

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Asta Orentienė

**IMIDAZOLIO JONINIŲ SKYSČIŲ KATIJONŲ ATSKYRIMO
ULTRAEFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS
METODAIS YPATUMŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai,
chemija – 03 P)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Joniniai skysčiai	9
1.2. Joninių skysčių taikymas	15
1.2.1. Joninių skysčių taikymas chemijoje	15
1.2.2. Pramoninis joninių skysčių taikymas	23
1.3. Imidazolio katijonų atskyrimas skysčių chromatografijos metodais	25
1.4. Hidrofilinės sąveikos chromatografija	33
1.4.1. HILIC savybės bei atskyrimo mechanizmas	33
1.4.2. Eksperimentinių veiksnių įtaka	37
1.4.3. Sorbentai HILIC metode	43
II. EKSPERIMENTO METODIKA	48
2.1. Aparatūra	48
2.2. Reagentai ir tirpalai	48
2.3. Procedūros	50
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	52
3.1. Imidazolio joninių skysčių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais	52
3.1.1. Atvirkščių fazių skysčių chromatografija	53
3.1.2. Jonų porų chromatografija	59
3.1.3. Hidrofilinės sąveikos chromatografija	62
3.1.4. Metodų palyginimas	68
3.2. Imidazolio katijonų chromatografinės elgsenos hidrofilinės sąveikos chromatografijoje tyrimas	69
3.2.1. Acetonitrilo koncentracijos įtaka	70
3.2.2. Judrios fazės pH įtaka	76

3.2.3. Buferinio tirpalo koncentracijos įtaka	79
3.2.4. Rūgšties priedų įtaka imidazolio katijonų sulaikymui	82
3.2.5. Organinio tirpiklio prigimties įtaka	85
3.2.6. Kolonėlės temperatūros įtaka	88
3.2.7. Masės perkrova kolonėlėje	93
3.2.8. Judrios fazės greičio įtaka	98
3.2.9. Imidazolio katijonų atskyrimo palyginimas	100
IŠVADOS	104
Mokslinių publikacijų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas	106
PADĖKA	106
LITERATŪROS SĄRAŠAS	107

SANTRUMPOS

ACN – acetonitrilas
AFCh – atvirkščių fazių skysčių chromatografija
BDMIM – 1-butil-2,3-dimetilimidazolio jodidas
BMIM – 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroboratas
CMMIM – 1-cianometil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imididas
DMIM – 1,3-dimetilimidazolio metilsulfatas
DMPIM – 2,3-dimetil-1-propilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imididas
EDMIM – 1-etil-2,3-dimetilimidazolio chloridas
EMIM – 1-etil-3-metilimidazolio tetracianoboratas
EtOH – etanolis
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
HEMIM – 1-(2-hidroksietil)-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imididas
HILIC – hidrofilinės sąveikos chromatografija
HMIM – 1-heksil-3-metilimidazolio chloridas
iPrOH – izopropanolis
JPCh – jonų porų chromatografija
JS – joninis skystis
MeOH – metanolis
MSA – metansulfoninė rūgštis
MS – masių spektrometrija
OMIM – 3-metil-1-oktilimidazolio chloridas
PALC – vandeninė skysčių chromatografija
PMIM – 3-metil-1-propilimidazolio jodidas
TMIM – 1,2,3-trimetilimidazolio jodidas
TFA – trifluoracto rūgštis
UESCh – ultraefektyvioji skysčių chromatografija

IVADAS

Joniniai skysčiai (dar vadinami skystais elektrolitais arba skystomis druskomis) – organinės druskos, pasižyminčios žema lydymosi temperatūra (<100 °C). Žemą šių junginių lydymosi temperatūrą lemia tai, kad šie junginiai yra sudaryti iš santykinai didelio, azotą ar fosforą turinčio, asimetriško organinio katijono (pvz., imidazolio, piridinio, pirimidinio ir kt.) ir silpnai koordinuoto neorganinio ar organinio anijono (pvz. halogenido, tetrafluoroborato, metilsulfato, heksafluorofosfato ir kt.). Joniniai skysčiai pasižymi puikiu cheminiu, elektrocheminiu bei terminiu stabilumu, geru elektriniu laidumu, universaliomis tirpinančiomis savybėmis. Be to, jie yra nedegūs, nelakūs kambario temperatūroje, todėl priskiriami „draugiškoms aplinkai“ medžiagoms. Stebėtinais platum joninių skysčių populiarumą ir lėmė šios unikalios savybės, kurios gali būti keičiamos keičiant joninio skysčio katijoną ar anijoną. Neabejotinai populiariausia joninių skysčių grupė – alkilmetilimidazolio druskos, kuriose net mažiausi struktūriniai pakeitimai sąlygoja ženklus fizikinių ir cheminių savybių pokyčius. Todėl nenuostabu, kad joniniai skysčiai, kaip naujos kartos tirpikliai, pastarąjį dešimtmetį intensyviai taikomi įvairiose chemijos srityse (katalizėje, organinėje sintezėje, fermentų reakcijose, elektrochemijoje, koloidų chemijoje, ekstrakcijoje ir kt.). Taip pat tiriamas joninių skysčių pritaikymas baterijų, akumuliatorių, energijos šaltinių, kuro elementų ir fotoelektrinių prietaisų gamyboje. Pataruoju metu atsiranda vis daugiau pramonės sričių, kuriose joniniais skysčiais yra pakeičiamos įprastinės medžiagos ir tikėtina, kad ateityje tokių sričių tik daugės.

Plečiantis joninių skysčių taikymo sritims bei augant jų panaudojimo apimtims, neišvengiamai iškyla ir efektyvių jų tyrimo bei nustatymo metodų poreikis. Kadangi skirtingi joniniai skysčiai pasižymi labai panašiomis absorbcinėmis, elektrocheminėmis savybėmis bei yra nelakūs, jų nustatymui neabejotinai geriausiai tinka skysčių chromatografijos metodai. Tačiau norint šiam

tikslui efektyviai panaudoti skysčių chromatografiją, būtina nuodugniai ištirti joninių skysčių chromatografinę elgseną įvairiose skysčių chromatografijos sistemose. Deja, iki šiol nėra darbų, kuriuose būtų kompleksiskai įvertintos skirtingų skysčių chromatografijos variantų galimybės joninių skysčių katijonų atskyrimui. Be to, publikuotuose darbuose tyrimai buvo atliekami naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos įrangą, kuri pastaraisiais metais yra intensyviai išstumiamą naujos kartos ultraefektyviaja skysčių chromatografija. Galiausiai joninių skysčių katijonai savo savybėmis (stabilumu tirpaluose, skirtingomis funkcinėmis grupėmis, konjuguota π elektronų sistema, krūviu) puikiai tinka modeliniais junginiais naujų skysčių chromatografijos sistemų tyrimui.

Darbo tikslas – ištirti ir palyginti imidazolio joninių skysčių katijonų atskyrimą skirtingais ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodais bei nuodugniai ištirti imidazolio katijonų chromatografinę elgseną hidrofilinės sąveikos (HILIC) ir vandeninės skysčių (PALC) chromatografijos sąlygose.

Darbo uždaviniai:

1. Optimizuoti ir palyginti imidazolio katijonų atskyrimą atvirkščių fazių, jonų porų ir HILIC metodais;
2. Ištirti acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaką imidazolio katijonų chromatografinėi elgsenai sistemoje silikagelio sorbentas-vanduo/acetonitrilas.
3. Ištirti įvairių veiksnių (judrios fazės pH, katijono koncentracijos, organinio tirpiklio ir rūgšties prigimties, kolonėlės temperatūros bei masės perkrovų) įtaką imidazolio katijonų sulaikymui, smailių efektyvumui bei atskyrimo atrankumui HILIC ir PALC sąlygose.
4. Nustatyti imidazolio katijonų sulaikymo mechanizmą HILIC ir PALC sąlygose.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

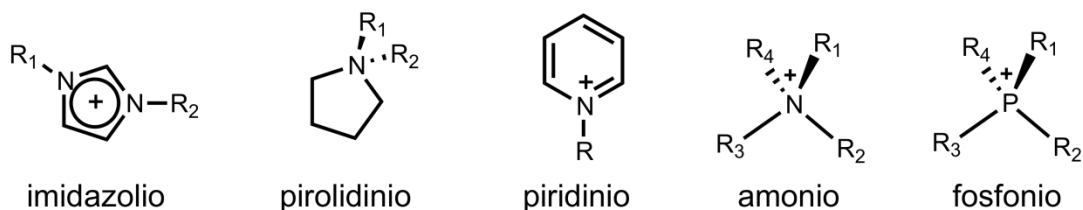
1. Hidrofilinės sąveikos chromatografija yra efektyviausias ir greičiausias skysčių chromatografijos metodas imidazolio katijonams atskirti.
2. Kolonėlėje su hibridiniu silikagelio sorbentu imidazolio katijonų eliucijos tvarka ir sulaikymo mechanizmas priklauso nuo acetonitrilo/vandens santykio judrioje fazėje.
3. Sistemoje silikagelio sorbentas-vanduo/acetonitrilas imidazolio katijonai yra sulaikomi mišriu mechanizmu: greta hidrofobinės (PALC sąlygos) ir hidrofilinės (HILIC sąlygos) sąveikų, abiejose sistemose vyksta papildoma jonų mainų sąveika tarp imidazolio katijonų ir disocijavusių silanolinių grupių.
4. HILIC metodas pasižymi žymiai didesniu kolonėlės krovumo laipsniu nei PALC.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

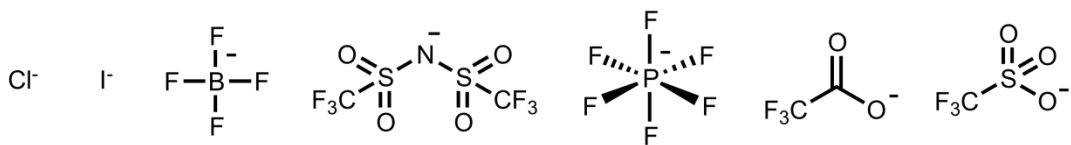
1.1. Joniniai skysčiai

Joniniai skysčiai (JS) – tai skystos organinės druskos. Kaip ir klasikinės metalų druskos, JS yra neutralūs junginiai, sudaryti iš anijono ir katijono. Nuo neorganinių druskų JS išsiskiria žema lydymosi temperatūra (<100 °C). Joniniai skysčiai, kurie kambario temperatūroje yra skystame būvyje, Weltono buvo pavadinti „kambario temperatūros JS“ [1]. Žemą šių junginių lydymosi temperatūrą lemia tai, kad šie junginiai sudaryti iš santykinai didelio, azotą ar fosforą turinčio, asimetriško organinio katijono ir silpnai koordinuoto neorganinio (pvz. halogenido, $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$ ir kt.) ar organinio (pvz. trifluormetilsulfonato, bis [(trifluormetilo) sulfonil] imido $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ ir kt.) anijono. Populiariausi JS sudarantys katijonai – imidazolio, piridinio, pirimidinio bei ketvirtinės amonio ar fosfonio druskos [2, 3]. Skirtingos anijono ir katijono kombinacijos sudaro didelę šių junginių klasę. Yra apskaičiuota, kad tokių, skirtingomis savybėmis pasižyminčių junginių gali būti net 10^{18} [4]. Populiariausių JS katijonų ir anjonų struktūros pateiktos 1.1 pav.

Katijonai:



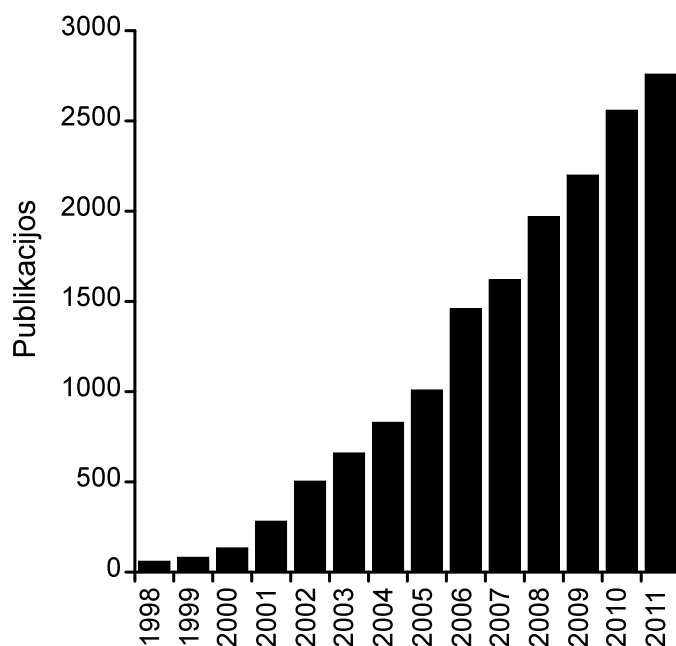
Anijonai:



1.1 pav. Populiariausių JS katijonų ir anjonų struktūrinės formulės.

JS atsiradimo istorija yra ganėtinai ilga. Jau 1888 m. Gabriel ir Weiner [5] susintetino pirmąjį joninį skystį – etanolamonio nitrata (lyd. temp. 52-55 °C), kitaip dar vadintą skysta druska. Didelio susidomėjimo nesulaukė ir 1914 m. Walden [6] susintetintas etilamonio nitratas - pirmasis kambario temperatūros JS (lyd. temp. 12 °C). Po dviejų dešimtmečių tylos tirpikliais celiuliozei buvo užpatentuotos ketvirtinės amonio druskos (1-benzilpiridinio chloridas, 1-etilpiridinio chloridas ir kt.) [7]. Dar kurį laiką kelios mokslininkų grupės bandė pritaikyti aliuminio chlorido ir 1-alkilpiridinio chlorido mišinius elektronusodiniui ir baterijų gamybai, tačiau šie mišiniai buvo nestabilūs ir veikė tik labai siaurame komponentų sudedamųjų dalių intervale [8]. 1982 m. Wilkes su kolegomis [9] susintetino žymiai stabilesnius kambario temperatūros JS – dialkilimidazolio chloraluminatus. Šie junginiai buvo daug atsparesni redukcijai, pasižymėjo mažesne klampa ir platesniu elektrocheminiu langu už 1-alkilpiridinio junginius. Vis tik dialkilimidazolio chloraluminatai buvo labai jautrūs drėgmei ir tai apsunkino jų taikymą. Ir tik praėjus daugiau nei šimtmečiui nuo pirmojo JS sintezės, šie junginiai sulaukė pripažinimo. 1992 m. Wilkes ir Zaworotko [10] pirmą kartą susintetino orui ir drėgmei atsparius kambario temperatūros imidazolio JS su silpnai kompleksuojančiais anijonais – $[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$, $[\text{NO}_3]^-$ ir $[\text{BF}_4]^-$. Nuo to laiko buvo susintetinta daugybė JS, kurie savo unikalių savybių bei paprastos sintezės dėka rado platų pritaikymą pirmiausiai akademinėje sferoje, o pastaraisiais metais ir pramonėje. JS populiarumą puikiai iliustruoja 1.2 pav. pateikta mokslinių straipsnių, kurių pavadinime yra terminas „joninis skystis“, skaičiaus dinamika 1998–2011 m. Joniniai skysčiai pasižymi ne tik žema lydimosi temperatūra, bet ir kitomis naudingomis savybėmis – cheminiu ir elektrocheminiu stabilumu, elektriniu laidumu, skirtinga klampa, universaliomis tirpinančiomis savybėmis (tirpina tiek polinius, tiek ir nepolinius junginius). Be to, jie yra nedegūs, nelakūs kambario temperatūroje, termiškai stabilūs, chemiškai atsparūs drėgmei ir orui, todėl priskiriami „draugiškoms aplinkai“ medžiagoms [11, 14]. JS unikalumą lemia ir tai, kad keičiant anijoną ir/arba katijoną, keičiasi

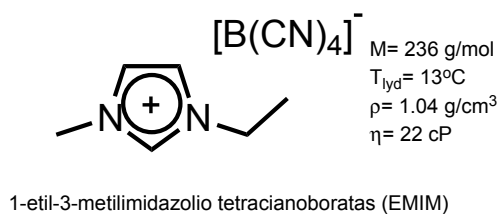
JS fizinės ir cheminės savybės, todėl jie dar vadinami „modeliuojamais tirpikliais“ (angl. „designer solvents“).

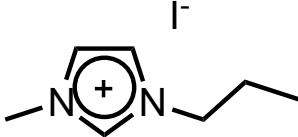
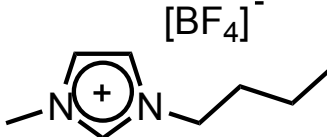
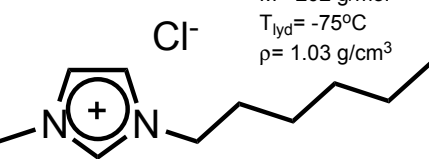
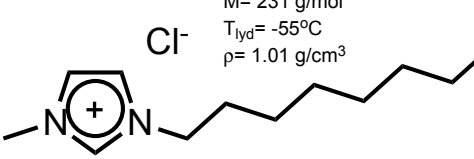
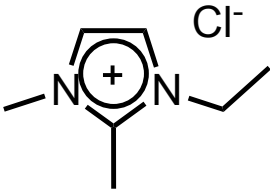
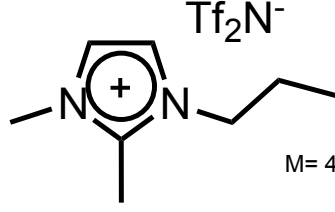
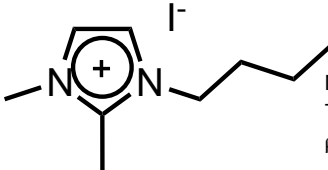
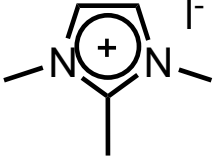
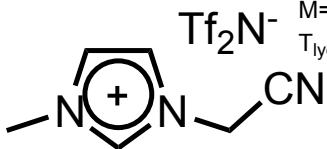
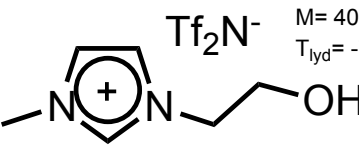


1.2 pav. Mokslinių straipsnių, kurių pavadinime yra terminas „joninis skystis“, skaičiaus kitimas 1998-2011 m.

Neabejotinai populiariausi JS – 1,3-dialkilimidazolio dariniai. Imidazolio JS išpopuliarėjo dėl to, kad juos pakankamai lengva modifikuoti, o atlikus net mažiausius pakeitimus jų struktūroje, gaunami žymūs jų fizikocheminių savybių pokyčiai [12-14]. Šiame darbe tirtų imidazolio JS cheminės formulės ir kai kurios jų fizinės savybės pateiktos 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Imidazolio katijoną turinčių JS fizinės savybės.



 <p>M= 252 g/mol $T_{lyd} = -75^{\circ}\text{C}$ $\rho = 1.55 \text{ g/cm}^3$ $\eta = 719 \text{ cP}$</p> <p>3-metil-1-propylimidazolio jodidas (PMIM)</p>	 <p>M= 226 g/mol $T_{lyd} = -71^{\circ}\text{C}$ $\rho = 1.21 \text{ g/cm}^3$ $\eta = 76 \text{ cP}$</p> <p>1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroboratas (BMIM)</p>
 <p>M= 202 g/mol $T_{lyd} = -75^{\circ}\text{C}$ $\rho = 1.03 \text{ g/cm}^3$</p> <p>1-heksil-3-metilimidazolio chloridas (HMIM)</p>	 <p>M= 231 g/mol $T_{lyd} = -55^{\circ}\text{C}$ $\rho = 1.01 \text{ g/cm}^3$</p> <p>3-metil-1-oktilimidazolio chloridas (OMIM)</p>
 <p>M= 160 g/mol</p> <p>1-etil-2,3-dimetilimidazolio chloridas (EDMIM)</p>	 <p>M= 419 g/mol</p> <p>2,3-dimetil-1-propylimidazolio bis(trifluorometilsulfoni)imididas (DMPIM)</p>
 <p>M= 298 g/mol $T_{lyd} = 97^{\circ}\text{C}$ $\rho = 1.345 \text{ g/cm}^3$</p> <p>1-butil-2,3-dimetilimidazolio jodidas (BDMIM)</p>	 <p>M= 238 g/mol</p> <p>1,2,3-trimetilimidazolio jodidas (TMIM)</p>
 <p>M= 402 g/mol $T_{lyd} = -54^{\circ}\text{C}$</p> <p>1-cianometil-3-dimetilimidazolio bis(trifluorometilsulfoni)imididas (CMMIM)</p>	 <p>M= 407 g/mol $T_{lyd} = -74^{\circ}\text{C}$</p> <p>1-(2-hidroksietil)-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfoni)imididas (HEMIM)</p>

Lydimosi temperatūra. Kaip jau minėjome, imidazolio JS būdinga žema lydymosi temperatūra, kuri daugeliu atveju yra artima kambario temperatūrai. Tokią šių junginių lydymosi temperatūrą apsprendžia mažas jų struktūros simetriškumo laipsnis, netolygus krūvio pasiskirstymas molekulėje ir galimybė sudaryti vandenilinių ryši. Lyginant JS ir neorganinių druskų lydymosi temperatūras (pvz.: NaCl lyd. temp. – 803°C , o 1-propil-3-metilimidazolio chlorido – 60°C)

aiškiai matoma, kad pakeitus mažą neorganinį katijoną dideliu asimetrišku organiniu katijonu, lydimosi temperatūra ženkliai sumažėja. Didinant 1-alkil-3-metilimidazolio alkilo grandinės ilgį iki kritinio taško (8-10 anglies atomų), o tuo pačiu ir katijono asimetriškumo laipsnį, lydimosi temperatūra mažėja. Imidazolio žiede C(2,4,5) esantys pakaitai sąlygoja glaudaus imidazolio katijonų išsidėstymo erdvėje buvimą ar nebuvimą. Šie faktoriai turi įtakos efektyviam jonų kristalinės gardelės formavimui, paremtam Kulono sąveikomis, kurios esant dideliems asimetriškiems jonams yra išardomos. Kita vertus, pakaitų įvedimas į C(2) padėtį gali stipriai padidinti lydimosi temperatūrą. Tai rodo, kad Van der Valso sąveikos tarp metilo grupių ar metil- π sąveika yra svarbesnės nei vandenilinis ryšys [12]. Didesne lydimosi temperatūra pasižymi tie junginiai, kurių katijonai yra simetriškesni. Lydimosi temperatūra taip pat padidėja esant ilgesnei alkilo grandinei (daugiau nei 8 anglies atomai) ar didėjant grandinės šakotumui [15].

Ngo ir kt. [11] nustatė, kad žemesne lydimosi temperatūra pasižymi JS, turintys fluorintus anijonus – $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, $[\{\text{CF}_3\text{SO}_2\}_2\text{N}]^-$ ir pan. Žemesnė lydimosi temperatūra būdinga ir tiems JS, kuriuose krūvis yra tolygiau pasiskirstęs, o vandeniliniai ryšiai silpnesni.

Klampa. Joniniai skysčiai pasižymi pakankamai didele klampa (nuo 10 iki 500 cP), kuri yra didesnė nei daugelio molekulinų tirpiklių. Palyginimui, vandens, etilenglikolio ir glicerolio klamos kambario temperatūroje yra atitinkamai 0,89, 16,1 ir 934 cP. Joninių skysčių klampą apsprendžia Van der Valso jėgų ir vandenilinių ryšių stiprumas. Didinant 1-alkil-3-metilimidazolio alkilo grandinės ilgį (nuo C4 iki C8) tarp katijonų susiformuoja stipresnės Van der Valso jėgos, todėl molekulės judėjimui reikalinga didesnė energija ir JS klampa padidėja. JS klampą padidina ir į alkilo grupę įvesta hidroksi grupė, kuri sustiprina vandenilinius ryšius. Tuo tarpu didelio asimetriškumo junginiai pasižymi maža klampa. Įvertinta ir anijonų įtaka JS klampai. 1-Butil-3-metilimidazolio klampa mažėja pagal šią anijonų seką: $[\text{I}]^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{TfO}]^- > [\text{CF}_3\text{CO}_2]^- >$

[Tf₂N]⁻. Tokia priklausomybė nėra tiesiogiai susijusi su anijonų dydžiu. Greičiausiai tarp deguonies ar halogeno atomų (anijono molekulėje) ir vandenilio (imidazolio katijono žiede) gali susidaryti vandenilinis ryšys, sąlygojantis didesnę JS klampą [12, 13].

JS klampa priklauso nuo temperatūros. Pavyzdžiui, temperatūrą padidinus 5 laipsniais (nuo 293 K iki 298 K), 1-butil-3-metilimidazolio heksafluorofosfato klampa sumažėja 27 % [16]. Ne ką mažesnę įtaką JS klampai turi ir priemaišos (vandens ar halogenidų). Pavyzdžiui, 3 mol/kg Cl⁻ priedas apie 9 kartus padidina 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluorborato klampą. Priešingas efektas gaunamas pridėjus vandens – 5 % vandens priedas 4 kartus sumažina klampą [12, 17].

Tankis. Daugelio žinomų imidazolio JS tankis yra didesnis už vandens ir svyruoja tarp 1 ir 1,6 g/cm³. JS tankis mažėja ilgėjant alkilo grandinei ir mažėjant katijono simetriškumo laipsniui. Nustatyta, kad JS tankis priklauso ir nuo anijono molekulinės masės: kuo didesnė anijono molekulinė masė tuo didesnis tą patį imidazolio katijoną turinčio JS tankis. Anijonų įtaka tankiui galima išdėstyti tokia seka: Cl⁻ < [BF₄]⁻ < [C₂SO₄]⁻ < [PF₆]⁻ < [(CF₃SO₂)₂N]⁻ [13].

Tirpumas. Imidazolio JS pasižymi ne tik organiniams tirpikliams būdingomis vandenilino ryšio, dipolio-dipolio ir Van der Valso, bet ir joninėmis (traukos ar atostūmio) sąveikomis. JS gebėjimas sudaryti vandenilinį ryšį tarp anijono deguonies ar halogenido ir vandenilio atomų imidazolio žiede didina šių junginių tirpumą poliniuose tirpikliuose. Tuo tarpu alkilo grupė padidina jų tirpumą ir nepoliniuose tirpikliuose. Pavyzdžiui, padidinus 1-alkil-3-metilimidazolio heksafluorofosfato alkilo grandinės ilgį nuo 1 iki 9 anglies atomų, jis tampa visiškai netirpiu vandenyje, tačiau puikiai tirpsta nepoliniuose organiniuose tirpikliuose. JS tirpumas priklauso ir nuo anijono prigimties: vietoje [PF₆]⁻ įvedus [BF₄]⁻, JS tirpumas vandenyje stipriai padidėja, priešingas efektas gaunamas vietoje [PF₆]⁻ įvedus [Tf₂N]⁻ anijoną [14].

Terminis stabilumas. Imidazolio JS terminis stabilumas didėja didėjant linijinės alkilo grandinės ilgiui. Tačiau prie azoto atomo prijungta antrinė alkilo

grupė destabilizuoja katijoną ir sumažina junginio terminį stabilumą. Itin dideliu terminiu stabilumu pasižymi kambario temperatūros JS, kurių sudėtyje yra silpnai nukleofilinių anijonų – $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$, $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ ir pan. Tokie junginiai stabilūs drėgnoje aplinkoje ir ore [13].

1.2. Joninių skysčių taikymas

1.2.1. Joninių skysčių taikymas chemijoje

Kaip minėta, didžiausias JS privalumas – galimybė pasigaminti reikiamomis savybėmis pasižymintį junginį, keičiant jo katijono ir/ar anijono struktūrą. Todėl nenuostabu, kad daugybė mokslininkų grupių užsiima naujų JS sinteze, jų savybių tyrimu ir taikymu. JS plačiai taikomi įvairiose chemijos srityse - organinėje sintezėje, elektrochemijoje, ekstrakcijoje, masių spektrometrijoje, chromatografijoje bei elektroforezėje [12, 13]. Trumpai aptarsime JS taikymą paminėtose srityse didesnę dėmesį skirdami chromatografijai.

Organinė sintezė. Ypač plačiai šie junginiai pradėti naudoti tirpikliais organinių junginių sintezėje ir/arba katalizatoriais įvairiose reakcijose [1, 12]. Chiraliniai JS plačiai naudojami enantioselektyvių junginių sintezėje [18]. Ypač svarbią vietą užima „specialios paskirties“ JS (angl. „task specific“) sintezė ir jų taikymas [19]. Daugeliu atveju įprastus organinius tirpiklius pakeitus joniniais skysčiais pagerėja reakcijos efektyvumas, gaunamos geresnės išėigos ir atrankumas, sumažinamas sunaudojamų toksiškų medžiagų kiekis bei jų patekimas į aplinką.

Elektrochemija. JS pasižymi visomis elektrolitams būdingomis savybėmis – dideliu elektriniu laidumu, plačiu elektrocheminiu langu ir mažu lakumu [20]. Todėl pirmiausia jie buvo naudojami įvairiuose elektrocheminiuose procesuose – metalų nusodinime ir valyme, poliravime, oksiduojant/redukuojant įvairius organinius ir neorganinius junginius [21]. Joniniai skysčiai buvo panaudoti ir

elektrocheminių, optinių jutiklių ir jutiklių, paremtų kvarco kristalo mikrogravimetrijos metodu, gamybai. Kambario temperatūros JS taikomi kaip nelakūs elektrolitai dujų jutiklių kūrimui. Panaudojus JS nebereikia naudoti membranų, kurios įprastose sistemose būtinos mėginio atskyrimui nuo elektrolito. Jutikliai JS pagrindu yra termiškai atsparūs ir gali būti naudojami ekstremaliomis sąlygomis [22].

Masių spektrometrija. Pasižymintys mažu lakumu JS išlieka skystame būvyje net ir vakuume, todėl jie yra puiki matrica lazerinės desorbcijos ir jonizacijos masių spektrometrijoje (MALDI) [23]. Tokioje matricoje analizės yra homogeniškai pasiskirsčiusios ir jų išgarinimo/jonizacijos metu yra išvengiama „karštų taškų“. Naujai susintetinti JS buvo panaudoti peptidų, baltymų, sacharidų, sintetinių polimerų, mažos molekulinės masės organinių junginių tyrimui. Pavyzdžiui, imidazolio JS buvo susintetinti su rūgštiniais anijonais gautais iš sinapininės rūgšties. Šios matricos buvo pritaikytos peptidų, baltymų ir polietilenglikolio tyrimams [23]. Lovejoy ir kt. [24] parodė, kad tetraalkilfosfonio joninis skystis kartu su įprastinėmis matricomis gali būti naudojamas kaip terpė dažiklių mustatymui MALDI metodu. Naudojant joninę matricą, paruoštą iš joninių skysčių, buvo nustatytos DNR oligomerų molekulinės masės [25]. Specifinės matricos JS pagrindu pasižymi didesniu stabilumu vakuume, geresniu detektavimo jautriu ir geresniu rezultatų atsikartojamumu. Šiose matricose analizuojami junginiai gerai tirpsta, tolygiai pasiskirsto.

Kitame masių spektrometrijoje naudojamame jonizacijos metode – jonizacijoje elektriniu lauku – JS naudojami kaip jonų porų reagentai mažos molekulinės masės junginiams nustatyti. Nustatant anijonus mėginyje su JS priedu, jonizacijos metu susidaro teigiamo krūvio jonų aduktai, kurių detektavimas žymiai jautresnis [26]. Martinelango ir kt. [27] pirmą kartą panaudojo dikatijoninius JS $[\text{ClO}_4]^-$ nustatymui MS metodu. Toliau sekė įvairių JS panaudojimas nitrato, jodido, benzensulfonato ir kt. mažų anijonų MS

detektavimui [28]. Buvo tiriamos ir trikatijoninių JS panaudojimo galimybės anijonų MS analizei [29, 30].

Ekstrakcija. Dviguba JS prigimtis lemia tai, kad ekstrakcija joniniais skysčiais gali vykti dviem mechanizmais: pasiskirstymo ir jonų mainų. Hidrofobiniai JS yra tinkami ekstrahentai tiek mažų organinių junginių (aromatinių ir alifatinių angliavandenilių, rūgščių, fenolių ir aminių), tiek ir didelių molekulių (baltymų, DNR, hemoglobino, penicilino) ekstrakcijai iš vandeninių mėginių [26]. Ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo JS anijono ir katijono prigimties: keičiant anijoną ir/arba katijono alkilo grandinės ilgį, galima pakeisti JS tirpumą bei jo ekstrahuojančias savybes [31]. JS, kurie nėra tirpūs organiniuose tirpikliuose ir/ar vandenyje, gali būti panaudoti formuojant dvifazes ekstrakcijos sistemas. Tokios sistemos buvo panaudotos organinių aminių (anilino, bromanilino), rūgščių (2-aminobenzenkarboksi ir 3,5-dinitrobenzenkarboksi rūgštis), benzeno ir jo darinių ekstrakcijai iš heptano [32]. Kai kurios šių junginių kombinacijos gali sudaryti trifazę ekstrakcinę sistemą, pvz.: heptanas/vanduo/BMIM·PF₆ ir vanduo/BMIM·PF₆/chloroformas. Wang su kolegomis pirmieji atliko dvigubos DNR spiralės ekstrakciją naudodami BMIM·PF₆ sistemą [33]. Buvo pastebėta, kad DNR ekstrakcijos efektyvumas pagerėja, ekstrahuojant joniniu skysčiu su ilgesne katijono alkilo grandine. Panaudojus joninį skystį DNR ekstrakcijai, išvengiama DNR denatūracijos, dažnai vykstančios ekstrahuojant įprastiniu fenolio/chloroformo metodu. Vėliau JS buvo panaudoti baltymų ekstrakcijai. Susintetinti specialios paskirties imidazolio JS su inkorporuotomis tiokarbamido, tioeterio ar karbamido grupėmis, galinčiomis kompleksuotis su metalo jonais, buvo panaudoti kadmio ir gyvsidabrio jonų ekstrakcijai iš vandeninių tirpalų. Tačiau ir tradicinis metodas, kai be JS į mėginį arba į joninį skystį (ekstrahentą) papildomai pridedama metalą kompleksuojančio ligando, sėkmingai naudojami metalų jonų ekstrakcijai iš vandeninių matricių [34]. Pavyzdžiui, Dai ir bendraautorai [35] nustatė, kad Sr²⁺ ekstrakcija iš vandens žymiai efektyvesnė naudojant imidazolio joninį skystį su krauneterio priedu.

Ypač sėkminga JS taikymo sritis – mikroekstrakciniai metodai, tokie kaip kietafazė mikroekstrakcija, skysčių-skysčių mikroekstrakcija, dispersinė skystafazė mikroekstrakcija ir kt. [26].

Dujų chromatografija (DCh). Puikus terminis stabilumas ir mažas lakumas - dvi pagrindinės savybės, kuriomis turi pasižymėti stacionari fazė DCh. Didžioji dalis tyrimų, skirtų kambario temperatūros JS taikymui DCh metode, atlikta Armstrong grupėje [36-42]. Mokslininkai kvarco kapiliaro sienelės padengė BMIM·PF₆ ir BMIM·Cl joniniais skysčiais, ištyrė jų elgseną ir nustatė, kad dėl savo savybių (klampos ir gebėjimo drėkinti) JS yra puiki stacionari fazė [36]. JS modifikuota stacionari fazė pasižymi dvigubu veikimo mechanizmu: veikia kaip mažo poliškumo stacionari fazė nepoliniams junginiams atskirti, tačiau taip pat sulaiko ir junginius, kurie turi protonų donorines grupes. Ruošiant stacionarią fazę chiralinių junginių atskyrimui, BMIM·Cl panaudotas kaip matrica mono ir di-metilo-β-ciklodekstrinams tirpinti [37]. Tačiau chiralinių junginių atskyrimo efektyvumas buvo žymiai prastesnis nei naudojant komercinę ciklodekstrino kolonėlę, kadangi chiralinių junginių atpažinimo procesui trukdė ciklodekstrino ertmėje įsitvirtinęs BMIM katijonas. Tik vėliau Armstrong su bendraautoriais [38] pristatė pirmą enantiomerų atskyrimui skirtą DCh kolonėlę, kurioje stacionaria faze panaudotas chiralinis kambario temperatūros JS. Ši kolonėlė buvo pritaikyta alkoholių, diolių, alkoksidių, sulfoksidių, epoksidų, ir acetilintų aminų enantiomerų atskyrimui. Įdomus faktas, kad pakeitus stacionarios fazės paviršiuje esančio joninio skysčio anijoną, keičiasi ir fazės atrankumas.

