



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

**Gabrielė Krikščiūnienė**

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**CUKRŲ NUSTATYMAS HIDROFILINĖS SAŲVEIKOS SKYSČIŲ  
CHROMATOGRAFIJOS METODU**

Darbo vadovas  
asist. dr. Vilius Poškus

Vilnius, 2024

# TURINYS

ĮVADAS.....	2
SANTRUMPOS .....	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	4
1.1. Cukrai. Jų nustatymo įvairiuose objektuose ir procesuose svarba.....	4
1.2. Cukrų nustatymo metodai .....	5
1.2.1. Klasikiniai cukrų nustatymo metodai.....	6
1.2.2. Chromatografiniai metodai .....	7
1.3. Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija.....	14
2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA .....	18
2.1. Naudota įranga ir reagentai.....	18
2.2. HILIC metodo sąlygos.....	18
2.3. Kalibracinės kreivės paruošimas .....	18
2.4. Mėginio paruošimas.....	19
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	20
3.1. Optimalių HILIC sąlygų parinkimas .....	20
3.1.1. Judrios fazės parinkimas .....	20
3.1.2. Nejudrios fazės (kolonėlės) parinkimas .....	21
3.1.3. Kolonėlės temperatūros parinkimas .....	22
3.1.4. Mėginio tirpiklio įtakos chromatografiniam atskyrimui tyrimas .....	23
3.1.5. Mėginio paruošimo chromatografiniam tyrimui optimizavimas .....	24
3.2. Kalibracinių kreivių sudarymas .....	25
3.3. Realių mėginių tyrimas HILIC metodu .....	28
IŠVADOS.....	32
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	33
SANTRAUKA.....	38
SUMMARY.....	39

## ĮVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais nuolat didėjantis cukrų suvartojimas kelia rimtą tiek mokslininkų, tiek visuomenės susirūpinimą. Jis siejamas su padidėjusia įvairių sveikatos sutrikimų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, cukrinis diabetas, antsvoris ir nutukimas, dantų kariesas ir net vėžiniai susirgimai, rizika [1]. Todėl labai svarbu nustatyti maisto produktuose esančių cukrų kiekį, siekiant reguliuoti kasdienį jų suvartojimą. Taip pat cukrų kiekio nustatymas būtinas žaliavų, maisto produktų, vaistinių preparatų bei įvairių gamybos procesų kokybei ir saugai kontroliuoti [2]. Dauguma maisto tyrimų laboratorijose atliekamų tyrimų metodų yra skirti tik bendro cukrų kiekio nustatymui, į atskiras analites neatsižvelgiama. Tačiau kiekvienas į bendrą kiekį įeinantis cukrus daro skirtingą įtaką žmogaus sveikatai ar produkto kokybei, pavyzdžiui, fruktozės, kaip saldiklio, vartojimas, didina atsparumo insulinui, metabolinių sutrikimų, hipertrigliceridemijos riziką [3]; žmonės, turintys laktazės fermento išskyrimo sutrikimą, netoleruoja pieno cukraus laktozės [4], todėl yra poreikis paprasto ir efektyvaus metodo, kuriuo būtų galima lengvai nustatinėti atskirų cukrų koncentracijas mėginyje.

Cukrai nustatomi įvairiais klasikiniiais bei chromatografiniais metodais, tačiau dauguma jų turi svarbių trūkumų, pavyzdžiui, klasikiniiais metodais galima nustatyti tik bendrą cukrų kiekį mėginyje, o dujų chromatografijos metodu tiriant cukrus, reikalingas gana ilgas ir sudėtingas mėginio paruošimas [5]. Pastaraisiais metais vis labiau populiarėja hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografijos metodo taikymas, kuris pirmąsyk buvo pasiūlytas mokslininko Alpert ne taip ir seniai – 1990 metais. Šis metodas yra skirtas būtent polinėms analitėms atskirti bei analizuoti ir yra pranašesnis tuo, kad apjungia net tris tradicinius skysčių chromatografijos variantus: atvirkščių fazių, normalių fazių ir jonų mainų chromatografiją [6].

Šio darbo tikslas – parengti metodiką, kuri leistų sėkmingai nustatyti atskirų cukrų kiekį maisto produktuose hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografijos metodu.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti optimalias hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografijos sąlygas;
2. Sukurti optimalią mėginių paruošimo chromatografiniam tyrimui metodiką;
3. Ištirti realius mėginius pagal parengtą metodiką.

## SANTRUMPOS

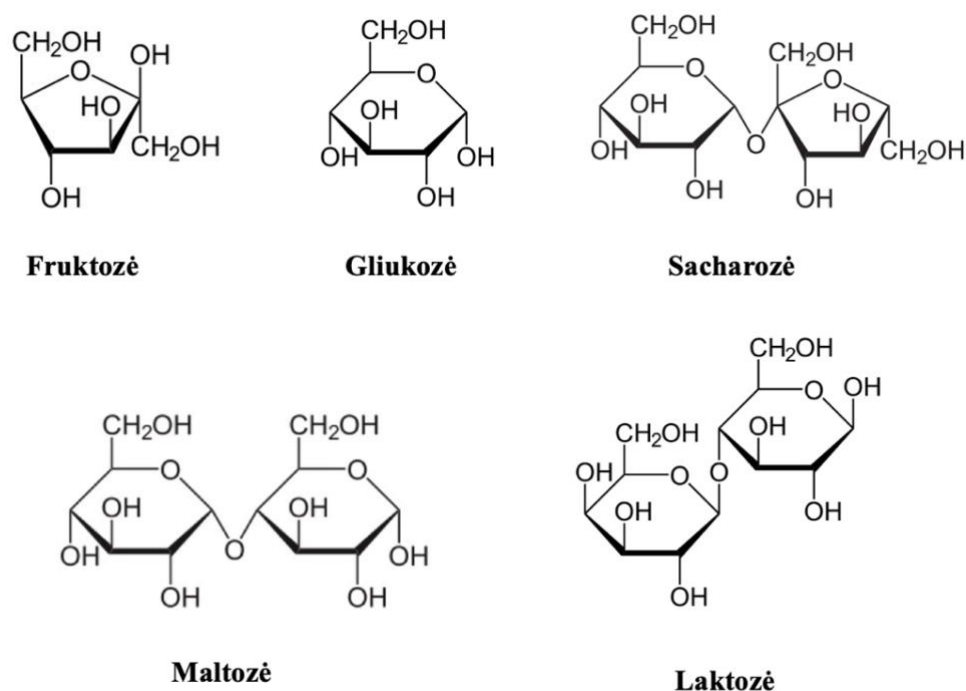
**ACN** – acetonitrilas  
**AED** – atominės emisijos detektorius  
**APCI** – atmosferos slėgio cheminė jonizacija  
**ECD** – elektronų pagavos detektorius  
**ELCD** – elektrolitinio laidumo detektorius  
**ELSD** – šviesos išbarstymo detektorius  
**ESI** – elektropurkštuvinė jonizacija  
**FID** – liepsnos jonizacinis detektorius  
**FLD** – fluorescencinis detektorius  
**FPD** – liepsnos fotometrinis detektorius  
**GC** – dujų chromatografija  
**HILIC** – hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija  
**HPLC** – efektyvioji skysčių chromatografija  
**IEC** – jonų mainų chromatografija  
**MS** – masių spektrometras  
**NPD** – azoto-fosforo detektorius  
**NP- HPLC** – normalių fazių skysčių chromatografija  
**PAD** – elektrocheminis pulsinės amperometrijos detektorius  
**RID** – lūžio rodiklio detektorius  
**RP- HPLC** – atvirkščių fazių skysčių chromatografija  
**TCD** – terminio laidumo detektorius  
**THF** – tetrahidrofuranas

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Cukrai. Jų nustatymo įvairiuose objektuose ir procesuose svarba

Cukrai yra paprasti, tirpūs angliavandeniai, įprastai randami maisto produktuose, gėrimuose ir kituose plačiai vartojamuose produktuose. Cukrai yra skirstomi pagal monomerų kiekį junginyje: monosacharidai sudaryti iš vienos molekulės (pvz. fruktozė, gliukozė, manozė ir galaktozė), disacharidus sudaro dvi cukraus molekulės (pvz. sacharozė ir laktozė). Ilgesnės grandinės skirstomos į oligosacharidus bei polisacharidus, priklausomai nuo cukraus monomerų kiekio molekulėje [7].

Šiame darbe buvo tirti penki pagrindiniai paprastieji cukrūs: monosacharidai fruktozė ir gliukozė bei disacharidai sacharozė, maltozė ir laktozė. Jų molekulinės struktūros pavaizduotos 1 paveiksle.



1 pav. Paprastieji cukrūs.

Fruktozė – monosacharidas, kurio natūraliai randama uogose, vaisiuose, daržovėse bei meduje. Taip pat tai yra daugelio sirupų komponentas, įskaitant invertuotus cukraus sirupus ir gliukozės-fruktozės sirupus, kurie naudojami kaip saldikliai maisto pramonėje. Fruktozė yra saldžiausia iš visų cukrų [8, 9].

Gliukozė – svarbiausia gamtos statybinė medžiaga. Jos randama vynuogėse ir kituose vaisiuose, augalų lapuose, žieduose, šaknyse, taip pat limfoje ir kraujyje. Ji yra svarbiausių gamtinių disacharidų sacharozės, maltozės, laktozės sudėtinė dalis. Iš gliukozės sudaryti polisacharidai (krakmolas, celiuliozė, glikogenas), ji įeina į daugelio glikozidų sudėtį.

Sacharozė – augaluose labiausiai paplitęs disacharidas. Daug jo randama cukranendrėse ir cukriniuose runkeliuose. Ją sudaro  $\alpha$ -D-gliukopiranozė ir  $\beta$ -D-fruktofuranozė, sujungtos  $\alpha$ -1,2- $\beta$ -glikozidiniu ryšiu. Kadangi sacharozės molekulėje nėra laisvos hemiacetalinės hidroksigrupės, ji yra neredukuojantis disacharidas [9, 10].

Maltozė yra sudaryta iš dviejų gliukozės molekulių, sujungtų  $\alpha$ -1,4-glikozidiniu ryšiu ir yra randama grūduose ir jų produktuose, taip pat augaluose ir daržovėse [11]. Šis disacharidas yra nestipriai saldus, labai tirpus vandenyje [9].

Laktozė yra pieno cukrus, susidarantis žinduolių pieno liaukose iš kraujo D-gliukozės, veikiant fermentui, katalizuojančiam konfigūracijos pasikeitimą prie C-4 atomo. Laktozė – svarbi kūdikių maistinė medžiaga. Ji sudaryta iš  $\beta$ -D-galaktopiranozės ir  $\alpha$ - arba  $\beta$ -gliukopiranozės, susijungusių  $\beta$ -1,4-glikozidiniu ryšiu [10].

Per pastaruosius 50 metų cukraus suvartojimas pasaulyje patrigubėjo. Taip yra dėl to, kad atsirado didelis apdoroto maisto pasirinkimas, kuriame yra daug pridėtinio cukraus. Papildomai cukraus dedama į daugelį maisto produktų, siekiant išsaugoti jų spalvą, pagerinti skonį ar prailginti galiojimo laiką. Ir nors cukrus yra svarbus žmogaus organizmo energijos šaltinis, tačiau dideli jo kiekiai lemia riebalų kaupimąsi ir didina ligų atsiradimo tikimybę. Nustatyta, jog vidutiniškai žmogus per dieną suvartoja daugiau nei 500 kalorijų vien dėl pridėtinio cukraus, tai lemia padidėjusią antsvorio ir nutukimo riziką. Be to, didelis cukraus kiekis skatina ligų, susijusių su metabolitiniu sindromu, atsiradimą: hipertenziją (pvz. fruktozė didina šlapimo rūgšties kiekį kraujyje, kuri kelia kraujo spaudimą), didelį trigliceridų kiekį ir atsparumą insulinui, cukrinį diabetą bei pagreitėjusį senėjimo procesą dėl daromos žalos lipidams, baltymams ir DNR. Taip pat nustatyta, kad fruktozė turi panašų toksinį poveikį kaip alkoholis, kuris ir susidaro būtent vykstant cukrų fermentacijai [12]. Sacharozė ir fruktozė skatina riebalų sintezę kepenyse, didina cholesterolio kiekį. Taip pat tyrimais įrodyta, jog cukrai sukelia vėžinius susirgimus, dantų pažeidimus ir kariesą, kognityvinius sutrikimus, priklausomybę [13].

70 % pasaulio suaugusių žmonių populiacijos turi ribotą laktazės fermento, skaidančio laktozę, išskyrimą. Laktazės trūkumas organizme sukelia laktozės netoleravimą, kuris pagrįste pasireiškia virškinamojo trakto sutrikimais. Laktozės netoleravimas dažniausiai gydomas atsisakant laktozės turinčių maisto produktų ar sumažinant jų kiekį [4, 14]. Laktozės įprastai randama piene ir pieno produktuose, tokiuose kaip jogurtas, sviestas, sūris, ledai ar varškė, tačiau jos galima rasti ir duonoje ar kepinuose, gėrimuose, salotų padažuose ir netgi medikamentuose, tai vadinama „paslėpta laktoze“ [14].

Cukrų nustatymas yra labai svarbus įvairiuose objektuose ir procesuose. Pavyzdžiui, maisto produktuose jis labai svarbus siekiant sumažinti cukraus suvartojimą ir dėl to kylančią sveikatos sutrikimų riziką, taip pat užtikrinant maisto produktų kokybę ir saugą [15]. Žaliavose (pavyzdžiui, vaisiuose ir uogose) cukrų kiekis parodo jų kokybę ir/ar sunokimo lygį [16]. Taip pat cukrų kiekio tyrimai atliekami įvairiuose vaistiniuose preparatuose [17]. Be to, didėjant produktų be laktozės paklausai, auga likutinės laktozės šiuose produktuose tyrimų skaičius [18]. Klinikinėje diagnostikoje vienas iš dažniausiai atliekamų tyrimų – gliukozės nustatymas kraujyje. Tikslus gliukozės kiekio nustatymas kraujyje ypač svarbus diagnozuojant ir kontroliuojant diabetą [19]. Be to, cukrų nustatymas svarbus siekiant kontroliuoti fermentacijos procesą kepinų, pieno produktų bei fermentuotų gėrimų gamyboje ir užtikrinant jų kokybę [20].

## 1.2. Cukrų nustatymo metodai

Cukrų koncentracija maisto žaliavose ir produktuose nustatoma įvairiais klasikiniais (titrimetriniais, gravimetriniais, spektrofotometriniais ir kt.) metodais bei chromatografiniais metodais.

### 1.2.1. Klasikiniai cukrų nustatymo metodai

Charakteringi cukrų struktūros bruožai, tokie kaip laisvos aldehidinės ar keto grupės, gali būti pagrindas jų identifikavimui ir/ar kiekybinei analizei. Yra daugybė klasikinių cheminių metodų, pagrįstų būtent šiuo principu, naudojamų bendram cukraus kiekiui nustatyti [21]. Bendras cukraus kiekis apibūdina redukuojančių cukrų (gliukozės, fruktozės, laktozės ir pan.) bei oligosacharidų (pvz. sacharozės), kurie gali būti hidrolizuoti iki redukuojančių cukrų esant matavimo sąlygoms, sumą [22]. Bendram cukraus kiekiui nustatyti pagrindė taikomi klasikiniai cheminiai metodai, tokie kaip fenolio-sieros rūgšties metodas [23], Luff-Schoorl [24], Nelson-Samogyi [23], Lane-Eynon [25] metodai, Benedikto testas [26].

Fenolio-sieros rūgšties tyrimas yra labai jautrus klasikinis kolorimetrinis metodas angliavandenių, tokių kaip monosacharidų, oligosacharidų, polisacharidų ir jų darinių, kiekio nustatymui. Šio metodo principas: kaitinant reakcijos mišinį su koncentruota sieros rūgštimi, vyksta serija sacharidų dehidratacijos reakcijų, susidarant furano dariniams. Tuomet susiformuoja tamsios spalvos junginiai vykstant furano darinių kondensacijai su fenolio junginiais. Šie junginiai gali būti tiriami spektrofotometru; išmatuota absorbcija yra proporcinga cukrų koncentracijai [23].

Luff-Schoorl metodas – titrimetrinis cukrų nustatymo metodas. Jis yra pagrįstas reakcija tarp redukuojančių cukrų ir vario sulfato šarminio tirpalo, kurios metu varis redukuojamas iki vario oksido. Tuomet neredukavę  $\text{Cu}^{2+}$  jonai yra nustatomi jodometriškai [24].

