

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.623>

<https://orcid.org/0009-0006-4222-723X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Vytautas Kavaliauskas

Nauji hidrofobiniai tirpikliai perfluorintų junginių pagrindu: tyrimas ir taikymas mikroekstrakcijai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Chemija N 003

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Nariai:

doc. dr. Algirdas Brukštus (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003),

prof. habil. dr. Eugenijus Norkus (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija, N 003),

dr. Germanas Peleckis (Wollongong universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003),

prof. dr. Aleksej Žarkov (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. birželio mėn. 28 d. 12 val. Vilniaus universiteto Chemijos ir geomokslų fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje (141 aud.). Adresas: Naugarduko g. 24, LT-03225, Vilnius, Lietuva.

Tel. +370 5 2193105; el. paštas info@chgf.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Fizinių ir technologijos mokslų centro, Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.623>

<https://orcid.org/0009-0006-4222-723X>

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

Vytautas Kavaliauskas

Novel Hydrophobic Solvents Based on
Perfluorinated Compounds:
Investigation and Application for
Microextraction

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Chemistry (N 003)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University.

Academic supervisor – Prof. Habil. Dr. Audrius Padarauskas (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Algirdas Brukštus (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003),

Prof. Habil. Dr. Eugenijus Norkus (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry, N 003),

Dr. Germanas Peleckis (Wollongong University, Natural Sciences, Chemistry, N 003),

Prof. Dr. Aleksej Žarkov (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12:00 a.m. on 28th June 2024 in Inorganic chemistry auditorium of the Faculty of Chemistry and Geosciences, Vilnius University. Address: Naugarduko st. 24, LT-03225, Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 5 2193105; e-mail: info@chgf.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Center for Physical Sciences and Technology and Vilnius University as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Perfluorinti junginiai	11
1.2. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai (HET)	15
1.3. Vandeninės dvifazės sistemos	20
1.3.1. VDS tipai	20
1.4. Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija	25
1.4.1. Dispergavimo būdai	26
1.4.2. Ekstrahentai	27
1.4.3. DSSME taikymas	30
2. EKSPERIMENTO METODIKA	32
2.1. Reagentai ir tirpalai	32
2.2. Aparatūra	32
2.3. Procedūros	33
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai (HET): sintezė, tyrimas ir taikymas	35
3.1.1. Sinteze ir charakterizavimas	36
3.1.2. Ekstrakcinių savybių įvertinimas	37
3.1.3. Suderinamumas su efektyviaja skysčių chromatografija (ESCh)	40
3.1.4. Parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija	43
3.2. SUPRA tirpiklių sintezė, tyrimas ir taikymas	48
3.2.1. SUPRA fazių susidarymo tyrimas	50
3.2.3. SUPRA tirpiklių ekstraktinės savybės	56
3.2.4. SUPRA tirpiklių suderinamumas su efektyviaja skysčių chromatografija	57
3.2.5. Ftalatų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija ir nustatymas ...	60

3.3. Vandeninės dvifazės sistemos HFIP/hidrofilinis tirpiklis tyrimas ir taikymas	63
3.3.1. Inicijavimo būdų palyginimas	63
3.3.2. Ekstrakcinių savybių įvertinimas	67
3.3.3. Katijoninių dažiklių mikroekstrakcija ir nustatymas.....	73
IŠVADOS.....	80
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	81
SUMMARY	89
Curriculum Vitae.....	110
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	112

SANTRUMPOS

ACN – acetonitrilas
Bioch – biochaninas A
BuP – butilparabenas
DBP – dibutilftalatas
DEHP – dietilheksilftalatas
DEP – dietilftalatas
DMP – dimetilftalatas
DMSO – dimetilsulfoksidas
DSSME – dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija
EE – ekstrakcijos efektyvumas
EtP – etilparabenas
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
Form – formononetinas
HET – hidrofobinis eutektinis tirpiklis
HFIP – heksafluorizopropanolis
HFBA – heptafluorbutano rūgštis
i-PrOH – izopropanolis
KV – kristalinis violetinis
Men – mentolis
MeP – metilparabenas
MM – metileno mėlynasis
MŽ – malachito žaliasis
NAPH – naftalenas
Quer – kvercetas
PFPA – pentafluorpropano rūgštis
PrP – propilparabenas
RB – rodaminas B
SSN – santykinis standartinis nuokrypis
SUPRA – supramolekulinis tirpiklis
TBAC – tetrabutilamonio chloridas
TDTMAB – tetradeciltrimetilamonio bromidas
TFA – trifluoracto rūgštis
THAC – tetraheksilamonio chloridas
THF – tetrahidrofuranas
VDS – vandeninė dvifazė sistema
VS – vidinis standartas

ĮVADAS

Mėginio paruošimas yra svarbiausia ir dažniausiai daugiausiai laiko ir sąnaudų reikalaujanti cheminės analizės proceso dalis. Priklausomai nuo mėginio sudėties ir analizei naudojamų aparatūros, mėginio paruošimo metu gali reikėti sukonzcentruoti analizę, ją derivatizuoti ir/arba pakeisti mėginio matricą į tinkamą analizę. Skysčių-skysčių ekstrakcija yra vienas seniausių mėginio paruošimo metodų, neprarandantis populiarumo iki šių dienų. Klasikinėje skysčių-skysčių ekstrakcijoje hidrofobinės analizės iš vandeninių tirpalų yra ekstrahuojamos su vandeniu nesimaišančiu organiniu tirpikliu, pavyzdžiui, heksanu, dietileteriu, etilacetatu, chloroformu. Šis metodas turi trūkumų: užtrunkama daug laiko, sunaudojami dideli kiekiai aplinkai žalingų tirpiklių, susidaro daug kenksmingų atliekų.

Paskutinius kelis dešimtmečius mokslininkai skyrė nemažai dėmesio efektyvios, greitos ir pigios alternatyvos klasikinei skysčių-skysčių ekstrakcijai paieškai. Siekiant sumažinti sunaudojamų toksiškų tirpiklių kiekį, buvo pasiūlyti keli miniatiūrizuoti metodai: mikroekstrakcija tirpiklio lašu, dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija (DSSME) bei keletas modifikuotų jos versijų. Populiariausias paskutinio dešimtmečio mikroekstrakcijos metodas – dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija buvo pasiūlyta 2006 metais. Pirminiame DSSME variante į vandeninį mėginį sušvirksčiamas hidrofobinio ekstrakcijos tirpiklio ir vandenyje tirpus disperguojančiojo tirpiklio mišinys. Mėginys susidrumsčia dėl jame susidariusių daugybės smulkių lašelių. Susidariusių lašelių didelis bendras paviršiaus plotas leidžia pasiekti puikų ekstrakcijos efektyvumą. Fazės atskiriamos centrifuguojant. Vienas didžiausių DSSME trūkumų – nedidelis ekstrakcijai tinkamų tirpiklių pasirinkimas. Šiam metodui tinkami tik labai hidrofobiniai, todėl blogai ekstrahuojantys hidrofiliškesnius junginius, pageidautinai sunkesni už vandenį bei pasižymintys nedidele klampa tirpikliai.

Pastaraisiais metais kaip alternatyva tradiciniams organiniams tirpikliams buvo pasiūlytos kelios naujos tirpiklių klasės: joniniai skysčiai, eutektiniai tirpikliai ir vandeninės dvifazės sistemos (VDS). Nauji tirpikliai leidžia ekstrahuoti įvairesnio poliškumo junginius, tačiau turi ir nemažai trūkumų. Dauguma naujos kartos tirpiklių yra nelakūs, lengvesni už vandenį ir ganėtinai klampūs. Dėl blogo tirpiklių lakumo jie nėra suderinami su dujų chromatografija. Atliekant mikroekstrakciją lengvesniais už vandenį tirpikliais, juos sunku surinkti po fazių atskyrimo. Didelė tirpiklių klampa sulėtina masių mainus tarp fazių ir mažina ekstrakcijos efektyvumą. Be to,

klampus ekstraktus sunku dozuoti mikrošvirkštais. Dėl šių priežasčių tinkamų fizikinių savybių tirpiklių paieška iki šiol išlieka labai aktuali.

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – susintetinti ir ištirti naujus, nesimaišančius su vandeniu tirpiklius perfluorintų junginių pagrindu bei pritaikyti juos pasirinktų organinių junginių mikroekstrakcijai.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Susintetinti ir ištirti šešis hidrofobinius eutektinius tirpiklius, sudarytus iš mentolio, tetrabutilamonio chlorido arba tetraheksilamonio chlorido vandenilinio ryšio akceptorius ir heksafluorizopropanolio arba trifluoracto rūgšties vandenilinio ryšio donoro.
2. Ištirti hidrofobinių supramolekulinių tirpiklių susidarymą vandeniniuose ketvirtinio amonio druskos tirpaluose inicijuojant hidrofiliniais perfluorintais junginiais.
3. Ištirti naujo tipo heksafluorizopropanolis/acetonitrilas vandeninę dvifazę sistemą.
4. Įvertinti naujų tirpiklių ekstrakcines savybes bei pritaikyti juos pasirinktų junginių mikroekstrakcijai.

Disertacinio darbo naujumas:

Visi disertaciniame darbe susintetinti tirpikliai yra nauji, iki šiol neaprašyti kitų mokslininkų darbuose.

Disertaciniame darbe ištirta heksafluorizopropanolis/acetonitrilas VDS, mūsų žiniomis, yra pirmoji, visiškai naujo tipo sistema, kai su vandeniu neismaišančiai fazei gauti panaudojami du hidrofiliniai organiniai tirpikliai.

Ginamieji teiginiai:

1. Eutektiniai tirpikliai, sudaryti iš mentolio, tetrabutilamonio chlorido ar tetraheksilamonio chlorido vandenilio ryšio akceptorius ir trifluoracto rūgšties arba heksafluorizopropanolio vandenilinio ryšio donoro, yra hidrofobiniai, sunkesni už vandenį ir pasižymi maža-vidutine klampa.
2. Ketvirtinio amonio druskų vandeniniuose tirpaluose hidrofiliniai perfluorinti junginiai inicijuoja sunkesnių už vandenį ir su vandeniu nesimaišančių supramolekulinių tirpiklių susidarymą.
3. Hidrofiliniai aprotoniniai tirpikliai vandeniniuose heksafluorizopropanolio tirpaluose inicijuoja vandeninės dvifazės sistemos susidarymą.

4. Heksafluorizopropanolio/acetonitrilo vandeninė dvifazė sistema ypač efektyviai ekstrahuoja neutralius ir krūvį turinčius bazinius junginius.
5. Ištirti tirpikliai yra perspektyvi alternatyva tradiciniams tirpikliams, naudojamiems organinių junginių mikroekstrakcijai.

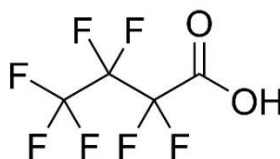
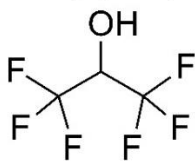
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Perfluorinti junginiai

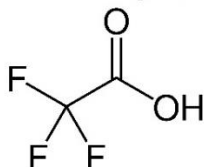
Perfluorintais junginiais vadinami organiniai junginiai, kuriuose visi C-H jungčių vietose esantys vandenilio atomai yra pakeisti fluoro atomais. Nors pirmasis perfluorintas junginys anglies tetrafluoridas buvo susintetintas 1886 m., tikra šios klasės junginių eros pradžia yra laikomas 20 a. 4-asis dešimtmetis, kai visiškai atsitiktinai buvo atrastas pirmasis perfluorintas polimeras – politetrafluoretilenas [1]. 1936–1938 metais DuPont chemijos kompanijos (JAV) laboratorijoje buvo atliekami tyrimai su tetrafluoretileno dujomis. Šiomis dujomis buvo siekiama pakeisti tuo metu šaldytuvuose šaldymo agentais naudojamus sieros dioksidą ir amoniaką. Dujos buvo laikomos specialiuose sausu ledu šaldomuose metaliniuose konteineriuose. Prieš eilinio eksperimento pradžią atidarius tokį konteinerį, jame vietoje tetrafluoretileno dujų buvo aptikti balkšvi milteliai. Pasirodo, kad aukštesniame slėgyje kontaktuodamas su konteinerio geležimi, kuri katalizavo procesą, tetrafluoretilenas polimerizavosi. 1941 m. DuPont kompanija šį polimerą užpatentavo [2], o 1945 m. užregistravo komerciniu pavadinimu Teflonas [3]. Buvo nustatyta, kad politetrafluoretilenas yra ypač atsparus korozijai ir aukštai temperatūrai, chemiškai inertiškas, puikus dielektrikas bei pasižymi labai maža paviršiaus trintimi. Dėka šių savybių teflonas plačiai naudojamas įvairiausiose srityse – elektros laidų izoliacijai, guolių sandarinimui, inertinių reaktorių, vamzdelių, implantų, kateterių gaminimui, lubrikantų sudėtyje, keptuvių ir puodų paviršiaus padengimui ir daugelyje kitų [4].

Politetrafluoretileno atradimas inicijavo platų susidomėjimą naujų perfluorintų junginių sinteze, jų tyrimu bei praktiniu panaudojimu. Per beveik 80 metų buvo susintetinta, ištirta ir įvairiems tikslams panaudota daugybė įvairiausių perfluorintų junginių: karboksirūgščių, sulfonrūgščių, alkoholių, amidų, eterių, esterių ir kt. Lyginant su nefluorintais analogais, šie junginiai pasižymi unikaliomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, kurias suteikia fluorintos grupės. Kadangi C-F ryšis yra trumpas ir labai stiprus, perfluorinti junginiai yra ženkliai chemiškai inertiškesni bei termiškai atsparesni. Fluorinta molekulės dalis pasižymi tiek hidrofobinėmis, tiek lipofobinėmis savybėmis, tuo tarpu polinė funkcinė grupė, kurią turi daugelis perfluorintų junginių, leidžia sąveikauti su polinėmis molekulėmis. Detalesnę informaciją apie šiuos junginius galima rasti apžvalginiuose straipsniuose [5, 6]. Toliau trumpai bus aptarti tik šiame darbe naudoti perfluorinti junginiai (1 pav.).

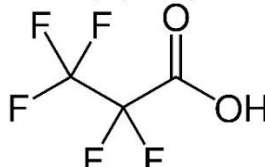
Heksafluorizopropanolis (HFIP) Heptafluorbutano rūgštis (HFBA)



Trifluoretano rūgštis (TFA)



Pentafluoropropano rūgštis (PFBA)



1 pav. Darbe naudotų perfluorintų junginių struktūros.

Heksafluorizopropanolis (HFIP, IUPAC pavadinimas – 1,1,1,3,3,3-heksafluor-2-propanolis) – bespalvis aštraus kvapo skystis. Nepaisant jog jo struktūroje yra vienas fluoru nepakeistas C-H vandenilis, HFIP dažniausiai priskiriamas perfluorintų junginių klasei. HFIP pirmą kartą susintetintas 1960 m. redukuojant heksafluoracetoną natrio borhidridu [7].

Heksafluorizopropanolio ir nefluorinto jo analogo – izopropanolio (i-PrOH) fizikinės savybės palygintos 1 lentelėje.

1 lentelė. HFIP ir i-PrOH fizikinės savybės [8].

Charakteristika	HFIP	i-PrOH
Virimo temperatūra, °C	58,6	82,5
Lydymosi temperatūra, °C	-4	-89,5
Tankis, g/ml	1,605	0,781
pK _a	9,3	17,1
Dielektrinė konstanta, ε	16,7	19,4
Dipolio momentas, μ	2,05	1,68
Vandenilio ryšio donoras, α	1,96	0,76
Vandenilio ryšio akceptorius, β	0	0,95

HFIP visiškai neabsorbuoja UV spinduliuotės, yra termiškai stabilus, puikiai maišosi su vandeniu. Maža virimo temperatūra (59 °C) leidžia jį lengvai regeneruoti distiliacijos būdu. HFIP pasižymi stipriu neigiamu indukcinio efektu. To priežastis – dvi trifluometilo grupės junginio struktūroje. Dėl stipraus neigiamo indukcinio efekto HFIP pasižymi daugiau nei 10⁷ kartų stipresnėmis rūgštinėmis savybėmis nei i-PrOH.

HFIP pasižymi labai stipriomis vandenilinio ryšio donorinėmis savybėmis (vandenilinio ryšio donoro parametras $\alpha = 1,96$) bei nėra vandenilinio ryšio akceptorius. Tuo tarpu i-PrOH pasižymi vidutinio stiprumo ir donorinėmis, ir akceptorinėmis savybėmis. HFIP donorinės savybės dar sustiprinamos vandeniliniu ryšiu tarp HFIP molekulių, susidarant HFIP dimerams ir trimerams. HFIP turi didesnę polinkį nei nefluorinti alkoholiai sudaryti micelių pavidalo klasterius. Galiausiai HFIP yra poliškesnis už savo nefluorintą analogą (žiūr. 1 lentelėje dipolio momentą).

Oksidacijos-redukcijos reakcijose HFIP išlieka labai stabilus. Dėl šios priežasties jis puikiai tinka kaip tirpiklis elektrocheminiuose tyrimuose, fotoredokso procesuose ir transformacijose, kuriose reikalingos stipriai oksiduojančios sąlygos [9]. HFIP – vienas dažniausiai pasirenkamų tirpiklių kai kuriose organinės sintezės srityse [10, 11]. Pavyzdžiui, dėl mažo nukleofilškumo, jis ypač gerai tinkantis tirpiklis sintetinant ir tiriant katijoninius organinius junginius.

Be plataus panaudojimo organinėje sintezėje HFIP naudotas ir kitose chemijos srityse. Perfluorinti alkoholiai nuo šešiasdešimtųjų praeito amžiaus metų naudoti baltymams denatūruoti ir stabilizuoti antrines peptidų struktūras [12]. Stiprios perfluorintų alkoholių vandenilinio ryšio donorinės savybės sustiprina šį efektą.

HFIP naudojamas ir analizinėje chemijoje. Perfluorinti alkoholiai, įskaitant HFIP, gali būti panaudoti kaip jonų porų reagentai nustatant oligonukleotidus jonų porų atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodu [13]. HFIP priedas judrioje fazėje daro įtaką rūgštinių ir bazinių analizių sulaikymui ir atskyrimo atrankumui skysčių chromatografijos metoduose. Proteomikoje HFIP naudotas baltymų ekstrakcijai iš audinių ar kaip ląstelių dializės buferio komponentas ruošiant mėginius analizei [14].

Polimerų chemijoje HFIP dažnai naudojamas kaip tirpiklis. HFIP tirpina polimerus žemesnėje temperatūroje nei dauguma kitų tirpiklių [15]. Vandenilinio ryšio donoro-akceptoriaus sąveika tarp perfluorintų alkoholių ir monomerų gali reikšmingai moduluoti stereokontrolę įvairiose radikalinės polimerizacijos reakcijose. Dėl šios priežasties galima kontroliuoti gauto polimero regiospecifiškumą, stereospecifiškumą bei molekulinę masę.

Didelė HFIP tirpinimo galia ir jo sugebėjimas veikti baltymų lankstymą ir struktūrą panaudotas medžiagotyroje. Nustatyta, kad HFIP inicijuoja vandenilinio ryšio susidarymu pagrįstą peptidinių supramolekulinių struktūrų susidarymą bei daro įtaką tokių struktūrų savybėms ir morfologijai [16].

Trifluoretano (trifluoracto) rūgštis (TFA, IUPAC pavadinimas – 2,2,2-trifluoretano rūgštis) – bespalvis aštraus kvapo skystis. Šią rūgštį 1922 m. pirmą kartą susintetino belgų mokslininkas F. Swarts [17].

TFA ir nefluorinto jo analogo – acto rūgšties fizikinės savybės palygintos 2 lentelėje.

2 lentelė. TFA ir acto rūgšties fizikinės savybės [18-24].

Charakteristika	TFA	Acto rūgštis
Virimo temperatūra, °C	72,4	117,9
Lydimosi temperatūra, °C	-15,4	16,6
Tankis, g/ml	1,531	1,045
pK _a	0,3	4,76
Dielektrinė konstanta, ε	42,1	6,15
Dipolio momentas, μ	2,3	1,7

TFA yra daugiau nei 10 000 kartų stipresnė rūgštis, nei acto rūgštis. Tai galima paaiškinti neigiamu fluoro atomų indukcinį efektu, kuris susilpnina O-H ryšį ir stabilizuoja konjunguotą bazę.

TFA pasižymi labai stipriomis vandenilinio ryšio donorinėmis savybėmis. Kaip ir HFIP atveju, TFA linkusi šias savybes sustiprinti sudarydama dimerus. Taip pat TFA yra poliškesnė nei acto rūgštis.

TFA gerai maišosi ne tik su vandeniu, bet ir su įvairaus poliškumo organiniais tirpikliais: acetonu, metanoliu, etanoliu, izopropanoliu, dietileteriu, benzenu, anglies tetrchloridu. TFA gerai tirpina aromatinius ir alifatinius angliavandenilius, peptidus, baltymus, aminorūgštis [25]. TFA laki, todėl dėl sąlyginai žemos virimo temperatūros ją nesunku pašalinti iš reakcijos produktų. Šios savybės leido TFA plačiai pritaikyti organinėje chemijoje [26]. TFA yra populiarus reagentas ne tik fluorintų junginių sintezėje, bet ir norint pašalinti apsaugines fluorenilmetiloksidkarbonil ir butiloksidkarbonil grupes [27].

TFA yra vienas dažniausiai naudojamų judrios fazės priedų atvirkščių fazių skysčių chromatografijoje analizuojant peptidus ir baltymus [28]. TFA sumažina tirpalo pH, taip perstumdama karboksilo grupių pusiausvyrą į nejonizuotos formos pusę. Taip pat TFA veikia bazines biopolimerų funkcines grupes kaip jonų porų reagentas. Dėl šių savybių TFA laikomas vienu geriausių judrios fazės priedų skysčių chromatografijoje, siekiant pagerinti biopolimerų sulaukymą, jų smailių formą ir atskyrimą. Tiesa, naudojant masių

spektrometrijos detektorių, TFA priedas susilpnina signalą, kadangi gana stipri TFA-analitė sąveika apsunkina analičių jonizaciją [29].

Pentafluorpropano (PFPA) ir heptafluorbutano (HFBA) rūgštys yra bespalviai aštraus kvapo skysčiai. Lyginant jų fizikines savybes su nefluorintais analogais (propano ir butano rūgštimis) matomos tos pačios tendencijos kaip ir HFIP ir TFA atvejais. Fluorinti junginiai pasižymi didesniu tankiu, mažesnėmis virimo ir lydimosi temperatūromis, ženkliai stipresnėmis rūgštinėmis savybėmis bei stipriomis vandenilinio ryšio donorinėmis savybėmis.

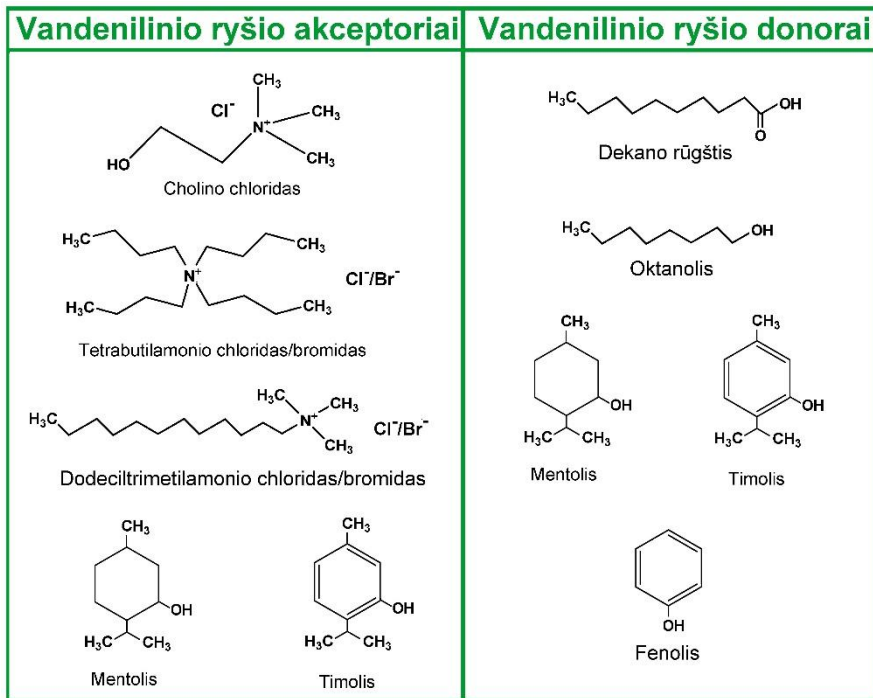
PFBA ir HFBA kartais naudojamos kaip judrios fazės priedas atvirkščių fazių skysčių chromatografijoje [30]. Taip pat šios rūgštys naudojamos specifinių organinių junginių sintezėje, kaip emulsikliai polimerų sintezėje bei fotojuostų gamyboje [31].

1.2. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai (HET)

Pirmieji hidrofilingi eutektiniai tirpikliai buvo susintetinti 2003 metais. Sumaišius cholino chloridą (lyd. temp. 302 °C) ir karbamidą (lyd. temp. 133 °C), moliniu santykiu 1:2, gautas tirpiklis, kurio lydimosi temperatūra – 12 °C [32]. Autoriai šiuos tirpiklius apibūdino kaip skysčius, gautus iš dviejų kietų medžiagų, kurių lydymosi temperatūros yra ne mažiau kaip 100 °C didesnės už gauto tirpiklio lydymosi temperatūrą ir pavadino giliais eutektiniais tirpikliais (angl., *deep eutectic solvents*). Vienas iš tokių tirpiklių komponentų yra vandenilinio ryšio donoras, o kitas – vandenilinio ryšio akceptorius. Terminas „eutektinis“ yra kilęs iš graikų kalbos ir reiškia gerai besilydantis, o terminas „gilus“ rodo ženkliai mažesnę už pradinių junginių tirpiklio lydymosi temperatūrą. Tačiau toks tirpiklių apibūdinimas jau nėra visiškai tikslus, kadangi vėliau jų sintezei buvo panaudotos ir skystos medžiagos (pvz., alkoholiai, karboksirūgštys), o susintetinto tirpiklio lydymosi temperatūra kartais būna netgi didesnė už kurio nors gryno skystojo jo komponento lydymosi temperatūrą. Todėl pastaruoju metu mokslinėje literatūroje [33, 34] yra diskutuojama dėl tokių tirpiklių apibūdinimo ir vis dažniau jie traktuojami kaip tirpikliai, sudaryti iš dviejų medžiagų, galinčių asocijuotis tarpusavyje vandenilinio ryšio pagalba susidarant homogeniškam skysčiui [35]. Šiame darbe tokie tirpikliai bus vadinami tiesiog eutektiniais tirpikliais.

Ilgą laiką buvo sintetunami, tiriami ir taikomi tik hidrofilingi (t.y. besimaišantys su vandeniu) eutektiniai tirpikliai. Tiktai 2015 m. olandų mokslininkai publikavo darbą [36], kuriame iš skirtingų ketvirtinio amonio druskų ir dekanų rūgšties pirmą kartą buvo susintetinti keli hidrofobiniai

eutektiniai tirpikliai (HET). Šis darbas inicijavo plataus masto tyrimus, skirtus tokių tirpiklių sintezei, jų savybių tyrimui bei praktiniam taikymui [37]. Lyginant su hidrofiliniais, hidrofobinių tirpiklių sintezei tinkamų junginių pasirinkimas yra gerokai siauresnis. 2 pav. pateiktos kelių, dažniau naudojamų junginių struktūros. Pagal šių tirpiklių sintezei naudojamų vandenilinio ryšio akceptorių prigimtį, HET skiriami į joninius ir nejoninius. Joninių tirpiklių vandenilinio ryšio akceptoriumi įprastai naudojami ilgagrandžiai ketvirtinio amonio (cholino, tetrabutilamonio, tetraheksilamonio, ir pan.) junginiai, o vandenilinio ryšio donoru – pakankamai hidrofobinės sočiosios bei nesočiosios karboksirūgštys (pvz. oktano, dekano, oleino ir pan.) arba alkoholiai (pvz. heksilo, decilo, dodecilo ir pan.) [38]. Nejoninių tirpiklių vandenilinio ryšio akceptorius įprastai būna mentolis arba timolis, o vandenilinio ryšio donoras – ilgagrandės karboksirūgštys (pvz. heksano, oktano, dekano, palmitino ir pan.) [39, 40]. Kai kurie junginiai (pvz. mentolis, dekano rūgštis), priklausomai nuo antrojo komponento prigimties, gali būti tiek akceptoriumi, tiek ir donoru.



2 pav. Kai kurių HET sintezei naudojamų akceptorių ir donorų struktūros.

Sintezė. Vienas iš esminių eutektinių tirpiklių privalumų – labai paprasta ir greitai jų sintezė. Eutektiniai tirpikliai gali būti sintetinami keliais būdais: sutrinant, nugarinant, išlydant, kaitinant ir maišant.

- **Sintezė sutrinant.** Komponentų mišinys trinamas grūstuvėje, kol gaunamas homogeninis skystis [41].
- **Sintezė nugarinant.** Sumaišomi atskirų komponentų vandeniniai tirpalai. Gautas tirpalas kaitinamas vakuume, kol išgaruoja vanduo [42].
- **Sintezė išlydant.** Komponentai sumaišomi karščiui atspariame inde ir kaitinant išlydoma iki homogeninio skysčio [42].
- **Sintezė šildant ir maišant.** Komponentai sumaišomi ir intensyviai maišomi ~ 50–80 °C temperatūroje, kol susidaro skaidrus homogeninis skystis [38].

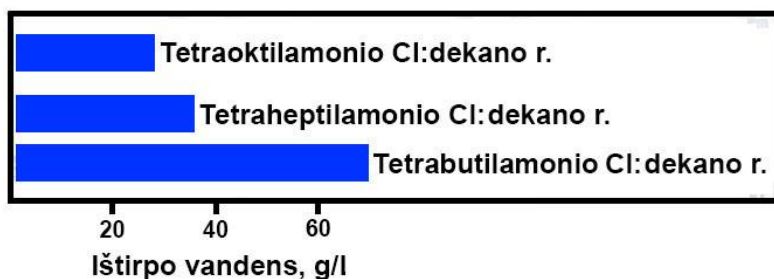
Sintezės būdas šildant ir maišant yra pats populiariausias. Dažniausiai tokios sintezės trukmė neviršija 0,5–1 valandos. Sintzei nereikalingi papildomi tirpikliai, sintezės metu nesusidaro jokie šalutiniai produktai, todėl nereikalingas papildomas susintetinto tirpiklio gryninimas. Populiariausias akceptorius/donoro molinis santykis 1:2, rečiau sintetinami tirpikliai moliniu santykiu 2:1, 1:1, 1:3, 1:4.

Toliau trumpai aptarsime klasikinei ekstrakcijai ir ypač skysčių-skysčių mikroekstrakcijai svarbias HET savybes: hidrofobiškumą, tankį, klampą ir lakumą.

Hidrofobiškumas. Didžioji dauguma analizei svarbių skystų objektų yra vandeniniai tirpalai, todėl analizių išskyrimui iš tokių mėginių ir jų sukonzentravimui skysčių-skysčių ekstrakcijos metodais yra būtini nesimaišantys su vandeniu tirpikliai. Įdomu pažymėti, kad praktiškai visuose publikuotuose darbuose HET hidrofobiškumas buvo vertinamas Karl'o Fišerio titravimo metodu išmatuojant ištirpusio vandens kiekį tirpiklyje, o ne matuojant HET tirpumą vandenyje [36, 39, 43]. Tuo tarpu ekstrakcijai ir ypač mikroekstrakcijai, kurioje naudojami labai maži hidrofobinio tirpiklio kiekiai, žymiai svarbiau įvertinti tirpiklio tirpumą vandenyje.

HET hidrofobiškumą didele dalimi nulemia tirpiklį sudarančių komponentų hidrofobiškumas. Bendru atveju dažniausiai galioja principas: kuo ilgesnes alkilo grandines turi kiekvienas tirpiklio komponentas, tuo mažesniu vandens tirpinimu pasižymi toks tirpiklis. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad tirpikliuose, sudarytuose iš tetrabutilamonio, tetraheptilamonio ir tetraoktilamonio chloridų akceptorius bei dekanas rūgšties donoro, vandens tirpumas juose mažėja, ilgėjant akceptorius alkilo grandinei (3 pav.).

Analogiškai, trimetilbutilamonio chlorido tirpikliuose su butano, heksano ir oktano rūgščių donorais, vandens tirpumas mažėja ilgėjant rūgšties alkilo grandinei [44, 45].

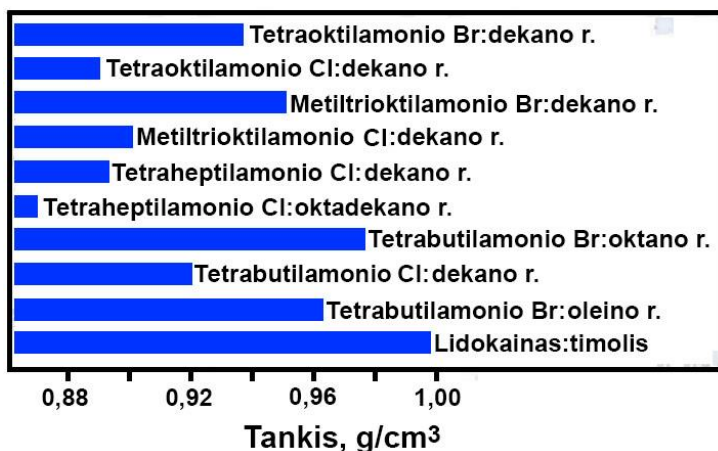


3 pav. Vandens tirpumo hidrofobiniuose eutektiniuose tirpikliuose (molinis santykis 1:2) palyginimas [36].

Ketvirtinio amonio druskos priešjonio (Cl^- arba Br^-) prigimties įtaka HET hidrofobiškumui nereikšminga. Pavyzdžiui, tetraoktilamonio chlorido ir tetraoktilamonio bromido tirpikliuose su dekanu rūgštimi vandens tirpumas skiriasi tik 2,2 g/l [36]. Be to, sudarytas iš abiejų hidrofobinių komponentų tirpiklis dažniausiai pasižymi blogesniu vandens tirpinimu nei tirpiklis, sudarytas iš hidrofobinio ir hidrofilinio junginių. Tarp iki šiol literatūroje aprašytų HET, geriausiu vandens tirpinimu (mažiausiu hidrofobiškumu) pasižymėjo tetrabutilamonio/dekano rūgšties (molinis santykis 1:2) tirpiklis. Ištirpusio vandens kiekis jame siekė 7 % (masės dalis) [46].