Vėliau Anderson ir Armstrong [39] susintetino du naujus aukštoje temperatūroje stabilus JS, 1-benzil-3-metilimidazolio trifluormetanosulfonata ir 1-(4-metoksifenil)-3-metilimidazolio trifluormetanosulfonata, pasižyminčius geresniu terminiu stabilumu (jų darbinės temperatūros atitinkamai siekė 220 ir 250 °C). Ant tokių stacionarių fazių efektyviai atskiriami įvairiausių analičių mišiniai – alkanai, alkoholiai, policikliniai aromatiniai angliavandeniliai, izomeriniai sulfoksidai. Nuo 2005 m. stacionariomis fazėmis pradėti naudoti

polimeriniai JS, stabilūs ir 350 °C temperatūroje [40, 41]. Būtina paminėti, kad Armstrong grupės darbų pagrindu, Supleco (Bellefonte, PA) firma komercializavo pirmą imidazolio JS modifikuotą stacionarią fazę dujų chromatografijai [42].

Kapiliarinė elektroforezė (KE). Kapiliarinėje elektroforezėje joniniai skysčiai gali būti naudojami elektrolitais, elektrolito priedais arba kapiliaro sienelių modifikatoriais (dinaminis ar kovalentinis padengimas) [43, 44].

KE metode atskyrimai atliekami elektrolito tirpale. Kadangi JS pasižymi geru elektriniu laidumu, jie gali būti naudojami elektrolitais, tačiau dėl didelės klampos, JS plačiau taikomi tik kaip elektrolitų priedai. JS tinkami organinių elektrolitų priedais nevandeninėje KE elektrolito laidumui pagerinti. Šia savybe pasinaudojo Vaher ir kt. [45], vandenyje netirpių dažiklių atskyrimui panaudoję dialkilimidazolio JS priedus. JS turintys ilgą alkilo grandinę buvo panaudoti vietoj įprastų detergentų micelinėje KE atskiriant chiralinius ir achiralinius junginius – alkilo arilo ketonus, fenolius, chiralinius dinaftilo darinius [46].

Kapiliaro sienelių dinaminis arba kovalentinis padengimas joniniu skysčiu pakeičia elektrosomosinio srauto kryptį. Kovalentiškai 1-metil-3-etilimidazolio katijonu padengtame kapiliare pavyko atskirti ir nustatyti K^+ ir NH_4^+ jonus žmogaus šlapime. Tokiu pat būdu paruoštas kapiliaras buvo panaudotas ir Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ir Ba^{2+} jonams raudoname vyne nustatyti [43]. Nustatyta, kad kapiliaro paviršiaus modifikavimas joniniais skysčiais praplečia darbinę pH sritį ir pagerina rezultatų atsikartojamumą bei smailių efektyvumą. Stalcup su kolegomis [47] fenolio junginių atskyrimui dinamiškai modifikavo kapiliarą 1-alkil-3-metilimidazolio katijonais. Jie nustatė, kad polifenoliai sąveikauja tiek su adsorbuotais kapiliaro paviršiuje, tiek ir su esančiais elektrolite imidazolio katijonais. Nuo to laiko literatūroje publikuota daug darbų, kuriuose įvairiausi junginiai atskiriami joniniais skysčiais dinamiškai modifikuotuose kapiliaruose – rūgštiniai ir baziniai baltymai, bioaktyvūs flavono dariniai, maži neorganiniai ir organiniai anijonai, DNR fragmentai ir kt. [44].

Efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh). Skysčių chromatografijoje JS gali būti panaudoti judrios fazės priedais bei stacionarios fazės modifikatoriais.

Pirmiausia buvo bandyta įprastus judrios fazės organinius tirpiklius pakeisti mažiau toksiškais joniniais skysčiais. Pirmame darbe šia tema, Poole ir bendraautoriai [48] išbandė alkilamonio tiocianato joninius skysčius. Didžiausia problema – JS klampa, kuri yra visa eile, o imidazolio druskoms net keliomis eilėmis didesnė už organinių tirpiklių – acetonitrilo ir metanolio – klampą. Waichigo ir kt. [49] atlikti tyrimai galutinai patvirtino, kad organinių tirpiklių judrioje fazėje pakeitimas joniniais skysčiais yra problematiškas dėl drastiškai padidėjančio slėgio prieš kolonėlę, sumažėjančio UV detektavimo jautrio ir efektyvumo, bei dėl joninių skysčių sukeltos prietaiso dalių korozijos. Be to, JS yra brangesni už organinius tirpiklius. Taigi, įvertinus visus faktorius galima konstatuoti, kad judrios fazės organinių tirpiklių pakeitimas joniniais skysčiais neperspektyvus.

Situacija iš esmės keičiasi, kai JS naudojami mažais kiekiais (1-60 mmol/L) judrios fazės priedais. Nedidelis JS kiekis judrioje fazėje tik labai nežymiai pakeičia jos klampą. Tokiu atveju JS gali blokuoti likutines silanolines grupes, modifikuoti stacionarios fazės paviršių ir/arba sąveikauti su analizuojamu junginiu, t.y. veikti kaip jonų porų reagentas. JS katijonų elektrostatinė sąveika su likutinėmis silanolinėmis grupėmis ir tuo pat metu vykstanti jų alkilo grandinės sąveika su stacionarios fazės alkilo grupėmis efektyviai blokuoja likutines silanolines grupes. Taip pagerinamas bazinių junginių atskyrimo efektyvumas atvirkščių fazių efektyviojoje skysčių chromatografijoje (AFCh) [50]. Pavyzdžiui, efedrinų (norefedrino, pseudoefedrino, efedrino ir metilefedrino) atskyrimui C18 kolonėlėje AFCh metodu buvo panaudotas 1-alkil-3-metilimidazolio priedas vandeninėje judrioje fazėje [51]. Tokioje sistemoje vyrauja mišrus sulaikymo mechanizmas apimantis jonų porų, jonų mainų ir hidrofobinę sąveiką. JS priedas pagerino smailių simetriškumą ir sumažino sulaikymo trukmes, dėl ko pagerėjo atskyrimo efektyvumas. Be to, JS pasižymi stipriomis protonų akceptorinėmis

savybėmis ir yra efektyvesni silanolinių grupių blokatoriai nei įprastai naudojami AFCh metode ketvirtinių amonio druskų priedai [52]. Padidinus JS koncentraciją judrioje fazėje, jo katijonai pradeda konkuruoti su analitėmis dėl silanolinių grupių esančių stacionarios fazės paviršiuje ir tai sumažina analičių sulaikymo trukmes. Tačiau ženkliai padidinus JS kiekį judrioje fazėje, JS katijonai jau sąveikauja ir su silanolinėmis grupėmis, ir su alkilo grupėmis stacionarios fazės paviršiuje, taip padidindami angies įkrovimo laipsnį kolonėlėje, o tuo pačiu ir analičių sulaikymo trukmes. Nepaisant krūvio, JS katijonai gali adsorbuotis C18 stacionarios fazės paviršiuje. Adsorbuotas kiekis priklauso nuo katijono hidrofobiškumo, tiesiogiai susijusio su alkilo grandinės ilgiu. Nustatyta, kad 40 μmol 1-etil-, 80 μmol 1-butil-, 200 μmol 1-heksil- ir 500 μmol 1-oktil-3-metilimidazolio katijonų adsorbavosi ant Kromasil C18 stacionarios fazės, kai į 30/70 % (v/v) ACN/H₂O judrią fazę buvo pridėdama 30 mmol/L atitinkamo imidazolio heksafluorofosfato [53].

Kitas svarbus faktorius yra tai, kad joninis skystis AFCh judrioje fazėje disocijuoja, todėl ne tik jo katijonas, bet ir anijonas gali įtakoti analitės chromatografinį sulaikymą. Anijonai taip pat gali adsorbuotis ant hidrofobinės stacionarios fazės paviršiaus priklausomai nuo jų chaotropiškumo pagal Hofmeisterio anijonų seką: [PF₆]⁻ > [SCN]⁻ > [ClO₄]⁻ ≈ [BF₄]⁻ > [NO₃]⁻ > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻ > [H₂PO₄]⁻ > [SO₄]²⁻ > citratas³⁻ [54]. Tačiau anijonų adsorbciją stacionarios fazės paviršiuje įtakoja ir JS katijono prigimtis. Pavyzdžiui, nustatyta, kad pridėjus į judrią fazę EMIM·PF₆, didžioji dalis [PF₆]⁻ adsorbavosi tiesiogiai C18 stacionarios fazės paviršiuje, tuo tarpu OMIM·PF₆ atveju, didžioji dalis [PF₆]⁻ adsorbavosi dėka elektrostatinės sąveikos su prieš tai adsorbuotu OMIM katijonu. Priklausomai nuo į judrią fazę pridėdama JS anijono ir katijono savybių, analičių sulaikymo trukmės gali ir padidėti, ir sumažėti [53]. Pavyzdžiu galėtų būti JS anijono ir/ar katijono įtaka imipramino sulaikymui. Judrioje fazėje 0,01 mol/L NaCl pakeitus 0,01 mol/L NaBF₄, pablogėjo ipramino smailių simetriškumas,

tačiau beveik dvigubai padidėjo sulaikymo trukmė. Toks efektas aiškinamas ir $[\text{BF}_4]^-$ anijono adsorbicija C18 stacionarios fazės paviršiuje, ir jo sąveika su ipraminu judrioje fazėje. Dėl pirmojo faktoriaus padidėjo neigiamas krūvis stacionarios fazės paviršiuje ir sustiprėjo ipramino katijonų sulaikymas. Dėl antrojo faktoriaus sumažėjo imipramino poliškumas, todėl sustiprėjo jo hidrofobinė sąveika su sorbento alkilo grupėmis. JS katijono įtaka ipramino sulaikymui buvo tiriama NaCl pakeitus BMIM·Cl. Šiuo atveju BMIM katijonas adsorbuojasi stacionarios fazės paviršiuje ir ji įgyja teigiamą krūvį. Veikiant krūvio-krūvio atostūmio sąveikoms, imipramino sulaikymo trukmė sumažėjo apie 30 % bei pagerėjo jo smailės efektyvumas. Galiausiai į judrią fazę buvo pridėdama 0,01 mol/L BMIM·BF₄. Šiuo atveju abu JS jonai gali adsorbuotis stacionarios fazės paviršiuje, tačiau $[\text{BF}_4]^-$ anijonas dar gali ir asocijuotis su ipraminu judrioje fazėje. Rezultatas – imipramino sulaikymo trukmė padidėjo, o smailių simetriškumas pagerėjo [55]. Kartu su imipraminu buvo analizuojamas neutralus junginys – o-toluidinas. Šio junginio sorbcijai įtakos neturi nei krūviai stacionarios fazės paviršiuje, nei jonų porų susidarymas judrioje fazėje, todėl jo atskyrimo parametrai išliko nepakitę.

Judrios fazės priedais JS buvo panaudoti septynių β-inhibitorių [56], alkaloidų, aminių, augimo hormonų, amino ir nukleorūgščių atskyrimui [43]. Gauti rezultatai atskleidė JS pranašumą – geresnį efektyvumą ir smailių simetriškumą.

Apibendrinat būtina pažymėti, kad JS, kaip judrios fazės priedą, reikia pasirinkti atsižvelgiant į analizių prigimtį. Jei analizuojamas bazinis junginys yra polinis ir silpnai sulaikomas, tokiu atveju rekomenduotina pasirinkti polinį JS su stipriai chaotropišku anijonu - MIM·PF₆, EMIM·PF₆ ar EMIM·ClO₄. Atskiriant hidrofobiškesnes bazines tikslinga naudoti mažiau polinį joninį skystį su kosmotropiniu anijonu - BMIM·Cl ar HMIM·Cl. JS priedai pagerina smailių formas ir pagreitina atskyrimą nedidinant organinio tirpiklio kiekio judrioje fazėje [50, 56]. Tačiau dėl mažo lakumo jie nėra suderinami su MS detektoriumi.

JS stacionarios fazės modifikavimui ESCh metode pradėti naudoti po to, kai buvo teigiamai įvertinta jų, kaip judrios fazės priedu, įtaką atskyrimui. Stacionarios fazės, modifikuotos JS, pasižymi ir hidrofobinėmis, ir joninėmis savybėmis bei galimybe atskirti tiek organinės kilmės, tiek ir neorganinės kilmės junginius. Pirmiausiai JS buvo panaudoti silikagelio dalelėms chemiškai modifikuoti. Jiang su grupe [57] buvo pirmieji, pabandę atskirti efedriną ant vinilheksilimidazolio tetrafluorboratu modifikuotos silikagelio stacionarios fazės. Tačiau gauti rezultatai nebuvo tokie geri lyginant su efedrino atskyrimu ant komercinių AF kolonėlių. Vėliau ta pati mokslininkų grupė imidazolio joniniu skysčiu modifikuotą stacionarią fazę sėkmingai pritaikė anijonų, aminų, nukleotidų atskyrimui [58]. Kolonėlė pasižymėjo stipriomis anijonų mainų ir hidrofobinėmis savybėmis, tačiau atskyrimo efektyvumas buvo blogesnis nei ant įprastinių jonų mainų kolonėlių. Stalcup ir bendraautoriai [59] ant silikagelio paviršiaus kovalentiškai prijungė n-butylimidazolį. Ši kolonėlė pasižymėjo komercinei fenilsilikagelio stacionariai fazei būdingomis savybėmis, todėl buvo panaudota neutralių aromatinių junginių atskyrimui. Wang su kolegomis [60] PMIM·Br ir BMIM·Br modifikuotas stacionarias fazes panaudojo įvairių organinių junginių atskyrimui. Pagrindinis stacionarių fazių su paviršiuje imobilizuotais JS privalumas – geras atskyrimo efektyvumas pasiekiamas net ir naudojant vandeninę judrią fazę be arba su labai mažu (1 %) organinio tirpiklio priedu.

1.2.2. Pramoninis joninių skysčių taikymas

Iki šiol pagrindinis dėmesys buvo skiriamas naujų JS sintezei, jų savybių tyrimui ir jų taikymui mokslinių tyrimų laboratorijų lygmenyje. Tačiau jau yra ir keletas joninių skysčių taikymo pramonėje atvejų ir, neabejotinai, ateityje tokių atvejų tik daugės. Plechkova ir Seddon [61] publikavo labai detalią JS taikymo pramonėje apžvalgą. Intensyviausiai šioje srityje dirba BASF kompanija. Jie

pirmieji panaudojo 1-metilimidazolį kaip rūgštis surišantį agentą BASIL (angl. Biphasic Acid Scavenging utilizing Ionic Liquids) procese [62]. Tokia technologija plačiai taikoma įvairiuose procesuose, kuriuose būtina surišti rūgštį. Įdomu tai, kad tęsiant proceso pritaikymą buvo sukurti naujos kartos, labai maži ir labai efektyvūs garų reaktoriai. BASF kompanija panaudojo JS katalizatoriais pramoninėje organinėje sintezėje. IoLiTec kompanija kartu su Wandres MicroCleaning pritaikė JS jautrių paviršių valymui. Užpurkštas ant besisukančių šepečių joninis skystis veikia kaip antistatinis agentas. JS panaudojimas ženkliai pagerino proceso efektyvumą. Linde kompanija JS pagrindu pagamino didelio efektyvumo dujų kompresorių [61].

Hidrofobiškumas, elektrocheminis patvarumas, elektrinis laidumas ir plastiškumas leidžia JS panaudoti elektrochemijos pramonėje. Pastaraisiais metais intensyviai tiriamas JS pritaikymas baterijų, akumuliatorių, energijos šaltinių, kuro elementų ir fotoelektrinių prietaisų gamyboje. Baterijos JS pagrindu išsprendžia kai kurias analogiškų maitinimo elementų ankstesnių versijų problemas [63]. Įprastinėse baterijose naudojamas vandeninis elektrolitas greitai išgaruoja. Tuo tarpu JS pasižymi nedideliu lakumu, yra skystos būsenos kambario temperatūroje, klampesni už vandenį ir puikiai praleidžia elektros srovę. Vandens pakeitimas joniniais skysčiais pašalina ir kitą problemą - kristalinių dendritų formavimąsi ant elektrodų pakrovimo metu, kurie sumažina darbinių ciklų skaičių ir maitinimo šaltinio eksploatavimo trukmę. Panaudojus JS tikimasi išgauti didelio efektyvumo akumuliatorius. JS taip pat jau taikomi kaip elektrochemiškai aktyvūs redokso poros junginiai saulės elementų gamybai [64].

Kaip jau buvo ne kartą minėta, JS gali būti lengvai modifikuojami įvedant papildomas funkcines grupes, keičiant anijoną ar katijoną. Tokie, specifiniam tikslui (angl. task specific) susintetinti joniniai skysčiai rado savo nišą farmacijoje [65]. Įterpus aktyvią medžiagą į JS anijono ir/ar katijono struktūrą, galima gauti vaistą, pasižymintį daugiafunkciniu veikimu. Pvz. joninis skystis, pagamintas

didecildimetilamonio bromido ir natrio ibuprofeno (didecildimetilamonio ibuprofenas) pasižymi ir antibakterinėmis, ir uždegimą slopinančiomis savybėmis.

Didelį kiekį azoto turintys JS tinka sprogstamųjų medžiagų gamybai. Pagrindiniai produktai susidarę terminės reakcijos metu yra azotas, anglies dioksidas ir vanduo, todėl JS pagrindu sukurtos medžiagos gali būti priskirtos “žaliajai chemijai” [66].

Apžvelgus JS taikymo tendencijas yra tikėtina, kad ateityje jie pakeis daugelį pramonėje plačiai naudojamų, tačiau toksiškų organinių tirpiklių. JS yra lengvai perdirbami, termiškai ir chemiškai stabilūs. JS pasižymi mažu lakumu, todėl jais pakeitus organinius tirpiklius būtų išvengiama oro taršos. Kurį laiką JS buvo priskiriami visiškai nekenksmingoms medžiagoms, tačiau neseniai atlikus tyrimus paaiškėjo, kad kai kurie iš jų gali būti toksiškesni už įprastinius tirpiklius. Pavyzdžiui, vykstant hidrolizės procesui heksafluorofosfatas išlaisvina fluorida anijonus. Todėl joninių skysčių su $[PF_6]^-$ ir $[BF_4]^-$ anijonais panaudojimas pramonėje turėtų būti ribojamas. Remiantis atliktų tyrimų rezultatais [67], imidazolio JS toksiškumas didėja ilgėjant alkilo grandinei, o anijonai šiuose junginiuose pasirodė esantys mažiau toksiški. Būtina atsižvelgti į galimą vandens taršą vandenyje tirpiaisiais joniniais skysčiais. Nustatyta, kad 1-butyl-3-metilimidazolio druskos (plačiai naudojamos katalizei) yra pakankamai stabilios ir pasižymi žemu skilimo laipsniu biologiniuose procesuose. Šie junginiai iš valymo sistemų galėtų pasiekti atvirus vandens telkinius ir tapti nuolatiniais teršalais.

1.3. Imidazolio katijonų atskyrimas skysčių chromatografijos metodais

Milžiniškas susidomėjimas joniniais skysčiais, intensyvėjantis jų komercializavimas bei taikymas reikalauja ir efektyvių jų savybių tyrimo, grynumo bei kiekybinio nustatymo metodų. Kadangi skirtingi JS pasižymi panašiomis savybėmis bei yra nelakūs, jų nustatymui tinkamiausi skysčių chromatografiniai metodai. Toliau apžvelgsime darbus, kuriuose tiriamos

imidazolių katijonų atskyrimo galimybės taikant skirtingus skysčių chromatografijos metodus.

Skysčių chromatografijoje analitės pasiskirstymą tarp judrios ir stacionarios fazių lemia tarpusavio sąveikos. Imidazolio katijonai pasižymi labai įvairiapusiškėmis savybėmis (skirtingomis funkcinėmis grupėmis, konjuguota π elektronų sistema, krūviu), todėl jų atskyrimui gali būti taikomi įvairūs skysčių chromatografijos variantai. Imidazolio katijono funkcinės grupės gali dalyvauti tokiose sąveikose kaip π - π , hidrofobinė, jonų mainų ir kt. Be to, H₂ vandenilio atomas imidazolio žiede pasižymi stipriomis rūgštinėmis savybėmis, todėl visas katijonas gali dalyvauti sudarant vandenilinius ryšius [68]. Iki šiol imidazolio katijonų atskyrimui buvo taikyti keturi skysčių chromatografijos metodai – atvirkščių fazių skysčių chromatografija (AFCh), jonų mainų chromatografija, jonų porų chromatografija (JPCh) bei hidrofiliinės sąveikos chromatografija (HILIC).

Atvirkščių fazių skysčių chromatografija. Pirmame publikuotame darbe [69] buvo optimizuotos vienuolikos 1-alkil- ir 1-arilimidazolio joninių skysčių katijonų atskyrimo sąlygos naudojant skirtingas AF stacionarias fazes (C18 ir C8 LiChrospher Select ir C8 MetaSil Basic). Geriausi imidazolio katijonų atskyrimo parametrai gauti naudojant C8 kolonėlę su didesniu anglies įkrovimo laipsniu. Optimizuojant atskyrimą buvo keičiama judrios fazės sudėtis. Metanolį pakeitus acetonitrilu, padidėjo jautris ir skiriamoji geba, o amonio acetato buferio priedas pagerino rezultatų atsikartojamumą ir smailių simetriškumo laipsnį. Vis tik, AFCh sąlygose polinės analitės yra silpnai sulaikomos, o hidrofobiškesni imidazolio junginiai sulaikomi labai stipriai. Pakankamas visų imidazolio katijonų atskyrimas pasiektas tik panaudojus gradientinę eliuciją, nors šiose sąlygose ir pablogėjo silpnai sulaikomų analičių atskyrimas.

Skirtingos stacionarios fazės su prijungtais C4, C8, C18, fenilo, arilo, alkilamido, cholesterolio ir mišriais (cianopropilo, aminopropilo, fenilo, C8 ir

C18) ligandais buvo tiriamos siekiant nustatyti imidazolio katijonų ir stacionarios fazės sąveikos mechanizmą. Bendru atveju, imidazolio katijonų sulaikymas stiprėjo, stiprėjant stacionarios fazės hidrofobinėms savybėms. Tačiau ant arilu modifikuotos stacionarios fazės buvo gautas stipresnis imidazolių sulaikymas, kurį sąlygojo papildoma π - π tipo sąveika tarp imidazolio katijonų ir arilo ligando. Dėl elektrostatinės stūmos tarp JS katijonų ir protonizuotų ligandų, silpniausiai imidazoliai sulaikomi ant protonizuotų linkusių cholesterolio ir mišrios stacionarių fazių. Neutralios (pH 7) judrios fazės sąlygojo geresnį analičių sulaikymą, bet blogesnį efektyvumą dėl papildomos imidazolio katijonų sąveikos su deprotonizuotomis likutinėmis silanolinėmis grupėmis. Panaudojus gradientinę eliuciją kolonėlėje su C18 stacionaria faze penki imidazolio ir vienas piridinio katijonas buvo atskirti per 13 min, tačiau smailių efektyvumas ir simetriškumas nebuvo geri [70]. Apibendrinus tyrimų rezultatus buvo padaryta išvada, kad imidazolio katijonų sulaikymo mechanizmas AFCh sąlygose susideda iš hidrofobinės, joninės bei π - π (aromatiniam ligandui) sąveikų.

π - π sąveikos svarbą imidazolio katijonų atskyrimui įvertino Stepnowski su bendraautoriais [71]. Jie nustatė, kad fenilo funkcinės grupės turinčios stacionarios fazės pagerina labiau polinių katijonų sulaikymą ir atskyrimą. Stipresnė π - π sąveika pasireiškė tarp stacionarios fazės ir trumpesnę alkilo grandinę turinčių imidazolių. Tuo tarpu labiau hidrofobinių analičių atveju dominuoja hidrofobinė sąveika, o π - π sąveika, greičiausiai dėl nepatogaus erdvinio išsidėstymo, yra silpnesnė. π - π sąveikos stiprumui įvertinti, tyrimo metu buvo analizuojami ir arilo grupės turintys JS katijonai, tačiau žymių sulaikymo pokyčių nenustatyta. Tai rodo, kad atskyrimo metu dominuoja tik vieno aromatinio žiedo sąveika su sorbento funkcinėmis grupėmis, tuo tarpu antrojo - labai silpna. Šių sąveikų stiprumui įtakos turi ir judrioje fazėje esančio organinio tirpiklio prigimtis (acetonitrilas ar metanolis). Priešingai nei metanolis, acetonitrilas turi didelį elektronų tankį ir slopina π - π sąveiką tarp analitės ir

stacionarios fazės. Tai reiškia, kad judrios fazės modifikatoriumi naudojant acetonitrilą, atskyrimo metu dominuos hidrobobinė sąveika.

Visi aukščiau paminėti tyrimai buvo atlikti naudojant judrias fazes su buferinio tirpalo priedu. JS atskyrimo tyrimus tik acetonitrilo/vandens judrioje fazėje atliko Berthod grupė [72]. Vienuolikos skirtingų 1-alkil-3-metil imidazolio katijonų atskyrimui naudota Kromasil C18 kolonėlė. Nustatyta, kad naudojant judrią fazę be priedų galima atskirti imidazolio katijonus, turinčius skirtingus anijonus. Į judrią fazę pridėjus druskos, atsiranda papildomos sąveikos, t.y. pasikeičia smailių ir adsorbcijos izotermės forma. Naudojant acetonitrilo/vandens judrią fazę visiems tirtiems joniniams skysčiams gautos įgaubtos adsorbcijos izotermės ir išstėtas smailių frontas. Priešingas efektas buvo nustatytas į judrią fazę pridėjus 0,01 mol/L NaCl. Šiuo atveju gaunamos išgaubtos adsorbcijos izotermės ir smailės su „uodegomis“. Į judrią fazę pridėjus acetatinio, fosfatinio buferinio tirpalo arba bet kurios kitos druskos (pvz., NaCl arba NaBF₄) atskiriami tik skirtingą alkilo grupę turintys imidazolio katijonai. Imidazolių sulaikymas stiprėja, didėjant neorganinių anijonų giminiškumui nepolinei stacionariai fazei. Šis reiškinys vadinamas chaotropiškumu (chaotropinė anijonų eilė: Cl⁻ ~ [H₂PO₄]⁻ < [BF₄]⁻ ~ [ClO₄]⁻ < [PF₆]⁻). Druskų, turinčių chaotropinius anijonus, priedai judrioje fazėje sumažina JS anijonų įtaką ir pagerina mažos molekulinės masės polinių analizių atskyrimą [73]. Galiausiai nustatyta, kad kiekybinei analizei yra geriau naudoti judrią fazę su 0,01 mol/L NaCl priedu. Taip gaunamos apie 20 kartų mažesnės aptikimo ribos ir geresnis rezultatų atsikartojamumas.

Visus anksčiau atliktų tyrimų rezultatus apibendrina kompleksinis judrios ir stacionarios fazės įtakos imidazolio katijonų atskyrimui AFCh metodu tyrimas [74]. Kaip jau minėta, imidazolio katijonų sulaikymą lemia jų sąveika su judria ir stacionaria fazėmis. Panaudojant kolonėles su skirtingomis stacionariomis fazėmis ir keičiant judrios fazės pH, buvo nustatyta, kad imidazolio katijonų sulaikyme dominuoja mišrus mechanizmas apimantis hidrofobinę, π - π ir joninę sąveikas.

Pastaroji gali būti nulemta kelių veiksnių: jonų porų susidarymo, jonų mainų ar elektrostatinės sąveikos su likutinėmis silanolinėmis grupėmis.

Jonų mainų ir jonų porų chromatografija. Gao ir Yu [75] alkilimidazolio katijonų atskyrimui pirmieji panaudojo jonų porų chromatografijos metodą. Tyrimo metu naudota monolitinė C18 kolonėlė ir ACN/citrinų rūgšties/natrio 1-heptansulfonato judri fazė. Nustatyta, kad imidazolio katijonų sulaikymo mechanizmas paremtas klasikiniu jonų porų sąveikos principu, t.y. padidinus natrio 1-heptansulfonato koncentraciją judrioje fazėje, imidazolio katijonų sulaikymas stiprėja. Tokioje sistemoje sulaikymas vyksta dviem mechanizmais. Anijoninis jonų porų reagentas su imidazolio katijonais judrioje fazėje sudaro neutralias jonų poras, kurios sulaikomos vykstant hidrofobinei sąveikai su nepoline stacionaria faze. Be to, jonų porų reagentas adsorbuojasi ant stacionarios fazės sukurdamas dinamiškas katijonų mainų vietas. Šiuo atveju sulaikymas vyksta katijonams sąveikaujant su adsorbuotu priešjoniu. Taip pat nustatyta, kad didinant acetonitrilo koncentraciją judrioje fazėje imidazolio katijonų sulaikymas silpnėja bei gerėja smailių simetriškumas. Šis efektas aiškinamas padidėjančiu judrios fazės hidrofobiškumu ir stipresne acetonitrilo absorbcija stacionarios fazės paviršiuje, sumažinančia hidrofobinę sąveiką tarp neutralios jonų poros ir stacionarios fazės. Imidazolio katijonų sulaikymo trukmėms judrios fazės pH (intervale 3,5-5) žymios įtakos neturėjo. Optimizuotomis sąlygomis (judri fazė 10 % ACN/1,0 mmol/L natrio 1-heptansulfonato, pH 4) keturi imidazolio katijonai buvo atskirti per 13 min.

Stepnowski ir Mroziak [76] JS atskyrimui pritaikė jonų mainų chromatografijos metodą. Aštuoni skirtingo poliškumo alkilimidazolio katijonai buvo atskiriami ant stipraus katijonito stacionarios fazės. Tyrimo metu pastebėta, kad, priklausomai nuo judrios fazės sudėties, analičių sulaikymą gali lemti katijonų mainų, nespecifinės hidrofobinės sąveikos ar adsorbcijos procesai. Esant mažam organinio tirpiklio (20 % ACN) kiekiui judrioje fazėje analitės sulaikomos tipiniu atvirkščių fazių mechanizmu. Tuo tarpu padidinus ACN kiekį iki 50-60 %,

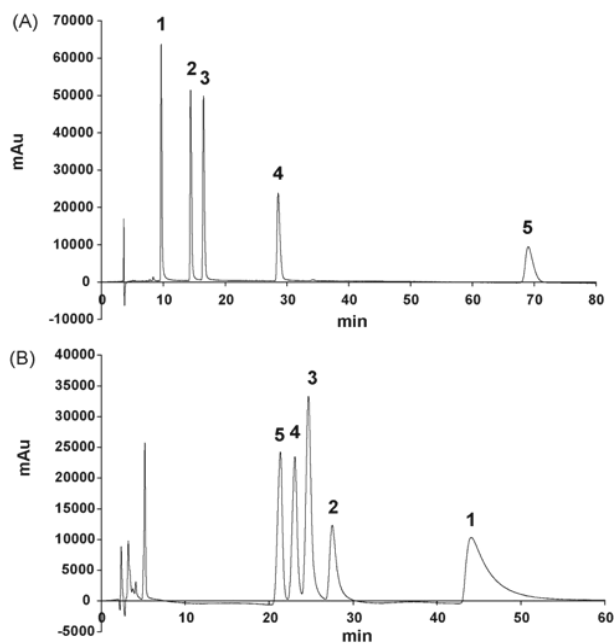
dominuoja jonų mainų sąveikos mechanizmas. Tokioje sistemoje susilpnėja imidazolio katijonų sulaikymas ir pasikeičia jų sulaikymo eiliškumas, tačiau atrankumas lieka nepakitęs. Imidazolio katijonų sulaikymo trukmės sumažėja pridėjus į judrią fazę buferinio tirpalo (K_2HPO_4), kurio katijonai konkuruoja su imidazolio katijonais dėl sorbento paviršiuje esančių sulfo funkcinų grupių. Šio metodo privalumas lyginant su tradiciniu AFCh metodu - galimybė atskirti ir hidrofilinius imidazolio katijonus.

Identiškas imidazolio ir piridinio katijonų atskyrimo mechanizmas nustatytas ir naudojant vidutinio stiprumo katijonų mainų sorbentą su krauneterio, karboksilato ir fosfato funkcinėmis grupėmis ir konduktometrinių detektavimą [77]. Optimizuotose sąlygose su 30 % ACN ir 2,5 mmol/L metansulfoninės rūgšties (MSA) judria faze vienuolikos imidazolio ir piridinio katijonų atskyrimo trukmė siekė net 80 min. Padidinus MSA koncentraciją judrioje fazėje iki 5 mmol/L, analizės trukmė sumažėjo iki 60 min, tačiau ir šiuo atveju nei efektyvumas, nei atskyrimo atrankumas, nei atskyrimo trukmė nebuvo pakankami analizei.

Jonų mainų metodo su konduktometriniu detektavimu sistema imidazolio katijonų ir anijonų atskyrimui tyrinėta Markowska ir Stepnowski darbe [78]. Šiame darbe optimizuotos imidazolio katijonų ir anijonų atskyrimo sąlygos nuosekliai sujungus dvi, anijonų mainų ir katijonų mainų, kolonėles. Naudojant 5 mmol/L kalio hidroftalato, 15 mmol/L ftalio rūgšties ir 45 % ACN (pH 3,5) judrią fazę pavyko atskirti BMIM, HMIM, OMIM, NMIM, DMIM katijonus ir Cl^- , Br^- , Tf_2N^- , BF_4^- , PF_6^- anijonus. Įvertintas šio metodo tinkamumas rutininėms analizėms atlikti.

Yu ir bendraautorių darbe [79] buvo optimizuota judrios fazės sudėtis penkių tos pačios homologinės eilės imidazolio katijonų atskyrimui. Tęsdami tyrimus autoriai įvertino skirtingų katijonitų įtaką imidazolio katijonų atskyrimui. Nustatyta, kad naudojant silpno katijonito sorbentus yra daugiau galimybių atskyrimo sąlygų optimizavimui nei ant stipraus katijonito sorbentų [80].

