

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJŲ MOKSLŲ CENTRAS

Vilius  
POŠKUS

Kietafazės ekstrakcijos sistemų skirtų  
trans riebalų rūgščių atskyrimui  
kūrimas ir tyrimas

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Chemija N 003

---

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014 – 2018 metais Vilniaus universitete.

**Mokslinė vadovė:**

**Prof. dr. Vida Vičkačkaitė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
1.1 Trans riebalų rūgštys: savybės, paplitimas .....	13
1.1.1 Dujų chromatografinė riebalų rūgščių analizė .....	14
1.2 Sidabro panaudojimas chromatografinėje analizėje .....	21
1.2.1 Sidabro jonų chromatografija .....	21
1.2.2 Sidabro nanodalelių savybės ir panaudojimas .....	26
1.2.3 Sidabro nanodalelių sintezė .....	27
1.2.4 Nanosidabro chromatografija .....	29
1.3 Monolitiniai sorbentai .....	30
1.3.1 Polimeriniai sorbentai .....	31
1.3.2 Silikagelio pagrindo monolitiniai sorbentai .....	32
1.3.3 Hibridiniai monolitiniai sorbentai .....	35
1.4 Monolitinių sorbentų modifikavimas .....	36
1.4.1 Polimerinių sorbentų modifikavimas .....	36
1.4.2 Silikagelio pagrindo sorbentų modifikavimas .....	37
1.4.3 Hibridinių sorbentų modifikavimas .....	38
1.5 Monolitinių sorbentų panaudojimas .....	40
2. EKSPERIMENTO METODIKA .....	42
2.1 Reagentai .....	42
2.2 Tirpalai .....	42
2.3 Įranga ir aparatūra .....	43
2.4 Dujų chromatografinės analizės sąlygos .....	44
2.5 Elementinės analizės sąlygos .....	46
2.6 Riebalų rūgščių metilo esterių formavimas naudojant $\text{BF}_3$ .....	47
2.7 Riebalų rūgščių metilo esterių formavimas, naudojant acetilo chloridą .....	47
2.8 Silikagelio monolitinių sorbentų sintezė .....	47
2.9 Silikagelio monolitinių sorbentų modifikavimas .....	48

2.10	Sidabro nanodalelių sintezė sorbente .....	48
2.11	Supelco Discovery Ag-Ion SPE kietafazės ekstrakcijos sąlygos .....	48
2.12	Sidabro jonais modifikuoto silikagelio kietafazės ekstrakcijos kolonėlės paruošimas .....	49
2.13	Sidabro jonais modifikuoto silikagelio kietafazės ekstrakcijos sąlygos.. .....	49
2.14	Silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos kolonėlės paruošimas.....	50
2.15	Silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos sąlygos .....	51
2.16	Analizės rezultatų įvertinimas.....	51
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	54
3.1	Riebalų rūgščių derivatizacija.....	55
3.2	Sidabro kietafazės ekstrakcijos sistemos .....	56
3.2.1	Supelco Discovery Ag-Ion kietafazės ekstrakcijos sistema .....	56
3.2.2	Sidabro jonais padengto silikagelio kietafazės ekstrakcijos sistemos	58
3.2.3	Sidabro nanodalelių sintezė.....	65
3.2.4	Sidabro nanodalelėmis padengto monolitinio sorbento sintezė .....	74
3.2.5	Sidabro nanodalelėmis modifikuoto silikagelio monolito kietafazės ekstrakcijos sistemos tyrimas .....	79
3.2.6	Sidabro kietafazės ekstrakcijos sistemų palyginimas.....	82
	IŠVADOS.....	84
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....	85
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	87

## SANTRUMPOS

ADAM – 9-antrildiazometanas

AIBN – 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilas)

Ag – HPLC – sidabro jonų efektyvioji skysčių chromatografija (angl. silver ion high performancy liquid chromatography)

Ag – TLC – sidabro jonų plonasluoksnė chromatografija (angl. silver ion thin layer chromatography)

Ag – SPE – sidabro jonų kietafazė ekstrakcija (angl. silver ion solid phase extraction)

Ag – SFC – sidabro jonų superkritinių skysčių chromatografija (angl. silver ion supercritical fluid chromatography)

APTES – (3-Aminopropil) trietoksisilanas

ButOH – butanolis

CHD – koronarinės širdies ligos (angl. coronary heart disease)

CLA ME – konjuguoti linoleno rūgščių metilo esteriai (angl. Conjugated linoleic acids methyl esters)

CSL – ChromSpher Lipids chromatografinė kolonėlė

CTMS – chlortrimetilsilanas

DCM – dichlormetanas

DHR – dokozaheksaeno rūgštis

DM – diazometanas

DSC – diferencinė skenuojanti kalorimetrija

ECF – etilo chloroformiatas

EPR – eikozapentaeno rūgštis

EtOH – etanolis

GC – dujų chromatografija (angl. gas chromatography)

HDL-C – didelio tankio cholesterolis (angl. high-density lipoprotein cholesterol)

HPCL – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. high-performance liquid chromatography)

i-BuCF – izobutilo chloroformiatas

ICP-OES – induktyviai susietos plazmos optinės emisijos spektroskopija (angl. inductively coupled plasma – optical emission spectroscopy)

LDL-C – žemo tankio cholesterolis (angl. low-density lipoprotein cholesterol)

MCF – metilo chloroformiatas

MeOH – metanolis

MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoro acetamidas

PropOH – propanolis

PEI – polietileniminas (angl. polyethylenimine).

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas (angl. scanning electron microscope)

SFC – superkritinių skysčių chromatografija (angl. supercritical fluid chromatography)

SPE – kietafazė ekstrakcija (angl. solid phase extraction)

TEM - transmisinis elektroninis mikroskopas (angl. transmission electron microscope)

TG – termogravimetrinė analizė

TLC – plonasluoksnė chromatografija (angl. thin layer chromatography)

TMG – tetrametilguanidinas

TMSDM – trimetilsilildiazometanas

UV – VIS – ultravioletinės – regimosios šviesos diapazonas

UV – ultravioletinė spinduliuotė

Riebalų rūgščių metilo esteriai:

C4:0 – butirinės rūgšties metilo esteris

C6:0 – kaprono rūgšties metilo esteris

C8:0 – kaprilino rūgšties metilo esteris

C10:0 – kaprino rūgšties metilo esteris

C11:0 – undekano rūgšties metilo esteris

C12:0 – laurino rūgšties metilo esteris

C13:0 – tridekano rūgšties metilo esteris

C14:0 – miristino rūgšties metilo esteris

C14:1-9c – cis-9-miristoleino rūgšties metilo esteris

C15:0 – pentadekano rūgšties metilo esteris

C15:1-10c – cis-10-pentadekano rūgšties metilo esteris

C16:0 – palmitino rūgšties metilo esteris

C16:1-9c – cis-9-palmitoleino rūgšties metilo esteris

C17:0 – heptadekano rūgšties metilo esteris

C17:1-10c – cis-10-heptadekano rūgšties metilo esteris

C18:0 – sterino rūgšties metilo esteris

C18:1-9tr – trans-9-elaidino rūgšties metilo esteris

C18:1-9c – cis-9-oleino rūgšties metilo esteris

C18:2-9,12tr – trans-9,12-linolelaidino rūgšties metilo esteris

C18:2-9,12-c – cis-9,12-linolo rūgšties metilo esteris

C18:3-6,9,12c –  $\gamma$ -linoleno rūgšties metilo esteris

C20:0 – arachidino rūgšties metilo esteris

C18:3-9,12,15c –  $\alpha$ -linoleno rūgšties metilo esteris

C20:1-11c – cis-11-eikozeno rūgšties metilo esteris

C20:2-11,14c – cis-11,14-eikozadieno rūgšties metilo esteris

C20:4-5,8,11,14tr – trans-5,8,14,14-arachidono rūgšties metilo esteris

C21:0 – heneikozano rūgšties metilo esteris

C22:0 – becheno rūgšties metilo esteris



C20:3-8,11,14c – cis-8,11,14-eikozatrieno rūgšties metilo esteris

C20:3-11,14,17c – cis-11,14,17-eikozatrieno rūgšties metilo esteris

C22:1-13c – cis-13-eruko rūgšties metilo esteris

C22:2-13,16c – cis-13,16-dokozadieno rūgšties metilo esteris

C24:1-15c – cis-15-nervono rūgšties metilo esteris

C23:0 – trikozano rūgšties metilo esteris

C24:0 – lignocero rūgšties metilo esteris

C20:5-5,8,11,14,17c – cis-5,8,11,14,17-eikozapentaeno rūgšties metilo esteris

C22:6-4,7,10,13,16,19c – cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaeno rūgšties metilo esteris

## ĮVADAS

Riebalų rūgštys – tai ilgos anglies atomų grandinės, alifatinės karboksirūgštys. Organizme jos atlieka įvairias biologines funkcijas: įeina į ląstelių membranų sudėtį, taip užtikrinamos jų takumą, lankstumą, pralaidumą ir pasyvią pernašą per membraną. Iš riebalų rūgščių sintetintos biologiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip: prostaglandinai, prostaciklinai, leukotrienai, tromboksanai. Jų metabolizmas sukuria didelį adenosino trifosfato (ATP) kiekį ir padeda organizmui pasisavinti riebaluose tirpius A, D, E ir K vitaminus. Riebalų rūgštys yra skirstomos į sočiasias ir nesočiasias. Sočiosios riebalų rūgštys neturi dvigubojo ryšio grandinėje, o nesočiosios turi nuo vieno iki keturių dvigubų ryšių. Dėl dvigubų ryšių nesočiųjų riebalų rūgščių lydymosi temperatūros yra mažesnės, todėl kambario temperatūroje sočiosios riebalų rūgštys (C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>) būna vaško konsistencijos, o nesočiosios, turinčios tokį patį anglies atomų skaičių grandinėje – skysčiai. Žmogaus organizmas gali pats sintetinti daugumą riebalų rūgščių, tačiau dvi polinesočiasias riebalų rūgštis – linolo ir alfa linoleno privalo gauti su maistu. Šios rūgštys yra itin svarbios, nes jos yra pagrindinė medžiaga kitų omega-3 ir omega-6 rūgščių sintezei. Linolo ir alfa linoleno riebalų rūgščių šaltiniai yra įvairūs aliejai (alyvuogių, rapsų, saulėgrąžų), įvairios žuvis ir žuvų taukai [1, 2].

Tačiau yra riebalų rūgščių, kurios gali turėti žalingą poveikį žmogaus organizmui – tai trans nesočiosios riebalų rūgštys. Tai tokios nesočiosios rūgštys, kurių grandinėje yra bent vienas trans konfigūracijos dvigubasis ryšys. Nors nedidelius trans riebalų rūgščių kiekius galima aptikti ir natūraliuose produktuose (mėsoje, pieno produktuose), dažniausiai maiste jos atsiranda pramoniniu būdu – atliekant augalinių aliejų hidrinimą. Produktai, turintys daug trans nesočiųjų riebalų rūgščių, yra patrauklūs maisto pramonėje dėl jų pigumo, ilgesnės vartojimo trukmės, stabilumo gruzdinant, kas lemia jų itin didelį panaudojimą greito maisto industrijoje [3]. Atlikta labai daug tyrimų, kurie įrodo, jog trans nesočiųjų riebalų rūgščių vartojimas didina širdies ir kraujagyslių ligų, cukrinio diabeto, nutukimo atsiradimo riziką, jos turi kancerogeninį poveikį, didina mažo tankio cholesterolio koncentraciją kraujyje [4-13]. Tikslus riebalų rūgščių nustatymas ir kiekybinis įvertinimas gali būti naudojamas medicininėje diagnostikoje. Pavyzdžiui, kraujo serume esanti maža koncentracija trans-C16:1n 7-palmitoleino rūgšties indikuoja metabolinės ligos riziką [14]. Riebalų rūgščių izomerų analizė dažniausiai atliekama dujų chromatografijos

metodu, tačiau tai yra ganėtinai sudėtinga, nes tiriamuose objektuose paprastai yra didelis kiekis cis konfigūracijos nesočiųjų riebiųjų rūgščių, kurios lemia chromatografinių smailių persiklojimą. Efektyviausias būdas supaprastinti analizę – mėginį frakcionuoti per tokį sorbentą, kuris geba atskirti nesočiųjų rūgščių cis ir trans izomerus. Literatūroje yra duomenų, jog vieni tinkamiausių sorbentų tokiam atskyrimui – sidabro jonų veikimu paremti sorbentai [15,16].

**Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas** – sukurti ir ištirti sidabro jonais ir nanodalelėmis modifikuotus kietafazės ekstrakcijos sorbentus ir pritaikyti juos riebalų rūgščių metilo esterių geometrinių izomerų frakcionavimui.

#### **Disertacinio darbo uždaviniai:**

1. Sukurti sidabro jonais modifikuotą kietafazės ekstrakcijos sistemą, sorbentu naudojant silikagelį ir parinkti tinkamas riebalų rūgščių frakcionavimo sąlygas.
2. Palyginti laboratorijoje pagamintos ir komercinės jonitinės sidabro jonų kietafazės ekstrakcijos sistemų charakteristikas.
3. Susintetinti ir charakterizuoti aminopropilo grupėmis modifikuotą silikagelio monolitinį sorbentą.
4. Parinkti tinkamas sidabro nanodalelių sintezės sąlygas ir atlikti šią sintezę monolitiniame sorbente.
5. Ištirti sidabro nanodalelėmis padengto monolitinio sorbento sąveiką su cis ir trans riebalų rūgščių metilo esteriais.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Riebalų rūgščių trans izomerai sudėtingose matricose gali būti identifikuojami ir kiekybiškai nustatomi panaudojant sidabro jonais ar nanodalelėmis modifikuotus kietafazės ekstrakcijos sorbentus ir dujų chromatografinę analizę.
2. Efektyvią ir nebrangią sidabro jonais modifikuotą kietafazės ekstrakcijos sistemą, skirtą trans riebalų rūgščių atskyrimui galima paruošti sorbentu naudojant silikagelį, o sidabro jonų šaltiniu – sidabro nitrata.
3. Aminopropilo grupėmis modifikuotas silikagelio monolitinis sorbentas pasižymi dideliu paviršiaus plotu ir porų tūriu.
4. Sidabro nanodalelių sąveika su riebalų rūgštimis priklauso nuo riebalų rūgščių nesotumo laipsnio. Sidabro nanodalelių agregatų formavimasis prastina ir gali visiškai panaikinti metalinio sidabro sąveiką su nesočiais junginiais.
5. Aminopropilo grupėmis modifikuotas silikagelio monolitinis sorbentas gali būti padengtas sidabro dalelėmis naudojant prekursorių sidabro nitrata ir reduktorių formaldehidą.
6. Sidabro nanodalelėmis modifikuota kietafazės ekstrakcijos sistema pasižymi dideliu stabilumu ir pakartotinio naudojimo galimybėmis. Efektyvus junginių atskyrimas yra pasiekiamas naudojant mažesnius sorbento ir organinių tirpiklių kiekius, nei sidabro jonų pagrindu veikiančiose kietafazės ekstrakcijos sistemose.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1 Trans riebalų rūgštys: savybės, paplitimas

Trans riebalų rūgštys – tai visi geometriniai mononesočiųjų ir polinesočiųjų riebalų rūgščių izomerai, turintys trans konfigūracijos dvigubąjį ryšį. Trans riebalų rūgštys nedideliais kiekiais aptinkamos gamtoje, tačiau didžioji dalis yra gaunama augalinių ir gyvulinių riebalų hidrinimo metu. Hidrinimas atliekamas siekiant padidinti riebalų stabilumą ar pakeisti tam tikras jų fizikines savybes [17,18]. Pramoninio hidrinimo metu, naudojant katalizatorių, prie nesočiųjų riebalų rūgščių yra prijungiamas vandenilis, taip pašalinant nesočiašias jungtis. Vykstant šiam procesui, gali įvykti dvigubojo ryšio migracija bei persitvarkymas iš cis į trans konfigūraciją [18]. Tokie hidrinti riebalai dažniausiai būna įvairiuose margarinuose (10-30% bendro riebalų kiekio), užtepėlose, kremuose, taip pat naudojami komerciniuose kepinuose, duonoje, sausainiuose, keptose bulvytėse (daugiau kaip 10 % bendro riebalų kiekio) ir kt. [6, 17]. Daugybė atliktų tyrimų rodo, kad trans riebalų rūgštys turi didelę įtaką žmogaus sveikatai. Organizme riebalų rūgščių trans izomerų virškinimas, įsisavinimas ir apykaita yra tokie pat kaip cis izomerų [19]. Trans riebalų rūgštys organizme konkuruoja su natūraliomis riebalų rūgštimis ir slopina fermentines reakcijas, vykstančias hormonų prostaglandinų sintezės metu [6, 17]. Be to, trans riebalų rūgštys gali pakeisti būtinašias riebalų rūgštis eritrocitų, kraujagyslių bei raumenų ląstelių membranose [17]. Vis daugėja duomenų, rodančių, kad trans riebalų vartojimas didina riziką susirgti diabetu, krūties, kiaušidžių, gaubtinės ir tiesiosios žarnų vėžiu. Trans riebalų rūgščių vartojimas didina žemo tankio cholesterolio ir mažina didelio tankio cholesterolio koncentracijas kraujyje, didina sistolinį ir diastolinį kraujospūdį bei koronarinės širdies ligos riziką [4-13].