Lane-Eynon yra dar vienas titrimetrinio metodo pavyzdys. Šiuo atveju mėginys lašinamas biuretės pagalba į verdantį žinomos koncentracijos šarminį vario tartrato tirpalą, kuriame yra metileno mėlynojo indikatoriaus. Redukuojantys cukrai redukuoja vario jonus, mėlynos tirpalo spalvos pasikeitimas indikuoja titravimo pabaigą [25].

Nelson-Samogyi metodas yra vienas iš klasikinių ir plačiai taikomų metodų kiekybiniam redukuojančių cukrų nustatymui. Tai yra spektrofotometrinis analizės metodas. Cukrų nustatymui yra naudojami vario reagentas ir Nelsono reagentas. Redukuojantys cukrai kaitinami šarminėje terpėje, vyksta  $\text{Cu}^{2+}$  jonų redukcija iki  $\text{Cu}^+$ . Susidaręs vario oksidas redukuoja arseno molibdinę rūgštį, susidarant molibdeno mėlynajam spalvotam kompleksui, kurio sugertis gali būti išmatuojama ties 520 nm bangos ilgiu, absorbcija yra proporcinga redukuojančių cukrų kiekiui tiriamajame mėginyje [23].

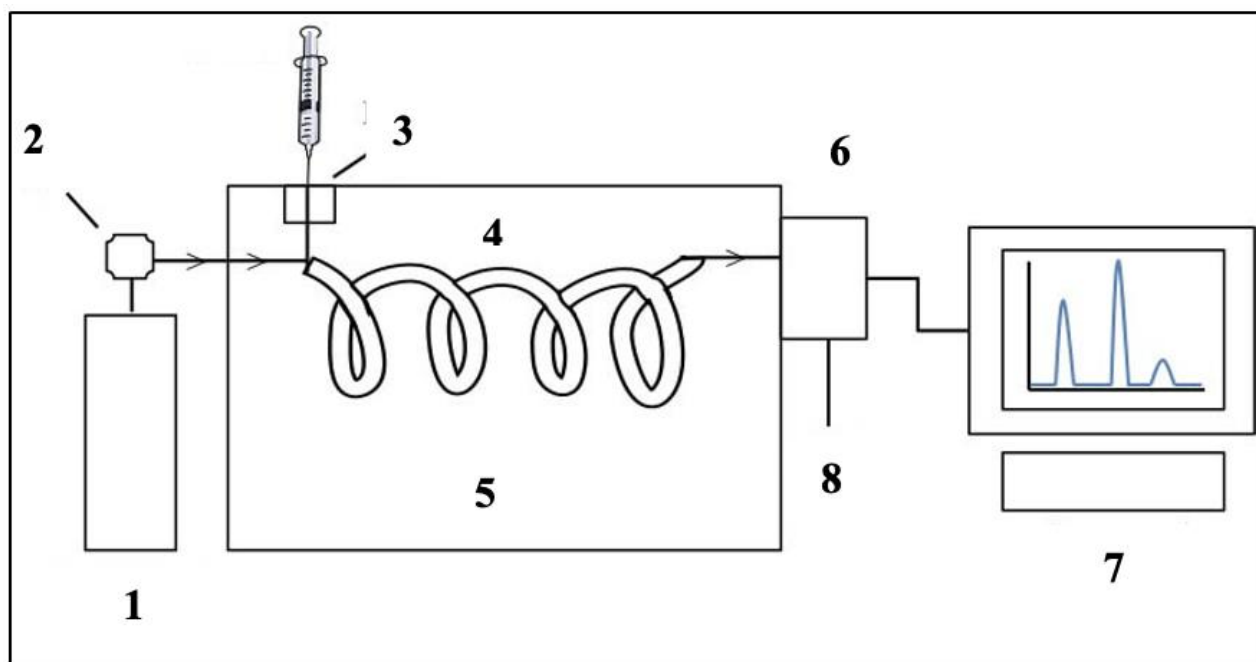
Benedikto metodas redukuojantiems cukrams buvo sukurtas 1911 m. mokslininko Stanley R. Benedict kokybiniam gliukozės nustatymui šlapime [27]. Šis metodas vis dar taikomas cukrų nustatymui industriniuose, klinikiuose, moksliniuose tyrimuose. Reakcijos mechanizmas pagrįstas gliukozės laisvų karbonilinių grupių redukavimo galimybe – platus spektras metalų jonų gali būti redukuojami, įskaitant  $\text{Cu}^{2+}$  jonus. Šarminėje terpėje varis redukuojamas iki  $\text{Cu}^+$  ir iškrenta  $\text{Cu}_2\text{O}$  nuosėdos. Šio metodo privalumas – greitas redukuojančių cukrų detektavimas dėl spalvos pasikeitimo [26]. Be kokybinio cukrų nustatymo Benedikto metodas taip pat gali būti taikomas ir pusiau kiekybiniam tyrimui. Šiuo atveju naudojamas kalio tiocianatas ir ferocianidas, susidaro vario tiocianatas, kuris iškrenta į nuosėdas ir gali būti titruojamas. Nustatyta, jog tam tikras kiekis gliukozės redukuoja tam tikrą kiekį vario. Šios procedūros metu reakcijos komponentai kaitinami iki virimo temperatūros ir lašinamas mėginys iki kol išnyksta mėlyna spalva [26].

## 1.2.2. Chromatografiniai metodai

Chromatografija – populiarus analizės metodas, plačiai taikomas mišinio komponentų atskyrimui, identifikavimui ir gryninimui, atliekant kokybinę bei kiekybinę analizę. Junginiai atskiriami priklausomai nuo jų charakteristikų, tokių kaip dydis ir forma, krūvis, hidrofobinės grupės, gebėjimas sąveikauti su stacionaria faze. Šis metodas yra pagrįstas daugkartiniu komponentų pasiskirtumu tarp dviejų fazių: stacionarios ir judrios [28].

Dujų chromatografija – chromatografijos variantas, kai judri fazė yra dujos. Šis metodas dar yra skirstomas į du variantus, priklausomai nuo to, ar stacionari fazė yra kieta, ar skysta. Kai stacionari fazė yra kieta, analitės atskiriamos dėl skirtingos jų adsorbicijos ant kietų dalelių. Naudojant skystą nejudrią fazę, analičių atskyrimas vyksta dėl nevienodo jų pasiskirstymo tarp judrios ir nejudrios fazių [29].

2 paveiksle pavaizduota dujų chromatografo schema. Įprastai jį sudaro nešančiųjų dujų sistema, injektorius, dujų chromatografinė kolonėlė, detektorius ir duomenų registravimo sistema. Nešančiomis dujomis naudojamos vandenilio, helio ar azoto dujos, jų prigimtis lemia GC atskyrimo charakteristikas ir detektavimo jautrį. Termostatuojamo injektoriaus dėka mėginys patenka į kolonėlės pradžią. Tuomet yra staigiai išgarinamas aukštoje temperatūroje ir patenka į dujinę mobilią fazę, kuri juda kolonėle esant dideliame slėgiui. Komponentai pasiskirto tarp dviejų fazių ir yra atskiriami [28].



**2 pav.** Dujų chromatografo schema. 1 – dujų rezervuaras, 2 – tekėjimo reguliatorius, 3 – mėginio įleidimo sistema, 4 – kolonėlė, 5 – termostatas, 6 – detektorius, 7 – duomenų registravimo sistema, 8 – atliekos.

Dujų chromatografijoje naudojamos dviejų tipų kolonėlės: pakuotos ir kapiliarinės. Pakuotos būna sudarytos iš kieto metalo ar stiklo ir užpildytos mažomis dalelėmis, kurios dažnai būna padengtos plonu didelės molekulinės masės polimero sluoksniu. Kapiliarinės kolonėlės – tai labai



mažo vidinio skersmens (apie 0,20-0,53 mm) stiklo ar lydyto silicio vamzdeliai. Jų vidinių sienelių paviršius yra padengtas plonu stacionarios fazės sluoksniu. Efektyviam ir patikimam chromatografiniam atskyrimui reikalinga pastovi temperatūra, todėl GC kolonėlės yra termostatuojamos.

Detektoriai dujų chromatografijoje sąveikauja su iš kolonėlės išeinančiomis molekulėmis, ši sąveika konvertuojama į elektrinį signalą, kuris siunčiamas į duomenų registravimo sistemą ir gaunama chromatograma [30]. GC naudojami skirtingi detektoriai (3 pav.): liepsnos jonizacinis (FID), terminio laidumo (TCD), elektronų pagavos (ECD), azoto-fosforo (NPD), liepsnos fotometriniis (FPD), elektrolitinio laidumo (ELCD), atominės emisijos (AED), masių spektrometriniai (MS) ir kt.

Detector	Selectivity	Detectability	Linearity
Flame ionization detector (FID)	No	2 pg C/s	10 <sup>7</sup>
Thermal conductivity detector (TCD)	No	≈300 pg/mL	10 <sup>4-6</sup>
Electron capture detector (ECD)	Halogens	fg/s	10 <sup>4</sup>
Nitrogen-phosphorus detector (NPD)	N, P	fg-pg N, P/s	10 <sup>4-7</sup>
Halogen-specific detector (XSD)	Halogens	pg Cl/s	10 <sup>4</sup>
Thermionic ionization detector (TID)	N, P	≈100 fg N/s, ≈100 fg P/s	N: 10 <sup>5</sup> , P: 10 <sup>4</sup>
Photoionization detector (PID)	Aromatics	pg	10 <sup>6</sup>
Flame photometric detector (FPD)	S, P	pg <sup>a</sup>	S: 10 <sup>3</sup> , P: 10 <sup>5</sup>
Pulsed flame photometric detector (PFPD)	Tuneable for 28 elements	pg S/s, 100 pg P/s <sup>a</sup>	S, P: 10 <sup>3</sup>
Atomic-emission detector (AED)	Tuneable for any element	pg/s <sup>a</sup>	10 <sup>3-4</sup>
Electrolytic conductivity detector (ELCD) or Hall electrolytic conductivity detector	S, N, halogens	pg	10 <sup>6</sup>
Mass spectrometric detector (MSD)	Yes	fg-pg	10 <sup>4-7</sup>
Fourier transform infrared (FTIR)	Yes	pg	10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> The detectability considerably varies among particular elements.

### 3 pav. Dujų chromatografijoje naudojami detektoriai [31].

FID yra vienas populiariausių detektorių. Iš kolonėlės išeinanti judri fazė sumaišoma su vandeniliu bei oru ir nukreipiama į liepsną, kuri suskaldo organines molekules ir susidaro jonai. Tarp degiklio galvutės ir virš liepsnos esančio elektrodo suteikiamas elektrinis potencialas, susidaranti srovė tuomet yra išmatuojama ir yra proporcinga analitės koncentracijai.

TCD sudarytas iš elektra šildomo laido ir termistoriaus. Jutiklio temperatūra priklauso nuo aplink jį tekančių dujų terminio laidumo. Terminio laidumo pokyčiai sukelia temperatūros pokyčius jutiklyje, kurie yra registruojami kaip varžos pokyčiai.

Vykstant elektronų pagavos detektavimui, mėginys patenka į detektorių iš kolonėlės ir praeina pro <sup>63</sup>Ni radioaktyvųjį elementą, išspinduliuojamos β dalelės, kurios sukelia nešančiųjų dujų jonizaciją ir išlaisvinami elektronai. Kai organinės molekulės, turinčios elektroneigiamus funkcinius atomus ar grupes, praeina pro detektorių, pagauna tam tikrą kiekį elektronų ir matuojama srovė tarp elektrodų sumažėja [31].

Azoto-fosforo detektavimo metu stiklo karoliukas, kuriame yra šarminis metalas, elektros pagalba yra šildomas, kol išspinduliuojami elektronai. Šie elektronai tuomet yra pagaunami stabilių tarpinių produktų ir susidaro vandenilio plazma, kuri jonizuoja iš kolonėlės išeinančius junginius.

Poliarizuojantis laukas šiuos jonus nukreipia į kolektorinį anodą, susidarant srovei. Šis detektorius yra selektyvus junginiams, turintiems azoto ar fosforo atomų.

Naudojant liepsnos fotometrinių detektorių, mėginys sudeginamas vandenilio/oro liepsnoje ir susidaro molekuliniai produktai, emituojantys šviesą dėl chemiluminescencinių cheminių reakcijų. Tuomet išspinduliuota šviesa izoliuojama nuo foninės emisijos tam tikro bangos ilgio filtrais ir detektuojama. Šis detektorius yra atrankus sieros ir fosforo turintiems junginiams.

Elektrolitinio laidumo detektavimo metode junginiai, išeinantys iš kolonėlės, patenka į nikelio reakcijos vamzdelį aukštoje temperatūroje (iki 900 °C) ir atsiskiria nuo jų halogeninti atomai, kurie yra nunešami į laidumo celę. Keičiantis halogenų koncentracijai šioje celėje, matuojamas laidumas proporcingai kinta [31].

Masių spektrometrija yra jautrus ir itin specifiškas detektavimo metodas. Taikant MS, vykdoma analičių jonizacija, molekulinų jonų susidarymas ir jų fragmentavimas. Susidarę jonai atskiriami masių spektrometre priklausomai nuo jų masės-krūvio santykio ir yra detektuojami, gaunamas masių spektras [32].

Dujų chromatografijos metodu tiriant cukrus ir kitus angliavandenius įprastai atliekamas mėginio derivatizavimas [33, 34]. Derivatizacija – tai metodas, pagrįstas cheminėmis reakcijomis, kurių metu vieni junginiai keičiami kitais, pasižymintiais reikalingomis savybėmis. GC atveju derivatizacija dažniausiai vykdoma siekiant padidinti analičių lakumą. Nelakių angliavandenių polinės grupės yra pakeičiamos vykdant sililavimo, alkilavimo, acilavimo ir esterifikacijos reakcijas [35].

Sililavimo metu pagrįde derivatizuojamos hidroksilo, karboksilo, amino, tiolio ir fosfato funkcinės grupės, junginio aktyvus vandenilis pakeičiamas alkilsililo grupe, gaunamas mažiau polinis, lagesnis ir termiškai stabilesnis junginys. Šiai reakcijai naudojami sililavimo reagentai, tokie kaip trimetilsililas (TMS) ar *tert*-butildimetilsililas (*tert*-BDMS).

Vykdant acilavimą junginiai, turintys -OH, -SH ar -NH funkcines grupes, atitinkamai paverčiami esteriais, tioesteriais bei aminais. Kaip ir sililavimo atveju, padidinamas analičių lakumas, tuo pačiu sumažinant jų poliškumą. Acilavimo reagentai skirstomi į tris grupes: fluorintus anhidridus, fluoracilimidazolus ir nehalogenintas acetilo grupes. Naudojant fluorintus anhidridus, gaunami stabilūs ir labai lakūs fluorinti alkoholių, fenolių ir aminių derivatai. Fluorintos funkcinės grupės ne tik padidina junginių lakumą, bet ir praplečia detekcijos galimybes – derivatizuotas analites galima nustatyti elektronų pagavos detektoriumi, kuris pasižymi itin dideliu jautrumu. Fluoracilimidazolai reaguoja su hidroksilo grupėmis, antriniais ar tretiniais aminais, susidarant acilo dariniams. Naudojant nehalogenintas acetilo grupes turinčius reagentus, gaunami mažiau lakūs ir ne tokie naudingi derivatai, tačiau tam tikrais atvejais reikalingi siekiant padidinti analitės sulaikymo trukmę.

Alkilinimas (arba arilinimas) – R-COOH, R-OH, R-SH, R<sub>2</sub>-NH, R-NH<sub>2</sub>, R-CONH<sub>2</sub> ir R-CONH-R' grupių aktyvaus vandenilio pakeitimas alkilo, alifatine ar alifatine-aromatine (pvz. benzilo) grupe. Derivatizuojant šiuo metodu, vykdoma nukleofilinio pakeitimo reakcija, kurios metu sumažinamas junginio poliškumas. Alkilinant naudojami tokie reagentai, kaip dimetilformamidas (DMF), metanolyje ištirpintas NaOH ar BF<sub>3</sub>.

Esterifikavimas – reakcija, kurios metu karboksilo grupė reaguoja su hidroksigrupe, mišinyje esant katalizatoriui. Susidarantys alkil esteriai yra stabilūs, jų smailės tinkamos kiekybiniam nustatymui [36].

Skysčių chromatografija – tai molekulių ar jonų, ištirpusių skystoje judrioje fazėje, atskyrimo metodas [37]. Ji gali būti atliekama kolonėlėje arba plokštumoje. Šių dienų skysčių chromatografijoje atskyrimui dažniausiai naudojamos kolonėlės iš labai mažų supakuotų dalelių ir pakankamai aukštas slėgis, šis metodas geriau žinomas kaip efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC) [38].