Hidrofilinės sąveikos chromatografija. Kaip alternatyvą imidazolio katijonų atskyrimui jonų porų, jonų mainų ir atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodais, Le Rouzo su bendraautoriais [81] pasirinko hidrofilinės sąveikos chromatografijos metodą (HILIC). Siekdami įvertinti imidazolio katijonų sulaikymą ant diolio stacionarios fazės, autoriai tyrė organinio tirpiklio (ACN) koncentracijos ir judrios fazės priedų įtaką. Buvo nustatyta, kad esant ACN koncentracijai judrioje fazėje nuo 60 iki 95 %, imidazolio katijonų sulaikymas stiprėja jų hidrofiliškumo stiprėjimo tvarka. Tai aiškinama tuo, kad analitės atskiriamos vykstant pasiskirstymui tarp labai polinio vandens sluoksnio sorbento paviršiuje ir mažiau polinės judrios fazės. Pagrindinės sąveikos – vandenilinio ryšio susidarymas ir dipolio-dipolio sąveika. Sumažinus ACN koncentraciją, sumažėja skiriamoji geba ir efektyvumas. Kitas svarbus faktorius analizuojant polinius joninius junginius HILIC metodu yra judrios fazės priedai, susilpninantys nepageidaujamas elektrostazines sąveikas. Ištyrus amonio acetato koncentraciją judrioje fazėje intervale nuo 5 iki 20 mmol/L, nustatyta, kad didėjant druskos koncentracijai, imidazolio katijonų sulaikymas silpnėja. Šis efektas buvo aiškinamas stiprėjančiu neutralių, todėl geriau tirpstančių judrioje fazėje, jonų porų tarp imidazolio katijonų ir acetato anijonų susidarymu. Keista, kad autoriai visiškai nevertino galimos jonų mainų sąveikos įtakos imidazolių sulaikymui. Geriausias atskyrimas pasiektas izokratiname režime naudojant ACN/H₂O 90/10 (v/v) su 10 mmol/L amonio acetato priedu judrią fazę. Galiausiai autoriai palygino penkių imidazolio katijonų atskyrimą HILIC ir JPCh metodais (1.3 pav.). Nors HILIC metodu imidazolio katijonai buvo atskirti truputį greičiau (HILIC – 50 min, JPCh – 60 min), tačiau ir šiuo atveju nei efektyvumas, nei atskyrimo trukmė nebuvo pakankami praktinei analizei.



1.3 pav. Imidazolio katijonų atskyrimo JPCh (A) ir HILIC (B) metodais palyginimas. 1 – 1-etil-3-metilimidazolis; 2 – 1-butil-3-metilimidazolis; 3 – 1-butil-2-metil-3-metilimidazolis; 4 – 1-heksil-3-metilimidazolis; 5 – 1-oktil-3-metilimidazolis [81].

Naujausiame šios grupės darbe [82] imidazolių katijonų atskyrimui HILIC metodu panaudotos tradicinės (amido, aminopropilo, cianopropilo, karbamato ir diolio) ir mišrios sąveikos (hidrofobiniai ar hidrofiliniai ligandai su prijungtomis katijonitinėmis ar anijonitinėmis grupėmis) stacionarios fazės. Visose minėtose kolonėlėse imidazolio katijonų sulaikymas stiprėjo stiprėjant jų hidrofiliškumui. Palyginus tradicinius sorbentus nustatyta, kad geriausiai imidazolio katijonai atskiriami diolio kolonėlėje. Tai paaiškinama puikiu diolio gebėjimu sudaryti ploną vandens sluoksnį savo paviršiuje. Kadangi imidazoliai turi krūvį, jų atskyrimui HILIC metodu buvo išbandyti ir mišrios sąveikos sorbentai. Kaip ir tikėtasi, dėl elektrostatinės stūmos ant sorbento su anijonitinėmis grupėmis imidazolio katijonai buvo nesulaikomi. Tuo tarpu ant sorbento su prijungtu oktilo ligandu ir katijonitinėmis funkcinėmis grupėmis visi penki tirti imidazolio katijonai buvo atskirti per 20 min.

Apibendrinus literatūroje publikuotus duomenis matome, kad iki šiol nepavyko pasiūlyti tinkamo metodo imidazolio ir kitų joninių skysčių katijonų atskyrimui. Aprašytos chromatografinės sistemos nepasižymi nei greičiu, nei efektyvumu, nei atskyrimo atrankumu. Stebina tai, kad didžioji dalis darbų yra skirta imidazolio katijonų atskyrimui būtent atvirkščių fazių ir jonų mainų chromatografijos metodais, kurie yra ilgi ir neefektyvūs. Tuo tarpu paskutinį dešimtmetį ypač išpopuliarėjęs ir labai perspektyviu polinėms/katijoninėms analitėms atskirti laikytas HILIC metodas šiam tikslui rimčiau apskritai nebuvo tyrinėtas.

1.4. Hidrofilinės sąveikos chromatografija

HILIC metode atskyrimas atliekamas ant polinių normalių fazių chromatografijos sorbentų naudojant polines atvirkščių fazių chromatografijos judrias fazes. 1990 metais ši normalių/atvirkščių fazių chromatografijos hibridą Alpert pavadino hidrofilinės sąveikos chromatografija [83]. Jau tada Alpert buvo labai optimistiškas ir prognozavo, kad HILIC taps vienu iš pagrindinių skysčių chromatografijos metodu, tokiu kaip AFCh ar jonų mainų chromatografija. Dabar jau drąsiai galima teigti, kad metodo pradininko prognozė pasitvirtino. HILIC metodą pradėjus naudoti angliavandenių, amino rūgščių ir peptidų atskyrimui [84], vėliau, atskleidus metodo privalumus, jis sėkmingai pritaikytas vaistų ir jų metabolitų, alkaloidų, toksinų, įvairiausių biologinių junginių ir kitų joninių ir neutralių polinių junginių analizei [85].

1.4.1. HILIC savybės bei atskyrimo mechanizmas

HILIC metode atskyrimas atliekamas ant polinių, įprastai normalių fazių chromatografijoje naudojamų sorbentų, dažniausiai ant silikagelio, rečiau ant polinėmis funkcinėmis grupėmis (pvz., amino, amido, ciano, diolio ir pan.)

modifikuoto silikagelio. Tuo tarpu judrios fazės sudėtis atitinka atvirkščių fazių chromatografijoje naudojamas judrias fazes: didesnę jos dalį (>60 %) sudaro polinis organinis tirpiklis (dažniausiai acetonitrilas), o likusioji dalis – vanduo. Polinio sorbento paviršiuje vandenilinių ryšių pagalba susiformuoja vandens multisluksnis (mažiausiai iš dviejų sluoksnių), atliekantis taip vadinamos skystos nejudrios fazės vaidmenį. Atskyrimo metu analitės pasiskirsto tarp labai polinio gryno vandens sluoksnio sorbento paviršiuje ir mažiau polinės judrios fazės sudarytos iš vandens/ACN mišinio. Kuo geriau analitė tirpsta vandenyje, t.y. kuo ji poliškesnė, tuo stipriau ji yra sulaikoma. Scott ir Traiman [86] padarė prielaidą, kad dėl stacionarios fazės paviršiuje suformuoto vandens sluoksnio negali būti tiesioginės sąveikos tarp analizuojamo junginio ir stacionarios fazės. Vis tik, reikia atkreipti dėmesį į tai, kad vandens sluoksnis formuojasi ne ant inertiško stacionarios fazės paviršiaus. Polinės funkcinės grupės (pvz., silanolinės, amido, amino ir kt.) nėra pilnai užblokuojamos vandens sluoksnio, todėl gali vykti ir tiesioginė analitės sąveika su stacionaria faze. Polinės mažos molekulinės masės analitės gali lengvai prasiskverbti per vandens sluoksnį ir tiesiogiai sąveikauti su stacionarios fazės paviršiuje esančiomis funkcinėmis grupėmis. McCalley ir Neue atlikti tyrimai [87] rodo, kad esant dideliame ACN kiekiui judrioje fazėje susiformuoja labai plonas vandens sluoksnis stacionarios fazės paviršiuje, o didinant vandens kiekį judrioje fazėje šis sluoksnis storėja. Tai reiškia, kad esant mažam vandens kiekiui judrioje fazėje yra galima tiesioginė analitės ir stacionarios fazės sąveika. Tačiau reikia pažymėti, kad yra darbų, kuriuose teigiama priešingai: hidrofilinė sąveika stiprėja mažinant vandens kiekį judrioje fazėje ir kitos sąveikos (pvz., elektrostatinės) tampa mažiau reikšmingos [88].

Alpert dar savo pirmajame straipsnyje [83], priskirdamas HILIC metodui pasiskirstymo mechanizmą, pastebėjo, kad analičių sulaikymą HILIC režime gali įtakoti ir kitos sąveikos. Tokiomis sąveikomis jis įvardino vandenilinio ryšio susidarymą ir dipolio-dipolio sąveiką. Vėliau daugelis autorių rėmėsi Alpert padaryta prielaida ir, neatlikdami detalesnių sulaikymo mechanizmo tyrimų,

sulaikymo mechanizmą priskirdavo grynam pasiskirstymui. Hermstrong ir Irgum 2006 metais išleistoje apžvalgoje [89] pateikia detalią publikuotų duomenų studiją. Jie atliko pakartotinių kitų autorių publikuotų duomenų vertinimą ir sulaikymo mechanizmui HILIC metode išaiškinti pritaikė pasiskirstymo (idealiu atveju atitinka AFCh sulaikymo mechanizmą) ir adsorbcijos modelius (normalių fazių chromatografijos sulaikymo mechanizmą). Gauti rezultatai parodė, kad HILIC režime (sorbentas – aminopropilsilikagelis) vykstantį sulaikymą sunku aprašyti vienu modeliu. Pvz., 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandioliui gautos sulaikymo faktoriaus priklausomybės nuo vandens kiekio judrioje fazėje $\log k - \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ ($R^2=0,968$) ir $\log k - \log \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ ($R^2=0,958$), o 2-amino-2-etil-1,3-propandioliui - $\log k - \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ ($R^2=0,912$) ir $\log k - \log \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ ($R^2=0,992$). Pirmojo junginio sulaikymas geriau aprašomas pasiskirstymo mechanizmu, tuo tarpu antrajam – geriau tinka adsorbcijos modelis. Tačiau griežtai teigti, kad vienu ar kitu atveju tiriamų junginių sulaikymą lemia tik adsorbcija ar tik pasiskirstymas, negalima. Jei du, savo sandara tokie panašūs junginiai identiškais sąlygomis sulaikomi skirtingu mechanizmu, sunku nubrėžti ribą, skiriančią sulaikymą pasiskirstymo ir adsorbcijos mechanizmais. Taip pat reikia pažymėti, kad tyrimas buvo atliktas naudojant H₂O/ACN judrią fazę be buferio priedų, t.y. neslopinant elektrostatiinių sąveikų. Tokiomis sąlygomis galėjo pasireikšti atostūmio jėgos tarp analitės amino grupės ir amino grupių stacionarios fazės paviršiuje.

Remiantis darbe [90] pateiktais rezultatais, trijų tetraciklinų sulaikymui ant aminopropilsilikagelio, vandens koncentracijų judrioje fazėje intervale nuo 10 iki 30 % gautos tiesinės $\log k - \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ priklausomybės, o vandens koncentracijų intervale 15-50 % nustatytas $\log k - \log \varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ priklausomybių tiesiškumas. Sulaikymą sąlygojančio mechanizmo aiškinimas yra apsunkinamas ir dėl elektrostatiinio atostūmio jėgų, veikiančių tarp tetraciklino ir aminopropilsilikagelio: abu komponentai tirtose sąlygose turi teigiamą krūvį (judrios fazės pH 3,5 ir 5,0). Paminėti pavyzdžiai rodo, kad, greičiausiai, analičių sulaikymas HILIC sąlygomis vyksta mišriu mechanizmu, o kuris iš jų bus

dominuojantis priklauso nuo analitės ir stacionarios fazės prigimties bei nuo judrios fazės sudėties. Be to, kai kuriais atvejais HILIC sulaikymo mechanizmas nėra pastovus ir gali kisti, keičiantis eksperimento sąlygoms. Netgi esant tai pačiai stacionariai fazei ir keičiant tik tirpiklių santykį judrioje fazėje, analitės sulaikymo mechanizmas gali pasikeisti iš hidrofobinės sąveikos į hidrofilinę. Vienas iš tokios elgsenos pavyzdžių pateikiamas Dong ir Huang darbe [91], kuriame buvo tirta epirubicino analogų sulaikymo ant silikagelio stacionarios fazės priklausomybė nuo ACN koncentracijos judrioje fazėje. Kai vandens kiekis judrioje fazėje yra mažesnis nei ~40 %, analičių sulaikymo trukmės ilgėja analičių hidrofilškumo stiprėjimo tvarka. Šiose sąlygose vanduo yra stipresnis judrios fazės tirpiklis ir jo koncentracijos didinimas judrioje fazėje sumažina analičių sulaikymo trukmes. Tačiau kai vandens kiekis judrioje fazėje viršija ~60 %, polinių analičių sulaikymo tvarka apsiverčia: analičių sulaikymas stiprėja, stiprėjant jų hidrofobiškumui. Tokiu atveju dominuojanti tampa hidrofobinė sąveika būdinga AFCh metodui. Deja, pastarasis HILIC atskyrimo režimas iki šiol apskritai nebuvo nuodugniau tyrinėtas.

Apžvelgiant naujausius sulaikymo mechanizmo HILIC režime tyrimus, reikėtų išskirti McCalley darbą, skirtą stiprių bazių, stiprių rūgščių ir neutralių junginių atskyrimui ant amidinės (TSKgel Amide-80), diolio (Luna HILIC), mišraus režimo diolio (HILIC-1), silikagelio ir cviterjoninės (ZIC-HILIC) stacionarių fazių [92]. Gauti rezultatai parodė, kad analičių sulaikymo procesas yra kompleksinis, susidedantis iš pasiskirstymo, adsorbcijos, jonų mainų, o kartais net ir hidrofobinės sąveikos. Ryškiausiai jonų mainų įtaka bazinių junginių sulaikymui buvo stebima ant amidinės, mišraus režimo diolio, silikagelio ir cviterjoninės stacionarių fazių. Tuo tarpu naudojant Luna HILIC stacionarią fazę, elektrostatiinių sąveikų įtaka bazinių junginių sulaikymui buvo žymiai mažesnė, galimai todėl, kad sutinklintas diolio ligandų sluoksnis stacionarios fazės paviršiuje žymiai efektyviau blokuoja likutines silanolines grupes.

Ryšys tarp sulaikymo mechanizmo ir vandens kiekio judrioje fazėje HILIC režime buvo tiriamas ir Liang grupės darbe [93]. Naudodami skirtingas komercines bei pačių susintetintas polines stacionarias fazes, jie matavo nukleozidų sulaikymo parametrų kitimą keičiant vandens kiekį judrioje fazėje. Remdamiesi gautais duomenimis, mokslininkai pasiūlė sulaikymo mechanizmą HILIC metode aprašantį modelį, kuris įvertina analitės sąveikas su stacionaria ir judria faze (žiūr. 3.2.1. skyrių). Pritaikius šį modelį, išmatuotų sulaikymo parametrų priklausomybių nuo vandens kiekio judrioje fazėje koreliacijos koeficientai daugeliui nukleozidų viršijo 0,99. Pasiūlytas modelis dar kartą parodė, kad sulaikymas HILIC režime negali būti priskiriamas tik vienos rūšies sąveikai. Šis modelis taip pat puikiai aprašė vandenyje tirpių vitaminų sulaikymą ant diolio stacionarios fazės [94]. Tiesinės $\log k - \log \phi_{H_2O}$ priklausomybės, gautos esant didesniai kiekiui vandens judrioje fazėje parodė, kad tokioje sistemoje dominuoja pasiskirstymo mechanizmas. Tačiau sumažinus vandens kiekį judrioje fazėje, sulaikymo parametrus įtakoja ir adsorbcija, vandenilinio ryšio susidarymas bei elektrostatinės sąveikos.

Apibendrinant literatūros duomenis galima konstatuoti, kad be visuotinai priimto analičių sulaikymo pasiskirstymo mechanizmu, HILIC sistemoje pasireiškia ir kitos sąveikos, tokios kaip vandenilinio ryšio, hidrofobinė ir jonų mainų sąveikos. Konkrečių sąveikų įtaka sulaikymui priklauso ir nuo sorbento bei analičių savybių, ir nuo judrios fazės sudėties.

1.4.2. Eksperimentinių veiksnių įtaka

Pagrindiniai eksperimentiniai veiksniai, įtakojantys atskyrimo kokybę (sulaikymą, atrankumą, efektyvumą) HILIC metode – kolonėlės temperatūra, tirpiklių santykis judrioje fazėje, judrios fazės pH ir druskos koncentracija judrioje fazėje [89, 95].

Kolonėlės temperatūra. Kolonėlės temperatūra jau senai įvardijama kaip pakankamai svarbus faktorius atskyrimui skysčių chromatografijos metuose. Keičiant temperatūrą keičiasi judrios fazės klampa, analitės difuzijos greitis ir analitės pernašos tarp fazių entalpijos vertė. Tai įtakoja atskyrimo greitį, atrankumą bei analičių smailių efektyvumą. Kaip ir AFCh, taip ir HILIC metode analičių sąveika su nejudria faze dažniausiai yra egzoterminė, todėl keliant kolonėlės temperatūrą sulaikymo trukmės mažėja [96]. Be to nustatyta, kad aukštesnėje temperatūroje judrios fazės poliškumas sumažėja. Vis tik reikia pažymėti, jog kolonėlės temperatūra turi mažesnę įtaką analičių sulaikymui nei judrios fazės sudėtis. Pavyzdžiui, acetonitrilo koncentracijos padidinimas judrioje fazėje 1 %, sulaikymo faktorių paveikia tiek pat, kiek temperatūros kolonėlėje padidinimas 5 °C [97].

Apžvelgdamas temperatūros įtaką Dolan padarė išvadą, kad AFCh metode kolonėlės temperatūra stipriau įtakoja jonizuotų ir polinių junginių atskyrimo atrankumą [98]. Remdamiesi šiuo teiginiu, galime daryti prielaidą, kad temperatūros pokyčiai turėtų smarkiai įtakoti atrankumą ir HILIC metode. Visų pirma todėl, kad HILIC būtent ir skirtas polinių ir/arba jonizuotų junginių atskyrimui. Be to, HILIC metode naudojamuose poliniuose sorbentuose svarbus vaidmuo tenka elektrostatinėms sąveikoms. Nustatyta, kad temperatūros įtaka atrankumui priklauso nuo analitės prigimties ir nuo sąveikų tarp analitės ir stacionarios fazės pobūdžio. Temperatūros įtaka pasireiškia stipriau atskiriant junginius, kurie skiriasi dydžiu, molekulių forma ir/arba vandenilinių ryšių stiprumu, ypač atskiriant dalinai jonizuotus junginius. Ženkliai mažesnė temperatūros įtaka nustatyta neutralių polinių junginių atskyrimo atrankumui [95]. Temperatūra gali turėti įtakos ne tik analitės pernašos tarp fazių entalpijos pokyčiams, bet ir keisti pačios analitės būvį. Pvz., gliukozės mutarotacija tirpale priklauso nuo temperatūros – aukštesnėje temperatūroje sulėtėja angliavandenių izomerų susidarymas ir tai papildomai įtakoja jų chromatografinę elgseną [99].

Ryšys tarp kolonėlės temperatūros ir analičių sulaikymo gali būti taikomas sulaikymo mechanizmo nustatymui. Kolonėlės temperatūros įtaka analičių sulaikymui chromatografijoje aprašoma van't Hoff'o lygtimi (žiūr. 3.2.6 skyrių). Tiesinės $\ln k - 1/T$ priklausomybės yra būdingos AFCh metodui [100, 101]. Tačiau tiesinės priklausomybės taip pat nustatytos ir normalių fazių bei jonų mainų chromatografijos metoduose, kur analitės sulaikomos adsorbcijos arba elektrostatinės sąveikos pagalba [102]. Yra laikoma, kad netiesinės temperatūrinės priklausomybės rodo analičių sulaikymo mechanizmo kitimą kintant temperatūrai ir/arba analičių sulaikymą mišriu mechanizmu. Neigiamas van't Hoffo kreivės polinkis arba neigiama sulaikymo entalpija rodo, kad analitės pernašos tarp judrios ir stacionarių fazių procesas yra egzoterminis ir atvirkščiai [103, 104].

Stalikas ir bendraautoriai [94] tyrė vandenyje tirpių vitaminų (nikotino rūgštis, L-askorbo rūgštis ir tiamino) sulaikymo mechanizmą ant diolio kolonėlės judria faze naudodami ACN/H₂O (90/10 v/v) mišinį su 10 mmol/L amonio acetato priedu. Van't Hoffo priklausomybių nuokrypį nuo tiesiškumo autoriai priskyrė antrinėms elektrostatinėms sąveikoms (atostūmio - nikotino ir L-askorbo rūgštims, ir traukos – tiaminui). Taip pat pastebėta, kad padidinus judrioje fazėje vandens kiekį nuo 10 % iki 20 %, van't Hoffo priklausomybių tiesiškumas pagerėja ($R^2 > 0,99$). Tai aiškinama tuo, kad didesnis vandens kiekis palengvina sąlygas pasiskirstymui, t.y. judrioje fazėje su daugiau vandens pradeda dominuoti pasiskirstymo mechanizmas. Gua ir Gaiki [104] tyrė kolonėlės temperatūros įtaką mažų polinių junginių sulaikymui. Tyrimo rezultatai apibendrinti taikant van't Hoffo priklausomybes. Gautas tiesinės neigiamo polinkio (sorbcija – egzoterminė) priklausomybes autoriai aiškino stiprių specifinių sąveikų tarp analičių ir stacionarios fazės nebuvimu.

Judrios fazės tirpikliai. Judri fazė HILIC metode sudaryta iš organinio tirpiklio ir vandens. Organinio tirpiklio kiekis judrioje fazėje neturi būti didesnis už 95 % ir ne mažesnis nei 60 %. Dažniausiai naudojamas organinis tirpiklis yra acetonitrilas. Keliuose darbuose organiniu judrios fazės tirpikliu buvo panaudoti

metanolis, tetrahidrofuranas, izopropanolis ir etanolis, tačiau tai tik pablogino atskyrimo kokybę [105, 106]. Siekiant užtikrinti hidrofilinės sąveikos mechanizmą, likusią judrios fazės dalį turi sudaryti grynas vanduo arba vandeninis buferio tirpalas. Priešingai nei AFCh metode, HILIC sistemoje vanduo yra stipresne išstūmimo jėga pasižymintis tirpiklis. Todėl siekiant sustiprinti silpnai sulaikomų analičių sulaikymą bei pagerinti jų atskyrimą, yra mažinamas vandens kiekis judrioje fazėje. Tam tikrais atvejais vanduo gali būti dalinai arba net pilnai pakeistas poliniu organiniu tirpikliu. Pavyzdžiui, metakrilo rūgšties, citozino, notriptilino ir nikotino rūgšties sulaikymas ant BEH HILIC kolonėlės stiprėjo ir atskyrimas pagerėjo kai 5 % judrioje fazėje (90/10 ACN/vanduo+10 mmol/L amonio acetato) esančio vandens buvo pakeista organiniu tirpikliu [107]. Analčių sulaikymas stiprėjo silpnėjant organinio tirpiklio poliškumui tokia eile: metanolis < etanolis < 2-propanolis. Vandenį pilnai pakeitus kitu poliniu protoniniu tirpikliu, stacionarios fazės paviršiuje susiformuoja protoninio tirpiklio sluoksnis. Nukleozidų, nukleorūgščių ir dezoksinukletidų atskyrimo sąlygos buvo optimizuotos naudojant ACN ir protoninio tirpiklio (etilendiolio, metanolio ar etanolio) judrias fazes [108]. Nors vandens pakeitimas kitu tirpikliu nepagerino atskyrimo, toks bevandenis HILIC metodas galėtų būti taikomas vandenyje blogai tirpių polinių junginių atskyrimams.

Judrios fazės pH. Judrios fazės pH yra vienas iš svarbesnių atskyrimo kokybę įtakančių veiksnių HILIC metode. Priešingai nei AFCh metode, kur analčių jonizacija turi neigiamą poveikį atskyrimui ir jos stengiamasi išvengti, HILIC atveju jonizuotų analčių sulaikymas dažnai sustiprėja bei pagerėja atskyrimas. pH įtaka reikšminga tuomet, kai analitės ir/arba stacionarios fazės funkcinės grupės dalyvauja protonizacijos/deprotonizacijos procese, t.y. pasižymi silpnomis rūgštinėmis ar bazinėmis savybėmis. Jeigu keičiant judrios fazės pH, keičiasi ir sorbento paviršiaus, ir analitės krūvis, tuomet, priklausomai nuo konkrečios situacijos, analitės sulaikymas gali stiprėti, ženkliai nesikeisti arba

silpnėti. Jei analitės ir stacionarios fazės funkcinės grupės turi tą patį krūvį, tokiu atveju stiprėjant analitės jonizacijai jos sulaikymas dėl elektrostatinės stūmos susilpnėja. Elektrostatinės traukos sąveika, vykstanti tarp priešingą krūvį turinčių analitės ir stacionarios fazės funkcinių grupių, padidina analizuojamų junginių sulaikymo trukmes. Pavyzdžiui, keičiant judrios fazės pH nuo 6,5 iki maždaug 4,8, citozino ($pK_{a1} \sim 4,6$) sulaikymo trukmė ant aminopropilsilikagelio stacionarios fazės nežymiai mažėja. Staigus sulaikymo trukmės sumažėjimas vyksta kai pH sumažinamas nuo 4,8 iki maždaug 3,5. Šiame pH intervale intensyviai vyksta ir citozino, ir amino grupių silikagelio paviršiuje protonizacija, kurios metu analizė ir sorbento paviršius įgyja teigiamą krūvį. Dėl sustiprėjusios elektrostatinės stūmos analitės sulaikymas susilpnėja. Tuo tarpu padidinus judrios fazės pH nuo 3,3 iki 4,8, acetilsalicilo rūgšties ($pK_a \sim 3,5$) sulaikymas ant amino ligandu modifikuoto silikagelio reikšmingai sustiprėjo, o toliau didinant pH iki 6,5 beveik nekito. Šiuo atveju didinant pH sustiprėja elektrostatinės traukos jėgos tarp teigiamą krūvį turinčių amino grupių ir acetilsalicilato anijono [104].

Neutralių junginių sulaikymo ant diolio stacionarios fazės, judrios fazės pH neįtakoja. Pavyzdžiui, keičiant judrios fazės pH intervale 3-6, vandenyje tirpių vitaminų nikotinamido, piridoksino ir riboflavino krūvis nekinta, todėl šių junginių sulaikymas ant diolio stacionarios fazės nepriklauso nuo pH. Tuo tarpu nikotino rūgšties ($pK_a \sim 2,2$) ir L-askorbo rūgšties ($pK_a \sim 4,1$) sulaikymo trukmės padidėjo, esant didesniai judrios fazės pH dėl vykstančios deprotonizacijos [94].

Vienu iš populiariausių sorbentų HILIC metode yra nemodifikuotas silikagelis. Didinant judrios fazės pH, jo paviršiuje esančios silanolinės grupės yra linkusios deprotonizuotis ir stacionari fazė įgyja neigiamą krūvį. Tokie stacionarios fazės paviršiaus pokyčiai sustiprina bazinių junginių elektrostatinę sąveiką su sorbentu ir padidina jų sulaikymo trukmes [105]. Netgi neutraliais ligandais modifikuotos silikagelio stacionarios fazės dėl likutinių silanolinių grupių jonizacijos taip pat gali įgyti neigiamą krūvį. Likutinių silanolinių grupių

įtaką analizuojamų junginių atskirymui nustatyta amido [104] ir diolio [109] stacionarioms fazėms.

Druskų įtaka. Druskos koncentracija judrioje fazėje (arba judrios fazės joninė jėga) įtakoja krūvį turinčių junginių chromatografinę elgseną. Druskų priedai judrioje fazėje susilpnina jonų mainų sąveikas bei pagerina analičių smailių formą. Elektrostatinės traukos atveju, t.y. kai analizė ir stacionari fazė yra priešingo krūvio, didinant druskos koncentraciją judrioje fazėje analičių sulaikymo trukmės mažėja [110]. Priešingas efektas gaunamas kai analizės ir stacionarios fazės krūvis vienodas, t.y. kai kolonėlėje tarp analizės ir sorbento pasireiškia elektrostatinė stūma [94]. Būtent tokia amonio acetato koncentracijos įtaka buvo nustatyta atskiriant salicilūro rūgštį ant amido, amino, sulfobetaino ir silikagelio stacionarių fazių. Padidinus druskos koncentraciją, sulaikymas ant amino sorbento ženkliai susilpnėjo dėl susilpnėjusios elektrostatinės sąveikos tarp salicilūro rūgšties anijonų ir teigiamų sorbento amino grupių. Priešingas efektas gautas ant amido, silikagelio ir sulfobetaino stacionarių fazių. Net ir sistemose su nejoninėmis polinėmis stacionariomis fazėmis, kuriose elektrostatinės sąveikos nevyksta, druskos koncentracijos judrioje fazėje didinimas sustiprina analičių sulaikymą. Tai aiškinama tuo, kad judrioje fazėje esanti druska palengvina vandenilinio ryšio susidarymą tarp analizės ir stacionarios fazės ir/arba padidina adsorbuoto vandens sluoksnio storį stacionarios fazės paviršiuje [104].

Kitas svarbus faktorius yra tai, kad skirtingų druskų priedai gali skirtingai įtakoti analizuojamų junginių sulaikymą. Trietilamino fosfato druskos priedas sustiprino bazinių peptidų sulaikymą ant silpnomis anijonų mainų savybėmis pasižyminčio sorbento. Tuo tarpu naudojant natrio metilfosfonato priedą, tie patys peptidai buvo sulaikomi žymiai silpniau. Tai paaiškinama tuo, kad fosfatas sukuria papildomą sluoksnį stacionarios fazės paviršiuje, kuriame vienas neigiamas krūvis neutralizuoja sorbento ligando teigiamą krūvį, o kitas laisvas neigiamas krūvis pritraukia teigiamas peptidų funkcines grupes. Natrio

metilfosfonato atveju laisvas tik vienas neigiamas krūvis, kuris gali sąveikauti arba su sorbento paviršiumi, arba tik su baziniais peptidais [111].

Būtina pažymėti, kad HILIC metode gali būti naudojamos tik judrioje fazėje su dideliu ACN kiekiu tirpios druskos, pvz., trietilamonio fosfatas, natrio metilfosfatas, amonio acetatas ar amonio formiatas. Pastarosios dvi yra labiausiai tinkamos dėl gero suderinamumo su MS detektoriumi.

1.4.3. Sorbentai HILIC metode

HILIC metode populiariausios stacionarios fazės – grynas silikagelis arba įvairiomis polinėmis funkcinėmis grupėmis (pvz., amino, amido, diolio ir kt.) modifikuotas silikagelis [112, 113]. Pirmieji darbai HILIC metodu buvo atliekami naudojant tradicinei normalių fazių chromatografijai skirtas stacionarias fazes ir tik paskutinį dešimtmetį atsirado polinės stacionarios fazės pritaikytos specialiai HILIC metodui. Šiuo metu jau yra pakankamai platus HILIC metodui skirtų komercinių kolonėlių pasirinkimas.

Vis tik pagrindine stacionaria faze, ypač farmacijos srityje, išlieka **nemodifikuoto silikagelio sorbentas** [114]. Priklausomai nuo paruošimo būdo, komerciškai prieinami silikagelio sorbentai skiriasi savo grynumu ir savybėmis. A tipo silikagelis yra nusodinamas iš šarminių silikato tirpalų ir turi metalų priemaišų, kurie aktyvuoja paviršiaus silanolines grupes. Toks silikagelis netinkamas HILIC metodui. Sferinės B tipo silikagelio sorbento dalelės gaunamos vykstant silicio delelių agregacijai ore. Toks sorbentas turi mažiau metalų priemaišų ir yra stabilesnis iki 9 pH judrioje fazėje. Šio tipo silikagelis pasižymi geresniu bazinių junginių atskyrimu. C tipo silikagelis arba „silicio hidridas“ yra modifikuotas, t.y. apie 95 % jo paviršiuje esančių silanolinių grupių ($\equiv\text{Si-OH}$) hidrosilaninimo proceso metu yra pakeistos į silicio hidrido ($\equiv\text{Si-H}$) grupes. C tipo silikagelis yra mažiau polinis už nemodifikuotą silikagelį, jis silpniau sąveikauja su vandeniu ir pasižymi geresniu rezultatų atsikartojamumu. Pasirenkant kolonėlę,

būtina atkreipti dėmesį į tai, kad naudojant skirtingų gamintojų kolonėlės gali ženkliai skirtis analizuojamų junginių chromatografiniai parametrai: sulaikymas, efektyvumas ir smailių simetriškumas.

Naudojant silikagelio stacionarias fazes būtina atsižvelgti į silikagelio paviršiuje esančių silanolinių grupių jonizaciją. Ypač tai svarbu atskiriant bazinius junginius, kurių elektrostatinė sąveika su disocijavusiomis silanolinėmis grupėmis gali ženkliai įtakoti tiek jų sulaikymą, tiek ir smailių efektyvumą [115, 116].

HILIC metode naudojamos mažos klampos judrios fazės, todėl net ir dirbant su labai mažo dydžio sorbento dalelėmis nesusidaro dideli slėgiai prieš kolonėlę [117]. 2007 m. Waters firma pagamino 1,7 μm dalelių dydžio etileno tilteliais modifikuotą silikagelio sorbentą (BEH) skirtą HILIC metodui. BEH HILIC silikagelio sorbentas pasižymi didesniu cheminiu atsparumu lyginant su nemodifikuotu silikagelio sorbentu, dėl to gerai suderinamas su MS detektoriumi (neišsiplauna funkcinės grupės) [107].

Aminopropilsilikagelis ($\equiv\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$) buvo pirmasis modifikuoto silikagelio sorbentas, kuris iki šiol dažnai naudojamas amino rūgščių, peptidų, karboksirūgščių, nukleozidų, cukrų ir kai kurių vaistų atskyrimui HILIC metodu. Stacionarios fazės paviršiuje esančios amino grupės yra labiau giminingos rūgštiniams junginiams. Dirbant su parūgštintomis judriomis fazėmis amino grupės protonizuojasi ir sorbento paviršius įgyja teigiamą krūvį. Taip atsiranda papildoma jonų mainų sąveika su neigiamą krūvį turinčiomis analitėmis, sustiprinanti tokių analizių sulaikymą ir netgi galinti sukelti negrįžtamą kai kurių junginių adsorbciją stacionarios fazės paviršiuje. Be to, lyginant su silikagelio sorbentais, aminopropilsilikagelis mažiau stabilus, jį būtina žymiai ilgiau kondicionuoti, o jo tarnavimo trukmė dėl ligandų išsiplovimo gerokai trumpesnė. Pirminės amino grupės yra labai reakingos ir, sąveikaudamos su aldehidais, gali suformuoti Šifo bazes, kas gali neigiamai įtakoti angliavandenių atskyrimą [118]. Antriniai ir tretiniai aminai pasižymi mažesniu reakingumu, todėl jais

modifikuotas silikagelis (pvz., YMPC Pack Poliamine II) yra chemiškai stabilesnis už aminopropilsilikagelį. Pagrindinis aminopropilsilikagelio sorbentų privalumas – žymiai geresnis sacharidų atskyrimas nei ant nemodifikuoto silikagelio. Amino grupės pagreitina cukrų mutarotacijos procesą ir eliminuoja dvigubų smailių susidarymą [112].

Amidu modifikuotas silikagelis. Šioms stacionarioms fazėms priskiriamas karbamoil arba amido ($\equiv\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_3\text{-CO-NH-R}$) funkcinėmis grupėmis modifikuoti silikagelio sorbentai. Amido grupė yra prijungiamą per alkilo grandinę. Priešingai nei aminopropilas, šios grupės yra mažiau reaktingos ir nepasižymi bazinėmis savybėmis, todėl jonizuotų analizių sulaikymui mažesnę įtaką turi jonų mainai [112]. Taigi, dirbant su amidiniais sorbentais rečiau reikia naudoti joninius judrios fazės priedus, dėl to mažesni druskų kiekiai patenka į MS detektorius. Be to, ant amidu modifikuoto silikagelio rečiau pasireiškia negrįžtama adsorbcija ir geriau atsikartoja rezultatai. Šios stacionarios fazės įprastai naudojamos peptidų, oligosacharidų, glikoproteinų, glikozidų atskyrimui [119]. Kai kurios amidu modifikuotos stacionarios fazės buvo sukurtos specialiai HILIC metodui. Pavyzdžiui, karbamoil-silikagelis HILIC TSK-gel Amide-80, kuris tapo pagrindine stacionaria faze atskiriant mono ir oligosacharidus, angliavandenių darinius, peptidus ir aminorūgštis [120]. Specialiai HILIC atskyrimams UESCh metodu buvo pagamintas 1,7 μm dalelių dydžio BEH Amide sorbentas.