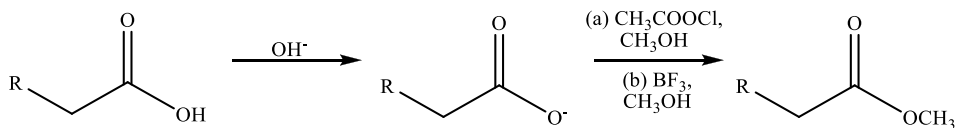
Pasaulio Sveikatos Organizacija rekomenduoja, kad trans riebalų rūgščių suvartojimas būtų ribojamas iki 1 % bendro suvartojamų kalorijų kiekio. 2003 m. Danija pirmoji pradėjo riboti trans riebalų rūgščių kiekį maiste ir uždraudė riebalų ir aliejų pardavimą, kuriuose yra daugiau nei 2 % industriniu būdu pagamintų trans riebalų rūgščių. 2008 m. Kanada ir 2010 m. JAV pateikė reikalavimą gamintojams žymėti trans riebalų rūgštis ant maisto ir maisto papildų pakuočių [17, 20]. Per paskutinius du dešimtmečius trans riebalų rūgščių suvartojimas Europoje sumažėjo, tačiau JAV trans riebalų rūgščių suvartojimas vis dar yra apie 2 % bendro suvartojamų

kalorijų kiekio [21]. Trans riebalų kiekis maisto produktuose Europos Sąjungoje nėra vieningai reglamentuotas, tačiau kai kurios valstybės yra priėmusios nacionalinius teisės aktus. Nuo 2019 m. prie šių šalių prisijungs ir Lietuva, tai numatyta šiuo metu derinamame teisės akte. Kelerius metus Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos vykdytų tyrimų rezultatai rodo, kad beveik pusėje tirtų maisto produktų trans riebalų kiekis buvo didesnis, nei rekomenduoja Pasaulinė sveikatos organizacija [22].

### 1.1.1 Dujų chromatografinė riebalų rūgščių analizė

Riebalų rūgščių analizė dažniausiai atliekama dujų chromatografijos metodu dėl aukštos kapiliarinių kolonėlių skiriamosios gebos. Riebalų rūgštys yra polinės, mažai lakios medžiagos, linkusios jungtis į asociatus arba prilipti prie kapiliarinės kolonėlės sienelių ar injektoriaus, todėl tiesioginis riebalų rūgščių atskyrimas yra ganėtinai problematiškas [23]. XX a. viduryje mokslininkai James ir Martin gebėjo pilnai atskirti lakias laisvasias riebalų rūgštis dujų chromatografijos metodu, tačiau gera skiriamoji geba nebuvo pasiekta, o smailės buvo gaunamos asimetriškos ir išsiplėtusios [24]. Siekiant pagerinti medžiagų lakumą, skiriamąją gebą ir analizinio metodo charakteristikas, prieš dujų chromatografinę analizę yra būtina atlikti riebalų rūgščių derivatizaciją.

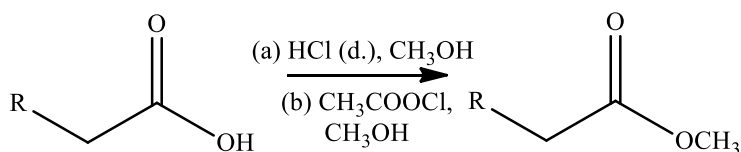
Riebalų rūgščių derivatizacija yra ilgai trunkantis ir brangus procesas, todėl svarbu pasirinkti tinkamiausią metodą. Paprastai, riebalų rūgštys dujų chromatografijos metodu yra analizuojamos pavertus jas atitinkamais riebalų rūgščių esteriais. Metilo esteriai populiariausi dėl plataus metilavimo ir transesterifikacijos metodų pasirinkimo, literatūros ir standartinių medžiagų gausos. Riebalų rūgščių metilo esterių sintezė gali būti atliekama katalizatoriumi naudojant rūgštį, bazę arba kitus reagentus. Straipsnyje [25] aprašoma tradicinė dviejų žingsnių riebalų transesterifikacija. Mėginys veikiamas stipriu šarmu, taip išlaisvinant riebalų rūgštis (jas muilinant). Tirpalas neutralizuojamas, o analizės ekstrahuojamos toluenu ir veikiamos metilinančiu reagentu (metanoliu), esant rūgštiniam katalizatoriui – acetilochloridui (**1.1.1.1 pav. a sąlygos**). Darbe [26] siūloma panaši metodika katalizatoriumi naudojant boro trifluoridą BF<sub>3</sub> metanolyje (**1.1.1.1 pav. b sąlygos**). Mėginys veikiamas kalio šarmu metanolyje, kaitinant 75 °C temperatūroje 5 min, vėliau reakcijos mišinys ataušinamas ir pridedama BF<sub>3</sub> metanolyje. Vėl kaitinama 75 °C temperatūroje 5 min., ataušinama ir ekstrahuojama heksanu. Dviejų žingsnių transesterifikacijos metodo išeiga aukšta, tačiau didelės tirpiklių bei laiko sąnaudos.



**1.1.1.1 pav.** Dviejų žingsnių transesterifikacijos schema.

Siekiant pagreitinti procesą, buvo ieškoma įvairių tiesioginės *in situ* derivatizacijos metodų. Vykdam tiesioginę transesterifikaciją, mėginys metilinančiu reagentu yra veikiamas tiesiogiai, esant reakcijos mišinyje katalizatoriaus. Katalizė gali būti vykdoma rūgštinėmis arba bazinėmis sąlygomis [27, 28]. Itin plačiai naudojama rūgštinė katalizė dėl galimybės derivatizuoti laisvas ir surištas riebalų rūgštis, tačiau reakcijos trukmė ženkliai išauga. Vykdam riebalų rūgščių derivatizacijos reakciją itin svarbu tinkamų sąlygų parinkimas. Per šurkščiomis reakcijos sąlygomis (aukšta temperatūra, ilgas kaitinimas) galimas nesočiųjų riebalų rūgščių praradimas [29], per švelniomis – prasta riebalų rūgščių metilo esterių išeiga. Paprastai tokio tipo reakcijos yra atliekamos 60-90 °C temperatūroje ir trunka nuo kelių minučių iki kelių valandų. Dažniausiai tiesioginės derivatizacijos metodui naudojami rūgštiniai katalizatoriai: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub> metanolyje.

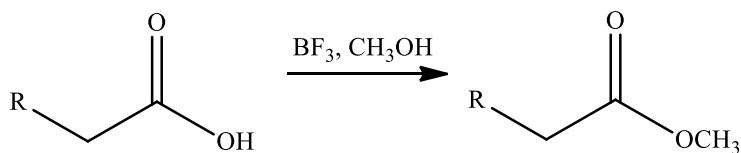
5 % bevandenis HCl tirpalas metanolyje yra plačiausiai naudojamas reagentas tiesioginei rūgštinėi transesterifikacijai (**1.1.1.2 pav. a sąlygos**). Jis gali būti ruošiamas dujinį HCl leidžiant per metanolį. Šio reagento stabilumą ištyrė Kishimoto ir Radin, kurie nustatė, kad pusė titruojamo rūgštingumo yra prarandama per šešias savaites [30]. Dėl nepatogaus šio reagento paruošimo ir prasto stabilumo pastaruoju metu dažniau naudojamas acetilo chloridas metanolyje (**1.1.1.2 schema b sąlygos**). Ruošiant šį reagentą gaunamas šalutinis produktas – metilo acetatas, tačiau jis netrukdo tolimesnei esterinimo reakcijai [31]. Atliekant šią reakciją mėginys yra veikiamas šviežiai paruoštu 10 % acetilo chlorido tirpalu metanolyje, kaitinamas toluene su acetilo chlorido tirpalu 120 min. 70 °C temperatūroje, atvėsintas ir riebalų rūgščių metilo esteriai ekstrahuojami petrolio eteriu: dietilo eteriu (4:1) [25]. Straipsnio [28] autoriai teigia, kad naudojant šį katalizatorių yra gaunamas panašus atkuriamumas kaip ir tradiciniu dviejų žingsnių transesterifikacijos metodu, katalizatoriumi naudojant BF<sub>3</sub>.



**1.1.1.2 pav.** Tiesioginės transesterifikacijos rūgštinėmis sąlygomis schema katalizatoriumi naudojant HCl arba acetilo chloridą.

Kitas dažnai naudojamas rūgštinis katalizatorius yra  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Šio katalizatoriaus privalumai yra ilgas galiojimo laikas, paprastas ir saugus paruošimas, bei gera transesterifikacijos reakcijos išeiga. Tačiau jis yra vengtinas reakcijos mišinyje esant polinesočiujų riebalų rūgščių dėl oksidacinių sieros rūgšties savybių [32-34]. Tačiau naudojant praskiestą reagentą ir vidutines reakcijos temperatūras tokie šalutiniai efektai nėra pastebėti [31].

Lewis rūgštis – boro trifluoridas metanolyje, dėl koordinavimo komplekso savybių yra puikus rūgštinis katalizatorius riebalų rūgščių esterifikavimui (**1.1.1.3 pav.**). Šis reagentas yra labai efektyvus tokio tipo reakcijose, tačiau yra toksiškas, brangus, skyla vandenyje ir yra sąlyginai nestabilus sandėliuojant. Naudojant didelės koncentracijos  $\text{BF}_3$  (50 %), vyksta šalutinė reakcija – metanolio prisijungimas prie nesočiųjų riebalų rūgščių dvigubųjų jungčių [35]. Nepaisant to, mažesnės koncentracijos (6-25 %) reagentas sėkmingai *in situ* katalizuoja riebalų rūgščių derivatizaciją aliejuose ir gyvuliniuose riebaluose, muiluose, maisto produktuose ir kt. [36].

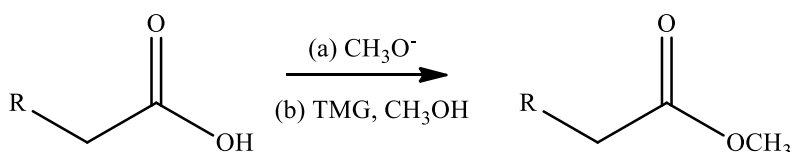


**1.1.1.3 pav.** Tiesioginės transesterifikacijos rūgštinėmis sąlygomis schema katalizatoriumi naudojant  $\text{BF}_3$ .

Tiesioginė transesterifikacija bazinėmis sąlygomis vyksta greičiau bei žemesnėje temperatūroje nei rūgštinėmis sąlygomis, tačiau nevyksta laisvųjų riebalų rūgščių esterifikacija. Plačiausiai naudojamas reagentas šiose



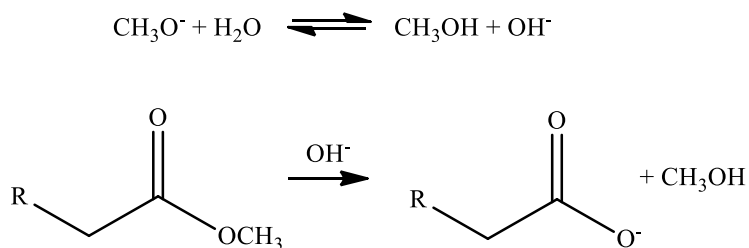
reakcijose – natrio metoksidas (**1.1.1.4 pav. a sąlygos**) [36]. Reakcija vyksta kambario temperatūroje. Priklausomai nuo mėginio, reakcija trunka nuo kelių minučių iki valandos. Kitas populiarus reagentas bazinei transesterifikacijai – tetrametilguanidinas (TMG) (**1.1.1.4 pav. b sąlygos**). Kaitinant mėginį su TMG metanolyje 2 min. 100 °C temperatūroje gaunama 99 % riebalų rūgščių metilo esterių išeiga.



**1.1.1.4 pav.** Tiesioginės transesterifikacijos bazinėmis sąlygomis schema katalizatoriumi naudojant natrio metoksidą arba TMG.

Transesterifikacija bazinėmis sąlygomis pasižymi šiais trūkumais [28]:

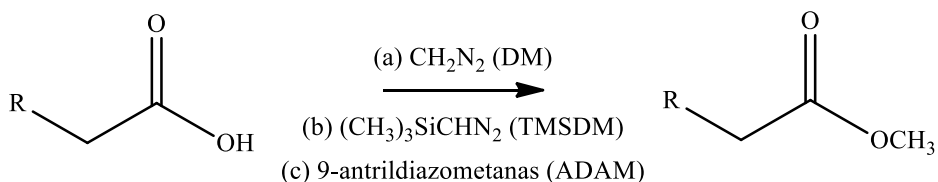
- Laisvosios riebalų rūgštys lieka nesureagavusios
- Dėl susidariusių laisvų hidroksido jonų reakcijos mišinyje gali įvykti esterių hidrolizė (**1.1.1.5 pav.**)
- Mišinyje esant natrio ar kalio jonų, gali susidaryti riebalų rūgščių druskos – muilai, kuriems sudarius emulsiją išauga riebalų rūgščių metilo esterių ekstrakcijos trukmė



**1.1.1.5 pav.** Riebalų rūgščių esterių hidrolizės schema.

Literatūroje siūlomi alternatyvūs reagentai esterifikacijos reakcijoms katalizuoti. Katalizė diazometanu (DM) eteryje yra žymiai greitesnė nei kiti minėti metodai (**1.1.1.6 pav. a sąlygos**). Reakcija atliekama 0 °C arba

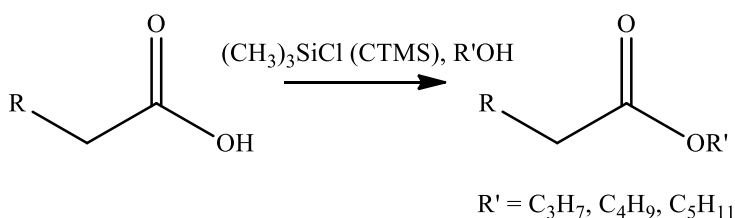
kambario temperatūroje trumpą laiką, reakcijos metu susidaro mažai pašalinių produktų, tačiau diazometanas yra nuodingas, kancerogeninis ir sprogus, dėl šių priežasčių nėra labai plačiai naudojamas. Ieškant mažiau pavojingų reagentų, buvo pasiūlyti trimetilsilildiazometanas (TMSDM) (*1.1.1.6 pav. b sąlygos*) ir 9-antrildiazometanas (ADAM) (*1.1.1.6 pav. c sąlygos*). TMSDM yra stabilesnis reagentas, gali būti įsigytas komerciškai, tačiau reakcija su TMSDM yra lėtesnė, prastesnės išėigos, susidaro pašaliniai produktai dėl trimetilsilinimo reakcijos. ADAM taip pat yra komerciškai prieinamas, tačiau gali būti nepakankamai grynas. ADAM su riebalų rūgštimis reaguoja greitai – 35-60 min. kambario temperatūroje [18, 23, 27, 28].



**1.1.1.6 pav.** Riebalų rūgščių esterifikacijos katalizatoriais naudojant DM, TMSDM ir ADAM schema.

Dujų chromatografijos metodu galima analizuoti ir kitus riebalų rūgščių alkilo esterius, katalizatoriumi naudojant chlortrimetilsilaną (CTMS) (*1.1.1.7 pav.*) [26, 37-38]. Straipsnyje [26] aprašoma riebalų rūgščių transesterifikacija chlortrimetilsilanu 1-propanolyje, susidarant propilo esteriams. Šio reagento privalumas – galimybė jį naudoti su įvairiais alkoholiais, taip pagerinant riebalų tirpumą ir sutrumpinant reakcijos laiką, reakcijai nereikalingas papildomas tirpiklis. Mėginio ir CTMS mišinys 1-propanolyje kaitinamas vandens vonioje 90 °C temperatūroje 20 min. Reakcijos mišinys atvėsinaamas ir neutralizuojamas vandeniniu NaHCO<sub>3</sub> tirpalu. Riebalų rūgščių propilo esterių, gautų šiuo metodu, ir metilo esterių, gautų atliekant tradicinę dviejų žingsnių transesterifikaciją naudojant BF<sub>3</sub> metanolyje, dujų chromatografinės analizės rezultatai panašūs. Straipsnyje [37] pateikiamas analogiškas metodas tirpikliu naudojant 1-pentanolį. Mėginio ir CTMS mišinys 1-pentanololyje kaitinamas 90 °C temperatūroje azoto atmosferoje 40 min. Reakcijos mišinys atvėsinaamas, pridedama heksano:dietilo eterio (1:1), sumaišoma ir neutralizuojama sočiu NaHCO<sub>3</sub> tirpalu. Mišiniui išsiskuoksniaavus, viršutinis sluoksnis surenkamas. Palyginus

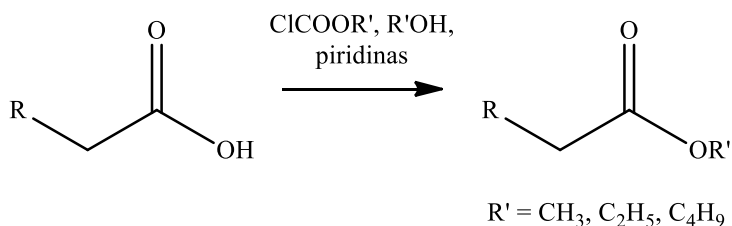
dujų chromatografinės analizės rezultatus, pastebėta, kad pentilo esterių sulaikymo trukmė yra šiek tiek didesnė nei metilo esterių, tačiau skiriamoji geba išlieka tokia pati. Publikacijoje [37] pateikiama panaši metilo, etilo ir butilo esterių sintezė. Mėginio ir CTMS (0,75 ekv.) emulsija metanolyje, etanolyje ar 1-butanolyje (1,5 ekv.) kaitinama 60 °C temperatūroje 8 val. azoto atmosferoje ir atvėsinama. Reakcijos mišiniui išsisluoksniavus, viršutinis alkoholio sluoksnius su atitinkamais riebalų rūgščių alkilo esteriais atskiriamas ir perdistiliuojamas vakuume. Rūgštinis reakcijos katalizatorius CTMS yra pigus, mažai toksinis ir nekenkiantis aplinkai, o susidariusius pašalinius produktus galima perdirbti. [38]



**1.1.1.7 pav.** Riebalų rūgščių esterifikacijos schema, katalizatoriumi naudojant chlortrimetilsilaną.

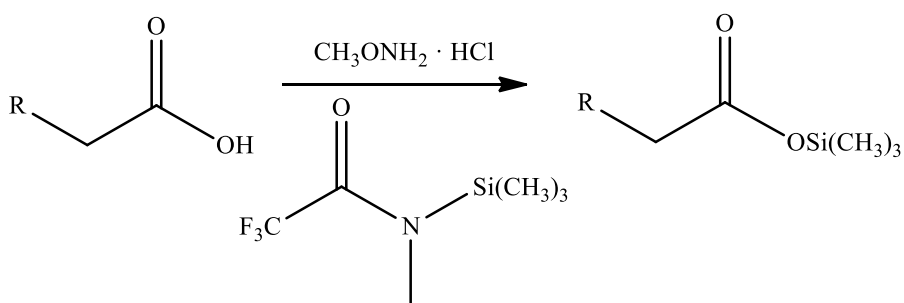
Publikacijose [18, 39-41] yra aprašomas patogus tiesioginis riebalų rūgščių derivatizacijos vandeninėje terpėje metodas, katalizatoriumi naudojant alkilo chloroformiatų (**1.1.1.8 pav.**). Reakcija vyksta greitai kambario temperatūroje, susidarant stabiliems, lengvai iš reakcijos mišinio išskiriamiems dariniams, išsaugant nesočiųjų ryšių konfigūraciją. Straipsnyje [41] pateikiama metodika derivatizacijai naudojant metilo chloroformiatą (MCF). Išdžiovintas mėginys sumaišomas su 1 M natrio šarmo tirpalu, metanoliu ir piridinu. Pridedama MCF ir maišoma kambario temperatūroje 60 s. Susidarę metilo esteriai atskiriami reakcijos mišinį ekstrahuojant chloroformu. Pagal autorių [39] metodiką, riebalų rūgščių etilo esterių sintezė atliekama vandeninį riebalų rūgščių tirpalą sumaišant su etanolio:piridino (4:1) mišiniu, pridendant acetono ir tetrachlormetano (kaip dispersinį ir ekstrakcinį tirpiklius), ir pridendant etilo chloroformiato (ECF). Riebalų rūgščių etilo esteriai tetrachlormetane išskiriami reakcijos mišinį centrifuguojant 2 min. Esterifikacija izobutilo chloroformiatu (i-BuCF), susidarant riebalų rūgščių butilo esteriams, aprašoma straipsnyje [40]. Paruošiamas riebalų rūgščių – piridino mišinys, į kurį pridedama

izobutanolio bei izobutilo chloroformiato. Mišinys veikiamas ultragarsu 30 s. ir ekstrahuojamas chloroformu.