Tankis. Tirpiklio tankis yra ypač svarbus parametras skysčių-skysčių ekstrakcijoje. Norint tirpiklį panaudoti tradicinei skysčių-skysčių ekstrakcijai, jo tankis turėtų būti pakankamai reikšmingai didesnis arba mažesnis už vandens tankį. Priešingu atveju po ekstrakcijos sunku atskirti fazes. Tuo tarpu skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje žymiai pranašesni didesnio nei vandens tankio tirpikliai. 4 pav. palygintas dešimties HET tankis.

Tankis priklauso ir nuo vandenilinio ryšio donoro, ir nuo vandenilinio ryšio akceptorius prigimties [33, 43]. Skirtingų ketvirtinio amonio chlorido ir dekanu rūgšties tirpiklių (molinis santykis 1:2) tankis mažėja, ilgėjant amonio katijono alkilo grandinei. Be to, tokių tirpiklių tankiui įtaką daro ir ketvirtinio amonio anijonas: pakeitus chloridą bromidu, gaunami didesnio tankio tirpikliai. Joniniuose tirpikliuose, naudojant tą patį tetraalkilamonio akceptorius, tirpiklio tankis mažėja, ilgėjant donoro (organinės rūgšties) alkilo grandinei. Tuo tarpu nejoniniams tirpikliams su timolio akceptoriumi priešingai, tankis mažėja, trumpėjant rūgšties alkilo grandinei [47].



4 pav. Hidrofobinių eutektinių tirpiklių (molinis santykis 1:2) tankių palyginimas [48].

Deja, beveik visų iki šiol aprašytų HET tankis yra mažesnis arba labai artimas vandens tankiui ir tai apsunkina tokių tirpiklių taikymą mikroekstrakcijai. Todėl labai aktuali naujų, sunkesnių už vandenį HET paieška. Xiao su bendraautoriais [49, 50] susintetino kelis tirpiklius, sudarytus iš betaino, cholino chlorido bei karnitino akceptorių ir HFIP donoro, pasižyminčius ypač dideliu ($>1,2 \text{ g/cm}^3$) tankiu. Būtent šie darbai ir paskatino mus detaliau patyrinėti galimybę pritaikyti perfluorintus junginius naujų HET sintezei.

Klampa. Klampa yra dar vienas svarbus parametras, darantis didelę įtaką ekstrakcijos procesui. Ekstrakcijai tinkamesni mažesnės klamos tirpikliai, užtikrinantys geresnį kontaktą su mėginiu bei greitesnį pusiausvyros nusistovėjimą dėl greitesnės analičių difuzijos ekstrahente. Be to, mažesnės klamos tirpiklius lengviau tiksliai dozuoti, ypač naudojant automatines mėginių įleidimo sistemas.

Daugelio HET klampa kambario temperatūroje yra gana didelė ($>100 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) [51]. Tokias dideles klampas sąlygoja tai, jog tarp vandenilinio ryšio akceptoriaus ir donoro susidaro platus vandenilinių ryšių tinklas, dėl kurio sumažėja laisvų tirpiklio komponentų judrumas tirpiklyje. HET klampa priklauso nuo tirpiklio komponentų prigimties. Joninių tirpiklių klampa didėja, ilgėjant ketvirtinio amonio alkilo grandinei [37]. Tiek joninių, tiek ir nejoninių tirpiklių klampa taip pat didėja, ilgėjant donoro (karboksirūgšties) alkilo grandinei [52]. Mažiausios klamos ($<20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) nustatytos nejoniniams HET, susintetintiems donoru naudojant mentolį arba timolį bei riebiųjų rūgščių akceptorius [39].

Lakumas. Šis parametras ekstrakcijai svarbus dviem aspektais. Galimybė po ekstrakcijos nugarinti tirpiklį leidžia: a) papildomai sukonzentruoti išekstrahuotus junginius ir b) pertirpinti išekstrahuotus junginius analizei tinkamame tirpiklyje taip praplečiant ekstraktų analizės metodų spektrą. Deja, šiai HET savybei iki šiol mokslinėje literatūroje nebuvo skiriamas dėmesys. Didžioji dalis HET yra joninės prigimties, todėl jie nėra pakankamai lakūs ir aukštesnėje temperatūroje suskyla. Tai ypač neparanku atliekant ekstraktų analizę dujų chromatografijos metodu, kadangi nelakieji joniniai komponentai kaupiasi inžektoriuje bei chromatografinėje kolonėlėje. Bene vieninteliame šia tema publikuotame darbe [53] buvo išmatuotas timolio/dekano rūgšties, lidokaino/dekano rūgšties ir mentolio/dekano rūgšties tirpiklių garų slėgis ir nustatyta, kad šie tirpikliai yra 150–1000 kartų mažiau lakūs nei toluenas.

1.3. Vandeninės dvifazės sistemos

Vandeninės dvifazės sistemos (VDS) – vandeniniai tirpalai, kuriuose puikiai vandenyje tirpūs junginiai atitinkamose sąlygose (koncentracija, temperatūra, pH, druskos priedas ir kt.) sudaro nesimaišančią su vandeniu skystą fazę. VDS buvo atsitiktinai atrasta 1896 m. olandų mikrobiologo M. W. Beijerinck [54]. Tyrinėdamas baltymų ir polisacharidų tirpalus mokslininkas pastebėjo, kad sumaišius vandeninius agarą ir želatinos tirpalus, tirpale susidaro dvi nesimaišančios skystos fazės. Deja, kaip neretai pasitaiko moksliniuose tyrimuose, šis darbas ilgą laiką buvo nepelnytai užmirštas. Sistema buvo prisiminta tiktai praėjus daugiau nei 50 metų nuo jos atradimo. Švedų biochemikas Albertsson polietilenglikolio ir dekstrano vandeninę dviejų fazių sistemą panaudojo baltymų, peptidų, nukleorūgščių ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų grynimui [55]. Šis darbas paskatino kitus mokslininkus ieškoti naujų vandeninių dvifazių sistemų, jas tirti ir taikyti.

1.3.1. VDS tipai

Polimeras/polimeras. Polimeras/polimeras tipo VDS susidaro sumaišius du atitinkamų koncentracijų vandenyje tirpių polimerų tirpalus. Nuo praėjusio amžiaus šeštojo dešimtmečio visa eilė hidrofilinių polimerų kombinacijų buvo sėkmingai panaudota VDS suformavimui. Vandeninės dvifazės polimeras/polimeras sistemos gaunamos sumaišius [56]:

- Du hidrofilinius nejoninius polimerus, pvz., polietilenglikolį ir dekstraną.

- Hidrofilinių nejoninių ir joninių polimerus, pvz., polietilenglikolį ir poliakrilo rūgštį.
- Du joninius polimerus (polielektrolitus), pvz., dekstrano sulfatą ir polistireno sulfonatą.

Paminėtos hidrofilinių polimerų poros vandeniniuose tirpaluose yra „nesuderinamos“, todėl išsiskiria iš tirpalų kaip nesimaišanti su vandeniu skysta fazė [57]. Iki šiol nėra visiškai aiškus šio tipo VDS susidarymo mechanizmas. Daugumoje publikuotų darbų pagrindinis dėmesys skiriamas VDS susidarymo sąlygų optimizavimui ir sistemų praktiniam panaudojimui [58], tuo tarpu tokių fazių susidarymo mechanizmas sistemingai nebuvo tyrinėjamas. Pagrindiniai VDS susidarymą lemiantys veiksniai: polimerų koncentracija ir jų molekulinė masė. Esant mažoms polimerų koncentracijoms abu polimerai yra visiškai besimaišantys vandenyje, todėl fazių atsiskyrimas nevyksta. Konkretų polimerų pora sudaro VDS tik tirpale viršijus kritines abiejų polimerų koncentracijas, kurios priklauso nuo polimerų molekulinės masės. Kuo didesnė polimerų molekulinė masė, tuo mažesnės jų koncentracijos reikalingos VDS susidaryti.

Polimeras/druska. Polimero/druskos VDS yra antrasis dvifazių sistemų tipas atrastas penkiasdešimtaisiais praėjusio amžiaus metais [55]. Polimero/druskos VDS susidaro į vandeninį hidrofilinio polimero tirpalą pridėjus neorganinės ar organinės druskos. Susidaro sunkesnė vandeninė fazė su didele druskos koncentracija (joje polimero koncentracija nedidelė) ir viršutinė lengvesnė sukoncentruoto polimero fazė (joje druskos koncentracija maža). Pastaraisiais metais polimero/druskos sistemos plačiai tyrinėtos, nuodugniai charakterizuotos ir taikytos įvairiuose atskyrimo procesuose [59]. Šio tipo VDS susidarymui buvo naudoti įvairūs polimerai ir druskos, tačiau populiariausios sistemos – polietilenglikolio arba polipropilenglikolio polimerai ir neorganinės fosfato arba sulfato druskos [60, 61].

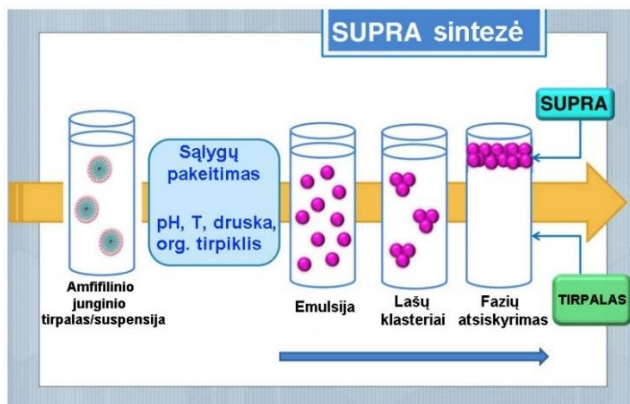
Polimero/druskos VDS susidarymui labai svarbus fazių atsiskyrimą inicijuojančios druskos veiksmingumas. Naudojamų druskų jonų veiksmingumas atitinka Hofmeister seriją [62], kurioje druskų jonai (svarbesnis yra anijonų indėlis) buvo išrikiuoti pagal minimalią koncentraciją, reikalingą nusodinti baltymus iš vandeninio tirpalo. Hofmeister eilė anijonams ir katijonams yra tokia:

- Anijonai: $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- \approx \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$.
- Katijonai: $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$.

Daugiakrūviai anijonai ir didelė hidratacijos energija pasižymintys mažesni vienakrūviai anijonai yra efektyvesni VDS iniciatoriai. Pvz., dvikrūvių HPO_4^{2-} ir SO_4^{2-} druskos yra labai efektyvios inicijuojant polimero/druskos VDS, o didesnių vienakrūvių ClO_4^- ir SCN^- druskos jau ne tokios efektyvios [63]. Druskos katijono įtaka VDS inicijavimui nėra tokia reikšminga, todėl dažniausiai naudojamos didesniu tirpumu pasižyminčios amonio arba šarminių metalų druskos [64, 65].

Nors kai kurios šio tipo VDS susidarymo mechanizmo detalės nėra visiškai aiškios, tačiau tikrai žinoma, kad fazės atsiskiria dėl hidratacijos proceso konkurencijos tarp polimero ir druskos jonų [66]. Pvz., trikrūviai anijonai yra ypač stipriai hidratuoti, todėl jie yra efektyvesni polimerų išdruskintojai nei dvikrūviai ar vienakrūviai anijonai. Druskos katijonų įtaka išdruskinimui sudėtingesnė nei anijonų. Kai kuriais atvejais katijonų įtaką nulemia dviejų priešingų sąveikų – katijono hidratacijos ir specifinės katijono-polimero sąveikos – konkurencija. Pvz., buvo nustatyta sąveika tarp ličio katijono ir polietileno oksido polimero etileno oksido grupių [63]. Bet kuriuo atveju yra patikimai ištirta, jog daugeliu atvejų pagrindinis polimero/druskos VDS susidarymo faktorius – dalinė polimero dehidratacija ir druskos jonų gebėjimas hidratuotis. Tai buvo ne karta patvirtinta vėlesniuose tyrimuose panaudojus įvairias druskų ir polimerų kombinacijas [66, 67].

Supramolekuliniai tirpikliai (SUPRA). Supramolekuliniais tirpikliais (dar vadinamais vandeninėmis micelinėmis dvifazėmis sistemomis) vadinami nanostruktūriniai skysčiai, susidarantys koloidinėse amfifilų (t.y. junginių, turinčių ir hidrofobinę, ir hidrofobinę grupes) suspensijose ar jų tirpaluose savaiminio susijungimo ir koacervacijos procesų dėka [68]. Bendras jų susidarymo procesas apima du etapus (5 pav.).



5 pav. SUPRA tirpiklių susidarymo schema [68].

Pirmiausiai paruošiama vandeninė amfifilo suspensija arba homogeniškas tirpalas, kuriame amfifilo koncentracija viršija kritinę agregacijos koncentraciją. Tokioje sistemoje susidaro taip vadinami supramolekuliniai agregatai – micelės arba pūslelės. Po to, pakeitus pH, temperatūrą arba pridėjus druskos ar organinio tirpiklio, sistemoje inicijuojamas koacervacijos procesas – agregatų augimas. Agregatams augant susidaro lašeliai (emulsija), kurie susijungia į didesnius lašelių konglomeratus, kol galiausiai naujos skystos fazės pavidalu iškyla į tirpalo paviršių arba nusėda dugne [69].

Koacervacijos būdu gaunamos fazės jau seniai traukė įvairių sričių mokslininkų susidomėjimą, tačiau jų vidinė struktūra iki šiol išlieka gana sunkiai suprantama. Taip yra todėl, kad jų struktūrai nustatyti reikalingose sąlygose agregatai įprastai suyra [70]. Amfifilų agregatų skilimo/susijungimo grįžtamumas, pagrindinis veiksnys kuriant tokias savitvarbias struktūras, atsiranda dėl nekovalentinio supramolekulinius agregatus sudarančių sąveikų pobūdžio [71]. Mokslinėje literatūroje iki šiol naudojami labai skirtingi tokių fazių pavadinimai: L3 fazė, koacervatas, anomali fazė, kempinės fazė [70]. 2009 m. tokios fazės pirmą kartą pavadintos supramolekuliniiais tirpikliais, taip siekiant labiau pabrėžti jų, kaip tirpiklių pobūdį, atskirti jas nuo molekulių ir joninių tirpiklių bei atsižvelgti į jų savaiminį susidarymą nekovalentinių sąveikų dėka [72].

Amfifilų agregacija vyksta traukos ir stūmos sąveikų tarp amfifilo-tirpiklio ir amfifilo-amfifilo balanso dėka. Amfifilų hidrofobinės dalies solvofobiškumas skatina jų agregaciją, o jonogeninių/neutralių polinių grupių tarpusavio stūma yra pagrindinė agregacijos stabdymo priežastis [73]. Taigi, norint gauti SUPRA fazę, reikia susilpninti sistemoje esančių micelių ar pūslelių jonogeninių/polinių grupių stūmą. Priklausomai nuo amfifilo polinės grupės prigimties (joninė ar neutrali), skiriami du pagrindiniai agregatų augimo mechanizmai [71]. Joninėse sistemose efektyviai susilpninti stūmą tarp grupių galima neutralizavus jų krūvį. Tai pasiekama pridėjus neorganinių ar organinių druskų, amfifilo priešjonių arba pakeitus tirpalo pH (tik silpnai besijonizuojantiems amfifilams) [74]. Dirbant su nejoniniais amfifilais, veiksmingiausias būdas susilpninti stūmą – sumažinti hidrofilines grupes solvatuojančio tirpiklio molekulių skaičių padidinus temperatūrą [75] arba pridėjus į sistemą besimaišančio su pagrindiniu tirpikliu kito tirpiklio [76]. Pirmuoju atveju, pašalinus dalį hidrofilines grupes solvatuojančio tirpiklio molekulių, sumažėja kiekvienos hidrofilinės grupės plotas ir tai palengvina kaimyninių micelių sukibimą [77]. Antruoju atveju, konkurencija tarp dviejų tirpiklių yra palanki amfifilas-amfifilas sąveikai, o tuo pačiu ir jų agregacijai. Cviterjoninės micelės agreguojasi temperatūrai nukritus žemiau kritinės

vertės [78]. Tokia netikėta elgsena, atsižvelgiant į didelį kviterioninių grupių poliškumą, aiškinama tuo, kad šiuo atveju elektrosstatinės sąveikos yra trumpo nuotolio, todėl jų poveikis kokybiškai skiriasi nuo analogiškų sąveikų tarp joninių amfifilų.

Joninis skystis/druska. Joniniai skysčiai – iš jonų sudaryti junginiai, kurių lydymosi temperatūra mažesnė nei 100 °C. Pirmą kartą šio tipo VDS buvo gauta 2003 m. Rogers su bendradarbiais [79] nustatė, jog hidrofilinis joninis skystis naujos fazės pavidalu gali būti išskirtas iš vandeninio tirpalo pridėjus neorganinės druskos. Šio tipo VDS susidaro tuo pat metu vykstant dviejų druskų tirpimui. Viena druska, turinti vieną ar du didelio krūvio tankio jonus (vandens-jono sąveika stipresnė nei vandens-vandens sąveika), ir kita – turinti mažo krūvio tankio jonus (vandens-jono sąveika silpnesnė nei vandens-vandens sąveika). Pirmoji druska – bet kokia organinė arba neorganinė druska, pasižyminti stipriu išdruskinimo poveikiu. Antroji druska – dėl mažo simetriškumo ir jonų krūvio delokalizavimo priskiriama joninių skysčių kategorijai.

Dėl labai didelės joninių skysčių įvairovės (apima platų hidrofiliskumo-hidrofobiškumo diapazoną) joninių skysčių/druskų VDS tyrimai buvo atliekami labai intensyviai. Nuo 2009 m. buvo iširta daugybė skirtingų sistemų [80]. Bene plačiausiai buvo tiriami hidrofiliniai imidazolio joniniai skysčiai su halogenų, sulfato, sulfonato, alkanoatų, tetrafluorborato anijonais. VDS inicijavimui dažniausiai naudojamos didelio krūvio tankio neorganinės druskos (pvz., fosfatai, sulfatai, karbonatai) [81, 82]. Darbuose [83-85] vietoje neorganinių druskų pasiūlyta iniciatoriais naudoti draugiškesnius aplinkai sacharidus arba amino rūgštis.

Joninio skysčio/druskos tipo sistemose abu dvi fazes formuojantys komponentai yra joniniai. Dėl šios priežasties tarp dviejų susiformavusių fazių vyksta procese dalyvaujančių jonų persiskirstymas, kurį apriboja visos sistemos ir individualių fazių elektroneutralumas. Bridges su bendraautorais [86] nustatė, jog nepaisant bendro sistemos elektroneutralumo, labiausiai chaotropiškas jonas susikoncentruoja joninio skysčio fazėje, o labiausiai išdruskinanti linkęs jonas kaupiasi vandeninėje fazėje. Deja, daugelyje darbų pateikiamos joninio skysčio/druskos tirpalų fazių diagramos buvo matuojamos ir interpretuojamos naudojant bendras druskos ir joninio skysčio koncentracijas, o ne atskirų jų jonų koncentracijas. Coutinho [87] ir Zafarani-Moattar [81] tyrimų grupės pademonstravo, kad siekiant gauti joninio skysčio/druskos VDS, svarbiausias yra jonų hidratacijos dėka vykstantis išdruskinimo procesas, o ne išdruskinimą inicijuojančių jonų tarpusavio (jonas-jonas) sąveikos.

Kiti VDS tipai. Be aukščiau aptartų VDS sistemų, reikėtų paminėti dvi iki šiol rečiau taikomas sistemas:

- VDS hidrofilinių eutektinių tirpiklių pagrindu [88].
- VDS polinių organinių tirpiklių pagrindu [89].

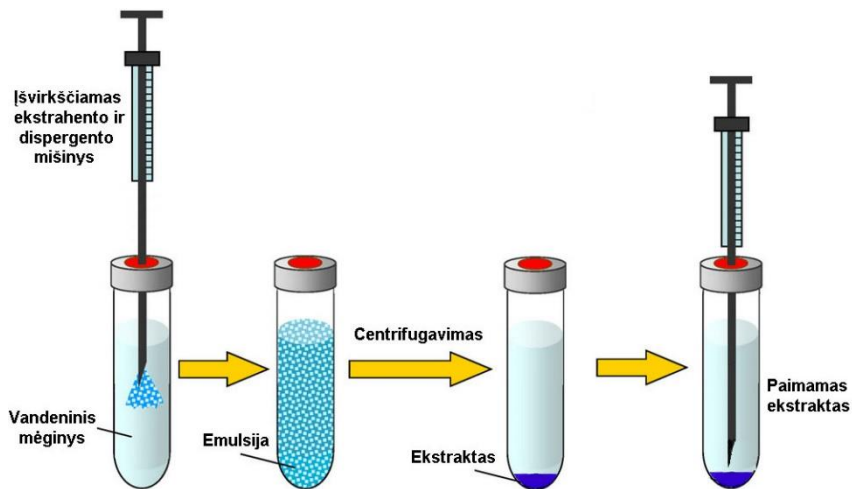
Sistemos hidrofilinių eutektinių tirpiklių pagrindu dažniausiai formuojamos inicijuojant neorganinėmis druskomis [90, 91], rečiau hidrofiliniais polimerais [92] arba sacharidais [93].

VDS organinių tirpiklių (acetonitrilo, acetono, etanolio, 1-propanolio arba 2-propanolio) pagrindu gaunamos išdruskinimo būdu, t.y. į vandeninį polinio organinio tirpiklio tirpalą pridėjus neorganinės druskos [94-97]. Palyginus su kitomis VDS, organinis tirpiklis/druska sistemos yra žymiai paprastesnės ir pigesnės. Jos pasižymi nedidele klampa ir lengvai keičiamu fazių tūrių santykiu. Tačiau išdruskinimui naudojamos labai didelės druskų koncentracijos (mol/l eilės) dažnai apsunkina šių sistemų suderinamumą su chromatografiniais analizės metodais.

1.4. Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija

Klasikinė skysčių-skysčių ekstrakcija yra ilgai trunkantis ir brangus procesas. Ekstrakcijai įprastai sunaudojami dideli aplinkai ir žmogui žalingų organinių tirpiklių kiekiai (kai kuriais atvejais ekstrakcijai sunaudojamų tirpiklių kiekis gali siekti ir 1 litrą). Pastaraisiais dešimtmečiais visuomenėje sparčiai populiarėjant tvarios aplinkos principams, vis didesnis mokslininkų dėmesys buvo skiriamas ir tradicinių mėginio paruošimo būdų miniatiūrizavimui [98]. Neabejotinai populiariausias pastarojo dešimtmečio miniatiūrizuotas skysčių-skysčių ekstrakcijos variantas – Rezaee ir bendraautorių 2006 metais pasiūlyta dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija (DSSME) [99]. Pirminiame DSSME (6 pav.) variante hidrofobinis ir sunkesnis už vandenį ekstrakcijos tirpiklis yra sumaišomas su hidrofiliniu disperguojančiu tirpikliu ir šis tirpiklių mišinys (~150–400 μ l) mikrošvirkštu greitai sušvirkščiamas į ~5–10 ml tūrio vandeninį mėginį. Greitai sušvirkštus šį mišinį, tirpale susiformuoja emulsija, sudaryta iš tolygiai vandeniniame mėginyje pasiskirsčiusių ekstrakcijos tirpiklio mikrolašelių. Tokia sistema pasižymi labai dideliu abiejų fazių sąlyčio paviršiaus plotu. Būtent tai ir nulemia esminį šio metodo pranašumą – ypač greitą analizių perėjimą iš vandeninės į organinę fazę. Mikroekstrakcija įprastai trunka tik kelias-keliolika sekundžių, o neretai įvyksta netgi akimirksniu. Mėginys centrifuguojamas ir sunkesnė už vandenį organinė fazė nesunkiai paimama

mikrošvirkštu. Bendra visos procedūros trukmė (įskaitant centrifugavimo trukmę) įprastai siekia 5–10 min.



6 pav. DSSME metodo principinė schema.

Sėkmingam DSSME panaudojimui turi būti tenkinami šie reikalavimai:

- Ekstrakcijos tirpiklis turi nesimaišyti su vandeniu, tačiau maišytis su disperguojančiu tirpikliu.
- Disperguojantis tirpiklis turi maišytis ir su ekstrakcijos tirpikliu ir su vandeniu.

Tradiciniame DSSME variante naudojamas sunkesnis už vandenį ekstrakcijos tirpiklis. Taip pat svarbu, kad ekstrakcijos tirpiklis būtų suderinamas su naudojamu analizės metodu. Priešingu atveju būtina nugarinti ekstraktą ir išekstrahuotas analites ištirpinti analizei tinkamame tirpiklyje.

Efektyviai tikslinių junginių ekstrakcijai turi būti parinkti tinkami dispergavimo ir ekstrahavimo tirpikliai, optimizuotas jų tūris, vandeninės fazės pH, joninė jėga, ekstrakcijos ir centrifugavimo trukmė [100].

1.4.1. Dispergavimo būdai

Tradiciniame DSSME metodo variante hidrofobinis ekstrakcijos tirpiklis mėginio tirpale buvo disperguojamas poliniais organiniais tirpikliais [101]. Dažniausiai dispergentais buvo naudojami acetonitrilas arba metanolis, žymiai rečiau – etanolis ar acetonas. Tokio dispergavimo būdo trūkumas – polinis organinis tirpiklis mėginio tirpale padidina ekstrahuojamų junginių tirpumą mėginyje ir sumažina ekstrakcijos efektyvumą. Vėliau mokslininkų publikuotuose darbuose buvo pasiūlyti keli alternatyvūs dispergavimo būdai.

Mechaninis dispergavimas. Tai pats paprasčiausias ekstrahento emulsijos generavimo be dispergento būdas: mėginys su pridėtu ekstrahentu purtomas rankomis [102], mechanine purtykle [103] arba intensyviai maišomas magnetine maišykle [104]. Visais paminėtais atvejais ekstrakcija taip pat vyksta labai greitai (trukmė nuo kelių iki keliasdešimties sekundžių) ir efektyviai.

Dispergavimas ultragarsu. 2008 metais kaip alternatyva dispergavimo tirpikliui buvo pasiūlytas ultragarsas [105]. Mikrošvirktu į mėginį išvirkščiamas reikiamas ekstrahento tūris, po to tam tikrą laiką tarpą (~2–5 min.) mėginys veikiamas ultragarsu. Taip ne tik išvengiama papildomo tirpiklio panaudojimo, tačiau, kaip teigia autoriai, susidaro mažesni ekstrahento lašeliai ir pagerėja ekstrakcijos efektyvumas.

Nepaisant paminėtų privalumų, šis metodas turi ir trūkumų. Veikiant ultragarsu tirpalas įšyla. Dėl to dalis ekstrakcijos tirpiklio gali nugaruoti, o kai kurie organiniai junginiai gali ir skilti. Taip pat disperguojant ultragarsu susidaro labai stabili emulsija, todėl reikia ilgiau centrifuguoti [105].

Dispergavimas oru. Taikant šį metodą, emulsija susidaro kelis kartus įtraukiant ir išstumiant vandeninio mėginio ir ekstrakcijos tirpiklio mišinį švirktu [106]. Judant oro srautui skystyje susidaro sūkurinis judėjimas, dėl ko ekstrahentas sudaro labai mažus lašelius vandeninėje fazėje.

Taip pat galima paminėti rečiau taikomus dispergavimo būdus: dispergavimą mikrobangomis [107] bei dispergavimą temperatūra [108].

Apibendrinant galima pažymėti, kad nors šia tema publikuotuose darbuose autoriai akcentuoja savo siūlomų dispergavimo būdų pranašumus kitų atžvilgiu, išsamesnė darbų analizė rodo, kad visi paminėti būdai beveik vienodai gerai tinka mikroekstrakcijai. Nežymiai skiriasi tik ekstrakcijos trukmė (nuo kelių s iki kelių min) bei dispergavimui naudojama įranga. Tai patvirtina ir mūsų laboratorijoje atliktas tyrimas (rezultatai nepublikuoti), kurio metu ftalatai buvo ekstrahuojami anglies tetrachloridu (100 μ l) disperguojant acetonitrilu, purtant rankomis, magnetine maišykle ir ultragarsu. Visais atvejais ftalatų ekstrakcijos efektyvumas reikšmingai nesiskyrė.

1.4.2. Ekstrahentai

DSSME metu susidaro labai maži (~20–100 μ L) ekstrakto tūriai, todėl ekstrakcija įprastai atliekama konusiniame centrifuginiame mėgintuvėlyje. Patikimai surinkti tokius mažus organinės fazės tūrius įmanoma tik jei ekstrahentas yra sunkesnis už vandenį, t.y. jei po centrifugavimo ekstraktas susikaupia labai siauroje apatinėje mėgintuvėlio dalyje. Reikalavimas

ekstrahuojančiam tirpikliui būti sunkesniau už vandenį labai apriboja tinkamų ekstrahentų skaičių. Todėl pradiniam DSSME metodo tyrimo ir taikymo etape ekstrahentai su retomis išimtimis buvo naudojami tik keli chlorinti angliavandeniliai – chloroformas, anglies tetrachloridas, chlorbenzenas ir pan. [109]. Vėliau potencialių ekstrahentų ratas buvo išplėstas panaudojus ir lengvesnius už vandenį tirpiklius, joninius skysčius, hidrofobinius eutektinius tirpiklius bei VDS.

Mažo tankio hidrofobiniai tirpikliai. Naudojant mažo tankio tirpiklius, nucentrifugavus mišinį organinis sluoksnis lieka viršuje. Kadangi ekstrahento tūris labai mažas, susidaro labai plonas sluoksnis, kurį sunku surinkti mikrošvirkštu [110]. Vienas iš pasiūlytų būdų šios problemos sprendimui – panaudoti specialios konstrukcijos mėgintuvėlį, pavyzdžiui, stiklinį mėgintuvėlį su siaurėjančia viršutine dalimi [111]. Po ekstrakcijos į mėgintuvėlį papildomai švirkštu įleidžiama vandens, kad organinė fazė pakiltų į siaurąją mėgintuvėlio dalį. Kitas būdas – ekstrakciją atlikti plastikinėje Pastero pipetėje. Po ekstrakcijos ekstraktas ištraukiamas mikrošvirkštu iš siaurosios pipetės dalies [112].

Dar vienas lengvesnių už vandenį tirpiklių panaudojimo būdas paremtas ekstrakto sukietinimu šaldant [113]. Po įprastos DSSME procedūros ir centrifugavimo mėginys atšaldomas vonioje su ledukais. Ekstraktui sukietėjus, jis ištraukiamas mentele, atšildomas ir analizuojamas. Deja, šiam metodui tinkami tik keli, pakankamai aukšta lydymosi temperatūra pasižymintys tirpikliai. Tai ilgos anglies grandinės alkoholiai – dekanolis, undekanolis, dodekanolis [114].

Joniniai skysčiai. Panaudoti hidrofobinius joninius skysčius DSSME metode pirmą kartą 2009 metais pasiūlė Liu ir bendraautorai [115]. Heterociklinių insekticidų ekstrakcijai iš vandeninių tirpalų buvo panaudotas 1-heksil-3-metilimidazolis. Nuo to laiko nemažai skirtingų joninių skysčių buvo panaudoti įvairiuose mikroekstrakcijos variantuose [116].

Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai dispersinei skysčių-skysčių mikroekstrakcijai naudojami nuo 2016 m. [117]. Pirmajame darbe [118], vaisių sulčių mėginiuose acetonitrilu dispergavus cholino chlorido/4-chlorfenolio eutektinį tirpiklį buvo ekstrahuojami pesticidai. Vėlesniuose darbuose mikroekstrakcijai buvo panaudota nemažai įvairių HET, tarp kurių ryškiai dominuoja tirpikliai, sudaryti iš ketvirtinio amonio druskų akceptorių ir ilgagrūdžių alkoholių, fenolinių junginių arba karboksirūgščių donorų [119]. HET dispergavimas mėginyje buvo atliekamas poliniais tirpikliais [118], ultragarsu [120] arba mechaniškai purtant [121].

Vandeninės dvifazės sistemos. 2009 m. buvo publikuotas pirmasis VDS panaudojimo mikroekstrakcijai darbas [122], kuriame aldehidų

mikroekstrakcijai buvo panaudota acetonitrilas/druska vandeninė dvifazė sistema. Tai davė pradžią VDS panaudojimui mikroekstrakcijai. Kadangi naudojant VDS ekstrahentas yra generuojamas tiesiogiai mėginyje, šis mikroekstrakcijos būdas neretai dar vadinamas ne dispersine, bet homogenine skysčių-skysčių mikroekstrakcija. Šia tema publikuotuose darbuose VDS susidarymui mėginio tirpale inicijuoti dažniausiai buvo naudoti trys būdai [123]: a) neorganinės druskos; b) sacharidai; c) tirpalo pH pakeitimas.

Inicijuojant druskomis bei sacharidais ekstrakcijos tirpikliu dažniausiai naudoti poliniai organiniai tirpikliai acetonitrilas, acetonas, etanolis, propanolis, tetrahidrofuranas [123-126]. Priklausomai nuo naudojamos druskos prigimties, išdruskinimui naudojamų druskų koncentracija svyruoja 1–3 mol/l ribose. Inicijuojant sacharidu (dažniausiai gliukoze), įprastai naudojama 100–200 g/l jo koncentracija [127].

Inicijuojant tirpalo pH pakeitimu ekstrahentais naudojami keičiamo hidrofiliškumo tirpikliai [128]. Tokiomis savybėmis pasižymi kai kurie aminai (pvz., dimetilcikloheksilaminas, dipropilaminas, diizobutilaminas, oktilaminas ir pan.) bei karboksirūgštys (pvz., oktano, heptano, nonano ir pan.). Jonizuotos tokių junginių formos yra hidrofilinės ir gerai tirpios vandenyje. Tuo tarpu pakeitus tirpalo pH, šie junginiai pereina į neutralią nesimaišančią su vandeniu formą. Aminai ištirpinami mėginyje paveikus mėginį anglies dioksidu arba pridėdant į mėginį sauso ledo. Hidrofilinės tirpiklio formos grąžinimas į hidrofobinę atliekamas pašalinus anglies dioksidą iš tirpalo praleidžiant per jį dujas (azotą arba orą) arba tiesiog pašarminus mėginio tirpalą [129, 130]. Naudojant karboksirūgštis, jos ištirpinamos pašarminame mėginyje, o dvifazės sistemos susidarymas inicijuojamas tirpalą parūgštinus [131].