Dioliu modifikuotas silikagelis ($\equiv\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$) savo poliškumu ir gebėjimu formuoti vandenilinius ryšius yra artimas nemodifikuotam silikageliui. Šio sorbento paviršiuje nėra jonizuotų grupių, išskyrus likutines silanolines grupes, kurios gali būti dalinai užblokuotos silaninimo agento, taip išvengiant negrįžtamos polinių junginių adsorbcijos. Diolio stacionari fazė plačiai taikoma baltymų atskyrimui [121], bet pastaruoju metu šis sorbentas pradėtas naudoti ir mažos molekulinės masės fenoliniams junginiams atskirti AFCh ir HILIC metoduose [122]. Diolio stacionarios fazės

buvo papildomai modifikuotos įvedant undekan-1,2-diolio ligandą. Tokia stacionari fazė turi ilgą alkilo grandinę su poline diolio funkcinę grupę grandinės gale, todėl pasižymi dvigubu AFCh/HILIC sulaikymo mechanizmu [123]. Cukrų mutarotacijos procesas ant diolio sorbento vyksta lėtai, priešingai nei naudojant aminopropilsilikagelį, todėl galima registruoti visas anomerines formas [124].

Dioliu modifikuoto silikagelio sorbentai nepasižymi dideliu atsparumu rūgštinei judriai fazei. Tačiau naujos kartos sutinklintos diolio stacionarios fazės jau yra atsparesnės hidrolizei, pasižymi stipresne hidrofobine sąveika, geresne skiriamąją geba ir efektyvumu lyginant su tradicinėmis diolio kolonėlėmis [125].

Ciklodekstrino stacionarios fazės. Ciklodekstrinai yra cikliniai oligosacharidai, dažniausiai naudojami α , β ir γ -ciklodekstrinai, kurie atitinkamai yra sudaryti iš 6, 7 ir 8 D-gliukozės žiedų. Kadangi ertmės yra suformuotos iš optiškai aktyvaus cukraus, ciklodekstrinai plačiai naudojami kaip chiraliniai selektoriai enantiomerų atskyrimui AFCh. Didžioji dalis hidroksigrupių yra išsidėstę ciklodekstrino kūgio išorėje, todėl ciklodekstriniais modifikuotas silikagelis yra tinkamas naudoti ir HILIC metode monosacharidų ir oligosacharidų atskyrimui [126]. Sulaikymas HILIC sąlygose stiprėja didėjant monosacharidų kiekiui ir yra labiau priskiriamas hidrofilei sąveikai tarp judrios fazės ir dalinai imobilizuoto vandens sluoksio išorinėje ciklodekstrino molekulės dalyje, nei analitės sąveikai su ciklodekstrino ertme [127]. Ciklodekstriniais modifikuotas silikagelis yra daug žadantis sorbentas enantiomerų atskyrimui HILIC metodu. Pavyzdžiui, β -ciklodekstriniais modifikuota stacionari fazė pasižymi ir enantioselektyviomis savybėmis. Ciklodekstriniais modifikuotos stacionarios fazės yra stabilesnės, gaunamas geresnis rezultatų atskikartojamumas ir geresni amino rūgščių ir kitų polinių junginių sulaikymo parametrai nei naudojant amidu modifikuotą (TSKgel Amide 80) stacionarią fazę. Ciklodekstriniais modifikuotos stacionarios fazės pritaikytos flavanoidų ir izoflavanoidų atskyrimui, kurie AFCh sąlygomis buvo nesulaikomi [89].

Cviterjoninės stacionarios fazės tradiciškai sukurtos jonų mainų chromatografijai, tačiau pasirodė tinkamomis ir HILIC metodui. Irgum grupė [128, 129] specialiai HILIC metodui sukūrė sulfoalkilbetainu modifikuotas stacionarias fazes, kurios buvo pritaikytos neorganinių druskų, mažų joninių organinių junginių ir baltymų analizei. Šios stacionarios fazės – tai silikagelis, kurio paviršiuje kovalentiškai prijungti ligandai su rūgštinėmis savybėmis pasižyminčiomis sulfo funkcinėmis grupėmis ir stipriomis bazinėmis savybėmis pasižyminčiomis ketvirtinio amonio grupėmis, atskirtomis trumpa alkilo grandine. Tokia stacionari fazė gali būti panaudota katijonų, anijonų ir neutralių polinių junginių atskyrimui. Sorbento paviršiuje moliniu santykiu 1:1 esančios ketvirtinio amonio ir sulfo funkcinės grupės duoda artimą nuliui sorbento paviršiaus krūvį, tačiau sulfoalkilbetaino cviterjonas yra osmolitas, gebantis sorbento paviršiuje stipriai sulaikyti vandenį. Pagrindinės neutralių analičių sąveikos ant šios stacionarios fazės – vandenilinio ryšio sudarymas ir dipolio-dipolio sąveika. Tuo tarpu joninių analičių sulaikyme dominuoja jonų mainai [112].

Šioje apžvalgoje paminėtos tik populiariausios komercializuotos stacionarios fazės. Matome, kad stacionarių fazių pasirinkimas jau dabar yra pakankamai gausus, tačiau, atsižvelgiant į sparčiai augantį HILIC metodo populiarumą, ateityje jų skaičius ir įvairovė neabejotinai plėsis.

II. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Aparatūra

Tyrimai buvo atliekami ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) sistema Waters Acquity UPLC (Waters, Milford MA) sukomplektuota iš aukšto slėgio 2 kanalų gradientinio siurblio su automatiniu judrios fazės nudujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos, fotodiodinės matricos (PDA) skenuojančio detektoriaus (190-500 nm) ir kolonėlės termostato su temperatūros programavimo įrenginiu.

Tyrimams buvo naudojamos šios kolonėlės (Waters):

Acquity UPLC BEH HILIC, 1,7 μm , 100 \times 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH Amide, 1,7 μm , 100 \times 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 100 \times 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH C8, 1,7 μm , 100 \times 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH Phenyl, 1,7 μm , 100 \times 2,1 mm.

Įleidžiamo mėginio tūris – 2 μL . Detektavimas buvo atliekamas prie 210 nm bangos ilgio. Kolonėlės temperatūra tyrimo metu buvo palaikoma 30 $^{\circ}\text{C}$. Judrios fazės sudėtys ir elucijos gradiento programos pateiktos atitinkamuose „Rezultatai ir jų aptarimas“ dalies skyriuose. Rezultatams apdoroti buvo naudojama „Empower 2“ programinė įranga (Waters).

Tirpalų pH buvo kontroliuojamas pH-metru „pH-673. M” (Rusija).

2.2. Reagentai ir tirpalai

Tyrimams naudoti imidazolio joniniai skysčiai (Merk, Vokietija):

1-Butil-2,3-dimetilimidazolio jodidas (BDMIM).

1-Butil-3-metilimidazolio tetrafluoroboratas (BMIM).

1-Cianometil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl)imididas (CMMIM).

1,3-Dimetilimidazolio metilsulfatas (DMIM).
2,3-Dimetil-1-propilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl)imidazolas (DMPIM).
1-Etil-2,3-dimetilimidazolio chloridas (EDMIM).
1-Etil-3-metilimidazolio tetracianoboratas (EMIM).
1-Heksil-3-metilimidazolio chloridas (HMIM).
1-(2-Hidroksietil)-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl)imidazolas (HEMIM).
3-Metil-1-propilimidazolio jodidas (PMIM).
3-Metil-1-oktilimidazolio chloridas (OMIM).
1,2,3-Trimetilimidazolio jodidas (TMIM).

Darbe naudotos medžiagos:

Acetonitrilas (ACN), gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Amonio formiatas, 99,9 % (Sigma-Aldrich, JAV).

Tris-(hidroksimetil)aminometanas (Tris), 99,9 % (Sigma-Aldrich, JAV).

Metansulfoninė rūgštis (MSA), $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, JAV).

Trifluoroacto rūgštis (TFA), 99,9 % (Sigma-Aldrich, JAV).

Perchloro rūgštis, 70,0 % (Reachim, Rusija).

Natrio oktansulfonatas (NaOS), 99,0 % (Sigma-Aldrich, JAV).

Metanolis, gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Etanolis, ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Izopropanolis, ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Bidistiliuotas vanduo.

Visi judrios fazės tirpalai buvo filtruojami per 0,2 μm membraninį filtrą.

Pirminiai standartiniai 2,5 mmol/L koncentracijos joninių skysčių tirpalai buvo gaminami acetonitrilo - vandens mišinyje (1:1) ir laikomi tamsiuose induose 4 °C temperatūroje. Darbiniai standartiniai tirpalai buvo ruošiami kiekvieną dieną, pirminio standarto tirpalą skiedžiant acetonitrilu arba vandeniu, priklausomai nuo naudojamos judrios fazės sudėties. Buferiniai tirpalai buvo gaminami iš amonio druskos vandeninio tirpalo pridėdant atitinkamos rūgšties reikiamai pH vertei

nustatyti. Darbe pateiktos jūdrios fazės pH vertės atitinka vandeninio tirpalo pH vertes, neatsižvelgiant į organinio tirpiklio įtaką.

2.3 Procedūros

Analičių sulaikymo faktoriai k buvo skaičiuojami pagal formulę:

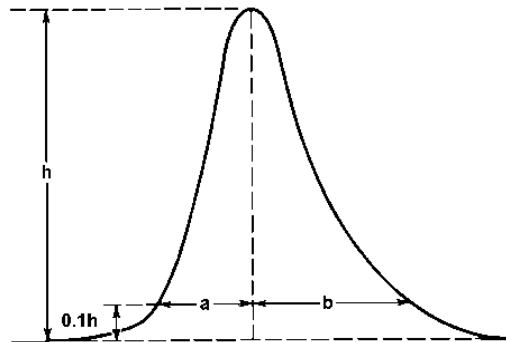
$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

t_R – analizės sulaikymo trukmė (min); t_m – nesulaikomos medžiagos (tolueno arba tiokarbamido) sulaikymo trukmė (min).

Smailių asimetriškumo faktoriai A_s buvo skaičiuojami pagal formulę:

$$A_s = b/a$$

a ir b atstumai (2.1 pav.) išmatuoti ties 1/10 smailės aukščio.



2.1 pav. Smailės asimetriškumo faktoriaus nustatymas.

Smailių efektyvumas buvo skaičiuojamas pagal formulę:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

N – teorinių lėkštelių skaičius (bedimensinis); t_R – analizės sulaikymo trukmė (min); $w_{0,5}$ – smailės plotis pusėje smailės aukščio (min).

Kolonėlės teorinės lėkštelės aukštis H (mm) buvo skaičiuojamas pagal formulę:

$$H = L/N$$

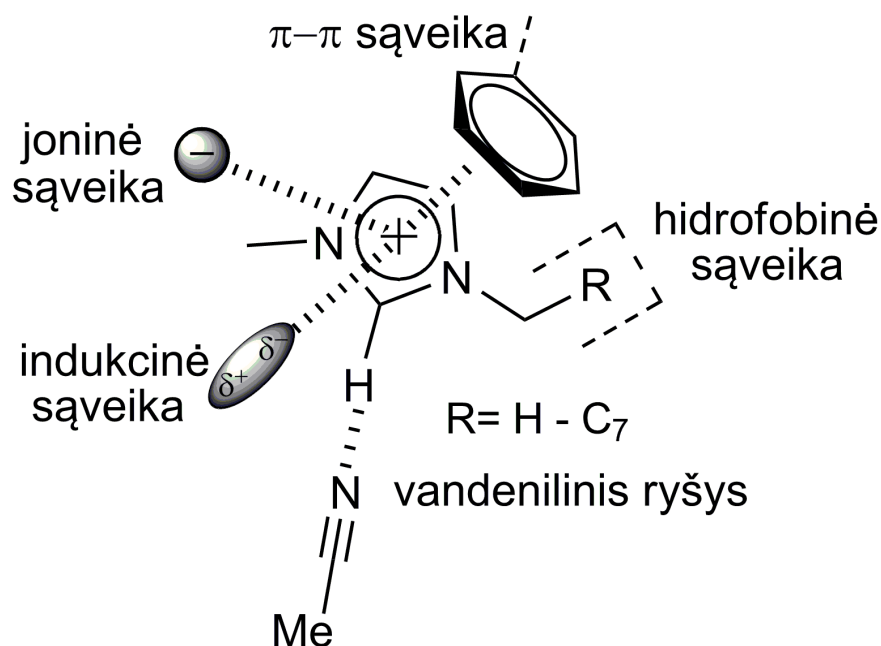
L – kolonėlės ilgis, mm.

Visi skaičiavimai buvo atliekami naudojantis kompiuterine chromatografijos duomenų apdorojimo programa Empower 2 (Waters). Rezultatai, pateikiami skyriuje „Rezultatai ir jų aptarimas“, yra vidutinės vertės gautos atlikus ne mažiau kaip tris tyrimus.

III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Imidazolio joninių skysčių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais

Kaip buvo minėta literatūros apžvalgoje, joninis skystis – tai druska, sudaryta iš organinio katijono (dažniausiai imidazolio, rečiau – piridinio ar pirolidinio darinių) ir nedidelio organinio arba neorganinio anijono. Pagrindinis komponentas, nulemiantis joninių skysčių savybes chromatografiniuose metoduose yra imidazolio (piridinio, pirolidinio) katijonas. Todėl, kai kalbama apie joninių skysčių chromatografinį atskyrimą, turime omenyje jų katijonų atskyrimą. Literatūros apžvalgoje pateikti pavyzdžiai rodo, kad joninių skysčių atskyrimas yra sudėtingas procesas. Priklausomai nuo JS savybių, judrios fazės sudėties ir sorbento prigimties, jų katijonų sulaikymo mechanizmas gali apimti hidrofobinę, indukcinę, π - π , vandenilinio ryšio, joninę sąveikas (3.1 pav.).



3.1 pav. Imidazolio katijono struktūra ir galimos jo sąveikos su stacionaria faze.

Tokia galimų sąveikų įvairovė atveria galimybę atskirti JS įvairiais skysčių chromatografijos metodais, pradedant nepoliniais ir vidutinio poliškumo junginiams atskirti naudojamu AFCh metodu, ir baigiant tik jonams atskirti tinkamu JPCh metodu. Deja, iki šiol nėra darbų, kuriuose būtų kompleksiskai įvertintos skirtingų skysčių chromatografijos metodų galimybės JS katijonams atskirti. Be to, visuose publikuotuose darbuose tyrimai buvo atliekami naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos įrangą, kuri pastaraisiais metais yra intensyviai išstumiamą naujos kartos ultraefektyviaja skysčių chromatografija.

Ši disertacinio darbo dalis skirta nuodugniai ištirti ir palyginti imidazolio JS atskyrimo galimybes skirtingais skysčių chromatografijos variantais (AFCh, JPCh ir HILIC) ultraefektyviosios skysčių chromatografijos sąlygomis. Tyrimams pasirinkome šešis plačiausiai naudojamus imidazolio grupės joninių skysčių katijonus: 1,3-dimetilimidazolį (DMIM), 1-etil-3-metilimidazolį (EMIM), 3-metil-1-propilimidazolį (PMIM), 1-butil-3-metilimidazolį (BMIM), 1-heksil-3-metilimidazolį (HMIM) ir 1-oktil-3-metilimidazolį (OMIM). Jų cheminės struktūros ir savybės pateiktos literatūros apžvalgoje 1.1 lentelėje.

3.1.1. Atvirkščių fazių skysčių chromatografija

Atvirkščių fazių skysčių chromatografija labai universalus ir lankstus metodas, puikiai tinkantis tiek visiškai nepoliniais, tiek ir palyginti poliniams junginiams atskirti. Šiame metode naudojami nepoliniai sorbentai (oktadecilsilikagelis, oktilsilikagelis, anglis ir pan.) ir polinės judrios fazės (vandens-acetonitrilo, vandens-metanolio mišiniai) [70]. AFCh metode atskyrimas pagrįstas hidrofobine analičių sąveika su nepoliniu sorbentu. Pagrindinės problemos atskiriant imidazolio katijonus šiuo metodu gali būti šios: blogas labai polinių analičių sulaikymas dėl silpnos jų sąveikos su nepoliniu sorbentu ir smailių asimetriškumas dėl papildomos elektrostatinės sąveikos tarp katijoninės

analitės ir neigiamo krūvio disocijavusių likutinių silanolinių grupių. Optimizuojant imidazolio katijonų atskyrimo AFCh metodu sąlygas didžiausias dėmesys buvo skiriamas dviems chromatografiniams parametrams – analičių sulaikymo trukmėms ir chromatografinių smailių efektyvumui.

Pirmiausia ištyrėme sorbento prigimties įtaką imidazolio katijonų sulaikymui. Tuo tikslu imidazolio katijonų atskyrimas buvo atliekamas izokratinės eliucijos sąlygomis naudojant tris skirtingais sorbentais užpildytas kolonėles (Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC BEH C8 ir Acquity UPLC BEH Phenyl). Dėl silpno labiau polinių junginių sulaikymo AFCh metode, preliminariam tyrimui pasirinkome nedidele išstūmimo jėga pasižyminčią judrią fazę – ACN:H₂O 10:90 (v/v) su 0,025 % (m/v) metansulfoninės rūgšties (MSA) priedu. Išmatuotos imidazolio katijonų sulaikymo trukmės palygintos 3.1 lentelėje.

Visose kolonėlėse imidazolio katijonų sulaikymas stiprėja ilgėjant jo alkilo grandinei, t.y. stiprėjant hidrofobiškumui. Tokia analičių chromatografinė elgsena yra būdinga AFCh metodui. Atsižvelgiant į tai, kad analičių smailių efektyvumai visose kolonėlėse buvo labai panašūs, pagrindiniu kolonėlės pasirinkimo kriterijumi laikėme analičių sulaikymo stiprumą. Kaip ir buvo galima tikėtis, nepriklausomai nuo sorbento prigimties, poliškesnės analitės (DMIM, EMIM, PMIM) yra silpnai sulaikomos ir beveik neatskiriamos. Stipriausias sulaikymas bei geriausias poliškiausių katijonų atskyrimas buvo gautas naudojant Acquity UPLC BEH Phenyl kolonėlę. Be hidrofobinės sąveikos šioje kolonėlėje atsiranda papildoma π - π tipo sąveika tarp imidazolio žiedo ir fenilo funkcinių grupių sorbento paviršiuje [71]. Ši kolonėlė ir buvo pasirinkta tolimesniems tyrimams.

Pagrindinės smailių išplitimo ir asimetriškumo (smailių su „uodegomis“) priežastys gali būti kolonėlės perkrova arba katijoninių analičių elektrostatinė sąveika su disocijavusiomis likutinėmis silanolinėmis grupėmis sorbento paviršiuje. Kolonėlės perkrovos faktorių turėjome atmesti, kadangi, net ir sumažinus įleidžiamo mėginio kiekį, smailių forma nepagerėjo. Gerai žinoma, kad

modifikuoto silikagelio paviršiuje likusios silanolinės grupės gali sąveikauti su teigiamą krūvį turinčia analite. Ši sąveika dažniausiai sąlygoja mažą efektyvumą, smailių išplitimą ir blogą sulaikymo trukmių atsikartojamumą. Dažniausiai analitės-silanolinių grupių joninėms sąveikoms sumažinti AFCh metode yra naudojamos judrios fazės su rūgščių (pvz.: TFA, HClO₄, H₃PO₄) ar jų druskų priedais [130, 131]. Judrios fazės parūgštinimas slopina silanolinių grupių disociaciją, o pridedamų rūgščių ar druskų anijonai gali sudaryti jonų poras su analizuojamu katijonu, taip sumažindami jų teigiamą krūvį ir padidindami sulaikymo trukmes [132, 133].

3.1 lentelė. Imidazolio katijonų sulaikymo trukmių skirtingose kolonėlėse palyginimas. Judri fazė: 0,025 % (m/v) MSA ACN:H₂O (10:90 v/v) mišinyje, tėkmės greitis – 0,25 mL/min.

Kolonėlė	Analitė	Sulaikymo trukmė, min
Acquity UPLC BEH C18	DMIM	0,82
	EMIM	0,85
	PMIM	0,89
	BMIM	1,22
	HMIM	4,08
	OMIM	12
Acquity UPLC BEH C8	DMIM	1,00
	EMIM	1,07
	PMIM	1,20
	BMIM	1,85
	HMIM	9,64
	OMIM	>25
Acquity UPLC BEH Phenyl	DMIM	1,05
	EMIM	1,13
	PMIM	1,35
	BMIM	2,08
	HMIM	11,0
	OMIM	>25

Toliau optimizuojant imidazolio katijonų atskyrimo sąlygas buvo tirta rūgščių (TFA, MSA, HCl ir HClO₄) judrioje fazėje įtaka analičių sulaikymo trukmėms ir smailių efektyvumui. 3.2 pav. pateiktos keturių hidrofiliškiausių

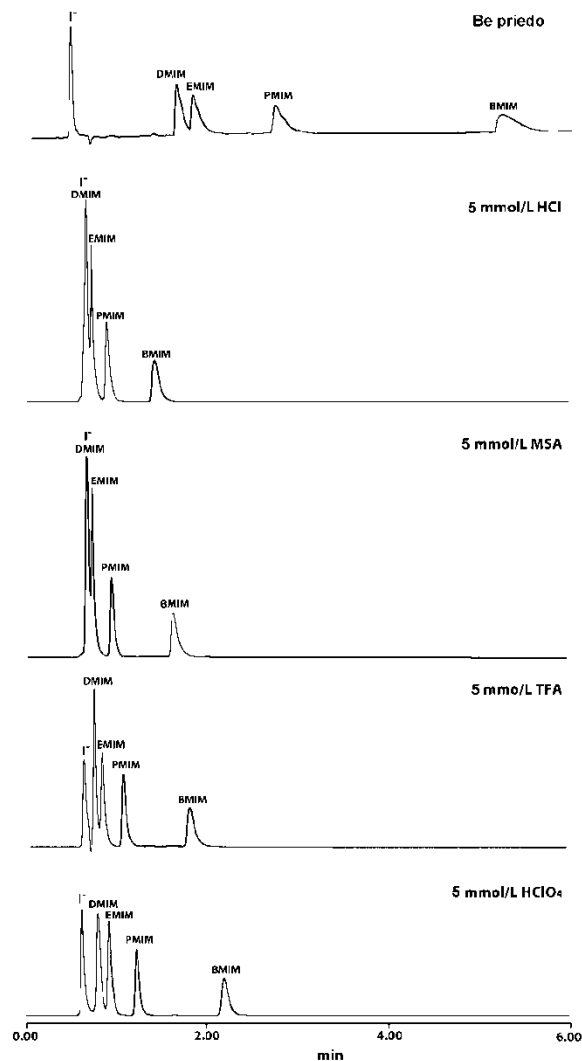
imidazolio katijonų chromatogramos, išmatuotos su skirtingų rūgščių priedais judrioje fazėje. Panaši chromatografinė elgsena nustatyta ir HMIM bei OMIM, tačiau šie junginiai yra žymiai stipriau sulaikomi, todėl nepavaizduoti chromatogramose. Pirma smailė chromatogramose priskiriama PMIM priešjoniui Γ , kuris taip pat absorbuoja šviesą 210 nm bangos ilgyje, tačiau yra visiškai nesulaikomas kolonėlėje. Visos tirtos rūgštys yra stiprios, todėl, nepriklausomai nuo rūgšties prigimties, judrios fazės pH neviršijo 3. Tokioje terpėje likutinių silanolinių grupių disociacija yra beveik pilnai nuslopinama ir maksimaliai susilpninamos joninės sąveikos. Būtent tai ir sumažina katijonų sulaikymo trukmes bei pagerina jų smailių simetriškumą.

3.2 pav. pateiktose chromatogramose matome, kad analičių sulaikymo trukmės priklauso ir nuo pridedamos rūgšties prigimties. Kaip jau buvo minėta, rūgščių anijonai gali asocijuotis su imidazolio katijonais. Tokiu atveju sumažinamas efektyvus analičių krūvis ir sustiprinamas jų sulaikymas. Tirtų rūgščių anijonų gebėjimas sudaryti jonų poras silpnėja tokia seka: $[\text{ClO}_4]^- > \text{TFA}^- > \text{MSA}^- > \text{Cl}^-$ [54]. Matome, kad tiriamų katijonų sulaikymo stiprumas atitinka pateiktą rūgščių gebėjimo sudaryti jonų poras seką. Stipriausias analičių sulaikymas bei geriausias jų atskyrimas gautas naudojant judrią fazę su HClO_4 priedu.

Toliau buvo tirta HClO_4 koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų sulaikymui ir atskyrimui. Keičiant rūgšties koncentraciją intervale 1-10 mmol/L, reikšmingų pokyčių nepastebėta. Padidinus HClO_4 koncentraciją judrioje fazėje nuo 1 iki 10 mmol/L, analičių sulaikymas truputį sustiprėjo (pvz., BMIM sulaikymo trukmė padidėjo nuo 2,16 iki 2,28 min), o smailių efektyvumo pokyčiai buvo nereikšmingi.

Remiantis anksčiau pateiktais tyrimų rezultatais matome, kad poliškiausi imidazolio katijonai yra silpnai sulaikomi, tuo tarpu hidrofobiškesni imidazolio katijonai (HMIM ir OMIM) sulaikomi žymiai stipriau. Pavyzdžiui, DMIM ir OMIM sulaikymo trukmės skiriasi apie 30 kartų. Hidrofobiškesnių imidazolio

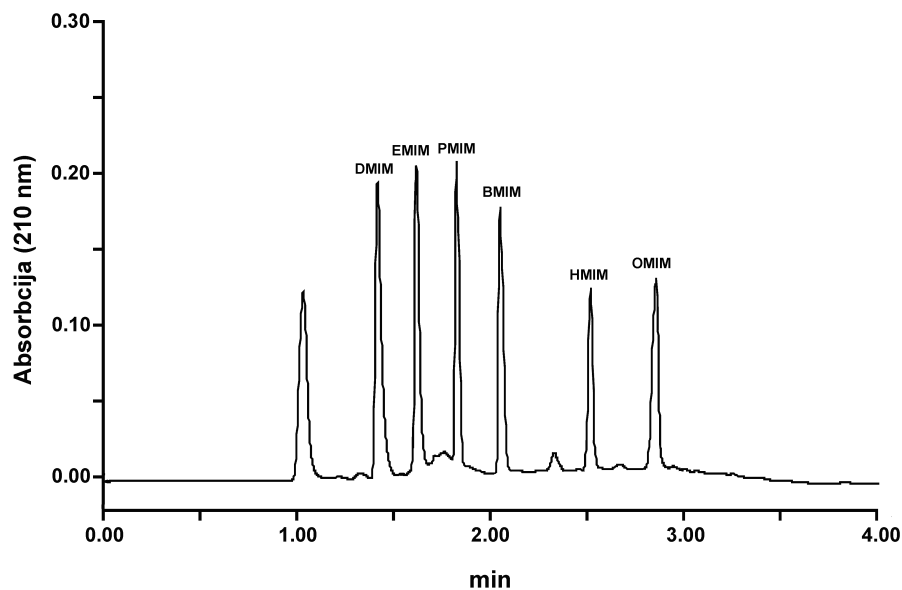
katijonų eliuciją galima pagreitinti panaudojus stipresnės eliuacinės gebos judrią fazę, tačiau tuomet bus neatskiriami hidrofiliniai DMIM, EMIM ir PMIM katijonai. Akivaizdu, kad greitas visų 6 imidazolio joninių skysčių katijonų atskyrimas izokratinėse AFCh sąlygose neįmanomas.



3.2 pav. Rūgščių įtaka imidazolio katijonų atskyrimui atvirkščių fazių chromatografijos metodu. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH Phenyl. Judri fazė: ACN:H₂O 10:90 (v/v) su atitinkamu rūgšties priedu. Tėkmės greitis - 0,4 mL/min.

Gradientinės eliucijos sąlygoms optimizuoti pradinėmis judriomis fazėmis pasirinkome 2,5 mmol/L HClO₄ vandeninį tirpalą (judri fazė A) ir 2,5 mmol/L

HClO₄ tirpalą ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje (judri fazė B) ir skirtingu greičiu, atskyrimo metu, keitėme jų santykį. Optimalus gradientas: nuo 0 iki 3 min judrios fazės B koncentracija tolygiai didinama nuo 5 iki 75 % (v/v). Iš 3.3 pav. pavaizduotos imidazolio katijonų mišinio chromatogramos matyti, kad gradientinės eliucijos sąlygomis pilnai ir labai greitai atskiriami visi šeši imidazolio katijonai. Gautos simetriškos smailės ir puikus efektyvumas. Vieno imidazolio katijonų atskyrimo ciklo trukmė – 6 min (1 min grįžimui į pradinę judrios fazės sudėtį ir 2 min pusiausvyros nusistovėjimui).



3.3 pav. Imidazolio katijonų atskyrimas AFCh metodu naudojant gradientinę eliuciją. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH Phenyl. Judri fazė A: 2,5 mmol/L HClO₄ vandeninis tirpalas; judri fazė B: 2,5 mmol/L HClO₄ ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje. Linijinis gradientas: 5% →75% B per 3 min. Tėkmės greitis – 0,25 mL/min.

Lyginant gradientinį imidazolio katijonų atskyrimą su atskyrimu izokratinėmis sąlygomis, galima išvardinti keleta gradientinio režimo privalumų: žymiai (~10 kartų) trumpesnė atskyrimo trukmė, geresnis smailių efektyvumas bei didesnis detektavimo jautris (signalas/triukšmai santykis).

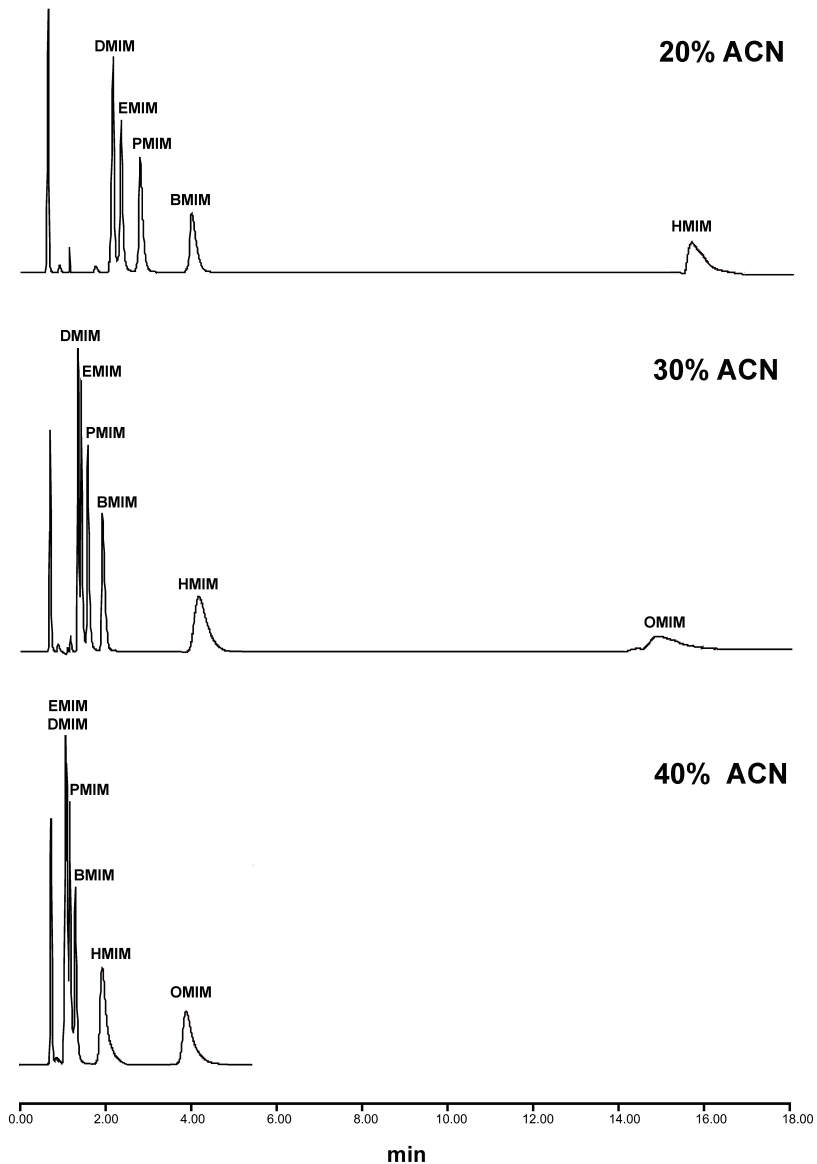
3.1.2. Jonų porų chromatografija

Kitas metodas joninių junginių atskyrimui yra jonų porų chromatografija [134]. Jonų atskyrimui JPCh metodu naudojami tradiciniai atvirkščių fazių sorbentai (pvz. oktadecilsilikagelis, oktilsilikagelis ir kt.) ir įprastinės AFCh judrios fazės su jonų porų reagento (priešingo analitei krūvio ilgagrاندžio jono) priedu. Katijoniniams junginiams atskirti jonų porų reagentais dažniausiai naudojami alkilsulfonatai. Imidazolio katijonų atskyrimo JPCh metodu tyrimams pasirinkome nepolinį oktadecilsilikagelio sorbentą (kolonėlė – Acquity UPLC BEH C18), o jonų porų reagentu – natrio 1-oktansulfonata (NaOS). Tokioje sistemoje katijoninės analitės su jonų porų reagento anijonu judrioje fazėje gali sudaryti neutralias jonų poras ir taip sustiprinti hidrofobinę sąveiką su sorbentu ir/arba gali vykti jonų mainai tarp sorbento paviršiuje adsorbuotų OS^- anijonų ir analizuojamų katijonų. Pagrindiniai veiksniai įtakojantys joninių junginių atskyrimą šiuo metodu yra jonų porų reagento koncentracija ir vandens/organinio tirpiklio santykis judrioje fazėje.

Atsižvelgdami į tyrimų rezultatus, gautus AFCh metodu, pradiniam tyrimams judria faze pasirinkome 20:80 ACN:H₂O (v/v) mišinį su 5 mmol/L amonio formiato buferiu (pH 3,2), kuriame palaipsniui didiname NaOS koncentraciją nuo 0,1 iki 5,0 mmol/L. Nustatėme, kad didinant NaOS koncentraciją judrioje fazėje nuo 0,1 iki 0,6 mmol/L visų imidazolio katijonų sulaikymo trukmės didėjo. Toliau didinant NaOS koncentraciją judrioje fazėje analičių sulaikymo trukmės reikšmingai nesikeitė. Be to, pridėjus į judrią fazę NaOS, analičių smailių efektyvumas pagerėjo maždaug 2-3 kartus. Taip pat nustatėme, jog stipriausiai NaOS koncentracija įtakoja ilgesnę alkilo grupę turinčių imidazolio katijonų sulaikymą. Tokia katijoninių junginių chromatografinė elgsena yra būdinga JPCh metode. Geriausias atskyrimo atrankumas pasiekiamas, kai NaOS koncentracija yra 0,6-1,2 mmol/L intervale.

Tolimesniems tyrimams naudojome judrią fazę su 1 mmol/L koncentracijos NaOS priedu.