**1.1.1.8 pav.** Tiesioginės riebalų rūgščių derivatizacijos vandeninėje terpėje, katalizatoriumi naudojant alkilo chloroformiatų schema.

Dar vienas plačiai naudojamas ir efektyvus tiesioginės derivatizacijos būdas – sililo esterių formavimas (**1.1.1.9 pav.**). Straipsnyje [41] aprašomas sililinio metodo mėginį sumaišant su metoksiamino hidrochlorido tirpalu ( $2 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) ir inkubuojant 400 W mikrobangų krosnelėje 2,8 min. Tuomet į reakcijos mišinį pridedama *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoro acetamido (MSTFA) ir vėl inkubuojama mikrobangų krosnelėje 3 min. Šio derivatizacijos metodo pakartojamumas ir reakcijos produktų stabilumas yra prastesni lyginant su derivatizacija naudojant metilo chloroformiatą. Taip pat, sililinio reakcijai būtina bevandenė terpė, reakcijos reagentai ir produktai nėra atskiriami. Dėl šių priežasčių metodas yra ganėtinai problemiškas.

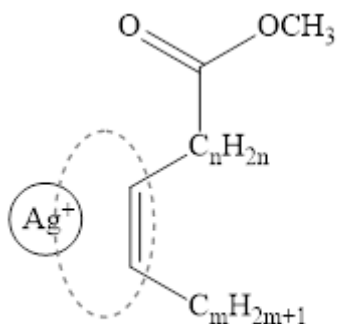


**1.1.1.9 pav.** Tiesioginės riebalų rūgščių derivatizacijos formuojant silil esterius schema.

## 1.2 Sidabro panaudojimas chromatografinėje analizėje

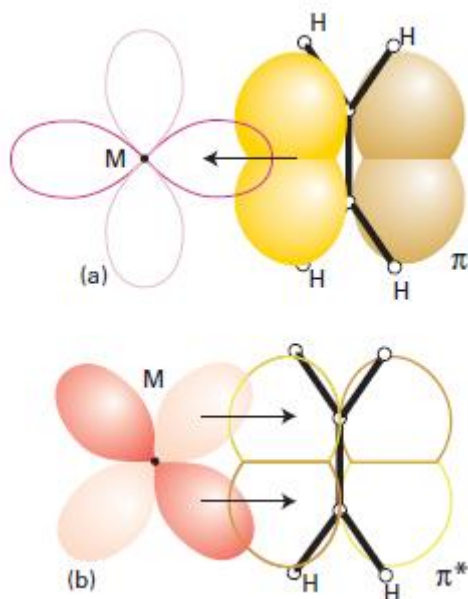
### 1.2.1 Sidabro jonų chromatografija

Sidabro jonų chromatografija – tai itin svarbus atskyrimo metodas lipidų chemijoje, kuris buvo pristatytas XX – to amžiaus antroje pusėje. Jis paremtas tuo, jog sidabro jonai, kaip ir kiti pereinamųjų metalų jonai, pasižymi specifine sąveika su nesočiais junginiais, suformuodami silpnus grįžtamus kompleksus su olefininiais dvigubaisiais ryšiais (**1.2.1.1 pav.**) [15, 16, 42].



#### 1.2.1.1 pav. Grįžtamas kompleksas tarp sidabro jono ir lipido olefininio ryšio.

Šio komplekso susiformavimas aiškinamas Dewar'o – Chatt'o – Duncanson'o modeliu (**1.2.1.2 pav.**) [15,43]. Pagal jį, sidabro jonui sąveikaujant su lipido dvigubuoju ryšiu, tarp jų susidaro du silpni, bet nevienodo stiprumo, ryšiai: stipresnis  $\delta$  ryšys, kai lipido dvigubo ryšio 2p rišančiosios orbitalės elektronai sąveikauja su tuščiomis  $\text{Ag}^+$  jono 5s arba 5p orbitalėmis, ir silpnesnis  $\pi$  ryšys, kai okupuotos sidabro jono 4d orbitalės sąveikauja su tuščia skiriančiąja dvigubo ryšio orbitale.



**1.2.1.2 pav.** Dewar'o – Chatt'o – Duncanson'o modelis: a – elektronų tankio donavimas iš eteno užpildytos  $\pi$  orbitalės į tuščią metalo  $\delta$  orbitalę, b – elektronų tankio donavimas iš užpildytos metalo  $d$  orbitalės į skiriančią alkeno  $\pi$  orbitalę [43].

Sidabro jonų chromatografija sėkmingai pritaikoma įvairiose lipidų chemijos srityse tokiose kaip: maisto pramonė, gyvūnų ir augalų fiziologija, farmacija ar medicina. Be to, šis metodas laikomas būtinu žingsniu norint lipidų mišinį suskaidyti į paprastesnes frakcijas, ypač atskirti geometrinius riebalų rūgščių izomerus, kadangi efektyvus tiesioginis tokių izomerų atskyrimas dujų chromatografijos metodu nėra galimas net naudojant 200 metrų ilgio stipriai polines joninių skysčių kolonėles [44].

Pagrindiniai sidabro jonų chromatografijos, pagal kuriuos vyksta junginių atskyrimas, principai [15, 16, 45]:

- Kuo daugiau dvigubų ryšių junginyje, tuo sulaikymas stipresnis [46].
- Trans – nesočiosios riebalų rūgštys yra sulaikomos silpniau nei cis [47, 48, 49-51].
- Junginiai, turintys konjuguotus dvigubus ryšius, sulaikomi silpniau nei junginiai, kuriuose dvigubieji ryšiai yra atskirti papildomomis metilo

grupėmis, t.y. kuo atstumas tarp dvigubų ryšių didesnis, tuo sulaikymas stipresnis [46].

- Kuo ilgesnė junginio grandinė, tuo sulaikymas silpnesnis [52], vis dėlto šio efekto gali nebūti Ag – HPLC, kur sulaikymą labiau apsprendžia mobiliosios fazės sudėtis [53-54].
- Junginiai, turintys dvigubuosius ryšius ties 5-8 anglies atomais riebiosios rūgšties grandinėje, sulaikomi stipriau, nei junginiai, kurių dvigubieji ryšiai yra molekulės galuose [15].

Plačiausiai naudojamas sidabro jonų chromatografijos metodas – Ag – HPLC. Šiame metode į sistemą įvesti sidabro jonus galima trim būdais:

- Užpildyti standartinę kolonėlę silikageliu, kuris impregnuotas žinomu kiekiu AgNO<sub>3</sub>.
- Standartinę jonų mainų kolonėlę konvertuoti į sidabro jonų formą.
- Į mobilią fazę pridėti sidabro druskos ir analizę atlikti RP – HPLC metodu.

Kiekvienas sidabro jonų įvedimo į chromatografinę sistemą būdas turi savų privalumų ir trūkumų. Pirmojo metodo privalumas yra žinomas įvestų sidabro jonų kiekis [55-56], tačiau tokios kolonėlės yra labai sunku paruošti ir dėl to jos naudojamos retai. Antrojo metodo privalumai: didelis stabilumas, kas lemia ilgą naudojimo laiką; sąlyginai lengvas paruošimas; galimybė ruošti sorbentą iš skirtingų tipų standartinių jonų mainų kolonėlių: RSilCAT [57], Nucleosil 5SA [58], Spherisorb 5 SCX [47] ir Partisil SCX [59]. Šio metodo principu yra paruoštos šiuo metu populiariausios komercinės Ag – HPLC kolonėlės ChromSper Lipids (CSL). Pagrindinis tokio tipo kolonėlių trūkumas – nėra žinoma, kiek tiksliai sidabro jonų yra įvesta į kolonėlę. Trečiasis metodas patrauklus tuo, jog sidabro jonų įvedimas į sistemą yra labai paprastas. Taip pat naudojant šį metodą pasikeičia lipidų atskyrimo atrankumas, o visi kiti parametrai yra tokie patys kaip įprastoje RP – HPLC [60].

Ag – HPLC analizėje dažniausiai naudojamos mobilios fazės: toluenas – heksanas, toluenas – etilacetatas, toluenas – skruzdžių rūgštis [55]; dichlormetano – dichloretano mišinys modifikuotas acetonitrilu, acetonu arba abiem [61]; heksanas – acetonitrilas [48]. Judrios fazės tirpiklio parinkimas ir tekėjimo režimas priklauso nuo to, koku būdu sidabro jonai buvo įvesti į sistemą. Sistemose, kuriose naudojamos komercinės sidabro

jonų mainų kolonėlės, kaip judri fazė izokratinium režimu naudojamas heksanas, kuriame yra nedidelis kiekis (<1 %) kito tirpiklio: acetonitrilo, dichlormetano, izopropanolio [48], o sistemose su silikageliu, impregnuotu žinomu kiekiu AgNO<sub>3</sub>, mobili fazė yra toluenas – skruzdžių rūgštis, toluenas – etilo acetatas, toluenas – heksanas, kuri tiekama gradientiniu režimu [55].

Ag – HPLC analizės dažniausiai atliekamos kambario temperatūroje, tačiau kai kurios analizės gali būti atliekamos tiek žemesnėse, tiek aukštesnėse temperatūrose intervale nuo 0 iki 40 °C [59, 62]. Ankstesni eksperimentai atlikti Ag-TLC metodu parodė, kad analizių sulaukymas stiprėja mažinant temperatūrą. Tai aiškinama didėjančiu sidabro jonų kompleksu stabilumu žemose temperatūrose [63-64].

Ag – SFC metodas turi pranašumų, lyginant jį su GC ar HPLC metodais. Šiuo metodu galima analizuoti termiškai nestabilius ir nelakius junginius, pavyzdžiui, polinesočiąsias riebalų rūgštis ir jų esterius, taip pat galimas didesnis detektorių pasirinkimas [65-66]. Šio metodo taikymas yra ribotas dėl polinių mobilių fazių trūkumo [67]. Kolonėlės, naudojamos Ag – SFC metode, yra dviejų tipų - tuščiaavidurio vamzdelio užpildyto sorbentu, kurios yra beveik identiškos naudojamoms HPLC (vidinis diametras 1-5 mm, sorbento dalelių dydis 3-10 μm), ir kapiliarinės, kurios panašios į kolonėles, naudojamas dujų chromatografijoje, tik jų skersmuo mažesnis, o stacionari fazė pririšta prie sienelių [16].

Kapiliarinių kolonėlių, naudojamų Ag-SFC metode, privalumai [68]:

- Gaunamas puikus atskyrimas
- Jos gerai pritaikomos terminiam programavimui
- Lėtas mobilios fazės tekėjimo greitis palengvina mobilios fazės sušildymą iki reikiamos temperatūros
- Pigus paruošimas

Ag – SFC metode stacionari fazė yra tokia pati kaip ir Ag – HPLC – jonų mainų kolonėlė, modifikuota sidabro jonais. Naudojamos kolonėlės pasižymi geru terminiu stabilumu, tačiau yra jautrios peroksidams, kurie patenka į sistemą iš netinkamai laikomų riebalų mėginių arba organinių tirpiklių. Dėl peroksidų buvimo formuojasi sidabro oksidas, kuris lemia kolonėlės destruktiją [16]. Dar vienas kolonėlių trūkumas – ilgainiui pastebimas nedidelis sidabro jonų pasišalinimas. Norint pašalinti šį trūkumą išbandyta nauja stacionari fazė – polimerinė medžiaga, turinti daug nitrilo grupių. Šis adsorbentas susideda iš smulkių silikagelio dioksido dalelių, deaktyvuotų 50



% cianopropilo funkcinėmis grupėmis pakeistu polimetilhidrosiloksanu ir padengtų 25 % orto, para – diciano – para bifenil pakeistu polimetilsiloksanu (*angl.* o,p,p – DCBP), arba 25 % meta, meta – diciano – para bifenil pakeistu polimetilsiloksanu (*angl.* m,m,p – DCBP). Adsorbentą veikiant sidabro jonais, tarp jų ir ciano funkcinų grupių susidaro kompleksai, kurie lemia sidabro jonų įvedimą į sistemą. Tačiau šis adsorbentas nepakeitė tradicinių jonų mainų kolonėlių, nes riebalų rūgščių atskyrimo atrankumas buvo gautas tik pagal nesočiųjų ryšių skaičių molekulėje, o konfigūracinių izomerų atskyrimas buvo prastas [69].

Ag -TLC daugelį metų buvo vienas pagrindinių metodų taikomų lipidų analizėje. Analizė yra greita, paprasta, nereikalaujanti sudėtingos įrangos, o gauta informacija apibūdina visą tiriamą mėginį ir yra lengvai ir greitai apdorojama [70-71]. Šiame metode stacionaria faze dažniausiai naudojamas plonas sluoksnis silikagelio, kuris būna impregnuotas AgNO<sub>3</sub>. Ankščiau kaip alternatyva silikageliui buvo bandoma naudoti sidabro nitrato modifikuoto aliuminio oksido plokšteles, tačiau toks sluoksnis reaguodavo su kai kuriais lipidais bei tirpikliais ir dėl to nebuvo taikomas toliau [45, 72-76].

Ag – SPE metodas dažniausiai naudojamas norint frakcionuoti mėginį taip gaunant supaprastintus analičių mišinius (dažniausiai riebalų rūgščių metilo esterius) prieš GC, GC/MS ar HPLC analizes. Analinių frakcionavimas paprastai atliekamas mažose kolonėlose, kurios yra užpildytos chemiškai inertišku polimeru, modifikuotu sidabro jonais [77-78]. Metodo privalumai:

- Greitas ir paprastas frakcionavimas
- Nereikalinga brangi įranga
- Gaunamas didelis frakcijų grynumas
- Frakcionavimui naudojamas kolonėles galima įsigyti komerciškai arba pasiruošti laboratorijoje iš jonų mainų kolonėlių

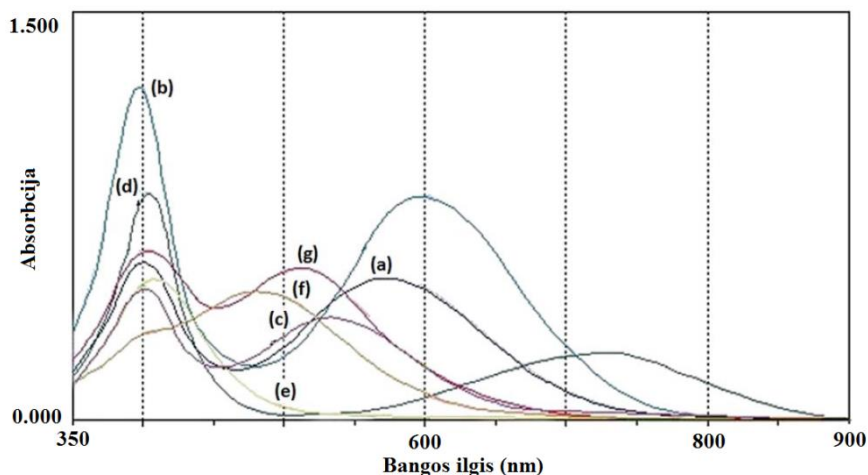
Lietratūros šaltiniuose [16, 79] pateikiamos nesudėtingos Ag- SPE kolonėlių pasiruošimo metodikos. Bond Elut SCX kolonėlė praplaunama 2 ml acetonitrilo ir pro ją praleidžiama 1 ml 20 mg ml<sup>-1</sup> koncentracijos AgNO<sub>3</sub> acetonitrilo:vandens (9:1) tirpalas. Po padengimo sidabro jonais kolonėlė iš eiles plaunama 5 ml acetonitrilo, 5 ml acetono ir 10 ml dichlormetano. Paruošta kolonėlė uždengiama aliuminio folija, siekiant apsaugoti ją nuo šviesos. Beveik identiška procedūra atliekama ir su Chromabond SA<sup>TM</sup> SPE

kolonėle, tik praplovimui naudojami kiti tirpikliai – metanolis, dichlormetanas ir heksanas.

### 1.2.2 Sidabro nanodalelių savybės ir panaudojimas

Sidabro nanodalelės – tai sidabro dalelės, kurių bent vienas matmuo yra nuo 1 iki 100 nm. Jos pasižymi dideliu paviršiaus ploto bei tūrio santykiu ir unikaliomis elektrinėmis, optinėmis, cheminėmis, biologinėmis ar magnetinėmis savybėmis, kurios yra nebūdingos metalo kristalui. Būtent dėl unikalių savybių jos yra panaudojamos medicinoje, elektronikoje, optikoje, chemijos pramonėje [82].

Unikalios sidabro nanodalelių optinės savybės – jos itin efektyviai absorbuoja ir išsklaido šviesą, o jų spalva priklauso nuo dalelių formos ir dydžio (*1.2.2.1 pav.*) [81-82].