Siekiant paplėsti metodo galimybes neseniai mikroekstrakcijai buvo panaudotos VDS hidrofiliųjų eutektinių tirpiklių pagrindu [132]. Mikroekstrakcijai vandeniniame mėginyje ištirpinamas nedidelis kiekis hidrofiliinio eutektinio tirpiklio, pvz., cholino chlorido/etilenglikolio, tetrabutilamonio chlorido/etilenglikolio, tetrabutilamonio chlorido/heptanolio ir pan. VDS susidarymas inicijuojamas pridėdant nedidelį kiekį organinio tirpiklio: tetrahidrofurano, heksano, etilacetato ar cikloheksano [133]. Tuo tarpu iš ketvirtinio amonio druskų ir ilgagrandžių alkoholių ar karboksirūgščių sudaryti hidrofiliiniai eutektiniai tirpikliai, ištirpinti vandeniniame mėginyje suskyla į individualius komponentus. Todėl šiuo atveju papildomas VDS susidarymo inicijavimas nereikalingas, kadangi emulsiją sudaro, t.y. ekstrahento vaidmenį atlieka hidrofobinis alkoholis ar karboksirūgštis, o ketvirtinio amonio druska yra VDS iniciatorius [134]. Pastarasis būdas vertintinas skeptiškai. Nesuprantama, kokia prasmė sintetinti hidrofiliinį

eutektinį tirpiklį, kuris vandeniniame mėginyje vėl skyla į atskirus komponentus. Žymiai paprasčiau tiesiog sušvirkšti į mėginį atitinkamo hidrofobinio alkoholio ar karboksirūgšties ir disperguojančio tirpiklio mišinį

1.4.3. DSSME taikymas

Pagrindinė ir bene vienintelė DSSME metodo taikymo sritis – mėginio paruošimas analizei, t.y. įvairių junginių išskyrimas iš mėginio matricos ir jų sukonzentravimas. Plačiau susipažinti su metodo taikymu galima neseniai publikuotuose apžvalginiuose straipsniuose [119, 135, 136]. Kadangi metodas skirtas ekstrakcijai iš vandeninių tirpalų, dažniausiai buvo tiriami įvairių rūšių vandens mėginiai – geriamasis, nutekamasis, upių, ežerų, požeminis ir pan., rečiau – biomedicininiai (šlapimas, kraujas, seilės) mėginiai bei maisto produktai (pienas, sultys, kiti gėrimai).

Ekstrahuojamų junginių spektras pakankamai platus: chlorinti ir aromatiniai angliavandeniliai, fenoliai, ftalatai, nitro junginiai, pesticidai, fungicidai, riebalų rūgštys, antibiotikai, analgetikai, antidepresantai, nelegalūs dažikliai, biologiškai aktyvūs junginiai, pereinamųjų metalų jonai prieš ekstrakciją juos pervedus į hidrofobinius kompleksus, ir kt. Būtina pažymėti, kad netradicinių tirpiklių (HET, VDS) panaudojimas ženkliai išplėtė ekstrahuojamų junginių poliškumo intervalą. Tradiciniame DSSME variante ekstrahentu naudojami nesimaišantys su vandeniu, t.y. gana hidrofobiniai tirpikliai, efektyviai ekstrahuojantys tik vidutinio poliškumo-nepolinius junginius. Tuo tarpu netradicinių ekstrahentų sistemose susidaro ir labai polinės (pvz., polinis organinis tirpiklis/druska, joninis skystis/druska ir pan.) nesimaišančios su vandeniu fazės, puikiai tinkančios ir polinių junginių ekstrakcijai [68]. Be to, skirtingai nei įprasti tirpikliai, kai kurių tipų VDS turi galimybę ekstrahuoti junginius mišriais mechanizmais. Pvz., polinė supramolekulinių VDS tirpiklių dalis gali su analite sąveikauti vandenilinio ryšio, dipolis-dipolis, jonas-dipolis, jonas-jonas sąveikomis, o nepolinė – dispersine ir/arba π - π sąveikomis. Tai įgalina vienu metu ekstrahuoti plataus poliškumo diapazono junginius.

Apibendrinant galima pažymėti, kad DSSME dažniausiai atliekama iš 5–10 ml tūrio mėginių su 20–150 μ l ekstrahento. Priklausomai nuo ekstrahuojamų analičių savybių, mėginio matricos bei ekstrakcijos tirpiklio prigimties, analitės dažniausiai sukonzentruojamos 10–100 kartų, o ekstrakcijos efektyvumas daugeliu atveju viršija 80%. Ekstraktai įprastai analizuojami efektyviosios skysčių chromatografijos, dujų chromatografijos (organiniai junginiai) arba atominės absorbcijos/emisijos spektroskopijos (metalai) metodais.

Lyginant su klasikine skysčių-skysčių ekstrakcija galima išskirti du pagrindinius DSSME metodo pranašumus: a) DSSME vyksta labai greitai, daugeliu atveju netgi akimirksniu; b) sunaudojami ženkliai mažesni toksiškų ir gana brangių tirpiklių kiekiai.

Deja, DSSME metodas turi ir keletą trūkumų. Ekstrakcijos metu susidaro labai maži ekstrakto tūriai, todėl jų analizei tinkami tik keli analizės metodai. Be to, kaip jau buvo ne kartą minėta, idealus ekstrahentas turi būti sunkesnis už vandenį, pakankamai lakus, pasižymėti nedidele klampa bei suderinamumu su analizės metodu. Šie reikalavimai labai apriboja DSSME metodui tinkamų tirpiklių skaičių. Didžioji dauguma netradicinių (joniniai skysčiai, HET, VDS) tirpiklių yra labai klampūs, nelakūs, lengvesni už vandenį bei dažnai nesuderinami su skysčių chromatografija. Didelės klamos ekstraktus sunku dozuoti mikrošvirkštais ar automatinėmis mėginių įleidimo sistemomis. Nelakūs ekstraktai netinka dujų chromatografinei analizei. Be to, tokių ekstraktų ne tik negalima nugarinti ir pertirpinti tolimesnei analizei tinkamame tirpiklyje, tačiau dažniausiai būtina dar papildomai juos praskiesti taip sumažinant jų klampą bei įgalinant analizę skysčių chromatografijos metodu. Galiausiai lengvesnių už vandenį ekstraktų surinkimui reikalingi specialūs indai. Taigi, DSSME metodui tinkamų savybių tirpiklių paieška iki šiol išlieka labai aktuali.

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Reagentai ir tirpalai

Tirpiklių sintezei bei chromatografinėi analizei buvo naudoti šie reagentai: mentolis ($\geq 99\%$), tetrabutilamonio chloridas ($\geq 97\%$), tetraheksilamonio chloridas ($\geq 98\%$), tetradeciltrimetilamonio bromidas ($\geq 98\%$), heksafluorizopropanolis (LC-MS grynumo), trifluoracto rūgštis (LC-MS grynumo), pentafluorpropano rūgštis ($\geq 98\%$), heptafluorbutano rūgštis ($\geq 98\%$), metanolis (LC-MS grynumo), etanolis ($\geq 98\%$), izopropanolis (LC-MS grynumo), acetonitrilas (LC-MS grynumo), dimetilsulfoksidas ($\geq 99\%$), acetonas ($\geq 99\%$), tetrahidrofuranas ($\geq 99\%$), NaCl ($\geq 99,9\%$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\geq 99,9\%$), $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (LC-MS grynumo), skruzdžių rūgštis (LC-MS grynumo), acto rūgštis (LC-MS grynumo).

Visi modelinėmis analitėmis naudoti junginiai buvo ne mažesnio nei 95 % grynumo. Visi reagentai buvo įsigyti iš Sigma-Aldrich (Vokietija) bei ThermoFisher (Lietuva). Pirminiai standartiniai 200–500 mg/l analizių tirpalai buvo ruošiami pasveriant reikiamą junginio kiekį ir, priklausomai nuo junginio tirpumo, ištirpinant metanolyje, metanolio/vandens mišinyje arba vandenyje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami atitinkamai skiedžiant pirminius standartus judria faze (chromatografinėi analizei) arba vandeniui (mikroekstrakcijai).

Judriomis fazėmis chromatografinėi analizei buvo naudoti vandens/acetonitrilo mišiniai be arba su atitinkamais (skruzdžių rūgštis, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ir kt.) priedais.

2.2. Aparatūra

Skysčių chromatografijos tyrimai buvo atliekami 1290 Infinity II LC (Agilent) chromatografu, sukomplektuotu iš dviejų aukšto slėgio siurblių su judrios fazės nудujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos, kolonėlių termostato ir diodinės matricos detektoriaus (190–600 nm). Chromatografo valdymas ir eksperimento duomenų apdorojimas buvo atliekami Agilent OpenLAB CDS programine įranga.

SUPRA tirpiklių stochiometrija buvo nustatoma ultraefektyviosios skysčių chromatografijos prietaisu Acquity UPLC (Waters), sukomplektuotu iš dviejų aukšto slėgio siurblių su judrios fazės nудujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos, kolonėlių termostato, diodinės matricos detektoriaus (190–600 nm) ir q-TOF masių spektrometro su

elektropurkštuvine (ESI) jonizacija (Bruker). Chromatografo valdymas ir duomenų apdorojimas buvo atliekami Bruker HyStar 3.2 programine įranga.

Konkrečių junginių chromatografiniam nustatymui naudotos kolonėlės, judrių fazių sudėtys bei detektavimo sąlygos pateikiamos atitinkamuose „Rezultatai ir jų aptarimas“ darbo dalies skyriuose.

Mėginiai buvo centrifuguojami SIGMA 1-6P centrifuga (DJB Labcare Ltd., Anglija). Eutektinių tirpiklių klampa buvo matuojama 25 °C temperatūroje Brookfield DV-II viskozimetru (Middleboro, MA, USA).

2.3. Procedūros

Hidrofobinių eutektinių tirpiklių sintezė. Į stiklinį indą su hermetišku dangteliu pridedami reikiami (molinis santykis 1:2) vandenilinio ryšio akceptorius ir donoro (perfluorinto junginio) kiekiai, įdedamas magnetinės maišyklės strypelis ir mišinys intensyviai maišomas (15–30 min.) vandens vonioje ~60 °C temperatūroje kol susidaro skaidrus homogeniškas skystis.

Eutektinių tirpiklių tankis buvo matuojamas tiksliai ($\pm 0,5$ mg) pasveriant specialioje 5,0 cm³ talpos gravimetrinėje kolbutėje.

Fazių diagramų matavimas. Matavimas buvo atliekamas titravimo iki susidrumstimo metodu. Į termostatuojamą (20 °C) ir maišomą atitinkamos koncentracijos vandeninį HFIP tirpalą (10,000 g vandens + 0,200–2,000 g HFIP) pipete nedidelėmis porcijomis pridedamas atitinkamas organinis tirpiklis kol susidaro emulsija ir tirpalas susidrumsčia. Apskaičiuavus susidrumstimo taške pridėto tirpiklio masę, apskaičiuojamos jo ir HFIP masės dalys (w, mas.%) šiame tirpale. Fazių diagrama sudaroma nubrėžiant w(HFIP) priklausomybę nuo w(tirpiklis).

Ekstrakcijos efektyvumo įvertinimas. Ekstrakcijos efektyvumas (EE) buvo skaičiuojamas tokia lygtimi:

$$EE(\%) = \frac{c_0 - c_1}{c_0} \cdot 100 \%$$

c_0 – tiriamo junginio koncentracija, išmatuota vandeninėje fazėje prieš ekstrakciją; c_1 – tiriamo junginio koncentracija, išmatuota vandeninėje fazėje po ekstrakcijos.

Atliekant ekstrakciją HFIP/ACN vandenine dvifaze sistema, po ekstrakcijos vandeninės fazės tūris padidėja. Todėl šiuo atveju ekstrakcijos efektyvumas buvo skaičiuojamas tokia lygtimi:

$$EE(\%) = \frac{c_0 \cdot V_0 - c_1 \cdot V_1}{c_0 \cdot V_0} \cdot 100\%$$

c_0 ir c_1 – tiriamo junginio koncentracijos vandeninėje fazėje prieš ir po ekstrakcijos; V_0 ir V_1 – vandeninės fazės tūris prieš ir po ekstrakcijos.

Mikroekstrakcijos procedūra. Mikroekstrakcija buvo atliekama 10 ml talpos stikliniuose centrifuginiuose mėgintuvėliuose. Į mėgintuvėlį su 5,0–7,5 ml vandeninio mėginio pridedami atitinkami kiekiai reikiamų medžiagų (hidrofobinio eutektinio tirpiklio, SUPRA tirpiklio komponentų arba HFIP ir ACN bei vidinio standarto), tirpalas fiksuotą laiko tarpą (1–30 s) purtomas ir 5 min centrifuguojamas 4000 rpm greičiu. Tolimesnė eiga priklauso nuo tyrimo pobūdžio. Tiriant susidariusios fazės tūrį, mikrošvirkštu išmatuojamas jos tūris. Vertinant ekstrakcijos efektyvumą analizuojama vandeninė fazė. Atliekant realių vandens mėginių mikroekstrakciją eutektiniais ir SUPRA tirpikliais, ekstraktas sumaišomas su 50 µl acetonitrilo ir analizuojamas. Atliekant ekstrakciją HFIP/ACN vandenine dvifaze sistema, ekstraktas nugarinamas azoto srautu, likutis tirpinamas 50 µl judrios fazės ir analizuojamas.

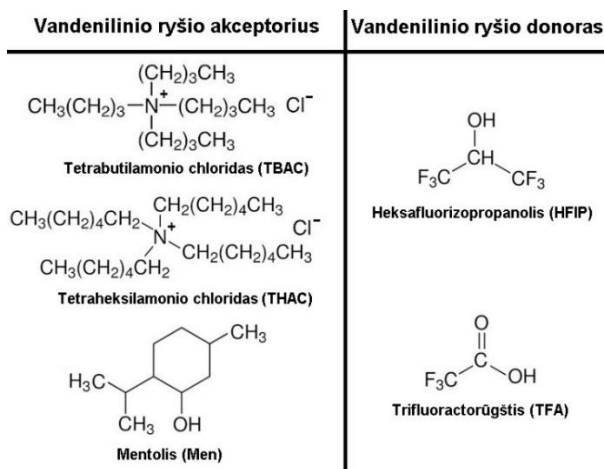
Visi matavimai buvo atliekami po 3 kartus.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Disertaciniame darbe susintetinta ir ištirta serija naujų, nesimaišančių su vandeniu tirpiklių. Šiuos tirpiklius vienija tai, kad visų jų sudėtyje yra perfluorintas junginys. Be to, visi tirpikliai susidaro vykstant nekovalentinei sąveikai tarp dviejų junginių, todėl visus juos galima būtų priskirti supramolekuliniams tirpikliams. Tačiau skirtingų krypčių mokslinėje literatūroje iki šiol nėra vieningos tokių tirpiklių nomenklatūros. Pvz., tirpikliai, sintetinami sumaišius atitinkamu moliniu santykiu grynus vandenilinio ryšio donora ir akceptorius įprastai vadinami eutektiniais tirpikliais. Tuo tarpu tirpikliai, gaunami iš tų pačių ar panašių junginių tiesiogiai vandeniniame tirpale jau vadinami vandeninėmis dvifazėmis sistemomis arba supramolekuliniams tirpikliams. Šiame darbe bus laikomasi analizinės chemijos literatūroje dominuojančios nomenklatūros.

3.1. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai (HET): sintezė, tyrimas ir taikymas

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, vienas iš svarbiausių reikalavimų dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamiems tirpikliams – tirpiklio tankis turi būti didesnis už vandens tankį. Priešingu atveju po ekstrakcijos labai sunku atskirti organinę fazę. Eutektinių tirpiklių tankį didele dalimi nulemia jų sudarančių komponentų tankis. Perfluorinti junginiai pasižymi dideliu tankiu bei yra labai stiprūs vandenilinio ryšio donorai. Šios savybės ir nulėmė jų pasirinkimą vandenilinio ryšio donorais hidrofobinių eutektinių tirpiklių sintezei.

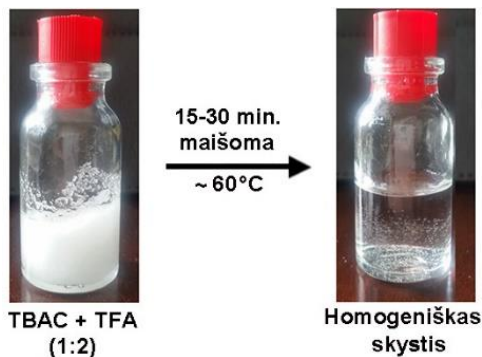


7 pav. Hidrofobinių eutektinių tirpiklių sintezei naudotų junginių struktūros.

Tuo tarpu vandenilinio ryšio akceptoriais pasirinkome tris junginius, kurie dažnai naudojami tiek hidrofilinių, tiek ir hidrofobinių eutektinių tirpiklių sintezei – tetrabutilamonio ir tetraheksilamonio chloridus bei mentolį (7 pav.).

3.1.1. Sintezė ir charakterizavimas

Preliminariems tyrimams eutektiniai tirpikliai buvo sintetinami trimis akceptorius/donoras moliniais santykiais: 1:1, 1:1,5 ir 1:2. Į stiklinį indą su hermetišku dangteliu buvo pridėdami reikiami abiejų junginių kiekiai, įdedamas magnetinės maišyklės strypelis ir mišinys 15–30 min. intensyviai maišomas vandens vonioje ~60 °C temperatūroje. Visais atvejais susidarė homogeniški, nesimaišantys su vandeniu, bespalviai skysčiai (8 pav.), tačiau moliniais santykiais 1:1 ir 1:1,5 gauti tirpikliai buvo lengvesni už vandenį. Kadangi pagrindinis tikslas buvo susintetinti sunkesnius už vandenį tirpiklius, tolimesni tyrimai buvo atliekami tik su šią sąlygą tenkinančiais šešiais tirpikliais: TBAC:HFIP, THAC:HFIP, Men:HFIP, TBAC:TFA, THAC:TFA ir Men:TFA (molinis santykis 1:2).



8 pav. Pradinis TBAC ir TFA mišinys (molinis santykis 1:2) ir susintetintas hidrofobinis eutektinis tirpiklis.

Susintetintų HET tankis ir klampa buvo išmatuoti 25 °C temperatūroje, o gauti rezultatai pateikti 3 lentelėje. Visi tirpikliai yra sunkesni už vandenį ir už daugelį iki šiol moksliniuose darbuose aprašytų hidrofobinių eutektinių tirpiklių [33]. Didelį jų tankį nulemia didelis abiejų perfluorintų vandenilinių ryšių donorų tankis (TFA – 1,535 g/ml; HFIP – 1,596 g/ml). Kaip ir tikėtasi, tirpiklio tankis koreliuoja su vandenilinio ryšio donoro tankiu: didesnės tankio vertės buvo nustatytos tirpikliams su sunkesniu HFIP. Be to, abiejų TBAC pagrindu gautų tirpiklių tankis yra didesnis nei atitinkamų tirpiklių, kurių

sudėtyje yra THAC. Tai atitinka anksčiau publikuoto tyrimo rezultatus, rodančius, kad didėjant ketvirtinės amonio druskos alkilo grandinės ilgiui, eutektinių tirpiklių tankis mažėja [36].

3 lentelė. HET tankio ir klampos vertės (25 °C).

HET	Tankis (g/ml)	Klampa (mPa·s)
Men:TFA	1,136	2,95
TBAC:TFA	1,159	46,4
THAC:TFA	1,094	65,8
Men: HFIP	1,228	4,57
TBAC:HFIP	1,237	51,2
THAC:HFIP	1,168	70,6

Tirpiklio klampa yra dar vienas ekstrakcijai svarbus parametras. Ekstrahuojant mažos klampos tirpikliais greičiau vyksta analičių perėjimas į organinę fazę, dėl ko pagerėja ekstrakcijos efektyvumas. Be to, klampus tirpiklius sunku dozuoti mikrošvirkšu ir tai apsunkina jų panaudojimą mikroekstrakcijai. Daugelio iki šiol mokslinėje literatūroje aprašytų HET klampa kambario temperatūroje yra palyginti didelė (>100 mPa·s) [48]. Kaip matyti iš 3 lentelėje pateiktų rezultatų, ketvirtinių amonio druskų pagrindu susintetintų HET klampa svyruoja nuo 46,4 iki 70,6 mPa·s. Be to, tirpiklių su ilgesnės alkilo grandinės amonio druska ir su tuo pačiu donoru klampa yra didesnė. Daugiau nei 10 kartų mažesne klampa pasižymi abu tirpikliai su mentoliu. Šių tirpiklių klampa jau artima tradicinių hidrofobinių organinių tirpiklių klampai. Taip pat, TFA pagrindu susintetintų HET klampa yra mažesnė nei analogiškų tirpiklių HFIP pagrindu. Tai galima paaiškinti mažesne TFA klampa nei HFIP.

Būtina pažymėti, kad intensyviau su vandeniu purtant TBAC:TFA tirpiklį susidaro baltos nuosėdos, todėl šis tirpiklis netinka vandeninių mėginių ekstrakcijai ir tolimesni tyrimai buvo atliekami su penkiais tirpikliais.

3.1.2. Ekstraktinių savybių įvertinimas

Hidrofobinių eutektinių tirpiklių ekstraktinių savybių įvertinimui buvo pasirinktos trys analičių grupės - ftalatai, parabenai ir flavonoidai. Ekstrakcija buvo atliekama iš 5 ml vandeninio tirpalo su 0,2 ml atitinkamo tirpiklio. Analčių koncentracija – 2,5 mg/l, ekstrakcijos trukmė – 1 min. Siekiant palyginti susintetintų HET ir tradicinių organinių tirpiklių ekstrakcijos

efektyvumus, ekstrakcija buvo atlikta ir su trimis dažnai dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamais chlorintais tirpikliais (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , ir CCl_4). Iš 4 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad ekstrakcijos hidrofobiniais tirpikliais efektyvumas didėja tokia tvarka: Men:TFA < TBAC:HFIP \leq Men:HFIP < THAC:TFA \approx THAC:HFIP. Efektyviausiai ($\geq 90\%$) visos analitės ekstrahuojamos abiem tirpikliais THAC pagrindu. Men:TFA tirpiklis parodė blogiausią ekstrakcijos efektyvumą: šiuo tirpikliu didesniu nei 90 % efektyvumu išekstrahuojami tik trys hidrofobiškiausi junginiai – BuP, DBF ir Bioch.

Kaip ir tikėtasi, visų analizių EE vertės gerai koreliavo su jų $\log P$ vertėmis, surašytomis 4 lentelėje. Tai rodo, kad analizių hidrofobiškumas yra esminis faktorius, nulemiantis jų ekstrakcijos iš vandeninių tirpalų efektyvumą tiriamais tirpikliais.

Svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad ekstrahuojant TFA pagrindu susintetintais tirpikliais, vandeninės fazės pH reikšmingai sumažėja. Ekstrakcijos metu nedidelė dalis tirpiklio neišvengiamai tirpsta vandenyje, kur HET struktūra yra suardoma ir išlaisvinama gana stipri TFA rūgštis ($\text{pK}_a = 0,52$). Nors tirtų junginių ekstrakcijos efektyvumui pH sumažėjimas neturėjo įtakos, tačiau tai gali turėti įtakos rūgštinių ir bazinių junginių ekstrakcijai. Taigi, šie tirpikliai turėtų puikiai tikti junginių, kurių ekstrakcija efektyvi tik iš rūgščių tirpalų (pvz., karboksirūgštys), ekstrakcijai.

Apibendrinant galima konstatuoti, kad keturi hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai (išskyrus Men:TFA) pasižymi žymiai efektyvesne tirtų junginių ekstrakcija nei chlorinti tirpikliai. Šie HET galėtų būti perspektyvia alternatyva tradiciniams organiniams tirpikliams dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje.

4 lentelė. Modelinių analičių (2,5 mg/l) ekstrakcijos skirtingais tirpikliais efektyvumas. Mėginio tūris – 5,0 ml; ekstrahento tūris – 0,2 ml; ekstrakcijos trukmė – 1 min.

Analitė	log <i>P</i>	EE ± σ, (%; n = 3)							
		Men: TFA	THAC: TFA	Men: HFIP	TBAC: HFIP	THAC: HFIP	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	CCl ₄
MeP	1,96	29,4±0,6	97,4±1,8	86,7±2,1	75,3±1,5	95,8±1,2	33,6±0,6	42,4±0,7	5,9±0,2
EtP	2,47	48,7±1,3	98,5±2,2	95,5±1,8	91,5±2,0	98,9±1,9	63,8±0,9	68,8±1,2	12,1±0,2
PrP	3,04	75,2±1,2	98,3±1,9	98,6±1,7	96,7±1,8	98,5±1,7	87,1±1,9	88,7±1,7	37,9±0,8
BuP	3,57	91,3±1,8	98,1±1,6	99,0±2,6	98,5±1,7	99,2±2,4	96,0±2,1	97,1±2,2	74,1±1,9
DMP	1,60	28,6±0,5	91,0±1,8	44,8±0,8	69,0±1,0	93,6±2,2	86,3±2,3	91,2±1,9	68,2±2,0
DEP	2,42	54,8±1,2	98,4±1,5	69,9±0,7	97,4±2,2	98,6±1,8	98,5±1,7	97,5±1,6	88,4±1,8
DBP	4,50	96,0±1,9	≥99	95,7±1,5	≥99	≥99	97,2±2,5	98,7±2,3	98,5±2,2
Quer	1,82	6,7±0,2	96,1±1,8	76,8±0,8	56,3±0,9	98,8±2,0	14,7±0,5	20,6±0,6	7,4±0,3
Form	2,88	57,0±0,8	98,4±1,4	94,4±1,8	92,2±1,6	97,6±1,8	35,5±0,8	44,5±0,8	48,0±1,1
Bioch	3,22	90,5±1,5	97,7±2,0	98,4±2,3	91,9±1,8	98,2±1,8	78,4±1,5	57,8±1,2	89,2±1,8

MeP – metilparabenai; EtP – etilparabenai; PrP – propilparabenai; BuP – butilparabenai; DMP – dimetilftalatas; DEP – dietilftalatas; DBP – dibutilftalatas; Quer – kvercetas; Form – formononetas; Bioch – biochaninas A.

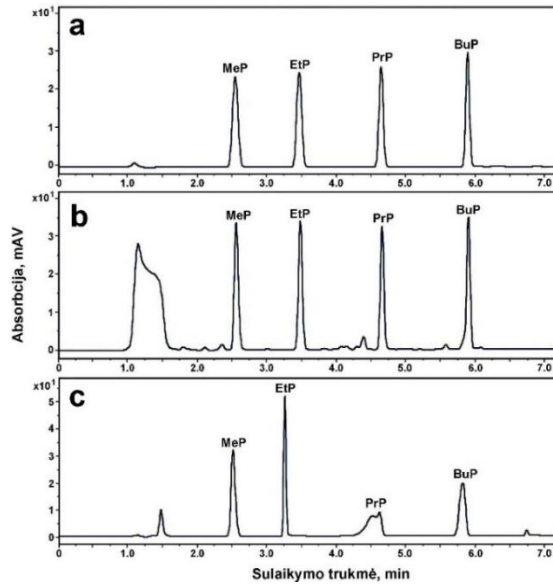
3.1.3. Suderinamumas su efektyviaja skysčių chromatografija (ESCh)

Atvirkščių fazių ESCh yra vienas iš dažniausiai kartu su DSSME naudojamų analizės metodų [109, 137, 138]. Tačiau atliekant analizę tiek šiuo, tiek ir kitais skysčių chromatografijos metodais, labai svarbu parinkti tinkamą mėginio tirpiklį. Naudojant hidrofobiškesnį, t.y. stipresnės eliuocinės gebos už chromatografiniam atskyrimui naudojamą judrią fazę mėginio tirpiklį, analičių smailės dažnai išsiplėčia, deformuojasi, o neretai ir dvigubinasi [139, 140]. Šis efektas pasireiškia tuo stipriau, kuo didesnis judrios fazės ir mėginio tirpiklio hidrofobiškumų skirtumas. Be to, nevienoda mėginio tirpalo ir judrios fazės klampa taip pat gali turėti įtakos smailių efektyvumui. Mėginio klampai gerokai viršijus judrios fazės klampą, analičių smailės taip pat deformuojasi ar netgi dvigubinasi [141]. Atliekant mikroekstrakciją tradiciniais hidrofobiniais tirpikliais (pvz., chlorintais angliavandeniliais) ši problema sprendžiama išgarinant tirpiklį ir pertirpinant ekstrakto likutį judrioje fazėje arba kitame analizei tinkamame tirpiklyje. Deja, šiame darbe naudojami hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai nėra lakūs ir jų negalima pašalinti nugarinant.

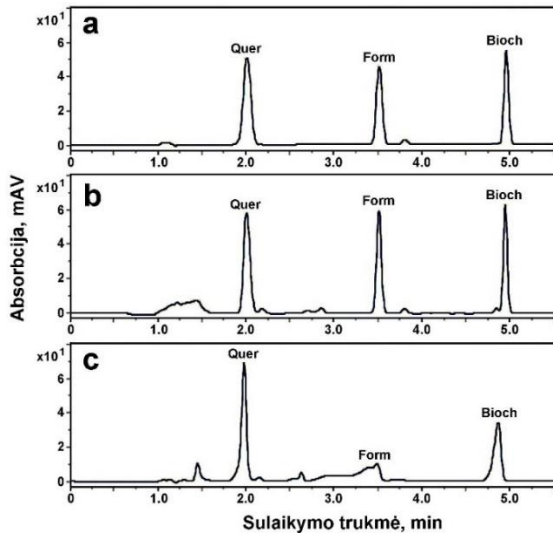
HET suderinamumui su ESCh analize įvertinti buvo ruošiami parabenu, ftalatų ir flavonoidų standartiniai tirpalai atitinkamo eutektinio tirpiklio ir acetonitrilo (1:1 v/v) mišinyje ir analizuojami optimizuotomis ESCh sąlygomis. Eutektiniai tirpikliai buvo 1:1 skiedžiami acetonitrilu jų klampai sumažinti. Palyginimui buvo analizuojami ir identiški standartų tirpalai gryname acetonitrile.

9, 10 ir 11 pav. palygintos parabenu, flavonoidų ir ftalatų, ištirpintų gryname ACN, ACN/Men:TFA (1:1, v/v) ir ACN/Men:HFIP (1:1, v/v) tirpikliuose chromatogramos. Visoms acetonitrile ištirpintoms analitėms registruojamos simetriškos smailės. Men:TFA tirpiklyje analičių smailės ne tik nebuvo deformuojamos, tačiau parabenams ir flavonoidams, priešingai, jos netgi susiaurėjo. Tuo tarpu tirpiklyje HFIP pagrindu, PrP, Form ir DBP smailės stipriai deformavosi. Atskiriant ftalatus Men:TFA tirpiklyje, chromatogramoje (11b pav.) registruojama intensyvi smailė priskirtina TFA, kuri, nors ir nestipriai, taip pat absorbuoja 230 nm bangos ilgio spinduliuotę.

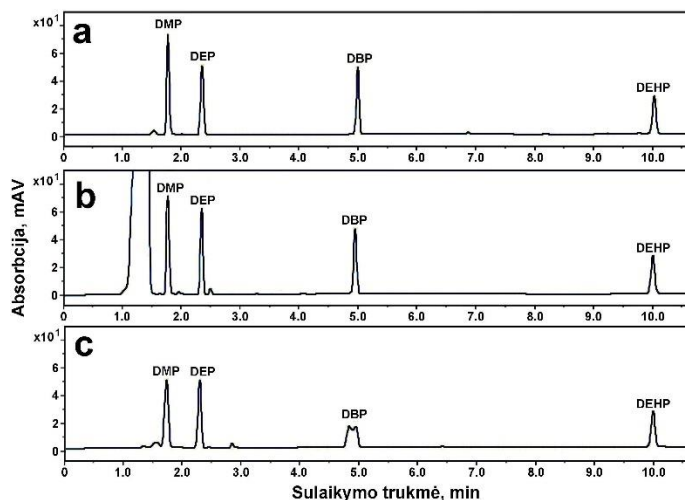
Beveik identiški chromatogramų profiliai buvo gauti visoms trimis analičių grupėms ištirpinus jas eutektiniuose tirpikliuose su ketvirtinio amonio druskomis. THAC:TFA tirpiklis tiriamų junginių smailių nedeformavo. Tuo tarpu abiejuose tirpikliuose su HFIP (TBAC:HFIP ir THAC:HFIP) buvo stipriai deformuojamos PrP, Form ir DBP smailės.



9 pav. Skirtinguose tirpikliuose ištirpintų parabenų mėginio chromatogramos. Mėginio tirpiklis: a – ACN; b – ACN/Men:TFA (1:1, v/v); c – ACN/Men:HFIP (1:1, v/v). Judri fazė – H₂O/ACN, 0,5 ml/min. Gradientas: 0 min – 40% ACN, 6 min – 80% ACN. UV detektavimas – 260 nm.



10 pav. Skirtinguose tirpikliuose ištirpintų flavonoidų mėginio chromatogramos. Mėginio tirpiklis: a – ACN; b – ACN/Men:TFA (1:1, v/v); c – ACN/Men:HFIP (1:1, v/v). Judri fazė – 0,1% HCOOH H₂O/ACN, 0,5 ml/min. Gradientas: 0 min – 45% ACN, 5 min – 80% ACN. UV detektavimas – 260 nm.