3.4 pav. palygintos imidazolio katijonų mišinio chromatogramos, gautos naudojant judrias fazes su skirtinga ACN koncentracija. Kaip ir tikėtasi, didinant ACN koncentraciją judrioje fazėje visų imidazolio katijonų sulaikymas silpnėja.



3.4 pav. Acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų atskyrimui JPCh metodu. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH C18. Judri fazė: 1 mmol/L NaOS tirpalas ACN:H₂O mišinyje. Tėkmės greitis – 0,25 mL/min.

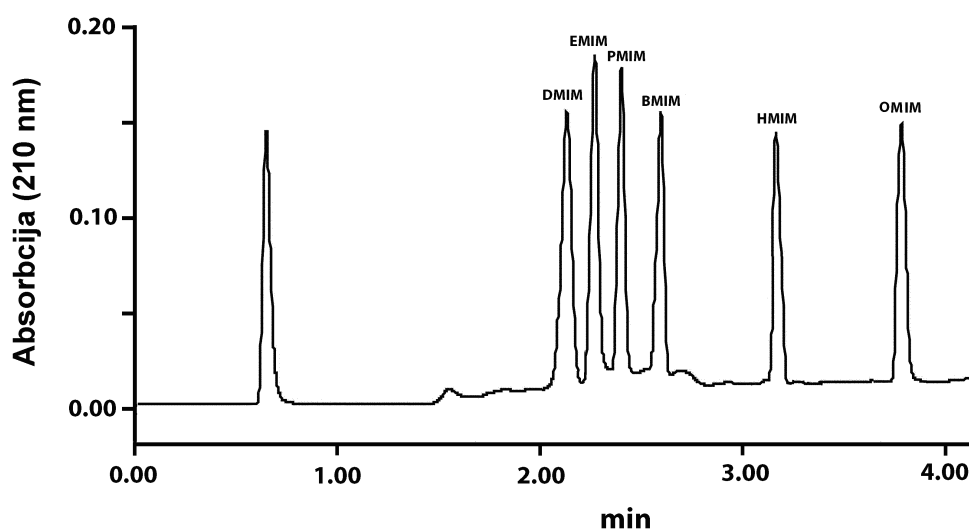
Tačiau dėl per didelės judrios fazės eliucinės gebos labiau poliniai junginiai yra silpnai sulaikomi ir beveik neatskiriami. Sumažinus ACN koncentraciją (ACN:H₂O 30:70 v/v) skiriamoji geba šiek tiek pagerėja, tačiau, dėl susilpnėjusios judrios fazės eliucinės jėgos, HMIM ir OMIM yra stipriai sulaikomi, o jų smailės smarkiai išsiplečia. Dar sumažinus ACN koncentraciją (ACN:H₂O 20:80 v/v), pasiekiamas pilnas visų šešių imidazolio katijonų atskyrimas. Tačiau šiuo atveju atskyrimo trukmė siekia maždaug 50 min (pilna chromatograma nepateikta).

Papildomai ištyrėme judrios fazės pH įtaka imidazolio katijonų sulaikymui. Judrios fazės pH buvo keičiamas intervale 3,0-7,0, naudojant fosforo rūgšties/amonio fosfato ir acto rūgšties/amonio acetato buferinius tirpalus (5 mmol/L). Nustatyta, kad judrios fazės pH beveik neturi įtakos imidazolio katijonų atskyrimo charakteristikoms. Visais atvejais analičių sulaikymo trukmių ir smailių efektyvumų pokyčiai buvo nereikšmingi (≤10 %). Todėl tolimesni tyrimai buvo atliekami nenaudojant buferinio tirpalo judrioje fazėje.

Iš 3.4 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad nors imidazolio katijonų atskyrimas izokratinės eliucijos režimu yra įmanomas, tačiau atskyrimo trukmė siekia 50 minučių, o stipriai sulaikomų analičių smailių efektyvumas yra labai blogas. Todėl, kaip ir AFCh, JPCh metode imidazolio katijonams atskirti taip pat būtina taikyti gradientinę eliuciją. Optimizavus gradientinės eliucijos sąlygas, visi tirti imidazolio katijonai yra atskiriami per 4 min (3.5 pav.). Stipriausiai sulaikomų hidrofobinių HMIM ir OMIM katijonų smailių efektyvumas pagerėjo beveik penkis kartus.

Būtina pažymėti, kad gradientinės eliucijos taikymas šiame metode komplikotas, kadangi sorbentas yra dinamiškai modifikuojamas jonų porų reagentu. Tokiu atveju, atskyrimo metu keičiant tirpiklių santykį, keičiasi ir sorbento paviršiuje adsorbuoto oktansulfonato kiekis. Todėl tarp atskyrimo ciklų būtina ilgiau kondicionuoti sorbentą pradine judria faze pusiausvyrai kolonėlėje pasiekti [135]. Priešingu atveju, analičių sulaikymo trukmės labai blogai atsikartoja. Papildomai buvo įvertintas analičių sulaikymo trukmių

atsikartojamumas ($n=6$) esant identiškoms gardientinės eliucijos sąlygoms ir skirtingai kolonėlės kondicionavimo tarp atskyrimo ciklų trukmei: 3, 5, 10 ir 15 min. Nustatyta, kad jau po 5 min pusiausvyra kolonėlėje nusistovi, o visų imidazolio katijonų sulaikymo trukmių santykiniai standartiniai nuokrypiai neviršija 0,2 %. Taigi, atliekant imidazolio katijonų atskyrimą JPCh metodu, tarp analizės ciklų mažiausiai 5 min būtina kondicionuoti kolonėlę, o viso atskyrimo ciklo trukmė siekia 10 min. Nors šiame darbe buvo naudojamas UV detektavimas, atsižvelgiant į pastaraisiais metais smarkiai populiarėjantį masių spektrometrinio detektoriaus taikymą, būtina įvardinti pagrindinį JPCh metodo trūkumą: jonų porų reagento panaudojimas yra nesuderinamas su masių spektrometriniu detektoriumi.



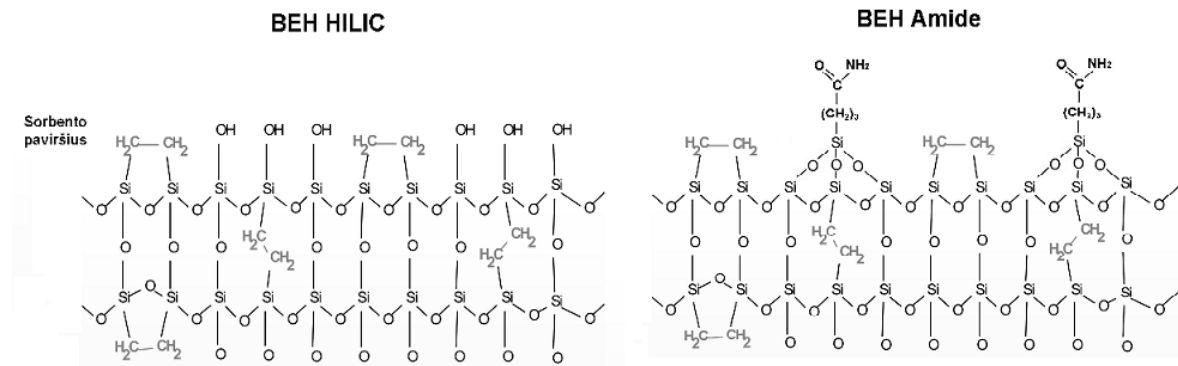
3.5 pav. Imidazolio katijonų atskyrimas JPCh metodu naudojant gradientinę eliuciją. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH C18. Judri fazė A: 1 mmol/L vandeninis NaOS tirpalas; judri fazė B: 1 mmol/L NaOS ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje. Linijinis gradientas: 15% →60% B per 4 min. Tėkmės greitis - 0,25 mL/min.

3.1.3. Hidrofilinės sąveikos chromatografija

Kaip buvo minėta literatūros apžvalgoje, HILIC metode atskyrimas vyksta ant polinių stacionarių fazių su mažiau poline judria faze (dažniausiai

vandens/acetonitrilo mišiniu). Tam, kad būtų užtikrinta hidrofiliinė sąveika, didžiąją dalį (>60 %) judrios fazės turi sudaryti ACN, o likusią – vanduo [89].

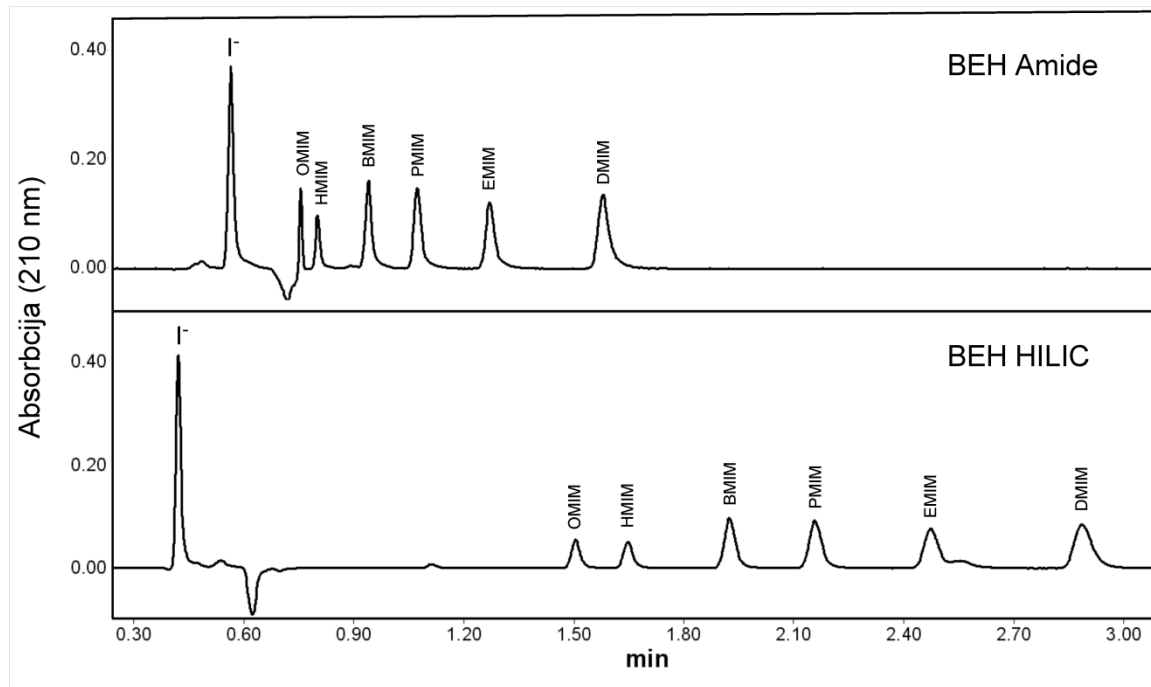
Imidazolio katijonams atskirti pasirinkome dvi HILIC metodui skirtas kolonėles. Acquity BEH HILIC kolonėlė užpildyta gryno silikagelio sorbentu, o Acquity BEH Amide – amido funkcinėmis grupėmis modifikuotu silikageliu. BEH sorbentuose dalis (~30 %) silanolinių ir siloksaninių funkcinų grupių yra pakeistos etileno tilteliais (**3.6 pav.**), todėl tokie sorbentai žymiai atsparesni hidrolizei aukštesnėse temperatūrose bei pasižymi platesniu darbinio pH intervalu.



3.6 pav. BEH HILIC ir BEH Amide sorbentų struktūros.

Sorbentams palyginti pasirinkome įprastinę HILIC metodui judrią fazę – 5 mmol/L amonio formiato buferį (pH 3,2) ACN:H₂O (90:10 v/v) mišinyje. Imidazolio katijonų standartinio mišinio chromatogramos palygintos 3.7 pav. Naudojant tiek amido, tiek silikagelio sorbentą imidazolio katijonai yra pilnai atskiriami izokratinės elucijos režime. Abiem atvejais gaunamas geras smailių simetriškumas ir efektyvumas. Tačiau silikagelio sorbentu imidazolio katijonai sulaikomi beveik dvigubai stipriau. Galimos kelios stipresnio sulaikymo priežastys. Nemodifikuotas silikagelis yra poliškesnis už amidu modifikuotą silikagelį, todėl jo paviršiuje gali susidaryti storesnis adsorbuoto vandens sluoksnis. Tai padidina sistemos fazių tūrių santykį, o tuo pačiu sustiprina analičių sulaikymą. Kita galima stipresnio sulaikymo priežastis - silikagelio sorbento

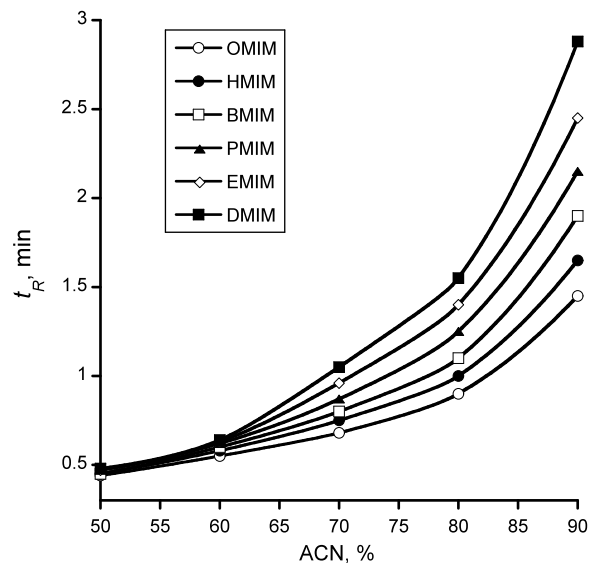
paviršiuje yra žymiai didesnis silanolinių grupių skaičius, todėl sustiprėja papildoma jonų mainų sąveika tarp katijoninių analičių ir disocijavusių silanolinių grupių. Atsižvelgiant į stipresnį sulaikymą, tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta BEH HILIC kolonėlė.



3.7 pav. Imidazolio katijonų mišinio atskyrimas HILIC metodu Acquity BEH HILIC ir Acquity BEH Amide kolonėlėse. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje. Tėkmės greitis - 0,5 mL/min.

3.8 pav. pateikta analičių sulaikymo trukmių priklausomybė nuo ACN/H₂O santykio judrioje fazėje. Siekiant eliminuoti buferio įtaką, tyrimas buvo atliekamas naudojant judrias fazes be buferio. Mažinant acetonitrilo koncentraciją judrioje fazėje, imidazolio katijonų sulaikymas silpnėja bei mažėja jų skiriamoji geba. Esant 50-60 % ACN koncentracijai analitės yra beveik nesulaikomos ir neatskiriamos. Rezultatai rodo, kad tiriamoje sorbentas/judri fazė sistemoje vanduo pasižymi stipresne nei ACN išstūmimo jėga. Tokia priklausomybė būdinga tiek HILIC, tiek ir normalių fazių adsorbcinės chromatografijos metodams. Tačiau perėjus prie 100 % ACN judrios fazės (rezultatai nepateikti),

analičių sulaikymo trukmės drastiškai sumažėjo (iki ~0,6-0,8 min). Jei atskyrimas vykėtų adsorbcinės normalių fazių chromatografijos mechanizmu, gryname acetonitrile analičių sulaikymas turėtų dar labiau sustiprėti. Tuo tarpu HILIC režime atskyrimas vyksta pasiskirstymo mechanizmu: silikagelio sorbento paviršiuje susidarantis adsorbuoto vandens sluoksnis atlieka skystos nejudrios fazės vaidmenį, o analitės atskiriamos dėka nevienodo jų pasiskirstymo tarp stacionaraus adsorbuoto vandens sluoksnio ir mažiau polinės judrios fazės. Taigi, visiškai pašalinus vandenį iš judrios fazės atskyrimo mechanizmas keičiasi iš HILIC į adsorbcinį, todėl drastiškai sumažėja imidazolio katijonų sulaikymo trukmės.

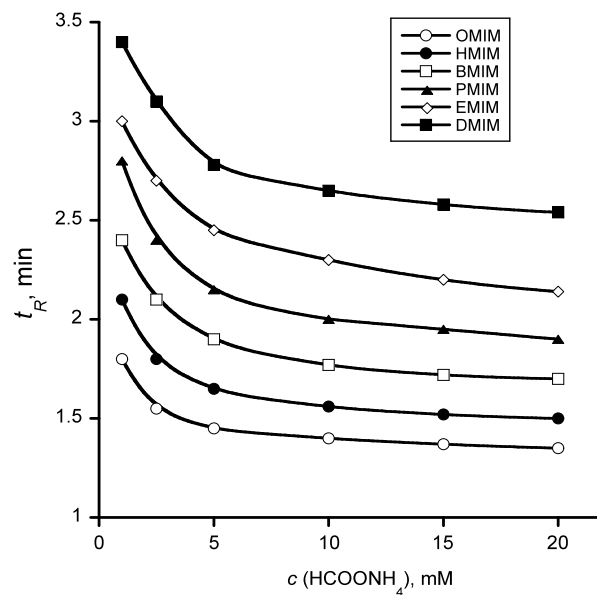


3.8 pav. Imidazolio katijonų sulaikymo trukmių priklausomybė nuo acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH HILIC. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Deja, nepriklausomai nuo ACN koncentracijos judrioje fazėje, visų analičių smailės labai išplitusios ir nesimetriškos. Tai susiję su papildoma jonų mainų sąveika tarp katijoninių analičių ir neigiamų silanolinių grupių. Nepageidautina jonų mainų sąveika susilpninama arba visiškai eliminuojama papildomai pridodant

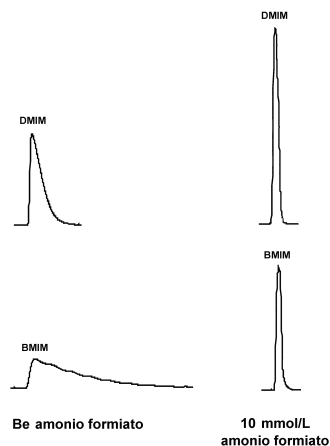
į judrią fazę elektrolito (dažniausiai amonio acetato arba formiato), jonų poras su katijoninėmis analitėmis sudarančio junginio ir/arba parūgštinant judrią fazę.

Toliau buvo tiriama amonio formiato (pH 3,2) koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų sulaikymui. Iš 3.9 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant amonio formiato koncentraciją analičių sulaikymas silpnėja. Ypač ryškus sulaikymo silpnėjimas nustatytas keičiant buferio koncentraciją intervale nuo 1 iki 5 mmol/L.



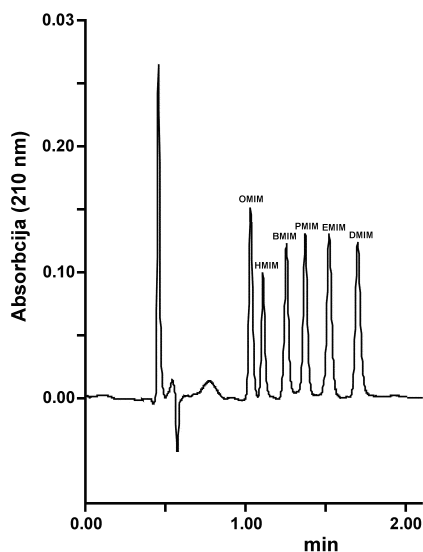
3.9 pav. Imidazolio katijonų sulaikymo trukmių priklausomybė nuo amonio formiato koncentracijos judrioje fazėje. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH HILIC. Judri fazė: skirtinga amonio formiato (pH 3,2) koncentracija ACN:H₂O 85:15 (v/v) mišinyje. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Be to amonio formiato priedas judrioje fazėje pagerino analičių smailių simetriškumą ir efektyvumą. Tai iliustruoja 3.10 pav. palygintos dviejų imidazolio katijonų smailės, gautos judrioje fazėje be buferio ir su 10 mmol/L amonio formiato priedu. Joninės jėgos didinimas susilpnina antrines elektrostazines sąveikas (pvz., jonų mainus) tarp analitės ir silanolinių grupių sorbento paviršiuje.



3.10 pav. Amonio formiato įtaka smailių efektyvumui.

Geriausias atskyrimas pasiektas naudojant 85:15 (v/v) ACN:H₂O judrią fazę su 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) buferio priedu (3.11 pav.). HILIC metodu izokratinėmis sąlygomis visi šeši imidazolio katijonai efektyviai atskiriami per 2 min.



3.11 pav. Imidazolio katijonų mišinio atskyrimas izokratinėmis sąlygomis HILIC metodu. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) ACN:H₂O (85:15 v/v) mišinyje. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

3.1.4. Metodų palyginimas

Atlikti tyrimai parodė, kad imidazolio katijonai gali būti atskiriami trimis skysčių chromatografijos variantais – AFCh, JPCh ir HILIC. Lyginant su anksčiau šia tema publikuotais darbais, galime konstatuoti, kad naudojant UESCh gaunami net iki 25 kartų greitesni bei žymiai efektyvesni atskyrimai, nei analogiškais ESCh variantais [82].

3.2 lentelėje palygintos optimizuotų UESCh metodų charakteristikos. Vienas iš pagrindinių AFCh ir JPCh metodų trūkumų yra smarkiai besiskiriantis nevienodo poliškumo analičių sąveikos su sorbentu stiprumas. Polinės analitės yra silpnai sulaikomos ir dažnai blogai atskiriamos, tuo tarpu hidrofobinės analitės yra sulaikomos labai stipriai, todėl šiems metodams būtinas gradientinės eliucijos režimas. Gradientinė eliucija labiau apsunkina operatoriaus darbą, jai reikalinga brangesnė įranga ir grynesni tirpikliai, be to šis metodas imlesnis klaidoms. Tačiau net ir gradientinės eliucijos režime imidazolio katijonų atskyrimo trukmės 3-5 kartus didesnės, o smailių efektyvumai nėra geresni nei juos atskiriant izokratinėmis sąlygomis HILIC metodu. Reikšmingas JPCh metodo trūkumas yra 2-3 kartus ilgesnis dinamiškai jonų porų reagentu modifikuojamo sorbento paruošimas analizei. Galiausiai, dėl mažai lakaus NaOS priedo judrioje fazėje JPCh metodas visiškai nesuderinamas su MS detektoriumi.

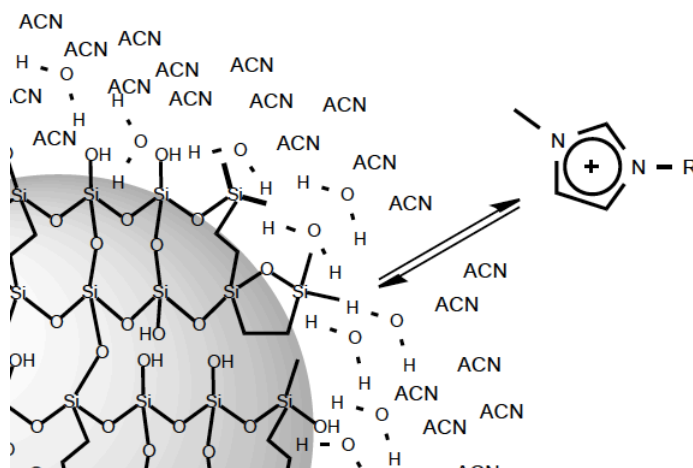
3.2 lentelė. Imidazolio katijonų atskyrimo ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodais palyginimas.

Metodas	Atskyrimo trukmė, min	Efektyvumas (teorinių lėkštelių skaičius N)	Trūkumai
AFCh	6 min	Labai geras (16000-20000)	Būtinasis gradientas.
JPCh	10 min	Geras (8000-12000)	Nesuderinamas su MS detektoriumi. Ilgas sorbento kondicionavimas prieš analizę (50-60 min). Būtinasis gradientas.
HILIC	2 min	Labai geras (17000-18000)	-

Akivaizdu, kad imidazolių katijonams atskirti tinkamiausias yra HILIC metodas. Be jau paminėtų privalumų reikėtų pažymėti, kad dėl puikaus judrios fazės lakumo (didelis kiekis ACN ir naudojami lakūs buferiniai tirpalai) šis metodas idealiai tinka apjungimui su MS detektoriais. Be to, žymiai mažesnė HILIC metode naudojamų judrių fazių klampa (daug ACN) leidžia greitinti atskyrimą didinant judrios fazės tekėjimo greitį.

3.2. Imidazolio katijonų chromatografinės elgsenos hidrofilinės sąveikos chromatografijoje tyrimas

Hidrofilinės sąveikos chromatografijoje analičių sulaikymo mechanizmas yra paremtas pasiskirstymu tarp judrios fazės ir dinamiškai imobilizuoto hidrofilinio vandens sluoksnio sorbento paviršiuje (3.12 pav.). Tačiau paskutiniu metu atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad HILIC sulaikymo mechanizmas yra žymiai sudėtingesnis. Be tradicinio pasiskirstymo tarp dviejų skysčių, analitės gali sąveikauti su sorbento paviršiumi susidarant vandeniliniam ryšiui, vykstant jonų mainams ir netgi hidrofobinei sąveikai. Kokia sąveika bus dominuojanti priklauso nuo analitės bei sorbento prigimties ir netgi nuo judrios fazės sudėties [112].



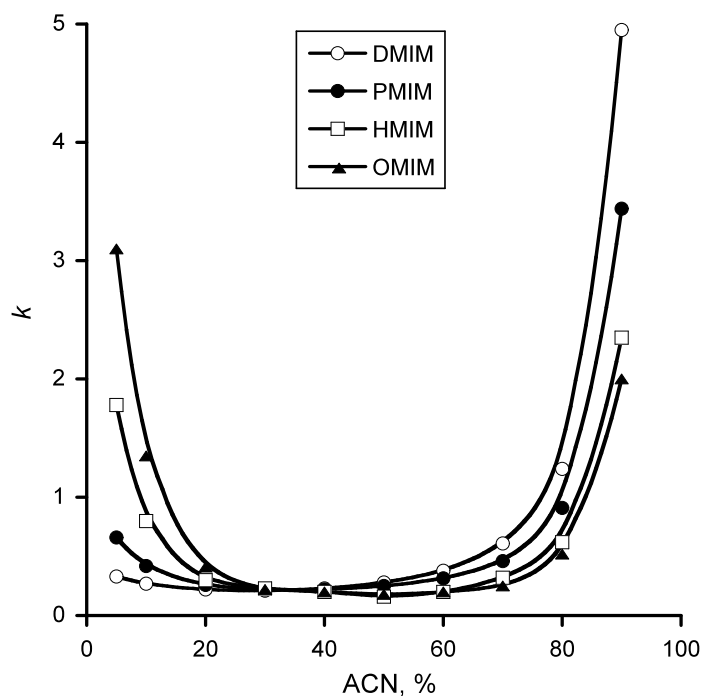
3.12 pav. Imidazolio katijonų atskyrimas ant BEH silikagelio sorbento HILIC metode pasiskirstymo mechanizmu.

Kitas svarbus faktas yra tai, kad sulaikymo mechanizmas HILIC metode nėra pastovus ir gali keistis keičiant eksperimento sąlygas. Ilgą laiką buvo manoma, kad kai vandens koncentracija HILIC judrioje fazėje padidinama iki $\geq 40\%$, analitės yra nebesulaikomos, nes sistemoje nebesusidaro dvi skirtingo poliškumo skystos fazės (stacionari adsorbuoto vandens ir judri H₂O/ACN). Tačiau neseniai buvo nustatyta, kad baziniams junginiams ant silikagelio sorbento būdinga taip vadinama „U“ formos sulaikymo trukmių nuo ACN/H₂O santykio judrioje fazėje priklausomybė [91]. Didinant H₂O koncentraciją, bazinių analičių sulaikymas silpnėja, pasiekia minimumą esant 50:50 H₂O:ACN (v/v), tačiau toliau didinant vandens kiekį analičių sulaikymas vėl pradeda stiprėti, bei pasikeičia analičių elucijos tvarka. Tai netipiškas atvejis, unikalus tuo, kad naudojant tą patį sorbentą ir keičiant tik judrios fazės tirpiklių santykį, analitės gali būti sulaikomos hidrofiliškumo stiprinimo (daug ACN) arba silpnėjimo (daug H₂O) tvarka. Tokią HILIC sistemą, kai naudojama vandeniui prisotinta judri fazė, Sandra su kolegomis pavadino vandenine skysčių chromatografija (angl. *per aqueous liquid chromatography*, PALC) [136]. Įvertinus tai, kad šis HILIC variantas apskritai dar nebuvo išsamiau tyrinėtas, buvo įdomu ištirti ir palyginti imidazolio katijonų chromatografinę elgseną hidrofiliškos sąveikos chromatografijoje, naudojant vandeniui prisotintą (PALC režimas) ir acetonitrilu prisotintą (tradicinis HILIC režimas) judrias fazes. Šiame darbo etape tyrimai buvo atliekami su visais dvylika komerciškai prieinamų imidazolio grupės joninių skysčių (1.1 lentelė). Tyrimams buvo naudotas BEH HILIC hibridinis silikagelio sorbentas (3.6 pav.).

3.2.1. Acetonitrilo koncentracijos įtaka

Pirmiausiai ištyrėme ACN:H₂O santykio judrioje fazėje įtaką imidazolio katijonų sulaikymui. ACN kiekis vandenyje buvo keičiamas nuo 5 % iki 90 % (v/v). Elektrostatinių sąveikų tarp imidazolio katijonų ir disocijavusių silanolinių grupių susilpninimui, į judrią fazę buvo pridėdama 5 mmol/L amonio formiato

(pH 3,2) buferio. Analičių sulaikymas buvo vertinamas sulaikymo faktoriumi k (žiūr. darbo metodinėje dalyje), kuris geriau charakterizuoja sistemą lyginant atskirumus skirtinguose režimuose. Siekdami išvengti papildomo chromatografinių zonų išsiplėtimo dėl tirpiklių nesuderinamumo, analites tirpinome ACN:H₂O mišiniuose, atitinkančiuose konkrečios judrios fazės sudėtį. Tyrimo rezultatai keturiems imidazolio katijonams pavaizduoti 3.13 pav. Analogiškos priklausomybės nustatytos ir likusioms analitėms. Gauta „U“ formos sulaikymo faktorių priklausomybė nuo tirpiklių tūrių santykio judrioje fazėje.



3.13 pav. Acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų sulaikymui. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiatas (pH 3,2) ACN:H₂O mišinyje. Tėkmės greitis - 0,5 mL/min.

Kaip jau buvo parodyta ankstesniame skyriuje, didinant ACN kiekį HILIC režime (≥ 50 % ACN) analičių sulaikymas tolygiai stiprėja. Šioje srityje imidazolio katijonai sulaikomi hidrofiliškumo stiprėjimo tvarka, o vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga už acetonitrilą. Tai ir yra pagrindinis atskyrimo HILIC mechanizmu požymis. Kai ACN koncentracija judrioje fazėje sumažinama

iki ~30-50 %, analitės tampa beveik nesulaikomos ir neatskiriamos. Toliau mažinant ACN kiekį (PALC režimas), katijonų sulaikymas vėl pradeda stiprėti. Įdomu tai, kad kai ACN koncentracija judrioje fazėje mažesnė už 30 %, pasikeičia analičių elucijos tvarka bei judrios fazės tirpiklių išstūmimo jėga. Šioje srityje ACN išstūmimo jėga jau stipresnė už vandens, o analičių sulaikymas stiprėja, stiprėjant jų hidrofobiškumui. Tai rodo, kad PALC režime pasikeitė analičių sąveikos su sorbentu mechanizmas. Greičiausiai iš hidrofilinės sąveikos jis pasikeičia į hidrofobinę sąveiką.

Norėdami detaliau išsiaiškinti adsorbcijos ar pasiskirstymo mechanizmas lemia imidazolio katijonų sulaikymą PALC ir HILIC sąlygose, gautų rezultatų analizei pritaikėme pasiskirstymo ir adsorbcijos modelius. Yra nustatyta [137, 138] kad, jei sulaikymo mechanizmas yra paremtas (idealiomis sąlygomis) tik pasiskirstymu, sulaikymas aprašomas lygtimi:

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (3.1)$$

kur k – analitės sulaikymo faktorius; k_w – silpnesne eliuoje arba pasižymintio judrios fazės tirpiklio sulaikymo faktorius, φ - stipresne eliuoje arba pasižymintio tirpiklio tūrio dalis judrioje fazėje, S - tiesinės $\log k$ priklausomybės nuo φ polinkio koeficientas [139].

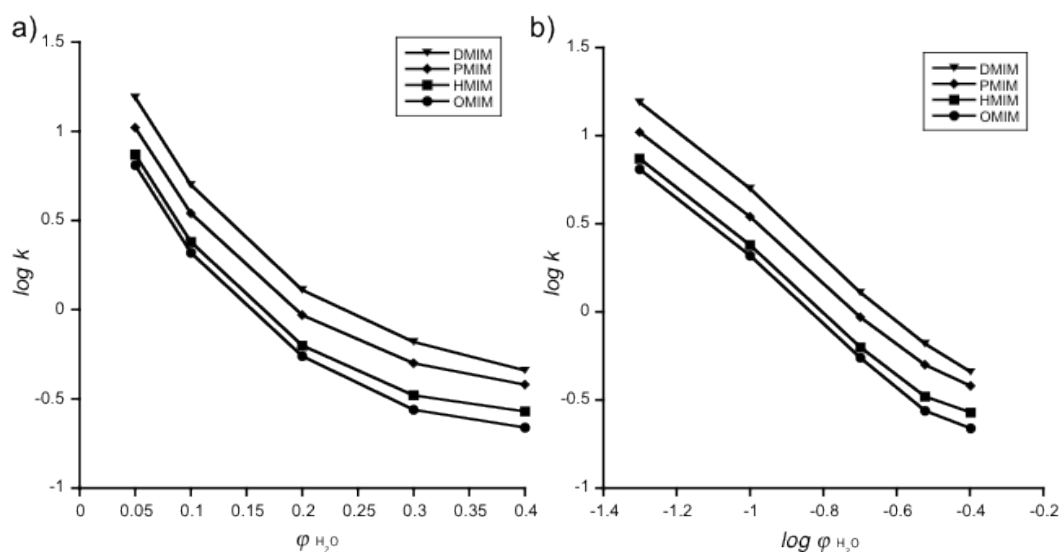
Jei analičių sulaikymas vyksta tik adsorbcijos mechanizmu, jis aprašomas analitės sulaikymo priklausomybe nuo stipresne eliuoje arba pasižymintio tirpiklio B tūrio dalies φ judrioje fazėje, išreikšta lygtimi:

$$\log k = \log k_B - \frac{A_s}{n_B} \log \varphi \quad (3.2)$$

kur k – analitės sulaikymo faktorius; k_B – analitės sulaikymo faktorius esant tik tirpikliui B judrioje fazėje, φ - stipresne eliuoje arba pasižymintio tirpiklio tūrio dalis judrioje fazėje, A_s ir n_B – sorbento paviršiaus plotai, kuriuos atitinkamai užima adsorbuota analitės molekulė ir tirpiklio B molekulė [139].

Tiesinės $\log k$ priklausomybės nuo φ rodo analičių sulaikymą pasiskirstymo mechanizmu, o tiesinės $\log k$ priklausomybės nuo $\log \varphi$ – sulaikymą adsorbciniu mechanizmu.

3.14 pav. pateiktos abiejų tipų priklausomybės, gautos keturiems imidazolio katijonams HILIC sąlygose, kur stipresne eliuicine gėba pasižymi H₂O. Nors literatūroje dominuojantis analičių sulaikymo mechanizmas HILIC metode yra priskiriamas pasiskirstymui, tyrimo rezultatai imidazolio katijonams to nepatvirtino (gautos netiesinės $\log k - \varphi_{H_2O}$ priklausomybės 3.14a pav.).

