для колонок одного типу в однакових умовах, його величина характеризує площу поверхні адсорбенту і густину закріпленого шару [20]. Тому, порівнюючи значення факторів утримування модельних сполук для різних нерухомих фаз можна встановити характеристики іммобілізованого шару адсорбентів, а порівнюючи утримування різних сполук на одній колонці можна встановити домінування того чи іншого механізму утримування. Зокрема, порівняння колонок, досліджених нами показує прийнятну кореляцію значень k із площею поверхні нерухомих фаз, Рис. 2.

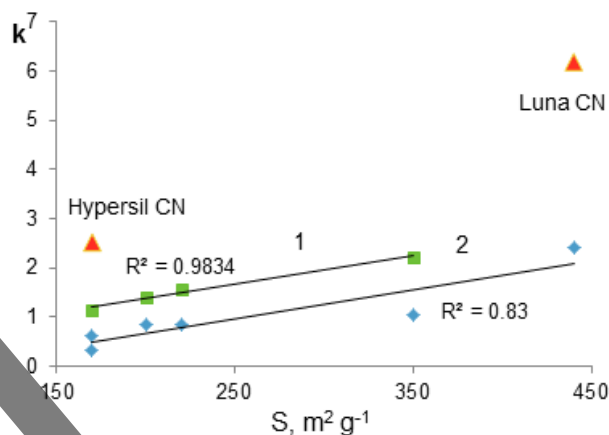


Рис. 2. Залежність k_{PP} (1) та k_{MP} (2) від питомої площі поверхні (S) нерухомих фаз досліджених хроматографічних колонок.

Порівняння факторів утримування пентилбензолу (k_{PB}) на хроматографічних колонок різних виробників показує, що CN-фази мають, як правило, у 15-25 разів нижчі значення k_{PB} ніж C18 фази [20]. Це означає, що внесок дисперсійної взаємодії на утримування аналітів на CN-фазах, як правило у 15-25 менший, ніж на C18 фазах. Хроматографічна фаза Luna CN утримує PB у 35 гірше ніж фаза Luna C18 [20]. Це, на нашу думку, вказує на незначний внесок дисперсійних взаємодій в утримування сполук на фазі Luna CN. Проте, як свідчать дані Рис.2, колонка Luna CN дуже добре утримує похідні парабенів. Порівнюючи ці два спостереження, а також враховуючи значення α_{CH_2} можна стверджувати, що фаза Luna CN відрізняється від інших вивчених фаз своєю аномально високою спорідненістю до парабенів, яка не може бути пояснена дисперсійними взаємодіями між аналітом та іммобілізованими групами. Інша нерухома фаза, яка випадає із встановленої закономірності – Hypersil CN. Проте, на відміну від Luna CN фаза Hypersil CN має завищену спорідненість лише до PP, Рис.2, і значення α_{CH_2} для цієї фази також аномально високі, Табл. 3. Як вказувалося вище, така поведінка може бути пояснена лише зміною механізму утримування парабенів, із зростанням вкладу гідрофобних взаємодій.

Вважається [18,21], що саме зміни у геометрії іммобілізованих груп в основному визначає зміни у хроматографічній поведінці CN-фаз. На поверхні CN-хроматографічних фаз одночасно

присутні групи, що можуть брати участь в утриманні парабенів за рахунок диполь-дипольних $(-\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$, іонних (Si-OH) та дисперсійних $(-\text{Si}(\text{CH}_3)_3)$ взаємодій [22,23], Рис.3.