HPLC (angl. *high performance liquid chromatography*) – populiariausias, moderniausias ir universaliausias chromatografinis metodas, įprastai naudojamas atskirti mišinio komponentus, juos identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti [39]. Priklausomai nuo atskyrimo mechanizmo bei mobilios ir stacionarios fazių poliškumo, HPLC yra skirstoma į adsorbcinę normalių ir atvirkščių fazių, pasiskirstymo, jonų mainų, afininę (giminingumo), jonų porų chromatografiją ir kitus metodus [40].

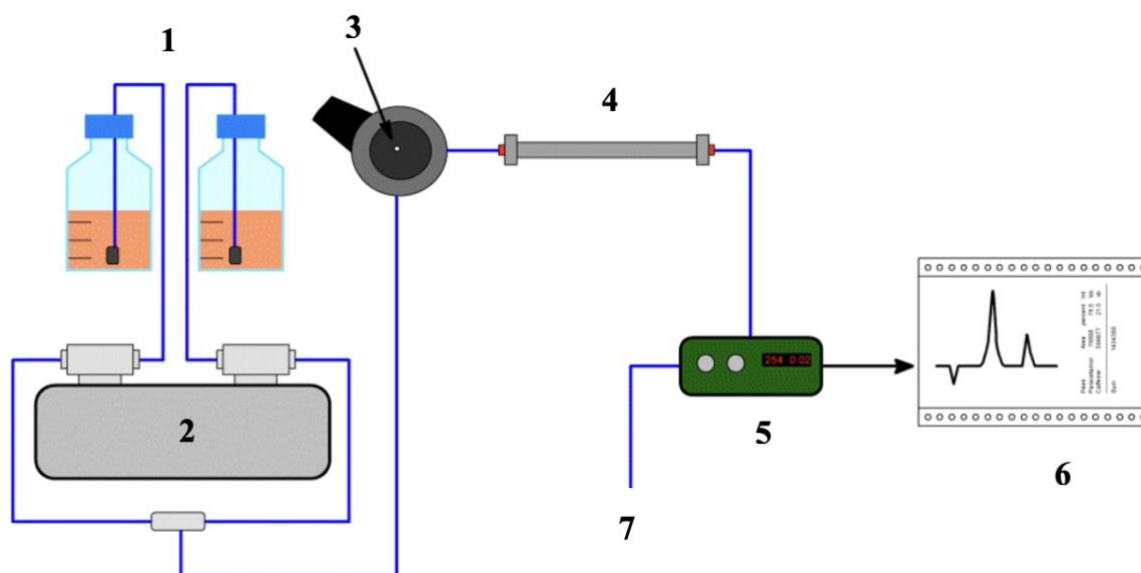
Normalių fazių skysčių chromatografija (NP-HPLC) yra seniausias chromatografinis metodas, dominavęs prieš atsirandant atvirkščių fazių skysčių chromatografijai. Dirbant šiuo režimu, stacionari fazė yra poliškesnė už mobiliąją fazę, o analičių sulaikymas stiprėja didėjant stacionarios fazės poliškumui bei mažėjant judrios fazės poliškumui, polinės analitės yra stipriau sulaikomos nei nepolinės [40, 41]. NP-HPLC naudojamos polinės stacionarios fazės, dažniausiai naudojamas silikagelis [42]. Rečiau naudojami polinėmis funkcinėmis grupėmis (pvz. diolio, amino, ciano) modifikuoti silikagelio sorbentai [43]. Atskyrimas vyksta dėl skirtingos analičių sąveikos su sorbento paviršiumi, procesą lemia polinės sąveikos, tokios kaip vandenilinių ryšių susidarymas ar dipolis-dipolis sąveika [42]. Normalių fazių HPLC judrias fazes sudaro labai įvairūs tirpikliai: alkanai ir cikloalkanai (n-pentanas, n-heksanas, n-heptanas, ciklopentanas, cikloheksanas ir pan.), fluoralkanai, chlorinti alkanai (dichlormetanas, chloroformas, anglies tetrachloridas, propilchloridas), eteriai, esteriai (metilacetatas, etilacetatas), alkoholiai (metanolis, etanolis, 1-propanolis), aminai (piridinas, propilaminas, trietilaminas), karbonilinės rūgštys ar jų dariniai ir kt. [42]

Atvirkščių fazių skysčių chromatografija (RP-HPLC) – populiariausias skysčių chromatografijos variantas. Atradus šį metodą XX a. 8-ajame dešimtmetyje, jis beveik pilnai pakeitė normalių fazių variantą. Kaip pavadinimas leidžia suprasti, šis metodas yra priešingas NP-HPLC [39]. Šiuo atveju chromatografinis atskyrimas yra pagrįstas hidrofobine sąveika tarp analitės ir hidrofobiniais ligandais padengto sorbento paviršiaus; analitės eliuojamos jų hidrofobiškumo didėjimo tvarka [44]. RP-HPLC naudojamos nepolinės stacionarios fazės, įprastai silikagelio sorbentai su ant paviršiaus kovalentiškai prijungtomis alkilo ar arilo funkcinėmis grupėmis. Iš alkilintų silikagelio stacionarių fazių, oktadecil- ( $C_{18}$ ), oktil- ( $C_8$ ) ir butil- ( $C_4$ ) padengti sorbentai yra plačiausiai naudojami [45]. Taip pat gali būti pritaikomi įvairūs aromatinius žiedus, pavyzdžiui, fenilo ligandus, turintys silikagelio sorbentai [46]. Judrios fazės atvirkščių fazių chromatografijoje yra polinės, naudojami vandens ar buferio ir polinio organinio tirpiklio, tokio kaip metanolis, acetonitrilas, izopropanolis ar tetrahidrofuranas, mišiniai. Analčių sulaikymas yra reguliuojamas keičiant mobilios fazės sudėtį. Vanduo yra silpniausias eliuentas, didelis jo kiekis lemia didelį sulaikymą, o organinio tirpiklio pridėjimas sulaikymą sumažina. Sulaikymas bei selektyvumas taip pat gali būti koreguojami ne tik keičiant judrios fazės sudėtį, bet ir jos pH. Galinčių jonizuotų junginių sulaikymas kontroliuojamas buferių ar rūgščių/bazių priedų pagalba [45, 47].

Jonų mainų chromatografija (IEC) – chromatografinis metodas, leidžiantis atskirti jonus ir polines molekules priklausomai nuo jų giminiškumo jonų keitikliui. Šis metodas yra skirstomas į anijonų ir katijonų mainų chromatografiją, priklausomai nuo to, ar proceso metu nustatomos analitės yra anijonai, ar katijonai [48]. IEC naudojamos įvairios tiek organinės, tiek neorganinės stacionarios

fazės. Organinių fazių kietą pagrindą sudaro, pavyzdžiui, stireno-divinilbenzeno ar etilenglikolio-metakrilato kopolimerai, o neorganinės įprastai gaminamos silikagelio pagrindu [49]. Šios dervos yra padengtos krūvį turinčiomis funkcinėmis grupėmis, prie kurių tikslinės molekulės, esančios mišinyje, keliaudamos kolonėle jungiasi ir yra atskiriamos – anijonai atskiriami ant katijoninių stacionarių fazių, ir atvirkščiai [50]. Anijonų mainų dervos dažniausiai būna padengtos teigiamomis amino grupėmis (pvz. dietilaminoetilo, ketvirtinio amino, trietilamino), o katijonų mainų dervos – neigiamos krūvio grupėmis (pvz. karboksietilo, sulfopropilo, ortofosfato). Judrią fazę sudaro įvairūs buferiai. Atskyrimas pagrįstas elektrostatinėmis sąveikomis tarp krūvį turinčių molekulių vietų ir priešingą krūvį turinčių funkcinių grupių, esančių ant sorbento paviršiaus. Sąveikos yra stipriausios, kai buferio joninė jėga yra maža, todėl prisijungimas gali būti reguliuojamas keičiant joninę jėgą ir pH. Molekulių krūvis tirpale ir ant jonų mainų dervos balansuojamas priešjoniais, pavyzdžiui, druskų ir buferio jonais, kurie yra pakeičiami, kai tikslinė molekulė prisijungia prie sorbento funkcinės grupės, vykstant jonų mainams. Prijungtos molekulės desorbcija įprastai vykdoma didinant buferio joninę jėgą arba keičiant pH [48].

4 paveiksle schematiškai pavaizduota HPLC sistema. Ją sudaro skysčių chromatografas, kurį sudaro judrios fazės rezervuarai, siurblys (siurbliai), mėginio įleidimo sistema, kolonėlė ir detektorius bei kompiuterinė įranga. Siurblys reikalingas esant dideliame slėgiui (50-400 bar) pumpuoti judrią fazę per kompaktišką stacionarią fazę užpildytą kolonėlę, detektorius – mėginio atskyrimo monitoringui, o kompiuterinė įranga leidžia kontroliuoti procesą ir analizuoti rezultatus. Priklausomai nuo atliekamo tyrimo metodikos, gali būti papildomai naudojama kolonėlės termostatas, degazatorius, frakcijų rinktuvas ar keli papildomi moduliai [39].



**4 pav.** Skysčių chromatografo schema. 1 – judrios fazės rezervuarai, 2 – siurbliai, 3 – mėginio įleidimo sistema, 4 – chromatografinė kolonėlė, 5 – detektorius, 6 – kompiuterinė įranga, 7 – atliekos.

HPLC naudojami labai įvairūs detektoriai: absorbciniai ultravioletinės/regimosios šviesos (UV/Vis), fluorescenciniai (FLD), lūžio rodiklio (RID), elektrocheminiai (ECD), masių spektrometrijos (MS), šviesos išbarstymo (ELSD) ir kt. 5 paveiksle esančioje lentelėje vaizduojami dažniausiai taikomi detektavimo metodai ir jų palyginimas.

Detection Method		Mass Detection Limits*	Note For Analytical Application
UV absorption		1 pg–1 ng	Relatively sensitive Not selective Direct and indirect
Fluorescence		10 fg–10 pg	Sensitive Selective Native detection or pre-column derivatization
RID		10 ng–1 µg	Relatively sensitive Not selective
Electro-chemical	Amperometric	100 fg–1 ng	Sensitive Selective (can be turned to the analyte of interest)
	Conductometric	500 pg–1 ng	Moderate sensitive Universal detection
	Potentiometric	Not reported	Not reported
FT-IR		100 ng–1 µg	Relatively sensitive Structural elucidation
Mass spectrometry (in HPLC-ESI-MS configuration)		100 ag–1 ng	Sensitive Selective (in MS/MS mode) Structural determination (in high resolution mode, e.g., FT-ICR-MS) Metabolic, proteomic, and ADME studies

\*LOD values are expressed in injected mass that brings to a signal-to-noise ratio of 5-folds, using 200 g/mol as molar mass with an injection volume of 10 µL.

### 5 pav. Dažniausiai taikomi HPLC detektavimo metodai ir jų palyginimas. [51]

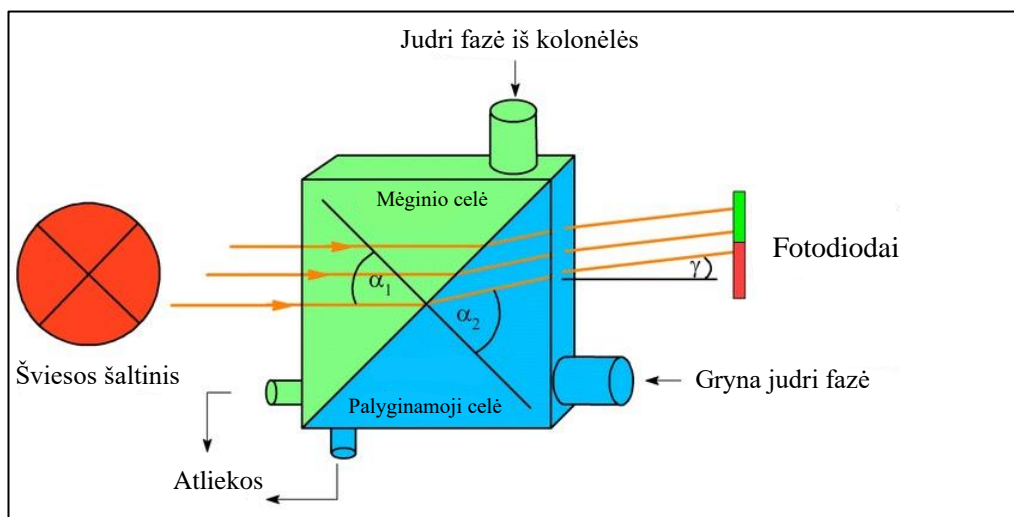
Absorbciniai detektoriai yra plačiausiai naudojami, detekcija yra pagrįsta ieškomos analitės chromoforo UV/Vis šviesos absorbcija [51]. Analitės koncentracija yra proporcinga absorbcijos dydžiui ir nustatoma matuojant krentančios ir pro detektoriaus celę praėjusios šviesos intensyvumą santykį.

FLD matuojama tirpių molekulių optinė šviesos emisija po sužadavimo aukštesnės energijos bangos ilgio spinduliuote. Taikant fluorescencinį detektavimą, pagerinamas jautris ir selektyvumas, lyginant su HPLC-UV konfigūracija, tačiau šiuo atveju detektavimas priklauso nuo molekulės fluorescencinių savybių arba reikalauja specialaus paruošimo – derivatizacijos.

Elektrocheminiai detektoriai yra labai selektyvūs, ypač tinka junginių, galinčių oksiduotis ar redukuotis, atskyrimui, nes yra pagrįsti elektrocheminėmis reakcijomis ant elektrodo paviršiaus. ECD detektoriai suteikia net keturis galimus signalo gavimo režimus: amperometrinių, pulsinių amperometrijos, potenciometrinių ir konduktometrinių. Didelis selektyvumas ir jautrumas leidžia šį detektavimo būdą taikyti tiriant vaistus ir jų metabolitus biologiniuose skysčiuose, ypač dėl reikalingo mažo mėginio kiekio [51, 52].

Šiame darbe buvo naudotas lūžio rodiklio detektorius. Tai yra universalus ir seniausias skysčių chromatografijos detektorius. Jis yra pakankamai jautrus, tačiau neselektyvus. RID matuoja optinio lūžio rodiklio skirtumą tarp judrios fazės ir mėginio. Detektavimui nereikalingi chromoforai, todėl

šis metodas sėkmingai taikomas cukrų, trigliceridų ir organinių rūgščių nustatymui. Dažniausiai naudojami lūžio rodiklio detektoriai (6 pav.) sudaryti iš refraktometro, kuriame šviesa iš volframo lempos nukreipta per dvi plyšius turinčias celes – palyginamąją ir darbinę (mėginio). Palyginamoji celė užpildyta mobiliąja faze, o per darbinę teka judri fazė iš kolonėlės. Šviesa, praėjusi pro dvi detektoriaus celes, skirtingai lūžta ir yra pamatuojama pora fotodiodų, kurie konvertuoja signalą į išmatuojamą įtampą [52].



6 pav. Lūžio rodiklio detektorius.

Nors bet koks junginys gali būti detektuojamas RID, šis detektorius nėra labai jautrus dėl mažų lūžio rodiklio skirtumų. Nedideli temperatūros, judrios fazės sudėties ar slėgio pokyčiai lemia bazinės linijos poslinkius ir triukšmus. Tai reiškia, kad RID gali būti taikomas tik izokratinės eliuacijos sąlygomis. Tam, kad būtų išlaikoma pastovi celės, iš kolonėlės tekančios judrios fazės ir palyginamojoje celėje esančios judrios fazės temperatūra, daugumos lūžio rodiklio detektorių dalys tarp kolonėlės ir celės yra termostatuojamos. Tai lemia chromatografinių zonų išsiplėtimą, todėl gaunamos platesnės smailės. Dėl platesnių smailių prastėja efektyvumas, didėja aptikimo riba [53].

Taikant masių spektrometriją, analitės iš pradžių praeina skysčių chromatografijos sistema, kur yra atskiriamos. Tuomet patenka į MS sistemą ir yra jonizuojamos jonų šaltinyje. Kitaip nei GC-MS, kur plačiausiai taikoma jonizacija elektronų srautu, LC-MS daugiausia taikomos jonizacijos rūšys – elektropurkštuvinė (ESI) ir atmosferos slėgio cheminė (APCI) jonizacijos. Vykstant ESI, susidaro krūvį turintys judrios fazės lašeliai, kurie nuolat mažėja garuojant tirpikliui ir susidaro jonai dujinėje fazėje. APCI atveju judri fazė yra išpurškiama azoto dujų pagalba į kaitintuvą, kur yra išgarinama. Tuomet vykdoma tirpiklio molekulių jonizacija vainikine iškrova, susidarę tirpiklio jonai atiduoda protoną analitei vykstant cheminėms reakcijoms, gaunami teigiami ar neigiami jonai. Įvykdžius jonizaciją, jonai patenka į masių analizatorių, kur yra atskiriami pagal jų masės-krūvio santykį ( $m/z$ ), ir vėliau į detektorius, kur yra detektuojami [54].