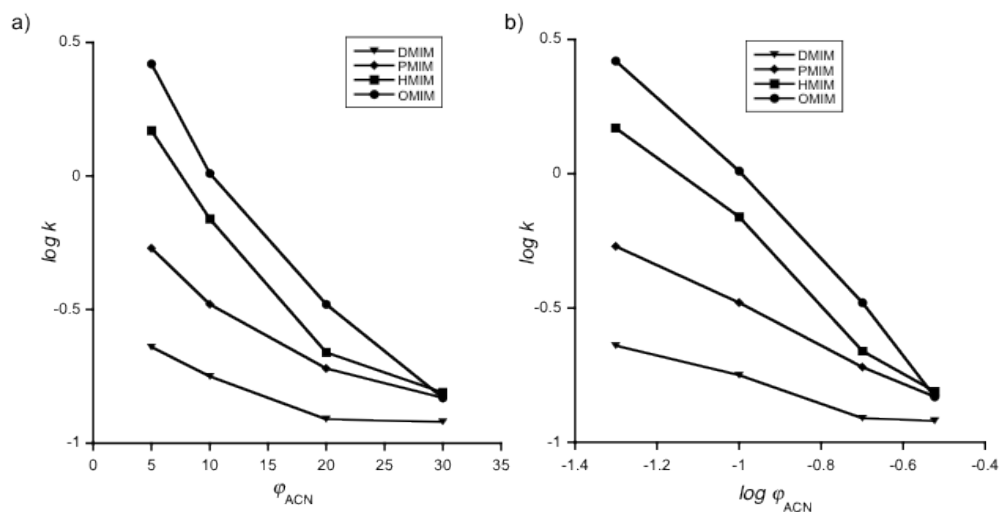


3.14 pav. Imidazolio katijonų sulaikymo ($\log k$) priklausomybės nuo vandens tūrio dalies φ (a) ir nuo $\log \varphi$ (b) judrioje fazėje HILIC sąlygose.

Be to (3.14b pav.), esant palyginti mažam vandens kiekiui (5-20 %) judrioje fazėje, gaunamos tiesinės $\log k - \log \varphi$ priklausomybės ($R \geq 0,996$), liudijančios apie šiose sąlygose dominuojančius adsorbcijos procesus.

Labai panašūs rezultatai gauti ir PALC sąlygose, kur stipresne eliuicine gėba pasižymi ACN (3.15 pav.). Ir šiuo atveju abiem sulaikymo modeliams gautos priklausomybės rodo sulaikymą mišriu mechanizmu, kuriame dominuoja adsorbciniai procesai. Taigi, tiek HILIC, tiek ir PALC sąlygose imidazolio

katijonų sulaikymas negali būti aprašytas nei grynu pasiskirstymo, nei grynu adsorbciniu mechanizmu.



3.15 pav. Imidazolio katijonų sulaikymo ($\log k$) priklausomybės nuo ACN tūrio dalies φ (a) ir nuo $\log \varphi$ (b) judrioje fazėje PALC sąlygose.

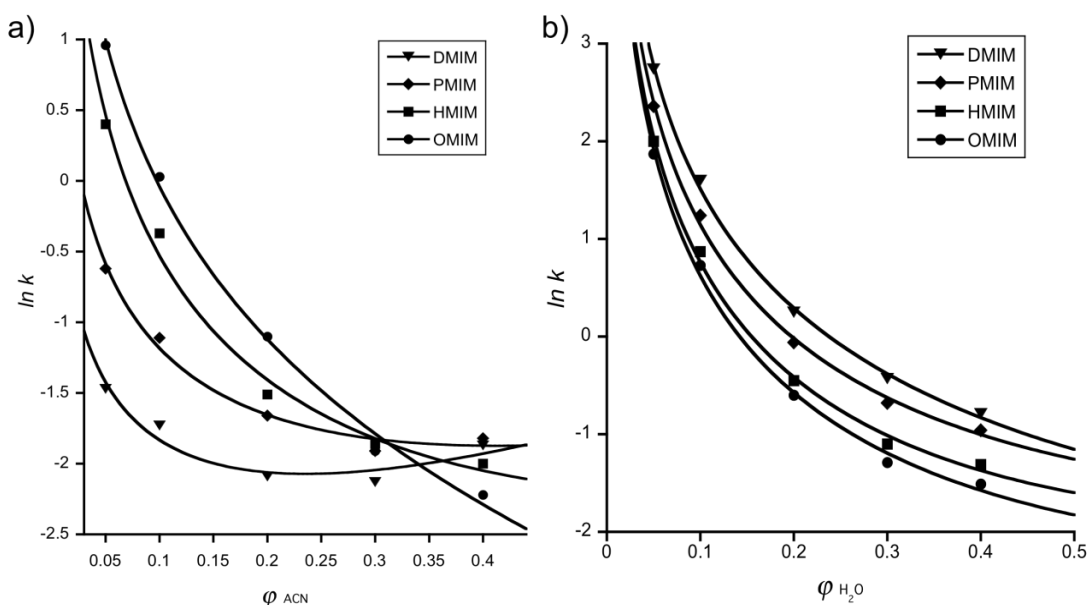
Neseniai Liang su bendraautorais [93] analičių sulaikymui HILIC metode aprašyti pasiūlė išplėstinę lygtį:

$$\ln k = a + b \ln \varphi + c \varphi \quad (3.3)$$

kur φ - stipresne eliuoje gaba pasižymintio tirpiklio tūrio dalis judrioje fazėje; a - konstanta, susijusi su molekulinio analitės tūriu; b – koeficientas, aprašantis tiesioginę analitės ir sorbento sąveiką; c – koeficientas, aprašantis analitės ir judrios fazės sąveiką.

Šis modelis apjungia ir analitė – judri fazė, ir analitė – sorbentas sąveikas bei įvertina jų indėlį analičių sulaikymui, todėl geriau aprašo mišriu mechanizmu vykstantį atskyrimą. 3.16 pav. pateiktos sulaikymo faktoriaus priklausomybės nuo stipresnio eliuojo tūrio dalies judrioje fazėje keturiems imidazolio katijonams, aproksimuotos pagal 3.3 lygtį HILIC ir PALC metodams. Apskaičiuotos lygties koeficientų (a , b ir c), aprašančių atitinkamas analičių sąveikas, vertės ir gautų $\ln k$ priklausomybių nuo stipresnio eliuojo judrioje fazėje dalies koreliacijos

koeficientai pateikti 3.3 lentelėje. Iš gautų rezultatų matome, kad 3.3 lygtis gerai aprašo analičių sulaikymą tiek PALC, tiek ir HILIC režime. Visiems 12-ai katijonų, išskyrus DMIN PALC režime, koreliacijos koeficientai $R \geq 0,996$.



3.16 pav. Sulaikymo faktoriaus ($\ln k$) priklausomybės nuo stipresnio eliuento tūrio dalies judrioje fazėje, aproksimuotos pagal 3.3 lygtį PALC (a) ir HILIC (b) metodams.

3.3 lentelė. Išplėstinės lygties (3.3) koeficientų (a, b ir c), aprašančių analitės sąveikas vertės ir $\ln k$ priklausomybių nuo stipresnio eliuento tūrio dalies judrioje fazėje koreliacijos koeficientai.

Imidazolio katijonas	HILIC				PALC			
	a	b	c	R	a	b	c	R
DMIM	-2,965	-1,901	0,982	0,9995	-4,151	-0,850	3,608	0,9788
PMIM	-3,503	-1,941	1,804	0,9994	-3,842	-1,045	2,529	0,9965
HMIM	-4,114	-2,020	2,230	0,9991	-4,460	-1,605	2,350	0,9974
OMIM	-4,207	-2,012	1,972	0,9991	-3,244	-1,430	-0,888	0,9991

Apibendrinant pateiktus rezultatus galime konstatuoti, kad imidazolio katijonai ir HILIC, ir PALC sąlygose yra sulaikomi mišriu mechanizmu.

Silikagelio paviršiuje susidarantis vandens sluoksnis neapsaugo nuo tiesioginės analitės sąveikos su sorbentu. Imidazolio katijonai gali prasiskverbti per vandens sluoksnį ir tiesiogiai sąveikauti su silikagelio paviršiumi. Atsižvelgdami į tai, kad mūsų analizė turi teigiamą krūvį, o stacionarios fazės paviršiuje yra silanolinių grupių, galime daryti išvadą, kad imidazolio katijonų sulaikymui HILIC ir PALC metodais gali turėti įtakos ir joninės sąveikos. Tolimesnis tyrimas skirtas išsiaiškinti jonų mainų įtaką imidazolio katijonų sulaikymui abiejuose methoduose (PALC ir HILIC).

3.2.2. Judrios fazės pH įtaka

Yra žinoma, kad atskiriant organinius katijonus atvirkščių fazių chromatografijos metodu, dėl sorbento silanolinių grupių jonizacijos slopinimo, žymiai geresnis smailių efektyvumas ir simetriškumas pasiekiamas su parūgštintomis judriomis fazėmis [92]. Judrios fazės pH įtaka imidazolio katijonų chromatografinėi elgsenai buvo tiriama PALC (2,5% ACN) ir HILIC (90% ACN) režimuose esant dviem judrios fazės pH vertėms – 3,2 (5 mmol/L amonio formiato buferinis tirpalas) ir 6,5 (5 mmol/L amonio acetato buferinis tirpalas). Tyrimų rezultatai visiems dvylikai imidazolio katijonų susisteminti 3.4 lentelėje. PALC režime su neutralia (pH 6,5) judria faze duomenys OMIM katijonui nepateikti, kadangi šiose sąlygose jis stipriai sulaikomas, jo smailė labai išplitusi, todėl kompiuterinė programa neskaičiavo reikiamų charakteristikų.

Tyrimų rezultatai rodo, kad tiek PALC, tiek ir HILIC sąlygose, imidazolio katijonų sulaikymas stipresnis esant didesnei judrios fazės pH vertei. Didinant judrios fazės pH, sorbento paviršiuje esančios silanolinės grupės deprotonizuojasi, dėl to jo paviršiuje padidėja neigiamų krūvių tankis ir sustiprėja jonų mainų sąveika. Tačiau palyginę abu metodus matome, kad HILIC režime padidinus judrios fazės pH, analičių sulaikymo faktoriai padidėjo ~1,6–1,8 kartus, kai tuo tarpu PALC režime esant pH 6,5 analičių sulaikymo faktoriai net ~3,5–5,0 kartus

didesni nei esant pH 3,2. Akivaizdu, kad HILIC režimas mažiau jautrus pH pokyčiams ir tai, greičiausiai, susiję su žymiai didesne ACN koncentracija judrioje fazėje HILIC metode. Skysčių chromatografijoje įprasta matuoti judrios fazės vandeninės dalies pH, o išmatuotą vertę pateikti kaip galutinės judrios fazės (su atitinkamo organinio tirpiklio priedu) pH. Be abejo, pridėjus į vandeninį buferio tirpalą organinio tirpiklio, gauto mišinio reali pH vertė pasikeičia. Kuo didesnis organinio tirpiklio kiekis judrioje fazėje, tuo smarkiau pasikeičia galutinės judrios fazės pH vertė [140, 141]. Taigi, dėl nevienodos ACN koncentracijos PALC ir HILIC judriose fazėse, jų realus pH taip pat turėjo skirtis. Be to, silikagelio sorbento silanolinių grupių pK_a vertė taip pat priklauso nuo kontaktuojančio su juo tirpalo sudėties: jam kontaktuojant su ACN prisotinta judria faze pK_a bus didesnė nei kontaktuojant su analogiška vandenine judria faze.

3.4 lentelė. Imidazolio katijonų chromatografinės charakteristikos* nustatytos PALC ir HILIC metoduose esant dviem judrios fazės pH vertėms.

Analitės	PALC						HILIC					
	pH 3,2			pH 6,5			pH 3,2			pH 6,5		
	k	N	A_s	k	N	A_s	k	N	A_s	k	N	A_s
CMMIM	0,2	5100	1,2	1,0	4200	1,3	3,2	18100	1,2	5,4	17500	0,9
HEMIM	0,3	5200	1,4	1,4	4800	1,5	5,3	17600	1,2	9,2	16800	1,3
DMIM	0,4	5500	1,4	1,9	4800	1,5	4,6	18800	1,2	7,7	17200	1,3
EMIM	0,6	5200	1,5	2,8	4500	1,7	3,8	20000	1,1	6,3	18900	1,1
TMIM	0,6	5100	1,5	2,7	4700	1,8	4,2	18900	1,2	6,9	18100	1,1
PMIM	1,0	4400	1,8	3,9	4100	2,1	3,2	19400	1,1	5,3	18300	1,0
EDMIM	1,0	4500	1,8	4,0	3800	2,2	3,5	18500	1,1	5,9	18300	1,1
BMIM	1,5	4300	2,0	5,8	2500	2,7	2,7	19000	1,1	4,5	17900	1,0
DMPIM	1,5	3900	2,1	5,9	2700	2,6	3,0	18600	1,0	4,9	18100	1,0
BDMIM	2,2	3600	2,1	8,3	2100	3,3	2,5	18200	1,0	4,4	17400	0,9
HMIM	3,2	2100	2,4	10,	860	3,9	2,1	19500	1,0	3,6	18700	0,9
				2								
OMIM	7,3	1200	2,9	-	-	-	1,9	18500	0,9	3,1	17200	0,9

*sulaikymo faktorius (k), efektyvumas (N) ir smailių asimetriškumo faktorius (A_s)

Be abejo, jonų mainų įtaka bazinių junginių sulaikymui priklauso ne tik nuo silanolinių grupių jonizacijos laipsnio, bet ir nuo pačios analitės krūvio. Todėl visai tikėtina, kad dėl mažesnės dielektrinės konstantos HILIC judrioje fazėje sustiprėja analičių asociacija su buferio anijonais, sumažinanti efektyvų jų krūvį.

Iš lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad PALC režime judrios fazės pH įtakoja imidazolio katijonų smailių efektyvumą bei simetriškumą: padidinus judrios fazės pH, visų analičių smailių efektyvumas sumažėjo, o asimetriškumo faktoriai padidėjo. Tačiau ryškus smailių efektyvumo/simetriškumo kitimas registruojamas ir esant tai pačiai judrios fazės pH vertei. Pavyzdžiui, esant pH 3,2 silpniausiai sulaikomo CMIM efektyvumas siekia 5100 teorinių lėkštelių, o A_s -1,2, tuo tarpu stipriausiai sulaikomo OMIM – efektyvumas tik 1200 teorinių lėkštelių, o A_s – 2,9. Analogiška tendencija nustatyta ir neutralioje judrioje fazėje. Taigi akivaizdu, kad smailių efektyvumas/simetriškumas PALC režime priklauso ne nuo judrios fazės pH, bet nuo analičių sulaikymo stiprumo. Tai patvirtino papildomas eksperimentas, kurio metu PALC režime matavome pasirinktų analičių smailių efektyvumus/asimetriškumus esant pH 3,2 ir 6,5 taip parinktose judriose fazėse (t.y. keisdami ACN:H₂O santykį judrioje fazėje), kad tos pačios analitės sulaikymo faktoriai esant skirtingoms pH vertėms reikšmingai nesiskirtų. Nustatėme, kad šiuo atveju tai pačiai analitei esant skirtingoms pH vertėms gauti smailių efektyvumai ir asimetriškumo faktoriai buvo panašūs arba netgi truputį geresni neutralioje judrioje fazėje. Tai įrodo, kad skirtingą imidazolio katijonų smailių efektyvumą/asimetriškumą PALC sąlygomis, esant skirtingoms judrios fazės pH vertėms, lemia mėginio perkrova kolonėlėje, kuri žymiai stipriau pasireiškia esant didesniems analičių sulaikymo faktoriams. Toks pat efektas buvo nustatytas atskiriant bazinius junginius AFCh metodu [142].

HILIC sąlygose visų analičių smailės pasižymėjo puikiu efektyvumu ir simetriškumu tiek neutralioje, tiek rūgščioje judriose fazėse. Labiau hidrofobinių (silpniau sulaikomų) katijonų smailės buvo su labai nežymiai išplitusiu frontu, tuo

tarpu stipriau sulaikomų hidrofiliškesnių katijonų smailės turėjo nedideles „uodegas“.

3.2.3. Buferinio tirpalo koncentracijos įtaka

Chromatografinio atskyrimo, pagrįsto jonų mainų sąveika, metu analičių sulaikymas silpnėja didinant druskos (tiksliau, konkuruojančio jono) koncentraciją judrioje fazėje. Sulaikymo faktoriaus priklausomybė nuo konkuruojančio jono koncentracijos judrioje fazėje katijoninėms analitėms jonų mainų chromatografijoje aprašoma lygtimi:

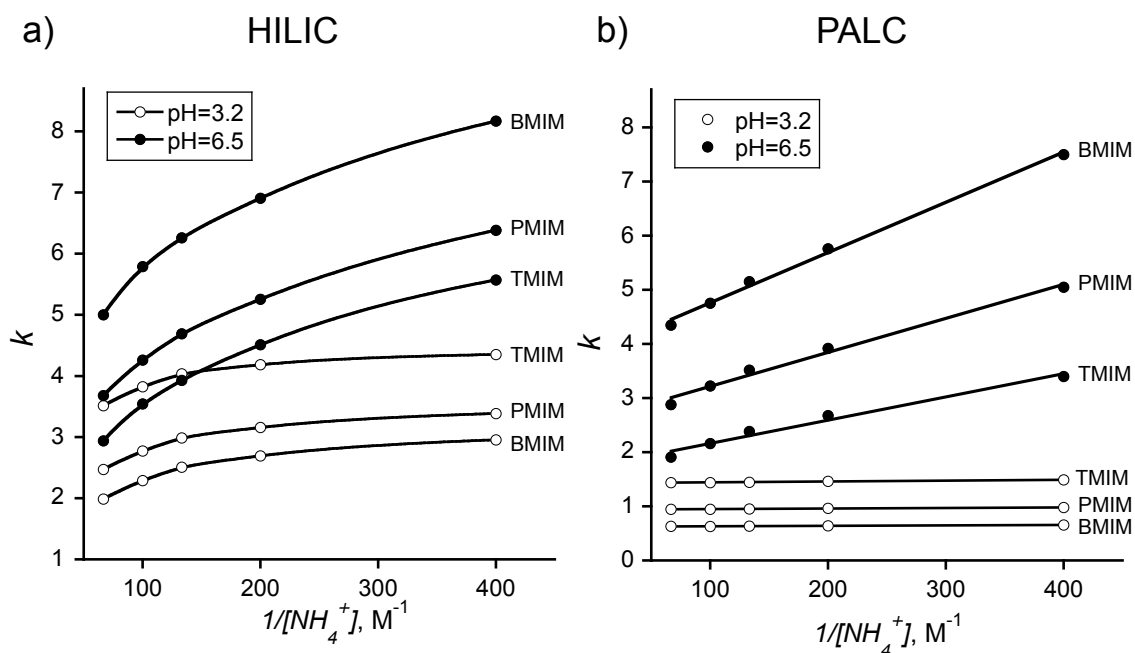
$$k = const \cdot \frac{1}{[X^+]} \quad (3.4)$$

kur $[X^+]$ - konkuruojančio katijono koncentracija judrioje fazėje; *const* – konkrečiai chromatografinėi sistemai pastovus dydis, į kurį įeina sorbento jonų mainų talpa bei analitės/konkuruojančio jono jonų mainų pusiausvyros konstanta.

Jonų mainų įtaka joninių analičių sulaikymui chromatografijoje įvertinama analitės sulaikymo faktoriaus priklausomybe nuo konkuruojančio jono koncentracijos judrioje fazėje atvirkštinio dydžio. Jei atskyrimas vyksta tik jonų mainų mechanizmu, tuomet ši priklausomybė turėtų būti tiesė, einanti per koordinacių pradžia, o gautos tiesės polinkis yra proporcingas jonų mainų pusiausvyros konstantai ir krūvį turinčių centrų (nagrinėjamu atveju – disocijavusių silanolinių grupių) skaičiui stacionarios fazės paviršiuje. Tiesė, einanti ne per koordinacių pradžia, rodo, kad analitė sulaikoma mišriu mechanizmu [143, 144]. Jei didinant konkuruojančio jono koncentraciją judrioje fazėje, analičių sulaikymas nesilpnėja, jonų mainai sulaikymo procese apskritai nevyksta.

Siekiant išsiaiškinti jonų mainų indėlį imidazolio katijonų sulaikymui, buvo ištirta buferinio tirpalo katijonų - amonio jonų - koncentracijos įtaka analičių

sulaikymui. Dvylika imidazolio katijonų buvo tiriami PALC ir HILIC metodais esant skirtingoms judrios fazės pH (pH 3,2 ir 6,5) vertėms, keičiant $[\text{NH}_4]^+$ koncentraciją judrioje fazėje nuo 2,5 iki 15 mmol/L. 3.17 pav. pavaizduota amonio jonų koncentracijos judrioje fazėje įtaka trijų imidazolio katijonų (BMIM, MPIM, TMIM) sulaikymo faktoriams.



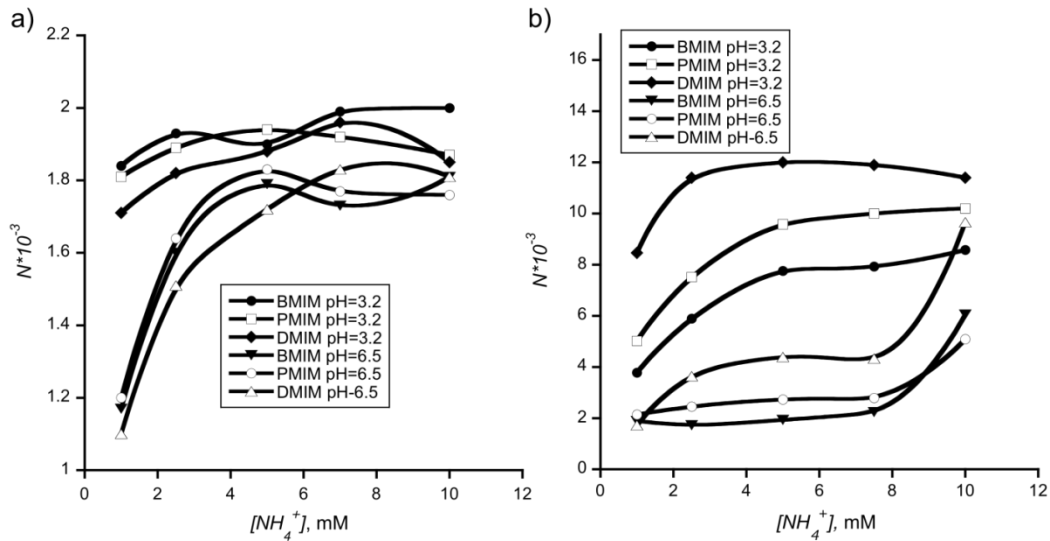
3.17 pav. Amonio jonų koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų sulaikymo faktoriams HILIC (a) ir PALC (b) sąlygomis. Judri fazė: PALC (2,5% ACN); HILIC (90% ACN); amonio formiato buferis (pH 3,2), amonio acetato buferis (pH 6,5). Tėkmės greitis - 0,5 mL/min.

Visais atvejais didinant $[\text{NH}_4]^+$ katijono koncentraciją judrioje fazėje, analičių sulaikymas silpnėjo. Tai rodo, kad imidazolio katijonų sulaikymo procese vyksta jonų mainai. Tačiau iš gautų rezultatų matyti sulaikymo mechanizmo skirtumai PALC ir HILIC sąlygose. PALC metode esant abiem pH vertėms gautos tiesinės priklausomybės ($R \geq 0,988$) (3.17b pav.). Abiem atvejais tiesės eina ne per koordinacių pradžių. Vadinasi PALC sąlygose analičių sulaikymą lemia ne tik jonų mainai. Greičiausiai tai yra hidrofobinės ir jonų mainų sąveikų mišinys. Be to, 3.17b pav. matyti, kad rūgščioje judrioje fazėje (pH 3,2)

konkuruojančio jono koncentracijos įtaka sulaikymui jau labai nežymi. Tai logiška, kadangi sumažinus judrios fazės pH, protonizuojantis silanolinėms grupėms, jonų mainų įtaka neišvengiamai susilpnėja. Šiuo atveju analičių sulaikymo procese dominuojantis mechanizmas yra hidrofobinė sąveika.

HILIC sąlygomis abiem atvejais gautos išgaubtos priklausomybės (3.17a pav.). Žymiai didesnės sulaikymo faktoriaus vertės, gautos neutralioje judrioje fazėje (pH 6,5), rodo, kad ir šiuo atveju jonų mainai ženkliai įtakoja imidazolio katijonų sulaikymą. Tuo tarpu kai judrios fazės pH=3,2, jonų mainų įtaka analičių sulaikymui silpnesnė. Netiesinės priklausomybės rodo, kad HILIC sąlygose atsiranda papildomas sulaikymą įtakojantis veiksnys. Reikėtų atsižvelgti, kad esant didelei ACN koncentracijai judrioje fazėje, sumažėja judrios fazės dielektrinė konstanta, sustiprinanti jonų porų sąveikas judrioje fazėje. HILIC režime, didinant buferio koncentraciją judrioje fazėje, sustiprėja asocijacija tarp buferio anijono ir analičių katijonų, sumažinanti analičių krūvį, o tuo pačiu ir jų sulaikymą.

Trijų imidazolio katijonų smailių efektyvumo priklausomybė nuo $[\text{NH}_4]^+$ koncentracijos PALC ir HILIC metoduose pavaizduota 3.18 pav. HILIC sąlygose smailių efektyvumas esant skirtingoms pH vertėms reikšmingai nesiskyrė ($\leq 15\%$), todėl galima teigti, kad $[\text{NH}_4]^+$ koncentracija nėra svarbus veiksnys atskyrimo efektyvumui šiame metode. Priešingai PALC metode, abiem atvejais didinant $[\text{NH}_4]^+$ koncentraciją, smailių efektyvumas didėjo. Mažiau rūgščioje judrioje fazėje druskos koncentracijos įtaka efektyvumui buvo žymiai stipresnė. Padidinus amonio koncentraciją intervale 2,5-15 mmol/L (pH 6,5), smailių efektyvumas padidėjo maždaug 3-4 kartus. Tuo tarpu padidinus amonio jonų koncentraciją tose pačiose ribose esant pH 3,2, smailių efektyvumas padidėjo tik 1,3-1,6 kartus.



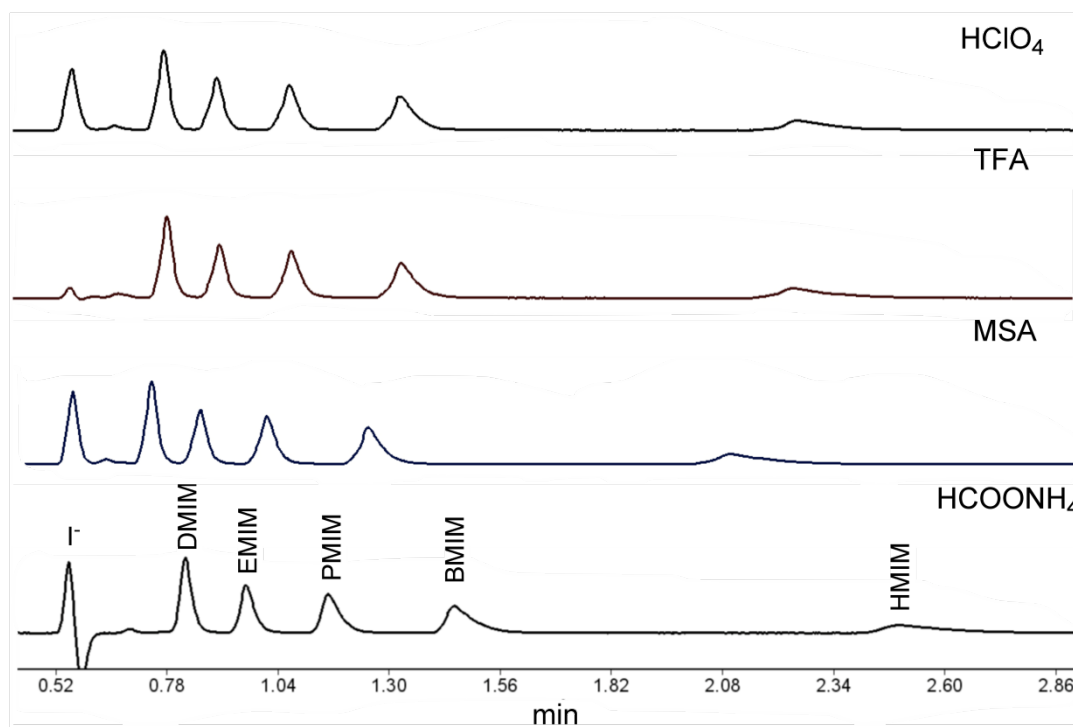
3.18 pav. $[NH_4^+]$ jonų koncentracijos judrioje fazėje įtaka imidazolio katijonų smailių efektyvumui.

3.2.4. Rūgšties priedų įtaka imidazolio katijonų sulaikymui

Skysčių chromatografijoje katijoninių analičių sulaikymui ant atvirkščių fazių sorbentų sustiprinti bei jų smailių efektyvumui pagerinti į judrią fazę dažnai dedamos rūgštys [92]. Dažniausiai šiuo tikslu naudojamos judrios fazės su $HClO_4$ arba TFA rūgščių priedais [130, 131]. Rūgštys slopina silanolinių grupių disociaciją tuo pagerindamos organinių katijonų smailių efektyvumą. Be to, rūgšties anijonas veikia kaip jonų porų reagentas judrioje fazėje, dėl to padidėja organinių katijonų hidrofobiškumas ir sustiprėja jų sulaikymas [132, 145]. PALC sąlygomis, kaip ir AFCh, analitės sulaikomos hidrofobiškumo stiprėjimo tvarka, todėl buvo įdomu įvertinti rūgščių įtaką šiame, dar netyrinėtame režime.

Tyrimams naudojome 1 mmol/L ir 10 mmol/L koncentracijų MSA, TFA ir $HClO_4$ rūgščių priedus. 3.19 pav. palygintas penkių imidazolio katijonų atskyrimas PALC sąlygose naudojant atitinkamų rūgščių 10 mmol/L koncentracijos priedą judrioje fazėje. Deja, laukto analičių sulaikymo sustiprėjimo efekto nenustatėme. Lyginant su duomenimis, gautais analogiškose sąlygose amonio formiato buferyje (pH 3,2), visos trys rūgštys (1 mmol/L) sumažino

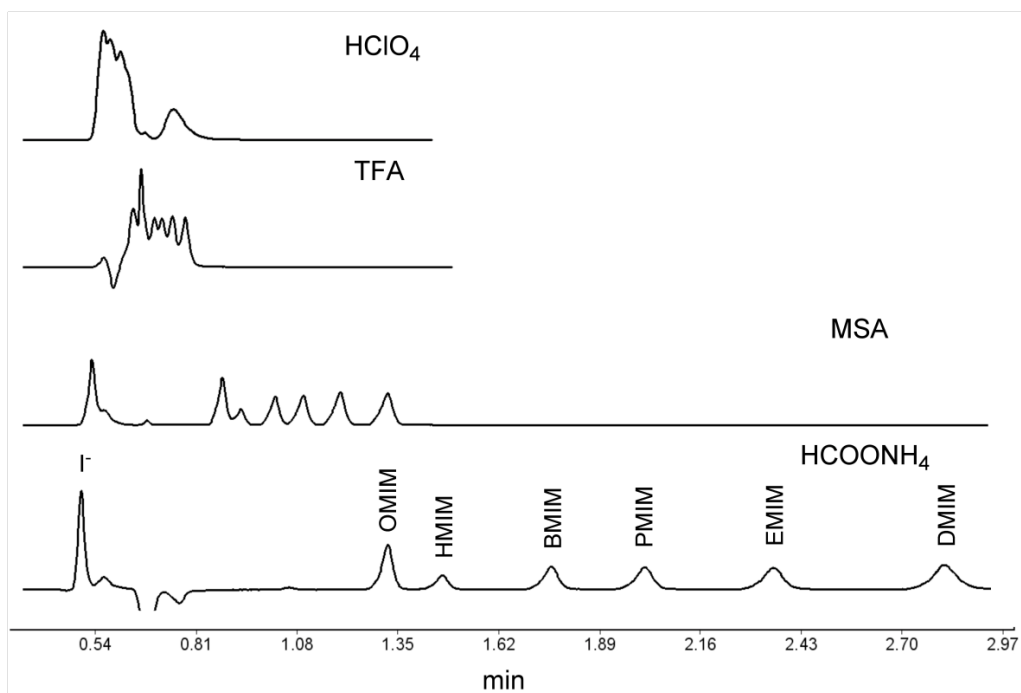
analičių sulaikymo trukmes maždaug 40-50 %. Tai sietina su silanolinių grupių protonizacijos sustiprėjimu. Nežymiai stipresnis analičių sulaikymas (~20-30 %) nustatytas pridėjus į judrią fazę 10 mmol/L atitinkamos rūgšties priedo. Tai rodo, kad jonų porų tarp rūgšties anijono ir imidazolio katijonų susidarymas vyksta tik labai nežymiai.



3.19 pav. Rūgšties prigimties įtaka imidazolio katijonų atskyrimui PALC metodu. Judri fazė: 10 mmol/L atitinkamos rūgšties ACN:H₂O 2,5:97,5 (v/v) mišinyje. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Sulaikymo faktoriai ir smailės efektyvumai, priklausomai nuo rūgšties prigimties, nežymiai svyravo ($\leq 15\%$), tačiau akivaizdaus ryšio tarp šių parametru ir rūgšties prigimties nenustatėme. Gauti rezultatai rodo, kad PALC metode rūgšties priedas nepasižymi efektyviu veikimu. Tokias išvadas patvirtina Wang ir Carr darbas [146], kuriame nustatyta, kad AFCh metode su labai nedidelį ACN kiekį turinčiomis judriomis fazėmis, anijoniniai priedai beveik neįtakoja arba tik labai silpnai įtakoja bazinių junginių sulaikymą.

HILIC sąlygose (judri fazė – ACN:H₂O 90:10 (v/v) ir atitinkamos rūgšties priedas) rūgščių priedų įtaka imidazolio katijonų sulaikymui žymiai stipresnė (3.20 pav.).



3.20 pav. Rūgšties prigimties įtaka imidazolio katijonų atskyrimui HILIC metodu. Judri fazė: 10 mmol/L atitinkamos rūgšties ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Nepriklausomai nuo TFA ir HClO₄ koncentracijos analičių sulaikymas susilpnėjo taip, kad jos tapo beveik nesulaikomos. Analčių sulaikymo faktoriai svyravo 0,05-0,4 ribose (t.y. buvo ~10-25 kartų mažesni nei su amonio formiato buferiu). Tokios chromatografinės elgsenos paaiškinimas galėtų būti tai, kad be silanolinių grupių disociacijos slopinimo, prisotinta acetonitrilu judri fazė yra palanki jonų porų susidarymui. Jonų asociacija sumažina analčių krūvį ir padidina jų hidrofobiškumą, todėl analčių sulaikymas susilpnėja. Su MSA priedu analitės sulaikomos stipriau – sulaikymo faktoriaus *k* vertės svyravo intervale 0,5-1,6. Tai paaiškinama silpnesniu MSA gebėjimu sudaryti jonų poras [147].

Apibendrinant gautus rezultatus galime teigti, kad rūgščių panaudojimas atskiriant imidazolio katijonus yra efektyvus tik esant didelei acetonitrilo koncentracijai judrioje fazėje, t.y. HILIC režime.