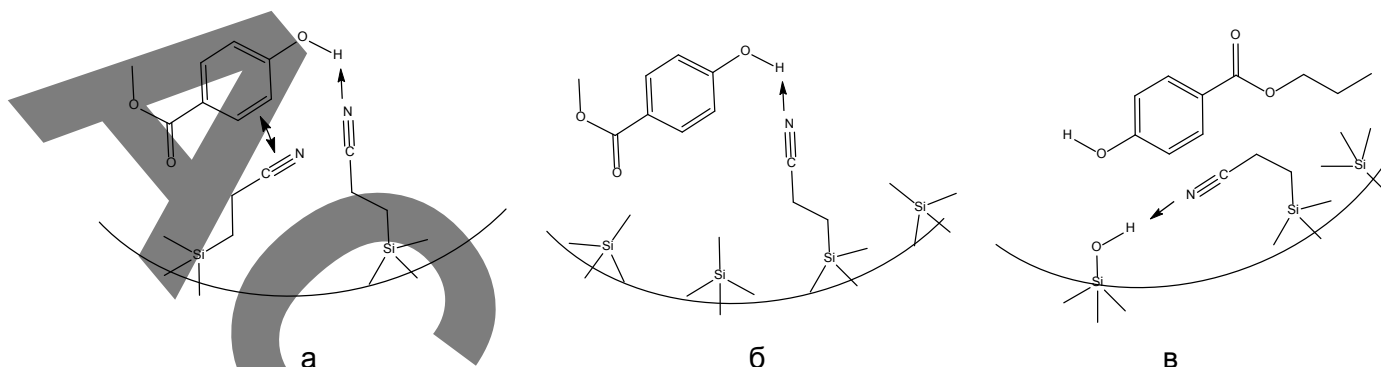


Рис.3. Схематична будова іммобілізованого шару для CN-нерухомих фаз: а) «збуджена» будова іммобілізованого шару із реалізацією диполь-дипольної і іонної взаємодії адсорбат-адсорбент; б) «збуджена» будова іммобілізованого шару, що демонструє можливість іонної взаємодії адсорбат-адсорбент; в) колапсована будова іммобілізованого шару, що допускає диполь-дипольні та дисперсійні взаємодії.

Відсутність впливу ендкепіngu на фактори утримування MP та малі значення α_{CH_2} вказують на незначний внесок дисперсійних взаємодій в утримування парабенів. Натомість, аномально високе утримування парабенів на Luna CN може вказувати на існування кооперативних ефектів взаємодії іммобілізованих груп з аналітом за рахунок диполь-дипольних взаємодій, Рис.3а. Інші досліджені CN-фази такого синергізму не демонструють, тому для них можна припустити наявність диполь-дипольних взаємодій одного типу, наприклад, між фенольною та $-\text{C}\equiv\text{N}$ групою, рис. 3б. Для негідрофобізованих фаз характерні дещо вищі значення k ніж для фаз з ендкепіngом. Це вказує на можливий внесок в утримування парабенів диполь-дипольних взаємодій між силанольними групами носія та фенольним кільцем парабенів. Із збільшенням ліпофільності аналіту може змінюватися механізм його взаємодії з хроматографічною CN-фазою, із підвищенням впливу дисперсійної взаємодії, рис.3в. Саме це, на нашу думку, і відбувається для Hypersil

CN та Supelcosil CN-фазах при визначенні PP, призводячи до аномального зростання коефіцієнту гідрофобної селективності.

Висновки

Таким чином, за високого (85%) вмісту води у рухомій фазі, утримування парабенів на CN-колонках різних виробників суттєво різняться. Це може бути пов'язано із зміною будови іммобілізованого шару нерухомих фаз в умовах проведення хроматографічного розділення. Виходячи з експериментальних даних можна припустити, що на поверхні Luna CN ціанопропільні групи мають збуджену геометрію, що сприяє диполь-дипольним взаємодіям між фазою та аналітом. Інші досліджені фази такого синергізму не виявляють. Внесок триметилсилільних чи силанольних груп в утримування парабенів незначний. Збільшення гідрофобності аналіту може суттєво змінювати внесок дисперсійних взаємодій в його утримування, що проявляється в аномальних значеннях коефіцієнтів гідрофобної селективності деяких фаз.

Література

1. *Liquid Chromatography*, 2nd ed.; Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C., Riekkola, M.-L., Eds.; Elsevier, 2017.
2. *The HPLC Expert*; Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016.
3. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*; Lough, W. J.,

- Wainer, I. W., Eds.; CRC Press, 1995.
4. Koval'chuk, T. V.; Lewin, U.; Zaitsev, V. N.; Engewald, W. Chromatographic Properties of High-Density Octadecyl Phases Immobilized on High-Purity Silica Gel. *J. Anal. Chem.* 1999, 54 (2), 115–121.
5. Gilroy, J. J.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R. Column Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography. IV. Type-B Alkyl-Silica Columns. *J. Chromatogr. A* 2003, 1000 (1–2), 757–778.

