



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA**

Martynas Katelinas

Pagrindinių studijų programa Chemija – 2 kursas

Magistro baigiamasis darbas

**ATVIRKŠČIŲ FAZIŲ IR HIDROFILINĖS SAŲVEIKOS
CHROMATOGRAFIJOS METODŲ APJUNGIMAS
HIDROFILINIŲ IR HIDROFOBINIŲ JUNGINIŲ ATSKYRIMUI**

Darbo vadovas

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius 2020

TURINYS

ĮVADAS	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	4
1.1. Organinių junginių poliškumas	4
1.2. Hidrofobinių junginių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais	5
1.2.1. Normalių fazių chromatografija	5
1.2.2. Atvirkščių fazių chromatografija.....	7
1.3. Hidrofilinių junginių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais.....	10
1.3.1. Hidrofilinės sąveikos chromatografija	10
1.3.2. Jonų porų chromatografija	13
2. EKSPERIMENTO METODIKA.....	16
2.1. Aparatūra.....	16
2.2. Reagentai ir tirpalai	16
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	17
3.1. Chromatografinės sistemos ir modelinių analičių charakterizavimas	17
3.2. Atskyrimas AFCh ir HSCh metodais	21
3.3. Atskyrimo AFCh+HSCh metodu tyrimas.....	22
IŠVADOS.....	31
SUMMARY	32
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	33

IVADAS

Analizinėje praktikoje neretai pasitaiko atvejų, kai konkrečiame objekte reikia nustatyti ir labai hidrofilius, ir labai hidrofobinius junginius. Tipinis tokio atvejo pavyzdys – vandenyje ir riebaluose tirpių vitaminų nustatymas. Teoriškai populiariausiu atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodu būtų galima atskirti labai stipriai poliškumu besiskiriančius junginius panaudojant platų judrios fazės eliucinės gebos gradientą. Tokiu atveju atskyrimą reikėtų pradėti su labai silpnos eliucinės gebos judria faze (pvz., su ~90–95% vandens) ir užbaigti su daug organinio tirpiklio (pvz., acetonitrilo ar metanolio) turinčia judria faze. Tačiau naudojant tokį gradientą mėginys su analitėmis yra įleidžiamas į pradinę vandeninę judrią fazę, kurioje dėl riboto tirpumo hidrofobinės analitės iškrenta į nuosėdas. Be to, labai stipriai hidrofilingiai ir ypač jonizuoti junginiai apskritai nesulaikomi ant nepolinių atvirkščių fazių sorbentų. Todėl tokių mišinių atskyrimui daugeliu atvejų būtina naudoti du skirtingus skysčių chromatografijos metodus arba dvi atskiras analizes tuo pačiu metodu.

Magistro baigiamojo darbo tikslas – ištirti atvirkščių fazių ir hidrofilingės sąveikos chromatografijos metodų apjungimo galimybes hidrofilingių ir hidrofobinių junginių atskyrimui.

Darbo uždaviniai:

1. Parinkti modelinius junginius bei tinkamiausias kolonėles sistemos tyrimui.
2. Ištirti įvairių veiksmų įtaką hidrofobinių ir hidrofilingių junginių chromatografinėi elgsenai.
3. Pritaikyti sistemą vandenyje ir riebaluose tirpiems vitaminams atskirti ir nustatyti.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Organinių junginių poliškumas

Organinių junginių atskyrimas adsorbcinės bei pasiskirstomosios skysčių chromatografijos metodais pagrįstas analičių poliškumo skirtumais. Todėl prognozuojant ir optimizuojant įvairių junginių atskyrimo sąlygas, tiriant jų chromatografinę elgseną, svarbu gebėti patikimai įvertinti tiriamų junginių poliškumą. Įprastai chromatografijoje analičių poliškumas vertinamas jų pasiskirstymo tarp n-oktanolio ir vandens koeficientu K_{ow} [1]:

$$K_{ow} = \frac{[A]_o}{[A]_w}$$

$[A]_o$ ir $[A]_w$ – tiriamo junginio A koncentracijos oktanolio ir vandeninėje fazėse nusistovėjus pusiausvyrai esant pastoviai (25 °C) temperatūrai.

Yra nemažai junginių, kurie vienoje ar abiejose fazėse gali egzistuoti keliose skirtingo poliškumo formose. Pvz., rūgštys ar bazės vandeninėje fazėje tam tikroje pH srityje gali egzistuoti ir neutralioje, ir jonizuotoje formose. Tokių junginių poliškumas gali būti vertinamas dviem dydžiais – pasiskirstymo koeficientu P arba dalijimosi santykiu D [2]. Pasiskirstymo koeficientas P parodo tik neutralios junginio formos pasiskirstymą tarp oktanolio ir vandens:

$$P_{ow} = \frac{[A]_o}{[A]_w}$$

$[A]_o$ ir $[A]_w$ – tiriamo junginio A neutralios formos koncentracijos oktanolio ir vandeninėje fazėse nusistovėjus pusiausvyrai esant pastoviai (25 °C) temperatūrai.

Tuo tarpu dalijimosi santykis D rodo visų galimų junginio formų suminės koncentracijos pasiskirstymą tarp fazių:

$$D_{ow} = \frac{c(A)_o}{c(A)_w}$$

$c(A)_o$ ir $c(A)_w$ – tiriamo junginio A bendros koncentracijos oktanolio ir vandeninėje fazėse nusistovėjus pusiausvyrai esant pastoviai (25 °C) temperatūrai ir fiksuotai vandeninės fazės pH vertei.

Patogumo sumetimais dažniau naudojami pasiskirstymo koeficiento ar dalijimosi santykio logaritmai: $\lg K_{ow}$, $\lg P_{ow}$, $\lg D_{ow}$. Kuo didesnė koeficiento/santykio ar jo logaritmo vertė duotam junginiui, tuo hidrofobiškesnis šis junginys, t.y. tuo blogiau jis tirpus vandenyje.

Pasiskirstymo koeficientai nustatomi eksperimentiškai: nusistovėjus pusiausvyrai, išmatuojama tiriamo junginio koncentracija abiejose fazėse arba vienoje iš fazių spektriniais, chromatografiniais, elektrocheminiais ir kt. metodais [3]. Tačiau labai hidrofiliinių ir labai

hidrofobinių junginių poliškumo eksperimentinis įvertinimas komplikotas, kadangi sunku patikimai nustatyti ypač mažas tokių junginių koncentracijas vienoje iš fazių. Tokiems junginiams naudojamos specialios skaičiuoklės, įvertinančios junginio struktūrą bei funkcines grupes [4].

Griežto kriterijaus, skiriančio hidrofilinius ir hidrofobinius junginius, nėra, tačiau chromatografijoje labai hidrofiliniais įprastai laikomi junginiai, kuriems $\lg P_{ow} \leq 0$, o labai hidrofobiniais – junginiai, kuriems $\lg P_{ow} \geq 4$. Toliau būtent ir bus aptariami šių dviejų junginių grupių analizei tinkamiausi skysčių chromatografijos metodai.

1.2. Hidrofobinių junginių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais

Labai hidrofobiniams junginiams atskirti yra naudojami du skysčių chromatografijos metodai: normalių fazių chromatografija ir atvirkščių fazių chromatografija.

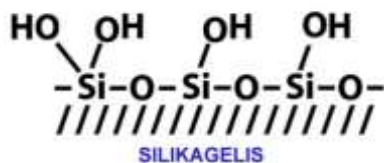
1.2.1. Normalių fazių chromatografija

Šio tipo chromatografija yra viena seniausių naudojamų skysčių chromatografijos rūšių, pirmą kartą panaudota 1906 metais augalų pigmentų atskyrimui. Normalių fazių chromatografijoje atskyrimui naudojami poliniai sorbentai, o judriomis fazėmis naudojami nepoliniai, dažniausiai organinės kilmės, tirpikliai arba jų mišiniai. Populiariausi normalių fazių chromatografijos adsorbentai ir judrios fazės surašytos **1.1 lentelėje**.

1.1 Lentelė. Populiariausi normalių fazių chromatografijos adsorbentai ir judrios fazės [5].

Adsorbento matrica	Prijungta funkcinė grupė	Adsorbento funkcinės grupės struktūra	Judrios fazės
Silikagelis	Nemodifikuotas	$\equiv\text{Si-OH}$	n-Pentanas n-Heksanas Cikloheksanas
	Amino	$-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$	Tetrachlormetanas
	Ciano	$-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$	Benzenas
	Diolio	$-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$	Dietiloeteris
	Amido	$-(\text{CH}_2)_3\text{-CO-NH-CH}_3$	Chloroformas Tetrahidrofuranas Acetonas

Plačiausiai iki šiol naudojamas sorbentas – nemodifikuotas silikagelis ($[\text{SiO}_2]_x \cdot [\text{H}_2\text{O}]_y$). Silikagelio sorbento paviršius susideda beveik vien iš hidroksilinių grupių, kurios dar vadinamos silanolinėmis, nes yra prijungtos tiesiogiai prie silicio atomų, kaip pavaizduota **1.1 pav.**

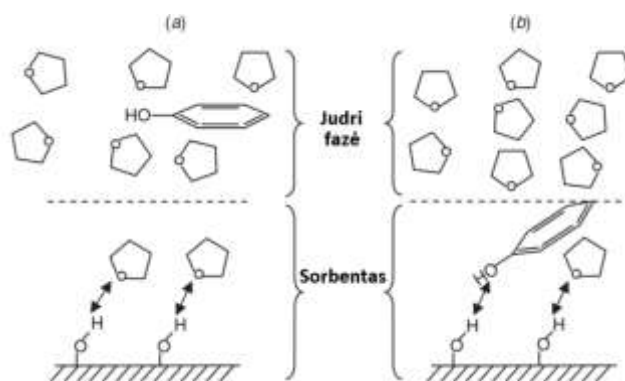


1.1 pav. Silikagelio sorbento paviršius

Normalių fazių chromatografijoje sorbentu taip pat gali būti naudojamas Al_2O_3 arba polinėmis funkcinėmis grupėmis modifikuotas silikagelis. Pasitelkiant skirtingų modifikacijų silikagelį (skirtingus prijungtus ligandus) įvairinamos analičių adsorbcijos ant sorbento paviršiaus galimybės [6].

Analičių sulaikymas ir eliucija šiame metode vyksta taip vadinamu išstūmimo (arba pakaitų) principu [6]. Kondicionuojant polinį sorbentą (pvz., silikagelį) nepoline judria faze, jo paviršiuje adsorbuojasi judrios fazės tirpiklio (pvz., tetrahidrofurano, **1.2 pav.**) monosluoksnis. Patekus į kolonėlę analitės (pvz., fenolio) zonos, analitės molekulės adsorbuojasi pakeisdamos sorbento paviršiuje adsorbuotas tirpiklio molekules. Kadangi judri fazė nepertraukiamai teka, jos tirpiklio molekulės išstumia analitę, kuri nunešama kolonėle žemyn, kur ir vėl adsorbuojasi. Tokiu būdu atskyrimo proceso metu vyksta daugiakartinis analitės sorbcijos/desorbcijos procesas.

Adsorbcija ant sorbento paviršiaus įprastai vyksta dipolis-indukuotas dipolis, dipolis-dipolis arba vandenilinio ryšio sąveikomis tarp tiriamų junginių ir sorbento polinių funkcinė grupių.



1.2 pav. Fenolio adsorbcija silikagelio paviršiuje normalių fazių chromatografijoje. (a) – judrios fazės tirpiklio (tetrahidrofurano) molekulių adsorbcija; (b) – fenolio adsorbcija išstumiant sorbento paviršiuje adsorbuotą tirpiklio molekulę

Kaip minėta anksčiau, judriomis fazėmis šiame metode dažniausiai naudojami nepoliniai organiniai tirpikliai, kurie pasižymi silpna eliucine geba. Kuo tirpiklis poliškesnis, tuo stipresne

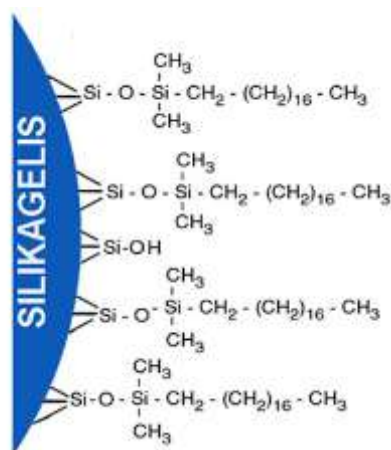
eliucine geba jis pasižymės ir analizės bus silpniau sulaikomos, todėl bus išstumiamos iš kolonėlės greičiau.