Dar vienas HPLC detektorius, ne toks populiarus, bet plačiai taikomas cukrų analizėje, yra garinant šviesos išbarstymo detektorius. Taikant ELSD, eliuatas išpurškiamas detektoriuje ir aerosolis išgarinamas susidarant smulkioms analičių dalelėms inertinių dujų sraute. Dalelės praeina pro šviesos spindulį, šviesa išbarstoma ir gaunamas detektoriaus signalas [55].

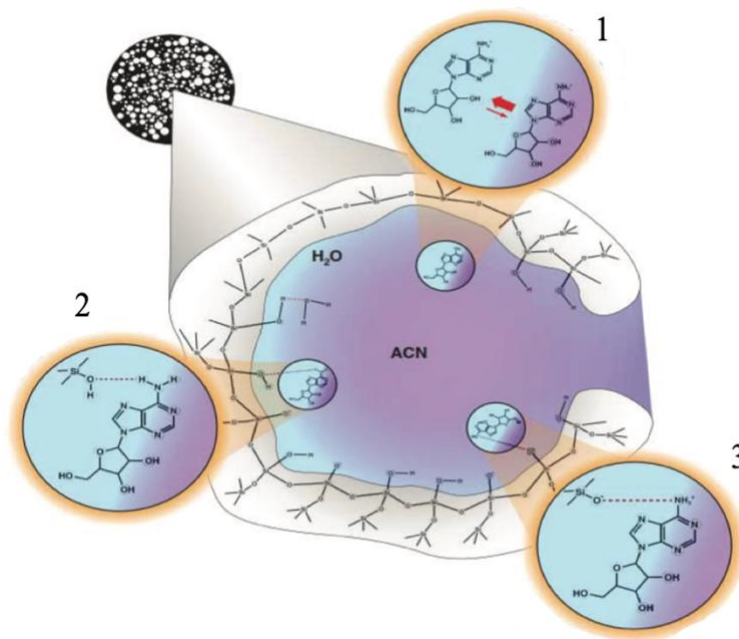
Cukrai nustatomi įvairiais chromatografiniais metodais. Dujų chromatografija ir GC-MS yra puikiai tinkančios technikos, tačiau dirbant šiais metodais reikalingas specialus mėginio paruošimas ir derivatizavimas dėl mažo cukrų lakumo, todėl efektyvioji skysčių chromatografija yra laikoma pranašesne rutiniuose tyrimuose ir yra labiau taikoma atliekant kiekybinę analizę. HPLC labiausiai tinkama cukrų kiekio nustatymui maiste ir gėrimuose dėl tikslumo ir praktiškumo, reikalauja palyginus mažai mėginio paruošimo, gaunamos pakankamai lengvai interpretuojamos chromatogramos. Paprastieji cukrai yra stipriai poliniai, be krūvio ir, kadangi neturi chromoforo, negali būti tiesiogiai nustatomi UV absorbciniais detektoriais, nebent yra derivatizuojami. Cukrai gali būti nustatomi ir kitose matricose, ne tik maisto produktuose, taikant skysčių chromatografijos metodus, naudojant lūžio rodiklio (RID), šviesos išbarstymo (ELSD), elektrocheminį pulsinės amperometrijos (PAD) detektavimą ar masių spektrometriją [5, 56].

### **1.3. Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija**

Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija (HILIC) – alternatyvus efektyviosios skysčių chromatografijos metodas poliniams junginiams tirti. Šis analizės būdas leidžia efektyviai atskirti mažus polinius junginius ant polinės stacionarios fazės [57].

HILIC atskyrimo metodas pagrįstas analitės sąveika su kolonėlėje esančia hidrofiline stacionaria faze [58]. Atskyrimas įprastai atliekamas ant polinių, normalių fazių chromatografijoje naudojamų, sorbentų – silikagelio arba polinėmis funkcinėmis grupėmis modifikuoto silikagelio. Judrios fazės sudėtimi dažniausiai atitinka atvirkščių fazių chromatografijoje naudojamas fazes – didžiąją sudėties dalį sudaro polinis organinis tirpiklis, likusią dalį sudaro vanduo. Polinio sorbento paviršiuje dėl susidarančių vandenilinių ryšių susiformuoja vandens multisluosknis, kuris atlieka skystos nejudrios fazės vaidmenį. Atskyrimo metu analitės pasiskirsto tarp stipriai polinio vandens sluoksnio, esančio ant sorbento paviršiaus, ir mažiau polinės mobilios fazės. Kuo analitė poliškesnė ir geriau tirpsta vandenyje, tuo ji yra stipriau sulaikoma [59].

Be hidrofiliinio pasiskirstymo, HILIC atskyrimas vyksta ir dėl kitokių sąveikų. 7 paveiksle pavaizduota HILIC atskyrimo mechanizmo schema. Atlikti tyrimai rodo, jog paviršiaus adsorbicija ir elektrostatinės sąveikos taip pat stipriai lemia polinių junginių sulaikymą hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografijoje. Paviršiaus adsorbicija apibūdina tiesiogines sąveikas tarp polinių analičių ir stacionarių fazių: specifines polines (pvz. vandeniliniai ryšiai) ir nespacificines (van der Waalso jėgos) sąveikas. Analitės gali tiesiogiai sąveikauti su ligandais ant stacionarios fazės. Jei tiek poliniai junginiai, tiek stacionari fazė turi krūvį, elektrostatinės sąveikos taip pat gali sąlygoti sulaikymą. Traukos jėgos tokiu atveju sustiprina sulaikymą, o stūmos – atvirkščiai, susilpnina [60].



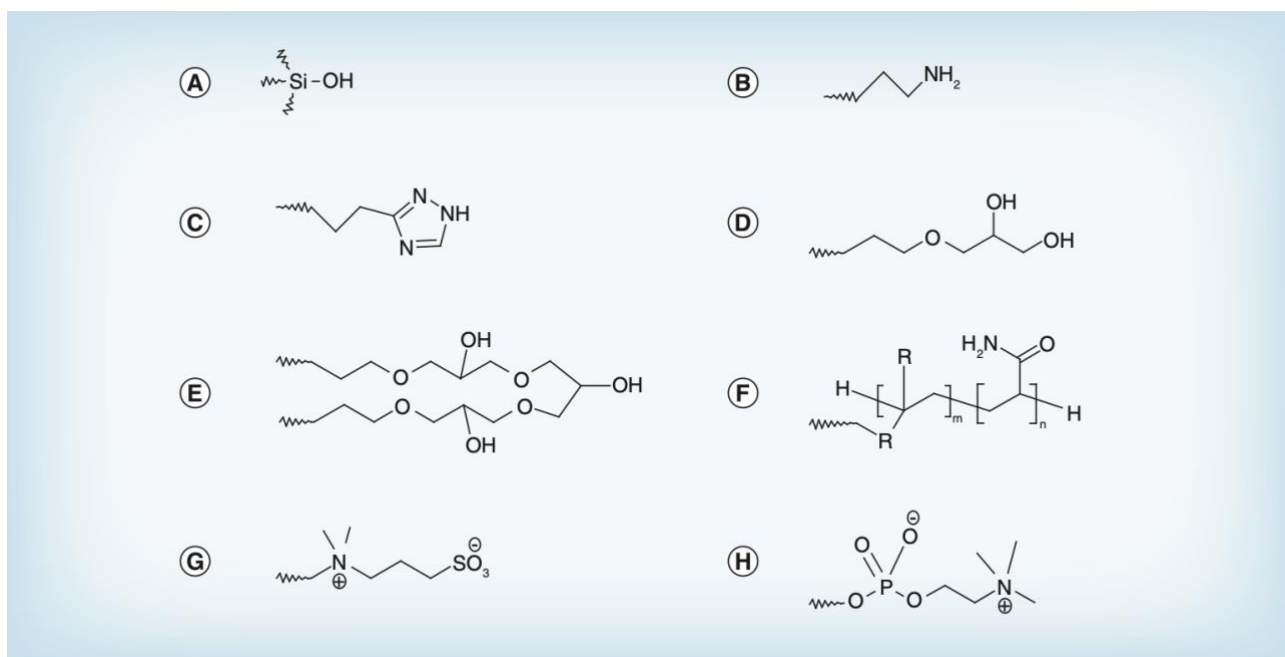
**7 pav.** HILIC atskyrimo mechanizmas. Sąveikos: 1 – hidrofiliinis pasiskirstymas, 2 – vandeniliniai ryšiai, 3 – elektrostatinės sąveikos.

Hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografija gali būti atliekama ant įvairių silikagelio ar polimerinių stacionarių fazių: nemodifikuoto silikagelio, įvairiais poliniais ligandais modifikuoto silikagelio, jonų-mainų ar cviterjoninių stacionarių fazių ir kt. [40, 61].

Didžioji dalis HILIC stacionarių fazių yra pagamintos silikagelio pagrindu. Silikagelis jau ilgą laiką yra naudojamas efektyviojoje skysčių chromatografijoje – kaip kolonėlės užpildas normalių fazių variante bei pagrindas funkcinių grupių prijungimui atvirkščių fazių variante. Taip yra dėl to, kad silikagelis yra stabilus esant aukštiems slėgiams, mechaniškai patvarus, lengvai modifikuojamas įvairiais ligandais, kurie leidžia įgyti įvairias pageidaujamas savybes [62]. Paprastas silikagelis turi silanolines grupes, kurios gali jonizuotis ir sudaryti neigiamai įkrautą sluoksnį. Būtent dėl silikagelio paviršiuje esančių silanolinių grupių gali susidaryti paviršinis vandens sluoksnis ir vykti hidrofiliinės sąveikos skysčių chromatografinis sulaikymas [63].



Modifikuotas silikagelis gaunamas chemiškai prijungiant polines funkcines grupes ant paviršiaus. Sorbentai, padengti įvairiomis polinėmis funkcinėmis (pvz. ciano, diolio, amino, amido) bei cviterjoninėmis (sulfoalkilbetaino, fosforilcholino) grupėmis (8 pav.), yra komerciškai prieinami ir naudojami HILIC atskyrimui [40, 64].



**8 pav.** HILIC stacionarių fazių funkcinės grupės. A – silikagelis, B – aminopropilas, C – triazolis, D – diolis, E – kryžminio ryšio diolis, F – amidas, G – sulfoalkilbetainas, H – fosforilcholinas. [64]

HILIC naudojamos mobilios fazės yra organinės (> 60 % tirpiklio, dažniausiai naudojamas acetonitrilas (ACN)), turinčios nedidelį kiekį vandens/buferio [61]. Taip pat gali būti naudojami alkoholiai, tačiau siekiant gauti tokį patį analitės sulaikymą kaip aprotinio tirpiklio-vandens mišinio atveju, reikalinga žymiai didesnė jų koncentracija. Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijai ant polinių stacionarių fazių naudojamos organinės fazės, įprastai turinčios sudėtyje 5 - 40 % vandens ar lakaus buferio, jei vykdoma MS ar įkrauto aerosolio detekcija.

Mobilios fazės pH ir joninė jėga daro stiprią įtaką jonizuojamų analičių sulaikymui ir atskyrimui. Buferinės druskos ir mobilios fazės priedai, tokie kaip amonio acetatas, amonio formiatas, amonio fosfatas ir trifluoracto rūgštis, yra naudojami siekiant kontroliuoti judrios fazės pH ir joninę jėgą, pagerinti smailių formą ir kontroliuoti analitės poliškumą, kuris lemia skirtingą analičių sulaikymą [57, 65]. Be to, jei tiriamos galinčios jonizuotis medžiagos, pH turi būti koreguojamas, kad būtų užtikrinama, jog analizė turės vienintelę joninę formą [66].

Organinio tirpiklio parinkimas stipriai veikia sulaikymą. Eliucinė tirpiklių geba HILIC metode įprastai didėja stiprėjant jų poliškumui ir gebėjimui dalyvauti protono-donor/protono-akceptorius sąveikose: metanolis > etanolis > 2-propanolis > THF > ACN. ACN yra patraukliausias organinis junginys, nes judrios fazės, kurių sudėtyje kiti tirpikliai, dažnai suteikia nepakankamą sulaikymą ir plačias arba nesimetriškas smailes [67].

HILIC atskyrimas gali būti vykdomas tiek izokratiniu režimu, tiek gradientiniu. Dirbant izokratiniu režimu, mobilios fazės sudėtis viso tyrimo metu lieka ta pati. Gradientinio režimo atveju judrios fazės sudėtis keičiasi, palaipsniui didinamas vandens kiekis [66, 68]. Didelis acetonitrilo kiekis pradiniam mišinyje reikalingas sėkmingam analičių, pasižyminčių mažu giminingumu

stacionariai fazei, sulaikymui. Didinant vandens kiekį eliuente, desorbuojamos stipriai sulaikomos analitės, vykdoma kolonėlės regeneracija. Gradiento tipas pasirenkamas priklausomai nuo sorbento prigimties, į judrios fazės sudėtį įeinančio organinio tirpiklio ir mėginio analičių prigimties [68].

Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija turi daug specifinių pranašumų nei įprasti normalių ar atvirkščių fazių chromatografijos metodai. Pavyzdžiui, šis analizės būdas yra tinkamas tirti analites, kurios yra beveik nesulaikomos tiriant atvirkščių fazių chromatografijos būdu. Be to, kitaip nei normalių fazių skysčių chromatografijoje, polinės analitės puikiai tirpsta hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijoje naudojamoje vandeninėje judrioje fazėje. Taip pat taikant šį analizės būdą nereikalingi brangūs jonų porų reagentai, galima jį susieti su masių spektrometrija. Dar HILIC galima tirti krūvį turinčias medžiagas, kaip jonų mainų chromatografijoje. Taigi, šis metodas apjungia net tris plačiai taikomus tradicinius chromatografinius metodus – normalių fazių, atvirkščių fazių ir jonų mainų chromatografiją [69].

Iš pradžių HILIC pagrinde buvo naudojamas tik angliavandenių, aminorūgščių ir peptidų atskyrimui ir nustatymui, tačiau nuo to laiko buvo įrodyta, jog šis metodas taip pat gali būti sėkmingai taikomas tiriant mažas molekules, metabolitus, toksinus, oligosacharidus, aminorūgštis, baltymus ir kitus junginius. Pastaraisiais metais susidomėjimas hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija ypatingai išaugo dėl nuolat didėjančios vaistinių preparatų ir biologiškai svarbių junginių tyrimų paklausos proteomikoje, glikomikoje ir klinikiniuose tyrimuose [65, 70]. Taip pat HILIC tapo naudingas atliekant narkotinių medžiagų, antibiotikų, maisto bei vandens tyrimus ir yra taikomas biochemijos, farmacijos, agrikultūros, maisto ir kitose srityse [71].

## 2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

### 2.1. Naudota įranga ir reagentai

Darbe naudota sertifikuota pamatinė medžiaga Lab mix 24, 5 komponentai: fruktozė, gliukozė, sacharozė, maltozė ir laktozė, 20 g/L kiekvieno, 95 % vandens, 5 % acetonitrilo tirpale.

Naudoti reagentai: acetonitrilas ( $\geq 99,95$  %, VWR Chemicals), chloroformas ( $\geq 98,5$  %, Chempur), n-heksanas ( $\geq 95,0$  %, VWR Chemicals), kalio heksaciano feratas(II) trihidratas ( $\geq 99,5$  %, Eurochemicals), cinko sulfatas heptahidratas ( $\geq 99$  %, Eurochemicals), dejonizuotas vanduo.

Naudoti tirpalai: Carrez I ir Carrez II. Carrez I paruošimas: 15 g kalio heksaciano ferato(II) trihidrato ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) tirpinama 60 mL vandens ir tūris matavimo kolbutėje privedamas iki 100 mL. Tirpalo koncentracija – 150 g/L. Carrez II tirpalo paruošimas: 30 g cinko sulfato heptahidrato ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) tirpinama 60 mL vandens ir tūris matavimo kolbutėje privedamas iki 100 mL.