6. Bocian, S.; Buszewski, B. Residual Silanols at Reversed-Phase Silica in HPLC - A Contribution for a Better Understanding. *J. Sep. Sci.* 2012, 35 (10–11), 1191–1200 DOI: 10.1002/jssc.201200055.
7. McCalley, D. V. Comparison of the Performance of Conventional C18 Phases with Others of Alternative Functionality for the Analysis of Basic Compounds by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999, 844 (1–2), 23–38 DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00250-2.
8. Wilson, N. S.; Gilroy, J.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R. Column Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004, 1026 (1–2), 91–100 DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.041.
9. Mallik, A. K.; Qiu, H.; Oishi, T.; Kuwahara, Y.; Takafuji, M.; Ihara, H. Design of C 18 Organic Phases with Multiple Embedded Polar Groups for Ultra-versatile Applications with Ultrahigh Selectivity. *Anal. Chem.* 2015, 87 (13), 6614–6621 DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00663.
10. Syrotchuk, O.; Didukh, I.; Kuras, S.; Zaitsev, V. HPLC Separation Of Bioactive Components Of Anti-Inflammatory Syrup On Stationary Phases With Embedded Polar Groups. *METHODS OBJECTS Chem. Anal.* 2015, 10 (4), 171–177 DOI: 10.17721/moca.2015.171-177.
11. Brunelli, C.; Zhao, Y.; Brown, M.-H.; Sandra, P. Development of a Supercritical Fluid Chromatography High-Resolution Separation Method Suitable for Pharmaceuticals Using Cyanopropyl Silica. *J. Chromatogr. A* 2008, 1185 (2), 263–272 DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.050.
12. Simeoni, S.; Tursilli, R.; Bianchi, A.; Scalia, S. Assay of Common Sunscreen Agents in Suncare Products by High-Performance Liquid Chromatography on a Cyanopropyl-Bonded Silica Column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38 (2), 250–255 DOI: 10.1016/j.jpba.2004.12.021.
13. Olsson, P.; Holmbäck, J.; Herslöf, B. Separation of Lipid Classes by HPLC on a Cyanopropyl Column. *Lipids* 2012, 47 (1), 93–99 DOI: 10.1007/s11745-011-3627-0.
14. Periat, A.; Guillarme, D.; Veuthey, J.-L.; Boccard, J.; Moco, S.; Barron, D.; Grand-Guillaume Perrenoud, A. Optimized Selection of Liquid Chromatography Conditions for Wide Range Analysis of Natural Compounds. *J. Chromatogr. A* 2017, 1504, 91–104 DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.024.
15. Ma, M.; Lee, T.; Kwong, E. Interaction of Methylparaben Preservative with Selected Sugars and Sugar Alcohols. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91 (7), 1715–1723 DOI: 10.1002/jps.10167.
16. Okusa, K.; Tanaka, H.; Ohira, M. Development of a New Cyano-Bonded Column for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2000, 869 (1–2), 143–149 DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00861-4.
17. Johnston, L. J.; de Mayo, P.; Wong, S. K. Surface Photochemistry: Evidence for Rotational and Translational Movement of Cyanopropyl Radicals on a Silica Gel Surface. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, No. 19, 1106 DOI: 10.1039/c39820001106.
18. Lanin, S. N.; Nikitin, Y. S.; Pyatygin, A. A.; Staroverov, S. M. The Effect of the Structure of Bonded Cyanoalkyl Stationary Phases on Their Selectivity in the Liquid Chromatographic Separation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Chromatographia* 1989, 27 (3–4), 147–155 DOI: 10.1007/BF02265867.
19. Nedd, S.; Kobayashi, T.; Tsai, C.-H.; Slowing, I. I.; Pruski, M.; Gordon, M. S. Using a Reactive Force Field To Correlate Mobilities Obtained from Solid-State ¹³C NMR on Mesoporous Silica Nanoparticle Systems. *J. Phys. Chem. C* 2011, 115 (33), 16333–16339 DOI: 10.1021/jp204510m.
20. Euerby, M. R.; Petersson, P. Chromatographic Classification and Comparison of Commercially Available Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns Using Principal Component Analysis. *J. Chromatogr. A* 2003, 994 (1–2), 13–36 DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00393-5.
21. Shreedhara Murthy, R. S.; Crane, L. J.; Bronnimann, C. E. Characterization of Cyano Bonded Silica Phases from Solid-Phase Extraction Columns. Correlation of Surface Chemistry with Chromatographic Behavior. *J. Chromatogr. A* 1991, 542 (C), 205–220 DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88762-8.
22. Cooper, W. T.; Smith, P. L. Retention Mechanisms in Cyanopropyl Normal Bonded Phase High-Performance Liquid Chromatographic Columns. *J. Chromatogr. A* 1986, 355, 57–74 DOI: 10.1016/S0021-9673(01)97303-0.
23. Rivera, D.; Harris, J. M. In Situ Studies of Pyridine Adsorption to Bare and Cyano-Derivatized Silica Sol-Gel Films Using Attenuated-Total-Internal-Reflection Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Langmuir* 2001, 17 (18), 5527–5536 DOI: 10.1021/la010280b.