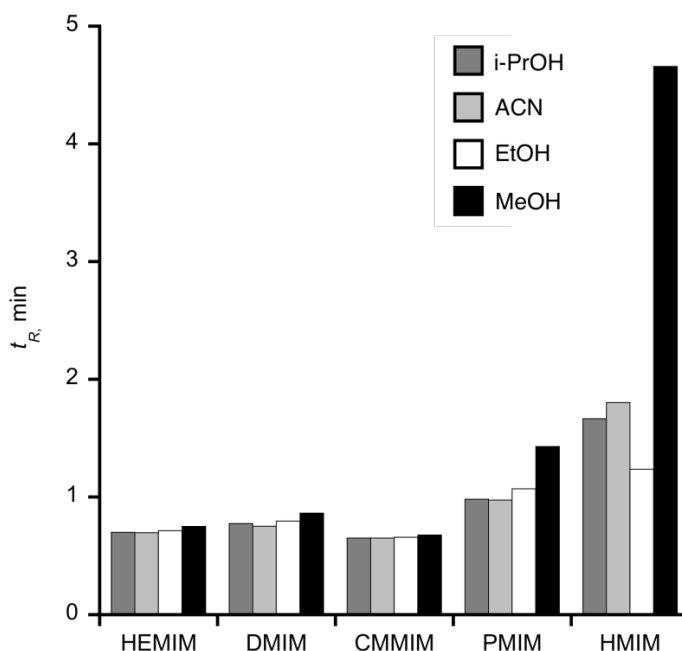
3.2.5. Organinio tirpiklio prigimties įtaka

Remiantis paskutiniu metu publikuotais darbais, galima pastebėti, kad acetonitrilas yra plačiausiai naudojamas HILIC metode [118]. Pakeitus ACN kitais poliniais organiniais tirpikliais, pablogėja atskyrimas bei efektyvumas. Tačiau mūsų žiniomis iki šiol nėra atliktų tyrimų, vertinančių organinio tirpiklio prigimties įtaką PALC režime. Dėl šios priežasties trijų alkoholių (metanolio (MeOH), etanolio (EtOH) ir izopropanolio (i-PrOH)) įtaka imidazolio katijonų atskyrimui buvo tiriama tik PALC sąlygomis.

Tyrimui buvo naudojama judri fazė su 5 mmol/L amonio acetato buferio (pH 6,5) atitinkamo organinio tirpiklio ir vandens mišinyje 5:95 (v/v). Nustatėme, kad imidazolio katijonų sulaikymo faktoriai didėjo tokia seka: i-PrOH < EtOH \approx ACN < MeOH (3.21 pav.). Tai atitinka eliuotropinę šių tirpiklių eilę tradicinėje AFCh [109].

Įvertinę organinio tirpiklio prigimties įtaką imidazolio katijonų smailių efektyvumui nustatėme, kad silpniausiai sulaikomų imidazolio katijonų (CMMIM, HEMIM, DMIM, EMIM, TMIM) efektyvumas skiriasi santykinai nežymiai ($\leq 25\%$), esant skirtingiems tirpikliams judrioje fazėje. Tačiau stipriau sulaikomų, t.y. mažiau hidrofilinių imidazolio katijonų smailių efektyvumas didėja tokia tirpiklių seka: MeOH < ACN \leq EtOH < i-PrOH. Pavyzdžiui, pakeitus i-PrOH metanoliumi, EDMIM ir BDMIM junginiams efektyvumas sumažėja atitinkamai 2,1 ir 3,9 karto. Kaip jau buvo minėta anksčiau, dėl sustiprėjusio analičių sulaikymo silpnesne eliuoacine geba pasižyminčioje judrioje fazėje (H₂O/MeOH) sustiprėja masės perkrovos efektai ir smailių asimetriškumas. Acetonitrilo pakeitimas

alkoholiais imidazolio katijonų atskyrimo atrankumo PALC režime reikšmingai neįtakojo.

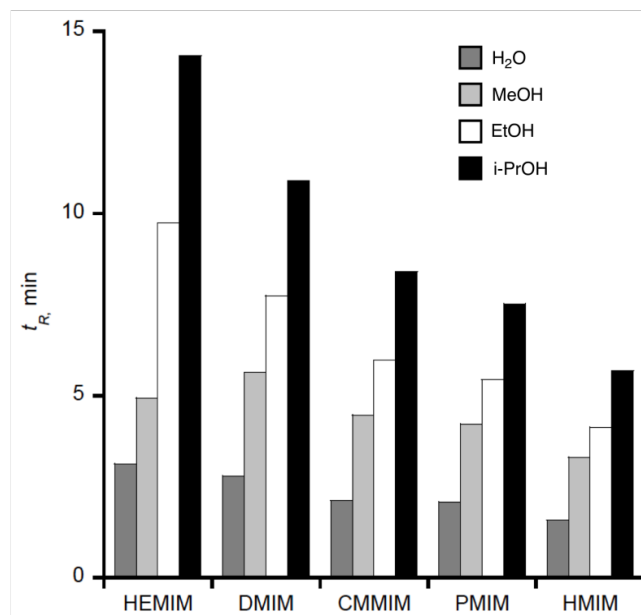


3.21 pav. Organinio tirpiklio prigimties įtaka imidazolio katijonų sulaikymo trukmėms PALC metode. Judri fazė: 5 mmol/L amonio acetatas (pH 6,5) atitinkamo organinio tirpiklio:H₂O mišinyje (5:95, v/v). Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Tirpiklių eliacinė geba HILIC režime priklauso nuo tirpiklio poliškumo ir gebėjimo dalyvauti protonų donorų/protonų akceptorių sąveikose. Pavyzdžiui, metanolis yra labai artimas vandeniui polinis tirpiklis, t.y. tiek vanduo, tiek metanolis pasižymi protonų donorinėmis savybėmis. Todėl gebantis sudaryti stiprius vandenilinius ryšius metanolis konkuruoja su vandeniu dėl silikagelio paviršiaus, tokiu būdu ardydamas vandens sluoksnį sorbento paviršiuje ir užimdamas jo vietą. Kiti poliniai alkoholiai (EtOH, i-PrOH) pasižymi panašiomis tik silpnesnėmis protonų donorinėmis savybėmis. Tuo tarpu ACN yra aprotoninis tirpiklis, nedalyvaujantis protonų donorų/akceptorių sąveikose, todėl jis sudaro tinkamas sąlygas susidaryti stabiliam vandens sluoksniui stacionarios fazės paviršiuje ir vyksti hidrofilinei sąveikai. Taigi, ACN pakeitimas judrioje fazėje

poliniu protoniniu tirpikliu tik pablogina atskyrimą ir efektyvumą HILIC metode, o alternatyvių ACN aprotoninių tirpiklių nėra.

Tuo tarpu dalies vandens judrioje fazėje pakeitimas poliniu protoniniu tirpikliu galėtų ir teigiamai įtakoti analičių sulaikymą, smailių efektyvumą ir atrankumą [148]. Norėdami tai iširti, 8% vandens HILIC judrioje fazėje pakeitėme poliniais tirpikliais (MeOH, EtOH ir i-PrOH). Tyrimui naudojome judrią fazę su 5 mmol/L amonio acetato buferio (pH 6,5) atitinkamo organinio tirpiklio, acetonitrilo ir vandens mišinyje 8:90:2 (v/v/v). Tyrimo rezultatai penkiems skirtingo poliškumo imidazolio katijonams pavaizduoti 3.22 pav.



3.22 pav. Organinio tirpiklio prigimties įtaka imidazolio katijonų sulaikymo trukmėms HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L amonio acetatas (pH 6,5) atitinkamo organinio tirpiklio:ACN:H₂O mišinyje 8:90:2 (v/v/v). Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

Kaip ir buvo galima tikėtis, analičių sulaikymas stiprėjo stiprėjant pridedamo tirpiklio poliškumui: i-PrOH < EtOH < MeOH < H₂O. Silpniausiai imidazolio katijonai sulaikomi naudojant judrią fazę, kurioje dalis vandens pakeista izopropanoliu. Tačiau nei vienu atveju nepasikeitė nei analičių eliuacijos tvarka, nei smailių simteriškumo laipsnis.

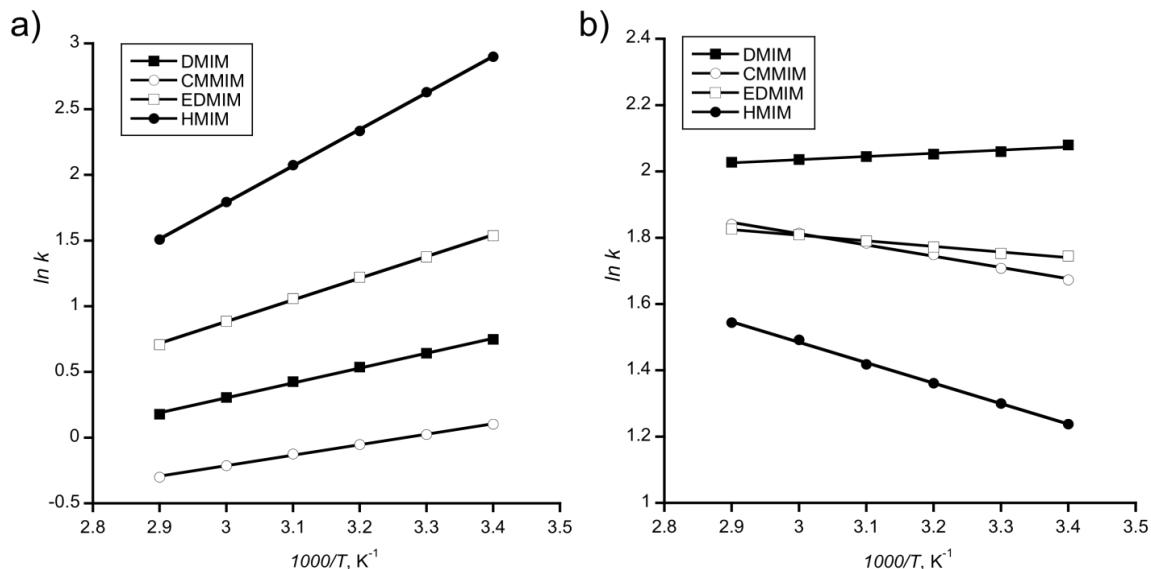
3.2.6. Kolonėlės temperatūros įtaka

Kolonėlės temperatūros įtaka analičių sulaikymui skysčių chromatografijoje aprašoma Van't Hoff'o lygtimi:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \quad (3.5)$$

kur k – analitės sulaikymo faktorius; ΔH° – analitės pernašos tarp fazių entalpijos pokytis; ΔS – analitės pernašos tarp fazių entropijos pokytis; R – universalioji dujų konstanta; T – absoliuti kolonėlės temperatūra; Φ – fazių tūrių santykis kolonėlėje.

Kolonėlės temperatūra buvo keičiama 20-70 °C intervale. Abiem atskyrimo metodais visiems imidazolio katijonams gautos tiesinės ($R \geq 0,99$) Van't Hoff'o priklausomybės ($\ln k - 1000/T$). Tai iliustruoja 3.23 pav. PALC sąlygose (3.23a pav.) visų analičių sulaikymas didinant kolonėlės temperatūrą silpnėja. Tokia priklausomybė liudija taip vadinamą „normalią“ analičių elgseną, kuri dažniausiai stebima atvirkščių fazių chromatografijoje. Toks pat chromatografinis elgesys buvo nustatytas Dong ir Huang [91], kurie tyrė epirubicino ir jo darinių sulaikymo mechanizmą ant silikagelio sorbento, naudodami vandeniu prisotintą judrią fazę. Tačiau jų tyrimo metu gautos Van't Hoff'o kreivės nebuvo tiesinės. Autoriai kreivių eigą aiškino mišriu (jonų mainai + adsorbcija) analičių sulaikymo mechanizmu. Mūsų rezultatai akivaizdžiai rodo, kad imidazolio katijonai taip pat sulaikomi veikiant mišriam mechanizmui, tačiau mūsų temperatūrinės priklausomybės yra tiesinės. Lyginant šiame darbe gautus rezultatus su Dong ir Huang publikuotais rezultatais, reikia atsižvelgti į tai, kad epirubicinas ir jo dariniai – silpnos bazės. Žinoma, kad kintant temperatūrai, kinta rūgščių ir bazių disocijacijos konstantų vertės. Netiesinė priklausomybė minėtame darbe greičiausiai susijusi su analičių pK_a verčių, o tuo pačiu ir jų efektyvaus krūvio pokyčiu [149]. Priešingai nei epirubicinas ir jo dariniai, šiame darbe tiriami imidazolio katijonai nėra silpnos bazės, tad ir jų krūvis nepriklauso nuo temperatūros.



3.23 pav. Kolonėlės temperatūros įtaka imidazolio katijonų sulaikymui PALC (a) ir HILIC (b) sąlygose. Judri fazė: 5 mmol/L amonio acetato buferinis tirpalas (pH 6,5), 2,5% ACN (PALC) arba 90% ACN (HILIC).

Kaip ir buvo tikėtasi, keliant kolonėlės temperatūrą PALC režime, visų analičių smailių efektyvumas šiek tiek pagerėjo. Pavyzdžiui, CMMIM atveju buvo gautas ~10 % geresnis efektyvumas, o HMIM atveju efektyvumas pagerėjo net ~40 %. Be to, buvo nustatytas nedidelis (~10-25 %) visų analičių smailių asimetriškumo faktoriaus sumažėjimas. Tai paaiškinama judrios fazės klampos sumažėjimu bei analičių difuzijos koeficientų padidėjimu aukštesnėje temperatūroje, pagreitinančiu masių mainų tarp dviejų fazių. Deja, aukštesnė temperatūra nepagerino EMIM/TMIM, MPIM/EDMIM ir BMIM/DMPIM katijonų porų atskyrimo.

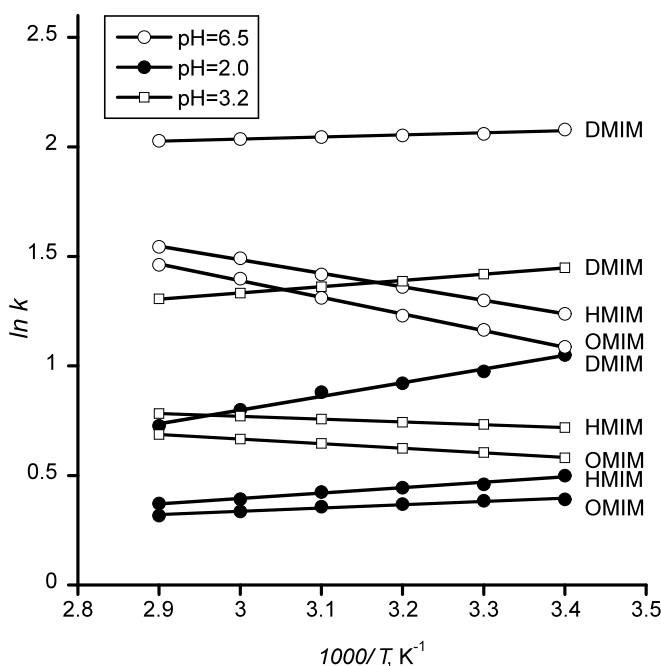
Iš Van't Hoff'o priklausomybių polinkio koeficientų įvertinome entalpijos vertes (ΔH°) visoms analitėms. PALC režime, ilgėjant imidazolio katijono alkilo grandinei eilėje nuo CMMIM į MOIM, išmatuotos ΔH° vertės tolygiai didėjo intervale nuo -8,5 iki -29 kJ/mol (egzoterminis procesas). Tai rodo, kad stiprėjant analitės hidrofobiškumui, jos sąveika su sorbentu taip pat stiprėja. Tokia savybė būdinga sulaikymui, vykstančiam tiek jonų mainų, tiek ir hidrofobinės sąveikos mechanizmu. Būtina pažymėti, kad imidazolio katijonams PALC sąlygose

nustatytos entalpijos vertės yra labai artimos entalpijų vertėms, nustatytoms sąlyginai mažiems baziniams junginiams AFCh sąlygomis [150]. Panašūs rezultatai imidazolio katijonams gauti ir PALC sąlygose esant pH 3,2, tačiau šiuo atveju analitės buvo žymiai silpniau sulaikomos.

Priešingai nei PALC, HILIC režime, keliant kolonėlės temperatūrą, imidazolio katijonų elgsena buvo skirtinga. Tai iliustruoja 3.23b pav. pavaizduotos Van't Hoff'o priklausomybės keturiems imidazolio katijonams. Didinant kolonėlės temperatūrą, DMIM sulaikymas silpnėja. Toks pat "normalus" elgesys buvo nustatytas ir dar dviem stipriau sulaikomiems (labiau hidrofiliniams) HEMIM ir TMIM katijonams (rezultatai nepateikti). Priešinga, taip vadinama „anormali“, elgsena nustatyta kitoms devynioms mažiau hidrofilinėms analitėms. Šiuo atveju didinant kolonėlės temperatūrą, imidazolio katijonų sulaikymas stiprėjo, o neigiamas Van't Hoff'o priklausomybių polinkis didėjo proporcingai analitės dydžiui. Panaši elgsena visai neseniai buvo nustatyta Chirita ir bendraautorių [110] publikuotame darbe. Šiame darbe teigiamo ir neigiamo polinkio Van't Hoff'o priklausomybės buvo gautos biogeninių aminių katijonams ant silikagelio sorbento HILIC režime. Tačiau tokia nevienoda panašios prigimties analičių elgsena nebuvo aiškinama. Įprastai, HILIC metode jonizuotiems junginiams gaunamas neigiamas Van't Hoff'o priklausomybių polinkis priskiriamas antrinei jonų mainų sąveikai [151]. Taigi, mūsų atveju katijoninių analičių sulaikymas esant pH 6,5 vyksta dviem mechanizmais: jonų mainų (endoterminis procesas) ir hidrofilinės sąveikos (egzoterminis procesas). Priklausomai nuo to, kuris iš dviejų mechanizmų dominuoja, priklauso ir katijoninių analičių temperatūrinių priklausomybių kryptis. Ilgėjant katijono alkilo grandinei, jo sulaikymas pasiskirstymo mechanizmu silpnėja (stiprėja hidrofobiškumas), o sulaikymas jonų mainų mechanizmu, priešingai, stiprėja. Poliškiausių tiriamų katijonų (DMIM, HEMIM ir TMIM) sulaikyme dominuoja pasiskirstymo mechanizmas, todėl jų sveika su sorbentu keliant temperatūrą

silpnėja. Tuo tarpu likusių hidrofobiškesnių katijonų sulaikyme jau dominuoja jonų mainų sąveika, todėl jų temperatūrinių priklausomybių kryptis pasikeičia.

Norėdami patvirtinti ar paneigti šią prielaidą, papildomai ištyrėme kolonėlės temperatūros įtaka analičių susilaikymui prie pH 3,2 (5 mmol/L amonio formiato buferinis tirpalas) ir prie pH 2,0 (10 mmol/L MSA). Iš 3.24 pav. pateiktų rezultatų matome, kad sumažinus judrios fazės pH nuo 6,5 iki 3,2, dviejų hidrofobiškiausių analičių (OMIM ir HMIM) neigiami tiesių polinkiai jau yra mažesni, o dar parūgštinus iki pH 2,0 gaunamas jau teigiamas tiesės polinkis. Tuo tarpu hidrofiliniam imidazolio katijonui (DMIM) didinant judrios fazės rūgštingumą, teigiamas tiesės polinkis taip pat tolygiai didėja. Akivaizdu, kad mažėjant judrios fazės pH, dėl silanolinių grupių protonizacijos, jonų mainų įtaka sulaikymui silpnėja, todėl temperatūrinės priklausomybės hidrofobiškesniems katijonams iš „anormalios“ pereina į „normalią“.



3.24 pav. Judrios fazės pH įtaka imidazolio katijonų sulaikymo priklausomybei nuo temperatūros HILIC sąlygose. Judri fazė: 5 mmol/L amonio acetatas (pH 6,5), 5 mmol/L amonio formiatas (pH 3,2) arba 10 mmol/L MSA (pH 2,0) ACN:H₂O mišinyje 90:10, (v/v).

Apskaičiuotos ΔH° vertės imidazolio katijonams HILIC sąlygose prie trijų pH verčių yra pateiktos 3.5 lentelėje. Iš lentelėje pateiktų rezultatų matome, kad mažinant pH, entalpijos vertės visoms analitėms mažėja. Labiau rūgščioje terpėje (pH 2) jau visos analitės pasižymi egzotermine elgsena (sulaikymas silpnėja didėjant temperatūrai). Taigi, iš pateiktų rezultatų akivaizdu, kad entalpijos pokyčiai yra susiję su mažėjančia jonų mainų įtaka imidazolio katijonų sulaikymui. HILIC sąlygose temperatūra neturėjo didelės įtakos smailių efektyvumui ir simetriškumui. Šie parametrai svyravo atsitiktiniu būdu $\pm 10\%$ ribose nepriklausomai nuo judrios fazės pH.

3.5 lentelė. Imidazolio katijonų sulaikymo entalpijų priklausomybė nuo judrios fazės pH HILIC režime.

Analitė	ΔH°		
	pH 6,5	pH 3,2	pH 2,0
OMIM	6,27	1,79	-1,18
HMIM	5,13	1,07	-1,77
BDMIM	3,93	0,21	-2,25
BMIM	3,22	-0,19	-2,72
DMPIM	2,74	-0,71	-2,84
PMIM	1,86	-1,03	-3,35
CMMIM	2,81	0,56	-1,91
EDMIM	1,35	-1,55	-3,38
EMIM	0,49	-1,70	-3,95
TMIM	-0,01	-2,25	-3,78
DMIM	-0,87	-2,39	-4,31
HEMIM	-2,02	-2,68	-3,97

Palyginus su PALC, HILIC sąlygose temperatūros įtaka atskyrimo atrankumui žymiai reikšmingesnė. Keliant temperatūrą bendras imidazolio katijonų atskyrimo atrankumas blogėjo, tačiau buvo kelios išimtys. Iš 3.23b pav. matome, kad pirmiausia keliant temperatūrą nuo 20 iki 60 °C EDMIM/CMMIM katijonų poros skiriamoji geba mažėja, tačiau kolonėlės temperatūrai pasiekus 60 °C, pasikeičia šių analičių eliucijos tvarka ir prie 70 °C jų skiriamoji geba vėl padidėja. CMMIM/MPIM imidazolio katijonų porai skiriamoji geba palaipsniui didėjo didinant kolonėlės temperatūrą. Vis tik, geriausias visų analičių atskyrimas HILIC sąlygomis pasiekiamas, kai kolonėlės temperatūra buvo 30 °C.

Baigiant reikėtų pažymėti, kad HILIC metode temperatūros įtaka imidazolio katijonų sulaikymo trukmėms buvo žymiai mažesnė, nei PALC metode. Padidinus kolonėlės temperatūrą nuo 20 iki 70 °C (pH 6,5), HILIC metode analičių sulaikymo trukmių pokyčiai buvo intervale 0,67-0,78 min. Tuo tarpu PALC metode, priklausomai nuo analitės prigimties, sulaikymo trukmių pokyčiai siekė 0,24-27,3 min.

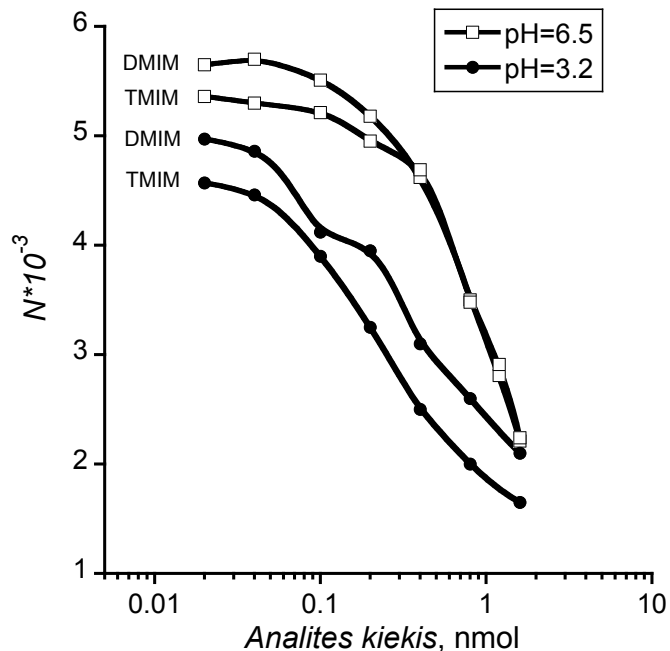
3.2.7. Masės perkrova kolonėlėje

Chromatografinio atskyrimo efektyvumas tiesiogiai susijęs su analičių zonų išsiplėtimu kolonėlėje ir charakterizuojamas smailės forma ir pločiu chromatogramoje [152]. Smailės formą ir plotį gali įtakoti daugelis veiksnių, tačiau masės perkrova kolonėlėje yra viena iš pagrindinių priežasčių, sumažinanti bazinių junginių atskyrimo efektyvumą AFCh [92]. McCalley [153] gauti tyrimų rezultatai parodė, kad lyginant su tradiciniu AFCh metodu, HILIC metodas yra mažiau jautrus masės perkrovai. Analizuojant jonizuotus bazinius junginius HILIC sąlygose nustatyta maždaug 10 kartų mažesnė masės perkrova nei analizuojant tuos pačius junginius AFCh metodu. Kaip rodo mūsų tyrimų rezultatai, analičių sulaikymo mechanizmas PALC ir AFCh yra panašus, nors,

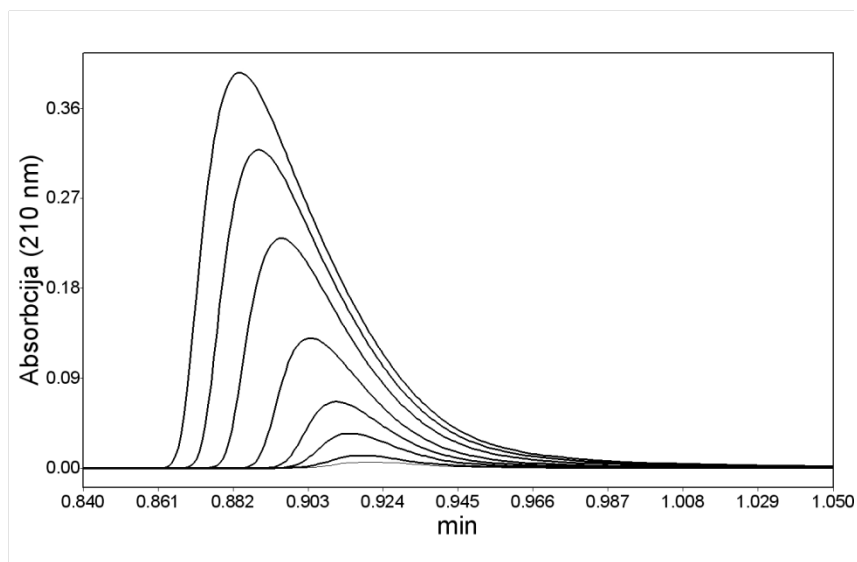
priešingai nei AFCh, PALC režime atskyrimas atliekamas ant polinio sorbento. Todėl buvo įdomu palyginti masės perkrovas imidazolio katijonams ant hibridinio silikagelio sorbento PALC ir HILIC sąlygomis. Šis parametras įvertinamas palaipsniui didinant įleidžiamos analitės kiekį mėginyje ir gautose chromatogramose išmatuojant analitės smailių efektyvumą (N). Prasidėjus perkrovai, analitės smailė pradeda plėstis, t.y. blogėja efektyvumas. Masės perkrova laikomas toks į kolonėlę įleidžiamas analitės kiekis, kuriam esant stebimas 10 % smailės efektyvumo sumažėjimas. Yra žinoma, jog masės perkrova kolonėlėje labiau pasireiškia stipriau sulaikomiems (kurių k yra didesnis) junginiams. Todėl kiekvienos analitės masės perkrovos įvertinimui buvo parenkama tokios sudėties judri fazė (keičiant ACN koncentracija), kad visų analičių sulaikymo faktorių vertės (intervale 3-4) būtų panašios.

3.25 pav. pavaizduota efektyvumo priklausomybė nuo įleidžiamo kiekio dviem imidazolio katijonams (DMIM ir TMIM) PALC sąlygomis esant dviem judrios fazės pH (3,2 ir 6,5) vertėms. Matome, kad PALC metode perkrovos stiprumas priklauso nuo judrios fazės pH. Efektyvumas sumažėja 10 %, kai įleidžiamas analitės kiekis padidinamas iki ~0,2 nmol (pH 3,2) arba iki ~0,5 nmol (pH 6,5). Panašūs rezultatai buvo gauti ir kitoms analitėms. Taigi, PALC sąlygose silikagelio kolonėlė truputį atsparesnė perkrovoms neutralioje judrioje fazėje, kur sorbento paviršiuje yra didesnis jonizuotų silanolinių grupių skaičius.

Būtina pažymėti, kad PALC metode didinant įleidžiamą analitės kiekį, jos sulaikymo trukmė tolygiai mažėja, o smailės asimetriškumas didėja plečiantis smailės „uodegai“. Tai iliustruoja 3.26 pav. pateikta skirtingų TMIM kiekių smailių dinamika. Tokia chromatografinė analičių elgsena yra įprasta ir perkrovoms AFCh metode [154].



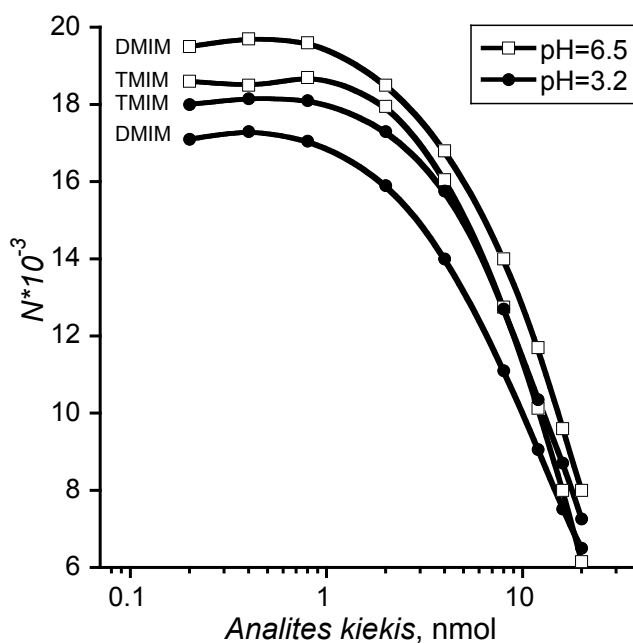
3.25 pav. Efektyvumo priklausomybė nuo įleidžiamo imidazolio katijono kiekio PALC sąlygose. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) arba 5 mmol/L amonio acetato (pH 6,5) buferinis tirpalas ACN/H₂O mišinyje.



3.26 pav. TMIM katijono smailės formos kitimas PALC režime (pH 3,2).

Analogiška smailių efektyvumo priklausomybė nuo įleidžiamo analitės kiekio HILIC metode pavaizduota 3.27 pav. Palyginus dviem analitėms (DMIM ir TMIM) pateiktus rezultatus matyti, kad HILIC sąlygomis masės perkrova

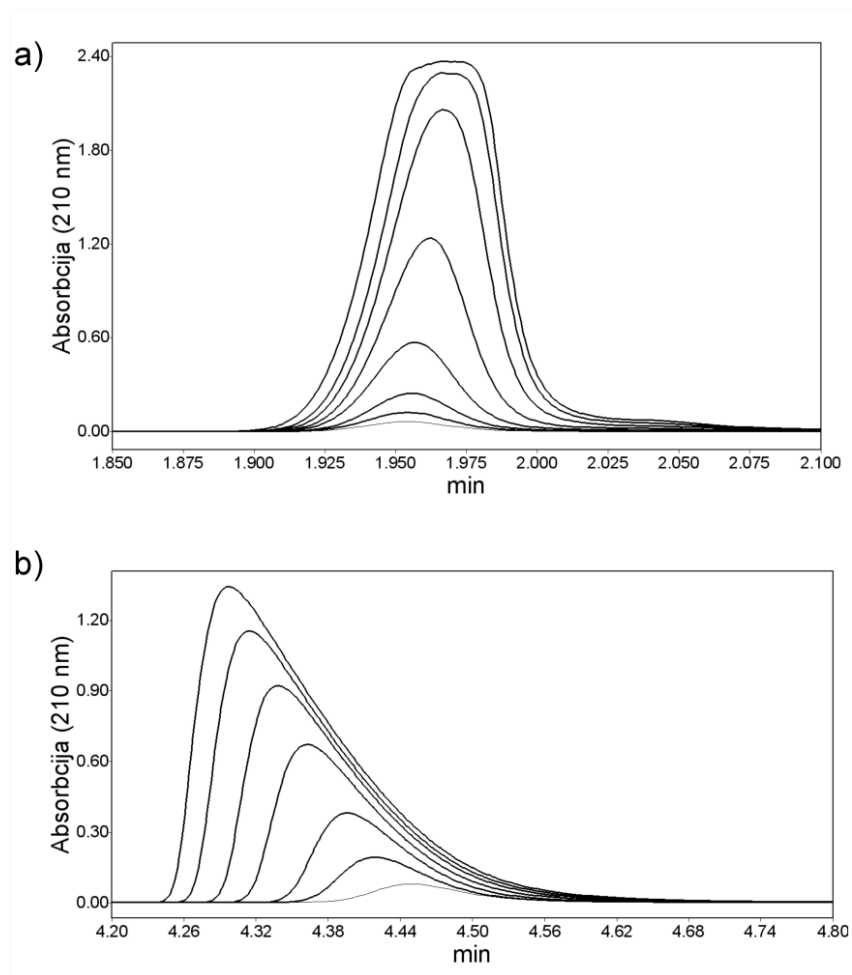
nepriklauso nuo judrios fazės pH. Be to, HILIC metode 10 % efektyvumo sumažėjimas pasiekiamas, padidinus analitės kiekį iki 2-3 nmol, tai yra kolonėlės krovumas HILIC apie 4-6 (neutralioje terpėje) ir 10-20 (rūgščioje terpėje) kartu didesnis nei PALC metode. Įdomu pažymėti, kad HILIC sąlygomis hidrofilinėms analitėms perkrovos atveju gaunamos įprastinės smailės su „uodegomis“. Tuo tarpu masės perkrova hidrofobiškesnėms analitėms (pvz., MOIM, HMIM, BDMIM) sukelia nežymų smailės fronto išplitimą ir sulaikymo sustiprėjimą. Tai iliustruoja 3.28 pav. pateikta skirtingų BDMIM ir DMIM kiekių smailių dinamika.



3.27 pav. Efektyvumo priklausomybė nuo įleidžiamo imidazolio katijono kiekio HILIC sąlygose. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) arba 5 mmol/L amonio acetato (pH 6,5) buferinis tirpalas ACN/H₂O mišinyje.

Smailes su ištemptu frontu gali sukelti analitės molekulių tarpusavio sąveika mėginyje [154]. Kuo stipresnė tokia sąveika, tuo lengviau analitėms pasiekti stacionarią fazę, todėl smailės gaunamos su ištemptu frontu (kai analitės koncentracija yra pakankamai didelė). Dėl to, didėjant įleidžiamai analitės

koncentracijai, padidėja ir analičių sulaikymo faktorius k . Akivaizdu, kad tokia analitės – analitės sąveika yra žymiai stipresnė didesniems imidazolio katijonams.



3.28 pav. BDMIM (a) ir DMIM (b) katijono smailės formos kitimas HILIC režime (pH 6,5).

Apibendrinant turime pažymėti, kad mėginio masės perkrova kolonėlėje yra sudėtingas ir išsamesnių tyrimų reikalaujantis procesas. Vis tik, šio tyrimo metu gauti rezultatai rodo, kad HILIC metodas, lyginant su PALC, pasižymi žymiai didesniu atsparumu imidazolio katijonų masės perkrovai kolonėlėje.