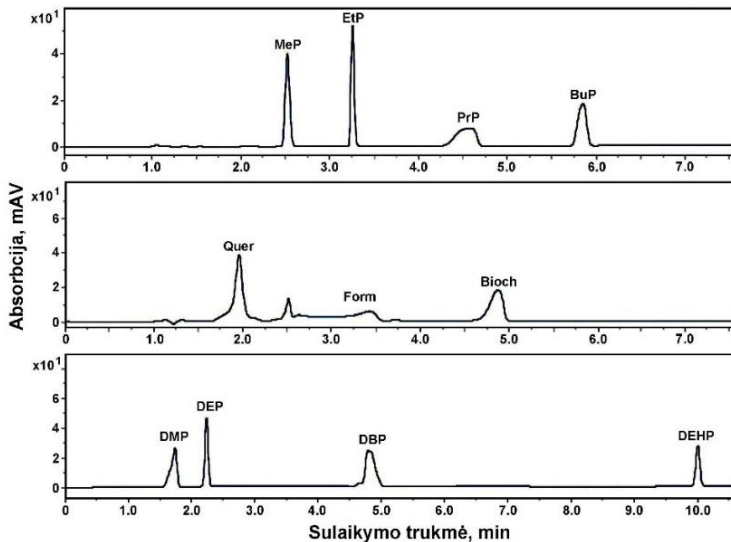


11 pav. Skirtinguose tirpikliuose ištirpintų ftalatų mėginio chromatogramos. Mėginio tirpiklis: a – ACN; b – ACN/Men:TFA (1:1, v/v); c – ACN/Men:HFIP (1:1, v/v). Judri fazė – H₂O/ACN, 0,5 ml/min. Gradientas: 0 min – 70% ACN, 5 min – 100% ACN, 12 min – 100% ACN. UV detektavimas – 230 nm.

Gauti rezultatai rodo, kad kai kurių analizių smailės deformuojamos tik tirpikliuose su HFIP. Tai leidžia daryti prielaidą, kad tokių deformacijų kaltininkas yra ne pats eutektinis tirpiklis, bet jo sudėtyje esantis HFIP. Ši prielaida buvo patvirtinta atlikus papildomą eksperimentą: buvo analizuojami tiriami junginiai, ištirpinti ACN ir HFIP (1:1, v/v) mišinyje. Kaip matyti iš 12 pav., išmatuotų chromatogramų profiliai yra labai panašūs į chromatogramų, gautų analites ištirpintus ACN/Men:HFIP mišinyje profilius. Labiausiai tikėtina, kad eutektinio tirpiklio sąveika su ACN ir/arba jo sąveika su stacionaria faze atskyrimo metu nutraukia jo vandenilinių ryšių tinklą, t.y. tirpiklis yra suardomas. Susidariusio laisvo HFIP eliucinė geba yra žymiai didesnė nei ACN/H₂O judrios fazės ir tai sukelia kai kurių analizių smailių deformacijas.

Darytina išvada, kad bent jau ištirtoms analitėms, HET tirpikliai HFIP pagrindu nėra tinkami ekstrahentai, jeigu ekstraktų analizei bus naudojamas ESCh metodas. HFIP įtaką galima sumažinti ar netgi pašalinti papildomai praskiedžiant mėginį tinkamu tirpikliu ir/arba sumažinant įleidžiamo mėginio tūrį, tačiau tai sumažina metodo jautrį. Kita vertus, kadangi HFIP pagrindu susintetinti eutektiniai tirpikliai pasižymi puikiomis ekstrakcinėmis

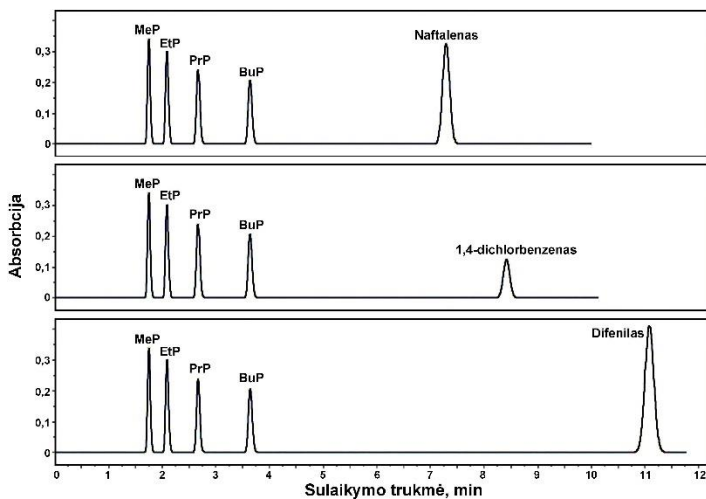
savybėmis, jie gali būti perspektyvi alternatyva kitų junginių ekstrakcijai arba analizuojant ekstraktus kitais analizės metodais.



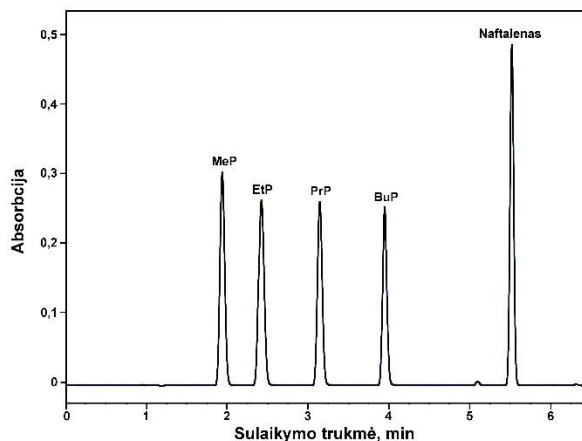
12 pav. ACN/HFIP (1:1, v/v) mišinyje ištirpintų analičių chromatogramos.

3.1.4. Parabenų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija

Remiantis gautais rezultatais, THAC:TFA tirpiklis buvo pasirinktas parabenų ekstrakcijai iš realių vandeninių tirpalų DSSME metodu. Koncentruojant junginius mikroekstrakcijos metodais būtina naudoti vidinį standartą, sumažinantį ar netgi visiškai eliminuojantį paklaidas, kurias sukelia analičių ir ekstrakto praradimai mikroekstrakcijos metu. Vidiniu standartu naudojamas junginys turėtų būti patikimai registruojamas nustatomų junginių detektavimo sąlygomis, o jo sulaikymo trukmė neturėtų smarkiai skirtis nuo tiriamų junginių sulaikymo trukmių. Remdamiesi šiais kriterijais vidiniu standartu išbandėme tris aromatinius junginius – naftaleną, difenilą ir 1,4-dichlorbenzeną. 13 pav. palygintos parabenų ir atitinkamo vidiniu standartu testuojamo junginio mišinio chromatogramos. Visi trys pasirinkti junginiai galėtų būti naudojami vidiniu standartu, tačiau naftaleno sulaikymo trukmė artimiausia parabenų sulaikymo trukmėms, todėl šis junginys ir buvo pasirinktas. Siekiant dar pagreitinti atskyrimą, panaudojome gradientinės eliucijos režimą (14 pav.).



13 pav. Vidinio standarto parabenų nustatymui parinkimas. Judri fazė – 55:45 ACN/H₂O (v/v).

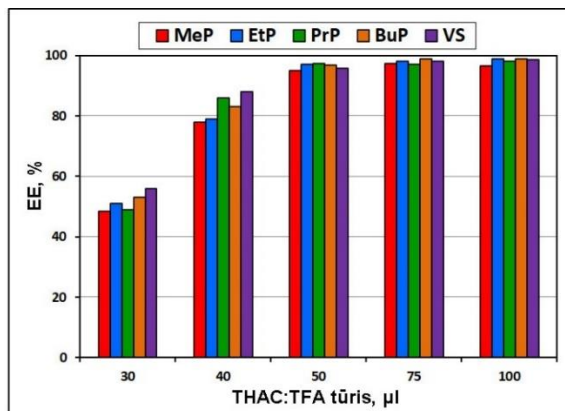


14 pav. Parabenų ir vidinio standarto (naftaleno) tirpalo chromatograma, išmatuota optimizuotose sąlygose. ACN koncentracija judrioje fazėje nuo 0 iki 6 min buvo didinama nuo 50% iki 100%.

Taip pat buvo ištirta THAC:TFA tūrio įtaka parabenų ir naftaleno ekstrakcijos efektyvumui. Gauti rezultatai pateikti 15 pav. Kaip matyti, net ir su 50 μl ekstrahento tūriu, visų penkių junginių ekstrakcijos efektyvumas viršijo 95 %. Remiantis šiais rezultatais, tolimesniems eksperimentams buvo pasirinktas 50 μl THAC:TFA tūris.

Ekstrakcijos trukmės įtaka ekstrakcijos efektyvumui buvo tiriama 5–60 s intervale. Rezultatai parodė, kad šiame intervale nei vienam junginiui reikšmingo ekstrakcijos efektyvumo skirtumo nepastebėta. Galutinės

ekstrakcijos sąlygos buvo tokios: vandeninio mėginio tūris – 5 ml, THAC:TFA tūris – 50 μ l, ekstrakcijos trukmė – 30 s.



15 pav. THAC:TFA tūrio įtaka parabenų ir vidinio standarto (VS) naftaleno ekstrakcijos efektyvumui. Mėginio tūris – 5,0 ml. Parabenų ir naftaleno koncentracija – 2,5 mg/l. Ekstrakcijos trukmė – 60 s.

Analizinių charakteristikų įvertinimui optimizuotose sąlygose buvo ekstrahuojami 7 koncentracijų parabenų standartai su pastovia 20,0 μ g/l naftaleno koncentracija. Po ekstrakcijos, centrifugavimo ir vandeninės fazės pašalinimo, ekstraktas sumaišomas su 50 μ l ACN ir analizuojamas. Gauti rezultatai pateikti 5 lentelėje. Aptikimo riba buvo laikoma koncentracija, kuriai signalo/fono triukšmų santykis lygus 3, o nustatymo riba – koncentracija, duodanti signalo/fono triukšmų santykį 10. Nors parabenų sukonzentravimo laipsniai papildomai nebuvo matuojami, įvertinus gauto ekstrakto tūrį, jo praskiedimą bei tai, kad parabenai išekstrahuojami ne mažesniu nei 95 % efektyvumu, galima konstatuoti, kad jie sukonzentruojami apie 65–70 kartų.

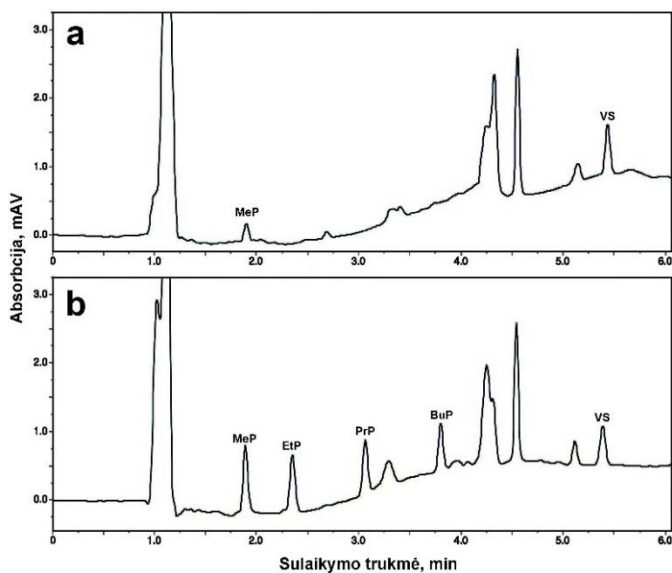
5 lentelė. Parabenų nustatymo DSSME-ESCh metodu analizinės charakteristikos (n = 3).

Analitė	Tiesiškumo intervalas (μ g/l)	R ²	Aptikimo riba (μ g/l)	Nustatymo riba (μ g/l)
MeP	1,0 – 500	0,9991	0,44	1,44
EtP	1,0 – 500	0,9984	0,50	1,65
PrP	1,0 – 500	0,9979	0,46	1,60
BuP	1,0 – 500	0,9970	0,58	1,92

Galiausiai DSSME-ESCh metodas buvo panaudotas parabenų nustatymui trijuose nuotekų mėginiuose, paimtuose skirtingomis dienomis iš pagrindinės Vilniaus miesto nuotekų valyklos. Dviejuose mėginiuose buvo aptiktas MeP, tačiau jo koncentracija buvo mažesnė už metodo nustatymo ribą. Trečiame mėginyje parabenai apskritai nebuvo registruojami. Su visais trimis mėginiais buvo atlikti išgavos testai, kurių rezultatai pateikti 6 lentelėje. Nustatytos parabenų išgavos svyruoja 84,0–104,0 % intervale, o analizės rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai (SSN) neviršija 7,5 %. Nuotekų vandens mėginio be priedo ir su 5 µg/l parabenų priedu chromatogramos pateiktos 16 paveiksle.

6 lentelė. Parabenų nustatymo nuotekų vandenyje rezultatai (n = 3).

Mėginys	Analitė	Pridėta (µg/l)	Išgava (%)	SSN (%)
1	MeP	5,0	102,0	6,8
		20,0	98,5	5,5
	EtP	5,0	86,0	7,2
		20,0	94,5	4,7
	PrP	5,0	90,0	7,5
		20,0	96,5	6,3
	BuP	5,0	94,0	5,9
		20,0	97,5	6,0
2	MeP	5,0	98,0	6,4
		20,0	96,0	4,9
	EtP	5,0	84,0	7,4
		20,0	94,0	6,6
	PrP	5,0	98,0	6,2
		20,0	103,5	5,9
	BuP	5,0	96,0	5,5
		20,0	97,5	5,1
3	MeP	5,0	104,0	7,0
		20,0	98,0	6,1
	EtP	5,0	90,0	7,1
		20,0	93,5	5,8
	PrP	5,0	88,0	6,5
		20,0	95,0	6,2
	BuP	5,0	94,0	6,6
		20,0	95,0	4,4



16 pav. Nuotekų vandens mėginio be (a) ir su 5 µg/l parabėnų priedu (b) chromatogramos. VS – vidinis standartas (naftalenas).

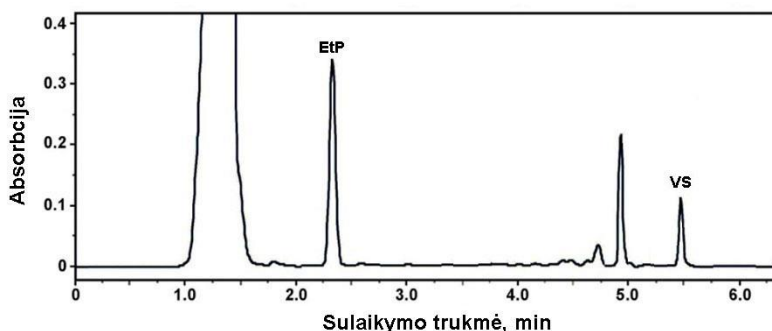
Papildomai išbandėme THAC:TFA tirpiklį parabėnų išskyrimui iš kosmetikos produktų. Kosmetikos produktuose esančios parabėnų koncentracijos įprastai yra pakankamai didelės ir jų nustatymui papildomas sukcentravimas nėra būtinas, o ekstrakcija yra reikalinga tik mėginio matricos įtakai eliminuoti. Todėl mėginių ekstrakcijai buvo naudojamas palyginti nedidelis mėginio/ekstrahento tūrių santykis, o mėginiai prieš ekstrakciją bei galutinis ekstraktas buvo papildomai praskiedžiami. Analizuoti du mėginiai – valomasis pienelis „Dermatoclean“ ir plaukų serumas „Agafji“. Centrifuginiame mėgintuvėlyje buvo atsveriamas 0,100 g atitinkamo mėginio, pridedama 1,00 ml 25 mg/l koncentracijos naftaleno tirpalo ir 3,9 ml vandens. Į gautą suspensiją („Dermatoclean“ mėginys) arba tirpalą („Agafji“ mėginys) buvo pridedama 0,50 ml THA:TFA eutektinio tirpiklio ir, užkimšus mėgintuvėlį, 30 s intensyviai purtoma. Po centrifugavimo ir vandeninės fazės atskyrimo, 0,10 ml ekstrakto buvo sumaišoma su 0,90 ml judrios fazės ir analizuojama. Analizės rezultatai pateikti 7 lentelėje, o 17 pav. – valomojo pienelio „Dermatoclean“ ekstrakto chromatograma. Tirtuose kosmetikos produktuose nustatyti parabėnų kiekiai neviršija leistinų normų.

Kadangi gamintojai nedeklaruoja į produktus pridedamų parabėnų kiekių, gauti rezultatai nesuteikia informacijos apie atliktos analizės teisingumą. Todėl papildomai plaukų serumo mėginiui buvo atliktas išgavos testas su 5,00 mg/l koncentracijos parabėnų standarto priedu. Visiems

parabenams nustatytos viršijančios 94 % išgavos patvirtino gautų rezultatų teisingumą.

7 lentelė. Parabenų nustatymo kosmetikos priemonėse rezultatai (n = 3).

Mėginys	Analitė	Nustatyta konc., % (masės)	SSN, %
Valomasis pienelis „Dermatoclean“	EtP	0,24	3,7
Plaukų serumas „Agafji“	MeP PrP	0,16 0,08	4,3



17 pav. Valomojo pienelio „Dermatoclean“ ekstrakto chromatograma. VS – vidinis standartas (naftalenas).

Apibendrinant galime konstatuoti, kad šiame darbe pasiūlyti hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai perfluorintų junginių pagrindu yra labai paprastai sintetinami, pasižymi maža/vidutine klampa, sunkesni už vandenį, efektyviai ekstrahuoja organinius junginius ir yra puiki alternatyva tradiciniams dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamiems tirpikliams.

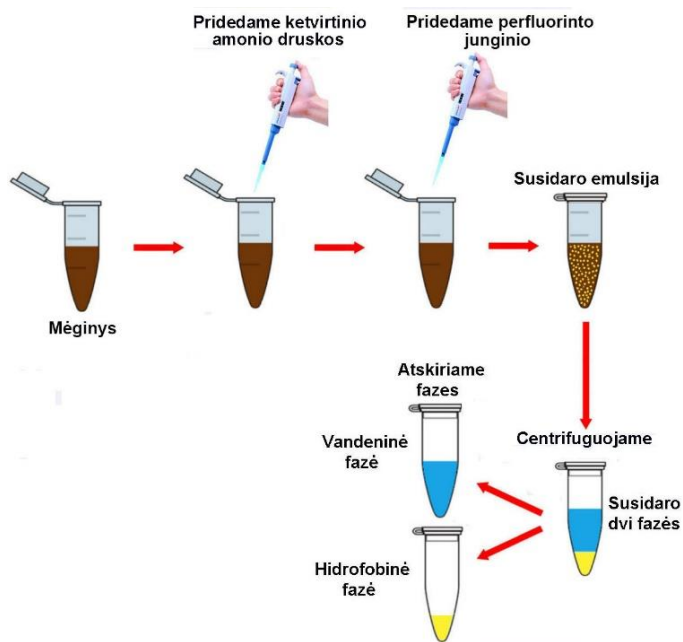
3.2. SUPRA tirpiklių sintezė, tyrimas ir taikymas

Pagrindiniai SUPRA tirpiklių privalumai – labai paprasta sintezė, galimybė sintetinti juos tiesiogiai mėginio tirpale, bei plačios galimybės konstruoti įvairiausių savybių tirpiklius. Būtent galimybė sintetinti labai mažus SUPRA tirpiklių kiekius tiesiogiai mėginio tirpale atveria puikias perspektyvas jų taikymui dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metuose. Deja, dauguma tokių tirpiklių yra lengvesni už vandenį ir tai apsunkina jų panaudojimą mikroekstrakcijai. 2015 metais JAV mokslininkai

nustatė [142, 143], kad perfluorinti junginiai pasižymi puikiais amfifilinių junginių (paviršiaus aktyvių medžiagų, fosfolipidų, polielektrolitų) koacervaciją inicijuojančiomis savybėmis, t.y. sukelia paminėtų medžiagų išsiskyrimą iš vandeninių tirpalų naujos skystos fazės pavidalu. Tai paskatino detaliau patyrinėti iš ketvirtinio amonio druskų ir perfluorintų junginių susidarancias SUPRA fazes bei jų taikymo mikroekstrakcijai galimybes. Tyrimams buvo pasirinktos trys ketvirtinio amonio druskos ir keturi perfluorinti junginiai (8 lentelė). 18 pav. pavaizduota hidrofobinės SUPRA fazės susidarymo tirpale schema.

8 lentelė. SUPRA tirpiklių sintezei naudoti junginiai.

Ketvirtinio amonio druska	Perfluorintas junginys
Tetrabutilamonio chloridas	Heksafluorizopropanolis
Tetraheksilamonio chloridas	Trifluoracto rūgštis
Tetradeciltrimetilamonio bromidas (TDTMAB)	Pentafluorpropano rūgštis
	Heptafluorbutano rūgštis

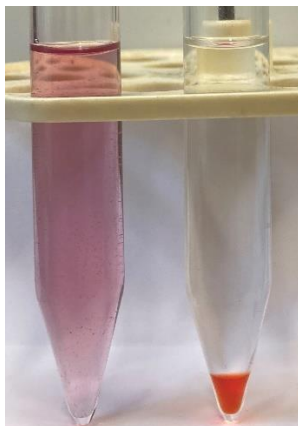


18 pav. SUPRA fazės susidarymo vandeniniame tirpale schema.

3.2.1. SUPRA fazių susidarymo tyrimas

Preliminarių tyrimų metu į 5 ml vandeninį atitinkamos koncentracijos ketvirtinio amonio druskos tirpalą buvo pridedami skirtingi perfluorinto junginio kiekiai, mišinys supurtomas ir centrifuguojamas. Nustatyta, kad THAC su visais perfluorintais junginiais sudaro ne skystą fazę, tačiau iškrenta baltos spalvos nuosėdomis. Todėl tolimesni tyrimai buvo atliekami tik su TBAC ir TDTMAB druskomis. Sumaišant vandenyje įvairiais kiekiais TDTMAB ir HFIP junginius SUPRA fazė apskritai nesusidarė. Papildomais tyrimais buvo nustatyta, kad TDTMAB:HFIP fazės susidarymui būtina į vandeninę fazę pridėti druskos, t.y. padidinti tirpalo joninę jėgą. Todėl visi tolimesni tyrimai su šia fazė buvo atliekami papildomai pridedant į vandeninį mėginį 0,50 mol/l NaCl. Kitų septynių kompozicijų (TBAC:HFIP, TBAC:TFA, TBAC:PFPA, TBAC:HFBA, TDTMAB:TFA, TDTMAB:PFPA ir TDTMAB:HFBA) vandeniniuose tirpaluose susidarė bespalvės, sunkesnės už vandenį skystos fazės be papildomo joninės jėgos didinimo.

Toliau buvo tiriama abiejų komponentų koncentracijos įtaka susidarančios SUPRA fazės tūriui. Taip siekta nustatyti minimalias pradinių junginių koncentracijas, būtinas mikroekstrakcijai reikalingo tirpiklio tūriui (~50–200 μ l) susidaryti. Į vandeninį tirpalą buvo pridedamas nedidelis dažiklio Alizarino (~0,02 mmol/l) kiekis. Alizarinas pereina į hidrofobiškesnę SUPRA fazę nudažydamas ją raudonai (19 pav.). Tai palengvino SUPRA fazės atskyrimo ir tūrio matavimo mikrošvirkštu procedūrą.



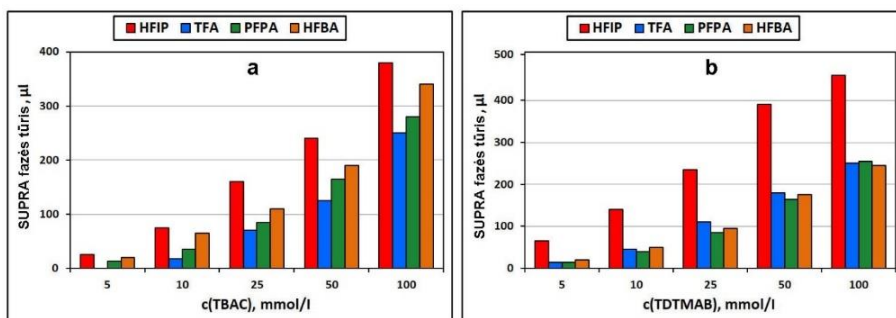
19 pav. TBAC:HFIP supramolekulinės fazės susidarymas.

20 pav. pavaizduota TBAC (a) TDTMAB (b) koncentracijų įtaka susidarančios SUPRA fazės tūriui. Kaip ir buvo tikėtasi, visoms

kompozicijoms susidarancios fazės tūris didėja, didinant ketvirtinio amonio druskos koncentraciją vandeniniame tirpale. Panašūs rezultatai buvo gauti Khaledi ir bendraautorių darbuose [142-144], kuriuose buvo tiriamas SUPRA fazių susidarymas polielektrolitų/katijoninių-anijoninių paviršiaus aktyvių junginių mišinių vandeniniuose tirpaluose inicijuojant heksafluorizopropanoliu. Autorių teigimu, SUPRA fazės tūrio didėjimas rodo, kad susidaranti fazė turi ne atskirų micelių, tačiau ištisinę dvisluoksnę (*bilayered continuous*) struktūrą. Didėjant pradinių medžiagų koncentracijai, tokia struktūra taip pat plečiasi. Tuo tarpu pirmu atveju, didinant koncentraciją didėtų micelių tankis.

Abiejų ketvirtinio amonio druskų sistemose HFIP inicijuoja ženkliai didesnius SUPRA fazės tūrius nei tokie patys perfluorintų rūgščių kiekiai. Labiausiai tikėtina to priežastis – nevienodas perfluorintų junginių krūvis. Vandeniniame tirpale HFIP yra neutralus, o perfluorintos rūgštys (pK_a vertės 0,18–0,40) dominuoja anijono formoje. Stipresnės jonas-jonas sąveikos dėka, ketvirtinio amonio katijonai su rūgščių anijonais sudaro kompaktiškesnę agregatą.

Įdomu pažymėti, kad su TBAC druska ilgesnės fluoralkilo grandinės perfluorintos rūgštys generuoja didesnius SUPRA fazės tūrius, o TDTMAB druskai tokia tendencija nenustatyta. Deja, tokio skirtumo priežastis nežinoma.



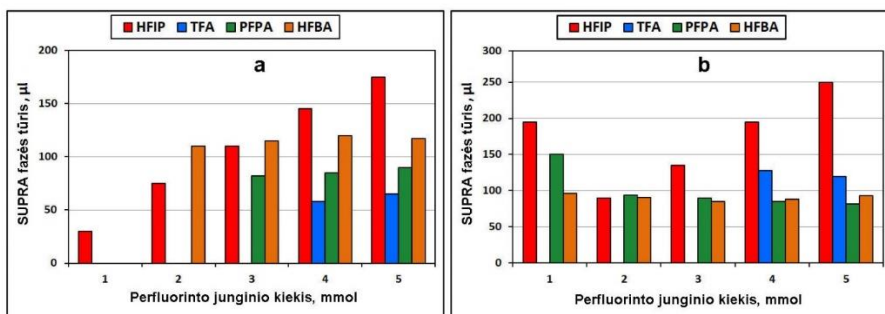
20 pav. TBAC (a) ir TDTMAB (b) koncentracijos įtaka susidarancios SUPRA fazės tūriui. Vandeninio mėginio tūris – 5 ml. Pridedamas perfluorinto junginio kiekis – 5 mmol.

21a pav. pateikta perfluorintų junginių kiekio įtaka susidarancios TBAC pagrindu SUPRA fazės tūriui. TBAC/HFIP fazės tūris didėja, didėjant pridedamo HFIP kiekiui. Tuo tarpu perfluorintų rūgščių kiekis susidarancios fazės tūriui įtakos praktiškai neturėjo. Be to, ilgėjant rūgšties fluoralkilo

grandinei, jos gebėjimas inicijuoti SUPRA fazės susidarymą stiprėja (t.y. fazei susidaryti reikia mažiau rūgšties) bei generuojamas didesnis fazės tūris.

TDTMAB atveju (21b pav.) perfluorintų junginių kiekio įtaka dar sudėtingesnė. Didinant atitinkamo perfluorinto junginio kiekį nuo 1 iki 5 mmol, TDTMAB/HFIP ir TDTMAB/PFPA fazių tūris iš pradžių sumažėja, o toliau didinat pradeda didėti (TDTMAB/HFIP fazė) arba reikšmingai nebekinta (TDTMAB/PFPA fazė). TDTMAB/HFBA ir TDTMAB/TFA fazių tūris praktiškai nepriklauso nuo perfluorinto junginio kiekio. Kaip ir TBAC atveju, silpniausiu SUPRA fazės TDTMAB pagrindu iniciatoriumi yra TFA, tačiau priešingai nei su TBAC, TDTMAB druskai koreliacija tarp rūgšties fluoralkilo grandinės ilgio ir susidarančios fazės tūrio nenustatyta.

Nevienoda TBAC ir TDTMEB druskų elgsena gali būti susijusi su skirtinga pradine šių druskų būseną vandeniniame tirpale. Visame tirtų koncentracijų intervale TDTMAB vandenyje egzistuoja micelių formoje (kritinė micelių susidarymo koncentracija – 3,6–3,7 mmol/l [145]), tuo tarpu TBAC tokiose sąlygose micelių nesudaro.



21 pav. Perfluorintų junginių kiekio įtaka susidarančios SUPRA fazės su TBAC (a) ir TDTMAB (b) druskomis tūriui. Vandeninio mėginio tūris – 5 ml. Ketvirtinės amonio druskos koncentracija – 25 mmol/l.

3.2.2. SUPRA tirpiklių stochiometrijos nustatymas

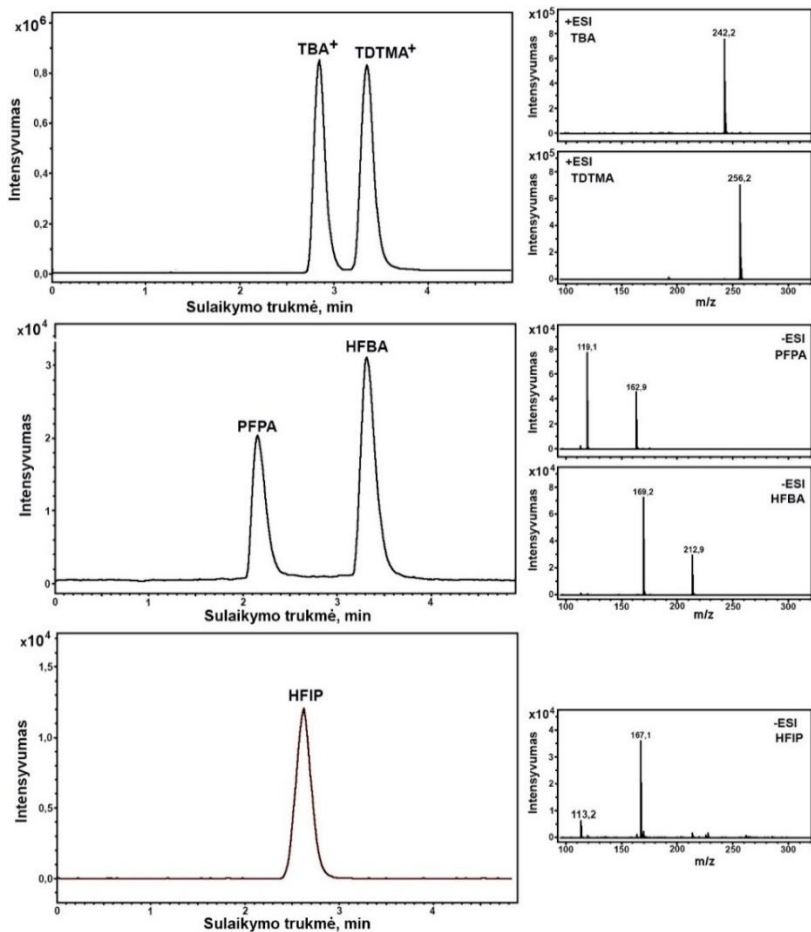
Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai perfluorintų junginių pagrindu buvo sintetinami tikslu moliniu santykiu sumaišant abu grynus junginius, todėl jų stochiometrija yra žinoma. Tuo tarpu SUPRA tirpiklių susidarymas vyksta tiesiogiai vandeniniame tirpale nežinomu moliniu santykiu, todėl buvo įdomu pabandyti įvertinti šių tirpiklių stochiometriją. Tirpiklių stochiometrijos nustatymui būtina patikimai išmatuoti abiejų tirpiklio komponentų koncentracijas. Šiam tyrimui buvo naudojama efektyvioji skysčių chromatografija. Kadangi tikslinių junginių prigimtis labai skirtinga (TBA^+ ir

TDTMA⁺ – katijonai, TFA, PFPA ir HFBA – anijonai, HFIP – neutralus), kiekvienai junginių grupei buvo parinktas tinkamiausias skysčių chromatografijos variantas ir optimizuotos atskyrimo bei detektavimo sąlygos (9 lentelė). TBA⁺, TDTMA⁺ ir HFIP visiškai neabsorbuoja UV/Vis spinduliuotės, o perfluorintos rūgštys pasižymi tik silpna absorbcija 200–210 nm bangos ilgių intervale. Todėl visiems junginiams išskyrus TFA, buvo naudojamas detektavimas masių spektrometru. Kadangi TFA masių spektrometru neregistruojama, jos nustatymui pasirinkome UV detektavimą. Tiriamų junginių chromatogramos ir masių spektrai išmatuoti optimizuotose sąlygose yra pateikti 22 ir 23 pav.

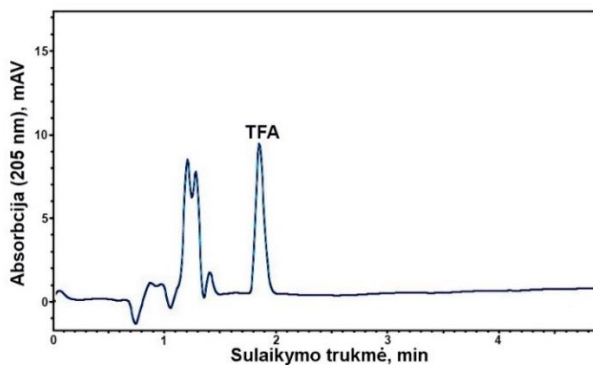
9 lentelė. Optimizuotos SUPRA komponentų chromatografinio nustatymo sąlygos.