Reikšmingiausias metodo trūkumas – milžiniškas jautrumas vandeniui. Net judrioje fazėje ar mėginyje esančio vandens pėdsakai gali sukelti negrįžtamą žalą sorbentui. Vandens molekulės labai stipriai adsorbuojasi silikagelio paviršiuje, dėl ko pablogėja kolonėlės veikimas, o regeneruoti jos dažnai net neįmanoma. Be to, polinių sorbentų paviršiuje lėtai nusistovi pusiausvyros (ypač silikagelyje), todėl pakeitus judrios fazės sudėtį, būtina ilgai kondicionuoti kolonėlę. Tai apsunkina gradientinės eliucijos panaudojimą. Dėl šių pagrindinių trūkumų normalių fazių chromatografija šiuo metu yra naudojama retai. Metodas taikomas tada, kai tikslinių junginių atskyrimui neįmanoma panaudoti atvirkščių fazių chromatografijos [6]. Dažniausiai šiuo metodu tiriami labai hidrofobiški, blogai tirpstantys atvirkščių fazių chromatografijoje naudojamose polinėse judrioje fazėse junginiai, tokie, kaip, pvz., aromatiniai angliavandeniliai, riebaluose tirpūs vitaminai ir pan.

1.2.2. Atvirkščių fazių chromatografija

Atvirkščių fazių chromatografija yra vienas populiariausių ir plačiausiai taikomų skysčių chromatografijoje medžiagų mišinių atskyrimo metodų. Šiame metode judri fazė yra poliškesnė už stacionarią. Tarp analizės ir stacionarios fazės dažniausiai pasireiškia ir yra pageidaujama hidrofobinė sąveika [8].

Atvirkščių fazių chromatografijoje dažniausiai naudojami silikagelio sorbentai su imobilizuotais oktadecilo (C18) ligandais (**1.3 pav.**).

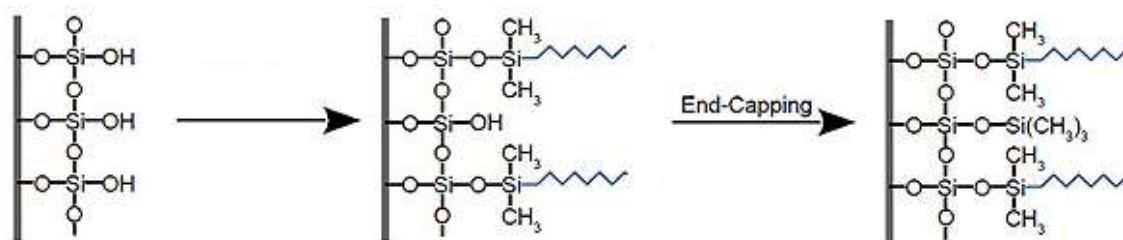


1.3 pav. C18 sorbento struktūra

Šiam metodui taip pat naudojami ir kiti sorbentai, tokie, kaip oktalo (C8), heksilo (C6), butilo (C4), metilo (C1) ar fenilo (C₆H₅) ligandais modifikuotas silikagelis. Kuo poliškesnis prijungtas

ligandas, tuo silpniau sulaikomos analitės. Kolonėlės parenkamos atsižvelgiant į analičių savybes (poliškumą, aromatiškumą ir pan.), o ligando prigimtis turi didelę įtaką atskyrimo atrankumui [6].

Pagaminti sorbentai dažnai turi laisvų silanolinių grupių, kurios mažina kolonėlės efektyvumą poliniams junginiams ir ypač baziniams junginiams. Problemai spręsti likusios nepakeistos reikalingu ligandu silanolinės grupės „deaktyvuojamos“ (angl. *end-capping*) trimetilsilanolio pagalba [9]. **1.4 pav.** pateiktas pavyzdys C8 sorbentui.



1.4 pav. Silikagelio „deaktyvavimo“ schema

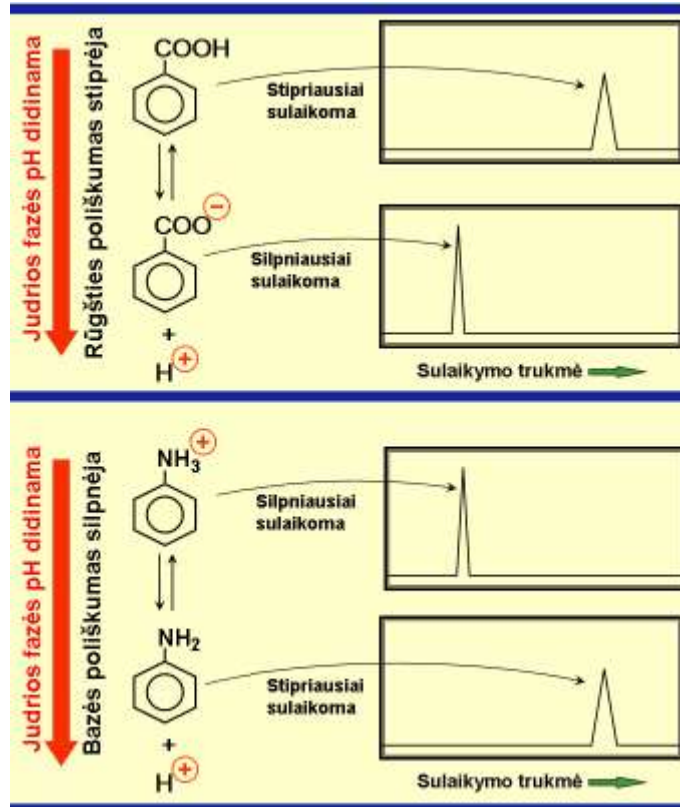
Atvirkščių fazių chromatografijoje, priešingai nei normalių fazių variante, naudojamos polinės judrios fazės: vanduo, acetonitrilas, metanolis, etanolis ir pan. Polinių tirpiklių eliucinė geba nepoliniams atvirkščių fazių sorbentams stiprėja tokia tvarka:



Dažniausiai judriomis fazėmis naudojami vandens-acetonitrilo arba vandens-metanolio mišiniai [7]. Judrios fazės eliucinė geba stiprėja, mažėjant vandens koncentracijai judrioje fazėje, t.y. mažėjant judrios fazės poliškumui. Analčių prigimtis taip pat įtakoja atskyrimo atrankumą.

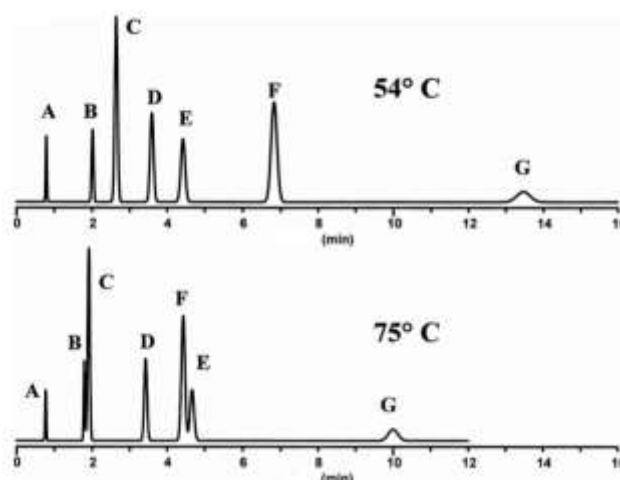
Judri fazė gali būti modifikuojama didinant joninę jėgą (pridedant druskų), taip padidinant jos poliškumą. Dėl šios priežasties eliucinė geba susilpnėja, o neutralių analčių sulaikymo trukmė padidėja. Skirtingas efektas gaunamas krūvį turinčioms analitėms, kurių sulaikymo trukmė sumažėja (silpnėja tarpjoninės sąveikos) [10].

Atskiriant silpnomis rūgštinėmis ar bazinėmis savybėmis pasižyminčius junginius labai svarbiu veiksniu yra judrios fazės pH [5]. Neutrali (nedisocijavusi) analitės forma atvirkščių fazių chromatografijoje bus sulaikoma stipriau (ji mažiau polinė), nei disocijavusi ir krūvį turinti forma. Tokiai analitei keičiant judrios fazės pH intervale, kuriame vyksta jos disociacija/protonizacija, analitės sulaikymo trukmė reikšmingai keisis. Tai iliustruoja **1.5 pav.** pateikta schema.



1.5 pav. Judrios fazės pH įtaka silpnos rūgšties ir silpnos bazės sulaikymui atvirkščių fazių chromatografijoje

Kolonėlės temperatūra turi įtaką analičių sulaikymui ir atskyrimui. Didinant temperatūrą galima sumažinti judrios fazės klampą (sumažėja slėgis prieš kolonėlę), dažniausiai mažėja analičių pasiskirstymo tarp fazių konstanta, dėl ko sulaikymas susilpnėja (**1.6 pav.**). Taip pat greitėja analičių difuzija judrioje fazėje, vyksta greitesni masių mainai, didėja efektyvumas ir atskyrimo atrankumas [11].



1.6 pav. Kolonėlės temperatūros įtaka analičių sulaikymui ir atskyrimui

Atvirkščių fazių chromatografijos metodas populiarus dėl kelių priežasčių. Viena iš jų yra ta, kad šiuo metodu galima analizuoti labai platų organinių junginių spektrą, kadangi dauguma junginių turi tam tikras hidrofobines sritis molekulėje, galinčias sąveikauti su nepoliniais sorbentais [12]. Metodas gerai tinka įvairiausių organinių junginių atskyrimui ir nustatymui: karboksirūgštys, aminorūgštys, aminorai, amidai, nitrojunginiai, alkoholiai, eteriai, esteriai, aldehidai, aromatiniai, sotūs ir nesotūs angliavandeniliai, metalų kompleksai su organiniais ligandais ir kt. Pastaraisiais metais atvirkščių fazių chromatografija labai plačiai naudojama peptidų ir baltymų analizei (proteomikoje) [5].

Pagrindinė metodo problema – labai polinių neutralių ir ypač jonizuotų junginių atskyrimas, kadangi tokie junginiai nesulaikomi arba silpnai sulaikomi ant nepolinių sorbentų.

1.3. Hidrofilinių junginių atskyrimas skysčių chromatografijos metodais

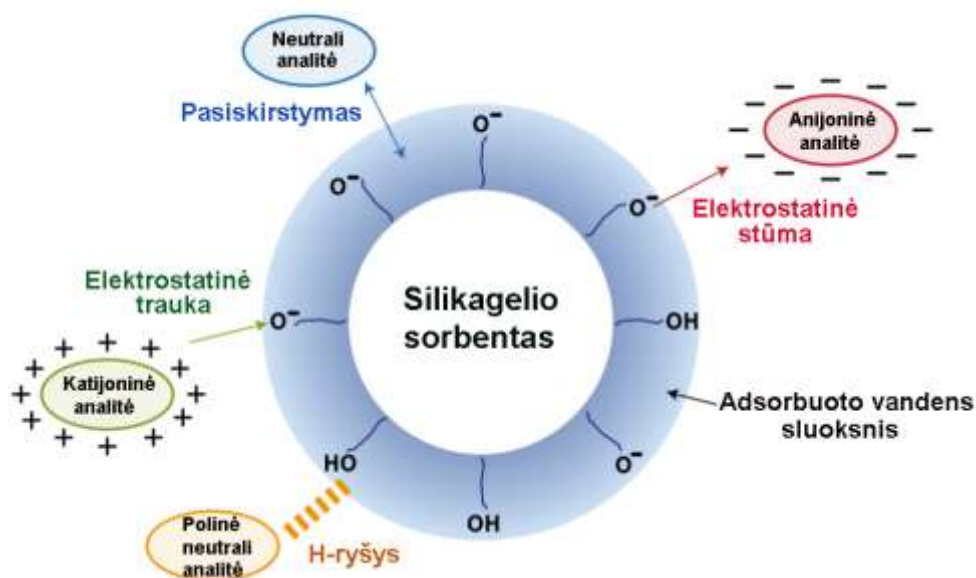
1.3.1. Hidrofilinės sąveikos chromatografija

Ilgą laiką labai polinių neutralių ir jonizuotų organinių junginių atskyrimui skysčių chromatografijos metodais nebuvo tinkamo metodo. Normalių fazių chromatografijoje tokie junginiai labai stipriai sulaikomi bei dažnai blogai tirpsta nepolinėse judrios fazės. Atvirkščių fazių chromatografijoje, priešingai, tokie junginiai labai silpnai sulaikomi, todėl sunkiai atskiriami. Ir tik 1990 m. buvo pasiūlytas naujas skysčių chromatografijos metodas – hidrofilinės sąveikos chromatografija [13]. Šis skysčių chromatografijos variantas skirtas labai polinių neutralių ir joninių medžiagų atskyrimui. Metodas naudojamas junginių atskyrimui, kurių $\lg K_{ow} < 1$.