Naudotos priemonės: chromatografiniai indeliai (1,5 mL, 32 x 11,6 mm, Thermo Scientific), stikliniai indeliai su tefloniniu kamščiu (12 mL, borosilikatinio stiklo, Thermo Scientific), 50 ir 100 mL matavimo kolbos (A klasė), 25 mL matavimo cilindras, 20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L ir 0,5-5 mL tūrio automatinės pipetės, filtrinis popierius (Whatman 4), 2 mL vienkartiniai švirkštai, polietersulfono membraniniai filtrai (Clearline, 0,45  $\mu$ m, 25 mm), analitinės svarstyklės (Sartorius), stikliniai mėgintuvėliai, stikliniai piltuvėliai. Mėginio paruošimui naudotos kietafazės ekstrakcijos kolonėlės: Phenomenex Strata C18-E (55  $\mu$ m) 200 mg/ 3 mL; Phenomenex Strata-X 33  $\mu$ m Polymeric Reversed Phase 200 mg/ 3 mL; Phenomenex Strata-X 33  $\mu$ m Polymeric Reversed Phase 60 mg/ 3 mL.

Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografinė analizė atlikta naudojant HPLC sistemą Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus su lūžio rodiklio detektoriumi Shimadzu RID-20A. Naudotos chromatografinės kolonėlės: Phenomenex 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m, Silica, 100Å ir Phenomenex 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m, Amino/Amide polyol, 100Å.

### 2.2. HILIC metodo sąlygos

- Chromatografinė sistema: skystinis chromatografas Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus su lūžio rodiklio detektoriumi Shimadzu RID-20A;
- Chromatografinė kolonėlė: Phenomenex 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m, Amino/Amide polyol, 100Å;
- Kolonėlės temperatūra: 35 °C;
- Judrios fazės sudėtis: 80 % acetonitrilas, 20 % vanduo;
- Izokratinis režimas;
- Judrios fazės tekėjimo greitis: 1 mL/min;
- Mėginio tūris: 1 mL;
- Injekcijos tūris: 10  $\mu$ L.

### 2.3. Kalibracinės kreivės paruošimas

Kalibracinei kreivei sudaryti buvo naudota sertifikuota pamatinė medžiaga Lab mix 24, turinti 5 komponentus: fruktozė, gliukozė, sacharozė, maltozė ir laktozė, 20 g/L kiekvieno, 95 % vandens, 5 % acetonitrilo tirpale. Iš šio tirpalo buvo ruošiami tokios koncentracijos tirpalai: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 ir 7,5 mg/mL. Mėginio tirpiklio sudėtis: 50 % vandeninis tirpalas ir 50 % acetonitrilas.

## 2.4. Mėginio paruošimas

**Pieno mėginių paruošimas.** Matavimo cilindru atmatuojama 20 mL mėginio ir vykdomas baltymų atskyrimas – pilama po 1 mL Carrez I ir Carrez II tirpalų, skiedžiama matavimo kolboje iki 50 mL. Tuomet gerai išmaišoma ir gautos nuosėdos filtruojamos. Vėliau vykdomas riebalų pašalinimas, paimama 3 mL filtrato ir įpilama į stiklinį indelį, pridedama 1 mL chloroformo ir gerai išplakama. Nusistovėjus fazėms, imama 0,5 mL viršutinio sluoksnio ir chromatografiniame indelyje sumaišoma su 0,5 mL acetonitrilo.

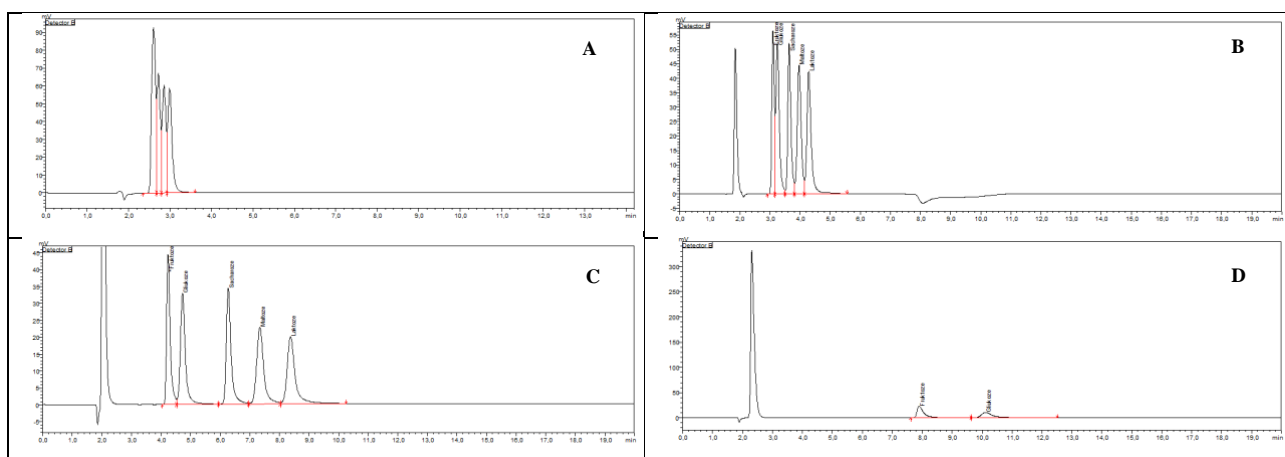
**Jogurto ir kečupo mėginių paruošimas.** Pasveriami po maždaug 5 g mėginio, kolboje skiedžiama apytiksliai 30 mL vandens ir vykdomas baltymų pašalinimas: pilama po 0,5 mL Carrez I ir Carrez II tirpalų į praskiestus kečupo mėginius ir po 1 mL į jogurto mėginius. Tuomet skiedžiama matavimo kolboje iki 50 mL, nuosėdos filtruojamos. Riebalų pašalinimas: imama 3 mL filtrato ir sumaišoma su 1 mL chloroformo. Atsiskyrus fazėms imama 0,5 mL viršutinio sluoksnio ir chromatografiniame indelyje sumaišoma su 0,5 mL acetonitrilo.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Optimalių HILIC sąlygų parinkimas

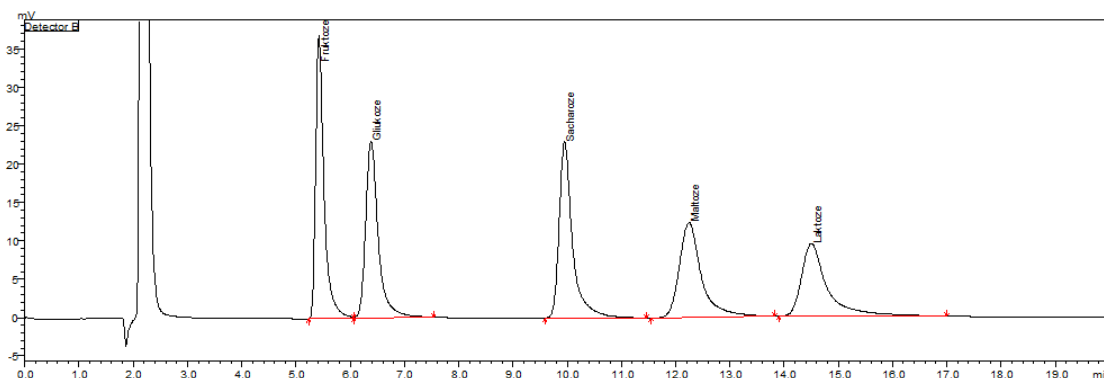
##### 3.1.1. Judrios fazės parinkimas

Darbo metu buvo parenkama optimali judrios fazės sudėtis. Judria faze naudoti acetonitrilo vandens mišiniai, kuriuose šie tirpikliai buvo maišomi santykiais ACN/H<sub>2</sub>O (%): A – 55/45, B – 65/35, C – 75/25, D – 85/15. Judrioje fazėje esant dideliame vandens kiekiui (45 % – 9A pav.), analičių sulaikymo trukmės labai mažos, taip pat ir skiriamoji geba, jos nėra pilnai atskiriamos. Mažinant vandens kiekį mišinyje, atskyrimas gerėja (9B ir 9C pav.), tačiau judrioje fazėje esant 15 % (9D pav.) vandens, analitės jau yra per stipriai sulaikomos, per 20 minučių atskiriamos tik fruktozė ir gliukozė.



9 pav. Judrios fazės sudėties parinkimas. ACN/H<sub>2</sub>O (%): A – 55/45, B – 65/35, C – 75/25, D – 85/15.

Vandens kiekiai buvo keisti po 10 %, optimaliausia judrios fazės sudėtis gauta esant 75 % acetonitrilo, 25 % vandens. Kai yra daugiau vandens, analitės prasčiau atskiriamos dėl mažo jų sulaikymo. Esant 15 % vandens, gliukozė žymiai geriau atskiriama nuo fruktozės, tačiau labai pailgėja tyrimo laikas, todėl buvo nuspręsta dar patikrinti tarpinį variantą, t.y. kai judrios fazės mišinyje yra 20 % vandens (10 pav.). Nustatyta, jog tokia fazės sudėtis yra optimaliausia analičių atskyrimui ir nustatymui, fruktozė nuo gliukozės geriau atskiriama, kitos analitės taip pat gerai atskiriamos viena nuo kitos, tyrimo laikas taip pat optimalus.

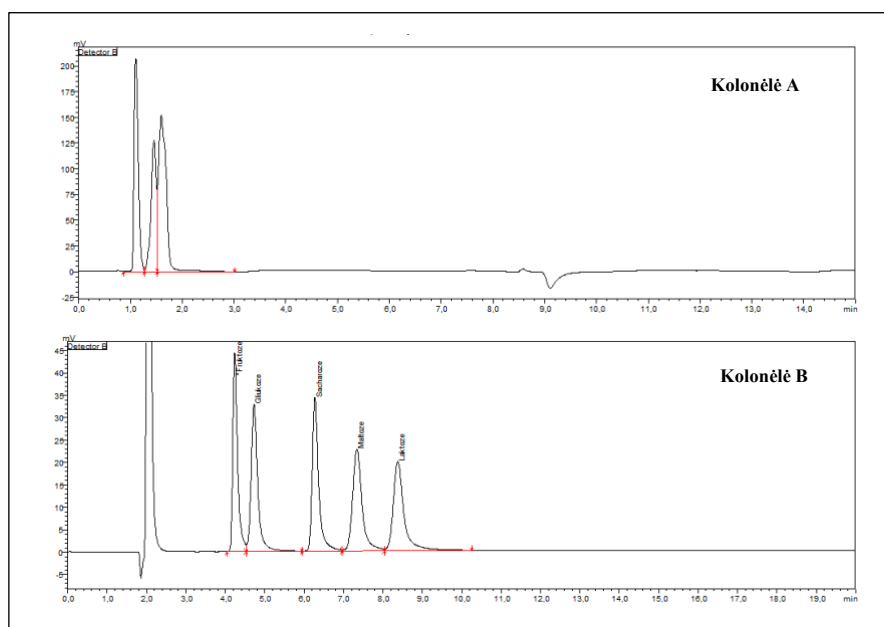


10 pav. Cukrų atskyrimas, kai judrios fazės sudėtis ACN/H<sub>2</sub>O (%): 80/20.

Organinio tirpiklio ir vandens santykis judrioje fazėje yra lemiamas HILIC sulaikymo kontrolės veiksnys. Mažinant vandens, kuris yra stiprus eliuentas, koncentraciją, stiprėja analičių sulaikymas – šis reiškinys yra siejamas su sumažėjusiu ištirpusių hidrofilinių junginių pasiskirstymu tarp skystų fazių ir/ar padidėjusia junginių adsorbcija ant stacionarios fazės. Esant dideliems acetonitrilo kiekiams (80 - 95 %), sulaikymas gali padidėti eksponentiškai. Iš kitos pusės, didėjant vandens kiekiui mobilioje fazėje, didėja ištirpusių polinių junginių dalis jame, silpnėjant sulaikymui [72].

### 3.1.2. Nejudrios fazės (kolonėlės) parinkimas

Be judrios fazės, taip pat buvo parenkama ir nejudri fazė, t.y. kolonėlė. Buvo naudotos 2 vienodo dydžio kolonėlės, užpildytos vienodo dydžio sorbento dalelėmis. Tik viena kolonėlė silikagelio, o kita silikagelio, modifikuoto amino ir amido grupėmis. Kaip matoma iš gautų chromatogramų (11 pav.), silikagelio kolonėlė nebuvo tinkama analičių atskyrimui, o modifikuoto silikagelio kolonėlėje buvo pilnai atskirtos visos 5 analitės.

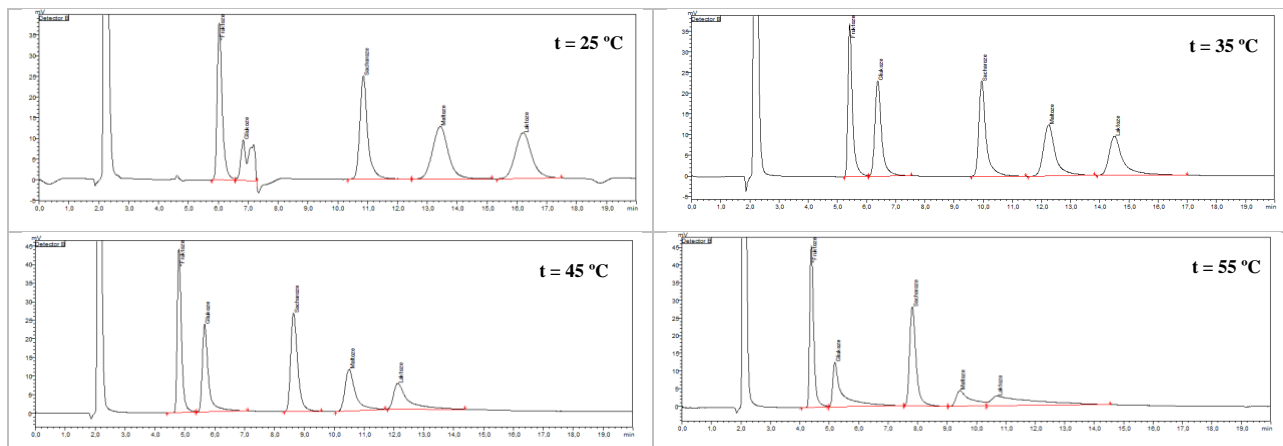


**11 pav.** Kolonėlės parinkimas. Kolonėlė A: Phenomenex 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m, Silica, 100Å.  
Kolonėlė B: Phenomenex 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m, Amino/Amide polyol, 100Å.

Naudojant nmodifikuoto silikagelio kolonėles, reikalingas cukrų derivatizavimas [74]. Ant silikagelio paviršiaus esančios silanolinės grupės jonizuojasi, susidarant neigiamai įkrautam sluoksniui, kurio dėka susidaro paviršinis vandens sluoksnis ir vyksta hidrofilinis pasiskirstymas [63]. Amino bei amido grupėmis modifikuotose kolonėlėse be hidrofilinio pasiskirstymo dar papildomai vyksta vandenilio ryšių susidarymas tarp cukrų hidroksigrupių ir stacionarios fazės amino ir amido grupių, tai lemia stipresnę sulaikymą, sulaikymo trukmė didėja ilgėjant oligosacharido grandinei [74, 75].

### 3.1.3. Kolonėlės temperatūros parinkimas

Parinkus tinkamą kolonėlę, taip pat buvo tiriama optimali jos temperatūra tinkamam atskyrimui. Buvo atlikti matavimai 25, 35, 45 ir 55 °C temperatūroje. Geriausias atskyrimas gautas 35 laipsnių temperatūroje (12 pav.) – analitės puikiai atskirtos, smailės gana simetriškos.

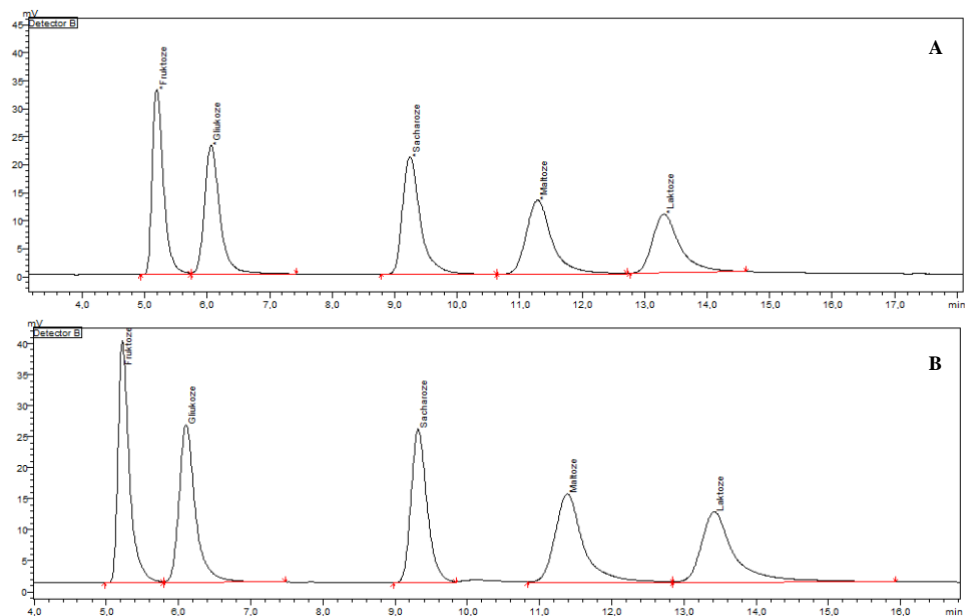


12 pav. Kolonėlės temperatūros parinkimas.