**1.2.2.1 pav.** Skirtingų dydžių sidabro nanodalelių spektrai: a – violetinė, b – mėlyna, c – purpurinė, d – žalia, e – geltona, f – oranžinė, g – raudona [85].

Stipri sąveika tarp sidabro nanodalelių ir šviesos įvyksta dėl to, jog sidabro nanodalelės pasižymi paviršiaus plazmonų rezonansu – reiškiniu, kai apšvietus monochromatine, p-polarizuota bei žymiai didesnio bangos ilgio, nei metalo nanodalelės dydis, šviesa, laisvieji elektronai ant dalelės paviršiaus pradeda kolektyviai osciliuoti, kas lemia stiprią šviesos absorbciją bei sklaidą [83-84].

Sidabro nanodalelių charakteristikos gali būti nustatomos įvairiais būdais. Dalelių dydis bei forma yra nustatomos pasitelkus skenuojantį elektroninį

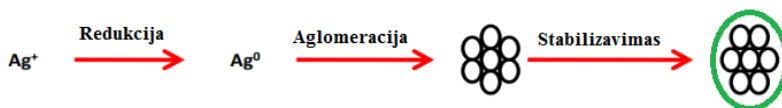
mikroskopą (*angl.* scanning electron microscope, SEM), transmisinį elektroninį mikroskopą (*angl.* transmission electron microscope, TEM), atominės jėgos mikroskopą (*angl.* atomic force microscope, AFM), o agregaciją – pasitelkus dinaminės šviesos sklaidos (*angl.* dynamic light scattering, DLS) technologiją [83].

Unikalios sidabro nanodalelių savybės leidžia jas pritaikyti įvairiose srityse:

- Medicinoje – jos naudojamos biodavikliuose [85-86], kaip biologiniai žymenys ląstelių žymėjime [87], antimikrobinė medžiaga – sidabro nanodalelės inkorporuojamos į medicininius drabužius, įrankius ir aparatūrą norint padidinti jų atsparumą įvairiems mikroorganizmams [88].
- Optikoje – norint sustiprinti signalą paviršiaus aktyvintoje Ramano spektroskopijoje [89-91].
- Elektronikoje – sidabro nanodalelės naudojamos kuriant elektrai laidžius rašalus [92].
- Chromatografijoje – norint pagerinti nesočiųjų arba aromatinių junginių atskyrimą [93-94].

### 1.2.3 Sidabro nanodalelių sintezė

Literatūroje aprašyta daug skirtingų metodų, kuriais galima susintetinti sidabro nanodaleles. Principinė sintezės schema tirpaluose pateikta **1.2.3.1 pav.** Kiekvienas metodas turi savų privalumų ir trūkumų, tačiau šiame skyriuje bus aptariami tik dažniausiai naudojami sidabro nanodalelių sintezės metodai.



#### 1.2.3.1 pav. Principinė sidabro nanodalelių sintezės schema.

Abliacija lazeriu – tai fizikinis metodas, kai metalinis sidabras tirpale yra veikiamas lazeriu, kas lemia sidabro nanodalelių susiformavimą. Šio metodo privalumu buvo laikomas sistemos grynumas. Naudojamas tirpiklis nėra užteršiamas pašalinėmis organinėmis ar neorganinėmis medžiagomis [95]. Tačiau vėlesni tyrimai parodė, kad papildomų reagentų naudojimas yra

būtinai, norint kontroliuoti susidarančių dalelių dydį, užtikrinti sistemos stabilumą ar pagreitinti sintezę [96-99]. Šiuo metodu suformuotos dalelės yra vienodo dydžio, tačiau yra reikalinga brangi įranga ir didelės energijos sąnaudos. Sintetinių dalelių dydis priklauso nuo kelių lazerio parametrų – spindulio bangos ilgio, veikimo bei impulsų trukmės (femto, piko ar nano režimais) [100-101].

Cheminė redukcija – tai labiausiai paplitęs sidabro nanodalelių sintezės metodas, kuris paremtas chemine  $\text{Ag}^+$  jonų redukcija iki  $\text{Ag}^0$  naudojant tiek organinius, tiek neorganinius reduktorius. Galimi reduktoriai – natrio borohidridas, vandenilio dujos, natrio citratas, askorbo rūgštis, N,N-dimetilformamidas, Tollens'o reagentas, polietilenglikolis, įvairūs sacharidai [102-106]. Įvykus  $\text{Ag}^+$  jonų redukcijai iki  $\text{Ag}^0$ , prasideda aglomeracija iki oligomerinių klasterių, kurie toliau auga ir suformuoja sidabro nanodaleles [80]. Taikant šį metodą labai svarbu naudoti stabilizatorius, kurie apsaugo disperguotas nanodaleles paruošimo metu – neleidžia vykti tolimesnei dalelių aglomeracijai bei sedimentacijai, nusėsti ant sienelių paviršiaus. Stabilizatoriais gali būti naudojami sintetiniai polimerai (polivinilo alkoholis, polivinilo piroolidonas, polietilenglikolis) [106-108], paviršiaus aktyvios medžiagos [109-110] arba polisacharidai (krakmolas, heparinas) [111-112]. Cheminės redukcijos metodu sintetinti sidabro nanodaleles yra paprasta ir nebrangu, o sintezė atliekama ganėtinai greitai. Sintetinių dalelių dydį bei morfologiją galima kontroliuoti keičiant sidabro jonų šaltinį, reduktorius, stabilizatorius, jų koncentracijas ir tirpalo pH, tačiau susintetintas daleles sunku išgryninti – išplauti įvairias priemaišas, kurios patenka į sistemą su naudojamais reagentais.

Biologinė sidabro nanodalelių sintezė (dažnai vadinama „žaliąja sinteze“) – tai sintezės metodas, kurio metu reduktoriumi ar stabilizatoriumi naudojamas ne cheminis reagentas, o biologinė medžiaga. Ekologiškų tirpiklių ir netoksiškų redukuojančių bei stabilizuojančių medžiagų parinkimas yra svarbiausias „žaliosios sintezės“ etapas. Tokiomis medžiagomis gali būti tiek paprastos prokariotinės bakterijų ląstelės, tiek eukariotiniai grybai ar augalai (1.2.3.1 lentelė) [80,113].

### 1.2.3.1 lentelė

Biologinių medžiagų, naudojamų sidabro nanodalelių sintezei pavyzdžiai [80].

Bakterijos	Augalai	Grybai	Dumbliai
<i>Aeromonas sp.</i> <i>SH10</i>	<i>Aloe vera</i> lapų ekstraktas	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	<i>Spirulina</i> <i>platensis</i>
<i>Klebsiella</i> <i>pneumonia</i>	<i>Azadirachta</i> <i>indica</i>	<i>Phaeneroechaete</i> <i>chryso sporium</i>	<i>Oscillatoria</i> <i>willei</i>
<i>Lactobacillus</i> <i>atmainos</i>	<i>Cinnamomum</i> <i>camphora</i>	<i>Verticullium sp.</i>	<i>Gelidiella</i> <i>acerosa</i>
<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> AG259	<i>Emblica</i> <i>Officinalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Corynebacteriu</i> <i>m sp.</i> SH09	<i>Pelargonium</i> <i>graveolens</i> lapai	<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	
<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	<i>Pinus eldarica</i>	<i>Fusarium</i> <i>semitectum</i>	

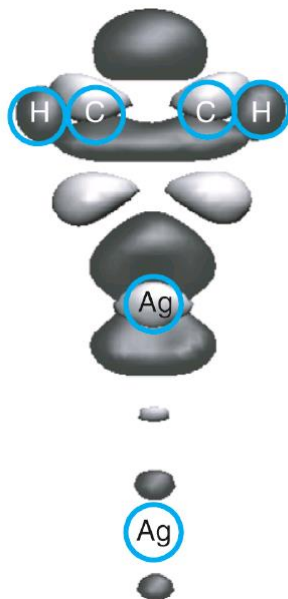
Sidabro nanodalelių dydį ir morfologiją galima kontroliuoti keičiant tam tikrus sintezės parametrus [114-117]:

- Reakcijos mišinio pH
- Mišiniui tenkančios šviesos kiekį
- Temperatūrą
- Biomasės ir substrato koncentracijas
- Maišymo greitį
- Reakcijos ir inkubacijos laiką

#### 1.2.4 Nanosidabro chromatografija

Nanodalelėmis modifikuoti monolitiniai sorbentai neseniai tapo daug žadančia medžiagų klase, kuri gali būti sėkmingai panaudota cheminėje analizėje. Šie sorbentai pasižymi išskirtiniu selektyvumu, kuris suteikia jiems didelį pranašumą lyginant su klasikiniiais monolitiniiais sorbentais [93, 94, 114-116]. Yra nustatyta, kad sidabro nanodalelėmis modifikuotų monolitinių sorbentų veikimo principai yra panašūs kaip  $Ag^+$ -HPLC [118]. Sąveika tarp sidabro nanodalelių ir alkenų atsiranda dėl krūvio pernašos. Krūvio pasiskirstymas tokioje sistemoje pavaizduotas **1.2.4.1 pav.** Dėl

sidabro nanodalelių sąveikos su dvigubaisiais ryšiais, jomis padengti monolitiniai sorbentai gali būti naudojami chromatografijoje nesočių organinių junginių atskyrimui [93-94].



**1.2.4.1 pav.** Etileno sąveikos sukeltas krūvio perkirstymas. Tamsios zonos vaizduoja krūvio trūkumą, o šviesios – perteklių. Krūvio pernaša vyksta iš  $\pi$  į  $\pi^*$  orbitalę [121].

### 1.3 Monolitiniai sorbentai

Efektyvus ir greitas medžiagų perskyrimas yra svarbus šiuolaikinės analizinės chemijos uždavinys. Monolitiniai sorbentai yra viena iš medžiagų, kuri gali pasitarnauti šiame procese dėl kelių priežasčių:

- Kontroliuojant monolito pradinę sudėtį, galima gauti norimo porų dydžio sorbentą [122, 123]
- Hibridiniai sorbentai pasižymi funkcinių grupių gausa, kurios gali sąveikauti su skirtingomis analitėmis [124]
- Nehibridiniai monolitiniai sorbentai pasižymi tuo, kad yra mechaniškai stiprūs, termiškai stabilūs bei chemiškai patvarūs [122].

Monolitiniai sorbentai gali būti sėkmingai panaudoti dujų chromatografinėje analizėje – pirmosios tokios kolonėlės buvo pradėtos

naudoti septintame dešimtmetyje. Jos buvo užpildytos poliuretano putomis ir pasižymėjo dideliu porėtumu (maždaug 85 %), nemažu pralaidumu, o teorinių lėkštelių skaičius vienam kolonėlės metrui buvo lygus apytiksliai 800 [125]. Tačiau šios kolonėlės turėjo tam tikrų trūkumų:

- Norint paruošti ilgesnes nei 1 metro kolonėles, poliuretano koncentracija turėjo būti mažesnė už optimalią – taip buvo padidinamas pralaidumas, tačiau sumažėdavo kolonėlės efektyvumas;
- Cheminio ryšio tarp monolito sluoksnio ir kolonėlės sienelių nebuvimas – esant temperatūros svyravimams termostate (kurie yra neatsiejama GC analizės dalis), poliuretano sluoksnis gali atsikabinti nuo kolonėlės sienelių taip suformuodamas pralaidų tarpą.

Šie trūkumai buvo pašalinti tik po 30 metų atsiradus naujos kartos monolitinėms kapiliarinėms kolonėlėms. Tiriant monolitų panaudojimo medžiagų perskyrimui galimybes, pagrindinės jų grupės buvo sorbentai silikagelio pagrindu, polimeriniai bei hibridiniai sorbentai. Kiekviena iš šių monolitų grupių pasižymi tam tikrais privalumais ir trūkumais, o konkretaus monolito tipo pasirinkimas priklauso nuo norimų pasiekti rezultatų [126].

### 1.3.1 Polimeriniai sorbentai

Polimeriniu pagrindu pagaminti monolitiniai sorbentai gaminami radikalinės polimerizacijos metodu, iniciatoriumi naudojant 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilą) (AIBN), kuris sužadinamas terminiu arba UV būdu. Tokį sorbentą galima susintetinti vieno žingsnio reakcijos pagalba. Akrilo monomerų tirpalas su piperazinu (kryžminio jungimo agentas) buvo polimerizuotas stiklo kapiliare apdorotame 3-(trimetoksisilil)propilmetakrilatu [127]. Kitas monolitinės kapiliarinės kolonėlės sintezės pavyzdys, kai gaunamas prie sienelių pririštas sorbentas yra polidivinilbenzenomonolitas, naudojamas dujų chromatografinėje analizėje. Kvarcinio stiklo kapiliaras prieš sintezę buvo paveiktas 3-(trimetoksisilil)propilmetakrilatu, kuris užtikrina ne tik gerą adheziją, bet ir cheminį monolito pririšimą prie kolonėlės sienelių. Taip paruoštas monolitas pasižymėjo dideliu savituoju paviršiaus plotu, nulėmusiu gerą sulaikymą ir atskyrimo atrankumą. Taip pat šie monolitai pasižymėjo terminiu stabilumu, kuris leido dirbti iki 300 °C temperatūros, o dėl savo hidrofobiškumo poliDVB monolitas buvo ypač tinkamas nopolinių medžiagų atskyrimui [125]. Kapiliariniai monolitiniai sorbentai naudojami ir skysčių chromatografijoje. Alkilinta polistireno monolitinė kolonėlė buvo naudojama peptidų analizėje [128].

Monolitinių sorbentų porėtumas yra svarbi charakteristika, nuo kurios priklauso medžiagų perskyrimo efektyvumas. Teoriškai polimero porėtumas turėtų tiesiogiai priklausyti nuo polimerizacijai naudoto porogeno kiekio, tačiau buvo pastebėta, kad sintetinant polimerinius monolitus jų porėtumas buvo gerokai didesnis nei porogeno tūris polimerizacijos mišinyje, taip pat porėtumas didėjo trumpėjant polimerizacijos trukmei [129-131].

Svarbus faktorius, darantis įtaką monolito struktūrai, yra polimerizacijos temperatūra. Monolitai, sintetinti aukštesnėje temperatūroje, pasižymėjo mažesnėmis poromis, platesniu porų dydžio diapazonu bei didesniu savituoju paviršiaus plotu. Tačiau dėl mažesnių porų nukenčia kolonėlės pralaidumas [130].

Kitas svarbus polimerinių monolitų sintezės aspektas yra monomero kiekis pradiniam mišinyje. Jis turi didelę įtaką monolito porėtumui ir kolonėlės pralaidumui. Kuo mažesnis pradinis monomero kiekis, tuo porėtesnis ir geresnis pralaidumo sorbentas gaunamas. Tačiau svarbu, kad vykstant polimerizacijai monomero kiekis būtų pakankamas monolitu užpildyti visą kolonėlę. Kitaip sorbentas gali neįsitvirtinti kolonėlėje ir, vykstant analizei, bus pašalintas [129-130].

### 1.3.2 Silikagelio pagrindo monolitiniai sorbentai

Populiari monolitinių sorbentų, naudojamų medžiagų atskyrimui HPLC ir GC metodais, grupė yra silikagelio dioksido pagrindu susintetinti monolitai. Šių sorbentų sintezė reikalauja nemažai laiko, tačiau, pagrindinis jų privalumas yra didelis porėtumas, dėl kurio gerokai išauga savitasis paviršiaus plotas, tačiau gali sumažėti kolonėlės pralaidumas. Monolitinio sorbento dydžio ir tūrio santykis yra 0,25 – 0,4, kai įprastinėse pakuotose kolonėlėse jis būna 1-2 [132]. Šie sorbentai yra sintetinami zolių-gelių metodu: vyksta alkoxi silikagelio darinių hidrolizė ir polikondensacija rūgštinėmis arba bazinėmis sąlygomis. Sintzei naudojamų reagentų, tirpiklių, katalizatorių ir porogenų literatūros apžvalga pateikta 1.3.2.1 lentelėje. Norint susintetinti efektyviai veikiančias kolonėles, reikia tinkamai parinkti sintezės sąlygas, kad būtų gauti optimaliausi porėtumo ir pralaidumo parametrai [125]. Taip pat, lyginant su įprastomis pakuotomis kolonėlėmis, šio sorbento kolonėlės pasižymi greitesniu atskyrimu (analizė atliekama 2-3 kartus greičiau). Silikagelio pagrindo monolitai gali būti sintetinami cilindro formos vamzdeliuose arba kapiliare, taip išvengiant papildomo kolonėlės



užpildymo proceso. Sintetinant monolitinius sorbentus tiesiogiai kapiliare yra labai svarbu atsižvelgti į kapiliaro diametrą. Kuo didesnio diametro kapiliaras, tuo sudėtingiau yra paruošti kolonėlę, kurioje nebūtų tarpo tarp jos sienelių ir monolitinio sorbento (dėl sorbento susitraukimo sintezės metu). Ši problema sprendžiama formuojant ryšius tarp sienelių ir sorbento [133].