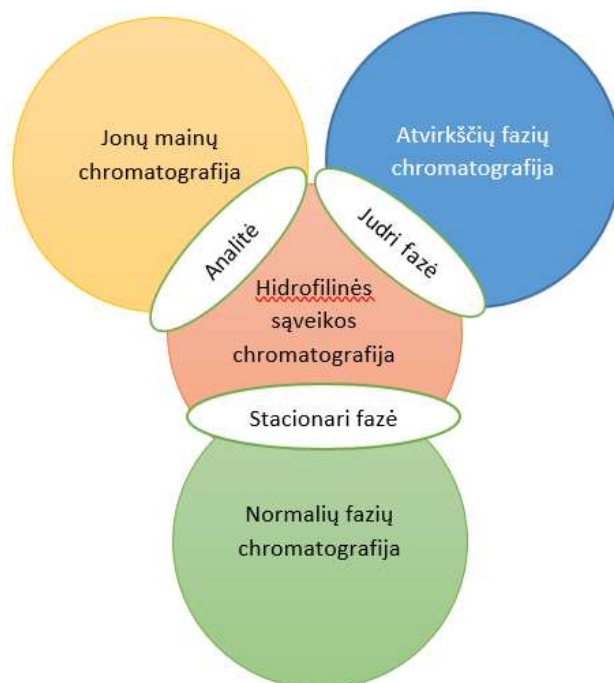
Šiame metode naudojami poliniai normalių fazių chromatografijos sorbentai ir polinės, būtina vandens turinčios atvirkščių fazių chromatografijos judrios fazės. Dominuojantis analičių sulaikymo mechanizmas, paaiškinantis analičių atskyrimą šiame metode – analičių pasiskirstymas tarp polinio sorbento paviršiuje adsorbuoto vandens sluoksnio ir mažiau polinės judrios fazės. Kartu su pasiskirstymu dažnai pasireiškia ir antrinės sąveikos (vandenilinis ryšys, jonas-dipolis, jonas-jonas) su sorbento paviršiuje esančiomis funkcinėmis grupėmis (**1.7 pav.**), priklausančios nuo analičių ir sorbento prigimties [14].

Hidrofilinės sąveikos chromatografija yra panaši į normalių fazių chromatografijos metodą, nes analičių sulaikymas stiprėja, stiprėjant analitės poliškumui ir/arba silpnėjant judrios fazės poliškumui [13]. Taip pat šiame metode naudojamos normalių fazių chromatografijos stacionarios fazės, o judrios fazės panašios į naudojamas atvirkščių fazių chromatografijoje [15].

Be to, šiuo metodu puikiai atskiriami ne tik poliniai neutralūs, bet ir jonizuoti junginiai. Tokiu būdu hidrofilinės sąveikos chromatografija tarsi susieja tris skirtingus skysčių chromatografijos variantus: normalių fazių (sorbentai), atvirkščių fazių (judrios fazės) ir jonų mainų (joninės analitės) chromatografiją [16]. Tai iliustruoja **1.8 pav.** pavaizduota schema.




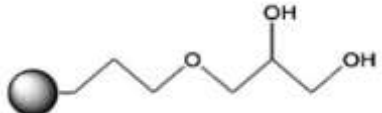


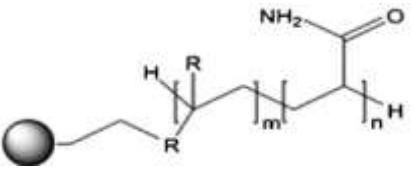

1.7 pav. Analitės-sorbento sąveikos ant nemodifikuoto silikagelio sorbento hidrofilinės sąveikos chromatografijoje



1.8 pav. Hidrofilinės sąveikos chromatografijos sąsajos su kitais skysčių chromatografijos metodais

Hidrofilinės sąveikos chromatografijoje dažniausiai naudojami ir plačiausiai taikomi sorbentai bei jų struktūros pavaizduoti **1.2 lentelėje** [16].

1.2 lentelė. Hidrofilinės sąveikos chromatografijos sorbentai ir jų struktūros.

Pavadinimas	Struktūra
Nederivatizuotas silikagelis, turintis silanolio ir siloksano funkcinių grupių	
Silikagelis su prijungtais diolio ligandais	
Silikagelis su prijungtais ciano ligandais	
Silikagelis su prijungtais amino ligandais	
Silikagelis su prijungtais karbamoilo (amido) ligandais	
Silikagelis su prijungtais cviterjoniniais sulfobetaino ligandais	

Tipinės judrios fazės, naudojamos hidrofilinės sąveikos chromatografijoje, susideda iš didelio kiekio su vandeniu besimaišančio polinio organinio tirpiklio (dažniausiai acetonitrilo) ir nedidelio kiekio (~5–30% v/v) vandens. Judriai fazei paruošti galima naudoti ir aprotoninius polinius organinius tirpiklius, kurie maišosi su vandeniu (tetrahidrofuraną, dioksaną ir kt.) [14] bei alkoholius [13]. Organinių tirpiklių judriai fazei ruošti pasirinkimas palengvinamas sudarius eliotropinę eilę, kurioje tirpikliai išrikiuoti pagal jų eliuacinę gebą [16]. Hidrofilinės sąveikos chromatografijoje polinių tirpiklių eliuacinė geba stiprėja tokia tvarka: acetonas < izopropanolis < acetonitrilas < etanolis < dioksanas < dimetilformamidas < metanolis < vanduo.

Tačiau acetonitrilą judrioje fazėje pakeitus kitu poliniu organiniu tirpikliu, dažniausiai smarkiai pablogėja efektyvumas, todėl beveik visuose atskyrimuose organiniu judrios fazės tirpikliu yra naudojamas acetonitrilas.

Druskų priedai (amonio acetatas ar formiatas) įprastai naudojami judrios fazės pH ir joninės jėgos kontrolei. Šiame metode jie stipriai įtakoja analičių poliškumą bei jų antrines elektrostazines sąveikas su sorbentu, o tai įtakoja ir jų sulaikymo stiprumą [16].

Pirmieji chromatografiniai atskyrimai naudojant polinius sorbentus ir polines judrias fazes buvo atlikti dar 1975 metais, kai sacharidų analizei panaudotas silikagelis su prijungtais amino ligandais, o judri fazė – acetonitrilas-vanduo (75:25 v/v) [17]. Dioliu modifikuotas silikagelio sorbentas panaudotas baltymų analizei [18]. Karbamoilo (amido) ligandais derivatizuotas silikagelis pasitelktas efektyviam peptidų atskyrimui [19]. Tačiau tuose darbuose šis atskyrimo režimas buvo traktuojamas kaip normalių fazių chromatografija ir po to dar maždaug 3 dešimtmečius metodas buvo nepelnytai pamirštas. Ir tik po 2000 m. kilo didžiulis susidomėjimas šiuo skysčių chromatografijos metodu [14].

Per paskutinius 15 metų hidrofiliinės sąveikos chromatografija rado itin platų pritaikymą analizuojant tiek mažas, tiek dideles polines molekules: biomarkerius [20], metabolitus [21], aminorūgštis [22], peptidus [14], sacharidus [23], alkaloidus, nukleotidus ir kt.

Šis skysčių chromatografijos variantas lengvai suderinamas su daugeliu detekcijos būdų: UV absorbcijos [24], fluorescenciniu [25], masių spektrometrijos ir kt. Ypač idealiai metodas tinkamas apjungimui su masių spektrometrija, kadangi daug acetonitrilo turinčiose lakiose judrioje fazėje polinės/joninės analitės yra labai efektyviai jonizuojamos elektropurkštuvinės jonizacijos būdu [16, 26].

Hidrofiliinės sąveikos chromatografija yra nepakeičiamas metodas analizuoti sudėtingus polinių/joninių junginių mišinius, kuriuose esančios analitės atvirkščių fazių chromatografijos metode yra visai ar beveik nesulaikomos.

1.3.2. Jonų porų chromatografija

Šis skysčių chromatografijos metodas skirtas tik turinčių krūvį junginių atskyrimui. Naudojant įprastą atvirkščių fazių chromatografiją jonogeninės analitės yra visiškai nesulaikomos ant hidrofobinės stacionarios fazės [27]. Siekiant krūvį turinčių analičių sulaikymo ant įprastų nepolinių atvirkščių fazių metodo sorbentų, būtina papildomai į judrią fazę pridėti jonų porų reagento. Jonų porų reagentas – tai junginys, turintis ilgą hidrofobinę grandinę ir krūvį. Šis jonų porų reagento apibūdinimas yra teisingas tik kalbant apie mažų neorganinių jonų atskyrimą jonų porų chromatografijos metodu. Tuo tarpu atskiriant didesnius organinius jonus (pvz., peptidus, baltymus ir pan.), jonų porų reagentais naudojami ir nedideli, neturintys hidrofobinio fragmento

jonai (pvz., trifluoracetatas, perchloratas). **1.3 lentelėje** pateikti populiariausi katijoniniai ir anijoniniai jonų porų reagentai [28].

1.3 lentelė. Populiariausi jonų porų reagentai.

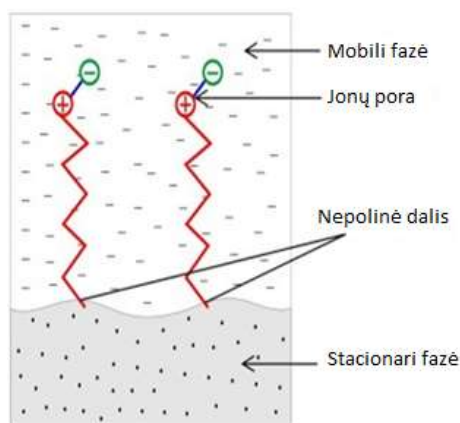
Katijoniniai	Anijoniniai
Trietilaminas	ClO_4^-
Tetraalkilamonio (C1-C6) katijonai	CF_3COO^-
Cetiltrimetilamonis	Heksafluorfosfatas PF_6^-
Oktilaminas	Pentafluorpropionatas
(priešjonai – OH^- , HCOO^- , CH_3COO^- , Cl^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- ir pan.)	Alkansulfonatai (C1-C8)
	Oktilsulfatas
	Dodecilsulfatas
	(priešjonai – H^+ , NH_4^+ , Na^+ , ir pan.)

Jonų porų chromatografijoje atskyrimui naudojami atvirkščių fazių skysčių chromatografijos sorbentai (silikagelis, modifikuotas C8, C18, fenilo ligandais). Taip pat gali būti naudojami ir paprasti nepoliniai organiniai polimeriniai (pvz., polistireno-divinilbenzeno ir kt.) sorbentai [29].