Analitė	ESCh metodas	Kolonėlė (ilgis)	Judri fazė
TBA ⁺ TDTMA ⁺	Hidrofilinės sąveikos chromatografija	BEH HILIC (10 cm)	5 mmol/l CH ₃ COONH ₄ 10:90 v/v H ₂ O/ACN
HFIP	Atvirkščių fazių chromatografija	BEH C18 (5 cm)	70:30 v/v H ₂ O/ACN
PFPA HFBA	Atvirkščių fazių chromatografija	BEH C18 (10 cm)	0,1 % HCOOH 80:20 v/v H ₂ O/ACN
TFA	Jonų porų chromatografija	Porachell 120 EC-C18 (15 cm)	1 mmol/l TBAC, 10 mmol/l fosfat. buf. (pH 7) 70:30 v/v H ₂ O/ACN

Nustatomų junginių koncentracijos mėginiuose didelės, todėl kalibracinių kreivių tiesiškumo intervalai bei analičių aptikimo ir nustatymo ribos metodams nebuvo matuojami. Kiekvieno junginio analizei buvo pasirinktas tik palyginti siauras koncentracijų intervalas, kuriame galioja tiesinė priklausomybė (10 lentelė). TBA⁺ ir TDTMA⁺ nustatymo MS detektoriumi jautris labai didelis, o tiesiškumas galioja tik gana siaurame koncentracijų intervale. Todėl šių junginių nustatymui teko naudoti labai didelius (iki 10 000 kartų) SUPRA fazės praskiedimus.



22 pav. TBA⁺ ir TDTMA⁺, PFPA ir HFBA bei HFIP tirpalų chromatogramos ir masių spektrai.



23 pav. TFA tirpalo chromatograma. UV detektavimas – 205 nm.

10 lentelė. Stechiometrijos nustatymui pasirinkti analičių koncentracijų intervalai ir koreliacijos koeficientai.

Analitė	Koncentracijų intervalas	R²
TBA ⁺	1,0 – 5,0 μmol/l	0,9972
TDTMA ⁺	1,0 – 5,0 μmol/l	0,9954
HFIP	0,1 – 1,0 mmol/l	0,9987
PFPA	0,01 – 0,10 mmol/l	0,9977
HFBA	0,01 – 0,10 mmol/l	0,9951
TFA	0,1 – 1,0 mmol/l	0,9994

SUPRA tirpikliai analizei buvo ruošiami į 5 ml 25 mmol/l koncentracijos vandeninį ketvirtinės amonio druskos tirpalą pridėdant 5 mmol atitinkamo perfluorinto junginio. Nucentrifugavus, nedidelė porcija susidariusios SUPRA fazės buvo tirpinama acetonitrile, atitinkamai praskiedžiama judria faze ir analizuojama. 11 lentelėje surašyti tirpiklių stochiometrijos nustatymo rezultatai. Iš pateiktų rezultatų seka dvi išvados: a) TBAC ir TDTMAB su tais pačiais perfluorintais junginiais (išskyrus fazes su PFPA) sudaro nevienodos stochiometrijos junginius; b) HFIP sąveikauja su abiem ketvirtinio amonio katijonais žymiai didesniu moliniu santykiu nei perfluorintos rūgštys.

11 lentelė. SUPRA tirpiklių stochiometrijos nustatymo rezultatai (n=3–6).

SUPRA tirpiklis	Išmatuotas molinis santykis	Suapvalintas molinis santykis
TBAC:HFIP	1:8,07	1:8
TBAC:TFA	1:2,08	1:2
TBAC:PFPA	1:2,98	1:3
TBAC:HFBA	1:4,14	1:4
TDTMAB:HFIP	1:12,18	1:12
TDTMAB:TFA	1:2,74	1:3
TDTMAB:PFPA	1:2,91	1:3
TDTMAB:HFBA	1:2,87	1:3

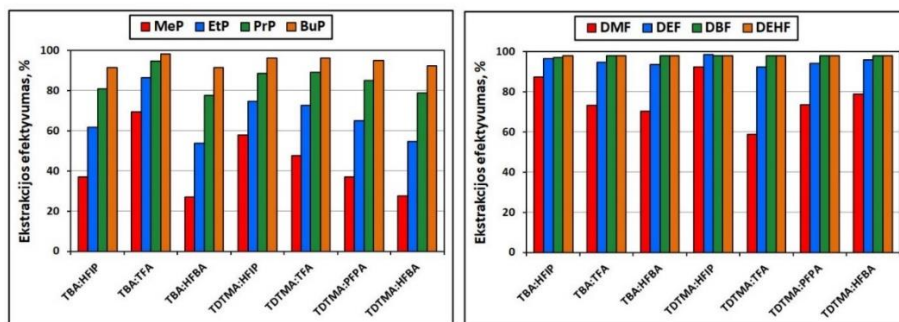
Apibendrinant būtina pažymėti, kad stochiometrijos nustatymo rezultatus reikėtų vertinti atsargiai. SUPRA tirpikliai susidaro vandeniniame tirpale esant dideliame (molinis santykis ~1:40) perfluorinto junginio pertekliui. Visiškai realu, kad susidariusioje SUPRA fazėje papildomai ištirpsta nestochiometrinis perfluorinto junginio kiekis. Paminėtas procesas gali

iškreipti tyrimo rezultatus, o jo įtakos įvertinimas ar eliminavimas praktiškai neįmanomas. Dėl šios priežasties detalesnių stochiometrijos tyrimų (pvz. keičiant komponentų kiekių santykį) buvo atsisakyta.

3.2.3. SUPRA tirpiklių ekstraktinės savybės

Norint palyginti skirtingų tirpiklių ekstraktines savybes, būtina šiais tirpikliais atlikti ekstrakciją identiškomis sąlygomis, t.y. esant pastoviam mėginio tūriui, modelinių analičių koncentracijai, ekstrahento tūriui bei ekstrakcijos trukmei. Nagrinėjamu atveju ekstrahento susidarymas vyksta tiesiogiai mėginio tirpale, todėl parinkti tokias tiriamų SUPRA tirpiklių komponentų koncentracijas, kurios visiems tirpikliams duotų visiškai vienodą SUPRA fazės tūrį yra labai sudėtinga. Remiantis 3.2.1 skyriuje pateiktais rezultatais, kiekvienam SUPRA tirpikliui buvo parinktos komponentų koncentracijos, kurios duoda panašius ($\sim 150 \pm 10$ μl) hidrofobinės fazės tūrius. Modelinėmis analitėmis buvo pasirinkti parabenai ir ftalatai. Vandeninio mėginio tūris – 7,5 ml, o parabenų ir ftalatų koncentracijos mėginyje – 1,0 mg/l.

Iš 24 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad visais SUPRA tirpikliais tiek parabenų, tiek ir ftalatų ekstrakcijos efektyvumas didėja, ilgėjant ekstrahuojamo junginio alkilo grandinei, t.y. stiprėjant jo hidrofobiškumui. Ketvirtinio amonio druskos prigimtis ekstrakcijos efektyvumui nereikšminga: daugeliu atveju TDTMAB tirpiklių ekstraktinės savybės yra panašios į TBAC tirpiklių su tuo pačiu perfluorintu junginiu ekstraktines savybes. Perfluorinto junginio prigimties įtaka tirpiklių ekstraktinėms savybėms priklauso ir nuo ekstrahuojamų junginių prigimties, todėl sunkiai apibendrinama. Pvz., ekstrahuojant MeP tirpikliais su TDTMAB, jo ekstrakcijos efektyvumas didėja tokia tvarka: TDTMAB:HFBA < TDTMAB:PFPA < TDTMAB:TFA < TDTMAB:HFIP. Tuo tarpu tais pačiais tirpikliais ekstrahuojant poliškiausią ftalatą (DMP), ekstrakcijos efektyvumas didėja taip: TDTMAB:TFA < TDTMAB:PFPA \leq TDTMAB:HFBA < TDTMAB:HFIP.



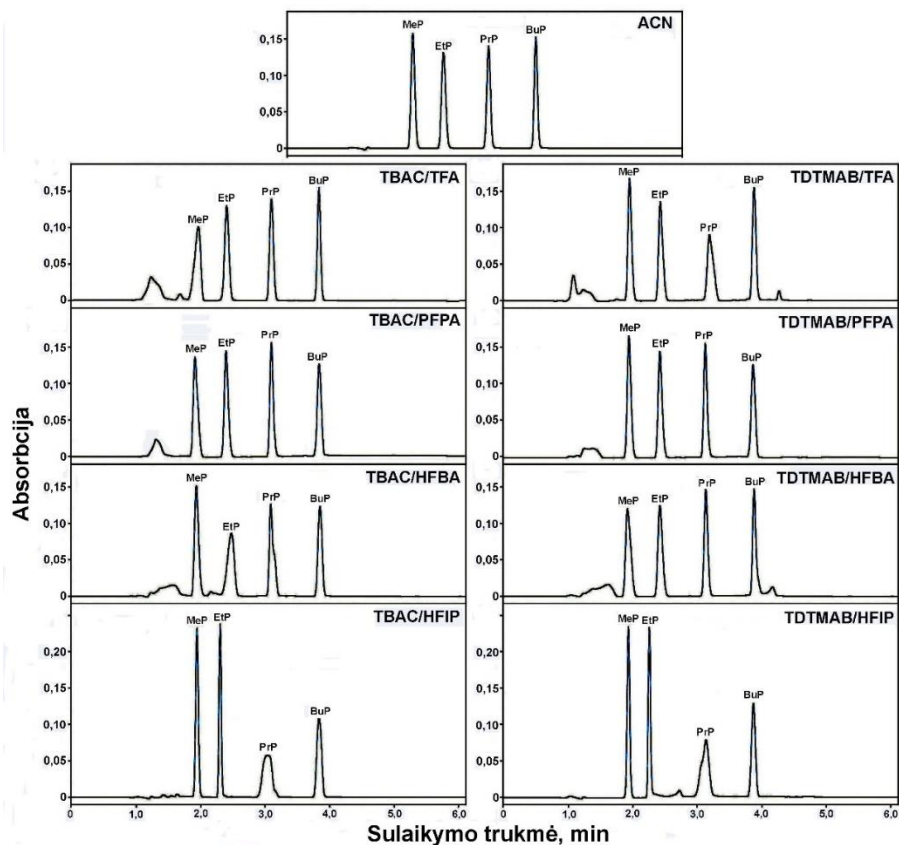
24 pav. Parabenų ir ftalatų ekstrakcijos SUPRA tirpikliais efektyvumo palyginimas.

Idomu pažymėti, kad SUPRA tirpiklių ekstrakcinis efektyvumas parabenams ir ftalatams reikšmingai skiriasi: ftalatai tais pačiais tirpikliais ekstrahuojami efektyviau. Pvz., EtP ($\log P = 2,47$) ekstrakcijos efektyvumas skirtingais tirpikliais svyruoja intervale 53,8–86,4%, tuo tarpu beveik identišku hidrofobiškumu pasižyminčio DEP ($\log P = 2,42$) ekstrakcijos efektyvumas visais tirpikliais viršija 90 %. Ekstrahuojant šiuos junginius iš tų pačių komponentų sudarytu hidrofobiniu eutektiniu tirpikliu (TBAC:HFIP), parabenų ir ftalatų ekstrakcijos efektyvumas reikšmingai nesiskyrė (žiūr. 4 lentelę). Tokį ekstrakcinių savybių skirtumą gali nulemti tiek nevienoda HET ir SUPRA tirpiklių kiekybinė sudėtis, tiek ir skirtinga jų struktūra. Hidrofobinis eutektinis tirpiklis sintetinamas sumaišius žinomus dviejų junginių kiekius susidarant homogeniškam skysčiui, todėl kokybinė ir kiekybinė tokio tirpiklio sudėtis yra tiksliai žinoma. Tuo tarpu SUPRA tirpiklis susidaro vandeniniame atitinkamų junginių tirpale vykstant agregacijos ir koacervacijos procesams. Kaip jau buvo minėta ankstesniame skyrelyje, net ir atlikta SUPRA tirpiklio sudėties analizė negali patikimai atspindėti gryno tirpiklio sudėties.

3.2.4. SUPRA tirpiklių suderinamumas su efektyviaja skysčių chromatografija

Šiam tyrimui buvo ruošiami parabenų ir ftalatų standartiniai tirpalai atitinkamo SUPRA tirpiklio ir acetonitrilo (1:1 v/v) mišinyje ir analizuojami optimizuotose ESCh sąlygose. Palyginimui buvo analizuojami ir identiški standartų tirpalai acetonitrile. Išmatuotos chromatogramos pavaizduotos 25 ir 26 pav. Iš 25 pav. pateiktų chromatogramų matyti, kad abu tirpikliai PFPA pagrindu praktiškai nedaro įtakos parabenų smailių efektyvumui. TDTMA:HFBA tirpiklio įtaka parabenų smailių formai taip pat nėra labai

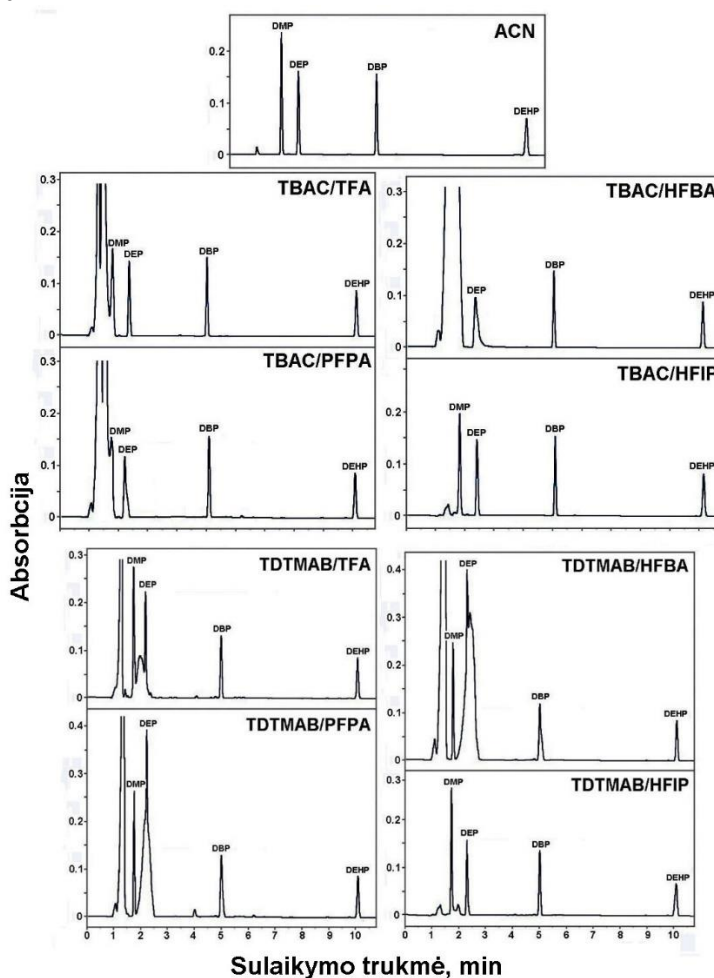
reikšminga. Tuo tarpu abu tirpikliai HFIP pagrindu pasižymėjo dvejopu efektu: stipriai deformavo PrP smailę, tačiau reikšmingai „suspaudė” MeP ir EtP smailes. Panašūs parabenų smailių profiliai buvo registruojami ir vertinant hidrofobinių eutektinių tirpiklių su tuo pačiu perfluorintu junginiu įtaką.



25 pav. Parabenų standarto ištirpinto ACN ir atitinkamo SUPRA tirpiklio/ACN (1:1 v/v) mišinyje chromatogramos. UV detektavimas – 260 nm.

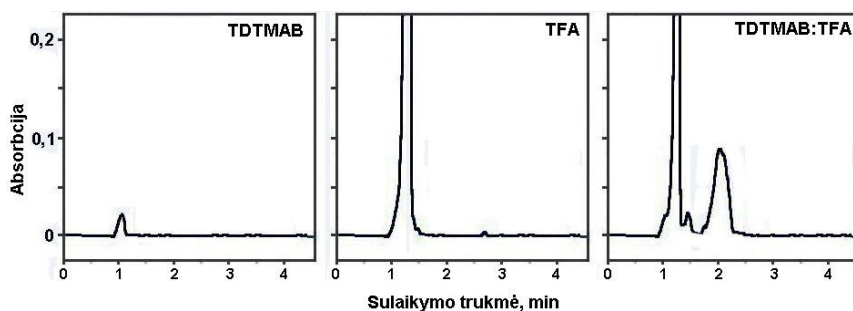
SUPRA tirpiklių įtaka ftalatų chromatografiniam atskyrimui pasireiškė visiškai kitaip. Iš 26 pav. palygintų chromatogramų matyti, kad SUPRA tirpikliai ftalatų smailių faktiškai nedeformuoja. Tačiau ištirpintų tirpikliuose su perfluorintomis rūgštimis ftalatų mėginių chromatogramose registruojamos papildomos smailės, dalinai arba visiškai persiklojančios su silpniau sulaikomų DMP ir/arba DEP smailėmis. Kaip jau buvo minėta 3.1.3 skyriuje, ftalatų detektavimui naudojama 230 nm bangos ilgio spinduliuotė, kuri, nors ir nestipriai, absorbuoja ir perfluorintos rūgštys. Chromatografinio atskyrimo

metu SUPRA tirpikliai yra suardomi į atskiras komponentes, o perfluorintų rūgščių koncentracija mėginio tirpale yra labai didelė. Tokiuose mėginiuose greičiausiai yra registruojamos laisvų rūgščių ir/arba jų aduktų su ketvirtinio amonio katijonu smailės. Tai buvo patvirtinta išmatavus ir palyginus gryną TDTMAB ir TFA tirpalų bei TDTMAB:TFA SUPRA tirpiklio tirpalo chromatogramas (27 pav.). TFA tirpalo chromatogramoje registruojama (sulaikymo trukmė 1,3 min) tik viena laisvos rūgšties smailė. Tuo tarpu TDTMAB:TFA SUPRA tirpiklio tirpale registruojamos jau dvi smailės, kurių profilis beveik identiškas ftalatų tirpale TDTMAB:TFA tirpiklyje registruojamų pašalinių (ne ftalatų) smailių (26 pav.) profiliui. Taigi, akivaizdu, kad pirmoji yra laisvos TFA smailė, o antra – TDTMA katijono ir TFA anijono adukto.



26 pav. Ftalatų standarto ištirpinto ACN ir atitinkamo SUPRA tirpiklio/ACN (1:1 v/v) mišinysje chromatogramas. UV detektavimas – 230 nm.

Įdomu pažymėti, kad priešingai nei analogiški HET tirpikliai, abu SUPRA tirpikliai HFIP pagrindu ftalatų smailių nedeformuoja. Ankstesniame skyriuje buvo parodyta, kad smailes deformuoja būtent HET tirpiklio sudėtyje esantis HFIP. Galima tokio skirtumo priežastis – SUPRA tirpiklis susidaro vandeninėje fazėje, todėl neišvengiamai jame yra ir kažkoks kiekis ištirpusio vandens, kuris susilpnina HFIP įtaką.



27 pav. TDTMAB, TFA ir TDTMAB:TFA tirpalų chromatogramos. UV detektavimas – 230 nm.

Būtina pažymėti, kad ftalatų atveju, perfluorintų rūgščių įtaka detektavimui pilnai eliminuojama padidinus detektavimo bangos ilgį (pvz. detektuojant ties 260 nm). Tačiau tai sumažina ftalatų detektavimo jautrį, todėl nėra tinkama praktinei realių mėginių analizei.

3.2.5. Ftalatų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija ir nustatymas

Ftalatų mikroekstrakcijai iš vandens mėginių buvo pasirinktas didžiausiu ekstrakcijos efektyvumu pasižymintis TDTMAB:HFIP tirpiklis. Vidiniu standartu pasirinkome naftaleną (NAPH). Siekiant gauti kuo didesnius ftalatų sukcentravimo laipsnius ištyrėme tirpiklio tūrio įtaką ftalatų ir naftaleno ekstrakcijos efektyvumui (12 lentelė). Tolimesniam darbui buvo pasirinktas 50 μ l SUPRA tirpiklio tūris, kuriuo visi junginiai išekstrahuojami didesniu nei 95 % efektyvumu.

Įvertinus mikroekstrakcijos trukmės (1–30 s) įtaką ekstrakcijos efektyvumui buvo nustatyta, kad ekstrakcija vyksta labai greitai – net ir supurčius mišinį vieną kartą, visų junginių ekstrakcijos efektyvumas viršijo 90 %. Realių mėginių mikroekstrakcijai buvo pasirinktos tokios sąlygos: į 7,5 ml mėginio pridedama 0,10 ml 1,5 mg/l naftaleno, 0,75 ml 5,0 mol/l NaCl, 0,20 ml 0,20 mol/l TDTMAB ir 0,20 ml HFIP bei purtome mišinį 5 s. Tokiomis sąlygomis tirpale susidaro ~50 μ l SUPRA tirpiklio.

12 lentelė. TDTMAB/HFIP tirpiklio tūrio įtaka ftalatų ir naftaleno (1,0 mg/l) mikroekstrakcijos efektyvumui. Vandeninio mėginio tūris – 7,5 ml; ekstrakcijos trukmė – 30 s.

Tirpiklio tūris (μl)	EE ± σ, (%; n = 3)				
	DMP	DEP	DBP	DEHP	NAPH
200	96,0±1,9	>98	>98	>98	>98
150	96,9±2,2	97,6±1,9	>98	>98	97,8±2,2
90	95,8±1,5	96,0±2,1	>98	>98	97,2±2,4
50	95,5±2,0	95,6±1,9	>98	>98	96,7±1,8
25	76,6±1,6	81,2±1,5	96,6±1,9	97,0±2,3	90,5±1,9

Analizinių charakteristikų įvertinimui optimizuotose sąlygose buvo ekstrahuojami ir analizuojami 7 koncentracijų ftalatų standartai su pastovia 20,0 μg/l naftaleno koncentracija. Gauti rezultatai pateikti 13 lentelėje.

13 lentelė. Ftalatų mikroekstrakcijos ir nustatymo analizinės charakteristikos (n = 3).

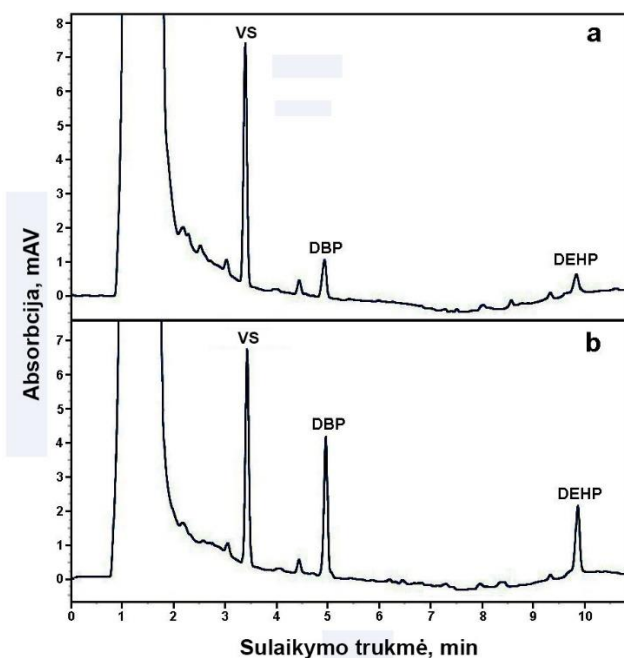
Analitė	Tiesiškumo intervalas, μg/l	R ²	Aptikimo riba, μg/l	Nustatymo riba, μg/l
DMP	1,0 – 50,0	0,9974	0,3	1,0
DEP	1,0 – 50,0	0,9965	0,3	1,0
DBP	1,0 – 50,0	0,9982	0,4	1,5
DEHP	2,0 – 50,0	0,9971	0,6	2,0

Metodas buvo išbandytas ftalatų koncentravimui ir nustatymui trijuose nuotekų vandens mėginiuose, paimtuose iš Vilniaus nuotekų valyklos. Du mėginiai buvo paimti skirtingomis dienomis prieš nuotekų valymą, o trečias – po nuotekų mechaninio ir biologinio valymo. Nedideli DBP ir DEHP buvo nustatyti viename nevalyto vandens mėginyje. Deja, DMP ir DEP nustatyti negalėjome, kadangi jų smailes užgožia mėginio matricos komponentai. Būtina pažymėti, kad pakeitus chromatografinę kolonėlę ir/arba papildomai pakoregavus judrios fazės sudėtį ir gradiento programą, greičiausiai pavyktų eliminuoti matricos įtaką šių ftalatų nustatymui. 14 lentelėje surašyti dviejų ftalatų nustatymo nuotekų vandenyse rezultatai, o 28 pav. pateikta nevalyto nuotekų vandens mėginio be ir su 10,0 μg/l DBP ir DEHP priedu chromatogramos. Išmatuotos ftalatų išgavos svyruoja 89,4–104,4 % intervale,

o analizės rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai neviršija 8,1 %. Taigi, įvertinus gautus rezultatus galima konstatuoti, kad metodas tinkamas ftalatų koncentravimui ir nustatymui vandeniniuose mėginiuose.

14 lentelė. Ftalatų nustatymo nuotekų vandenyje rezultatai (n = 3).

Mėginys	Analitė	Nustatyta (µg/l)	Pridėta (µg/l)	Išgava (%)	SSN (%)
Nevalytas vanduo 1	DBP	2,9	10,0	104,4	5,9
	DEHP	2,4	10,0	96,7	6,5
Nevalytas vanduo 2	DBP	-	5,0	102,9	6,2
	DEHP	-	5,0	93,1	7,4
Išvalytas vanduo	DBP	-	5,0	92,6	7,3
	DEHP	-	5,0	89,4	8,1
	DBP	-	10,0	95,5	4,9
	DEHP	-	10,0	97,0	6,7



28 pav. Nevalyto nuotekų vandens mėginio be (a) ir su (b) 10,0 µg/l DBP ir DEHP priedu chromatogramos. Vidinio standarto (naftaleno) koncentracija 20,0 µg/l.

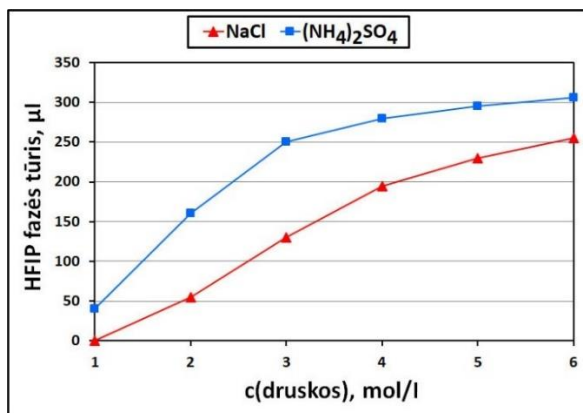
3.3. Vandeninės dvifazės sistemos HFIP/hidrofilinis tirpiklis tyrimas ir taikymas

Tiriant SUPRA tirpiklių ekstrakcines savybes visiškai atsitiktinai (pamiršus pridėti į mėginį ketvirtinio amonio druskos) buvo pastebėta, kad į labai nedaug acetonitrilo (~3–4% v/v) turintį vandeninį tirpalą pridėjus nedidelį kiekį HFIP, tirpale susidarė nauja, sunkesnė už vandenį fazė. Kadangi tokio tipo (hidrofilinis tirpiklis/hidrofilinis tirpiklis) vandeninės dvifazės sistemos apskritai dar nebuvo aprašytos mokslinėje literatūroje, pirmiausiai HFIP inicijavimas poliniais tirpikliais buvo palygintas su kitais dviem gana dažnai naudojamais būdais – inicijavimu druskomis ir inicijavimu sacharidais.

3.3.1. Inicijavimo būdų palyginimas

Šiame tyrime į 5 ml vandens buvo pridėdami 0,3 ml HFIP ir skirtingi atitinkamo iniciatoriaus kiekiai. Susidariusi emulsija centrifuguojama ir susidariusios HFIP fazės tūris išmatuojamas mikrošvirkštu.

Inicijavimas druskomis. Tyrimui buvo pasirinktos dvi dažniausiai įvairių tipų VDS susidarymui naudojamos druskos – NaCl ir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kaip ir buvo tikėtasi, abi druskos inicijavo nesimaišančios su vandeniu HFIP fazės susidarymą. Didinant atitinkamos druskos koncentraciją 1–6 mol/l intervale susidarančios HFIP fazės tūris didėja (29 pav.). Nustatyta, kad eksperimento sąlygose, t.y. pridėdant 0,3 ml HFIP, naujos fazės susidarymui būtina ne mažesnė už ~0,8 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ druskos koncentracija ir ne mažesnė už ~1,2 mol/l NaCl koncentracija. Be to, naudojant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ susidarė maždaug 1,5–3 kartus didesni HFIP fazės tūriai nei naudojant tos pačios koncentracijos NaCl druską. Šie rezultatai rodo, kad $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yra efektyvesnis iniciatorius. Gauti rezultatai koreliuoja su Hofmeister serija [62], kurioje skirtingi jonai yra išrikiuoti į eilę pagal jų kaip išdruskintojų efektyvumą. Hofmeister anijonų serijoje SO_4^{2-} yra efektyvesnis išdruskintojas už Cl^- , o katijonų serijoje NH_4^+ efektyvesnis už Na^+ .



29 pav. Druskos koncentracijos įtaka susidarancio HFIP fazės tūriui. Vandeninės fazės tūris – 5,0 ml; HFIP tūris – 0,30 ml.

Inicijavimas sacharidais. Inicijavimui buvo pasirinkti du sacharidai: monosacharidas gliukozė ir disacharidas sacharozė. Iš 15 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad lyginant su neorganinėmis druskomis, sacharidų kaip iniciatorių efektyvumas ženkliai blogesnis: HFIP fazės susidarymui reikalinga ne mažesnė nei ~2,0–2,5 mol/l sacharido koncentracija. Deja, tokios koncentracijos smarkiai padidina mėginio klampą ir tai apsunkina fazių atskyrimą po centrifugavimo.

15 lentelė. Sacharidų koncentracijos įtaka susidarancio HFIP fazės tūriui.

Sacharidas	Koncentracija, mol/l	HFIP fazės tūris, μl
Gliukozė	3,0	100
	2,5	25
	2,0	Nesusidaro
	1,0	Nesusidaro
Sacharozė	3,0	300
	2,5	120
	2,0	35
	1,0	Nesusidaro

Inicijavimas hidrofiliniais organiniais tirpikliais. Iniciatoriais buvo išbandyti septyni su vandeniu gerai besimaišantys poliniai organiniai tirpikliai: metanolis, etanolis, izopropanolis, ACN, acetonas, dimetilsulfoksidas (DMSO) ir tetrahidrofuranas (THF). Nustatyta, kad

nepriklausomai nuo pridedamų protoninių tirpiklių (alkoholių) kiekio, dvifazė sistema nesusidaro. Tuo tarpu visi keturi aprotoniniai tirpikliai, priešingai, inicijavo sunkesnės už vandenį fazės susidarymą. Nors tikslus šio proceso mechanizmas nėra žinomas, tikėtina, kad pagrindinė VDS susidarymo varomoji jėga – konkurencija dėl vandenilinio ryšio tarp HFIP, vandens ir inicijuojančio tirpiklio. HFIP yra ypač stiprus vandenilinio ryšio donoras (net stipresnis už vandenį), tačiau labai silpnas vandenilinio ryšio akceptorius [8]. Protoniniai tirpikliai taip pat yra stiprūs vandenilinio ryšio donorai. Tuo tarpu aprotoniniai tirpikliai, priešingai, pasižymi stipriomis protonų akceptorinėmis savybėmis, todėl vandenilinis ryšys tarp HFIP ir aprotoninio tirpiklio turėtų būti stipresnis už HFIP-vandens vandenilinį ryšį. Tokiu būdu, pridėjus į HFIP vandeninį tirpalą tokio iniciatoriaus, hidratiniame HFIP molekulių sluoksnyje esančios vandens molekulės yra pakeičiamos aprotoninio tirpiklio molekulėmis. Tai sukelia HFIP molekulių agregaciją susidarant micelių tipo klasteriams, kuriuose fluorintos grupės yra nukreiptos į klasterio centrą, o jo išorėje susidaro aprotoniniu tirpikliu solvatuotų hidroksilo grupių sluoksnis. Galutinis šio proceso rezultatas – nesimaišančios su vandeniu organinės fazės susidarymas. Atlikus HFIP/ACN fazės analizę dujų chromatografijos metodu, joje buvo nustatytas ne tik HFIP, bet ir gana didelis ACN kiekis. Tačiau analizė nesuteikia informacijos apie ACN būseną šioje fazėje. Tai gali būti ir tiesiog ištirpęs nestechiometrinis acetonitrilas, ir/arba sistemoje fiksuotų moliniu santykiu susidarantis kažkoks HFIP:ACN agregatas. Paprastumo dėlei toliau šios fazės bus vadinamos HFIP faze.

Siekiant palyginti inicijuojančių tirpiklių efektyvumą, titravimo iki susidrumstimo metodu jiems buvo išmatuotos fazių diagramos (30 pav.). Buvo nustatyta, kad visiems inicijuojantiems tirpikliams išmatuotos binodinės kreivės geriausiai aprašomos tokia lygtimi:

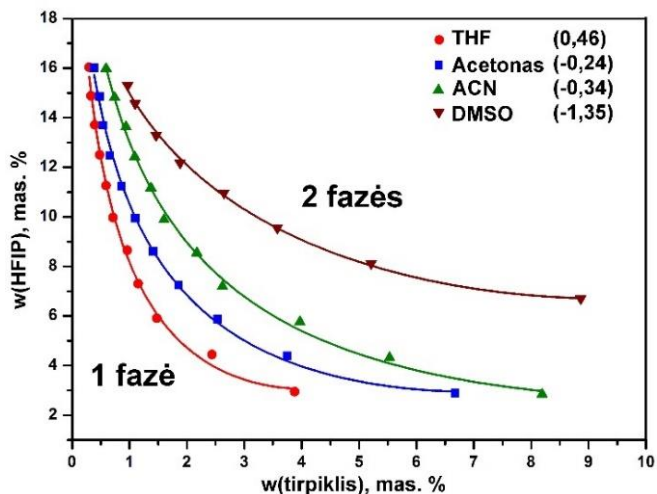
$$w(HFIP) = A \cdot \exp [(B \cdot w(Tirpiklis)^{0,5}) - (C \cdot w(Tirpiklis)^3)]$$

A, B ir C – regresijos parametrai.

16 lentelėje surašyti regresijos parametrai, koreliacijos koeficientai (R^2) bei standartiniai nuokrypiai (σ).