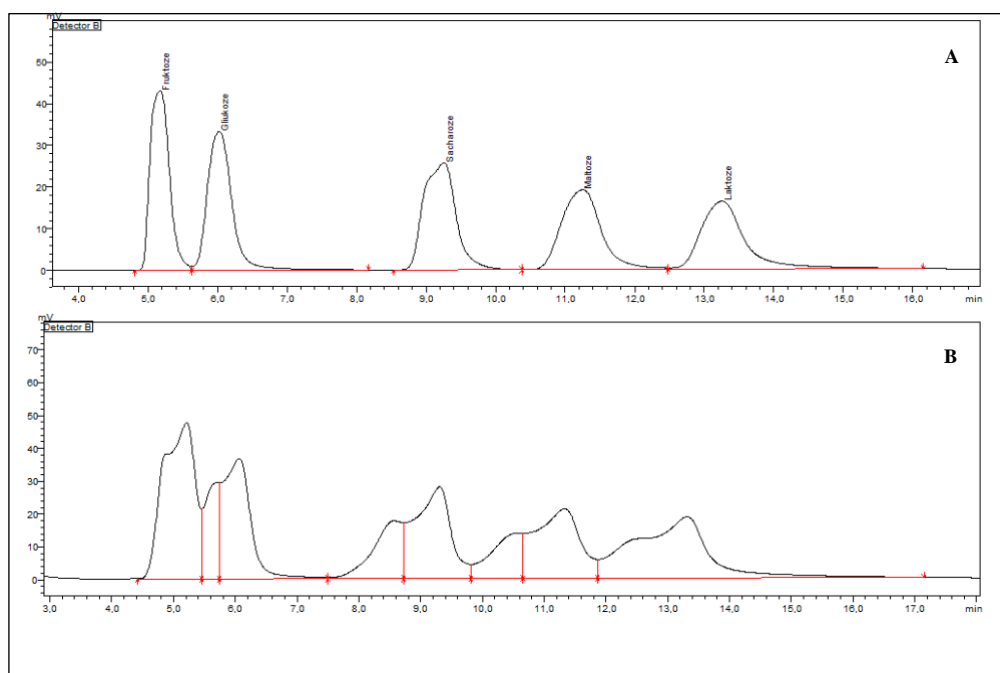
Didinant kolonėlės temperatūrą, įprastai HILIC sulaikymas ir selektyvumas silpnėja [72, 73]. Taip pat kolonėlės temperatūra lemia angliavandenių ir panašių analičių chromatografinį elgesį, pavyzdžiui, ištirpinus gliukozę, vyksta tautomerizacija ir susidaro kelių jos tautomerų pusiausvyrinis mišinys; esant žemesnei temperatūrai, gali vykti pagrindinių izomerų –  $\alpha$ - ir  $\beta$ -gliukopiranozių atskyrimas ir susidaryti 2 nepilnai atskirtos smailės [73]. Tai matoma ir 12 paveiksle pavaizduotose chromatogramose – keliant temperatūrą, analitės išeina iš kolonėlės greičiau, yra prasčiau atskiriamos; esant žemiausiai kolonėlės temperatūrai ( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), susidaro dviguba gliukozės smailė, kuri didinant temperatūrą tampa viena smaile.

### 3.1.4. Mėginio tirpiklio įtakos chromatografiniam atskyrimui tyrimas

Siekiant nustatyti, kokią įtaką chromatografiniam atskyrimui daro mėginio tirpiklis, buvo paruošti 5 mg/mL tirpalai, turintys skirtingą tirpiklio kompoziciją – H<sub>2</sub>O/ACN: 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50. Nustatyta, jog esant mažoms mėginio injekcijoms (10 μL), mėginio tirpiklio sudėtis beveik neturi įtakos atskyrimui (13 pav.), tačiau didinant įleidžiamo mėginio tūrį, atskyrimas prastėja (14 pav.).



13 pav. Analinių atskyrimas, kai injektuojamo mėginio tūris 10 μL. A – H<sub>2</sub>O/ACN (%): 90/10, B – H<sub>2</sub>O/ACN (%): 60/40.



14 pav. Analinių atskyrimas, kai injektuojamo mėginio tūris: A – 20 μL, B – 40 μL. H<sub>2</sub>O/ACN (%): 90/10.



Tiriant nedidelės molekulinės masės junginius, geriausi rezultatai gaunami, kai tirpiklis – grynas acetonitrilas, kuris yra silpniausias HILIC eliuentas. Tačiau mėginio tirpiklyje esant didelėms ACN koncentracijoms, susiduriama su polinių analičių tirpumo problema. Didinant vandens kiekį injektuojamo mėginio tirpale, prastėja kolonėlės efektyvumas dėl judrioje fazėje atsirandančio stipresnio eliuento, prastėja analičių sulaikymas, gaunamos iškraipytos, plačios smailės (tai pastebima ir 13 pav. esančiose chromatogramose – mėginio tirpiklyje esant 90 % vandens). Šis efektas stiprėja didėjant vandens koncentracijos injektuojamo mėginio tirpiklyje ir mobilioje fazėje skirtumui; jį galima labai sumažinti pasirenkant minimalų įleidžiamo mėginio tūrį [76, 77].

### 3.1.5. Mėginio paruošimo chromatografiniam tyrimui optimizavimas

Prieš tiriant mėginius HILIC metodu su universaliu RID detektoriumi, svarbu kuo labiau supaprastinti mėginių matricą iš jų pašalinant kaip įmanoma daugiau netikslinių junginių, galinčių sąveikauti su stacionaria faze ar trukdyti detekcijai. Todėl buvo optimizuojama mėginio paruošimo procedūra, kurios metu pašalinami iš mėginio matricos baltymai ir riebalai.

Baltymai įprastai iš mėginio išskiriami juos nusodinant. Tai galima atlikti įpilant organinio tirpiklio ar druskų tirpalų. Organinio tirpiklio (pvz. acetonitrilo) pridėjimas lemia mėginio, kuriame yra baltymų, dielektrinės konstantos sumažėjimą, o tai lemia vandens išstūmimą iš baltymo paviršiaus hidrofobinio regiono, suardomos hidrofobinės sąveikos tarp baltymų mėginyje, todėl baltymai iš tirpalo iškrenta į nuosėdas [78]. Atliekant baltymų nusodinimą druskų tirpalais, įprastai naudojami Carrez I (kalio heksacianoferatas) ir Carrez II (cinko sulfatas) tirpalai. Įpylus Carrez tirpalų į mėginį, susidaro mažai tirpus cinko heksacianoferatas(II) ( $Zn_2[Fe(CN)_6]$ ), kuris pritraukia didelės molekulinės masės junginius, tuo pačiu ir baltymus, vykstant adsorbicijai, ir susidaręs kompleksas iškrenta į nuosėdas [79]. Ir vienu, ir kitu atveju, susidariusios nuosėdos atskiriamos filtruojant [78, 79].

Baltymai ir riebalai gali būti išskirti pasitelkiant kietafazę ekstrakciją – šiuo atveju naudojamos sorbentu užpildytos kolonėlės, kuriose baltymai sąveikauja su sorbentu ir yra sulaikomi. Xu et al savo darbe cukrų gryninimui naudojo C18 kietafazės ekstrakcijos kolonėles [80].

Dėl paprastos, vieno žingsnio mėginio valymo procedūros, šio darbo metu iš pradžių baltymus ir riebalus bandyta atskirti naudojant būtent kietafazės ekstrakcijos sorbentus. Darbo metu buvo išbandyti šie sorbentai: Phenomenex Strata C18-E (55  $\mu$ m) 200 mg/ 3 mL kietafazės ekstrakcijos kolonėlės, polimerinės atvirkščių fazių kolonėlės (Phenomenex Strata-X 33  $\mu$ m Polymeric Reversed Phase 200 mg/ 3 mL bei Phenomenex Strata-X 33  $\mu$ m Polymeric Reversed Phase 60 mg/ 3 mL). Kolonėlės buvo testuojamos leidžiant per jas pieno mėginius. Nustatyta, jog kietafazės ekstrakcijos kolonėlėmis negalima atskirti mėginyje esančių baltymų (iš kolonėlės išėjęs mėginys vertintas vizualiai). Siekiant sumažinti į kolonėlę patenkančių baltymų kiekį, buvo bandoma mėginius prieš valymą skiesti, tačiau net ir daug kartų praskiedus mėginį nei viena iš tirtų kietafazės ekstrakcijos kolonėlių norimo rezultato nedavė.

Vėliau buvo bandoma baltymus atskirti iš mišinio juos nusodinant acetonitrilu ir nuosėdas filtruojant. Siekiant įsitikinti, kad baltymai pašalinti, į skaidrą filtratą buvo papildomai įpilama Carrez tirpalų ir stebima, ar ims kristi nuosėdos. Šis bandymas parodė, kad baltymų išsodinimo acetonitrilu procedūra nėra tinkama. Tai matoma 15 paveiksle esančioje nuotraukoje: dešinėje pusėje mėginys po baltymų išsodinimo acetonitrilu, o kairėje esančiame buteliuke – filtratas po Carrez tirpalų pridėjimo.



**15 pav.** Baltymų nusodinimo acetonitrilu tyrimas. Kairėje – filtratas po Carrez tirpalų pridėjimo, dešinėje – mėginys po baltymų išsodinimo acetonitrilu.

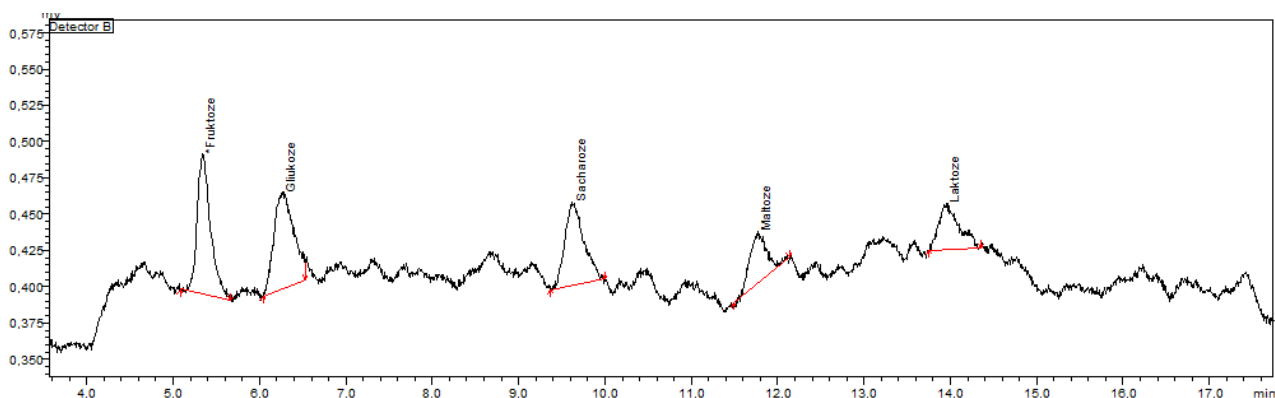
Kadangi kietafazės ekstrakcijos kolonėlės bei acetonitrilas nebuvo tinkami baltymų atskyrimui, nuspręsta baltymus nusodinti Carrez I ir Carrez II tirpalais. Įpylus šių tirpalų, baltymai iškrito į nuosėdas, kurios buvo filtruojamos. Mėginys po ekstrakcijos tapo visiškai skaidrus, šios procedūros metu sėkmingai pašalinti baltymai.

Pašalinus iš mėginio baltymus, taip pat buvo pašalinami ir riebalai. Riebalų ekstrakcijai dažniausiai yra naudojami organiniai tirpikliai, tokie kaip metanolis, butanolis, dichlormetanas, chloroformas ar n-heksanas [81]. Šio darbo metu buvo vykdoma ekstrakcija su vandeniu nesimaišančiais tirpikliais – chloroformu ir n-heksanu. Iš pradžių ekstrakcija buvo vykdoma sertifikuotos pamatinės medžiagos tirpale ir atliekama chromatografinė analizė siekiant nustatyti, ar ekstrakcijos metu nėra pašalinama dalis analičių. Nustatyta, jog po ekstrakcijos tiek vienu, tiek kitu tirpikliu analičių koncentracijos nesumažėja. Vėliau buvo atliekama riebalų ekstrakcija realiuose mėginiuose. Nustatyta, kad tiek chloroformu, tiek n-heksanu galima sėkmingai pašalinti riebalus iš mėginio matricos. Nuspręsta šiam tikslui naudoti chloroformą dėl patogaus atskyrimo – viršuje lieka vandeninė fazė, kurią lengva paimti automatinės pipetės pagalba, nereikalingi dalijamieji piltuvai ir kitos papildomos priemonės fazių atskyrimui.

### 3.2. Kalibracinių kreivių sudarymas

Buvo sudaromos kalibracinės kreivės. Tam parinkti tokios koncentracijos tirpalai: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/mL. Nustatyta, jog 0,01 mg/mL koncentracijos neįmanoma

kiekybiškai įvertinti, nes ji yra žemiau nustatymo ribos, t.y. smailių ir triukšmų santykis (16 pav.)  $S/N < 10$  (1 lentelė). Todėl buvo vykdomas kalibravimas nuo 0,05 mg/mL, tai yra nustatymo riba. 10 mg/mL koncentracijos tirpale susidarė dvi nesimaišančios fazės. Taip yra todėl, kad cukrų koncentracija tirpale per didelė, jie nebetirpsta dėl tirpiklyje esančio acetonitrilo.

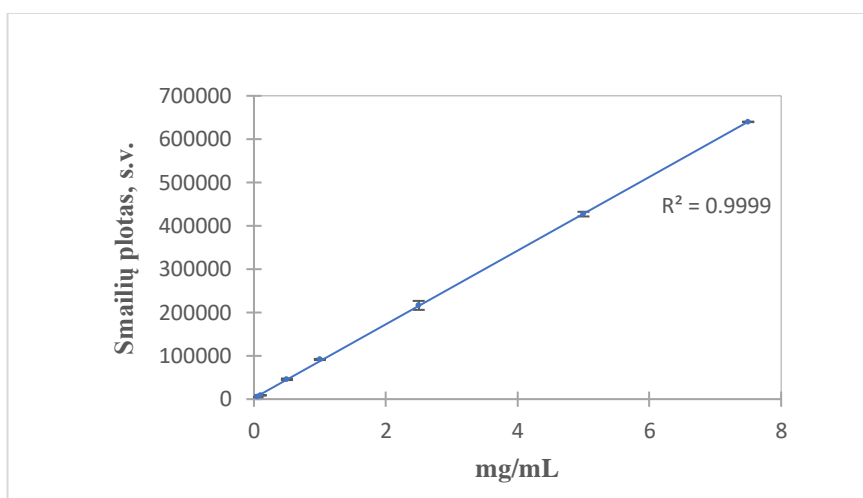


16 pav. 0,01 mg/mL koncentracijos tirpalo chromatograma.

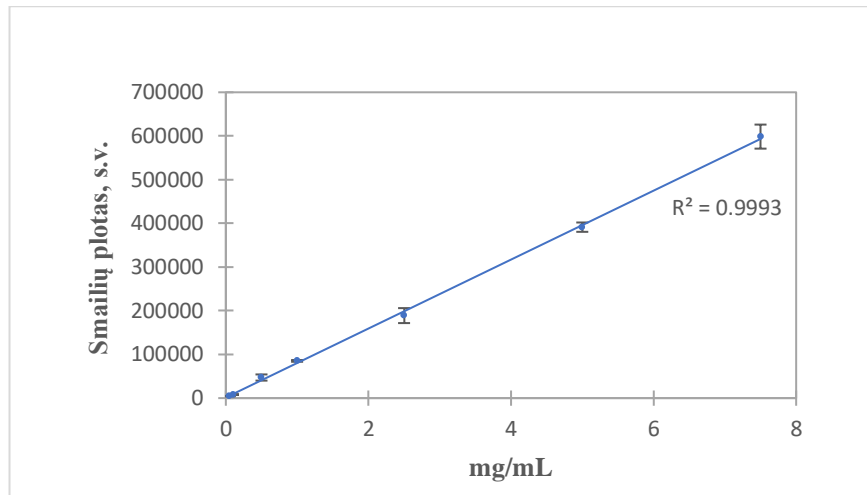
1 lentelė. 0,01 mg/mL analičių smailių ir triukšmų santykis.