### 1.3.2.1 lentelė

#### Silikatų sintezės zolių-gelių metodu sąlygos

Silicio junginys	Tirpiklis	Vanduo	Katalizatorius	Porogenas	Literatūros šaltinis
TEOS	EtOH				
1 <sup>a</sup>	3	4	HCl 0,02 M		
1	3	4	HNO <sub>3</sub> 0,02 M		
1	3	4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,02 M		134
1	3	4	Oksalorūgštis 0,02 M		
1	3	4	HF 0,02 M		
TMOS	MeOH				
1 <sup>a</sup>	0,5-3	2 - 20	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H 0,06 <sup>-1</sup> M		135
			NH <sub>4</sub> OH 0,02 <sup>-1</sup> M		
TMOS	Joniniskystis		HCO <sub>2</sub> H		136
1 <sup>a</sup>	1				
MTES	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		TFA		137
0,75 <sup>a</sup>	2	0.1			
TEOS	EtOH		HCl 12x10 <sup>-3</sup> M		
C <sub>8</sub> TEOS					
107 μl <sup>b</sup>	168 μl	60 μl			138
TEOS/C <sub>8</sub> TEOS	EtOH		HCl 0.11 M		139
500 μl <sup>b</sup> / 282 μl	200 μl	93 μl	11 μl		
TEOS	EtOH		HCl 4,8 x 10 <sup>-6</sup> M	PEG	140

1 <sup>b</sup>	1 ml	0,86 µl			
TMOS	EtOH		HCl 10 <sup>-2</sup> M		141
1 <sup>a</sup>	4	1			
TMOS	MeOH		NH <sub>4</sub> OH 10 <sup>-2</sup> M		142
1 <sup>a</sup>	4	4			
TMOS	MeOH		NH <sub>4</sub> OH 3.7 x 10 <sup>-3</sup> M		143
1 <sup>a</sup>	14	4			
PEDS	Etilacetatas		HF 21 N		144
1 <sup>b</sup>	1		0,02 %		
TMOS			CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H 0.01 M	PEO	145
45 ml			Paskui plaunama su		
			NH <sub>4</sub> OH		
TEOS	EtOH		NH <sub>4</sub> OH 0,18 M		146
a					
TEOS	EtOH		NH <sub>4</sub> OH (27 %), HCl 1 M		147
1 <sup>b</sup>	20		2,8/3,2		
TMOS	EtOH		HCl 10 <sup>-2</sup> M/NH <sub>4</sub> OH 10 <sup>-1</sup> M		148
4 <sup>b</sup>	4	1			
TMOS			CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H 10 <sup>-2</sup> M	PEO	149
0,45 <sup>b</sup>					
TMOS			CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H 0,01 M	P123	94
0.1 <sup>a</sup>		5,5	/ Karbamidas 1 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> – medžiagos molinis ekvivalentas

<sup>b</sup> – medžiagos tūrinis ekvivalentas

### 1.3.3 Hibridiniai monolitiniai sorbentai

Hibridiniai monolitai yra sorbentų grupė, pasižyminti savybėmis, būdingomis tiek polimeriniams, tiek neorganiniams sorbentams ir gali apjungti abiejų tipų sorbentų privalumus. Jie pasižymi stabilumu plačiame pH intervale, jų sintezei galima panaudoti įvairius monomerus, taip pat jie turi didelį savitąjį paviršiaus plotą, pasižymi terminiu ir mechaniniu stabilumu [123, 150]. Pagal cheminę sudėtį hibridiniai sorbentai gali būti skirstomi į dvi pagrindines grupes:

- Hibridiniai silikagelio pagrindo monolitai – sintetunami iš silicio prekursorių, turinčių organinių dalių. Dažniausiai tokie sorbentai sintetunami zolių-gelių metodu.
- Hibridiniai polimerinio pagrindo monolitai – yra sintetunami modifikuojant norimas funkcines grupes sorbente (chemiškai prijungiant norimus darinius). Pagrindinis tokių sorbentų trūkumas yra brinkimas organiniuose tirpikliuose, dėl ko kinta porų struktūra.

Patrauklus hibridinių silikagelio pagrindo sorbentų panaudojimo aspektas yra palyginti nesudėtingas sintezės procesas, bei galimybė kontroliuoti norimų funkcinių grupių kiekį galutiniame monolite. Vienas populiariausių hibridinių monolitų sintezės variantų yra „vieno indo procesas“ – tokia sintezė vykdoma visus reagentus sumaišant viename inde neišskirinėjant tarpinių produktų. Gautas monolitas pasižymi mechaniškai, chemiškai ir termiškai stabilium silicio dioksido karkasu, o monolito išorėje esančios organinės funkcinės grupės nulemia jo paviršiaus savybes bei sąveikos galimybes [151, 152].

Hibridiniai silikagelio pagrindo monolitiniai sorbentai, tinkami medžiagų atskyrimui, savo sudėtyje turi amino, tiolinių, akrilato, vinilo, propilo bei oktilo funkcinių grupių. Didelio populiarumo sulaukia sorbentai, turintys savo sudėtyje vinilo funkcinių grupių. Keičiant pradinius reagentų kiekius galima gauti monolitus su skirtingais vinilo grupių kiekiais, o per šias grupes modifikuoti monolitą naudojant „click“ reakciją [123].

Hibridiniai polimerinio pagrindo monolitai sorbentai gali būti panaudoti nanodalelių inkorporavimui polimerinio sorbento porose, kartu išlaikant funkcines grupes. Tokio tipo sorbentai gali būti naudojami skysčių chromatografijoje, tačiau jie turi būti chemiškai stabilūs ir gebėti atlaikyti keliasdešimt barų slėgį [153].

Hibridiniai monolitai yra patraukli ir perspektyvi sorbentų rūšis. Svarbu, kad jų sintezė yra paprastas procesas, juose dera tiek organinių, tiek neorganinių monolitinių sorbentų savybės, o sorbento sudėtį galima kontroliuoti parenkant monomeras su norimomis funkcinėmis grupėmis, kurios tikėtų medžiagų, kurias analizuojame, atskirumui. Taip pat, priklausomai nuo sintezės būdo, galime gauti ir skirtingą tų grupių išsidėstymą monolite.

#### 1.4 Monolitinių sorbentų modifikavimas

Labai svarbus aspektas monolitinių sorbentų panaudojimui medžiagų analizėje yra jų modifikavimo galimybės. Analitės sulaikymas priklauso nuo naudojamo sorbento savybių. Dėl šios priežasties, norint padidinti sorbento selektyvumą, jo paviršiuje yra formuojamos hidrofobinės arba jonitinės grupės [154-156]. Itin svarbi monolitinių sorbentų savybė – galimybė taikyti molekulinį anspaudų technologiją, kuri yra puikus papildymas imobilizuotiems antikūnams ar receptoriams. Suformuotas tikslinės analitės šablonas leidžia ją itin selektyviai atskirti nuo matricos komponentų [157].

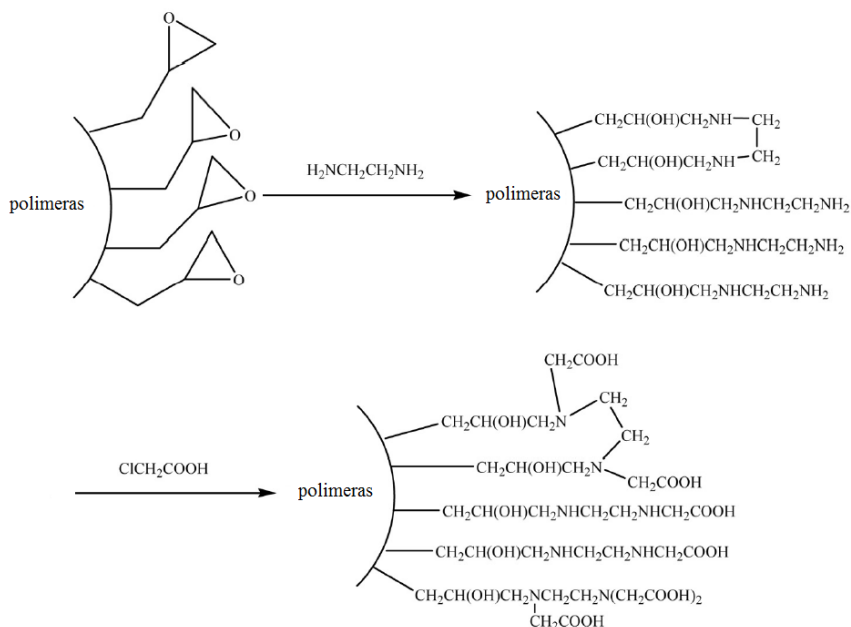
Norint įvesti į monolito struktūrą tikslinius elementus yra naudojami trys metodai:

- Tiesioginis – kai funkcinės grupės įvedamos monolitinio sorbento sintezės metu.
- Cheminė reakcija su sorbento paviršiuje esančiomis aktyviomis funkcinėmis grupėmis.
- Mechaninis porų, esančių monolitiniame sorbente, užpildymas

##### 1.4.1 Polimerinių sorbentų modifikavimas

Polimerinius sorbentus labai paprasta funkcionalizuoti sintezės metu naudojant tikslinių grupių turinčius reagentus. Pavyzdžiui, naudojant butilmetakrilatą ir 3-sulfopropilmetakrilatą galima gauti sorbentą, pasižymintį hidrofobinėmis ir jonitinėmis savybėmis [154]. Taip pat polimerinių sorbentų paviršiuje dažnai yra stengiamasi suformuoti epoksi grupes, prie kurių nesudėtinga prijungti norimus pakaitus [155, 156]. Šias grupes galima nesunkiai paversti sulfo grupėmis sorbentą paveikus  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  tirpalu [158] arba atlikti sorbento funkcionalizavimą amino ir karboksi grupėmis (**1.4.1.1 pav.**). Selektviai peptidų, baltymų ar kitų biologinių junginių ekstrakcijai iš mėginio matricos yra naudojami nanodalelėmis

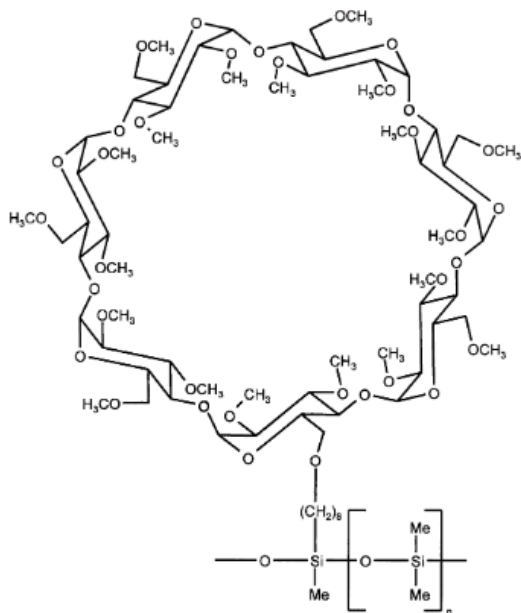
modifikuoti polimeriniai monolitai. Nanodalelėmis sorbentai gali būti modifikuojami mechaniškai arba imobilizuojami jo paviršiuje panaudojus elektrostatinę sąveiką arba kovalentinių ryšių formavimą. Dažniausiai kovalentiniais ryšiais yra pririšamos aukso nanodalelės. Šiam tikslui pradiniam sorbente yra formuojamos amino, merkapto arba ciano funkcinės grupės [159].



**1.4.1.1 pav.** Epoksi grupių polimeriniame sorbente funkcionalizavimo schema [160].

#### 1.4.2 Silikagelio pagrindo sorbentų modifikavimas

Silikagelio pagrindo sorbentai, priešingai nei tradiciniai polimeriniai turi aktyvų paviršių (laisvos silanolinės grupės), kas leidžia jį tiesiogiai funkcionalizuoti tokiais pakaitais kaip oktadecil- [161], aminopropil- [162] ar kitais chlor- ar alkoksisilanais. Dažniausiai šie monolitai yra modifikuojami norint suteikti jiems hidrofobinių ar jonitinių savybių, dėl kurių šie sorbentai galėtų būti taikomi skysčių chromatografijoje arba kietafazės ekstrakcijos sistemose. Įdomi kapiliarinių silikagelio monolitų, kurie naudojami elektrochromatografijoje, modifikavimo sfera yra jų pavertimas chiraliniais sorbentais. Šiam tikslui sorbento modifikavimui gali būti panaudoti ciklodekstrinai. Tokio tipo sorbento struktūra yra pavaizduota **1.4.2.1 pav.** [163].



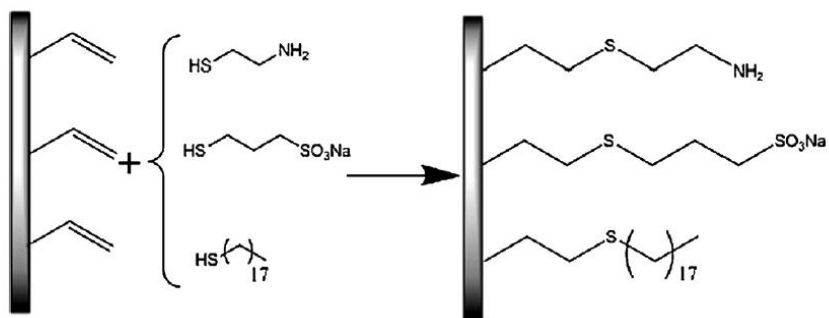
**1.4.2.1 pav.** Chiralinis silikagelio pagrindo monolitinis sorbentas [163].

Siekiant suteikti sorbentui jonitinių savybių, jo paviršių galima modifikuoti ketvirtinėmis amonio druskomis. Šiam tikslui gali būti panaudotas cetiltrimetilamonio bromidas arba cetiltrimetilamonio chloridas [164]. Kitas būdas tokio tipo sorbentams gauti yra dvigubas modifikavimas. Iš pradžių monolitinis sorbentas yra padengiamas oktadecilo grupėmis, o tada – amfoterine paviršiaus aktyvia medžiaga, tokia kaip N-dodecil-N,N-(dimetilamonio)dekanoatas [165].

### 1.4.3 Hibridinių sorbentų modifikavimas

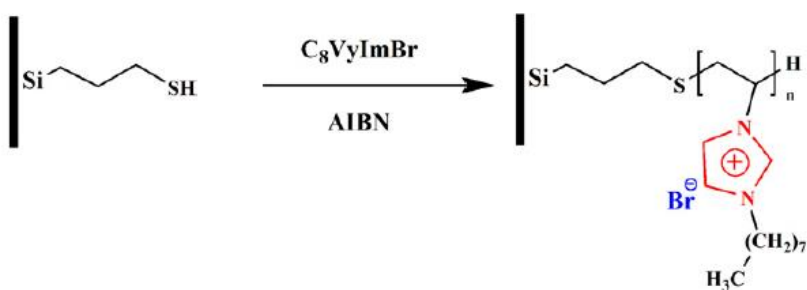
Hibridiniai monolitiniai sorbentai yra patrauklūs dėl savybių, būdingų tiek organiniams, tiek neorganiniams monolitams. Sėkmingas jų modifikavimas gali padėti pritaikyti šiuos sorbentus daugumos medžiagų atskyrimui. Hibridiniai monolitai, turintys vinilo grupių, yra vieni populiariausių. Vykdam įvairias chemines reakcijas, per šias grupes galimas tolimesnis monolito modifikavimas, išgaunant vis kitokias paviršiaus struktūras (**1.4.3.1 pav.**). Taip pat, parinkus tinkamas sąlygas, galima išgauti monolitus su skirtingu vinilo grupių kiekiu. Lyginant monolitinius sorbentus susintetintus iš 20 % ir 80 % viniltrimetoksilano, buvo pastebėta, kad

praktiniam taikymui didesnę vinilo grupių kiekį turintis sorbentas yra patrauklesnis: jam nebūdingas susitraukimas ir atšokimas nuo kapiliaro sienelių. Dėl mažo porų tūrio manoma, kad didžioji vinilo grupių dalis yra monolito išorėje. Dėl to sorbentas pasižymi dideliu vinilo grupių prieinamumu bei tinkamumu tolimesniam modifikavimui [166].



**1.4.3.1 pav.** Vinilo grupių, esančių hibridiniame sorbente, modifikavimo schema [123].

Nauja polimerinių medžiagų klasė – polimeriniai joniniai skysčiai – sulaukia daug dėmesio dėl savo mechaninių ir elektrocheminių savybių bei terminio stabilumo. Šios medžiagos buvo naudojamos stacionariomis fazėmis skysčių [167] ir dujų [168] chromatografijoje. Siekiant susitiprinti sąveiką tarp stacionarios fazės ir analitės, šio tipo medžiagos buvo sėkmingai panaudotos hibridinių monolitinių sorbentų modifikavimui (**1.4.3.2 pav.**).



**1.4.3.2 pav.** Hibridinio monolito modifikavimo polimeriniais joniniais skysčiais schema [169].

Dėl didelio reakingumo nukleofilinėse reakcijose su tokiais nukleofilais kaip NaOH, NaOR, NaCN arba  $\text{NH}_3$  yra sintetinami chlorpropilo grupėmis funkcionalizuoti hibridiniai sorbentai. Jie yra itin naudingi norint gauti  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{CN}$  arba  $-\text{NH}_2$  grupes savo struktūroje turinčias hibridines medžiagas [170].

### 1.5 Monolitinių sorbentų panaudojimas

Monolitinius sorbentus, dėl daugybės skirtingų sintezės ir paviršiaus modifikavimo būdų, galima pritaikyti įvairių medžiagų nustatymui. Jų įvairiapusiškumas ypatingai aktualus analizinėje chemijoje. Tokio tipo sorbentai gali palengvinti ir pagreitinti mėginio analizę. Jie gali būti taikomi analizuojant maisto, vandens ar farmakologinius mėginius. Taip pat juos galima pritaikyti biomolekulių analizei. Šie sorbentai gali būti naudojami kietafazės ekstrakcijos sistemose, siekiant sumažinti matricos įtaką ar sukcentruoti tikslines analites.

Monolitiniai sorbentai plačiai naudojami daugelio junginių (maisto komponentų, priedų ar teršalų) atskyrimui ir nustatymui. Tai gali būti vitaminai, veterinarinių vaistų likučiai, mikotoksinai, konservantai, saldikliai, baltymai, peptidai ir kt. [171]. Monolitų technologija naudojama ir sudėtingų maisto matricių, tokių kaip pienas, mėginių paruošimui ir tyrimams [172]. Panaudojant komercinę C18 monolitinę kolonėlę, galima paprastai nustatyti malachito žaliojo dažo mažas koncentracijas žuvų pašare, greitai ir efektyviai nustatyti kelis makrolidų klasės antibiotikus gyvūnų audiniuose, kiaušiniuose, piene, kūdikių maiste [176]. Monolitiniai sorbentai taikomi ir kapiliarinėje elektrochromatografijoje, pavyzdžiui, policiklinių aromatinių angliavandenilių, esančių jūros gėrybėse, sukcentravimui ir atskyrimui. Derinant kapiliarinę elektrochromatografiją su molekulių išpaudų technologija pavyko nustatyti pesticido trichlorfono likučius daržovėse [174]. Omega 3 riebalų rūgštys, tokios kaip EPA ar DHA yra svarbus mitybos komponentas, galintis apsaugoti nuo širdies ir kraujagyslių ligų, o efektyvus ir greitas jų atskyrimas nuo kitų riebalų rūgščių yra labai aktualus. Panaudojus monolitines kolonėles, galima gauti ne tik greitesnę perskyrimą, bet ir didesnę atrankumą šių riebalų rūgščių esteriams, lyginant su kitomis, mažesnio nesotumo laipsnio riebalų rūgštimis [175]. Silikagelio pagrindo monolitiniu sorbentu, kuris modifikuotas sidabro nanodalelėmis, užpildytas kolonėles galima panaudoti ir kitų nesočiųjų junginių atskyrimui.