Fazių diagramos suteikia informaciją apie minimalias naują fazę sudarančių junginių (nagrinėjamu atveju HFIP ir organinio tirpiklio) koncentracijas (masės %) vandeniniame tirpale, kurios būtinos VDS susidarymui. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad tirpiklių inicijuojančioji geba stiprėja (t.y. VDS susidarymui reikalinga mažesnė iniciatoriaus koncentracija

esant tirpale tam pačiam HFIP kiekiui) tokia tvarka: DMSO < ACN < Acetonas < THF. Tirpiklių, kaip iniciatorių efektyvumas puikiai koreliuoja su jų logP vertėmis: kuo hidrofiliskesnis tirpiklis, tuo didesnė jo koncentracija būtina VDS susidarymui. Papildomai buvo nustatyta, kad HFIP ir iniciatoriaus pridėjimo į vandenį eiliškumas VDS susidarymui įtakos neturi.



30 pav. Fazių diagramos HFIP-organinis tirpiklis vandeninėms dvifazėms sistemoms. Skliausteliuose pateiktos tirpiklių logP vertės.

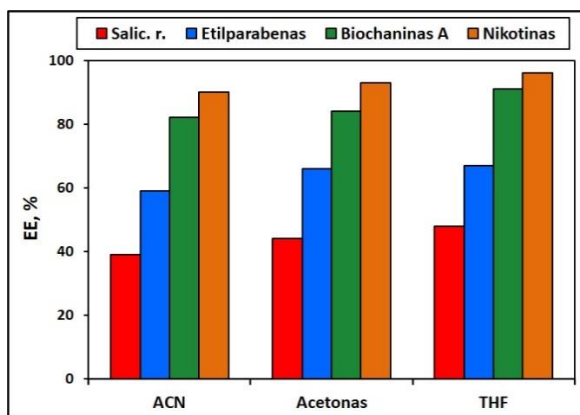
16 lentelė. Fazių diagramų parametrai.

VDS	A	B	C	R ²	σ
HFIP/THF	35,572	-1,499	-0,0198	0,9971	0,186
HFIP/Acetonas	30,321	-1,061	-1,40·10 ⁻³	0,9970	0,205
HFIP/ACN	32,070	-0,903	3,73·10 ⁻⁴	0,9968	0,210
HFIP/DMSO	25,213	-0,522	-3,31·10 ⁻⁴	0,9976	0,119

Apibendrinant tyrimų rezultatus galime konstatuoti, kad HFIP fazės inicijavimui ir tolimesniam VDS taikymui mikroekstrakcijai ir skysčių chromatografiniai ekstraktų analizei žymiai pranašesni iniciatoriai – poliniai organiniai tirpikliai. Naudojant druskas ir sacharidus reikalingos labai didelės iniciatorių koncentracijos. Tai padidina ekstraktų užteršimo tikimybę bei labai apsunkina tolimesnį ekstraktų paruošimą (HFIP fazės atskyrimą, nugarinimą ir pan.) chromatografiniai analizei.

3.3.2. Ekstrakcinių savybių įvertinimas

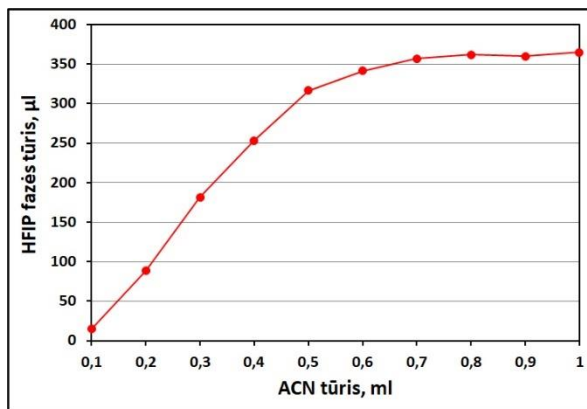
Inicijuojant HFIP fazės susidarymą organiniais tirpikliais dalis iniciatoriaus pereina į susidarančią HFIP fazę. Kadangi iniciatorių cheminė prigimtis bei poliškumas skiriasi, gali skirtis ir susidariusios HFIP fazės ekstrakcinės savybės. Todėl pirmiausiai įvertinome ar iniciatoriumi naudojamo organinio tirpiklio prigimtis daro įtakos ekstrakcijos efektyvumui. DMSO nebuvo vertinamas, kadangi jo, kaip iniciatoriaus efektyvumas labai menkas. Modelinėmis analitėmis buvo pasirinkti keturi skirtingos prigimties ir poliškumo junginiai: salicilo rūgštis, etilparabenas, biochaninas A ir nikotinas. Mikroekstrakcijai buvo parinkti tokie organinių iniciatorių kiekiai, kad visais atvejais susidarytų panašus (~90–110 µL) HFIP fazės tūris. Gauti rezultatai (31 pav.) rodo, kad organinio tirpiklio prigimtis ekstrakcijos efektyvumui praktiškai neturi įtakos. Nedideli ekstrakcijos efektyvumo skirtumai greičiausiai susiję su susidarančios HFIP fazės (t.y. ekstrakto) tūrio nevienodumu.



31 pav. Iniciatoriaus prigimties įtaka keturių junginių ekstrakcijos efektyvumui.

Detalesniam tiriamos VDS ekstrakcinių savybių tyrimui buvo pasirinktas acetonitrilas, kuris yra puikiai suderinamas su skysčių chromatografija. DSSME metoduose ekstrakcijai įprastai naudojami 50–200 µl ekstrakto tūriai. Todėl prieš tiriamos sistemos taikymą mikroekstrakcijai, buvo tikslinga įvertinti pridedamo iniciatoriaus tūrio įtaką susidarančios nesimaišančios su vandeniu fazės tūriui. Tyrimo metu HFIP tūris buvo palaikomas pastoviu (0,3 ml) ir keičiamas pridedamo ACN tūris. Nustatyta (32 pav.), kad didinant iniciatoriaus tūrį nuo 0,1 iki 0,7 ml, susidarančios HFIP fazės tūris tolygiai

didėja. Tolimesnis ACN tūrio didinimas reikšmingos įtakos susidariusios HFIP fazės tūriui neturėjo.



32 pav. ACN tūrio įtaka susidarančios HFIP fazės tūriui. Vandeninės fazės tūris – 5,0 ml; HFIP tūris – 0,3 ml.

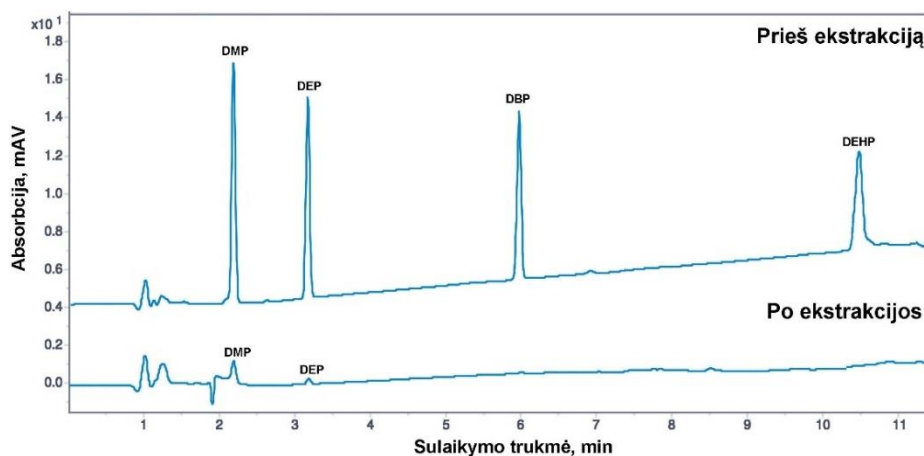
Tiriamos sistemos ekstrakcinių savybių įvertinimui modelinėmis analitėmis buvo pasirinkti šešių skirtingų klasių organiniai junginiai: aromatiniai angliavandeniliai, esteriai, hidroksiesteriai, aminorai, fenoliai ir karboksirūgštys. Mikroekstrakcijos sąlygos: vandeninio mėginio tūris – 5 ml, organinių junginių koncentracija mėginyje – 2,0 mg/l, HFIP tūris – 0,3 ml, ACN tūris – 0,3 ml, ekstrakcijos trukmė – 30 s.

Visų junginių, išskyrus karboksirūgštis, ekstrakcija buvo atliekama iš tirpalų papildomai nereguliuojant jų pH. Siekiant maksimaliai nuslopinti karboksirūgščių disociaciją, jų ekstrakcija buvo atliekama iš papildomai HCl parūgštintų (pH=2) vandeninių tirpalų. Kiekvienai analičių grupei buvo parinktos skysčių chromatografinės analizės sąlygos (17 lentelė). Iliustracijai, 33 pav. palygintos ftalatų mišinio chromatogramos, išmatuotos vandeninėje fazėje prieš ir po ekstrakcijos.

Išmatuotos skirtingų klasių organinių junginių ekstrakcijos efektyvumo vertės surašytos 18 lentelėje. Lentelėje taip pat pateiktos šių junginių logP vertės. Tos pačios klasės junginių ekstrakcijos efektyvumas didėja, didėjant junginio logP vertei, t.y. stiprėjant jo hidrofobiškumui. Tačiau lyginant skirtingų klasių junginių ekstrakcijos efektyvumą, tokios koreliacijos jau nėra. Pavyzdžiui, panašaus poliškumo kvercetino (logP=1,82) ir 2-nitroanilino (logP=1,85) ekstrakcijos efektyvumai skiriasi daugiau nei du kartus. Hidrofiliausiai kofeinas (logP=-0,07) ir nikotinas (logP=1,17) ekstrahuojami ženkliai efektyviau už gerokai hidrofobiškesnius metilparabeną, fenolį, kvercetiną bei karboksirūgštis.

17 lentelė. Modelinių analičių chromatografinio nustatymo sąlygos
(kolonėlė - Porachell 120 EC-C18).

Analitės	Judri fazė A	Judri fazė B	Linijinis gradientas
Aromatiniai angliavandeniliai	H ₂ O	ACN	50%B→100%B per 6 min
Esteriai	H ₂ O	ACN	60%B→100%B per 7 min
Hidroksiesteriai	H ₂ O	ACN	50%B→80%B per 5 min
Aminai	5 mmol/l CH ₃ COONH ₄ 100% H ₂ O	5 mmol/l CH ₃ COONH ₄ 95% ACN	10%B→80%B per 10 min
Karboksirūgštys	10 mmol/l H ₃ PO ₄ 100% H ₂ O	10 mmol/l H ₃ PO ₄ 90% ACN	20%B→50%B per 10 min
Fenoliai	0,1% HCOOH 100% H ₂ O	0,1% HCOOH 100% ACN	45%B→80%B per 6 min



33 pav. Ftalatų standartinio tirpalo (2 mg/l) chromatogramos, išmatuotos prieš ir po mikroekstrakcijos.

18 lentelė. Įvairių klasių junginių (2,0 mg/l) mikroekstrakcijos efektyvumo palyginimas.

Junginių klasė	Analitė	logP	EE ± σ, (%; n=3)
Aromatiniai angliavandeniliai	Benzenas	2,13	86,1 ± 1,8
	Toluenas	2,73	90,3 ± 1,6
	Naftalenas	3,30	94,7 ± 2,1
Esteriai	Dimetilftalatas	1,60	91,5 ± 1,5
	Dietilftalatas	2,42	96,8 ± 1,9
	Dibutilftalatas	4,50	≥98
	Dietilheksilftalatas	7,40	≥98
Hidroksiesteriai	Metilparabenas	1,96	40,1 ± 0,6
	Etilparabenas	2,47	57,1 ± 0,6
	Propilparabenas	3,04	77,6 ± 1,3
	Butilparabenas	3,57	89,7 ± 2,2
Aminai	Kofeinas	-0,07	67,7 ± 1,4
	Nikotinas	1,17	91,8 ± 1,8
	2-Nitroanilinas	1,85	≥98
Karboksirūgštys	Sorbo	1,33	25,6 ± 0,9
	Benzoinė	1,87	29,2 ± 0,8
	Salicilo	2,26	38,8 ± 1,2
Fenoliai	Fenolis	1,46	31,8 ± 0,7
	Kvercetas	1,82	39,7 ± 0,6
	Biochaninas A	3,22	81,3 ± 1,6

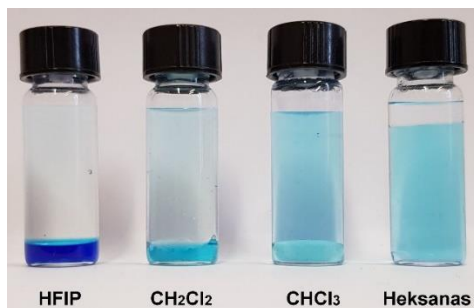
Apibendrinus tyrimų rezultatus galima konstatuoti, kad skirtingų klasių organinių junginių ekstrakcijos efektyvumas mažėja tokia tvarka: aminai > esteriai ≈ aromatiniai angliavandeniliai > hidroksiesteriai ≈ fenoliai > karboksirūgštys. Tai rodo, kad skirtingų klasių junginių ekstrakcijos efektyvumui lemiamą įtaką turi ne ekstrahuojamų junginių poliškumas, tačiau jų bazinės-rūgštinės savybės: geriausiai ekstrahuojami baziniai junginiai, truputį blogiau neutralūs ir blogiausiai – rūgštiniai junginiai. Rūgštiniai junginiai yra stiprūs vandenilinio ryšio donoriai, ir gerokai silpnesni akceptorai. Tuo tarpu baziniai junginiai – stiprūs vandenilinio ryšio akceptorai. Taigi, gerą bazinių junginių ekstrakcijos efektyvumą greičiausiai ir nulemia labai stipri jų donoras-akceptorius sąveika su HFIP.

Skysčių-skysčių ekstrakcijoje iš vandeninių tirpalų tradiciniais organiniais tirpikliais neutrali junginio forma yra ekstrahuojama žymiai efektyviau už poliškesnę jonizuotą jo formą. Nagrinėjant rezultatus nustebino puikus gana polinio nikotino, kuris ekstrakcijos sąlygose vandeniniame mėginyje (pH~7) didesne dalimi egzistuoja katijoninėje formoje (nikotino bazinis $pK_a=8,1$), ekstrakcijos efektyvumas. Tai paskatino papildomai patyrinti jonizuotų organinių junginių ekstrakciją. Pirmiausiai palyginome nikotino ekstrakcijos efektyvumą iš parūgštintų (pH=3) ir pašarmitų (pH=11) vandeninių tirpalų. Parūgštintame mėginyje nikotinas yra pilnai protonizuotas, t.y. katijonas, o šarminėje terpėje jis egzistuoja neutralioje formoje. Buvo nustatyta, kad iš parūgštinto mėginio nikotinas išekstrahuojamas beveik pilnai (ekstrakcijos efektyvumas 94,8%), o iš pašarmito mėginio nikotino ekstrakcijos efektyvumas siekė 87,6%. Tuo tarpu neutralios benzoinės rūgšties formos (pH=2,0) ekstrakcija, priešingai, buvo apie 2,5 kartų efektyvesnė už jos anijoninės (pH=10) formos ekstrakciją.

Taip pat palyginome dviejų, panašaus poliškumo, tačiau priešingo krūvio joninių dažiklių – katijoninio metileno mėlynojo ir anijoninio rūgštinio raudonojo 1 – ekstrakciją. Iš 34 pav. pateiktų dažiklių tirpalų prieš ir po ekstrakcijos nuotraukų akivaizdu, kad katijoninis dažiklis išekstrahuojamas pilnai, o anijoninis dažiklis praktiškai neekstrahuojamas. Galiausiai vienodomis sąlygomis buvo palyginta metileno mėlynojo ekstrakcija tirpiama sistema ir trimis tradiciniais hidrofobiniais tirpikliais – heksanu, chloroformu bei dichlormetanu (35 pav.). Kadangi šių tirpiklių tirpumas vandenyje skiriasi, eksperimentiškai buvo parinkti tokie šių tirpiklių tūriai, kad po ekstrakcijos susidarytų apie $180 \pm 10 \mu\text{l}$ ekstrakto. Netgi vizualiai palyginus po ekstrakcijos gautus tirpalus aiškiai matyti, kad HFIP fazė žymiai efektyviau ekstrahuoja katijoninį dažiklį.



34 pav. Joninių dažiklių tirpalai prieš ir po ekstrakcijos.



35 pav. Metileno mėlynojo (2 mg/l) ekstrakcija skirtingais tirpikliais. Heksano fazė mėginio tirpalo viršuje.

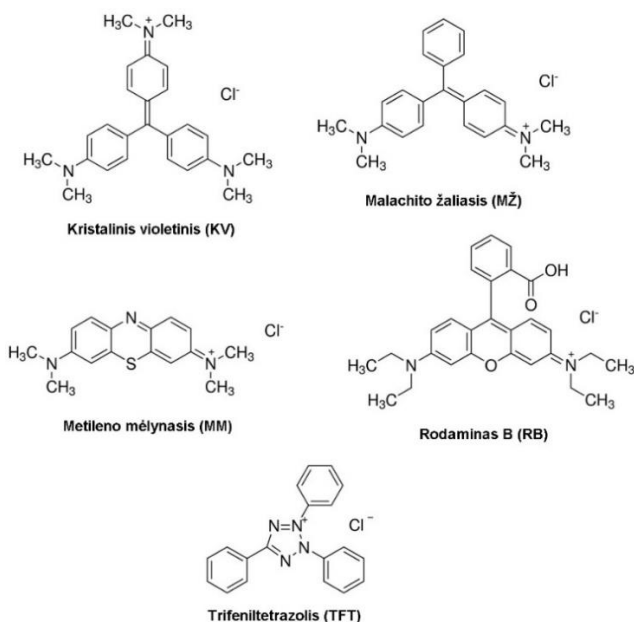
Tikėtina, kad tiriamos sistemos ekstrakcinės savybės nulemia susidarančios fazės sudėtyje esantis heksafluorizopropanolis. Todėl buvo įdomu patikrinti, ar HFIP pagrindu gauti eutektiniai bei SUPRA tirpikliai taip pat pasižymės panašiomis ekstrakcinėmis savybėmis. Šiam tikslui vandeninis katijoninio ir anijoninio dažiklių tirpalas buvo ekstrahuojamas panašiu tūriu ($\sim 180 \pm 10 \mu\text{l}$) TBAC/HFIP eutektinio tirpiklio, TBAC/HFIP SUPRA tirpiklio ir HFIP/ACN vandeninės dvifazės sistemos. Išmatuoti dažiklių ekstrakcijos efektyvumai palyginti 19 lentelėje. Rezultatai rodo, kad dažiklių ekstrakcijos skirtingais tirpikliais efektyvumai reikšmingai skiriasi. Anijoninio dažiklio ekstrakciją eutektiniu bei SUPRA tirpikliais nulemia šių tirpiklių sudėtyje esantis TBA^+ katijonas, linkęs sudaryti jonų poras su anijonais. Blogesnė katijoninio dažiklio ekstrakcija šiais tirpikliais greičiausiai taip pat susijusi su TBA^+ katijonu. Šiuo atveju TBA^+ įtaka galėtų būti dvejopa: elektrostatinė stūma tarp jo ir katijoninio dažiklio ir/arba stipresnis jo vandenilinis ryšys su HFIP, apsunkinantis dažiklio-HFIP sąveiką.

19 lentelė. Katijoninio ir anijoninio dažiklių (2 mg/l) ekstrakcijos skirtingais tirpikliais efektyvumo palyginimas (n=3).

Ekstrahentas	EE, %	
	Metileno mėlynasis	Rūgštinis raudonasis 1
TBAC/HFIP eutektinis tirpiklis	35,7	88,4
TBAC/HFIP SUPRA tirpiklis	70,5	66,6
HFIP/ACN VDS	≥98	≤2

3.3.3. Katijoninių dažiklių mikroekstrakcija ir nustatymas

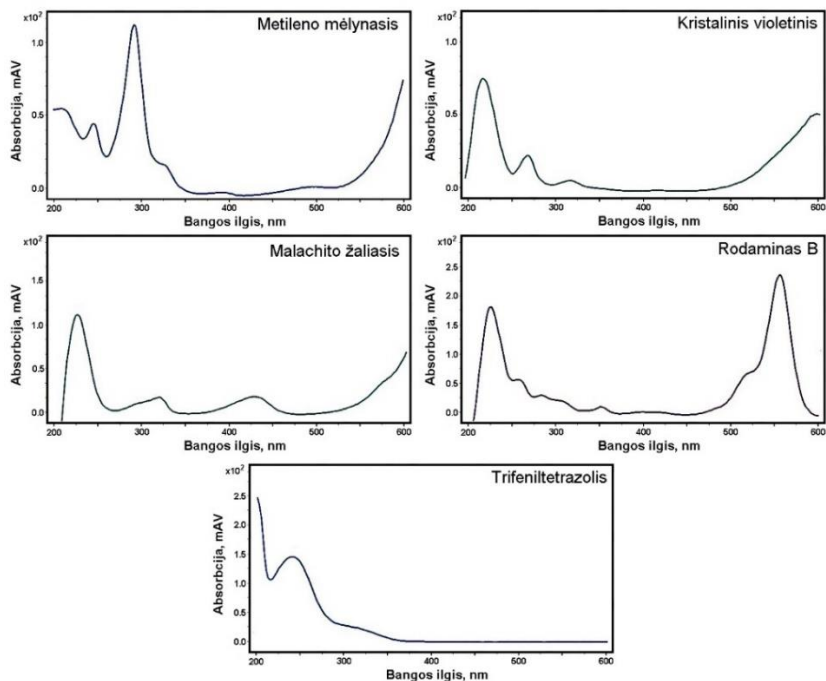
Ekstrakcinių savybių tyrimas parodė, kad VDS heksafluorizopropanolio pagrindu ypač gerai ekstrahuoja neutralius ir katijoninius bazinius organinius junginius. Todėl pabandėme šią sistemą panaudoti keturių sintetinių katijoninių dažiklių dispersinei skysčių-skysčių mikroekstrakcijai ir nustatymui skysčių chromatografijos metodu. Vidiniu standartu buvo pasirinktas trifeniltetrazolis (36 pav.)



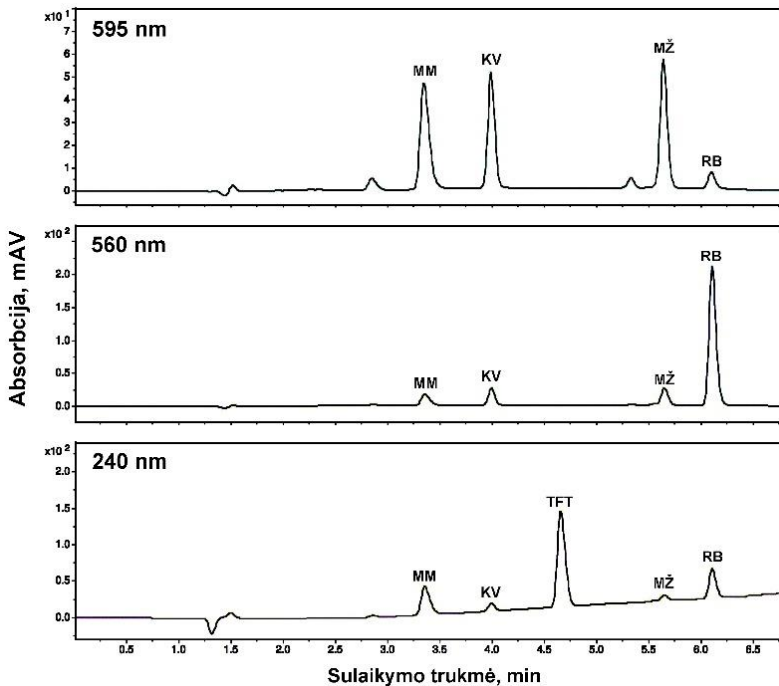
36 pav. Katijoninių dažiklių ir trifeniltetrazolio (vidinis standartas) struktūros.

Pirmiausiai buvo optimizuojamos dažiklių chromatografinio atskyrimo ir fotometrinio detektavimo sąlygos. 37 pav. pateikti tiriamų junginių absorbcijos spektrai išmatuoti diodinės matricos detektoriumi. Remiantis šiais rezultatais detektavimui buvo pasirinkti trys bangos ilgiai: metileno mėlynajam, kristaliniam violetiniam ir malachito žaliajam – 595 nm, rodaminui B – 560 nm ir trifeniltetrazoliui – 240 nm.

38 pav. pateikta dažiklių ir vidinio standarto mišinio chromatograma optimizuotose sąlygose.



37 pav. Dažiklių ir vidinio standarto absorbcijos spektrai.



38 pav. Dažiklių ir vidinio standarto (TFT) mišinio (2,0 mg/l) chromatograma optimizuotose sąlygose. Judri fazė: A – 0,1% HCOOH vandenyje; B – 0,1% HCOOH acetonitrile Gradientas: 0 min – 30% B; 7 min – 100% B.

Ekstrakcinių mėginio paruošimo metodų tikslas – kiek įmanoma pilniau išskirti analites iš mėginio bei maksimaliai jas sukonzentruoti. Pirmiausiai buvo išmatuotas dažiklių ir vidinio standarto ekstrakcijos efektyvumas pirminėse įvairių klasių junginių ekstrakcijos efektyvumui įvertinti naudotose sąlygose. Nustatyta, kad visi penki junginiai išekstrahuojami pilnai – jų mikroekstrakcijos efektyvumas ≥ 98 .

Siekiant ekstrakcijos būdu pasiekti kuo didesnę analičių sukonzentravimo laipsnį, būtina didinti mėginio ir ekstrahento tūrių santykį, t.y. išekstrahuoti analites iš kuo didesnio mėginio tūrio, kuo mažesniu ekstrahento tūriu. Deja, mėginio tūrio didinimą riboja tai, kad turimoje centrifugoje buvo galima centrifuguoti ne didesnius už 10 mL tirpalo tūrius. Įvertinus dar ir tai, kad į mėginius reikia pridėti ACN ir HFIP, didžiausias mėginio tūris $\sim 7,5$ ml. Atlikus mikroekstrakciją iš 7,5 ml vandens mėginių (pridedant po 0,4 ml HFIP ir ACN) buvo nustatyta, kad ir šiuo atveju visų analičių ekstrakcijos efektyvumas ≥ 98 .

Mažinti HFIP fazės tūrį taip siekiant dar padidinti sukoncentravimo laipsnį nebuvo tikslinga, kadangi abu susidarancios fazės komponentai (HFIP ir ACN) yra labai lakūs. Paprasčiau nugarinti ekstraktą azoto srautu ir ištirpinti likutį minimaliame tolimesnei analizei tinkamo tirpiklio tūryje. Be to, nugarindami tirpiklį išvengiame kai kurių analičių smailes deformuojančio HFIP įtakos. Tai yra labai svarbus šios VDS privalumas. Palyginimui, literatūroje publikuotuose šia tema darbuose dažniausiai naudojamose vandeninėse dvifazėse sistemose ekstrahentas (pvz., polimeras, joninis skystis ar eutektinis tirpiklis) ir/arba iniciatorius (druska ar sacharidas) yra nelakus, todėl nugarinti tokių ekstraktų negalima. Taigi, galimybė nugarinti ekstraktą leidžia ne tik daugiau sukoncentruoti tiriamus junginius, bet ir praplečia analizei tinkamų metodų (pvz. dujų chromatografija ir kt.) spektrą.

Papildomai ištyrėme mikroekstrakcijos trukmės įtaką dažiklių ir vidinio standarto ekstrakcijos efektyvumui (20 lentelė). Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, ekstrakcija vyksta labai greitai. Praktiškai pilnai visi junginiai išekstrahuojami ir per 5 s. Netgi ekstrahuojant apie 1 s (t.y. supurčius mišinį tik vieną kartą), keturių junginių (išskyrus KV) ekstrakcijos efektyvumai viršija 92%.

Remiantis tyrimų rezultatais realių mėginių analizei buvo pasirinkta tokia mikroekstrakcijos procedūra: į 7,5 ml vandens mėginio pridedama 0,4 ml HFIP ir 0,4 ml ACN, mišinys purtomas 5 s ir centrifuguojamas. HFIP fazė mikropipete perkeliama į mažą centrifugavimo mėgintuvėlį, tirpiklis nugarinamas oro srautu (~10 min), likutis ištirpinamas 50 µL pradinės judrios fazės (0,1% HCOOH, 70:30 H₂O:ACN v/v) ir analizuojamas. Kadangi naudojamas vidinis standartas, mikrošvirkštu surenkamo ekstrakto tūrio svyravimai analizės rezultatams įtakos neturi.

20 lentelė. Mikroekstrakcijos trukmės įtaka dažiklių ir vidinio standarto ekstrakcijos efektyvumui. Analčių koncentracija – 2,0 mg/l; mėginio tūris – 7,5 ml; HFIP tūris – 0,4 ml; ACN tūris – 0,4 ml.

Ekstrakcijos trukmė	EE, %				
	MM	KV	TFT (VS)	MŽ	RB
30 s	≥98	≥98	≥98	≥98	≥98
20 s	≥98	95,4	≥98	≥98	≥98
10 s	≥98	97,8	≥98	≥98	≥98
5 s	≥98	97,1	≥98	≥98	≥98
1 s	94,9	88,6	≥98	93,7	92,6

Tiesiškumo intervalui nustatyti optimizuotose sąlygose buvo ekstrahuojami ir analizuojami 7 koncentracijų (0,2–50,0 µg/l) dažiklių standartai su pastovia 10,0 µg/l vidinio standarto koncentracija. Gauti rezultatai pateikti 21 lentelėje. Visiems dažikliams tirtame koncentracijų intervale nustatytos galiojančios tiesinės priklausomybės. Didesnės koncentracijos nebuvo tiriamos, kadangi realiuose mėginiuose tokių koncentracijų nebūna.

21 lentelė. Dažiklių mikroekstrakcijos ir nustatymo analizinės charakteristikos (n=3).

Analitė	Tiesiškumo intervalas, µg/l	R²	Nustatymo riba, µg/l	Aptikimo riba, µg/l
MM	0,50 – 50,0	0,9959	0,60	0,18
KV	0,50 – 50,0	0,9980	0,50	0,15
MŽ	0,50 – 50,0	0,9972	0,50	0,15
RB	0,20 – 50,0	0,9987	0,15	0,05

Kaip matyti iš lentelėje pateiktų duomenų, metodas pasižymi labai geru jautriu – dažiklių nustatymo ribos yra 0,15–0,60 µg/l intervale. Kadangi tiriami dažikliai yra išekstrahuojami iš 7,5 ml mėginio į galutinį 50 µl tirpalo tūrį, teoriniai jų sukonzentravimo laipsniai turėtų siekti 150.

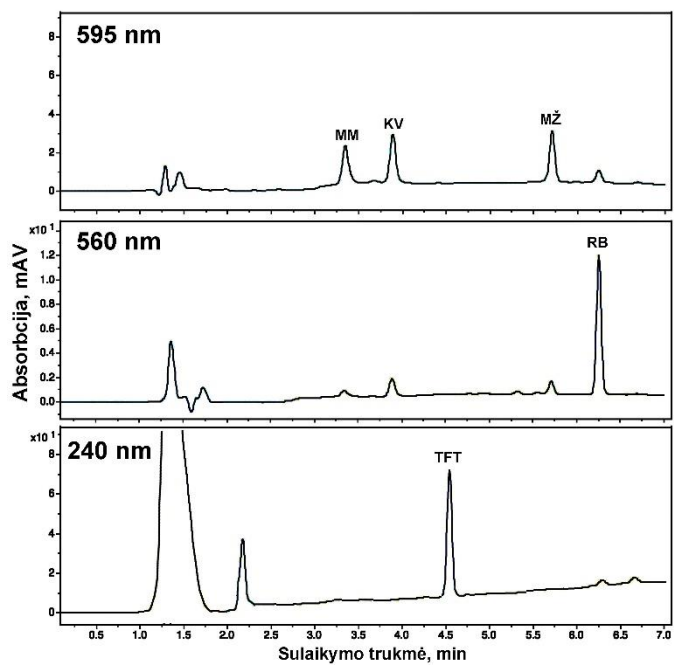
Katijoniniai dažikliai yra įprastai naudojami tekstilės pluoštų, odos ir popieriaus dažymui, todėl jų koncentracija yra kontroliuojama tokia veikla užsiimančių įmonių nutekamuosiuose vandenyse. Deja, tokių mėginių mums nepavyko gauti. Todėl norėdami patikrinti metodo tinkamumą realių vandens mėginių analizei ištyrėme du Neries upės vandens mėginius paimtus Vilniaus miesto ribose: mėginys Nr. 1 buvo paimtas prie Valakampių tilto, o mėginys Nr. 2 – prie pėsčiųjų tilto Vingio parke. Kadangi šiuose mėginiuose dažiklių neaptikome, į mėginius buvo pridėti žinomi dažiklių kiekiai ir nustatytos jų koncentracijos bei išgavos. Gauti rezultatai apibendrinti 22 lentelėje, o 39 pav. pavaizduota Neries upės vandens mėginio su 2,0 µg/l dažiklių ir 10,0 µg/l vidinio standarto priedu chromatograma. Išmatuotos dažiklių išgavos svyruoja 88,6–98,5 % intervale, o analizės rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai neviršija 9,6 %. Taigi, įvertinus gautus rezultatus galima teigti, kad metodas tinkamas labai mažų katijoninių dažiklių kiekių nustatymui vandeniniuose mėginiuose.

Apibendrinant 3.3 skyriuje pateiktus rezultatus galima konstatuoti, kad palyginus su daugeliu tradicinių vandeninių dvifazių sistemų polimerų, paviršiaus aktyviųjų junginių, joninių skysčių ar eutektinių tirpiklių pagrindu,

nauja HFIP/ACN vandeninė dvifazė sistema pasižymi keliais, labai svarbiais ekstrakcijai ir ypač mikroekstrakcijai privalumais. Susidaranti organinė fazė yra labai laki, sunkesnė už vandenį bei pasižymi nedidele klampa. Lakūs ekstraktai puikiai suderinami ir su dujų chromatografijos metodu. Be to, tokius ekstraktus nesunku nugarinti ir pertirpinti reikiamame tirpiklyje taip dar išplečiant ekstraktų analizei tinkamų metodų ratą. Didelio tankio ir nedidelės klamos svarba mikroekstrakcijai jau buvo aptarta literatūros apžvalgoje.

22 lentelė. Dažiklių nustatymo Neries upės vandenyje rezultatai (n=3).