Cukrus	S/N
Fruktozė	5
Gliukozė	4
Sacharozė	2,5
Maltozė	1,6
Laktozė	1,3

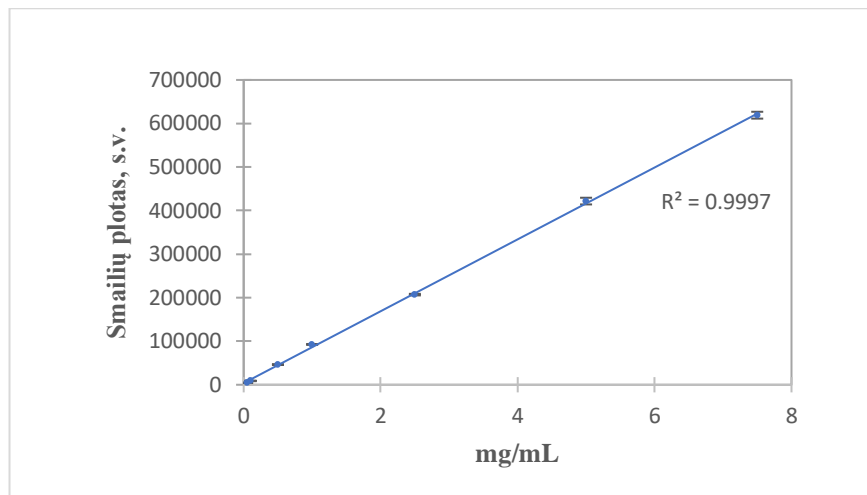
Gautos kalibracinės kreivės pavaizduotos 17-21 paveiksluose. Gautos tiesinės priklausomybės,  $R^2 = 0,9987 - 0,9999$ .



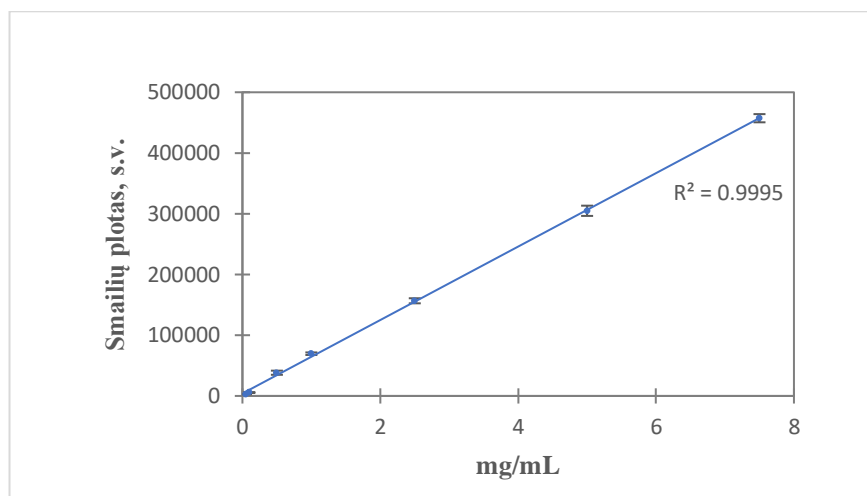
17 pav. Fruktozės kalibracinė kreivė



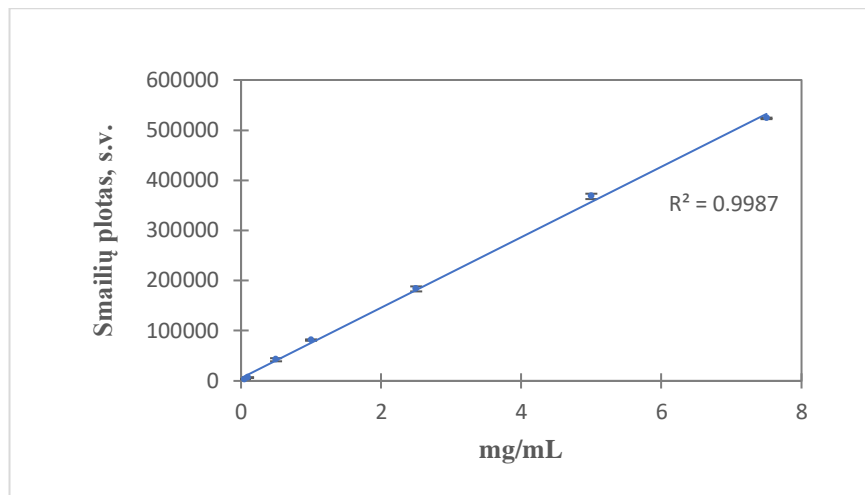
**18 pav.** Gliukozės kalibracinė kreivė



**19 pav.** Sacharozės kalibracinė kreivė.



**20 pav.** Laktozės kalibracinė kreivė.

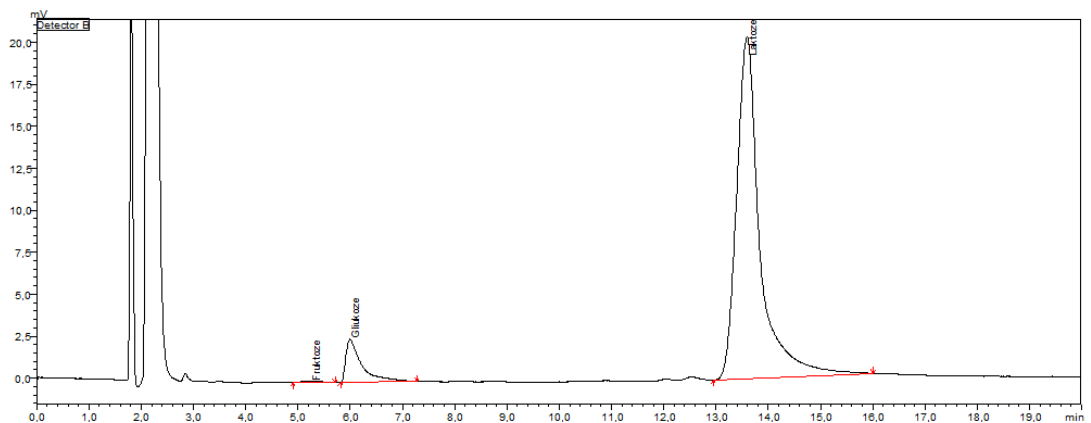


**21 pav.** Maltozės kalibracinė kreivė.

### 3.3. Realių mėginių tyrimas HILIC metodu

Nustčius optimalias tyrimo sąlygas, buvo parinkti tokie mėginiai tyrimui: pienas, pienas be laktozės, kečupas ir jogurtas su mėlynėmis. Paruošus šiuos mėginius ir praskiedus chromatografiniame indelyje acetonitrilu santykiu 1:1, buvo vykdoma jų chromatografinė analizė. Gautos chromatogramos pavaizduotos 22-25 paveiksluose.

Ištirus pieno mėginį (22 pav.) nustatyta, jog didžiąją cukrų dalį sudaro laktozė, taip pat yra nedidelis kiekis fruktozės bei gliukozės. Gautos analičių koncentracijos pateiktos 2 lentelėje.

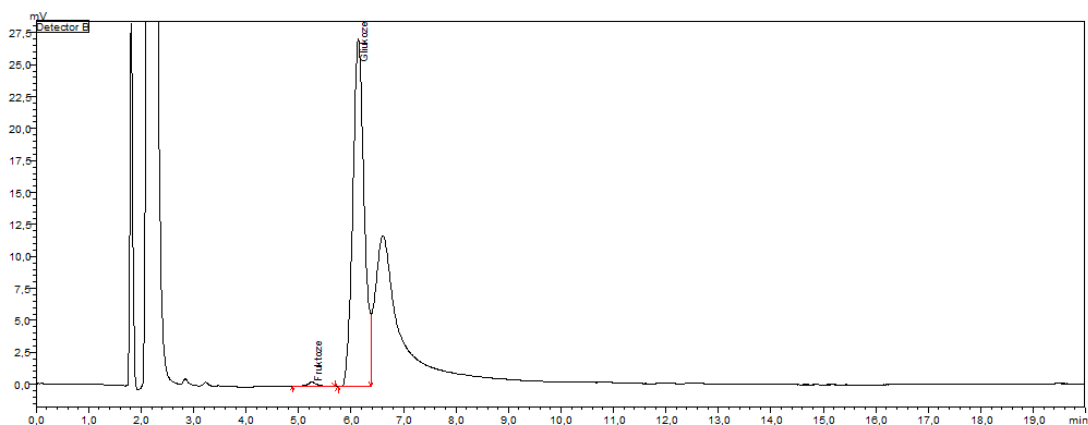


**22 pav.** Pieno mėginio chromatograma.

**2 lentelė.** Cukrų koncentracijos pieno mėginyje.

Cukrus	c, g/100 mL	Neapibrėžtis, g/100 mL
Fruktozė	< 0,03	-
Gliukozė	0,34	0,01
Sacharozė	< 0,03	-
Maltozė	< 0,03	-
Laktozė	4,24	0,04

Palyginimui taip pat buvo tirtas to paties gamintojo pieno be laktozės mėginys. Iš 23 paveiksle pavaizduotos chromatogramos matoma, jog šiame mėginyje nėra laktozės smailės, tačiau gliukozės smailė žymiai didesnė, taip pat atsiranda papildoma smailė, kurios nėra tyrime naudotos pamatinės medžiagos chromatogramoje. Tai galaktozės smailė. Iš gautų rezultatų galima spręsti, jog šiame pieno produkte laktozė yra suskaidyta į savo sudėtines dalis – gliukozės bei galaktozės molekules. Deja, naudojant turimą pamatinę medžiagą neįmanoma tiksliai nustatyti galaktozės koncentracijos ir tuo pačiu bendro cukrų kiekio. Fruktozės ir gliukozės koncentracijos nustatytos kiekybiškai ir pateiktos 3 lentelėje.

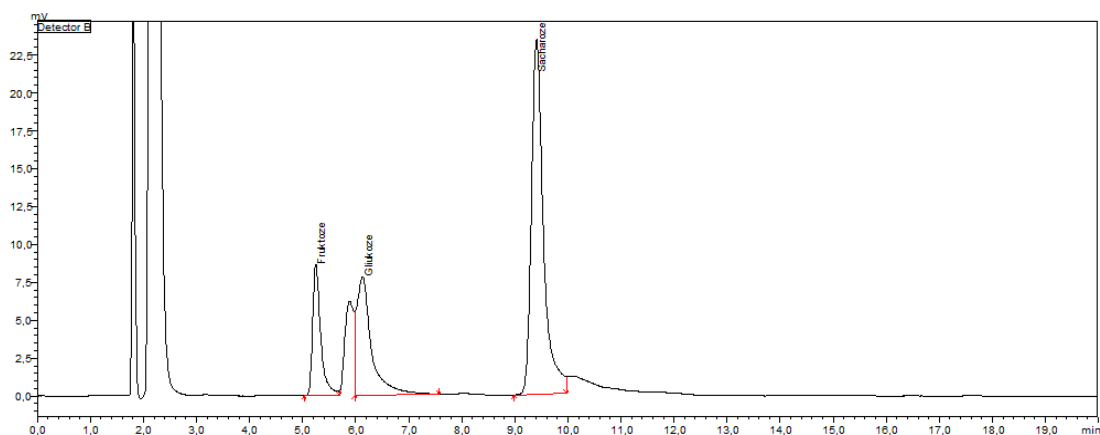


**23 pav.** Pieno be laktozės mėginio chromatograma.

**3 lentelė.** Cukrų koncentracijos pieno be laktozės mėginyje.

Cukrus	c, g/100 mL	Neapibrėžtis, g/100 mL
Fruktozė	0,04	0,001
Gliukozė	2,53	0,05
Sacharozė	< 0,03	-
Maltozė	< 0,03	-
Laktozė	< 0,03	-

Taip pat buvo tirtas kečupo mėginys. Jo chromatograma matoma 24 paveiksle. Nustatyta, jog šiame mėginyje daugiausia sacharozės, taip pat yra gliukozės bei fruktozės. Šiame mėginyje esančių cukrų koncentracijos pateiktos 4 lentelėje.

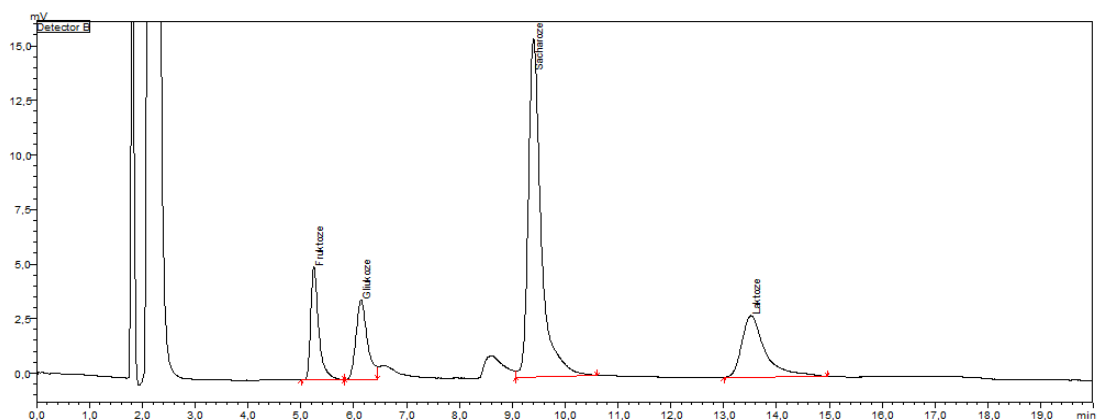


**24 pav.** Kečupo mėginio chromatograma.

**4 lentelė.** Cukrų koncentracijos kečupo mėginyje.

Cukrus	c, g/100 mL	Neapibrėžtis, g/100 g
Fruktozė	2,79	0,29
Gliukozė	4,98	0,51
Sacharozė	11,30	1,2
Maltozė	< 0,1	-
Laktozė	< 0,1	-

Ištyrus jogurto su mėlynėmis mėginį, gauta chromatograma, pavaizduota 25 paveiksle. Kadangi tai pieno produktas, jame rasta laktozės. Didžiąją cukrų dalį sudarė pridėtinis cukrus sacharozė, taip pat rasta fruktozės ir gliukozės. Nustatytos cukrų koncentracijos pateiktos 5 lentelėje.