Modifikavus kolonėlę sidabru, žymiai pagerėja tam tikrų medžiagų sulaikymas, lyginant su paprastomis, bei amino grupėmis modifikuotomis kolonėlėmis, o medžiagų sulaikymo trukmė priklauso nuo jų nesotumo laipsnio. Tokios kolonėlės gali būti panaudotos ir kaip alternatyva komercinėms kolonėlėms, skirtoms cis- bei trans- izomerų atskyrimui [93]. Aukso nanodalelėmis modifikuoti monolitai gali būti naudojami peptidų ir baltymų atskyrimui elektrochromatografijoje ir HPLC [176].

Monolitinės kolonėlės atvirkščių fazių chromatografijoje pasižymi įprastu neutralių junginių sulaikymo mechanizmu, tačiau gali pagerinti bazinių junginių atskyrimą. Glicidilmetakrilato ir etilendimetilakrilato kolonėlė, modifikuota  $SO_3^{2-}$  grupėmis, pasižymi stipriomis katijonų mainų savybėmis ir gali puikiai perskirti  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ir  $Ca^{2+}$  jonus, o teradecilamino grupėmis modifikuotas monolitas, dėl vidinių polinių funkcinių grupių, yra puikus atvirkščių fazių – kapiliarinės elektrochromatografijos sorbentas, tinkamas neutralių ir bazinių analizių, pavyzdžiui, aromatinių angliavandenilių, fenolių bei anilinų analizei [177-178].

Sorbentų pritaikymo farmakologijoje pavyzdys gali būti sidabro dalelėmis dengti monolitai, naudojami radioaktyvių halogenų pertekliaus pašalinimui po radiofarmacinių ar halogenais žymėtų junginių sintezės. Literatūroje pateikiama informacija, kaip modifikavus monolitinį sorbentą sidabro nanodalelėmis, pavyko jį panaudoti jodido bei laisvojo jodo pašalinimui iš galutinio sintezės produkto [179].

Platų monolitinių sorbentų pritaikymo spektrą lemia:

- Lengva ir greita sintezė,
- Didelės struktūros įvairovės,
- Paviršiaus modifikavimo galimybės,
- Geras monolito pralaidumas,
- Greiti masių mainai,
- Stabilumas.

## 2. EKSPERIMENTO METODIKA

### 2.1 Reagentai

Visi eksperimentams naudoti reagentai analitiškai gryni.

Sidabro jonų kietafazės ekstrakcijos sistemoms naudoti reagentai: Silikagelis „Silica gel 60“ (dalelių dydis 0,063–0,2 mm) įsigytas iš Sigma-Aldrich, sidabro nitratas pirktas iš Girochem. Tirpikliai: dichlorometanas (99,8 %), metanolis (99,9 %), n-heksanas (98,0 %), acetonas (99,9 %), įsigyti iš Merk. Discovery™ Ag-ION kietafazės ekstrakcijos kolonėlės pirktos iš Supelco.

Riebalų rūgščių metilo esterių formavimui naudoti reagentai: natrio hidroksidas, įsigytas iš Eurochemicals, boro trifluorido-metanolio kompleksas (20 % tirpalas metanolyje), izooktanas (99,0 %), natrio sulfatas (99,0 %), metanolis (99,9 %) pirkti iš Merk. Acetil chloridas (99,0 %), chloroformas (99,0 %), trikosano rūgštis (99 %) įsigyti iš Sigma-Aldrich.

Trans riebalų rūgščių kiekybiniam įvertinimui vidiniu standartu naudotas linolo rūgšties metilo esteris, įsigytas iš Carl Roth.

Aminopropil grupėmis modifikuoto ir sidabro nanodalelėmis padengto silikagelio monolito sintezei naudoti reagentai: Acto rūgštis (99,7%), toluenas (99,5 %), (3-aminopropil)trietoksisilanas (98 %), tetrametoksisilanas (98 %) pirkti iš Alfa Aesar. Karbamidai, poli(etilenglikolis)-blok-poli(propilenglikolis)-blok-poli(etilenglikolis), 37 % formaldehido tirpalas vandenyje ir etanolis ( $\geq 99,8$ ) įsigyti iš Sigma-Aldrich. Sidabro nitratas pirktas iš Girochem.

Mėginių mineralizavimui mikrobangose naudoti reagentai: azoto rūgštis 65% pirkti iš Merk ir vandenilio peroksidas 33% pirktas iš AppliChem.

### 2.2 Tirpalai

Riebalų rūgščių metilo esterių identifikavimui naudotas standartinis riebalų rūgščių metilo esterių mišinio „ME 100“ (10 mg ml<sup>-1</sup>) tirpalas dichlormetane (butirinės rūgšties metilo esteris 4 %; kaprono rūgšties metilo esteris 4 %; kaprilino rūgšties metilo esteris 4 %; kaprino rūgšties metilo esteris 4 %; undekano rūgšties metilo esteris 2 %; lauro rūgšties metilo esteris 4 %; tridekano rūgšties metilo esteris 2 %; miristino rūgšties metilo esteris 4 %; cis-9-miristoleino rūgšties metilo esteris 2 %; pentadekano rūgšties metilo esteris 2 %; cis-10-pentadekano rūgšties metilo esteris 2 %;

palmitino rūgšties metilo esteris 6 %; cis-9-palmitoleino rūgšties metilo esteris 2 %; heptadekano rūgšties metilo esteris 2 %; cis-10-heptadekano rūgšties metilo esteris 2 %; stearino rūgšties metilo esteris 4 %; cis-9-oleino rūgšties metilo esteris 4 %; trans-9-elaidino rūgšties metilo esteris 2 %; cis-9,12-linoleino rūgšties metilo esteris 2 %; trans-9,12-linolelaidino rūgšties metilo esteris 2 %; cis-9,12,15-linoleno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-6,9,12-linoleno rūgšties metilo esteris 2 %; arachidino rūgšties metilo esteris 4 %; cis-11-eikozeno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-11,14-eikozadieno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-11,14,17-eikozatrieno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-8,11,14-eikozatrieno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-5,8,11,14-arachidono rūgšties metilo esteris 2 %; cis-5,8,11,14,17-eikozapentaeno rūgšties metilo esteris 2 %; heneikozano rūgšties metilo esteris 2 %; becheno rūgšties metilo esteris 4 %; eruko rūgšties metilo esteris 2 %; cis-13,16-dokozadieno rūgšties metilo esteris 2 %; cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaeno rūgšties metilo esteris 2 %; trikozano rūgšties metilo esteris 2 %; lignocero rūgšties metilo esteris 4 %; cis-15-nervono rūgšties metilo esteris 2 %) įsigytas iš Larodan.

Trans riebalų rūgščių kalibracinės kreivės sudarymui tirpalai buvo ruošiami skiedžiant trans-9-elaidino rūgšties metilo esterio tirpalą heptane ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) įsigytą iš Sigma-Aldrich.

Sidabro kalibracinės kreivės sudarymui tirpalai buvo ruošiami skiedžiant sidabro standartinį tirpalą „Pure GFAAS Mixed standard“ ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 5 % azoto rūgštyje pirktą iš PerkinElmer. Praskiesti tirpalai buvo sunaudojami pagaminimo dieną.

Monolitinių sorbentų sintezei ir modifikavimui tirpalai buvo ruošiami ir sunaudojami sintezės metu. Sintezės ar modifikavimo metu naudoti tirpalai aprašyti 2.8 – 2.10 skyriuose.

### 2.3 Įranga ir aparatūra

Chromatografiniai tyrimai buvo atliekami dujų chromatografu Shimadzu 2010 plus su liepsnos jonizaciniu detektoriumi bei automatiniu mėginių paėmėju (Japonija). Chromatografiniam junginių perskyrimui naudota kapiliarinė kolonėlė: Rtx®-2330, kurios ilgis 105 metrai, vidinis skersmuo 0,25 mm, nejudrios fazės sluoksnio storis  $0,2 \mu\text{m}$  (90 % biscianopropil-, 10 % fenilcianopropil- polisiloksanas) (JAV). Medžiagų svėrimui buvo

naudojamos analizinės svarstyklės Sartorius, svėrimo ribos 0,01-210, tikslumas  $\pm 0,01$ g (Vokietija).

Sorbentų paviršiaus morfologija buvo ištirta skenuojančiu elektroniniu mikroskopu Hitachi SU – 70 ir transmisijos elektronų mikroskopu FEI Tecnai G2 F20 X-TWIN su STEM moduliu, kuris aprūpintas rentgeno spinduliuotės energijos sklaidos spektroskopijos (EDS) detektoriumi, skirtu elementinei analizei.

Tikslus sidabro kiekis buvo nustatytas induktyviai susietos plazmos optinės emisijos spektroskopu Optima 8000. Perkin Elmer (JAV).

Susintetintų sorbentų porų dydis ir tūris buvo įvertintas naudojant Quantachrome Autosorb iQ žematemperatūros azoto sorbcijos analizatorių.

Termogravimetrinė analizė apimanti diferencinę skenuojančią kalorimetriją atlikta naudojant STA 6000 TGA/DSC įrangą.

UV-VIS spektrai buvo užrašyti naudojant spektrofotometrą UV/VIS Lambda 365. PerkinElmer (JAV)

Tirpalų pH buvo matuojamas pH matuokliu Hanna (India).

Tirpalų maišymui naudota magnetinė maišyklė RSLAB-11NCD (JAV).

Medžiagų sintezė ir džiovinimas reikalingoje temperatūroje buvo atliekami termostate Memmert (Vokietija).

Sorbentų kalcifikavimui buvo naudojama aukštatemperatūrinė krosnis SNOL (Lietuva), leidžianti kaitinti medžiagas iki 1100 °C temperatūros. Temperatūros reguliavimas ir kontrolė vykdoma elektroniniu mikroprocesoriniu temperatūros reguliatoriumi, kuris veikia kartu su termopora, įmontuota kameroje.

Elementinei analizei mėginiai buvo mineralizuojami mikro bangų reaktoriuje Multiwave GO (JAV).

Efektyviam fazių atskyrimui buvo naudota centrifuga Boeco S-8 (Vokietija).

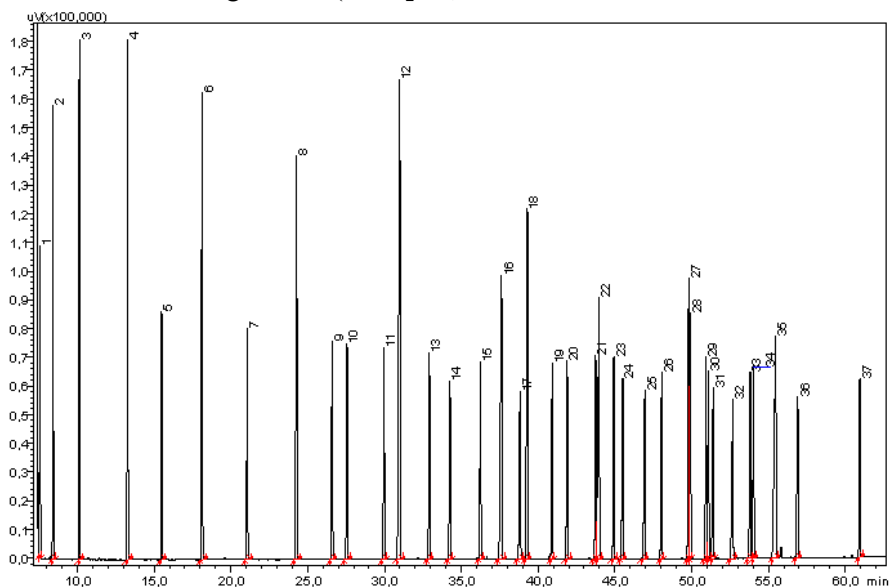
## 2.4 Dujų chromatografinės analizės sąlygos

Atliekant dujų chromatografinę analizę judria faze buvo naudojamas Helio dujų srautas.

Naudojant Rtx®-2330 chromatografinę kolonėlę optimalus nešančiųjų dujų linijinis greitis yra 32,0 cm s<sup>-1</sup>. Chromatografo garintuvo temperatūra palaikoma 225 °C. Srautas dalinamas santykiu 10:1. Buvo naudojamas chromatografinės kolonėlės termostato temperatūros programavimo režimas: pradinė temperatūra 120 °C laikoma 1 minutę, po to temperatūra keliama 2

°C min<sup>-1</sup> greičiu iki 250 °C ir laikoma 1 min. Analizės trukmė 67 min. Liepsnos jonizacinio detektoriaus temperatūra 260 °C. Pagalbinės dujos helis. Jų tūrinis greitis 30 ml min<sup>-1</sup>. Vandenilio dujų tūrinis greitis 40 ml min<sup>-1</sup>, sintetinio oro dujų tūrinis greitis 400 ml min<sup>-1</sup>.

Atliekant riebalų rūgščių metilo esterių dujų chromatografinio atskyrimo sąlygų optimizavimą, buvo naudojamas 37 analičių metilo esterių mišinys. Optimizuotomis sąlygomis visos analitės buvo atskirtos ir identifikuotos. Analčių sulaikymo laikas buvo naudojamas kaip kriterijus jų identifikavimui mėginiuose (2.4.1 pav).



2.4.1 pav. Standartinio riebalų rūgščių metilo esterių mišinio „ME 100“ chromatograma. Mišinio sudėtis pateikta 2.4.1 lentelėje.

#### 2.4.1 lentelė

Standartinio riebalų rūgščių metilo esterių mišinio „ME 100“ sudėtis

1	C4:0	20	C:18:2-9,12-c
2	C6:0	21	C18:3-6,9,12c
3	C8:0	22	C20:0
4	C10:0	23	C18:3-9,12,15c
5	C11:0	24	C20:1-11c
6	C12:0	25	C20:2-11,14c
7	C13:0	26	C20:4-5,8,11,14tr
8	C14:0	27	C21:0

9	C14:1-9c	28	C22:0
10	C15:0	29	C20:3-8,11,14c
11	C15:1-10c	30	C20:3-11,14,17c
12	C16:0	31	C21:1-13c
13	C16:1-9c	32	C22:2-13,16c
14	C17:0	33	C24:1-15c
15	C17:1-10c	34	C23:0
16	C18:0	35	C24:0
17	C18:1-9tr	36	C20:5-5,8,11,14,17c
18	C18:1-9c	37	
19	C18:2-9,12tr		

## 2.5 Elementinės analizės sąlygos

Atliekant sidabro elementinę analizę sorbente, 0,1 g mėginio mineralizuojama 5 ml koncentruotos azoto rūgšties (65 %) ir 2 ml vandenilio peroksido (33 %) mišinyje, reakciją atliekant mikro bangų reaktoriuje. Mikro bangų reaktoriaus programa sudaroma taip: mišinio temperatūra keliama iki 200 °C 30 minučių. Pasiekus šią temperatūrą, mišinys kaitinamas joje 10 minučių ir aušinamas iki 40 °C. Po mineralizavimo tirpalai perpilami į matavimo kolbą ir skiedžiami iki fiksuoto tūrio. Sidabro nustatymas vandeniniuose tirpaluose buvo atliekamas juos parūgštinus koncentruota azoto rūgštimi.

Tiksliam sidabro kiekio nustatymui buvo naudojamas optinės emisijos spektroskopas Optina 8000. Instrumentinės tyrimo sąlygos pateiktos 2.5.1 lentelėje.

### 2.5.1 lentelė

Sidabro nustatymo sąlygos	
<b>Matuojama emisijos linija, nm</b>	<b>Ag/328.068</b>
Matavimų skaičius	3
Galia, W	1300
	8 (plazma)
Oro srautas, l min <sup>-1</sup>	0,3 (pagalbinis)
	0,58 (nebulaizeris)
Plazmos vaizdas	Radialinis
Mėginio srautas, ml min <sup>-1</sup>	2,5 ml min <sup>-1</sup> , kapiliarinis

## 2.6 Riebalų rūgščių metilo esterių formavimas naudojant $\text{BF}_3$

50 mg mėginio įnešama į 100 ml kolbą, pridedama 5 ml  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  natrio hidroksido tirpalo metanolyje ir verdama vandens vonioje 30 min, prijungus grįžtamąjį kondensatorių. Tuomet įpilama 5 ml 20 % boro trifluorido metanolyje ir verdama vandens vonioje 3 min. Kolba ištraukiama iš vandens vonios, pridedama 5 ml izooktano, 20 ml sotaus natrio chlorido tirpalo, užkemšama ir 30 sekundžių purtoma. Į mišinį įpilama 50 ml distiliuoto vandens. Dviems fazėms išsisluoksniavus, viršutinis sluoksnis surenkamas ir džiovinamas jį praleidžiant pro natrio sulfatu užpildytą pastero pipetę. Ekstraktas laikomas tamsaus stiklo buteliuke.

## 2.7 Riebalų rūgščių metilo esterių formavimas, naudojant acetilo chloridą

50 mg mėginio įnešama į sandariai užsukamą mėgintuvėlį. Įpilama po 1 ml metanolio ir 100  $\mu\text{l}$  acetilo chlorido. Derivatizacija vyksta 10 min.  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje. Mėginiai plaunami trimis porcijomis po 6 ml distiliuoto vandens. Po kiekvieno plovimo mėginiai centrifuguojami 1 min.  $5000 \text{ aps. min}^{-1}$  greičiu.

## 2.8 Silikagelio monolitinių sorbentų sintezė

Maišant ant magnetinės maišyklės 1,4 g P123 ištirpinama 16 ml  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  acto rūgšties vandeninio tirpalo. Tirpalas pastatomas į ledo vonią ir maišomas 5 min. Atvėsintame tirpale ištirpinamas 1g karbamido. Po to lėtai sulašinama 2,5 ml TMOS mišinio intensyviai maišant. Tirpalas maišomas kol pasidaro visiškai skaidrus. Baigus maišyti tirpalas perkeliamas į vienkartinį 20 ml švirkštą. Iš švirkšto pašalinamas oras, jis užkemšamas ir laikomas termostate  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje 72 val. Susintetintas sorbentas plaunamas 2 kartus 200 ml vandens ir vieną kartą 200 ml vandens etanolio mišiniu 1:2. Kiekvienas plovimas atliekamas po 12 val. Išplautas sorbentas džiovinamas kambario temperatūroje 24 valandas ir  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje 5 dienas. Monolitas kalcifikuojamas aukštatemperatūrinėje krosnyje. Temperatūra joje keliama  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  greičiu iki  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  ir palaikoma 5 val.