3.2.8. Judrios fazės greičio įtaka

Judrios fazės greitis chromatografijoje lemia atskyrimo trukmę bei smailių efektyvumą. Efektyvumo (teorinės lėkštelės aukščio) priklausomybė nuo judrios fazės greičio yra aprašoma van Deemter'io lygtimi:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3.6)$$

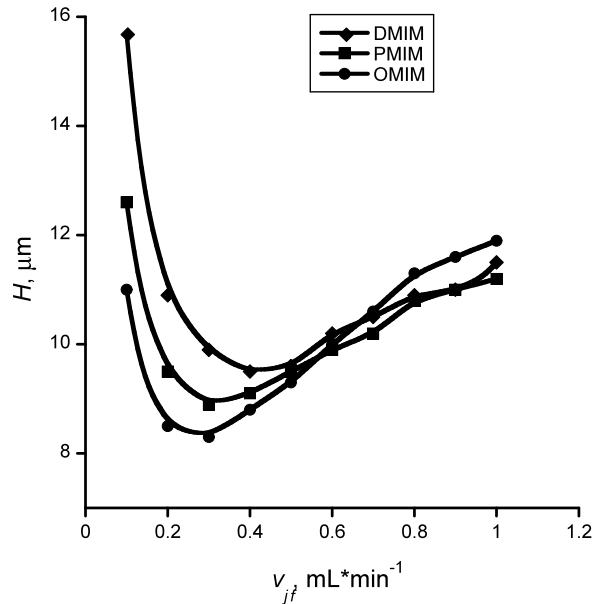
kur H – teorinės lėkštelės aukštis, μm ; u – linijinis judrios fazės tekėjimo greitis, cm/s ; A , B ir C – konstantos, charakterizuojančios konkrečią chromatografinę sistemą ir/ar analitę.

Kiekvienas dėmuo pateiktoje lygtyje aprašo atitinkamo difuzinio proceso įtaką analitės zonos išsiplėtimui (teorinės lėkštelės aukščiui): A – sūkurinės difuzijos indėlis; B/u – molekulinės (išilginės) difuzijos indėlis; $C \cdot u$ – pasipriešinimo masių mainams indėlis.

Trims imidazolio katijonams (DMIM, BMIM ir OMIM) HILIC režime gautos teorinės lėkštelės aukščio priklausomybės nuo judrios fazės greičio pateiktos 3.29 pav. Paprastumo dėlei matavome ne linijinį, bet tūrinį (mL/min) judrios fazės greitį. HILIC metodui nustatytos klasikinės parabolės formos priklausomybės. Esant nedideliems judrios fazės greičiams dominuoja išilginės difuzijos procesas, stipriau pasireiškiantis trumpesnę alkilo grandinę turintiems (didesni difuzijos koeficientai) imidazolio katijonams. Pavyzdžiui, esant $0,1 \text{ mL/min}$ greičiui, mažo DMIM katijono efektyvumas beveik 1,5 karto blogesnis (H didesnis) už didžiausio OMIM katijono efektyvumą.

Didinant judrios fazės greitį, išilginės difuzijos įtaka silpnėja, todėl visų analičių smailių efektyvumas gerėja ir pasiekia maksimumą (minimalus H) esant $0,3\text{-}0,4 \text{ mL/min}$. Toliau didinant judrios fazės greitį, sustiprėja pasipriešinimo masių mainams įtaka ir efektyvumas pradeda blogėti. Kadangi šis procesas jau stipriau įtakoja didesnių analičių efektyvumą, didesnių greičių srityje skirtingo

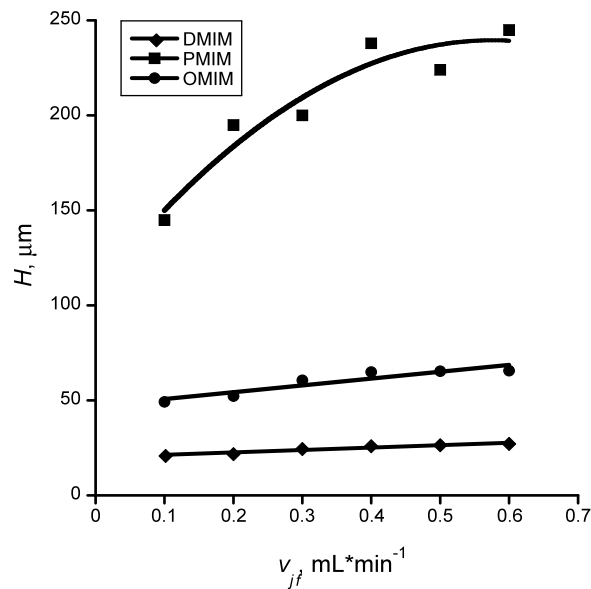
dydžio analičių smailių efektyvumai suvienodėja. Taigi, maksimaliam imidazolio katijonų efektyvumui pasiekti HILIC režime, judrios fazės greitis turėtų būti 0,3-0,4 mL/min. Tačiau praktikoje, esant pakankamam atskyrimo atrankumui, dažnai pasirenkamas didesnis judrios fazės greitis, taip sutrumpinant analizės trukmę.



3.29 pav. Judrios fazės greičio įtaka teorinės lėkštelės aukščiui HILIC metode. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) ACN:H₂O 90:10 (v/v) mišinyje.

Smalių simetriškumui judrios fazės greičio įtaka nežymi. Šiek tiek didesnis (~10 %) smalių asimetriškumas nustatytas esant mažesniems (0,1-0,2 mL/min) judrios fazės greičiams. Vienas iš HILIC metodo privalumų – maža judrios fazės klampa (judrioje fazėje daug ACN), leidžianti naudoti didesnę judrios fazės greitį neviršijant ribinio leidžiamo slėgio prieš kolonėlę. PALC metode dėl didesnės judrios fazės klamos, imidazolio katijonų smalių efektyvumas buvo tiriamas siauresniame 0,1-0,6 mL/min judrios fazės greičio intervale (3.30 pav.). Gautos labai netipiškos, todėl sunkiai interpretuojamos priklausomybės – didinant judrios fazės greitį, visų analičių smalių efektyvumas tolygiai blogėja. Šie duomenys rodo, kad visame tirtame greičio intervale dominuoja žymiai stipriau didesnių

analičių efektyvumą įtakojantis pasipriešinimo masių mainams procesas. Dėl savo stipriau išreikštų hidrofobinių savybių, ilgesnę grandinę turintys imidazolio katijonai vandeninėje terpėje yra labiau linkę asocijuotis. Tai sumažina jų difuzijos koeficientą ir sulėtina masių mainų procesą.

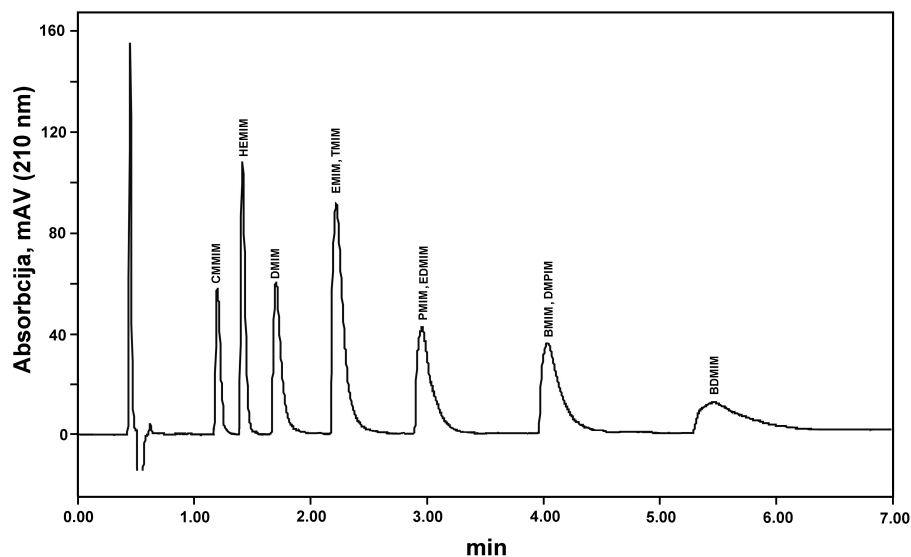


3.30 pav. Judrios fazės greičio įtaka teorinės lėkštelės aukščiui PALC metode. Judri fazė: 5 mmol/L amonio formiato (pH 3,2) ACN:H₂O 2,5:97,5 (v/v) mišinyje.

3.2.9. Imidazolio katijonų atskyrimo palyginimas

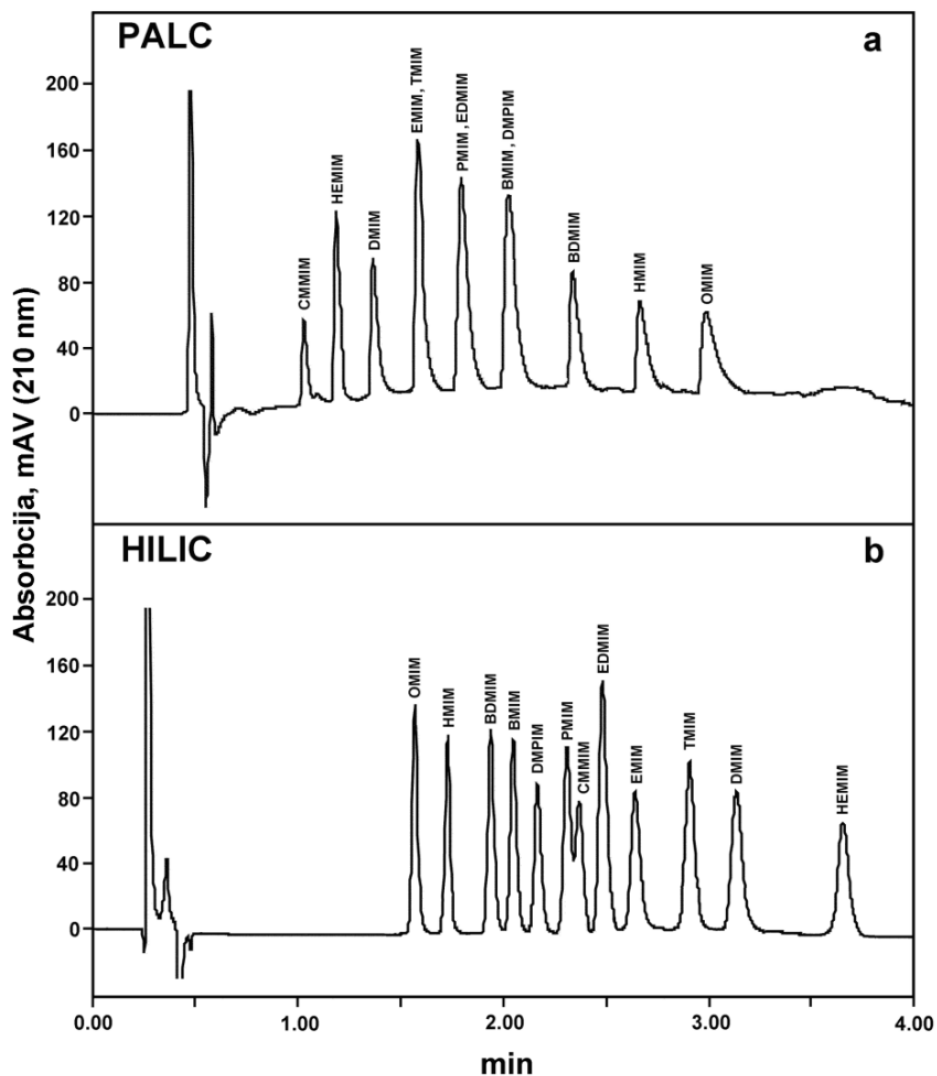
Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad, dėl labai didelių sąveikos su sorbentu skirtumų, greitas ir efektyvus visų dvylikos imidazolio katijonų atskyrimas PALC metodu naudojant izokratinės eliuacijos sąlygas yra neįmanomas. Izokratinė eliuacija PALC metode tinkama tik labiau hidrofiliniams katijonams atskirti. Tai iliustruoja 3.31 pav. pavaizduota dešimties imidazolio katijonų mišinio chromatograma. Matome, kad pakankamai geras efektyvumas pasiekiamas tik hidrofiliausiems (CMMIM, HEMIM, DMIM) junginiams. Tuo tarpu hidrofobiniai HMIM ir OMIM katijonai šiomis sąlygomis yra labai stipriai

sulaikomi, jų smailės išplinta ir sunkiai registruojamos. Norėdami pagreitinti hidrofobinių analičių eliuciją, padidinome ACN kiekį judrioje fazėje. Tačiau tokios sąlygos netinkamos hidrofilinėms analitėms: susilpnėjus jų sulaikymui, jos nebeatskiriamos. Taigi, norint greitai eliuuoti visus dvylika imidazolio katijonų PALC režime, būtina naudoti gradientinę eliuciją (3.32a pav.). Tačiau ir šiuo atveju, sistemos atrankumas per mažas panašaus hidrofobiškumo katijonų poroms (EMIM/TMIM, PMIM/EDMIM ir BMIM/DMPIM) atskirti.



3.31 pav. Imidazolio katijonų mišinio atskyrimas izokratinėmis sąlygomis PALC metodu. Judri fazė: 5 mmol/L amonio acetato buferinis tirpalas (pH 6,5), ACN:H₂O 2,5:97,5 (v/v) mišinyje. Tėkmės greitis – 0,5 mL/min.

HILIC metodu, priešingai nei PALC, visi 12 imidazolio katijonų yra atskiriami izokratiniu režimu greičiau nei per 4 min (3.32 b pav.). Vienintelės PMIM/CMMIM katijonų poros atskyrimas nėra pilnas, tačiau esant reikalui, juos nesunku atskirti pakoregavus judrios fazės sudėtį ir/arba kolonėlės temperatūrą. Kadangi HILIC metode naudojamos judrios fazės klampa palyginti nedidelė, galėjome, nepablogindami atskyrimo atrankumo, padidinti judrios fazės greitį iki 0,75 mL/min.



3.32 pav. Imidazolio katjonų atskyrimas optimaliomis PALC (a) ir HILIC (b) sąlygomis. PALC judri fazė: A - 5 mmol/L amonio acetatas (pH 6,5) 100 % H₂O, B - 5 mmol/L amonio acetatas 90 % ACN, linijinis gradientas nuo 2 iki 30 % B per 3 min. HILIC: izokratinė eliuacija, 5 mmol/L amonio formiato buferis (pH 3,2) 95 % ACN. Tėkmės greitis - 0,5 mL/min PALC ir 0,75 mL/min HILIC.

Apžvelgiant antroje darbo dalyje atliktų tyrimų rezultatus būtina pažymėti pagrindines HILIC metodo charakteristikas. Metodas unikalus tuo, kad keičiant tik acetonitrilo/vandens santykį judrioje fazėje, pasikeičia ir analičių sulaikymo mechanizmas. Esant didelėms ACN koncentracijoms (>60%), analitės sulaikomos jų hidrofiliškumo stiprėjimo tvarka (HILIC režimas). Kai ACN koncentracijos mažos (<30 %), sulaikymas vyksta priešinga, hidrofobiškumo stiprėjimo tvarka

(PALC režimas). Be jau minėtų hidrofobinės ir hidrofilinės sąveikų, abiejose sistemose sulaikymo procese vyksta antrinė jonų mainų tarp imidazolio katijonų ir disocijavusių silanolinių grupių sąveika. HILIC režime, lyginant su PALC, pasiekiamas žymiai geresnis smalių efektyvumas, simetriškumas bei atskyrimo atrankumas. HILIC sistema yra atsparesnė perkrovoms kolonėlėje bei, dėl didelio lakaus ACN kiekio judrioje fazėje, yra geriau suderinama su MS detektoriumi. Nors PALC metodas gali būti panaudotas kaip alternatyva HILIC atskiriant junginius priešinga eliucine eile (hidrofobiškumo didėjimo), jis nėra labai lankstus. Imidazolio katijonų atskyrimui PALC režime būtinos gradientinės eliucijos sąlygos. Didžiausias PALC privalumas – sunaudojami labai maži ACN kiekiai, kas yra labai patrauklu ekologiškumo ir ekonomiškumo požiūriu. Galiausiai, apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, galima teigti, kad abu metodai puikiai papildo vienas kitą ir pagal poreikius gali būti naudojami analizuojant skirtingo hidrofiliškumo junginius.

IŠVADOS

1. Optimizavus šešių imidazolio katijonų atskyrimo AFCh, JPCh ir HILIC metodais sąlygas nustatyta, kad visi metodai tinkami imidazolio katijonams atskirti. Naudojant ultraefektyviają skysčių chromatografiją pasiekiami net iki 25 kartų greitesni bei žymiai efektyvesni atskyrimai, nei analogiškais ESCh variantais. Perspektyviausiu laikytinas HILIC metodas, kuriuo pasiekiamas labai greitas (2 min) ir efektyvus šešių imidazolio katijonų atskyrimas izokratinėse sąlygose.
2. Kolonėlėje su hibridiniu silikagelio sorbentu imidazolio katijonų eliucijos tvarka ir sulaikymo mechanizmas priklauso nuo ACN/H₂O santykio judrioje fazėje. Kai ACN koncentracija judrioje fazėje viršija 60%, imidazolio katijonai sulaikomi hidrofiliškumo stiprėjimo tvarka, o vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga už acetonitrilą (HILIC režimas). Kai ACN koncentracija mažesnė už 30%, pasikeičia analičių eliucijos tvarka bei judrios fazės tirpiklių išstūmimo jėga (PALC režimas).
3. Tiriamai sistemai pritaikius pasiskirstymo ir adsorbcijos modelius nustatyta, kad tiek HILIC, tiek ir PALC sąlygose imidazolio katijonų sulaikymas negali būti aprašytas nei grynu pasiskirstymo, nei grynu adsorbciniu mechanizmu.
4. Didinant judrios fazės pH ir amonio jonų koncentraciją judrioje fazėje abiejose sistemose analičių sulaikymas silpnėja. Tai patvirtina, kad nepriklausomai nuo eliucijos režimo, vyksta papildoma jonų mainų sąveika tarp imidazolio katijonų ir disocijavusių silanolinių grupių.
5. Keičiant organinio tirpiklio prigimtį PALC sąlygose, imidazolio katijonų sulaikymo faktoriai didėjo tokia seka: i-PrOH < ACN ≈ EtOH < MeOH. Tai atitinka eluotropinę šių tirpiklių eilę tradicinėje atvirkščių fazių skysčių chromatografijoje ir patvirtina hidrofobinės sąveikos indėlį į analičių sulaikymą.

6. PALC sąlygose kolonėlės temperatūros didinimas (iki 70 °C) susilpnina visų analičių sulaikymą. HILIC režime keliant temperatūrą poliškiausių analičių sulaikymas silpnėja, o mažiau polinių – stiprėja. Tokią skirtingą temperatūros įtaką nulemia dominuojanti analitės sąveikos su nejudria faze rūšis (hidrofilinė sąveika ar jonų mainai).
7. HILIC sistema yra atsparesnė masės perkrovoms kolonėlėje. PALC metode kolonėlė perkraunama įleidžiamos analitės kiekiui viršijus 0,2 (pH 3,2) arba 0,5 (pH 6,5) nmol. HILIC metode maksimalus įleidžiamas analitės kiekis nepriklauso nuo pH ir siekia apie 2-3 nmol.
8. PALC režime, dėl smarkiai besiskiriančios skirtingo poliškumo analičių sąveikos su sorbentu, būtina gradientinė eliucija. Tačiau ir šiuo atveju sistemos atrankumas nepakankamas panašaus hidrofobiškumo katijonų poroms (EMIM/TMIM, PMIM/EDMIM ir BMIM/DMPIM) atskirti. HILIC metodu izokratinėmis sąlygomis per 4 min beveik pilnai atskiriami visi 12 imidazolio katijonų. Pagrindinis PALC privalumas – sunaudojami labai maži ACN kiekiai, kas yra patrauklu ekologiško ir ekonomiškumo požiūriu.

**MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO
DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS**

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI:

1. **A. Orentienė**, V. Olšauskaitė, V. Vičkačkaitė, A. Padarauskas. Ultra-Performance Liquid Chromatography: a Powerful Tool for the Separation of Imidazolium Ionic Liquid Cations. *Chromatographia* 73 (2011) 17-24.
2. **A. Orentienė**, V. Olšauskaitė, V. Vičkačkaitė, A. Padarauskas. Retention behaviour of imidazolium ionic liquid cations on 1.7 μm ethylene bridged hybrid silica column using acetonitrile-rich and water-rich mobile phases. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6884-6891.

KONFERENCIJŲ MEDŽIAGOS IR TEZĖS:

1. V. Vičkačkaitė, **A. Orentienė**, A. Padarauskas. Ultra-performance liquid chromatography: a powerful tool for the separation of imidazolium ionic liquid cations. Abstracts of the 7th Aegean Analytical Chemistry Days AACD 2010, Lesvos, Graikija, 2010, P3-33, p. 231.
2. V. Vičkačkaitė, **A. Orentienė**, V. Vičkačkaitė, A. Padarauskas. Hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography for separation of imidazolium ionic liquid cations. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, Kyoto, Japonija, 2011, 23P011.
3. **A. Orentienė**, V. Olšauskaitė, V. Vičkačkaitė, A. Padarauskas. Retention behaviour of imidazolium ionic liquid cations on 1.7 μm ethylene bridged hybrid silica column using acetonitrile-rich and water rich mobile phases. 5th International Scientific Conference The Vital Nature Sign, Kaunas, Lietuva, 2011, P-47, p. 83.

PADĖKA

Dėkoju Lietuvos Mokslo Tarybai už finansinę paramą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. T. Welton, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2071.
2. J. Liu, J. A. Jonsson, G. Jiang, *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 20.
3. T. Torimoto, T. Tsuda, K. Okazaki, S. Kuwabata, *Adv. Mater*, 22 (2010) 1196.
4. A. J. Carmichael, K. R. Seddon, *J. Phys. Org. Chem.*, 13 (2000) 591.
5. S. Gabriel, J. Weiner, *Chem. Ber.*, 21 (1888) 2669.
6. P. Walden, *Bull. Acad. Sci. St. Petersburg*, 8 (1914) 405.
7. C. Graenacher, *US Pat.*, 1943176 (1934).
8. H. L. Chum, V. R. Koch, L. L. Miller, R. A. Osteryoung, *J. Am. Chem Soc.*, 97 (1975) 3264.
9. J. S. Wilkes, J. A. Levisky, R. A. Wilson, C. L. Hussey, *Inorg. Chem.*, 21 (1982) 1263.
10. J. S. Wilkes, M. J. Zaworotko, *Chem. Commun.*, 13 (1992) 965.
11. H. L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A. B. McEwan, *Thermochim. Acta*, 357-358 (2000) 97.
12. P. Wasserscheid, T. Welton, *Ionic liquids in synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, p. 41-66.
13. M. Koel, *Ionic liquids in Chemical Analysis*, Taylor & Francis Group, 2009, p. 4-34.
14. K. N. Marsh, J. A. Boxall, R. Lichtenthaler, *Fluid Phase Equilib.*, 219 (2004) 93.
15. J. D. Holbrey, K. R. Seddon, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 13 (1999) 2133.
16. S. N. Baker, G. A. Baker, M. A. Kane, F. V. Bright, *J. Phys. Chem. B*, 105 (2001) 9663.
17. K. R. Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 2275.
18. C. Baudequin, D. Bregeon, J. Levillain, F. Guillen, J.-C. Plaquevent, A.- C. Gaumont, *Tetrahedron Asym.*, 16 (2005) 3921.

19. R. Giernoth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 2834.
20. D. R. Macfarlane, M. Forsyth, P. C. Howlett, J. M. Pringle, J. Sun, G. Annat, W. Neil, E. I. Izgorodina, *Acc. Chem. Res.*, 40 (2007) 1165.
21. F. Endres, S. Z. El Abedin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8 (2006) 2101.
22. J. Soukup-Hein, M. M. Warnke, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 2 (2009) 145.
23. D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He, M. L. Gross, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3679.
24. K. S. Lovejoy, G. M. Purdy, S. Iyer, T. C. Sanchez, A. Robertson, A. T. Koppisch, R. E. Del Sesto, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 2921.
25. S. Carda-Broch, A. Berthod, D. W. Armstrong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 553.
26. M. D. Joshi, J. L. Anderson, *RSC Adv.*, 2 (2012) 5470.
27. P. K. Martinelango, J. L. Anderson, P. K. Dasgupta, D. W. Armstrong, R. S. Al-Horr, R. W. Slingsby, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 4829.
28. J. W. Remsburg, R. J. Soukup-Hein, J. A. Crank, Z. S. Breitbach, T. Payagala, D. W. Armstrong, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19 (2008) 261.
29. R. J. Soukup-Hein, J. W. Remsburg, Z. S. Breitbach, P. S. Sharma, T. Payagala, E. Wanigasekara, J. Huang, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 2612.
30. M. M. Warnke, Z. S. Breitbach, E. Dodbiba, J. A. Crank, T. Payagala, P. Sharma, E. Wanigasekara, X. Zhang, D. W. Armstrong, *Anal. Chim. Acta*, 633 (2009) 232.
31. A. E. Visser, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *Chem. Commun.*, 22, (2001) 2484.
32. S. Carda-Broch, A. Berthod, D. W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 191.
33. J. H. Wang, D. H. Cheng, X. W. Chen, Z. Du, Z. L. Fang, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 620.
34. G.-T. Wei, Z. Yang, C.-J. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 488 (2003) 183.

35. S. Dai, Y. H. Ju, C. E. Barnes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1999) 1201.
36. D. W. Armstrong, L. He, Y. S. Liu, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3873.
37. A. Berthod, L. He, D. W. Armstrong, *Chromatogr.*, 53 (2001) 63.
38. J. Ding, T. Welton, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6819.
39. J. L. Anderson, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 4851.
40. J. L. Anderson, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6453.
41. T. Payagala, J. Huang, Z. S. Breitbach, P. S. Sharma, D. W. Armstrong, *Chem. Mater.*, 19 (2007) 5848.
42. D. W. Armstrong, T. Payagala, L. M. Sidisky, *LCGC North Am.*, 27 (2009) 596.
43. B. Buszewski, S. Studzinska, *Chromatogr.*, 68 (2008) 1.
44. M. López-Pastor, B. M. Simonet, B. Lendl, M. Valcárcel, *Electrophoresis*, 29 (2008) 94.
45. M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *Chromatogr.*, 53 (2001) 302.
46. S. M. Mwongela, A. Numan, N. L. Gill, R. A. Agbaria, I. M. Warner, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6089.
47. E. G. Yanes, S. R. Gratz, M. J. Baldwin, S. E. Robison, A. M. Stalcup, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3838.
48. C. F. Poole, B. R. Kersten, S. S. J. Ho, M. E. Coddens, K. G. Furton, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 407.
49. a) M. M. Waichigo, T. L. Riechel, N. D. Danielson, *Chromatogr.*, 61 (2005) 17. b) M. M. Waichigo, N. D. Danielson, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 599.
50. A. Berthod, M. J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 6.
51. L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 1007 (2003) 39.
52. M. P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1138.
53. A. Berthod, M. J. Ruiz-Angel, S. Huguet, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 4071.

54. J. M. Roberts, A. R. Diaz, D. T. Fortin, J. M. Friedle, S. D. Piper, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4927.
55. F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, *J. Chromatogr. A*, 1125 (2006) 182.
56. M. J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A*, 1119 (2006) 182.
57. S. J. Liu, F. Zhao, X. H. Xiao, L. Zhao, X. Liu, S. X. Jiang, *Chin. Chem. Lett.*, 15 (2004) 1060.
58. H. Qiu, S. Jiang, X. Liu, *J. Chromatogr. A*, 1103 (2006) 265.
59. Y. Sun, B. Cabovska, C. E. Evans, T. H. Ridgway, A. M. Stalcup, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 728.
60. Q. Wang, G. A. Baker, S. N. Baker, L. A. Colon, *Analyst*, 131 (2006) 1000.
61. N. V. Plechkova, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.*, 37 (2008) 123.
62. M. Volland, V. Seitz, M. Maase, M. Flores, R. Papp, K. Massonne, V. Stegmann, K. Halbritter, R. Noe, M. Bartsch, W. Siegel, M. Becker, O. Huttenloch, WO03062251, 2003.
63. M. Armand, F. Endres, D. R. MacFarlane, H. Ohno, B. Scrosati, *Nat. Mater.*, 8 (2009) 621.
64. E. Stathatos, R. Lianos, S. M. Zakeeruddin, P. Liska, M. Gratzel, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 1825.
65. W. L. Hough, M. Smiglak, H. Rodriguez, R. P. Swatloski, S. K. Spear, D. T. Daly, J. Pernak, J. E. Grisel, R. D. Carliss, M. D. Soutullo, J. H. Davis, R. D. Rogers, *New J. Chem.*, 31 (2007) 1429.
66. M. Smiglak, A. Metlen, R. D. Rogers, *Acc. Chem. Res.*, 40 (2007) 1182.
67. A. Romero, A. Santos, J. Tojo, A. Rodriguez, *J. Hazard. Materials*, 151 (2008) 268.
68. J. Dupont, *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004) 341.
69. P. Stepnowski, A. Muller, P. Behren, J. Rank, J. Hoffmann, B. Jastorff, *J. Chromatogr. A*, 993 (2003) 173.

70. B. Buszewski, S. Kowalska, P. Stepnowski, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1116.
71. P. Stepnowski, J. Nichthauser, W. Mroziak, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1483.
72. M. J. Ruiz-Angel, A. Berthod, *J. Chromatog. A*, 1113 (2006) 101.
73. M. J. Ruiz-Angel, A. Berthod, *J. Chromatog. A*, 1189 (2008) 476.
74. S. Studzińska, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 1264.
75. W. Gao, H. Yu, S. Zhou, *Chromatogr.*, 71 (2009) 475.
76. P. Stepnowski, W. Mroziak, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 149.
77. M. Molíková, S. Studzińska, P. Kosobucki, P. Jandera, B. Buszewski, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 33 (2009) 225.
78. A. Markowska, P. Stepnowski, *Anal. Sci.*, 24 (2008) 1359.
79. H. Yu, Sh. Zhou, W. Gao, Q. Chen, *Chromatogr.*, 72 (2010) 225.
80. W. Gao, H. Yu, *Anal. Lett.*, 44 (2011) 922.
81. G. Le Rouzo, C. Lamouroux, C. Bresson, A. Guichard, P. Moisy, G. Moutiers, *J. Chromatogr. A*, 1164 (2007) 139.
82. C. Lamouroux, G. Foglia, G. Le Rouzo, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3022.
83. A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 177.
84. a) B. Y. Zhu, C. T. Colin, R. S. Hodges, *Chromatogr.*, 548 (1991) 13. b) S. C. Lin, W. C. Lee, *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 302.
85. a) M. A. Strega, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2439. b) S. D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C. E. West, R. B. van Breemen, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5358.
86. R. P. W. Scott, S. Traiman, *Chromatogr.*, 196 (1980) 193.
87. D. V. McCalley, U. D. Neue, *J. Chromatogr. A*, 1192 (2008) 225.
88. A. J. Alpert, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 72.
89. P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, 26 (2006) 1784.
90. J. C. Valette, C. Demesmay, J. L. Rocca, E. Verdon, *J. Chromatogr.*, 59 (2004) 55.
91. L. Dong, J. Huang, *Chromatogr.*, 65 (2007) 519.

92. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3408.
93. G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Talanta*, 76 (2008) 522.
94. A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas, *J. Chromatogr. A*, 71 (2010) 751.
95. Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1449.
96. Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatogr.*, 66 (2007) 223.
97. M. H. Chen, C. Horvath, *J. Chromatogr. A*, 788 (1997) 51.
98. J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 965 (2002) 195.
99. G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A*, 1092 (2005) 246.
100. J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmann, M. R. Schure, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6551.
101. F. Gritti, G. Guichon, *J. Chromatogr. A*, 1099 (2005) 1.
102. E. Lundanes, T. Greibrokk, *Adv. Chromatogr.*, 44 (2006) 45.
103. Z. Hao, C. Y. Lu, B. Xiao, N. Weng, B. Parker, M. Knapp, C. T. Ho, *J. Chromatogr. A*, 1147 (2007) 165.
104. Y. Guo, S. J. Gaiki, *J. Chromatogr. A*, 1074 (2005) 71.
105. R. P. Li, X. J. Huang, *J. Chromatogr. A*, 1041 (2004) 163.
106. M. S. Ali, M. Ghori, S. Rafiuddin, A. R. Khatri, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007) 158.
107. E. S. Grumbach, D. M. Diehl, U. D. Neue, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1511.
108. W. Bicker, J. Y. Wu, M. Lammerhofer, W. Lindner, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 2971.
109. J. Y. Wu, W. Bicker, W. Lindner, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 909.
110. R. Chirita, C. West, A. Finaru, C. Elkafir, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3091.
111. A. J. Alpert, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 62.
112. P. Jandera, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2011) 1.
113. Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5920.
114. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 698.

115. B. Chauve, D. Guillarme, P. Cleon, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 752.
116. B. W. Pack, D. S. Risley, *J. Chromatogr. A*, 1073 (2005) 269.
117. Y. Hsieh, G. Galviz, B. Long, *J. Sep. Sci.*, 23 (2009) 1461.
118. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 474.
119. T. Yoshida, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3038.
120. G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A*, 1092 (2005) 246.
121. F. E. Regnier, R. Noel, *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 316.
122. P. Jandera, T. Hajek, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3603.
123. X. Liu, C. Pohl, *J. Chromatogr. A*, 1191 (2008) 83.
124. J. Pazourek, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 974.
125. P. Jandera, T. Hajek, V. Skerikova, J. Soukup, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 841.
126. D. W. Armstrong, H. L. Jin, *J. Chromatogr.*, 462 (1989) 219.
127. A. Berthod, S. S. C. Chang, J. P. S. Kullman, D. W. Armstrong, *Talanta*, 47 (1998) 1001.
128. W. Jiang, K. Irgum, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 333.
129. C. Viklund, K. Irgum, *Macromolecules*, 33 (2000) 2539.
130. B. Cai, J. Li, *Anal. Chim. Acta*, 399 (1999) 249.
131. R. LoBrutto, A. Jones, Y. V Kazakevich, *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 173.
132. J. Dai, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1072 (2005) 169.
133. M. Shibue, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 1080 (2005) 49.
134. T. Cecchi, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 38 (2008) 161.
135. M. Pathy, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 143.
136. A. dos Santos Pereira, F. David, G. Vanhoenacker, P. Sandra, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 2001.
137. L. R. Snyder, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 184 (1980) 363.
138. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, *J. Chromatogr. A*, 946 (2002) 33.

139. C. F. Poole, *The essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 2003, p. 349-359.
140. S. Espinosa, E. Bosh, M. Roses, *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 55.
141. L. G. Gagliardi, C. B. Castells, C. Rafols, M. Roses, E. Bosch, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3180.
142. D. V. McCalley., *J. Chromatogr. A*, 793 (1998) 31.
143. X. Q. Yang, J. Dai, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 996 (2003) 13.
144. W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 82.
145. M. Shibue, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 1080 (2005) 49.
146. X. Wang, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 165.
147. C. E. Wujcik, J. Tweed, E. P. Kadar, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 826.
148. E. S. Grumbach, D. M. Wagrowski-Diehl, J. R. Mazzeo, B. Alden, P. C. Iraneta, *LCGC North Am.*, 22 (2004) 1010.
149. S. M. C. Buckenmaier, D. V. McCalley, M. R. Euerby, *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004) 117.
150. R. J. M. Vervoort, E. Ruyter, A. J. J. Debets, H. A. Claessens, C. A. Cramers, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 67.
151. B. A. Bidlingmeyer, J. Henderson, *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004) 187.
152. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 169.
153. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 1171 (2007) 46.
154. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 1193 (2008) 85.