Judriomis fazėmis naudojamos atvirkščių fazių metodui įprastos tirpiklių kombinacijos (vanduo/acetonitrilas arba vanduo/metanolis) su jonų porų reagento priedu [30]. Jonų porų reagento koncentracija judrioje fazėje lemia reagento hidrofobiškumą: kuo hidrofobiškesnis reagentas, tuo mažesnė jo koncentracija turi būti judrioje fazėje. Todėl hidrofobinių reagentų (pvz., oktilamino, dodecilsulfato) koncentracija judrioje fazėje įprastai palaikoma 0,1–5 mmol/L intervale, o hidrofilinių (pvz., trietilamino, perchlorato) gali siekti ir 100 mmol/L. Judrios fazės pH stabilumui užtikrinti papildomai į ją dedamas buferis.

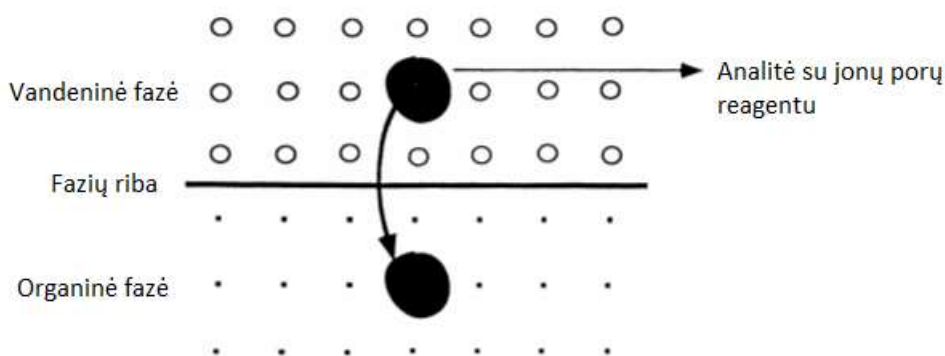
Atskiriant anijonus, į judrią fazę dedamas katijoninis jonų porų reagentas, o atskiriant katijonus, priešingai – anijoninis reagentas. Jonų porų reagentas parenkamas atsižvelgiant į atskiriamų jonų dydį: didelės molekulinės masės jonams atskirti naudojami maži jonų porų reagentai ir atvirkščiai.

Jonų atskyrimo mechanizmas šiame metode priklauso nuo jonų porų reagento prigimties. Naudojant didelius jonų porų reagentus atskyrimas vyksta jonų mainų principu. Į judrią fazę pridėtas jonų porų reagentas hidrofobine dalimi yra adsorbuojamas nepolinės stacionarios fazės paviršiuje, o krūvį turinti reagento dalis yra nukreipta į išorę, kaip parodyta **1.11 paveiksle**. Kitaip sakant, sorbento paviršiuje susiformuoja jonų mainų grupių sluoksnis ir priešingo krūvio analitės yra sulaikomos vykstant jonų mainams tarp analitės ir jonų porų reagento priešonio [28].



1.11 pav. Jonų atskyrimas jonų mainų mechanizmu

Naudojant mažos molekulinės masės jonų porų reagentą (atskiriant didelius jonus) atskyrimas vyksta taip vadinamu jonų porų mechanizmu (**1.12 pav.**). Analitė su priešingo krūvio jonų porų reagentu judrioje fazėje sudaro neutralią jonų porą, kuri adsorbuojasi nepolinio sorbento paviršiuje [31].



1.12 pav. Jonų atskyrimas jonų porų mechanizmu

Atskyrimo atrankumą galima keisti kontroliuojant du pagrindinius parametrus: jonų porų reagento tipą ir jo koncentraciją [28]. Pagrindiniai jonų porų chromatografijos trūkumai:

1. Dėl nedidelio daugelio jonų porų reagentų lakumo metodas sunkiai suderinamas su masių spektrometriniu detektoriumi.
2. Ilgai trunka kolonėlės kondicionavimas.
3. Ilgagrandžiai jonų porų reagentai sunkiai išplaunami iš kolonėlės.

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Aparatūra

Tyrimai buvo atlikti Waters™ Acquity UPLC ultraefektyviosios skysčių chromatografijos įranga, sukomplektuota iš aukšto slėgio dviejų kanalų gradientinio siurblio su judrios fazės nudujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos ir skenuojančio (190–500 nm) fotodiodinės matricos (PDA) detektoriaus.

Darbui buvo naudojamos Acquity UPLC BEH C18 (2,1×50 mm, 1,7 μm), Acquity UPLC BEH C8 (2,1×100 mm, 1,7 μm), Acquity UPLC BEH Phenyl (2,1×100 mm, 1,7 μm) ir Acquity UPLC BEH HILIC (2,1×100 mm, 1,7 μm) chromatografinės kolonėlės (Waters™). Judrios fazės srauto greitis – 0,25 mL/min. Kolonėlės temperatūra – 25 °C, įleidžiamo mėginio tūris – 2 μL.

2.2. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudoti šie reagentai ir tirpalai:

Kreatininas, grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Melaminas, grynumas ≥99% (Sigma Aldrich);

Menachinonas (vitaminas K2), grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Nikotinamidas (vitaminas B3), grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Riboflavinas (vitaminas B2), grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Retinilo acetatas (vitaminas A), grynumas ≥97% (Merck);

Sudanai I-IV, grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Triptaminas, grynumas ≥97% (Sigma Aldrich);

Tiraminas, grynumas ≥98% (Sigma Aldrich);

Acto rūgštis, LC-MS grynumas (Sigma Aldrich);

Amonio acetatas, LC-MS grynumas (Sigma Aldrich);

Acetonitrilas (ACN), gradientinės HPLC grynumas (ROTH);

Metanolis (MeOH), gradientinės HPLC grynumas (Sigma-Aldrich);

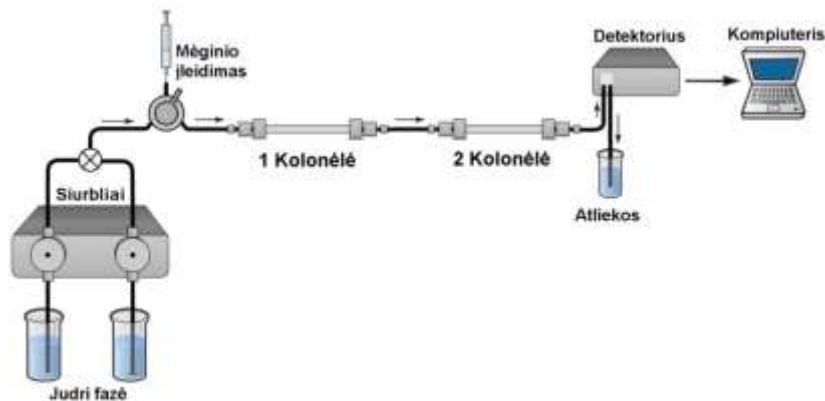
Acto rūgšties etilo esteris (etilacetatas), HPLC grynumas (Sigma-Aldrich).

Pirminiai standartiniai 1,00 g/L koncentracijos hidrofilinių analizių tirpalai buvo ruošiami iš svėrinčių tirpinant MeOH/H₂O (1:1 v/v) mišinyje. Pirminiai standartiniai 1,00 g/L koncentracijos hidrofobinių analizių tirpalai buvo ruošiami iš svėrinčių tirpinant jas etilacetate. Mažesnės koncentracijos (10 mg/L) analizių tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminius standartus atitinkamoje judrioje fazėje. Visi judrios fazės tirpalai buvo filtruojami 0,2 μm membraniniu filtru.

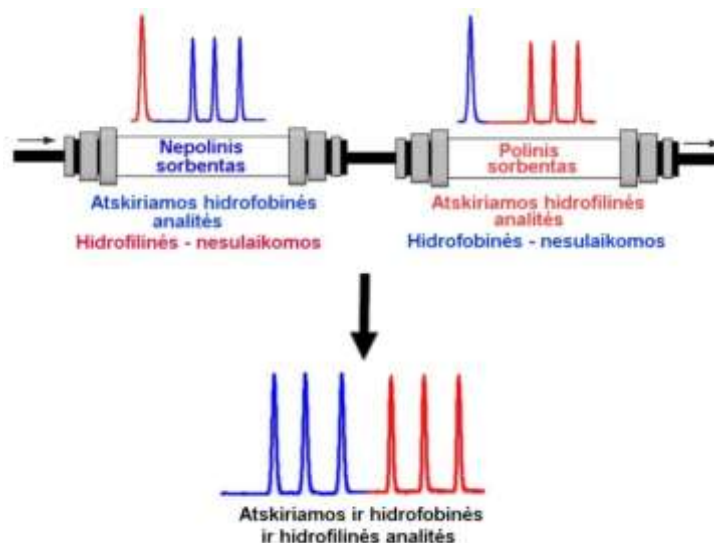
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Chromatografinės sistemos ir modeliųjų analičių charakterizavimas

Kaip matyti iš literatūros apžvalgoje pateiktos medžiagos, hidrofobinių junginių atskyrimui geriausiai tinka atvirkščių fazių chromatografijos (AFCh) variantas. Tuo tarpu idealus metodas neutraliems ir jonizuotiems hidrofiliniams junginiams atskirti – hidrofilinės sąveikos chromatografija (HSCh). Šiame darbe siūloma apjungti šiuos metodus, nuosekliai sujungus dvi skirtingo poliškumo kolonėles (**3.1 pav.**) bei parinkus tinkamą judrios fazės sudėtį. Abu metodai puikiai dera apjungimui dėl jų judrių fazių suderinamumo. Tiek AFCh metode hidrofobinių junginių atskyrimui, tiek ir HSCh metode hidrofilinių junginių atskyrimui naudojamos panašios sudėties daug acetonitrilo (80–100%) turinčios judrios fazės. Atskyrimo principą iliustruoja **3.2 pav.** pateikta schema.



3.1 pav. Chromatografinės sistemos principinė schema

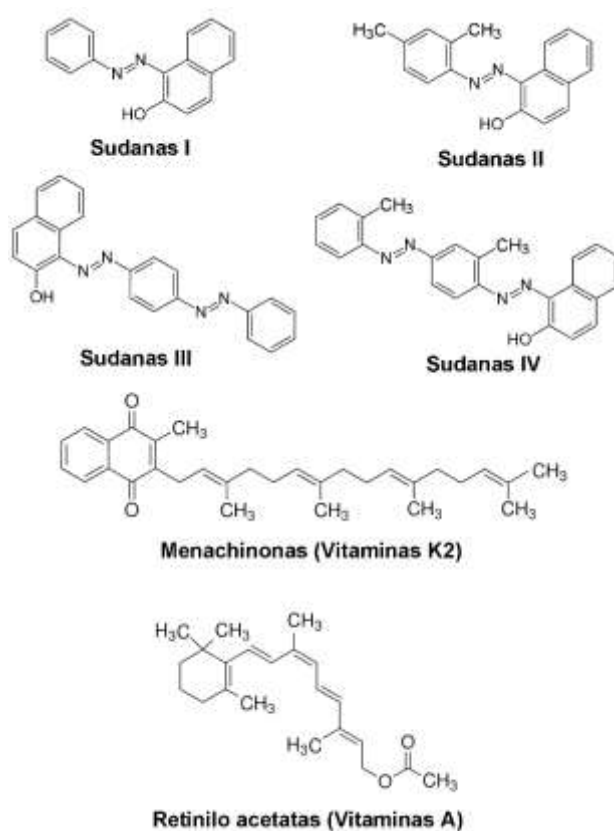


3.2 pav. Hidrofobinių ir hidrofilinių junginių atskyrimo AFCh+HSCh metodu principas

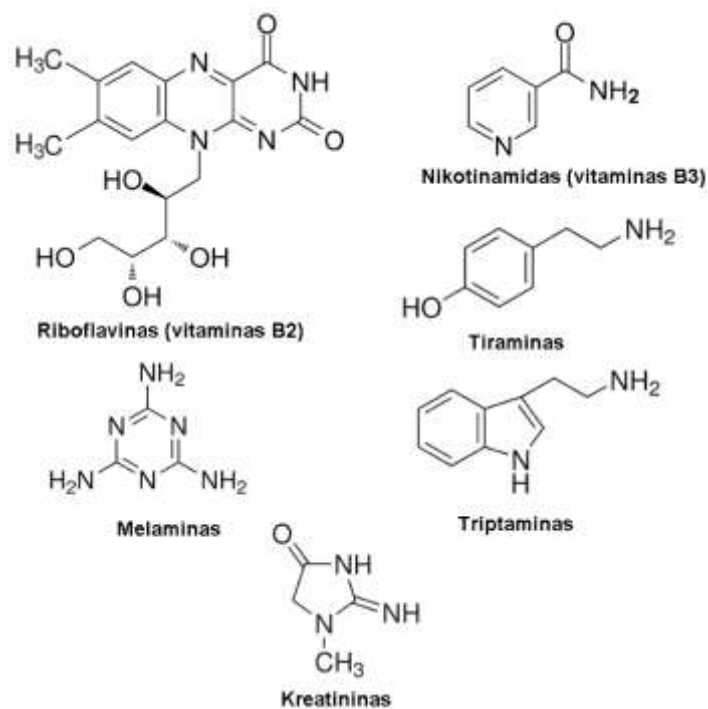
Būtina pažymėti, kad nuosekliai sujungus dvi chromatografines kolonėles, slėgis prieš kolonėlę padidėja maždaug dvigubai ir tai gali sukelti įrangos eksploatavimo sunkumų. Tačiau šiuolaikinė ultraefektyviosios chromatografijos įranga pritaikyta darbui su labai dideliais slėgiais (iki 1000 bar). Be to, tiriamame dviejų kolonelių metode bus naudojamos daug labai maža klampa pasižyminčio acetonitrilo turinčios judrios fazės, todėl slėgio problemų neturėtų kilti.