Mėginys	Analitė	Pridėta (µg/l)	Išgava (%)	SSN (%)
Nr. 1	MM	2,0	89,7	9,6
	KV	2,0	92,8	8,5
	MŽ	2,0	97,3	9,2
	RB	2,0	94,5	7,7
	MM	10,0	93,5	8,4
	KV	10,0	95,8	7,8
	MŽ	10,0	96,6	8,3
	RB	10,0	97,5	7,0
Nr. 2	MM	2,0	90,4	8,8
	KV	2,0	88,6	9,3
	MŽ	2,0	92,1	7,9
	RB	2,0	96,9	7,6
	MM	10,0	94,4	7,9
	KV	10,0	98,0	6,7
	MŽ	10,0	94,2	7,1
	RB	10,0	98,5	6,4



39 pav. Neries upės vandens mėginio su 2,0 $\mu\text{g/l}$ dažiklių ir 10,0 $\mu\text{g/l}$ vidinio standarto (TFT) priedu ekstrakto chromatograma.

IŠVADOS

1. Mentolis, tetrabutylamonio chloridas ir tetraheksilamonio chloridas sudaro su TFA ir HFIP (molinis santykis 1:2) sunkesnius už vandenį, hidrofobinius eutektinius tirpiklius, pasižyminčius maža-vidutine klampa. Didelį tirpiklių tankį nulemia didelis perfluorintų junginių tankis. Tirpiklių mentolio pagrindu klampa yra daugiau nei 10 kartų mažesnė už tirpiklių su ketvirtinio amonio druskomis klampą.
2. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai pasižymi efektyvesne parabenu, ftalatų ir flavonoidų ekstrakcija nei tradiciniai chlorinti tirpikliai. Eutektinių tirpiklių ekstrahuojančios savybės stiprėja tokia tvarka: Men:TFA < TBACl:HFIP ≤ Men:HFIP < THACl:TFA ≈ THACl:HFIP.
3. HFIP, TFA, PFPA ir HFBA inicijuoja sunkesnių už vandenį, hidrofobinių supramolekulinių tirpiklių susidarymą vandeniniuose ketvirtinio amonio druskų tirpaluose. HFIP inicijuoja didesnius SUPRA fazės tūrius nei tos pačios koncentracijos perfluorintos rūgštys. Ilgesnės fluoralkilo grandinės rūgštys yra efektyvesni SUPRA fazės iniciatoriai.
4. SUPRA tirpikliai perfluorintų junginių pagrindu efektyviai ekstrahuoja ftalatus. Ftalatų ekstrakcijos efektyvumas koreliuoja su jų logP vertėmis. Efektyviausiai ftalatai ekstrahuojami TDTMAB/HFIP tirpikliu: šiuo tirpiklių visų ftalatų ekstrakcijos efektyvumas viršija 94%.
5. Hidrofiliniai aprotoniniai tirpikliai inicijuoja VDS susidarymą vandeniniuose HFIP tirpaluose. Tikėtina, kad pagrindinė VDS susidarymo varomoji jėga – konkurencija dėl vandenilinio ryšio tarp HFIP, vandens ir inicijuojančio tirpiklio. Aprotoninių tirpiklių VDS susidarymą inicijuojanti geba stiprėja tokia tvarka: DMSO < ACN < Acetonas < THF.
6. HFIP/ACN tipo VDS ypač gerai ekstrahuoja neutralius ir netgi jonizuotus bazinius junginius, blogiau – neutralius, ir blogiausiai – rūgštinius junginius. Ypač efektyvią bazinių junginių ekstrakciją greičiausiai nulemia stiprios šių junginių vandenilinio ryšio akceptorinės savybės.
7. Nauji tirpikliai pritaikyti parabenu, ftalatų ir katijoninių dažiklių dispersinei skysčių-skysčių mikroekstrakcijai iš vandens mėginių ir jų nustatymui ESCh metodu. Mikroekstrakcijos trukmė – tik kelios sekundės, o sukonzentravimo laipsniai siekia ~70 parabenams ir ftalatams bei ~150 katijoniniams dažikliams. Tyrimų rezultatai rodo, kad nauji tirpikliai yra puiki alternatyva tradiciniams dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamiems tirpikliams.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] D.R.J. Plunkett, in: The Fluoropolymers Division Newsletter (Summer), 1994, pp. 1-2.
- [2] Plunkett, Roy J. Tetrafluoroethylene polymers. Patent US 2230654, issued 4 February 1941
- [3] The History of Teflon™ Fluoropolymers. Žiūrėta 2024-04-28 [Interaktyvus]. Adresas: <https://www.teflon.com/en/news-events/history>
- [4] E. Dhanumalayan, G.M. Joshi, *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 1 (2018) 247-268.
- [5] G. Ding, W.J.G.M. Peijnenburg, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (2013) 598-678.
- [6] C. Zhang, K. Yan, C. Fu, H. Peng, C.J. Hawker, A.K. Whittaker, *Chemistry Reviews*, 122 (2022) 167-208.
- [7] M.P. Knunyants, I. L., Krasuskaya. Byull. Izobretenii, No. 11 (1961) 25, Patent No. SU 138604.
- [8] I. Colomer, A.E.R. Chamberlain, M.B. Haughey, T.J. Donohoe, *Nature Reviews Chemistry*, 1 (2017).
- [9] R. Francke, D. Cericola, R. Kötz, D. Weingarth, S.R. Waldvogel, *Electrochimica Acta*, 62 (2012) 372-380.
- [10] J.M. Ramos-Villaseñor, E. Rodríguez-Cárdenas, C.E. Barrera Díaz, B.A. Frontana-Uribe, *Journal of The Electrochemical Society*, 167 (2020) 155509.
- [11] D. Bonnet-Delpon, J.-P. Bégué, B. Crousse, *Synlett*, (2004) 18-29.
- [12] M. Buck, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 31 (1998) 297-355.
- [13] A. Apffel, J.A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W.S. Hancock, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 1320-1325.
- [14] P. Mandal, A.R. Molla, D.K. Mandal, *Journal of Biochemistry*, 154 (2013) 531-540.
- [15] K. Yamada, T. Nakano, Y. Okamoto, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38 (2000) 220-228.
- [16] M.G. Khaledi, S.I. Jenkins, S. Liang, *Langmuir*, 29 (2013) 2458-2464.
- [17] F. Swarts, *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 8 (1922) 343-370.
- [18] Merck, The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed., Whitehouse Station N.J: Merck, 2001.
- [19] J. Langer, M. Stano, S. Gohlke, V. Foltin, S. Matejcik, E. Illenberger, *Chemical Physics Letters*, 419 (2006) 228-232.
- [20] W.M. Haynes, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95 ed., CRC Press LLC, Boca Raton, 2013-2014.
- [21] F.S. Wagner, Acetic Acid. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000.

- [22] L. Settimo, K. Bellman, R.M. Knechtel, *Pharmaceutical Research*, 31 (2014) 1082-1095.
- [23] C. Wohlfarth, Dielectric constant of acetic acid. Landolt-Börnstein - Group IV Physical Chemistry, 2008.
- [24] E.L. Mackor, P.J. Smit, J.H. van der Waals, *Transactions of the Faraday Society*, 53 (1957) 1309.
- [25] A.J. Elliott, Fluorinated acetic acids Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, 2000.
- [26] J.J. Lagowski, The Chemistry of Nonaqueous Solvents VB: Acid and Aprotic Solvents, Elsevier Science, 2012.
- [27] V.V. Sureshbabu, N. Narendra, Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Volume 4: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis 2011.
- [28] Y. Chen, A.R. Mehok, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Journal of Chromatography A*, 1043 (2004) 9-18.
- [29] M. Nshanian, R. Lakshmanan, H. Chen, R.R. Ogorzalek Loo, J.A. Loo, *International Journal of Mass Spectrometry*, 427 (2018) 157-164.
- [30] J.D. Pearson, M.C. McCroskey, *Journal of Chromatography A*, 746 (1996) 277-281.
- [31] H. Hori, Y. Takano, K. Koike, S. Kutsuna, H. Einaga, T. Ibusuki, *Applied Catalysis B: Environmental*, 46 (2003) 333-340.
- [32] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, *Chemical Communications*, (2003) 70-71.
- [33] D.J.G.P. van Osch, C.H.J.T. Dietz, S.E.E. Warrag, M.C. Kroon, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, (2020).
- [34] A. Shishov, A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andruch, A. Bulatov, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 129 (2020) 115956.
- [35] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jerome, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 7108-7146.
- [36] D.J.G.P. van Osch, L.F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M.A.A. Rocha, M.C. Kroon, *Green Chemistry*, 17 (2015) 4518-4521.
- [37] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, *ChemSusChem*, 12 (2019) 1549-1559.
- [38] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, W.F. Wong, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 97 (2021) 142-162.
- [39] B.D. Ribeiro, C. Florindo, L.C. Iff, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3 (2015) 2469-2477.
- [40] N. Schaeffer, M.A.R. Martins, C. Neves, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, *Chemical Communications*, 54 (2018) 8104-8107.

- [41] C. Florindo, F.S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2 (2014) 2416-2425.
- [42] M.B. Singh, V.S. Kumar, M. Chaudhary, P. Singh, *Journal of the Indian Chemical Society*, 98 (2021) 100210.
- [43] D.J.G.P. van Osch, C.H.J.T. Dietz, J. van Spronsen, M.C. Kroon, F. Gallucci, M. van Sint Annaland, R. Tuinier, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7 (2019) 2933-2942.
- [44] A.K. Dwamena. Investigating anions and hydrophobicity of deep eutectic solvents by experiment and computational software, Electronic Theses and Dissertations (2019).
- [45] A.K. Dwamena, D.E. Raynie, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65 (2020) 640-646.
- [46] S.M. Yousefi, F. Shemirani, S.A. Ghorbanian, *Chromatographia*, 81 (2018) 1201-1211.
- [47] M.A.R. Martins, E.A. Crespo, P.V.A. Pontes, L.P. Silva, M. Bülow, G.J. Maximo, E.A.C. Batista, C. Held, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6 (2018) 8836-8846.
- [48] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, *Microchemical Journal*, 152 (2020) 104384.
- [49] W.-W. Deng, Y. Zong, Y.-X. Xiao, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5 (2017) 4267-4275.
- [50] W. Deng, L. Yu, X. Li, J. Chen, X. Wang, Z. Deng, Y. Xiao, *Food Chemistry*, 274 (2019) 891-899.
- [51] M. Devi, R. Moral, S. Thakuria, A. Mitra, S. Paul, *ACS Omega*, 8 (2023) 9702-9728.
- [52] Y. Shi, D. Xiong, Y. Zhao, T. Li, K. Zhang, J. Fan, *Chemosphere*, 241 (2020) 125082.
- [53] C.H.J.T. Dietz, J.T. Creemers, M.A. Meuleman, C. Held, G. Sadowski, M. van Sint Annaland, F. Gallucci, M.C. Kroon, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7 (2019) 4047-4057.
- [54] M.W. Beijerinck, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, G. Fischer, 1896.
- [55] P.A. Albertsson, *Nature*, 182 (1958) 709-711.
- [56] S. Raja, V.R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, V. Ramesh, *Science and Technology*, 1 (2012) 7-16.
- [57] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M.A. Shabbir, H.I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, *Biological Procedures Online*, 18 (2016) 18-21.
- [58] R. Sadeghi, M. Maali, *Polymer*, 83 (2016) 1-11.

- [59] R.R. Soares, A.M. Azevedo, J.M. Van Alstine, M.R. Aires-Barros, *Biotechnology Journal*, 10 (2015) 1158-1169.
- [60] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.D. Rogers, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48 (2003) 1230-1236.
- [61] M.T. Zafarani-Moattar, R. Sadeghi, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 50 (2005) 947-950.
- [62] W. Kunz, J. Henle, B.W. Ninham, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (2004) 19-37.
- [63] K.P. Ananthapadmanabhan, E.D. Goddard, *Langmuir*, 3 (2002) 25-31.
- [64] R.D. Rogers, C.B. Bauer, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 680 (1996) 237-241.
- [65] S.C. Silvério, O. Rodríguez, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55 (2009) 1285-1288.
- [66] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, S.T. Griffin, R.D. Rogers, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38 (1999) 2523-2539.
- [67] X. Yang, Y. Lu, Z. Sun, K. Cui, Z. Tan, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 63 (2018) 625-634.
- [68] S. Rubio, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412 (2020) 6037-6058.
- [69] C. Caballo-Linares, M.D. Sicilia, S. Rubio, Supramolecular Solvents for Green Chemistry. Chapter in book: *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier, (2017) 111-137.
- [70] F.M. Menger, A.V. Peresyphkin, K.L. Caran, R.P. Apkarian, *Langmuir*, 16 (2000) 9113-9116.
- [71] H.W. D. Fennell Evans, *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, 2 ed., Wiley-VCH, 1999.
- [72] A. Ballesteros-Gomez, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 530-539.
- [73] D.R.T. Jonathan W. Steed, Karl J. Wallace, *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*, John Wiley & Sons, 2007.
- [74] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 4519-4526.
- [75] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24 (1993) 133-177.
- [76] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 7473-7484.
- [77] O. Glatter, G. Fritz, H. Lindner, J. Brunner-Popela, R. Mittelbach, R. Strey, S.U. Egelhaaf, *Langmuir*, 16 (2000) 8692-8701.
- [78] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 2520-2525.

- [79] K.E. Gutowski, G.A. Broker, H.D. Willauer, J.G. Huddleston, R.P. Swatloski, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003) 6632-6633.
- [80] A. Basaiahgari, R.L. Gardas, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27 (2021) 100423.
- [81] M.T. Zafarani-Moattar, S. Hamzehzadeh, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55 (2010) 1598-1610.
- [82] S. Shahriari, C.M. Neves, M.G. Freire, J.A. Coutinho, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 7252-7258.
- [83] M.G. Freire, C.L.S. Louros, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, *Green Chemistry*, 13 (2011) 1536.
- [84] B. Jamehbozorg, R. Sadeghi, *Journal of Molecular Liquids*, 255 (2018) 476-491.
- [85] S. Noshadi, R. Sadeghi, *The Journal of Physical Chemistry B*, 121 (2017) 2650-2664.
- [86] N.J. Bridges, K.E. Gutowski, R.D. Rogers, *Green Chemistry*, 9 (2007) 177-183.
- [87] C.M. Neves, S.P. Ventura, M.G. Freire, I.M. Marrucho, J.A. Coutinho, *The Journal of Physical chemistry B*, 113 (2009) 5194-5199.
- [88] Q. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, X. Ding, J. Chen, K. Xu, *The Analyst*, 139 (2014) 2565-2573.
- [89] W. Guo, J. Ma, Y. Wang, J. Han, Y. Li, S. Song, *Thermochimica Acta*, 546 (2012) 8-15.
- [90] F.O. Farias, H. Passos, M.G. Sanglard, L. Igarashi-Mafra, J.A.P. Coutinho, M.R. Mafra, *Separation and Purification Technology*, 200 (2018) 84-93.
- [91] E.A. Oke, S.P. Ijardar, *Journal of Molecular Liquids*, 375 (2023) 121372.
- [92] M. Baghlani, R. Sadeghi, *Polymer*, 143 (2018) 115-128.
- [93] E.A. Oke, S.P. Ijardar, *Biochemical Engineering Journal*, 176 (2021) 108211.
- [94] Y. Wang, Y. Yan, S. Hu, J. Han, X. Xu, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55 (2009) 876-881.
- [95] Y. Lu, T. Hao, S. Hu, J. Han, Z. Tan, Y. Yan, *Thermochimica Acta*, 568 (2013) 209-217.
- [96] Y. Li, Y. Zhao, R. Huang, Q. Cui, X. Lu, H. Guo, *Journal of Molecular Liquids*, 211 (2015) 924-933.
- [97] J. Chen, Y. Zhong, J. Han, M. Su, X. Shi, *Fluid Phase Equilibria*, 397 (2015) 50-57.
- [98] A. Kabir, M. Locatelli, H. Ulusoy, *Separations*, 4 (2017) 36.

- [99] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.
- [100] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 1382-1399.
- [101] A. Kamal El-Deen, H. Elmansi, F. Belal, G. Magdy, *Microchemical Journal*, 191 (2023) 108807.
- [102] H. Ma, Y. Li, H. Zhang, S.M. Shah, J. Chen, *Journal of Chromatography A*, 1358 (2014) 14-19.
- [103] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, *Talanta*, 80 (2010) 2057-2062.
- [104] P.P. Zhang, Z.G. Shi, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Talanta*, 83 (2011) 1711-1715.
- [105] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, *Journal of Chromatography. A*, 1190 (2008) 27-38.
- [106] R. Heydari, S. Zarabi, *Analytical Methods*, 6 (2014) 8469-8475.
- [107] F. Barzegar, N. Omid, M. Kamankesh, A. Mohammadi, R. Ferdowsi, S. Jazaeri, *Analytical Methods*, 11 (2019) 942-949.
- [108] K. Abdi, M. Ezoddin, N. Pirooznia, *Microchemical Journal*, 157 (2020) 104999.
- [109] M. Saraji, M.K. Boroujeni, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2027-2066.
- [110] L. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, *Microchemical Journal*, 102 (2012) 11-17.
- [111] M.A. Farajzadeh, S.E. Seyedi, M.S. Shalamzari, M. Bamorowat, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 3191-3200.
- [112] L. Guo, H.K. Lee, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5040-5046.
- [113] M.I. Leong, S.D. Huang, *Journal of Chromatography. A*, 1211 (2008) 8-12.
- [114] F.R. Mansour, N.D. Danielson, *Talanta*, 170 (2017) 22-35.
- [115] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, *Journal of Chromatography. A*, 1216 (2009) 885-891.
- [116] J. Feng, H.M. Loussala, S. Han, X. Ji, C. Li, M. Sun, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 125 (2020) 115833.
- [117] D.C. de Andrade, S.A. Monteiro, J. Merib, *Advances in Sample Preparation*, 1 (2022) 100007.
- [118] M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, M. Aghanassab, *Analytical Methods*, 8 (2016) 2576-2583.
- [119] W. Lu, S. Liu, Z. Wu, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52 (2022) 504-518.

- [120] R.A. Zounr, M. Tuzen, M.Y. Khuhawar, *Journal of Molecular Liquids*, 242 (2017) 441-446.
- [121] D. Ge, Y. Gao, Y. Cao, E. Dai, L. Yuan, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, (2020).
- [122] M. Gupta, A. Jain, K.K. Verma, *Talanta*, 80 (2009) 526-531.
- [123] S.G. Dmitrienko, V.V. Apyari, M.V. Gorbunova, V.V. Tolmacheva, Y.A. Zolotov, *Journal of Analytical Chemistry*, 75 (2020) 1371-1383.
- [124] H. Sereshti, M. Khosraviani, M. Sadegh Amini-Fazl, *Talanta*, 121 (2014) 199-204.
- [125] B.T. Roen, S.R. Sellevag, E. Lundanes, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 11833-11840.
- [126] M. Gupta, A. Dsouza, *Journal of Food Composition and Analysis*, 87 (2020) 103396.
- [127] I.A. Abdallah, S.F. Hammad, A. Bedair, F.R. Mansour, *Journal of Separation Science*, 44 (2021) 3117-3125.
- [128] Y. Bazel, M. Rečlo, Y. Chubirka, *Microchemical Journal*, 157 (2020) 105115.
- [129] S.K. Shahvandi, M.H. Banitaba, H. Ahmar, *Talanta*, 184 (2018) 103-108.
- [130] X. Di, Z. Zhang, Y. Yang, X. Guo, *Microchemical Journal*, 171 (2021) 106868.
- [131] A. Pochivalov, C. Vakh, S. Garmonov, L. Moskvina, A. Bulatov, *Talanta*, 209 (2020) 120587.
- [132] A.M. Ramezani, R. Ahmadi, Y. Yamini, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 149 (2022) 116566.
- [133] S. Babaei, A. Daneshfar, R. Sahraei, *Analytical Methods*, 11 (2019) 1663-1670.
- [134] A. Shishov, R. Chroma, C. Vakh, J. Kuchar, A. Simon, V. Andruch, A. Bulatov, *Analytica Chimica Acta*, 1065 (2019) 49-55.
- [135] M. Sajid, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 152 (2022) 116636.
- [136] S.F. Hammad, I.A. Abdallah, A. Bedair, F.R. Mansour, *Journal of Separation Science*, 45 (2022) 185-209.
- [137] M.I. Leong, M.R. Fuh, S.D. Huang, *Journal of Chromatography A*, 1335 (2014) 2-14.
- [138] M. Rezaei, Y. Yamini, M. Faraji, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2342-2357.
- [139] B.J. VanMiddlesworth, J.G. Dorsey, *Journal of Chromatography A*, 1236 (2012) 77-89.
- [140] J. Layne, T. Farcas, I. Rustamov, F. Ahmed, *Journal of Chromatography A*, 913 (2001) 233-242.

- [141] S. Keunchkarian, M. Reta, L. Romero, C. Castells, *Journal of Chromatography A*, 1119 (2006) 20-28.
- [142] M.M. Nejati, M.G. Khaledi, *Langmuir*, 31 (2015) 5580-5589.
- [143] M. Azizi, S. Tasharofi, A. Koolivand, A. Oloumi, H. Rion, M.G. Khaledi, *Journal of Chromatography A*, 1655 (2021) 462483.
- [144] S.I. Jenkins, C.M. Collins, M.G. Khaledi, *Langmuir*, 32 (2016) 2321-2330.
- [145] J.C. Roy, S. Das, M.N. Islam, *Journal of Solution Chemistry*, 48 (2019) 758-773.

SUMMARY

INTRODUCTION

Sample preparation is the most important step of any chemical analysis. Sample matrix cleanup, analyte enrichment, or conversion of analytes to instrument-compatible derivatives can be the main objectives of sample preparation. Liquid-liquid extraction (LLE) is one of the oldest and still among the most popular techniques in the preparation of aqueous samples for analysis. In conventional LLE, hydrophobic sample constituents are extracted from aqueous samples with a water-immiscible organic solvent, such as hexane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform and some others. However, this technique presents several disadvantages, such as the consumption of large solvent volumes, laborious and time-consuming procedures, and colossal waste generation.

In the past decades, there has been an increasing and fully justified emphasis on the miniaturization of traditional LLE technique. Several microextraction techniques, such as single drop microextraction, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) with its various modifications and some others have been introduced as alternatives to traditional LLE sample preparation procedure. The main advantages of the miniaturized extraction methods are the high sample throughput, ease of operation, low costs, small sample amounts required and extremely low solvent consumption.

DLLME, introduced in 2006, is, perhaps, the most popular microextraction technique used in the last decade. A mixture of hydrophobic extraction and hydrophilic disperser solvents is quickly injected into the aqueous sample in its basic design. This leads to cloud formation due to the dispersion of fine droplets throughout the aqueous phase. Obtained extract is then separated through centrifugation and introduced to an analytical instrument for determination. One of the weakest aspects of conventional LLE as well as miniaturized its techniques is the limited number of the effective extraction solvents. The lack of suitable solvents is especially important in DLLME in which low viscosity and denser than water solvents are preferred. In addition, the limited polarity range of the extraction solvents restricts their use for the extraction of more hydrophilic compounds.

Over the last two decades, several new classes of solvents, such as ionic liquids, deep eutectic solvents, and aqueous two-phase systems (ATPS), have been designed and introduced in LLE and miniaturized its techniques as alternatives to traditional organic solvents. Although these alternative solvents have potential for the extraction of compounds covering a wide polarity range,

they also present certain limitations. Most of the solvents proposed so far are non-volatile, lighter than water, and highly viscous liquids. Due to their low volatility, they are incompatible with gas chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry techniques. Solvents lighter than water remain are difficult to collect after the phase separation. Finally, their high viscosity hinders the mass transfer between phases resulting in lower extraction efficiency and makes difficult to handle the extracts prior to analysis. Thus, the search for new extraction solvents with valuable physicochemical properties is of great importance.

The aim of this study was to design and investigate a series of new water-immiscible solvents based on perfluorinated compounds as well as to apply the solvents for microextraction of selected organic compounds.

The following tasks were formulated:

1. To synthesize and characterize six hydrophobic eutectic solvents consisted of menthol, tetrabutylammonium chloride, or tetrahexylammonium chloride as hydrogen-bond acceptors and hexafluoroisopropanol or trifluoroacetic acid as hydrogen-bond donors.
2. To design and investigate eight hydrophobic supramolecular solvents consisted of quaternary ammonium salts as amphiphiles and hydrophilic perfluorinated compounds as coacervation-inducing agents.
3. To develop a new hexafluoroisopropanol/acetonitrile based aqueous two-phase system.
4. To evaluate extraction properties of the solvents and to apply them for microextraction of selected organic compounds.

NOVELTY OF THE WORK

All designed and investigated solvents have not previously been described. Hexafluoroisopropanol based aqueous two-phase systems are a first novel type systems formed from two hydrophilic organic solvents.

STATEMENTS FOR DEFENCE

1. Eutectic solvents composed of menthol, tetrabutylammonium chloride or tetrahexylammonium chloride as hydrogen-bond acceptors and trifluoroacetic acid or hexafluoroisopropanol as hydrogen-bond donors are hydrophobic, denser than water, and exhibit low to moderate viscosities.
2. Hydrophilic perfluorinated compounds induce formation of water-immiscible denser than water supramolecular solvent in aqueous solutions of quaternary ammonium salts.

3. Hydrophilic aprotic solvents induce the formation of aqueous two-phase system in aqueous solution of hexafluoroisopropanol.
4. Hexafluoroisopropanol/acetonitrile based aqueous two-phase system exhibits exceptionally good extractability of neutral and even charged basic compounds.
5. Developed solvents are very promising alternative extractants for liquid-liquid microextraction of organic compounds.

I. EXPERIMENTAL

Chromatographic separations were performed on an Agilent 1290 Infinity II LC system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a ternary pump, thermostatted column compartment, photodiode array detector and autosampler. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 150 mm, 2.7 μm, Agilent) column, maintained at 25 °C was used in the experiments. Separations were performed at a flow rate of 0.5 mL/min with ACN/water mobile phases. The injection volume was 10 μL. Data acquisition was performed by Agilent OpenLAB CDS software.

For the extraction experiments, 5.0-7.5 mL of aqueous solution was placed into a 10 mL glass centrifuge tube and specified amounts of appropriate compounds were added. The mixture was shaken manually for 1-60 s, resulting in the formation of emulsion. Then, the phases were separated by centrifugation at 3000 rpm for 5 min.

The extraction efficiency (EE) of each analyte was calculated according to the following equation:

$$EE(\%) = \frac{c_i - c_f}{c_i} \times 100\%$$

where c_i is the initial concentration of the analyte in the aqueous phase before the extraction and c_f is the analyte concentration in the aqueous phase after the extraction. The final concentrations of the analytes in the aqueous phase were measured using HPLC technique.

All measurements were performed in triplicate and the mean values are reported.

II. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Hydrophobic eutectic solvents based on perfluorinated compounds

In this part, six hydrophobic eutectic solvents (HESs) composed of menthol, tetrabutylammonium chloride and tetrahexylammonium chloride as hydrogen-bond acceptors (HBAs) and trifluoroacetic acid and hexafluoroisopropanol as hydrogen-bond donors (HBDs) were prepared and investigated.

Synthesis and characterization. HESs were prepared by mixing the components in a 1:2 molar ratio. This mixture was subsequently stirred at ~60 °C until (~30 min) a homogeneous liquid was obtained and then cooled to room temperature. The composition and abbreviations of the prepared HESs are presented in Table 1.

Table 1. Composition and abbreviations of the HESs studied.

HBA	HBD	Abbreviation
Tetrabutylammonium chloride	Hexafluoroisopropanol	TBACl:HFIP
Tetrahexylammonium chloride	Hexafluoroisopropanol	THACl:HFIP
Menthol	Hexafluoroisopropanol	Men:HFIP
Tetrabutylammonium chloride	Trifluoroacetic acid	TBACl:TFA
Tetrahexylammonium chloride	Trifluoroacetic acid	THACl:TFA
Menthol	Trifluoroacetic acid	Men:TFA

Densities and viscosities of the prepared HESs were measured at 25 °C and the results are depicted in Table 2. The densities are within the range of 1.094 to 1.237 g/mL, which is considerably higher than found for most HESs and water. As mentioned in the Introduction, densities higher than water are preferred for DLLME techniques. The high densities of the HESs can be explained by the high densities of both fluorinated hydrogen-bond donors used to prepare the HESs (TFA - 1.535 g/mL; HFIP - 1.596 g/mL). As expected, density is correlated with the density of hydrogen-bond donor: higher density values were observed for HESs contained heavier HFIP.

Moreover, both TBACl-based liquids have higher densities than corresponding those containing THACl.

Low viscosity extractants are generally preferred for the higher mass transfer rate resulting in improved extraction efficiency. However, most of the HESs exhibit relatively high viscosities (>100 mPa·s) at room temperature as a result of the extended hydrogen-bonding network. As can be seen in Table 2, the four quaternary ammonium salt-based HESs presented here have moderate viscosities varying between 46.4 and 70.6 mPa·s. In contrast to the density, higher viscosities are obtained for liquids containing quaternary ammonium salt with longer alkyl chain. The viscosities of both menthol-based liquids are over an order of magnitude lower than those containing quaternary ammonium salts and comparable to common organic hydrophobic solvents.

Table 2. Density and viscosity values (at 25 °C) of the HESs.

HES	Density (g/mL)	Viscosity (mPa·s)
Men:TFA	1.136	2.95
TBACl:TFA	1.159	46.4
THACl:TFA	1.094	65.8
Men:HFIP	1.228	4.57
TBACl:HFIP	1.237	51.2
THACl:HFIP	1.168	70.6

Extraction properties. The suitability of the solvents for DLLME was tested for the extraction of phthalates, parabens, and flavonoids from model aqueous solutions. However, the TBACl:TFA solvent formed a white precipitate after shaking with water and, consequently, it was not further investigated. The results obtained for the compounds tested are presented in Table 3. As can be seen, the extraction efficiencies of the HESs increase in the following order: Men:TFA < TBACl:HFIP ≤ Men:HFIP < THACl:TFA ≈ THACl:HFIP. The highest extraction efficiencies (≥90%) for all analytes were obtained using both THACl-based solvents.

As expected, for all analytes their EE values showed good correlation with their log *P* values, indicating that hydrophobicity plays a crucial role in the extraction of these compounds from aqueous solutions.

In general, under employed extraction conditions four developed hydrophobic eutectic solvents (except for Men:TFA) demonstrated considerably better overall extraction efficiency than conventional chlorinated

solvents. Therefore, these solvents may be considered as the alternative promising extractants for liquid-liquid microextraction techniques.

Table 3. Extraction efficiencies of model analytes from aqueous solutions using different extraction solvents.

Analyte	log <i>P</i>	EE ± σ, (%; n = 3)				
		Men: TFA	THACl: TFA	Men: HFIP	TBACl: HFIP	THACl: HFIP
MeP	1.96	29.4±0.6	97.4±1.8	86.7±2.1	75.3±1.5	95.8±1.2
EtP	2.47	48.7±1.3	98.5±2.2	95.5±1.8	91.5±2.0	98.9±1.9
PrP	3.04	75.2±1.2	98.3±1.9	98.6±1.7	96.7±1.8	98.5±1.7
BuP	3.57	91.3±1.8	98.1±1.6	99.0±2.6	98.5±1.7	≥99
DMP	1.60	28.6±0.5	91.0±1.8	44.8±0.8	69.0±1.0	93.6±2.2
DEP	2.42	54.8±1.2	98.4±1.5	69.9±0.7	97.4±2.2	98.6±1.8
DBP	4.50	96.0±1.9	≥99	95.7±1.5	≥99	≥99
Quer	1.82	6.7±0.2	96.1±1.8	76.8±0.8	56.3±0.9	98.8±2.0
Form	2.88	57.0±0.8	98.4±1.4	94.4±1.8	92.2±1.6	97.6±1.8
Bioch	3.22	90.5±1.5	97.7±2.0	98.4±2.3	91.9±1.8	98.2±1.8

DLLME of parabens. Based on the above results, THACl:TFA solvent was selected for the DLLME of parabens from real water samples combining DLLME with HPLC analysis. Naphthalene was used as an internal standard. The effect of THACl:TFA volume on the extraction efficiency of parabens and naphthalene is shown in Fig. 1. In this experiment various volumes of extractant (30, 40, 50, 75 and 100 μL) were added to a 5 mL of aqueous sample spiked at 2.5 mg/L of each analyte and internal standard. As can be seen, by decreasing THACl:TFA volume up to 50 μL higher than 95% extraction efficiencies were obtained for all five compounds. Based on these results, 50 μL of THACl:TFA volume was selected for subsequent experiments.

The effect of extraction time on the extraction efficiency was studied over the range of 1-60 s. The results showed that no significant difference in the extraction efficiency of all compounds was observed in the time range studied. The final extraction conditions were as follows: the aqueous sample volume - 5 mL, extractant volume - 50 μL, extraction time - 5 s.

The analytical performance of the DLLME-HPLC method was investigated under the optimized extraction conditions. The results are summarized in Table 4. The limits of detection (LODs) and limits of

quantification (LOQs), calculated based on signal to noise ratios of 3 and 10, respectively. Enrichment factors for all studied parabens were around 70.

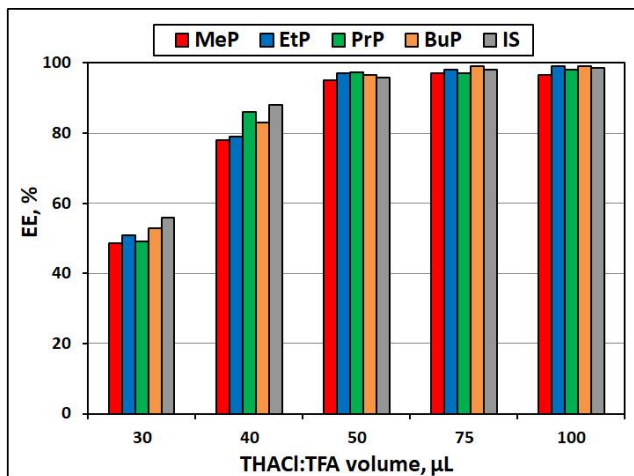


Fig. 1. Effect of THACl:TFA volume on the extraction efficiency of parabens and internal standard (naphthalene).

Table 4. Analytical performance characteristics of the developed DLLME-HPLC method (n = 3).