**25 pav.** Jogurto mėginio chromatograma.

**5 lentelė.** Cukrų koncentracijos jogurto su mėlynėmis mėginyje.

Cukrus	c, g/100 mL	Neapibrėžtis, g/100 g
Fruktozė	1,37	0,008
Gliukozė	1,44	0,02
Sacharozė	6,53	0,06
Maltozė	< 0,1	-
Laktozė	2,64	0,04



## IŠVADOS

- Nustatytos optimalios hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijos sąlygos: silikagelio, modifikuoto amino ir amido grupėmis, chromatografinė kolonėlė; judrios fazės sudėtis – ACN/H<sub>2</sub>O (%): 80/20; kolonėlės temperatūra – 35 °C; mėginio tirpiklio sudėtis – ACN/H<sub>2</sub>O (%): 50/50; injekcijos tūris – 10 µL. Sudarytos kalibracinės kreivės, gautos tiesinės priklausomybės intervale 0,05-7,5 mg/mL,  $R^2 = 0,9987 - 0,9999$ . Metodo nustatymo riba – 0,05 mg/mL.
- Optimizuotas mėginio paruošimas chromatografiniam tyrimui: baltymų nusodinimas Carrez I ir II tirpalais; riebalų ekstrakcija chloroformu.
- Ištirti realūs mėginiai, susumavus gautas analičių koncentracijų vertes, gauti bendri cukrų kiekiai atitinka ant pakuočių deklaruojamas vertes. Tai įrodo, kad parengtas metodas tikslus ir yra tinkamas realių mėginių analizei.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Warshaw, H., Edelman, S.V. (2021). Practical Strategies to Help Reduce Added Sugars Consumption to Support Glycemic and Weight Management Goals. *Clin Diabetes*. 2021 Jan;39(1):45-56. doi: 10.2337/cd20-0034.
2. Stylianopoulos, C. Carbohydrates: Requirements and Dietary Importance, Editor(s): Benjamin Caballero, *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, Academic Press, 2013, p. 278–282.
3. Dornas, W. C., de Lima, W. G., Pedrosa, M. L., & Silva, M. E. (2015). Health Implications of High-Fructose Intake and Current Research. *Advances in Nutrition*, 6(6), 729–737. doi:10.3945/an.114.008144
4. Li, A., Zheng, J., Han, X., Jiang, Z., Yang, B., Yang, S., Zhou, W., Li, C., & Sun, M. (2023). Health implication of lactose intolerance and updates on its dietary management. *International Dairy Journal*, 140, 105608.
5. Buiarelli, F., Filippo, P. D., Pomata, D., Riccardi, C., & Rago, D. (2016). Determination of sugar content in commercial fruit juices by refractometric, volumetric and chromatographic methods. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 5(3), 75-84.
6. Cavazzini, A., Catani, M., Felinger, A. (2023) Hydrophilic interaction liquid chromatography (3rd ed), *Liquid Chromatography, Fundamentals and Instrumentation*, 1 (2023), pp. 227-249.
7. Cornerstone Analytical Laboratories interneto svetainė. [Interaktyvus]. Sugar Analysis. [Žiūrėta 2024 gegužės 20 d.]. Prieiga per internetą: <https://cornerstoneanalytical.com/sugar-analysis/>
8. Ziesenitz, S. C. (2015). Authorised EU health claim for fructose. *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims: Volume 2*, 189–215. doi:10.1016/b978-1-78242-382-9.00011-6
9. Blanco, A., Blanco, G. (2022). Chapter 4 – Carbohydrates. *Medical Biochemistry (Second Edition)*, Academic Press, 77-103.
10. V. Jakubkienė, *Organinė chemija: mokomoji knyga*, Vilnius: Vilniaus universiteto I-kla (2009).
11. Engelking, L. R. (2015). Carbohydrate Structure. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 118–123. doi:10.1016/b978-0-12-391909-0.50018-9
12. Lustig, R., Schmidt, L. & Brindis, C. (2012). The toxic truth about sugar. *Nature* 482, 27–29.
13. Zaitoun, M., Ghanem, M., & Harphoush, S. (2018). Sugars: Types and their functional properties in food and human health. *International Journal of Public Health Research*, 6(4), 93-99.
14. Facioni, M.S., Raspini, B., Pivari, F. et al. (2020). Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. *J Transl Med* 18, 260.
15. Teixeira, G. G., Santos, P. M. (2022). Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 113.
16. Magwaza, L. S., Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review, *Scientia Horticulturae*, Volume 184, 179-192.
17. Maguire, A., Baqir, W., Nunn, J.H. (2007). Are sugars-free medicines more erosive than sugars-containing medicines? An in vitro study of paediatric medicines with prolonged oral

- clearance used regularly and long-term by children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 17: 231-238.
18. Rao, P. S., Singh, P., Sharma, V., & Arora, S. (2021). Traditional analytical approaches for lactose residues determination in lactose hydrolysed milks: A review. *LWT*, 151, 112069. doi:10.1016/j.lwt.2021.112069
  19. Frank, E. A., Shubha, M. C., & D'Souza, C. J. M. (2012). Blood Glucose Determination: Plasma or Serum? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26(5), 317–320. doi:10.1002/jcla.21524
  20. Wang, D., Xu, Y., Hu, J. and Zhao, G. (2004), Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110: 340-346.
  21. BeMiller, J.N. (2010). Carbohydrate analysis, in *Food Analysis* (ed. S.S. Nielson), Springer, New York, pp. 147-177.
  22. Zhao JH, Li HX, Xi WP, An W, Niu LL, Cao YL, et al. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L) fruit during development and maturation. *Food Chemist*. (2015) 173:718–24. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.082
  23. Guo, Q., Cui, S. W., & Kang, J. (2014). Classical Methods for Food Carbohydrate Analysis. *Food Oligosaccharides*, 284–299. doi:10.1002/9781118817360.ch16.
  24. Chen YT, Hung WT, Wang SH, Fang JM, Yang WB, Quantitative Analysis of Sugar Ingredients in Beverages and Food Crops by an Effective Method Combining Naphthimidazole Derivatization and <sup>1</sup>H-NMR Spectrometry. *Functional Foods in Health and Disease* 2017; 7(7); 494-510.
  25. Alexander, P. W., Hartati, R. D., & Curtin, J. (1989). Automated Potentiometric End Point Determination in the Lane-Eynon Titration of Reducing Sugars. *Electroanalysis*, 1(3), 263–269. doi:10.1002/elan.1140010312
  26. Hernández-López, A., Sánchez Félix, D.A., Zuñiga Sierra, Z., García Bravo, I., Dinkova, T.D., Avila-Alejandre, A.X. Quantification of Reducing Sugars Based on the Qualitative Technique of Benedict. *ACS Omega*. 2020 Dec 10;5(50):32403-32410. doi:10.1021/acsomega.0c04467.
  27. Benedict R. S. A reagent for the detection of reducing sugars. A rapid method for the quantitative determination of sugar in urine. *J. Biol. Chem.* 1911, 57, 1193–1194.
  28. Coskun, O. (2016). Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. doi:10.14744/nci.2016.32757
  29. Feng, T., Sun, M., Song, S., Zhuang, H., & Yao, L. (2019). Gas chromatography for food quality evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality*, 219–265. doi:10.1016/b978-0-12-814217-2.00012-3
  30. Forgács, E., & Cserháti, T. (2003). Gas chromatography. *Food Authenticity and Traceability*, 197–217. doi:10.1533/9781855737181.1.197
  31. Hajslova, J. & Cajka, Tomas. (2008). Gas chromatography in food analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*, p.119-144.
  32. de Hoffman, E., Strooband, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Third edition. John Wiley & Sons.
  33. Medeiros, P. M., & Simoneit, B. R. T. (2007). Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141(2), 271–278. doi:10.1016/j.chroma.2006.12.017

34. Wahjudi, P. N., Patterson, M. E., Lim, S., Yee, J. K., Mao, C. S., & Lee, W.-N. P. (2010). Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 43(1-2), 198–207. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009
35. Ruiz-Matute, A. I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 879(17-18), 1226–1240.
36. Parkinson, D. R. (2012). Analytical Derivatization Techniques. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 559–595. doi:10.1016/b978-0-12-381373-2.00060-0
37. Timperman, A.T., Reschke, B., Kelly, K. (2008). Liquid Chromatography. In: Li, D. (eds) *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. Springer, Boston, MA.
38. Pande, A.S. (2023). *Advanced Techniques and Future Trends in Laboratory Science – Part 1*. p.11.
39. Sarker, S. D., & Nahar, L. (2015). Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, 405–425. doi:10.1016/b978-0-12-800874-4.00019-2
40. Jandera, P. (2008). Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science*, 31(9), 1421–1437. doi:10.1002/jssc.200800005
41. Jandera, P. (2005). Liquid chromatography—normal phase. In: *Encyclopedia of analytical science*, 2nd edn. Elsevier, Oxford, pp 142–152
42. Moldoveanu, S., David, V. (2022). Chapter 12 - Other HPLC separations performed on polar stationary phases. *Essentials in Modern HPLC Separations (Second Edition)*, Elsevier, 479-484.
43. Lafont, R., Blais, C., Harmatha, J., & Wilson, I. D. (2013). Ecdysteroids: Chromatography. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.04726-0
44. Aguilar, MI. (2004). Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: Aguilar, MI. (eds) *HPLC of Peptides and Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol 251. Springer, Totowa, NJ.
45. El Rassi, Z. (2021). Chapter 2 - Reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. *Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques (Second Edition)*, Elsevier, 35-124.
46. Studzińska, S., Bocian, S., Siecińska, L., & Buszewski, B. (2017). Application of phenyl-based stationary phases for the study of retention and separation of oligonucleotides. *Journal of Chromatography B*, 1060, 36–43. doi:10.1016/j.jchromb.2017.05.033
47. Neue, U. D. (2007). Chromatography: Liquid. Mechanisms: Reversed Phases. *Encyclopedia of Separation Science*, 1–7. doi:10.1016/b0-12-226770-2/00311-2
48. Grönberg, A. (2018). Ion Exchange Chromatography. *Biopharmaceutical Processing*, 379–399. doi:10.1016/b978-0-08-100623-8.00018-9
49. Jandera, P. (2020). Comparison of various modes and phase systems for analytical HPLC. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, 1–91. doi:10.1016/b978-0-444-64070-3.00001-1
50. Li, D., & Liu, S. (2019). Drinking Water Detection. *Water Quality Monitoring and Management*, 251–267. doi:10.1016/b978-0-12-811330-1.00010-7

51. Locatelli, M., Melucci, D., Carlucci, G., & Locatelli, C. (2012). Recent HPLC Strategies to Improve Sensitivity and Selectivity for the Analys of Complex Matrices. *Instrumentation Science & Technology*, 40(2-3), 112–137. doi:10.1080/10739149.2011.6516
52. Swartz, M. (2010). HPLC Detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130–1150.
53. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed., Wiley, Hoboken, N. J., 2010.
54. Garg E, Zubair M. Mass Spectrometer. [Updated 2023 Jan 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
55. Jasutienė, I., Gibaitė, Ž., Vilkevičienė, N., Stankienė, J. (2012). Chromatografinis sacharidų nustatymas maistinėse matricose su garinančiu šviesos išbarstymo detektoriumi. *Maisto chemija ir technologija*. 2012. p. 13-18.
56. Suksom, W., Wannachai, W., Boonchiangma, S. et al. Ion Chromatographic Analysis of Monosaccharides and Disaccharides in Raw Sugar. *Chromatographia* 78, 873–879 (2015).
57. Buszewski B, Noga S. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1):231-47. doi: 10.1007/s00216- 011-5308-5.
58. Irgum, K.; Hemstrom, P. J. *Sep. Sci.* 2006, 29(12), 1784–1821.
59. R. P. W. Scott, S. Traiman, *Chromatogr.*, 196 (1980) 193.
60. Guo, Y. (2023). Hydrophilic Partitioning or Surface Adsorbtion? A Quantitative Assesment of Retention Mechanisms for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Molecules*, 28(18), 6459.
61. Santali, E. Y., Edwards, D., Sutcliffe, O. B., Bailes, S., Euerby, M. R., & Watson, D. G. (2014). A Comparison of Silica C and Silica Gel in HILIC Mode: The Effect of Stationary Phase Surface Area. *Chromatographia*, 77(13-14), 873–881. doi:10.1007/s10337-014-2694-9
62. Jiang, Wen & Appelblad, Patrik & Jonsson, Tobias & Hemström, Petrus. (2011). Analysis of aminoglycosides with a Zwitterionic HILIC stationary phase and mass spectrometry detection. *Chromatography Today*. 4. 26-28.
63. McCalley, D. V. (2018). A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography*, 1534, 64–74.
64. Isokawa, M., Kanamori, T., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2014). Recent advances in hydrophilic interaction chromatography for quantitative analysis of endogenous and pharmaceutical compounds in plasma samples. *Bioanalysis*, 6(18), 2421–2439. doi:10.4155/bio.14.173
65. Khsay, G., Song, H., Van Schepdael, A., Cabooter, D., & Adams, E. (2014). Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 142–154. doi:10.1016/j.jpba.2013.04.015
66. Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 499, 177–196. doi:10.1016/s0021-9673(00)96972-3
67. Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1-2), 1–25. doi:10.1016/j.aca.2011.02.047
68. Moldoveanu, S. C., David, V. (2017). Gradient Elution. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis, 451–462. doi:10.1016/b978-0-12-803684-6.00014-7
69. Cubbon S, Bradbury T, Wilson J, Thomas-Oates J. *Anal Chem.* 2007;79:8911–8918.

70. D.V. McCalley, *Adv. Chromatogr.* 46 (2008) 305.
71. Cavazzini, A., & Felinger, A. (2013). Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Liquid Chromatography*, 105–119. doi:10.1016/b978-0-12-415807-8.00005-5
72. McCalley, D. V. (2017). Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1523, 49–71. doi:10.1016/j.chroma.2017.06.0
73. Z.G. Hao, B.M. Xiao, N.D. Weng. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.*, 31 (2008), pp. 1449-1464.
74. Th. Verhaar, L. A., & Kuster, B. F. M. (1981). Liquid chromatography of sugars on silica-based stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 220(3), 313–328. doi:10.1016/s0021-9673(00)81928-7
75. Ghfar, A. A., Wabaidur, S. M., Ahmed, A. Y. B. H., Alothman, Z. A., Khan, M. R., & Al-Shaalan, N. H. (2015). Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 176, 487–492. doi:10.1016/j.foodchem.2014.
76. J.C. Heaton, D.V. McCalley. Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation. *J.Chromatogr.A* 2016 (1427) 37-44.
77. Separation Science interneto svetainė [interaktyvus]. Sample Solvent in HILIC. Separation Science Solutions Series (2009). [Žiūrėta 2024 gegužės 20 d.] Prieiga per internetą: <https://www.sepscience.com/hilic-solutions-9-sample-solvent-in-hilic/>
78. Castro-Perez, J., & Prakash, C. (2020). Recent advances in mass spectrometric and other analytical techniques for the identification of drug metabolites. *Identification and Quantification of Drugs, Metabolites, Drug Metabolizing Enzymes, and Transporters*, 39–71. doi:10.1016/b978-0-12-820018-6.00002-8
79. [https://www.megazyme.com/documents/Assay\\_Protocol/K-CARREZ\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-CARREZ_DATA.pdf)
80. Xu, W., Liang, L., & Zhu, M. (2015). Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 547–557.
81. Saini RK, Prasad P, Shang X, Keum YS. Advances in Lipid Extraction Methods-A Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 20;22(24):13643. doi: 10.3390/ijms222413643.

# SANTRAUKA

## VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

GABRIELĖ KRIKŠČIŪNIENĖ

### **Cukrų nustatymas hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijos metodu**

Cukrų kiekio nustatymas būtinas kontroliuojant maisto produktų, žaliavų, vaistinių preparatų bei gamybos procesų kokybę ir saugą, reguliuojant kasdienį cukrų suvartojimą ir siekiant sumažinti su pertekliniu vartojimu susijusią įvairių ligų ir sveikatos sutrikimų riziką. Šiuo metu taikomi klasikiniai cukrų nustatymo metodai leidžia nustatyti tik bendrą cukrų kiekį mėginyje, o chromatografiniais metodais galima atskirti analites, tačiau jie turi esminių trūkumų. Kadangi cukrai yra poliniai junginiai, jų nustatymui galima taikyti hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijos (HILIC) metodą, kuris yra pranašus tuo, kad apjungia net tris skysčių chromatografijos variantus, jam nereikalingas sudėtingas mėginio paruošimas, jis puikiai derinamas su atvirkščių fazių skysčių chromatografijoje naudojama HPLC sistema.

Šio darbo metu buvo sėkmingai parengtas HILIC metodas 5 paprastųjų cukrų – fruktozės, gliukozės, sacharozės, maltozės ir laktozės – nustatymui. Tam buvo parenkamos optimalios HILIC sąlygos, optimizuojama mėginio paruošimo procedūra. Nustačius tinkamiausią tyrimo metodiką, buvo atlikta realių mėginių (pieno, pieno be laktozės, jogurto ir kečupo) analizė, gauti rezultatai atitinka ant pakuočių deklaruojamas vertes. Gauta metodo nustatymo riba - 0,05 mg/mL; tiesiškumo intervalas – 0,05-7,5 mg/mL.

## **SUMMARY**

**VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES**

**GABRIELĖ KRIKŠČIŪNIENĖ**

### **The Determination of Sugars by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Method**

Determining sugar content is crucial for ensuring the quality and safety of food products, raw materials, medications and production processes. It also helps regulate daily sugar intake to reduce the risk of various health issues associated with excessive consumption. While classical methods only provide total amount of sugars, chromatographic techniques offer the ability to separate individual analytes. However, they come with significant drawbacks. Given that sugars are polar compounds, method called Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) can be applied for their determination. It is advantageous because it combines three different liquid chromatography variants, requires no complex sample preparation, and integrates well with the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) system.

During this study, HILIC method was successfully developed for the determination of 5 simple sugars – fructose, glucose, sucrose, maltose, and lactose. Optimal HILIC conditions were selected, and the sample preparation procedure was optimized. After determining the most suitable analytical approach, analysis of real samples (milk, lactose-free milk, yogurt, and ketchup) was performed, and the obtained results corresponded to the values declared on the packaging.