Naujos chromatografinės sistemos tyrimui modelinėmis analitėmis įprastai pasirenkami stabilūs ir patikimai nustatomi junginiai. Remdamiesi šiais kriterijais, pasirinkome 6 hidrofobinius junginius ir 6 hidrofilinius junginius. Jų struktūros pateiktos 3.3 ir 3.4 paveiksluose, o 3.1 lentelėje surašytos jų $\lg P_{ow}$ vertės. Pagal lentelėje pateiktas neutralioms junginių formoms nustatytas $\lg P_{ow}$ vertes tiraminas ir ypač triptaminas priskiriami vidutinio poliškumo junginiams, tačiau darbe naudotose judriose fazėse ($pH \leq 7,0$) jie egzistuoja žymiai poliškesnėse protonizuotose formose.

3.5 ir 3.6 pav. pavaizduoti PDA detektoriumi išmatuoti modeliųjų junginių absorbcijos spektrai. Kadangi atliekamiems tyrimams nustatymo jautris nebuvo svarbus, hidrofilinius junginius registravome 230 nm bangos ilgyje, hidrofobinius (išskyrus vitaminą A) – 240 nm bangos ilgyje. Vitaminas A buvo registruojamas 330 nm bangos ilgyje.



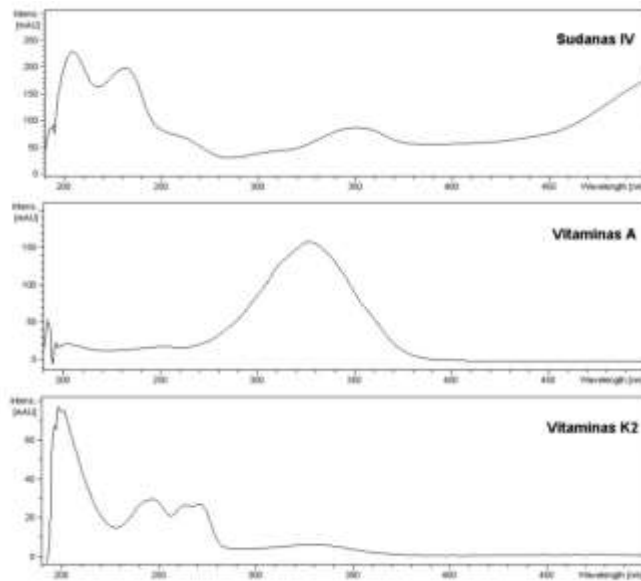
3.3 pav. Hidrofobinių analičių struktūros



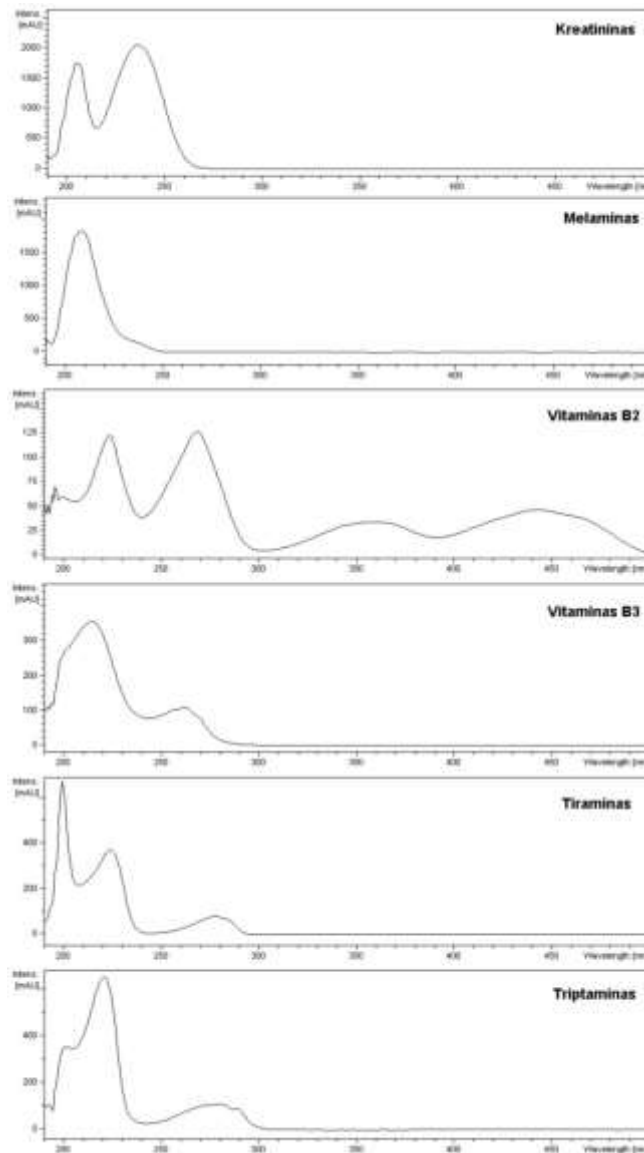
3.4 pav. Hidrofilinių analičių struktūros

3.1 lentelė. Modelinių analičių pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientai [32].

Analitė	Santrumpa	lg P _{ow}
Kreatininas	Kre	-1,76
Riboflaviną (vitaminas B2)	B2	-1,46
Melaminas	Mel	-1,37
Nikotinamidas (vitaminas B3)	B3	-0,37
Tiraminas	Tir	0,72
Triptaminas	Trip	1,21
Sudanas I	SI	4,1
Sudanas II	SII	5,3
Sudanas III	SIII	5,9
Sudanas IV	SIV	7,1
Retinilo acetatas (vitaminas A)	A	6,3
Menachinonas (vitaminas K2)	K2	14,5



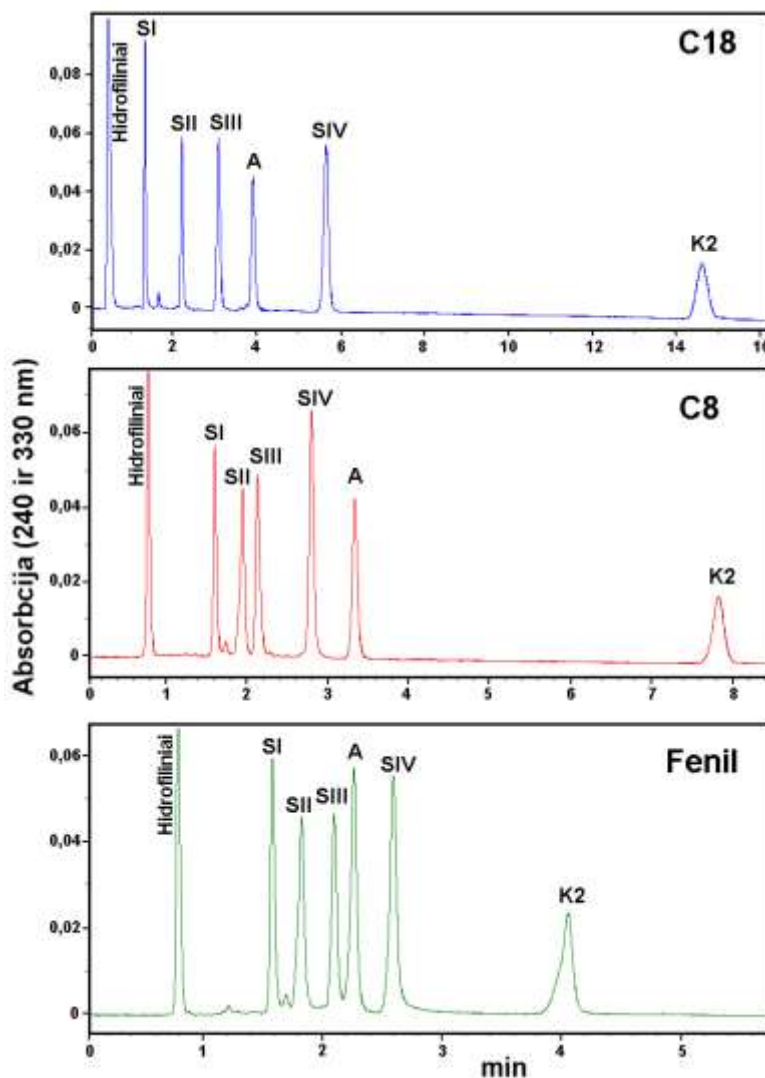
3.5 pav. Hidrofobinių analičių absorbcijos spektrai



3.6 pav. Hidrofilinių analičių absorbcijos spektrai

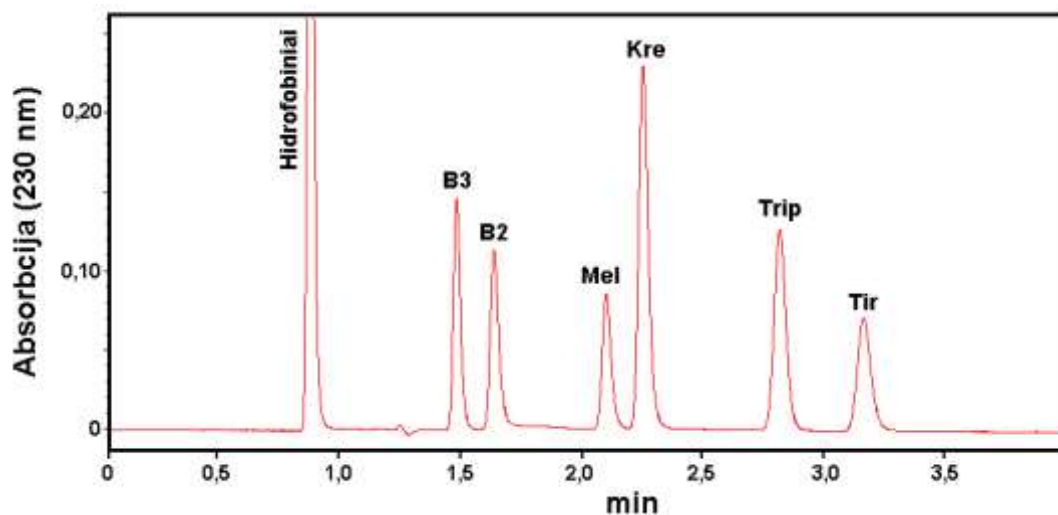
3.2. Atskyrimas AFCh ir HSCh metodais

Pirmiausiai buvo optimizuotas ir palygintas pasirinktų junginių atskyrimas atskirai AFCh ir HSCh metodais. Šiuo tyrimu buvo siekiama su tos pačios sudėties judria faze vienu metodu atskirti hidrofobinius junginius, o kitu metodu – hidrofilinius. AFCh metode buvo palygintos trys kolonėlės su skirtingais nepoliniais ligandais modifikuoto silikagelio sorbentais: oktadecilsilikagelio (C18), oktilsilikagelio (C8) ir fenilsilikagelio. **3.7 pav.** palygintos optimizuotose sąlygose išmatuotos mišinio chromatogramos. Kaip ir buvo tikėtasi, hidrofiliniai junginiai AFCh režime yra nesulaikomi ir neatskiriami. Tuo tarpu hidrofobinės analitės yra pilnai atskiriamos visose kolonėlėse. Metodų apjungimui pasirinkome C18 kolonėlę, kurios atrankumas hidrofobiniams junginiams buvo geriausias.