Analyte	Linear range (µg/L)	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
MeP	1.0 – 500	0.9991	0.44	1.44
EtP	1.0 – 500	0.9984	0.50	1.65
PrP	1.0 – 500	0.9979	0.46	1.60
BuP	1.0 – 500	0.9970	0.58	1.92

Finally, the developed method was applied for the determination of parabens in three samples of effluent waters from the main wastewater treatment plant of Vilnius. Only MeP in two samples was detected, but its concentration was below the LOQ. Recovery studies were performed by spiking samples with two concentration levels (5 and 20 µg/L) of parabens. Average recoveries of spiked samples were in the range from 84% to 104% with satisfactory precision (RSDs lower than 7.5%). The chromatograms of the unspiked and spiked wastewater samples are shown in Fig. 2. The obtained results indicate that the developed method is a promising alternative for the rapid enrichment and determination of parabens in aqueous samples.

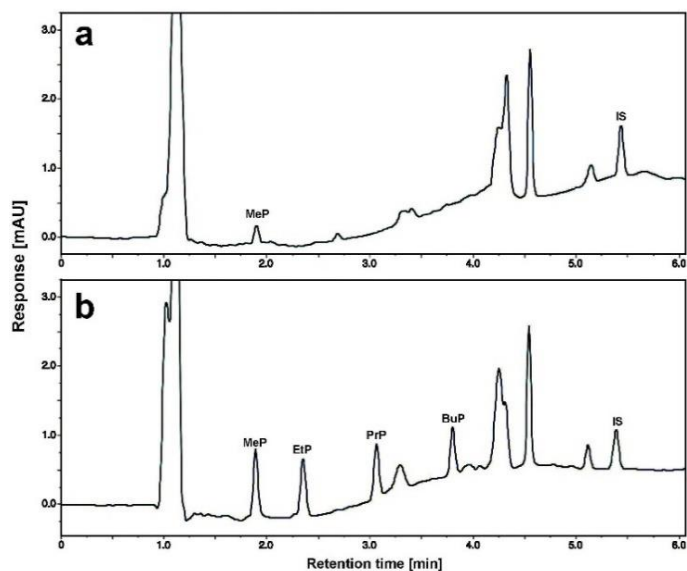


Fig. 2. Chromatograms of the (a) unspiked and (b) spiked with 5 $\mu\text{g/L}$ of parabens wastewater sample. Conditions: mobile phase – ACN/water, linear gradient from 50% ACN to 100% ACN in 6 min.

2.2. Supramolecular solvents based on quaternary ammonium salts and perfluorinated compounds

In the second part, eight hydrophobic supramolecular solvents (SUPRA) composed of tetrabutylammonium chloride and tetradecyltrimethylammonium bromide (TDTMAB) as amphiphiles and four perfluorinated compounds (hexafluoroisopropanol, trifluoroacetic acid, pentafluoropropionic acid (PFPA), and heptafluorobutyric acid (HFBA)) as coacervation-inducing agents were investigated.

In situ formation of SUPRA solvents. The *in-situ* SUPRA phase formation procedure is illustrated in Fig. 3. Specifically, 5.0 mL of aqueous sample was placed into a glass centrifuge tube, and specified amounts of quaternary ammonium salt solution and perfluorinated compound were sequentially added. The mixture was shaken manually for 30 s, resulting in the formation of emulsion. The phases were separated by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and the volume of SUPRA phase was measured using a microsyringe.

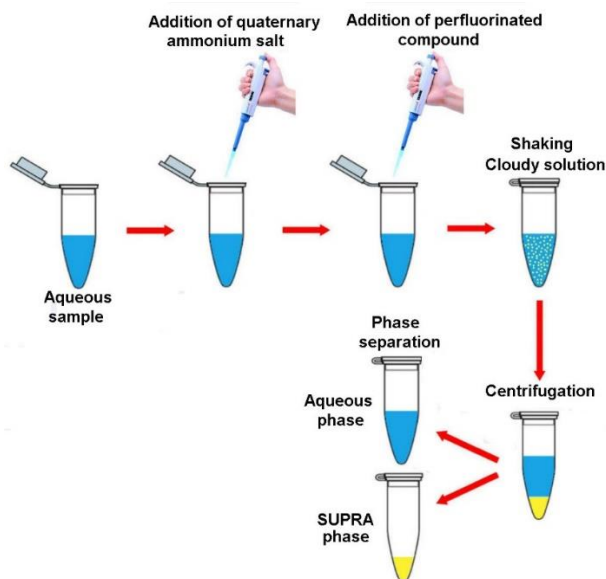


Fig. 3. Schematic of a SUPRA solvent *in-situ* formation procedure.

In the DLLME techniques target analytes usually are extracted from 5-10 mL of water samples using small volumes (50-100 μL) of extraction solvents. In the present work the extraction solvent was formed *in situ*. Therefore, it is important to know what concentrations of SUPRA components generate required solvent volumes. For this reason, the effects of quaternary ammonium salt and perfluorinated compound concentrations on the volume of the formed SUPRA phase were investigated. Fig. 4 shows the effects of TBAC and TDTMAB concentration on the volume of the formed SUPRA phase. As expected, for all systems, the SUPRA phase volume increases gradually as the concentration of quaternary ammonium salt increases from 5 to 100 mmol/L. The increase in SUPRA volume with surfactant concentration is indicative of a growth of the SUPRA phase that is in a bilayered bicontinuous structure rather than in discrete structures such as micelles. Increasing the quaternary ammonium salt concentration would simply make the structure larger, as opposed to more densely packed. In both TBAC and TDTMAB based systems, the HFIP induced much larger SUPRA phase volumes than the perfluorinated acids at comparable amounts. This may be attributed to the different charge state of perfluorinated compounds: alcohol has a net charge of zero, whereas strong acids present in an anionic form. Although the structures of these phases are not known at this point, one can assume that the oppositely charged quaternary ammonium cation-perfluorinated acid anion would form tighter assemblies resulting in lower

volumes. It is worth noting that for the TBAC salt (Fig. 4a) perfluorinated acids with longer fluoroalkyl chain induce larger SUPRA volumes, whereas for the TDTMAB (Fig. 4b) this phenomenon was not observed. However, the exact reason for this behaviour is not clear.

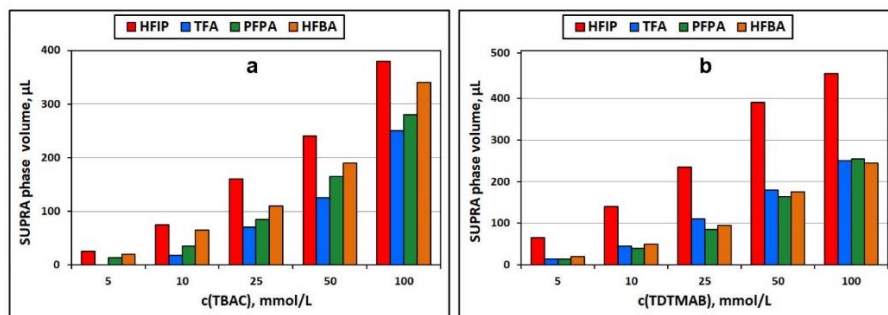


Fig. 4. Effect of TBAC (a) and TDTMAB (b) concentration on the SUPRA phase volume. Aqueous phase volume – 5 mL; amount of perfluorinated compound – 5 mmol.

Fig. 5a depicts the behavior when a fixed concentration of TBAC salt is combined with increased amounts of appropriate perfluorinated compound. The volume of the TBAC/HFIP phase increased gradually with increasing HFIP amount in the range of 1-5 mmol. In contrast, the SUPRA phase volume remains almost constant for TBAC/HFBA, TBAC/PFPA, and TBAC/TFA systems within the range of 2-5, 3-5, and 4-5 mmol of appropriate perfluorinated acid, respectively. At lower amounts of perfluorinated acid, all three mixtures form white precipitates. The initial amount of acid that is needed to form SUPRA phase decreases in the following order: TFA > PFPA > HFBA. This indicates that the SUPRA phase formation ability of perfluorinated acids with longer fluoroalkyl chain is more efficient.

Fig. 5b illustrates the behaviour when TDTMAB is combined with different amounts of perfluorinated compounds. As the amount of appropriate perfluorinated compound increases from 1 to 5 mmol, the volume of TDTMAB/HFIP and TDTMAB/PFPA phases first decreases, and then gradually increases (for TDTMAB/HFIP) or remains almost unchanged (for TDTMAB/PFPA). The volume of TDTMAB/HFBA phase formed was nearly unaffected by the varied amount of HFBA. Finally, as in the case of TBAC/TFA system, for the TDTMAB solution, the minimum amount of TFA required to form SUPRA phase is 4 mmol.

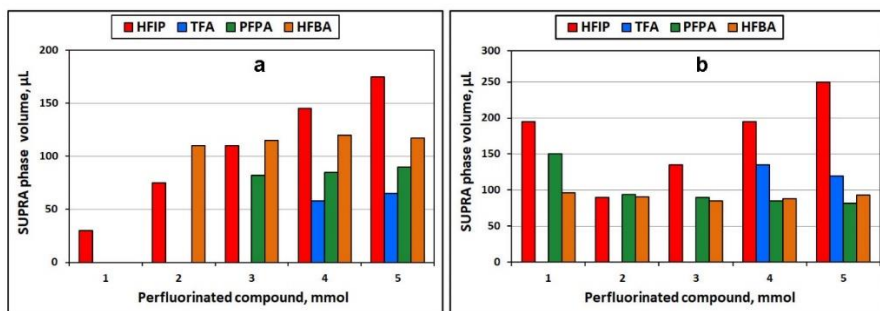


Fig. 5. Effect of perfluorinated compound amount on the SUPRA phase volume for TBAC (a) and TDTMAB (b) amphiphiles. Aqueous phase volume – 5 mL; concentration of the quaternary ammonium salt – 25 mmol/L.

Obtained results show that there are some differences among the two quaternary ammonium salts. One possible reason for such differences could be attributed to different initial states of these salts in aqueous solution. In the concentration range used TDTMAB forms micelles (critical micelle concentration – 3.6-3.7 mmol/L), whereas TBAC exists in the non-micellar state. Additional information about the exact structures of these phases is needed to achieve a better understanding of the involved mechanisms. However, a detailed investigation of these effects is beyond the scope of this study.

DLLME of phthalates. The suitability of the SUPRA solvents for DLLME was tested for the extraction of four phthalates from model aqueous solutions. The comparison of the extraction properties of different solvents should be performed under identical conditions, i.e., using equal or at least similar extraction solvent volumes. For each SUPRA solvent we have selected such amounts of both SUPRA compounds that gave the final solvent volume of $150 \pm 10 \mu\text{L}$.

The obtained results are presented in Table 5. In general, under employed extraction conditions all developed SUPRA solvents demonstrated good or even excellent overall extraction efficiency. Both TFA-based solvents were found to be least effective extractants: the extraction of the most hydrophilic DMP reached efficiencies of 58.9 and 70.2% for TDTMAB/TFA and TBAC/TFA, respectively. Finally, TDTMAB/HFIP solvent demonstrated the best extractability: using this solvent all phthalates were extracted with higher than 94% extraction efficiencies.

Table 5. Extraction efficiencies of phthalates (1.0 mg/L) from aqueous solution using different SUPRA solvents (aqueous sample volume - 7.5 mL; SUPRA volume - 150±10 µL; extraction time – 30 s).

SUPRA solvent	EE ± σ, (%; n = 3)			
	DMP	DEP	DBP	DEHP
TBAC/HFIP	87.3 ± 1.6	96.3 ± 1.9	97.1 ± 2.2	>98
TBAC/TFA	70.2 ± 1.3	93.6 ± 2.2	>98	>98
TBAC/PFPA	74.8 ± 1.2	95.0 ± 2.4	>98	>98
TBAC/HFBA	73.2 ± 1.7	94.6 ± 2.2	>98	>98
TDTMAB/HFIP	94.0 ± 1.8	97.5 ± 2.0	>98	>98
TDTMAB/TFA	58.9 ± 1.3	92.3 ± 1.8	>98	>98
TDTMAB/PFPA	73.4 ± 1.6	94.2 ± 1.9	>98	>98
TDTMAB/HFBA	78.7 ± 1.5	95.9 ± 2.3	>98	>98

Based on the above results, TDTMAB/HFIP solvent was selected for the DLLME of phthalates from real water samples combining DLLME with HPLC analysis. Naphthalene was used as an internal standard. In order to obtain high enrichment factors, the volume ratio of extraction solvent to sample solution should be minimized. For this reason, the effect of TDTMAB/HFIP solvent volume on the extraction efficiency of phthalates and naphthalene was investigated and the obtained results are presented in Table 6. To obtain required solvent volumes, different amounts of TDTMAB and HFIP were added to a 7.5 mL of aqueous sample spiked at 1.0 mg/L of each phthalate and internal standard. As can be seen, by decreasing SUPRA solvent volume up to 50 µL higher than 95% extraction efficiencies were obtained for all five compounds. Based on these results, 50 µL of TDTMAB/HFIP volume was selected for subsequent experiments.

Table 6. Effect of TDTMAB/HFIP volume on the extraction efficiency of phthalates and internal standard (aqueous sample volume - 7.5 mL; extraction time – 30 s).

Solvent volume (μL)	EE ± σ, (%; n = 3)				
	DMP	DEP	DBP	DEHP	IS
200	96.0±1.9	>98	>98	>98	>98
150	96.9±2.2	97.6±1.9	>98	>98	97.8±2.2
90	95.8±1.5	96.0±2.1	>98	>98	97.2±2.4
50	95.5±2.0	95.6±1.9	>98	>98	96.7±1.8
25	76.6±1.6	81.2±1.5	96.6±1.9	97.0±2.3	90.5±1.9

Next, the effect of extraction time on the extraction efficiency was studied over the range of 1-30 s. No significant difference in the extraction efficiency of all compounds was observed in the time range studied indicating that the SUPRA solvent-based DLLME is time-independent. The final extraction conditions were as follows: the aqueous sample volume – 7.5 mL, SUPRA extractant volume - 50 μL, extraction time - 5 s.

The analytical performance of the method was investigated under the optimized extraction conditions. The results are summarized in Table 7. Calibration curves were linear for a concentration level between 1.0-2.0 and 50.0 μg/L with the correlation coefficients (R^2) ranging from 0.9965 to 0.9982. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs), calculated based on signal to noise ratios of 3 and 10, respectively, were in the ranges 0.3-0.6 and 1.0-2.0 μg/L. Enrichment factors for all studied phthalates were around 70.

Table 7. Analytical performance characteristics of the developed DLLME-HPLC method (n = 3).

Analyte	Linear range (μg/L)	R^2	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)
DMP	1.0 – 50.0	0.9974	0.3	1.0
DEP	1.0 – 50.0	0.9965	0.3	1.0
DBP	1.0 – 50.0	0.9982	0.4	1.5
DEHP	2.0 – 50.0	0.9971	0.6	2.0

Finally, the developed method was applied for the determination of phthalates in two influent and one effluent (i.e., after treatment) water samples

collected from the main wastewater treatment plant of Vilnius. The influent samples were collected at different days. Only DBP and DEHP in the one influent water sample were detected. Unfortunately, the determination of DMP and DEP was impossible due to interference from co-eluting matrix compounds. Recovery studies were performed by spiking samples with known concentrations of DBP and DEHP. The results are summarized in Table 8. Average recoveries of spiked samples were in the range from 93.1% to 104.4% with satisfactory precision (RSD lower than 7.4%). The chromatograms of the unspiked and spiked influent water sample are shown in Fig. 6. The obtained results indicate that the developed method is a promising alternative for the rapid enrichment and determination of common phthalates in aqueous samples.

Table 8. Results of phthalates from wastewater samples (n = 3).

Sample	Analyte	Found (µg/L)	Added (µg/L)	Recovery (%)	RSD (%)
Influent water 1	DBF	2.9	10.0	104.4	5.9
	DEHF	2.4	10.0	96.7	6.5
Influent water 2	DBF	-	5.0	102.9	6.2
	DEHF	-	5.0	93.1	7.4
Effluent water	DBF	-	5.0	92.6	7.3
	DEHF	-	5.0	89.4	8.1
	DBF	-	10.0	95.5	4.9
	DEHF	-	10.0	97.0	6.7

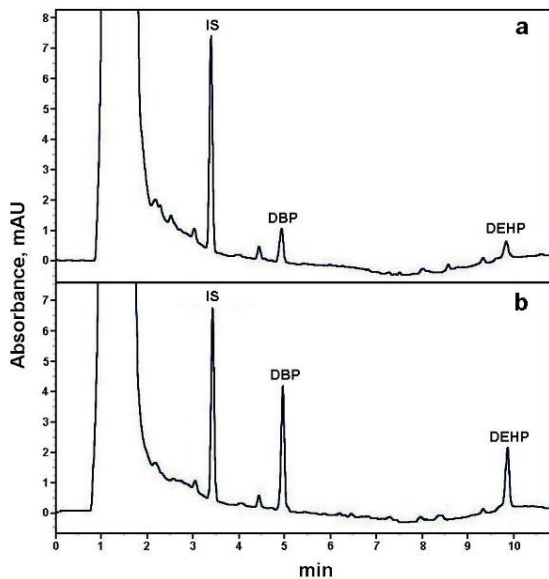


Fig. 6. Chromatograms of the (a) unspiked and (b) spiked with 10.0 $\mu\text{g/L}$ of DBP and DEHP influent wastewater sample.

2.3. New aqueous two-phase system based on hexafluoroisopropanol and acetonitrile

In the third part of the study, a novel HFIP-based aqueous two-phase system (ATPS) using a hydrophilic organic solvent as the phase separation inducing agent was developed.

Selection of ATPS inducing agent. Six hydrophilic solvents, namely acetone, ACN, DMSO, EtOH, MeOH, and THF were initially tested as HFIP-based ATPS inducing agents. In this experiment, different amounts of appropriate solvent were added into a glass centrifuge tube containing 5 mL of water and 0.3 mL of HFIP. The mixture was manually shaken several times, then the phases were separated by centrifugation. No phase separation was observed when protic solvents (MeOH and EtOH) were used as inducing agents. In contrast, all four aprotic solvents induced the formation of ATPS with the aqueous phase at the top and the HFIP-rich phase at the bottom. Although the exact mechanism for this phenomenon is unknown, it is believed that the main driving force of phase separation is competitive hydrogen bonding between water, HFIP, and inducing agent. HFIP is a strong hydrogen bond donor (even stronger than water) but a weak hydrogen bond acceptor. Similarly, both MeOH and EtOH exhibit strong hydrogen bond donating ability while, in contrast, aprotic solvents are strong hydrogen bond acceptors. The hydrogen bonding interaction between HFIP and an aprotic solvent is

stronger than that between HFIP and water. Thus, solvent molecules displace water molecules from the hydration layer of HFIP. In this case, the HFIP molecules likely cluster and even form micelle-like assemblies with the fluorine groups aggregating toward the center of the cluster while oriented at the surface hydroxy groups are solvated by aprotic solvent. Such clusters of HFIP molecules provide a hydrophobic local environment. This results in the formation of the immiscible with water HFIP-rich phase.

Next, the ability of aprotic solvents to induce phase separation was compared. In this experiment, the phase diagrams were determined at 20°C by cloud point titration. Obtained binodal curves (Fig. 7) divide the two-phase region (above the curve) from the single-phase region (below the curve) and provide concentration of both components (HFIP and aprotic solvent) necessary to create a biphasic system.

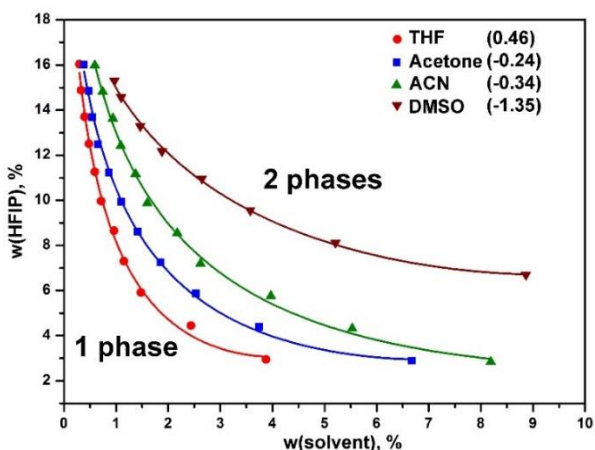


Fig. 7. Phase diagrams for the systems composed of HFIP/aprotic solvent/H₂O. Log P values are given in parentheses.

As shown in Fig. 7, the phase separation ability (lower amount of solvent creates the two-phase system at fixed HFIP concentration) of the solvents increases in the following order: DMSO < ACN < ACE < THF. Obtained results indicate that for all solvents their phase separation ability showed a good correlation with their log P values, given in Fig. 7: less hydrophilic solvents induced phase separation at lower concentrations. Due to ACN excellent compatibility with the mobile phases used in reversed-phase HPLC separations, it was selected as the phase separation agent for further experiments.

Finally, the effect of the ACN amount on the volume of the formed organic phase was investigated. As shown in Fig. 8, the HFIP phase volume

increases gradually as the volume of ACN increases from 0.1 to 0.7 mL and then remains almost unchanged at higher than 0.7 mL volumes.

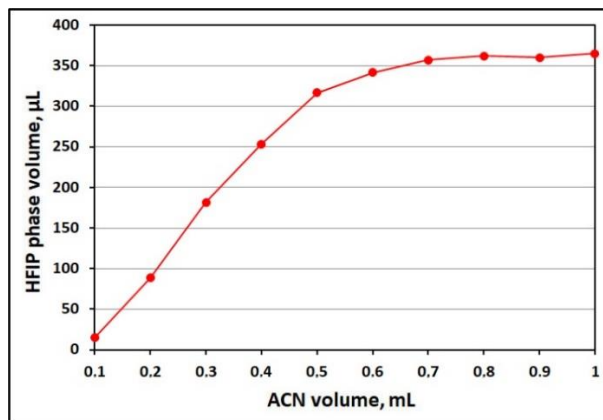


Fig. 8. Effect of ACN volume on the HFIP phase volume. Aqueous phase volume – 5.0 mL; HFIP volume – 0.3 mL.

Extraction properties. To evaluate the extraction properties of the proposed system it was tested for the extraction of various organic compounds from aqueous solutions. Six classes of organic compounds, namely aromatic hydrocarbons, esters, hydroxy esters, amines, phenols and carboxylic acids, were used as model analytes. For all compounds, except for carboxylic acids, the pH values at which extractions were carried out were in the range of 7.0 ± 0.5 . To suppress the dissociation of carboxylic acids, their solutions were acidified with HCl to pH 2.0. The extraction efficiencies for the compounds tested using the proposed ATPS are presented in Table 9. It can be observed that for all analytes among the same class their %EE values showed a good correlation with their log P values, listed in Table 9. These results indicate that hydrophobicity is the key property ruling the extraction efficiency of compounds with the same functional groups. However, there was no correlation between the %EE and hydrophobicity for the analytes of different classes. For example, the extraction efficiencies obtained for compounds possessing similar log P values, quercetin ($\log P=1.82$), methylparaben ($\log P=1.96$), and 2-nitroaniline ($\log P=1.85$), ranged from 21.3% for quercetin to $\geq 98\%$ for 2-nitroaniline. Interestingly, the extraction efficiencies of the most hydrophilic caffeine ($\log P=-0.07$) and nicotine ($\log P=1.17$) were considerably higher than those obtained for much less hydrophilic carboxylic acids, phenol, quercetin, and methylparaben.

In general, the obtained extraction efficiencies for compounds of different classes can be arranged according to the following sequence: amines

> esters \approx aromatic hydrocarbons > hydroxy esters \approx phenols > carboxylic acids. These results indicate that the proposed ATPS is the most effective extractant for basic compounds, less effective for neutral ones, and poorly extracts acidic analytes. Since only the basic analytes are strong hydrogen bond acceptors, this is not surprising. Thus, strong hydrogen bonding interactions with HFIP, which displays a high hydrogen bond donor ability, enhance extraction of basic compounds. The presence of ACN does not appear to have a role in the extraction, other than in generating the ATPS because the same trend was observed for the extraction efficiencies using THF as inducing agent (data not shown).

Table 9. Extraction efficiencies of selected organic compounds (2.0 mg/L) from aqueous solution (aqueous sample volume – 5.0 mL; HFIP volume – 0.3 mL; ACN volume – 0.3 mL; extraction time – 30 s).

Class	Analyte	Log P	EE $\pm \sigma$, (%; n=3)
Aromatic hydrocarbons	Benzene	2.13	86.1 \pm 1.8
	Toluene	2.73	90.3 \pm 1.6
	Naphthalene	3.30	94.7 \pm 2.1
Esters	Dimethyl phthalate	1.60	91.5 \pm 1.5
	Diethyl phthalate	2.42	96.8 \pm 1.9
	Dibutyl phthalate	4.50	\geq 98
Hydroxy esters	Methylparaben	1.96	40.1 \pm 0.6
	Ethylparaben	2.47	57.1 \pm 0.6
	Propylparaben	3.04	77.6 \pm 1.3
Amines	Caffeine	-0.07	67.7 \pm 1.4
	Nicotine	1.17	91.8 \pm 1.8
	2-Nitroaniline	1.85	\geq 98
Carboxylic acids	Sorbic	1.33	25.6 \pm 0.9
	Benzoic	1.87	29.2 \pm 0.8
	Salicylic	2.26	38.8 \pm 1.2
Phenols	Phenol	1.46	31.8 \pm 0.7
	Quercetin	1.82	39.7 \pm 0.6
	Biochanin A	3.22	81.3 \pm 1.6

In LLE using traditional organic extractants the neutral form of an analyte usually exhibits better extractability than its less hydrophobic charged form.

The extraction of nicotine ($pK_a=8.1$) at acidic ($pH=3.0$) and alkaline ($pH=11.0$) conditions was examined to prove this to our system. In alkaline aqueous solution nicotine ($pK_a=8.1$) is uncharged, while under acidic conditions it exists in a fully protonated cationic form. The EE for the charged form was found to be 95.7%, compared to 89.4% for the neutral form, indicating comparable or even better extraction of the cationic form. However, this was not observed for the benzoic acid: the %EE obtained for its neutral form at pH 2.0 was approximately 2.5 times higher than that of its anionic form at pH 10.

In order to further explore the role of charge sign of the analyte, we decided to evaluate the extraction efficiency of the two hydrophilic and oppositely charged dyes, namely cationic methylene blue and anionic acid red 1. As shown in Fig. 9, the cationic methylene blue seems to be completely extracted into the bottom HFIP-rich phase whereas the negatively charged acid red 1 almost completely remained in the top aqueous phase.



Fig. 9. Partition behaviour of the oppositely charged dyes.

DLLME of cationic dyes. Developed HFIP/ACN-based ATPS was applied for the DLLME of four cationic dyes - methylene blue (MB), crystal violet (CV), malachite green (MG) and rhodamine B (RB) - from real water samples prior to HPLC analysis. Triphenyltetrazolium was used as an internal standard. Optimized DLLME conditions were as follows: the aqueous sample volume – 7.5 mL, HFIP volume – 0.4 mL, ACN volume – 0.4 mL, extraction time - 5 s. After centrifugation, the HFIP-rich phase was collected using a microsyringe, evaporated to near dryness under stream of nitrogen, redissolved in 50 μ L of the mobile phase and analyzed. Under these

conditions, the obtained extraction efficiencies for all compounds were $\geq 97\%$. The analytical performance characteristics are summarized in Table 10.

Table 10. Analytical performance characteristics (n = 3).

Analyte	Linear range ($\mu\text{g/L}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
MB	0.5–50.0	0.9959	0.60	0.18
CV	0.5–50.0	0.9980	0.50	0.15
MG	0.5–50.0	0.9972	0.50	0.15
RB	0.2–50.0	0.9987	0.15	0.05

Finally, the developed method was applied for the determination of cationic dyes in two Neris river water samples collected within Vilnius city. None of dyes were detected in both samples. Recovery studies were performed by spiking samples with two concentration levels (2 and 10 $\mu\text{g/L}$) of dyes. Average recoveries of spiked samples were in the range from 88.6% to 98.5% with satisfactory precision (RSDs lower than 9,6%).

Compared to conventional ATPSs based on polymers, surfactants, ionic liquids, and deep eutectic solvents, the proposed system has several advantages. The water-immiscible HFIP-rich phase exhibits high volatility, a higher density than water, and low viscosity. All the properties make the ATPS very promising as extractant for conventional liquid-liquid extraction and especially for liquid-liquid microextraction techniques. Finally, since the proposed system shows exceptionally good extractability of relatively hydrophilic neutral and charged basic compounds, it appears to be a very promising selective extractant of such compounds from complex matrices.

CONCLUSIONS

1. Menthol, tetrabutylammonium chloride and tetrahexylammonium chloride form with TFA and HFIP at a molar ratio of 1:2 heavier than water hydrophobic eutectic solvents possessing low to moderate viscosities. The high densities of the solvents can be attributed to the high densities of fluorinated compounds. The viscosities of both menthol-based liquids are over an order of magnitude lower than those containing quaternary ammonium salts.
2. Developed eutectic solvents demonstrated considerably better overall extraction efficiency of parabens, phthalates, and flavonoids than conventional chlorinated solvents. The extraction efficiencies of the

solvents increase in the following order: Men:TFA < TBACl:HFIP \leq Men:HFIP < THACl:TFA \approx THACl:HFIP.

3. HFIP, TFA, PFPA, and HFBA induce formation of hydrophobic, heavier than water SUPRA solvents in aqueous solutions of quaternary ammonium salts. HFIP induced much larger SUPRA solvent volumes than the perfluorinated acids at comparable concentrations. The SUPRA solvent formation ability of perfluorinated acids with longer fluoroalkyl chain is more efficient.
4. The developed SUPRA solvents demonstrated good or even excellent extraction efficiency of phthalates. For all phthalates their extraction efficiency values showed good correlation with their log *P* values. TDTMAB/HFIP solvent demonstrated the best extractability: using this solvent all phthalates were extracted with higher than 94% extraction efficiencies.
5. Hydrophilic aprotic solvents induce the formation of ATPS in aqueous solution of HFIP. It is believed that the main driving force of phase separation is competitive hydrogen bonding between water, HFIP, and inducing agent. The phase separation ability of the solvents increases in the following order: DMSO < ACN < ACE < THF.
6. HFIP/ACN-based ATPS is very effective extractant for neutral and even charged basic compounds, less effective for neutral ones, and poorly extracts acidic analytes. Exceptionally good extractability of basic compounds may be explained by their high hydrogen bond acceptor ability.
7. Developed solvents were applied for the DLLME of parabens, phthalates and cationic dyes from aqueous samples prior to HPLC analysis. The extraction time takes only a few seconds and enrichment factors ranged from \sim 70 for parabens and phthalates to \sim 150 for cationic dyes. The obtained results demonstrate that proposed solvents are very promising alternative extractants for dispersive liquid-liquid microextraction techniques.

CURRICULUM VITAE

ASMENINĖ INFORMACIJA

Vardas, pavardė	Vytautas Kavaliauskas
Gimimo data	1994-09-12
El. paštas	Vyt.kavaliauskas@gmail.com

IŠSILAVINIMAS

2013 – 2017	Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra Chemijos bakalauras ir pedagogo kvalifikacija
2017 – 2019	Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra Chemijos magistras
2019 – 2024	Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra Chemijos doktorantūra

DARBO PATIRTIS

2016 03 – 2017 09	Laborantas, Vilniaus universitetas
2017 09 – 2019 06	Vyresnysis specialistas, Vilniaus universitetas
2018 09 – 2020 08	Metodininkas, Nacionalinė švietimo agentūra
2019 06 – 2021 10	Metodikų rengėjas ekspertas, Vilniaus universitetas
2022 05 – 2023 09	Projekto ekspertas, Vilniaus universitetas
2020 09 – 2022 09	Chemijos mokytojas, Vilniaus Gabijos gimnazija

KITOS VEIKLOS

2014	Nacionalinės jaunųjų chemikų mokyklos „Pažinimas“ pratybų dėstytojas ir egzaminų vertintojas
2014, 2015 ir 2017	Lietuvos chemijos olimpiados respublikinio etapo teorinių užduočių kūrėjas ir vertinimo komisijos narys
2017 – 2023	Lietuvos chemijos olimpiados respublikinio etapo praktinės užduoties kūrėjas ir vertintojas
2017 ir 2022	Baltijos šalių chemijos olimpiados praktinės užduoties kūrėjas ir vertintojas
2017	Egzaminatorius.lt internetinės svetainės chemijos srities užduočių testuotojas
2018	Lietuvos Gamtos mokslų olimpiados užduočių kūrėjas ir vertinimo komisijos narys
2019 ir 2023	Baltijos šalių chemijos olimpiados užduočių kūrėjas ir vertinimo komisijos narys, Lietuvos komandos vadovas
2023	Lietuvos komandos vadovas tarptautinės chemijos olimpiadoje

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai

1. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. Hydrophobic eutectic solvents based on perfluorinated hydrogen bond donors as extractants for dispersive liquid–liquid microextraction. *Chromatographia*, 85 (2022) 255-262. doi.org/10.1007/s10337-022-04129-z
2. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. Supramolecular solvents based on quaternary ammonium salts and perfluorinated compounds for dispersive liquid-liquid microextraction of phthalates. *Chemija*, 33 (4) (2022) 103-112. doi.org/10.6001/chemija.v33i4.4808
3. **V. Kavaliauskas**, A. Padarauskas. Aqueous two-phase system based on hexafluoroisopropanol and acetonitrile for homogeneous liquid-liquid microextraction of cationic dyes. *Chemija*, 35 (1) (2024) 1-7. doi.org/10.6001/chemija.2024.35.1.2

Konferencijų tezės

1. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. Novel hydrophobic deep eutectic solvents based on fluorinated hydrogen bond donors. International conference “*Functional Materials and Nanotechnologies FMTN-2020*”, Vilnius, Lithuania, November 23-26, 2020, p. 97.
2. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. Hydrophobic eutectic solvent for liquid-phase microextraction of parabens from water samples. 22nd International scientific conference “*EcoBalt 2021*”, Riga, Latvia, October 21-23, 2021, p. 52.
3. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. In situ formed solvents based on quaternary ammonium salts and perfluorinated compounds for dispersive liquid-liquid microextraction. International Scientific Conference “*Chemistry and Chemical Technology 2022*”, Kaunas, Lithuania, October 14, 2022, p. 184.
4. **V. Kavaliauskas**, V. Olšauskaitė, A. Padarauskas. Investigation of hexafluoroisopropanol-based aqueous biphasic system. International Scientific Conference “*Chemistry and Chemical Technology 2023*”, Vilnius, Lithuania, March 10, 2023, p. 74.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 12 egz.