## 2.9 Silikagelio monolitinių sorbentų modifikavimas

0,8 ml APTES tirpalo skiedžiama iki 20 ml toluenu. Į uždarą indą su magnetiniu maišikliu supilamas gautas tirpalas, įdedama 0,2 g kalcifikuoto sorbento ir maišant šildoma smėlio vonioje 80 °C temperatūroje 24 valandas. Atvėsintas iki kambario temperatūros sorbentas išimamas, plaunamas 3 porcijomis etanolio po 20 ml ir džiovinamas 40 °C temperatūroje 48 valandas.

## 2.10 Sidabro nanodalelių sintezė sorbente

0,2 g APTES modifikuoto silikagelio monolitinio sorbento pamerkiama į 20 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> etanolinio sidabro nitrato tirpalo 48 valandoms kambario temperatūroje. Sidabro jonais prisotintas monolitas išimamas iš tirpalo ir pamerkiamas į 37 % formaldehido vaneninį tirpalą 1 val. Po redukcijos sorbentas plaunamas 3 kartus 20 ml etanolio ir džiovinamas 40 °C temperatūroje 72 val.

## 2.11 Supelco Discovery Ag-Ion SPE kietafazės ekstrakcijos sąlygos

Prieš naudojimą Supelco Discovery Ag-Ion SPE kolonėlė plaunama 4 ml acetono ir kondicionuojama 6 ml heksano. Tuomet užnešama 100 µl riebalų rūgščių metilo esterių mišinio (10 mg ml<sup>-1</sup>), ir surenkamos penkios frakcijos. Surinktos frakcijos nugarinamos azoto srove ir ištirpinamos fiksuotame tūryje n-heksano. Kietafazės ekstrakcijos schema pateikta 2.11.1 lentelėje.



### 2.11.1 lentelė

Supelco Discovery Ag-Ion SPE kietafazės ekstrahavimo sąlygos

SPE žingsnis	Aprašymas
Kondicionavimas	Kondicionuoti kolonėlę 4 ml acetono, po to 6 ml heksano
Mėginio užnešimas	Užnešti 100 µl mėginio
1 frakcija	Eliuoti 6 ml heksanu:acetonu (96:4), pridėti 100 µl vidinio standarto
2 frakcija	Eliuoti 4 ml heksanu:acetonu (90:10)
3–5 frakcijos	Eliuoti po 4 ml acetono
Frakcijų koncentravimas	Išgarinti visas frakcijas azoto srove 40 °C temperatūroje ir skiesti heksanu iki 0,1 arba 1 ml

### 2.12 Sidabro jonais modifikuoto silikagelio kietafazės ekstrahavimo kolonėlės paruošimas

1 g silikagelio patalpinamas į 3 ml polipropileno vamzdelį tarp dviejų stiklo filtrų. Kolonėlė įvyniojama į aliuminio foliją. Per paruoštą kolonėlę praleidžiama 3 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> tirpalo. Tirpalui išlašėjus, kolonėlė iš eilės plaunama: 10 ml MeOH, 10 ml DCM ir 10 ml n-heksano.

### 2.13 Sidabro jonais modifikuoto silikagelio kietafazės ekstrahavimo sąlygos

Ant paruoštos kolonėlės užnešama 0,1 ml (10 mg ml<sup>-1</sup>) riebalų rūgščių metilo esterių mišinio. Jam pratekėjus į kolonėlę įpilama 1 ml n-heksano. Po to praleidžiama 10 ml 5 % heksano : DCM mišinio ir 10 ml 10 % heksano : DCM mišinio (šios frakcijos nerenkamos). Analitės išplaunamos n-heksano : DCM mišiniu pradėdant nuo 15 % DCM jame. Gaminamos tirpiklių mišinio porcijos po 3 ml ir surenkama 10 frakcijų. Surinktos frakcijos nugarinamos

azoto srove ir ištirpinamos fiksuotame tūryje n-heksano. Kietafazės ekstrakcijos schema pateikta 2.13.1 lentelėje.

**2.13.1 lentelė**

Sidabro jonais modifikuoto silikagelio kietafazės ekstrakcijos sąlygos

<b>Kietafazės ekstrakcijos žingsnis</b>	<b>Aprašymas</b>
Mėginio užnešimas	Užnešti 100 $\mu$ l mėginio, kuriame suminė analičių koncentracija 10 mg ml <sup>-1</sup>
1–2 frakcijos	Eliuoti 3 ml n-heksano:DCM (85:15)
3–4 frakcijos	Eliuoti 3 ml n-heksano:DCM (80:20)
5–6 frakcijos	Eliuoti 3 ml n-heksano:DCM (70:30)
7 frakcija	Eliuoti 3 ml n-heksano:DCM (50:50), pridėti 100 $\mu$ l vidinio standarto (c=0,0005 mg ml <sup>-1</sup> )
8 frakcija	Eliuoti 3 ml n-heksano:DCM (50:50)
9–10 frakcijos	Eliuoti 3 ml DCM
Frakcijų koncentravimas	Išgarinti visas frakcijas azoto srove 40 °C temperatūroje ir skiesti n-heksanu iki 0,1 arba 1 ml

#### 2.14 Silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos kolonėlės paruošimas

Siekiant gerai užpildyti kietafazės ekstrakcijos kolonėlę, paruoštas sorbentas buvo susmulkintas agatinėje grūstuvėje ir persijotas per sietus leidžiančius susirinkti 90-200  $\mu$ m dalelių dydžio frakciją. 0,2 g šios frakcijos buvo pakuojuama į komerciškai prieinamą 3 ml talpos polipropileno kolonėlę tarp dviejų stiklo filtrų. Prieš darbą kolonėlė plaunama 3 ml DCM.

## 2.15 Silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos sąlygos

Prieš naudojimą, silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos kolonėlė plaunama 3 ml n-heksano. Tuomet užnešama 50 µl riebalų rūgščių metilo esterių ir surenkamos šešios frakcijos. Surinktos frakcijos nugarinamos azoto srove ir ištirpinamos fiksuotame tūryje n-heksano. Kietafazės ekstrakcijos schema pateikta 2.15.1 lentelėje.

### 2.15.1 lentelė

Sidabro jonais modifikuoto silikagelio monolitinio sorbento kietafazės ekstrakcijos sąlygos

Kietafazės ekstrakcijos žingsnis	Aprašymas
Mėginio užnešimas	Užnešti 100 µl mėginio, kuriame suminė analičių koncentracija 10 mg ml <sup>-1</sup>
1–2 frakcijos	Eliuoti 1 ml n-heksano
3–4 frakcijos	Eliuoti 1 ml n-heksano : DCM (95:5)
5–6 frakcijos	Eliuoti 1 ml n-heksano : DCM (90:10)
Frakcijų koncentravimas	Išgarinti visas frakcijas azoto srove 40 °C temperatūroje ir skiesti n-heksanu iki 1 ml

## 2.16 Analizės rezultatų įvertinimas

Gauti analizės rezultatai įvertinami remiantis matematine statistika. Duomenų aritmetinis vidurkis ( $\bar{x}$ ) yra n matavimų rezultatų vidutinė vertė ir apskaičiuota pagal formulę:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i \quad (1)$$

Kur: n – matavimų skaičius;  
 $x_i$  – i-tojo matavimo vertė.

Matavimų serijos standartinis nuokrypis (S) parodo atskirų matavimo verčių išbarstymą nuo jų aritmetinio vidurkio. Standartinis nuokrypis apskaičiuotas pagal formulę:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Kur: n – matavimų skaičius;

$x_i$  – i-tojo matavimo vertė;

$\bar{x}$  – aritmetinis vidurkis.

Santykinis standartinis nuokrypis apskaičiuotas pagal formulę:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \quad (3)$$

Kur: S – standartinis nuokrypis;

$\bar{x}$  – aritmetinis vidurkis.

Metodo sklaida apskaičiuojama kaip procentinis santykinis standartinis nuokrypis  $S_r$  (%):

$$S_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Kur:  $S_r$  – santykinis standartinis nuokrypis;

$\bar{x}$  – tyrimų rezultatų vidutinė vertė.

Analičių koncentracija apskaičiuota dviem būdais: iš susidarytos kalibracinės kreivės, kurios lygtis:  $y = ax+b$ , ir vidinio standarto metodu. Analičių koncentracija skaičiuojama iš kalibracinės kreivės:

$$c = \frac{(s-b)}{a} \quad (5)$$

Kur: c – analitės koncentracija, mg ml<sup>-1</sup>;

s – analitės smailės plotas;

a = tiesės krypties koeficientas; b = Y ašies kirtimo taškas.

Analičių koncentracija, skaičiuojama vidinio standarto metodu:

$$c = \frac{s \cdot c_{vid.st.}}{s_{vid.st.}} \quad (6)$$

Kur:  $c$  – analitės koncentracija,  $\text{mg ml}^{-1}$ ;

$s$  – analitės smailės plotas;

$c_{vid.st.}$  – vidinio standarto koncentracija,  $c_{vid.st.} = 0,0005 \text{ mg ml}^{-1}$ ;

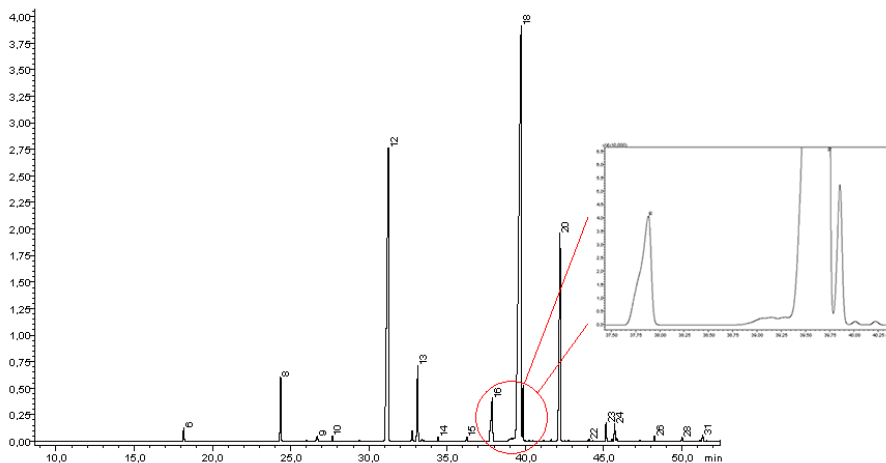
$s_{vid.st.}$  – vidinio standarto smailės plotas

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto klinikinės medicinos instituto gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinika, buvo atliekami keturių žmogaus riebalinio audinio sluoksnių riebalų rūgščių sudėties tyrimai. Remiantis literatūros duomenimis, kraujo serume esanti maža trans-palmitoleino rūgšties koncentracija indukuoja metabolinės ligos riziką [14].

Tiriant skirtingų žmogaus riebalinio audinio sluoksnių mėginius buvo pastebėtas ne tik lengvai atskiriamos ir identifikuojamos palmitoleino rūgšties buvimas, tačiau ir neiški chromatografinė zona oleino rūgšties trans izomerų srityje (**3.1 pav.**). Tiesiogiai išskirti, identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti šios zonos analičių nepavyko net naudojant 105 metrų itin polinę kapiliarinę kolonėlę, todėl buvo nuspręsta ieškoti būdų supaprastinti mėginio kompoziciją. Efektyviausias būdas tai padaryti – mėginį frakcionuoti per tokį sorbentą, kuris geba atskirti cis ir trans nesočiųjų rūgščių izomerus. Literatūroje yra duomenų, jog vieni tinkamiausių sorbentų tokiam atskyrimui – sidabro jonų veikimu paremti sorbentai [15-16], tačiau nanodalelėmis modifikuoti monolitiniai sorbentai neseniai tapo daug žadančia medžiagų klase, kurios gali būti sėkmingai panaudotos cheminėje analizėje, o tokių sorbentų veikimo principai yra panašūs kaip sidabro jonų veikimu paremtų sorbentų [118].

Dėl šių priežasčių buvo nuspręsta paruošti ir ištirti sidabro jonais ir nanodalelėmis modifikuotus kietafazės ekstrakcijos sorbentus. Pritaikyti juos riebiųjų rūgščių metilo esterių geometrinių izomerų frakcionavimui.



**3.1 pav.** Žmogaus riebalinio audinio riebalų rūgščių metilo esterių chromatograma ir oleino rūgšties trans izomerų sritis. Analitės identifikuojamos 2.4.1 lentelėje.

### 3.1 Riebalų rūgščių derivatizacija

Mokslinėje literatūroje yra aprašyta daugybė skirtingų būdų riebalų rūgščių metilo esteriams formuoti. Siekiant pasirinkti optimalų metodą, buvo nuspręsta išbandyti tradicinės dviejų žingsnių riebalų transesterifikacijos schemą, mėginį veikiant stipriu šarmu (muilinant riebalų rūgštis) ir formuoti esterius rūgštinio katalizatoriaus  $\text{BF}_3$  pagalba. Taip pat buvo bandoma atlikti esterinimo reakciją *in situ* panaudojus acetilo chloridą metanolyje.

Dėl nesudėtingo reakcijos atlikimo tyrimai buvo pradėti naudojant acetilo chloridą metanolyje. Skirtingi šaltiniai nurodo skirtingą šios sintezės laiką, todėl pagal 2.7 skyriuje aprašytą reakcijos procedūrą buvo ištirta metilo esterių formavimosi priklausomybė nuo laiko. Mėginiai buvo šildomi 10, 20, 30 ir 40 minučių vidiniu standartu naudojant trikozano rūgštį. Atlikus mėginių dujų chromatografinę analizę, pastebėjome, kad jau po 10 minučių metilo esteriai yra pilnai susiformavę, o laiko ilginimas rezultatų nebekeičia. Tačiau naudojant šį riebalų rūgščių metilo esterių formavimo metodą, buvo gaunama ganėtinai didelė rezultatų sklaida (3.5% – 6.7%).

Naudojant dviejų žingsnių esterifikacijos schemą, derivatizacija truko ilgiau ir buvo reikalinga sudėtingesnė aparatūra. Buvo atliekami 7 nepriklausomi to paties mėginio tyrimai pagal 2.6 skyriuje aprašytą procedūrą. Iš gautų duomenų buvo įvertinta metodo sklaida, apimanti

peresterifikavimo ir instrumentinės analizės etapus žmogaus riebalinio audinio mėginiuose. Rezultatai pateikiami 3.1.1 lentelėje. Atliekant esterifikacijos reakciją šiuo metodu buvo gauta itin maža metodo sklaida. Dėl šios priežasties jį buvo nuspręsta naudoti tolimesniems darbams.

### 3.1.1 lentelė

Dviejų žingsnių esterifikavimo metodo charakteristikos.

Rūgštis	Vid.	Sr, %
<b>C12:0</b>	0,11	1,65
<b>C14:0</b>	1,54	0,41
<b>C14:1</b>	0,17	0,87
<b>C15:0</b>	0,19	0,52
<b>C16:0</b>	19,79	0,58
<b>C16:1</b>	4,40	0,42
<b>C17:0</b>	0,20	0,54
<b>C18:0</b>	3,31	0,71
<b>C18:1</b>	53,56	0,14
<b>C18:2</b>	11,42	0,39
<b>C18:3</b>	0,85	0,59
<b>20:0</b>	0,12	1,10
<b>C20:1</b>	1,02	0,34
<b>C22:0</b>	0,24	0,89

## 3.2 Sidabro kietafazės ekstrakcijos sistemos

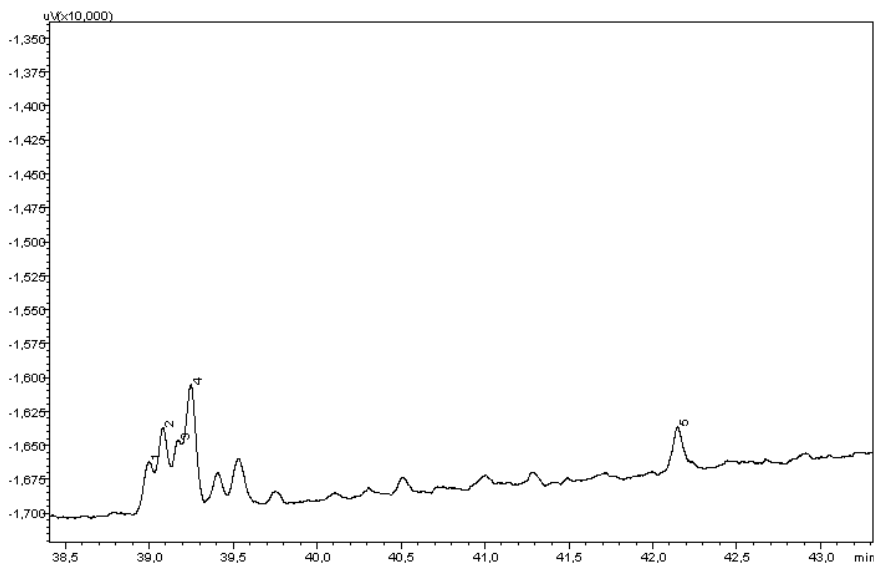
### 3.2.1 Supelco Discovery Ag-Ion kietafazės ekstrakcijos sistema

Riebalų rūgščių frakcionavimui pagal nesotumo laipsnį ir dvigubųjų jungčių konfigūraciją pramoniniu būdu yra gaminama Supelco Discovery Ag-Ion SPE kolonėlė. Ji ruošiamą imobilizuojant sidabro jonus ant stipraus katijonito. Kolonėlėje yra 750 mg modifikuoto katijonito, kurio gamyba yra gamintojo komercinė paslaptis. Ištirtas šios kolonėlės efektyvumas skirtingų sluoksnių žmogaus riebalinio audinio, riebalų rūgščių izomerams frakcionuoti. Prieš naudojimą, kaip nurodyta gamintojo instrukcijoje [182], Supelco Discovery Ag-Ion SPE kolonėlė kondicionuojama 4 ml acetono ir 6 ml heksano. Tuomet užnešama 100 µl žmogaus riebalinio audinio riebalų rūgščių metilo esterių mišinio, kurio koncentracija 10 mg ml<sup>-1</sup> ir surenkamos penkios frakcijos:



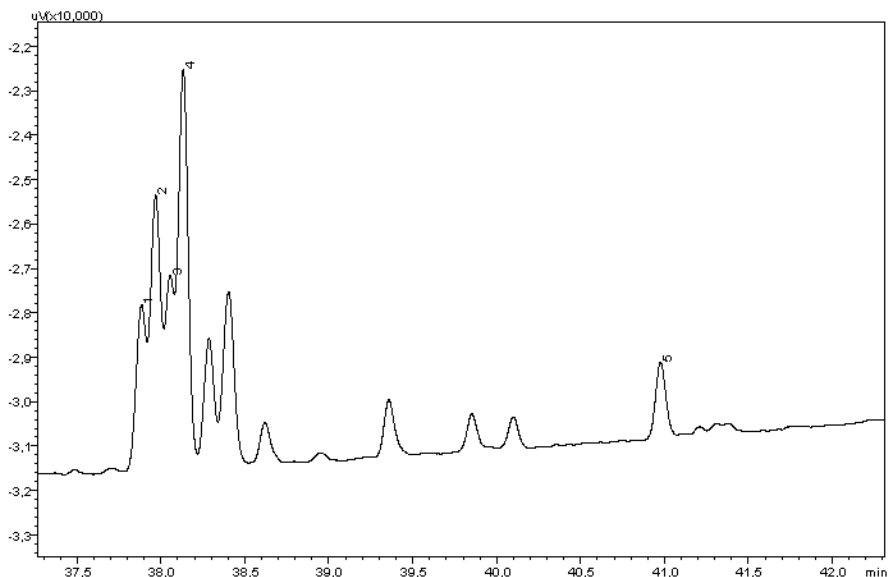
- 1 frakcija 6 ml heksano: acetono 96:4;
- 2 frakcija 4 ml heksano:acetono 90:10;
- 3 – 5 frakcijos 4 ml acetono.