3.7 pav. Tiriamų junginių mišinio chromatogramos, išmatuotos atvirkščių fazių chromatografijos režimu su trimis skirtingomis kolonėlėmis. Judri fazė: 5 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 15:85 (v/v) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Atskirymui HSCh metodu pasirinkome kolonėlę su poliniu nemodifikuoto silikagelio sorbentu. Iš **3.8 pav.** pateiktos mišinio chromatogramos matyti, kad su ta pačia judria faze HSCh metodu puikiai atskiriamos mišinio hidrofilinės analitės, o hidrofobiniai junginiai nesulaikomi. Toks rezultatas atveria puikias perspektyvas AFCh ir HSCh metodų apjungimui.



3.8 pav. Tiriamų junginių mišinio chromatograma, išmatuota hidrofilinės sąveikos chromatografijos režimu. Kolonėlė: BEH HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 15:85 (v/v) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

3.3. Atskirimo AFCh+HSCh metodu tyrimas

Šiam darbui nebuvo keliamas uždavinys būtinai pasiekti visišką modelinio mišinio junginių atskirimą. Pagrindinis uždavinys buvo ištirti, kaip tokioje sistemoje įvairūs veiksniai įtakoja skirtingos prigimties junginių sulaikymą bei efektyvumą. Buvo tiriama šių veiksnių įtaka: organinio tirpiklio (acetonitrilo) ir druskos ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) koncentracijų judrioje fazėje, judrios fazės pH ir kolonėlės temperatūros.

Acetonitrilo koncentracijos įtaka. AFCh metode organiniu judrios fazės tirpikliu vienodai sėkmingai yra naudojami tiek metanolis, tiek ir acetonitrilas. Tuo tarpu HSCh metode jokios alternatyvos acetonitrilui nėra. Naudojant atskirymui kitus polinius tirpiklius (pvz., metanolį, etanolį, izopropanolį), drastiškai blogėja efektyvumas ir atskirimo atrankumas.

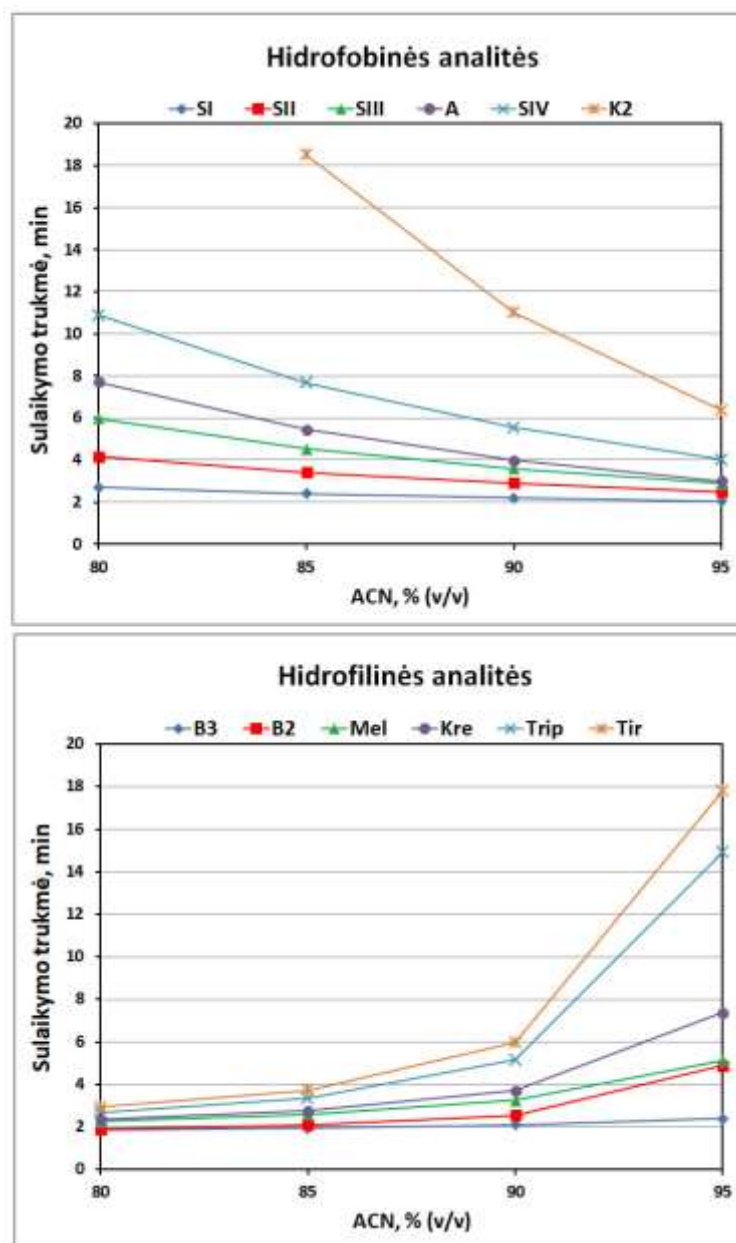
3.2 lentelėje surašytos tiriamų junginių sulaikymo trukmės, išmatuotos keičiant ACN koncentraciją judrioje fazėje 80–95% (v/v) intervale. **3.9 pav.** pateikti sulaikymo trukmių priklausomybių nuo ACN koncentracijos grafikai. Sudėtingų mišinių chromatografinį atskirimą žymiai lengviau optimizuoti, kai keičiamas sistemos parametras nevienodu stiprumu įtakoja

atskiriamų junginių sulaikymą. Dar geriau, kai tokio parametro įtaka atskiriamoms junginių grupėms yra priešinga, t.y. vienu junginių sulaikymą stiprina, o kitų – silpnina. Būtent toks atvejis ir yra tiriamoje AFCh+HSCh sistemoje. AFCh metode stipresne eliucine geba pasižymi acetonitrilas, tuo tarpu HSCh metode, priešingai, vanduo turi stipresnę eliucinę gebą. Būtent tai ir sąlygoja hidrofobinių junginių sulaikymo silpnėjimą, o hidrofilinių junginių sulaikymo stiprėjimą, kai ACN koncentracija judrioje fazėje yra didinama. Tokiu būdu, varijuojant ACN koncentracija judrioje fazėje galima ne tik gerinti atskirų analičių porų atskyrimą, bet ir keisti hidrofobinių ir hidrofilinių junginių eliucijos tvarką.

ACN koncentracija abiejų grupių junginių smailių efektyvumui nežymi.

3.2 lentelė. Analčių sulaikymo trukmės, išmatuotos judrioje fazėje su skirtinga ACN koncentracija. Judri fazė 5 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 7,0) H₂O/ACN.

Analitė	Sulaikymo trukmė, min			
	80% ACN (v/v)	85% ACN (v/v)	90% ACN (v/v)	95% ACN (v/v)
Hidrofobinės analitės				
SI	2,69	2,40	2,19	2,03
SII	4,16	3,41	2,91	2,50
SIII	5,96	4,53	3,58	2,89
A	7,71	5,44	3,98	2,99
SIV	10,9	7,67	5,54	4,03
K2	>25	18,5	11,0	6,36
Hidrofilinės analitės				
B3	1,87	1,95	2,09	2,39
B2	1,90	2,09	2,56	4,89
Mel	2,26	2,59	3,24	5,12
Kre	2,35	2,76	3,71	7,36
Trip	2,68	3,35	5,15	14,9
Tir	2,94	3,73	5,97	17,8



3.9 pav. ACN koncentracijos judrioje fazėje įtaka analičių sulaikymo trukmėms. Kolonėlės: C18+ BEH HILIC. Judri fazė 5 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 7,0) H₂O/ACN

Druskos koncentracijos įtaka. Druskos koncentracijos įtaka buvo tiriama 1–10 mmol/L CH₃COONH₄ koncentracijų intervale. Didesnių koncentracijų negalėjome naudoti dėl riboto druskos tirpumo daug ACN turinčioje judrioje fazėje. Išmatuotos junginių sulaikymo trukmės surašytos **3.3 lentelėje**. Nustatyta, kad druskos koncentracija visiškai neįtakoja nei hidrofobinių junginių sulaikymo, nei jų smailių efektyvumo.

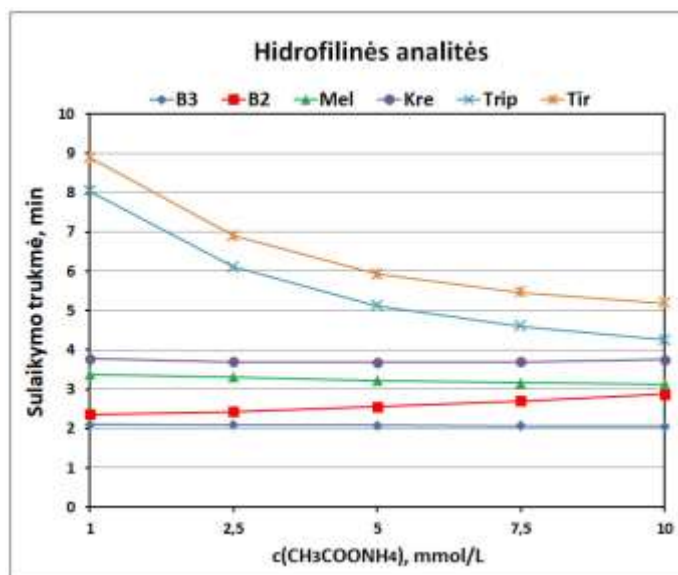
3.10 pav. pateiktos hidrofilinių junginių sulaikymo trukmių priklausomybės nuo CH₃COONH₄ koncentracijos judrioje fazėje. Hidrofilinėms analitėms šio parametro įtaka labai skirtinga. Didinant druskos koncentraciją, B3 ir Kre sulaikymo trukmės beveik nekinta, vitaminui B2 – sulaikymas stiprėja, o Trip, Tir ir Mel – sulaikymas silpnėja.

Bendru atveju judrioje fazėje esanti druska susilpnina elektrostazines (jonas-jonas, jonas-dipolis) sąveikas tarp analitės ir sorbento. Jei analizė ir sorbento paviršius turi priešingo krūvio funkcinės grupės (trauka), druskos koncentracija silpnins analizės sorbciją ir sumažins jos sulaikymo trukmę. Esant tam pačiam analitės ir sorbento krūviui (stūma), didinant druskos koncentraciją, analizės sulaikymas stiprės. Kadangi tarp hidrofobinių junginių ir abiejų sorbentų tokių sąveikų nėra, šių analičių chromatografinės elgsenos druskos koncentracija neįtakoja.

Dirbant su neutralia (pH = 7) judria faze, nemaža dalis nemodifikuoto silikagelio sorbento paviršiuje esančių silanolinių grupių disocijuoja ir įgyja neigiamą krūvį. Deja, įvertinti hidrofiliųjų junginių krūvį judrioje fazėje yra sudėtinga, kadangi daug acetonitrilo turinčiame tirpale junginių disociacija/protonizacija stipriai pasikeičia. Todėl remdamiesi **3.10 pav.** pateiktomis priklausomybėmis, galime tik daryti prielaidą, jog tyrimui naudotoje judrioje fazėje Trip, Tir ir Mel turi pilną arba dalinį teigiamą krūvį, Kre ir B3 yra neutralūs, o B2 turi dalinį neigiamą krūvį.

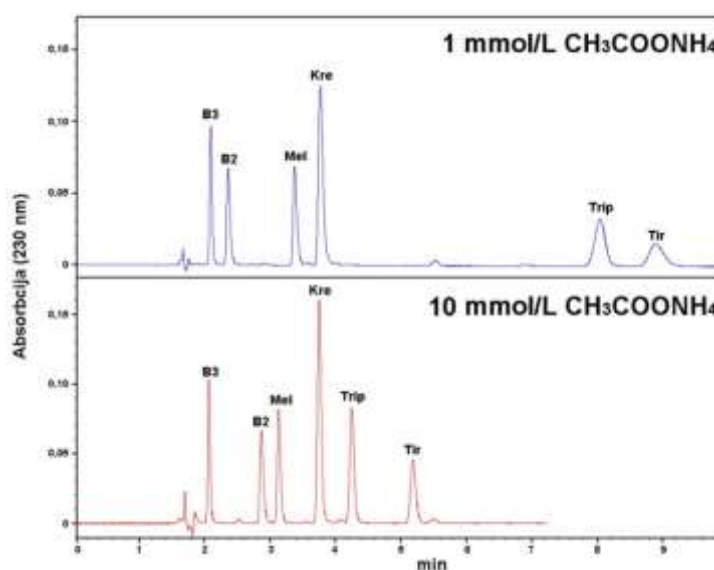
3.3 lentelė. Analinių sulaikymo trukmės, išmatuotos judrioje fazėje su skirtinga CH₃COONH₄ koncentracija. Judri fazė 1,0–10 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 7,0) H₂O:ACN (10:90 v/v).

Analitė	Sulaikymo trukmė, min				
	1,0 mmol/L	2,5 mmol/L	5,0 mmol/L	7,5 mmol/L	10 mmol/L
Hidrofobinės analizės					
SI	2,19	2,18	2,17	2,18	2,17
SII	2,89	2,89	2,88	2,90	2,88
SIII	3,57	3,58	3,57	3,56	3,55
A	3,97	3,98	3,99	3,98	3,96
SIV	5,53	5,54	5,53	5,52	5,50
K2	10,9	11,0	10,9	10,8	10,9
Hidrofilinės analizės					
B3	2,10	2,09	2,08	2,07	2,06
B2	2,36	2,43	2,55	2,70	2,87
Mel	3,38	3,31	3,22	3,16	3,13
Kre	3,77	3,70	3,68	3,70	3,75
Trip	8,04	6,11	5,12	4,60	4,25
Tir	8,89	6,90	5,92	5,46	5,19

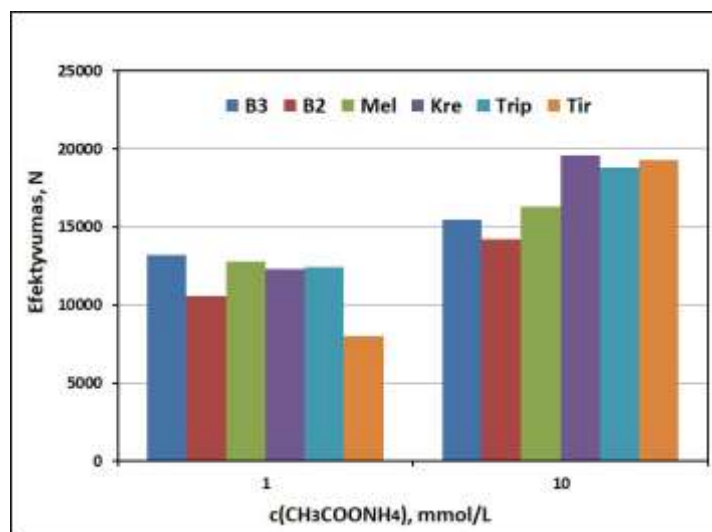


3.10 pav. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ koncentracijos judrioje fazėje įtaka hidrofilinių analičių sulaikymo trukmėms. Kolonėlės: C18+BEH HILIC. Judri fazė: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7,0) 10:90 v/v $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

3.11 pav. palygintos hidrofilinių junginių mišinio chromatogramos, išmatuotos judrioje fazėje su 1 ir 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Netgi vizualiai palyginus šias chromatogramas, galima išžvelgti pakankamai ženklų druskos koncentracijos įtaką hidrofilinių junginių smailių efektyvumui. Tikslūs efektyvumo duomenys dviem ribinėms druskos koncentracijoms yra pateikti **3.12 pav.** Didėjant druskos koncentracijai, visų hidrofilinių analičių smailių efektyvumas tolygiai didėja. Be to, stipriau sulaikomoms analitėms druskos įtaka efektyvumui žymiai stipresnė.

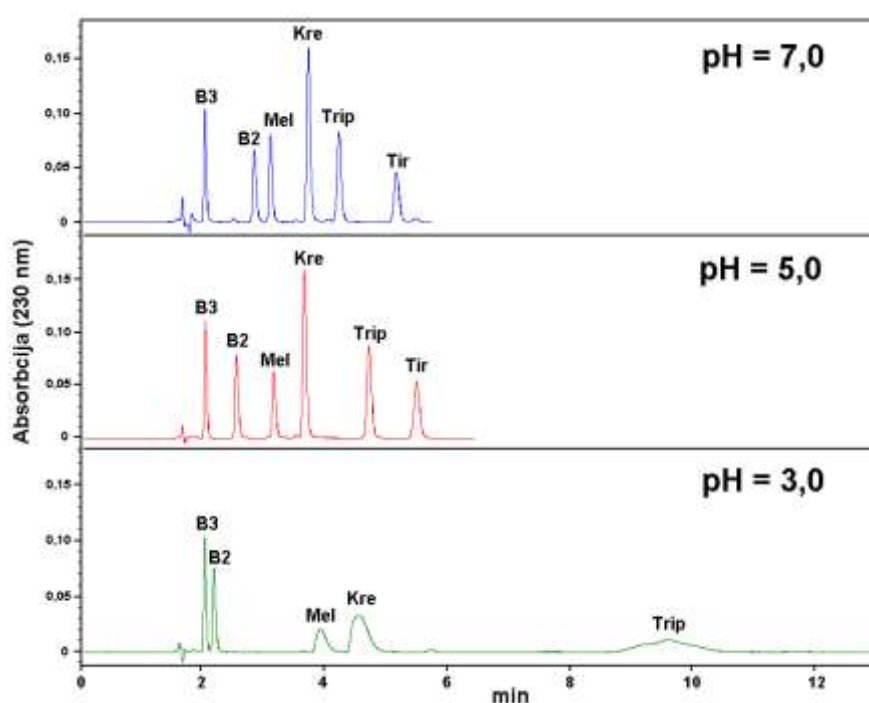


3.11 pav. Hidrofilinių analičių mišinio chromatogramų, išmatuotų judrioje fazėje su skirtinga druskos koncentracija, palyginimas. Kolonėlės: C18+ BEH HILIC



3.12 pav. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ koncentracijos įtaka hidrofiliųjų junginių smailių efektyvumui

Judrios fazės pH įtaka. Judrios fazės pH įtaka buvo tiriama trijų pH verčių judriose fazėse. Reikiamos pH vertės buvo gautos pridėjant į judrią fazę 25 mmol/L CH_3COOH (pH 3,0), 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ buferio (pH 5,0) arba 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7,0). Kaip ir tikėtasi, šis veiksnys visiškai neįtakojo hidrofobinių junginių chromatografinės elgsenos. Tuo tarpu pH įtaką hidrofiliųjų analizių chromatografinėi elgsenai iliustruoja **3.13 pav.** pateiktos chromatogramos.



3.13 pav. Judrios fazės pH įtaka hidrofiliųjų analizių atskyrimui. Kolonėlės: C18+BEH HILIC. Judri fazė: CH_3COOH (pH 3,0), $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 5,0) arba $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7,0) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (10:90 v/v)

Kaip matyti iš pateiktų chromatogramų, pH įtaka hidrofiliams junginiams labai nevienoda. Pvz., vitaminui B3 nėra jokios įtakos, vitamino B2 sulaikymas mažėjant pH silpnėja. Tuo tarpu likusių keturių junginių sulaikymas rūgščioje terpėje sustiprėja, o jų smailės smarkiai išsiplečia (Tir apskritai neregistruojamas). Deja, dėl aukščiau paminėtų priežasčių (nežinomos junginių pK_a vertės acetonitrilo terpėje) sunku interpretuoti gautus rezultatus. Antra vertus, šiam darbui nebuvo keliamas uždavinys išsiaiškinti būtent šių junginių chromatografinę elgseną. Todėl galima konstatuoti, kad judrios fazės pH yra svarbus veiksnys optimizuojant skirtingo poliškumo junginių atskyrimą nagrinėjamoje AFCh+HSCh sistemoje.

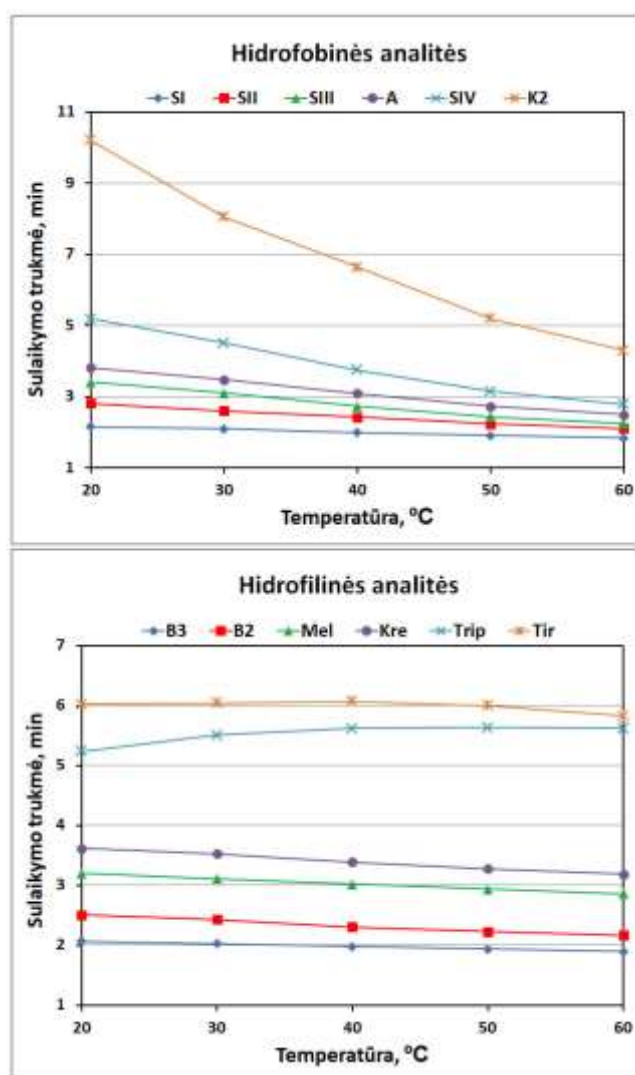
3.4 lentelė. Analčių sulaikymo trukmės, išmatuotos esant skirtingai kolonėlių temperatūrai.

Judri fazė: 5 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 7,0) H₂O:ACN (10:90 v/v).

Analitė	Sulaikymo trukmė, min				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
Hidrofobinės analitės					
SI	2,15	2,06	1,99	1,91	1,84
SII	2,81	2,60	2,42	2,23	2,11
SIII	3,41	3,11	2,73	2,43	2,25
A	3,82	3,50	3,09	2,73	2,49
SIV	5,18	4,49	3,74	3,15	2,78
K2	10,2	8,06	6,63	5,2	4,30
Hidrofilinės analitės					
B3	2,07	2,03	1,98	1,94	1,90
B2	2,51	2,43	2,31	2,23	2,17
Mel	3,20	3,11	3,02	2,94	2,86
Kre	3,62	3,53	3,39	3,28	3,19
Trip	5,24	5,51	5,62	5,63	5,62
Tir	6,02	6,04	6,07	6,0	5,83

Kolonėlių temperatūros įtaka. Kolonėlių temperatūros įtaką demonstruoja 3.4 lentelėje surašytos sulaikymo trukmės bei 3.14 pav. pateikti grafikai. Didinant kolonėlių temperatūrą, hidrofobinių analčių sulaikymo trukmės tolygiai mažėja. Tokio pobūdžio temperatūrinės priklausomybės įprastai būdingos atvirkščių fazių chromatografijai, kurioje junginiai dažniausiai sulaikomi analitėms sąveikaujant su sorbentu tik viena (dispersine) sąveika. Šio tipo sorbcija yra egzoterminis procesas, todėl keliant temperatūrą, sorbcija silpnėja.

Tuo tarpu hidrofiliniams junginiams temperatūros įtaka nėra tokia ryški: temperatūros didinimas tik gana nežymiai sumažina pirmųjų keturių junginių sulaikymo trukmes. Tuo tarpu Tir sulaikymo temperatūra beveik neįtakojo, o Trip sulaikymas, padidinus temperatūrą nuo 20 iki 40 °C, netgi sustiprėjo. Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad hidrofiliniai junginiai ant polinio silikagelio sorbento greičiausiai yra sulaikomi mišriu mechanizmu. Greta dominuojančio analitės pasiskirstymo tarp adsorbuoto vandens sluoksnio ir judrios fazės (egzoterminis procesas) gali vykti jų adsorbcija silikagelio paviršiuje susidarant vandeniliniam ryšiui su silanolinėmis grupėmis ir/arba (teigiamą krūvį turinčioms analitėms) jonų mainai su disocijavusiomis silanolinėmis grupėmis. Žinant, kad, pvz., jonų mainų sąveika yra endoterminis procesas (didinant temperatūrą jonų mainų sąveika stiprėja), tokia prielaida yra labai reali.

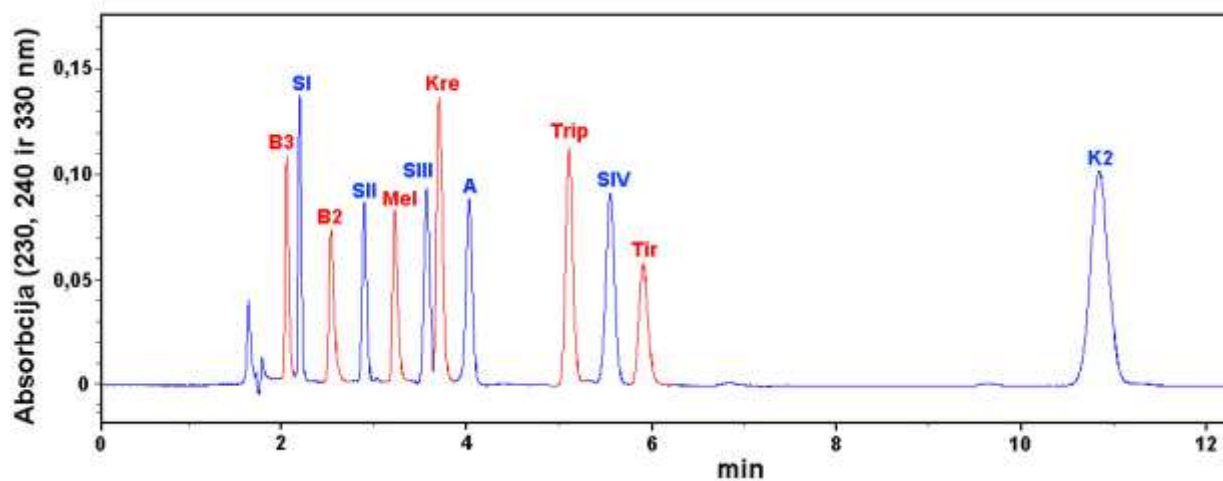


3.14 pav. Kolonėlių temperatūros įtaka analičių sulaikymo trukmėms. Kolonėlės: C18+BEH HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 7,0) 10:90 v/v H₂O/ACN

Didinant kolonėlių temperatūrą, visų junginių smailių efektyvumas truputį ($\leq 20\%$) pagerėja. Aukštesnėje temperatūroje sumažėja judrios fazės klampa bei pagreitėja analičių difuzija ir tai pagreitina masių mainus tarp fazių.

3.15 pav. pateikta chromatograma demonstruoja siūlomos chromatografinės sistemos galimybes. Apjungus du skirtingus metodus ir naudojant tik izokratinę eliuciją, pasiektas greitas ir efektyvus 12-os drastiškai poliškumu besiskiriančių junginių atskyrimas. Būtina pažymėti, kad šiame metode galima papildomai optimizuoti atskyrimą varijuojant tiek AFCh, tiek ir HSCh sorbentų prigimtimi bei apjungiamų kolonėlių parametrais (ilgiu, vidiniu skersmeniu).

Pagrindinis šio metodo trūkumas – atskyrimui negalima naudoti gradientinės eliucijos, kadangi keičiant tirpiklių santykį judrioje fazėje, jos eliuacinė geba apjungtuose AFCh ir HSCh metoduose kinta priešingomis kryptimis.



3.15 pav. Hidrofobinių ir hidrofilinių junginių mišinio chromatograma. Kolonėlės: C18+BEH HILIC. Judri fazė: 5 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7,0) 10:90 v/v $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

Trečio šiam darbui iškelto uždavinio – panaudoti metodą vandenyje ir riebaluose tirpiems vitaminams nustatyti – dėl karantino nepavyko įgyvendinti.

IŠVADOS

1. Didinant ACN koncentraciją judrioje fazėje, hidrofobinių junginių sulaikymas silpnėja, o hidrofilinių junginių – stiprėja. Keičiant ACN koncentraciją, galima ne tik gerinti atskirų analičių porų atskyrimą, bet ir keisti hidrofobinių ir hidrofilinių junginių eliucijos tvarką.
2. Druskos ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) koncentracija judrioje fazėje neįtakoja nei hidrofobinių junginių sulaikymo, nei jų smailių efektyvumo. Hidrofilinėms analitėms šio parametro įtaka sulaikymui labai skirtinga: jos kryptis ir stiprumas priklauso nuo analičių krūvio ženklo ir dydžio. Didėjant druskos koncentracijai, visų hidrofilinių analičių smailių efektyvumas tolygiai didėja.
3. Didinant kolonėlių temperatūrą (iki $60\text{ }^\circ\text{C}$), tik dispersine sąveika sulaikomų hidrofobinių analičių sulaikymo trukmės reikšmingai mažėja. Hidrofiliniai junginiai ant polinio sorbento yra sulaikomi mišriu pasiskirstymo/jonų-mainų mechanizmu, todėl jų sulaikymui temperatūros įtaka silpnesnė. Aukštesnėje temperatūroje sumažėja judrios fazės klampa bei pagreitėja analičių difuzija ir tai pagerina efektyvumą.
4. Apjungus AFCh ir HSCh metodus ir naudojant tik izokratinę eliuciją, galimas greitas ir efektyvus drastiškai poliškumu besiskiriančių junginių atskyrimas. Pagrindinis AFCh+HSCh metodo trūkumas – atskyrimui negalima naudoti gradientinės eliucijos.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

MARTYNAS KATELYNAS

COUPLING OF REVERSED-PHASE AND HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC COMPOUNDS

MASTER THESIS CARRIED OUT IN DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY OF VILNIUS UNIVERSITY

Research adviser: prof. A. Padarauskas

In this work a new chromatographic system for the simultaneous separation of hydrophilic and hydrophobic compounds was investigated. The proposed system is based on the serial coupling of reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography modes. Six hydrophobic (Sudan I-IV dyes, vitamins A and K₂) and six hydrophilic (vitamins B₂ and B₃, melamine, creatinine, tryptamine and tyramine) compounds were employed as model analytes. The effect of various parameters such as the concentration of acetonitrile and salt in the mobile phase, mobile phase pH and column temperature on the chromatographic behaviour of the analytes was evaluated and discussed.

Under optimized conditions all twelve compounds were completely separated in under 12 minutes. This work demonstrates the excellent ability of dual chromatographic system to separate compounds not separated with common single chromatographic techniques.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins. *Chemical Reviews*, **71** (1971) 525–616.
- [2] R. Kaliszan. *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1987.
- [3] R.S. Pearlman, W.J. Dunn, J.H. Block. *Partition Coefficient: Determination and Estimation*, Pergamon Press, New York, 1986.
- [4] D. Eros, I. Kovessi, L. Orfi, K. Takacs-Novak, G. Acsady, G. Keri. *Current Medicinal Chemistry*, **9** (2002) 1819–1829.
- [5] P. Jandera. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, (2013) 162–173.
- [6] A. Westman-Brinkmalm, J. Silberring, G. Brinkmalm. *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, Chapter 4, 105–115, John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- [7] M. C. Hennion, C. Picard, C. Combellas, M. Caude and R. Rosset. *Journal of Chromatography*, **210** (1981) 211–228.
- [8] C. Horvath, W. Melander. *Journal of Chromatographic Science*, **15** (1977) 393–404.
- [9] Y. Sudo. *Journal of Chromatography A*, **737** (1996) 139–147.
- [10] L. Pan, R. LoBrutto, Y. V. Kazakevich, R. Thompson. *Journal of Chromatography A*, **1049** (2004) 63–73.
- [11] R. G. Wolcott, J. W. Dolan, L. R. Snyder, S. R. Bakalyarc, M. A. Arnold, J. A. Nichols. *Journal of Chromatography A*, **869** (2000) 211–230.
- [12] H. A. Claessens, M. A. van Straten. *Journal of Chromatography A*, **1060** (2004) 23–41.
- [13] A. J. Alpert. *Journal of Chromatography*, **499** (1990) 177–196.
- [14] P. Hemstrom, K. Irgum. *Journal of Separation Science*, **29** (2006) 1784–1821.
- [15] Y. Guo, S. Gaiki. *Journal of Chromatography A*, **1074** (2005) 71–80.
- [16] B. Buszewski, S. Noga. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **402** (2012) 231–247.
- [17] J. C. Linden, C. L. Lawhead. *Journal of Chromatography*, **105** (1975) 125–133.
- [18] M. Rubinstein. *Analytical Biochemistry*, **98** (1979) 1–7.
- [19] T. Yoshida. *Journal of Chromatography A*, **811** (1998) 61–67.
- [20] V. V. Tolstikov, O. Fiehn. *Analytical Biochemistry*, **301** (2002) 298–307.
- [21] J. Feng, Z. Guo, H. Shi, J. Gu, Y. Jin, X. Liang. *Talanta*, **81** (2010) 1870–1876.
- [22] L. M. Bonanno, B. A. Denhot, P. C. Tchoreloff, F. Puisieux, and P. J. Cardot. *Analytical Chemistry*, **64** (2002) 371–379.
- [23] C. Antonio, T. Larson, A. Gilday, I. Graham, E. Bergstrom and J. Thomas-Oates. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **22** (2008) 1399–1407.

- [24] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux. *Journal of Chromatography A*, **961** (2002) 9–21.
- [25] M. Douša, J. Břicháč, P. Gibala, P. Lehnert. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54** (2011) 972–978.
- [26] C. R. Mitchell, Y. Bao, N. J. Benz, S. Zhang. *Journal of Chromatography B*, **877** (2009) 4133–4139.
- [27] Á. Bartha, J. Ståhlberg. *Journal of Chromatography A*, **668** (1994) 255–284.
- [28] J. Dolan. LCGC Europe, **Volume 21, Issue 5**, 258-263.
- [29] F. F. Cantwell. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **Vol. 2, No. 2** (1984) 153–164.
- [30] T. Cecchi. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **38:3** (2008) 161–213.
- [31] A. Vailaya, C. Horváth. *Journal of Chromatography A*, **829** (1998) 1–27.
- [32] Modelinių analičių pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientai. Prieiga per internetą. [Žiūrėta 2020 m. gegužės 11 d.]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>