Surinktos frakcijos analizuojamos dujų chromatografu su liepsnos jonizaciniu detektoriumi. Iš gautų chromatogramų nustatyta, kad 1-oje frakcijoje buvo surinktos su sidabro jonais nesąveikaujančios sočiosios, bei trans-nesočiosios riebalų rūgštys (3.2.1.1 pav.).



**3.2.1.1 pav.** Esterifikuoto žmogaus riebalinio audinio trans frakcijos fragmentas, naudojant „Discovery Ag-Ion“ kolonėlę. 1 – C18:1-6tr; 2 – C18:1-9tr; 3 – C18:1-10tr; 4 – C18:1-11-tr; 5 –C18:2-9,12c (vidinis standartas).

Ši kietafazės ekstrakcijos sistema leido eliminuoti iš tiriamojo objekto visas polinesočiasias riebalų rūgštis, todėl šios klasės junginiai gali būti papildomai įnešami į tiriamąją frakciją kaip vidinis standartas. Vidinio standarto naudojimas leidžia koncentruoti mėginį iki mažų tūrių (100  $\mu$ l ar mažiau) ir stipriai padidinti metodo jautrį (3.2.1.2 pav.).



**3.2.1.2 pav.** Esterifikuoto žmogaus riebalinio audinio C18:1 izomerų trans frakcijos fragmentas, mėginį koncentruojant iki 100  $\mu\text{l}$ . 1 – C18:1-6tr; 2 – C18:1-9tr; 3 – C18:1-10tr; 4 – C18:1-11tr; 5 – C18:2-9,12c (vidinis standartas).

Komercinė Discovery Ag-Ion SPE kolonėlė puikiai tinka riebalų rūgščių metilo esteriams frakciuonuoti pagal jų nesotumo laipsnį ir digubųjų jungčių konfigūraciją, tačiau yra brangi ir vienkartinio panaudojimo.

### 3.2.2 Sidabro jonais padengto silikagelio kietfazės ekstrakcijos sistemos

Naudojantis literatūros duomenimis apie sidabro jonų chromatografiją ir jos taikymą sidabro jonais impregnuotose silikagelio plokštelėse, buvo bandoma pagaminti paprastą, patikimą ir nebrangią kietfazės ekstrakcijos kolonėlę sorbentu naudojant silikagelį „Silica gel 60“ (dalelių dydis 0,063–0,2 mm). 0,9  $\times$  6 cm dydžio kolonėlė buvo užpildoma 1 g silikagelio, kuris patalpinamas tarp stiklo filtrų. Sorbento padengimui sidabro jonais per kolonėlę buvo leidžiamas 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  sidabro nitrato tirpalas. Tirpalas buvo užnešinėjamas porcijomis po 1 ml, o ištekėjęs iš kolonėlės surenkamas į 100 ml kolbutę, parūgštinamas azoto rūgštimi, skiedžiamas iki žymės ir analizuojamas ICP-OES metodu siekiant nustatyti minimalų sidabro nitrato

tirpalo tūrį, reikalingą padengti sorbentui. Tyrimo rezultatai pateikti 3.2.1.1 lentelėje.

### 3.2.2.1 lentelė

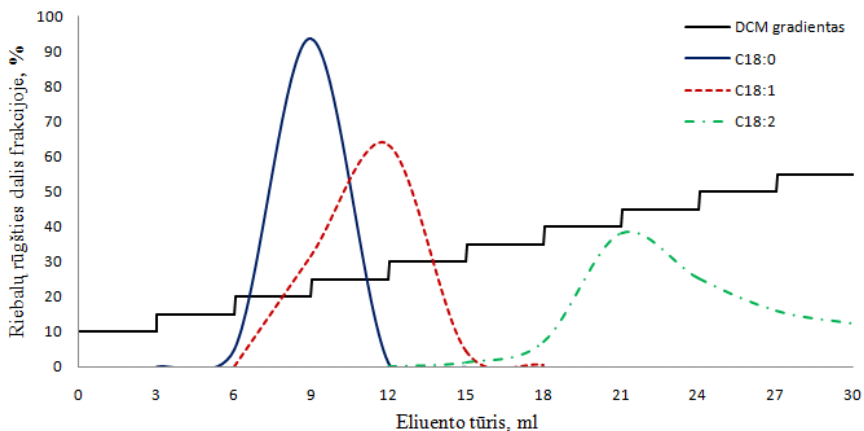
Silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėlės sidabro jonų sorbcijos duomenys. Tiksliai pradinio tirpalo koncentracija 65,72 μg l<sup>-1</sup>.

AgNO <sub>3</sub> porcija	Pratekėjusio Ag <sup>+</sup> koncentracija, μg l <sup>-1</sup>	Pratekėjusio Ag <sup>+</sup> dalis, %
1	0,15	2
2	22,93	35
3	37,53	57
4	66	100
5	65,25	99

Iš gautų duomenų buvo nustatyta, kad pilnam kolonėlės padengimui pakanka praleisti 3 ml sidabro nitrato tirpalo. Kadangi kolonėlės impregnavimui sidabru buvo naudojami vandeniniai tirpalai, svarbu parinkti tinkamas kondicionavimo sąlygas. Paruošta kolonėlė prieš naudojimą buvo plaunama 10 ml metanolio, 10 dichlormetano ir 10 ml heksano.

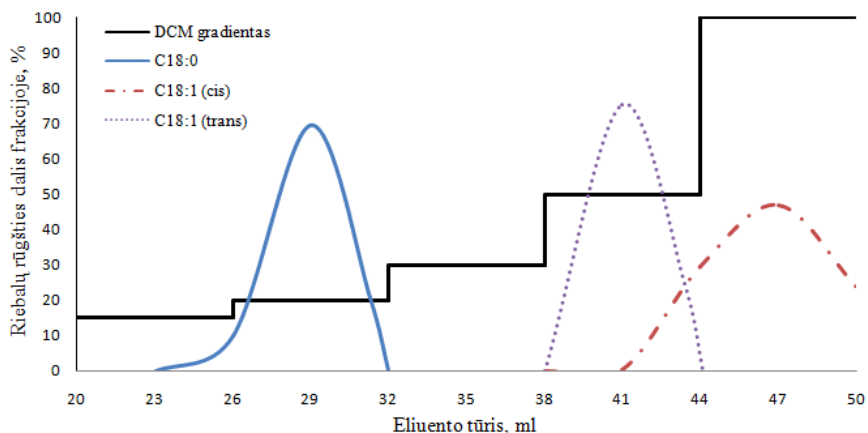
Siekiant turėti supaprastintą riebalų rūgščių esterių kompoziciją, eliucijos sąlygų parinkimui buvo nuspręsta naudoti modelinį rapsų aliejaus mėginį su papildomai pridėtu trans-9-elaidino rūgšties metilo esteriu.

Eliucijos sąlygų parinkimui į kolonėlę buvo užnešama 200 μl modelinio rapsų aliejaus metilo esterių mišinio, kurio koncentracija 10 mg ml<sup>-1</sup>. Eliuentu naudojant n-heksaną visos analitės buvo itin stipriai sulaikomos, todėl siekiant padidinti eliuento poliškumą buvo nuspręsta naudoti n-heksano : dichlormetano mišinius. Dichlormetano kiekis buvo tolygiai didinamas nuo 10 iki 55 % (3.2.2.1 pav.), o surinktos frakcijos analizuojamos dujų chromatografu su liepsnos jonizaciniu detektoriumi. Iš gautų rezultatų buvo matoma sorbento sąveika, skirstant analites pagal dvigubųjų ryšių skaičių, tačiau zonos buvo gaunamos persiklojusios, o geometrinių izomerų atskyrimas nepastebėtas.



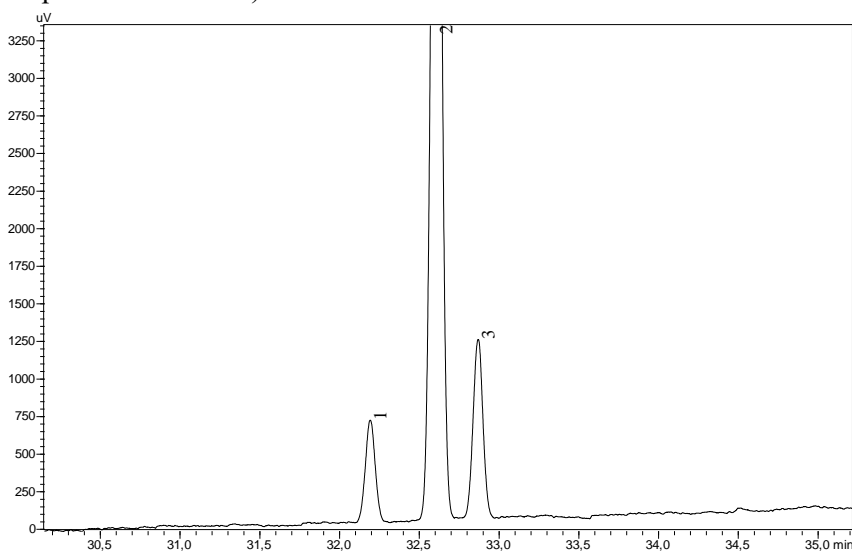
**3.2.2.1 pav.** C18 riebalų rūgščių atskyrimas naudojant sidabro jonais padengtą silikagelio kietfazės ekstrakcijos kolonėlę.

Šio bandymo rezultatai parodė tolimesnes eliucijos sąlygų optimizavimo gaires. Dirbant su įvairių kompozicijų eliuento mišiniu, buvo parinktos optimalios sąlygos junginių frakcionavimui. Po mėginio užnešimo į kolonėlę įpilama 1 ml n-heksano. Jam ištekėjus iš eilės praleidžiama 10 ml 5 % heksano : dihlormetano mišinio ir 10 ml 10 % heksano : dichlormetano mišinio. Kolonėlę plaunant šiais tirpikliais visos analitės yra išlaikomos sorbente. Analitės išplaunamos n-heksano : DCM mišiniu pradėdant nuo 15 %. Gaminamos porcijos po 3 ml ir vykdoma eliucija pagal (3.2.1.2 pav.) pateiktą schemą.



**3.2.2.2 pav.** C18 riebalų rūgščių atskyrimas optimizuotomis sąlygomis naudojant sidabro jonais padengtą silikagelio kietafazės ekstrakcijos kolonėlę.

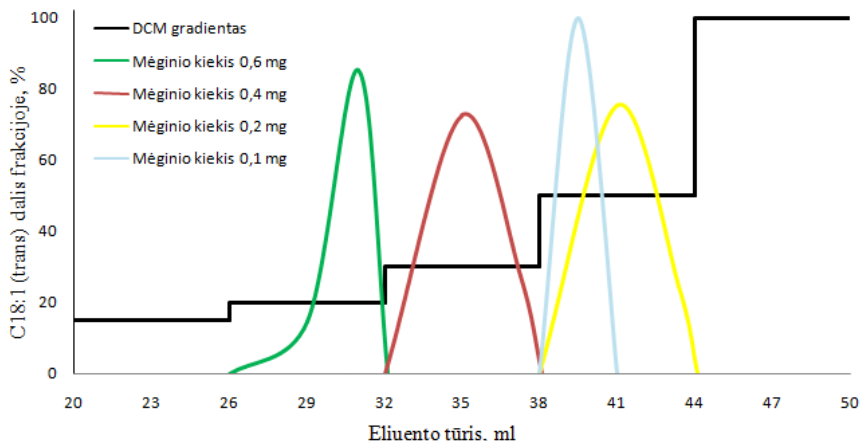
Nors optimizuotomis kietafazės ekstrakcijos sąlygomis nepavyko pilnai atskirti geometrinių izomerų, tačiau šios sąlygos leido eliminuoti iš mišinio 75 % dominuojančios oleino rūgšties (paprastai realiuose mėginiuose sudaro 50–70 % visų riebalų rūgščių), kas žymiai supaprastino instrumentinį geometrinių izomerų atskyrimą (**3.2.2.3 pav.**). Buvo apskaičiuotos pradinio mišinio ir frakcijos po valymo C18:1-9 cis ir trans izomerų skiriamosios gebos modeliniame mišinyje. Pradinio mišinio analičių skiriamoji geba  $R = 1,29$  ( $< 1,5$  pilno komponentų atskyrimo nėra), o po valymo  $R = 1,84$  (analitės pilnai atskiriamos).



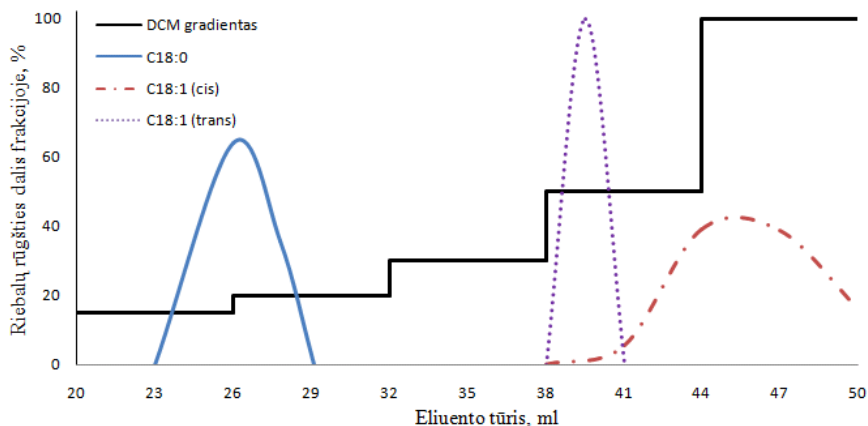
**3.2.2.3 pav.** Modelinio rapsų aliejaus chromatogramos C18:1 trans frakcijos fragmentas. 1 – C18:1-9tr; 2 – C18:1-9c; 3 – C18:1-11c.

Siekiant išsiaiškinti kolonėlės talpą, buvo ištirta pagamintos kolonėlės skiriamoji geba priklausomai nuo užnešamų esterių kiekio. Tam tikslui į kolonėlę buvo įnešama 100, 200, 400 ir 600  $\mu\text{l}$  modelinio rapsų aliejaus metilo esterių mišinio heksane, kurio koncentracija  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  ir atliekamas frakcionavimas optimizuotomis sąlygomis (**3.2.2.4 pav.**). Buvo nustatyta, kad didinant esterių mišinio kiekį kolonėlėje sulaukymas blogėja, o chromatografinės zonos plečiasi. Optimaliu mėginio kiekiu buvo pasirinktas

100  $\mu$ l arba 1 mg įnešamų esterių mišinio. Trans rūgščių chromatografinės zonos susiaurėjimas leido dar labiau pagerinti jų atskyrimą. Šiomis sąlygomis pavyko eliminuoti iki 95 % oleino rūgšties (3.2.2.5 pav.).

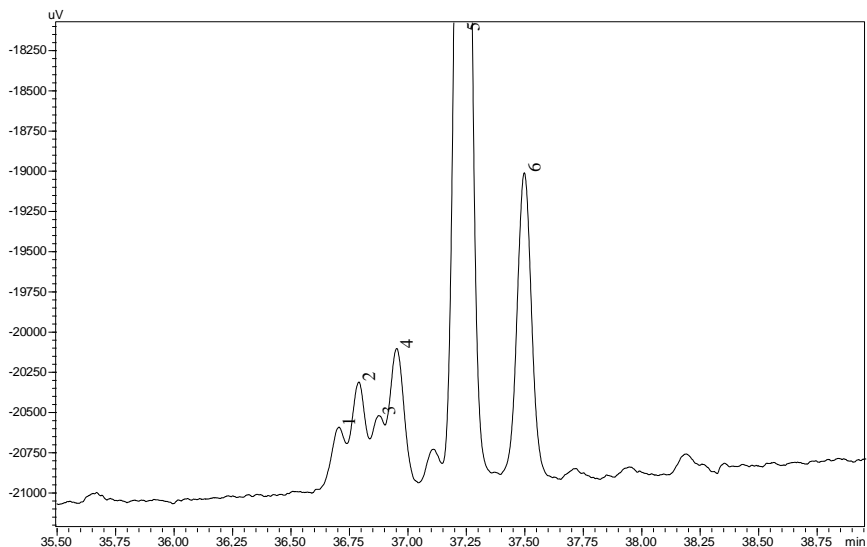


**3.2.2.4 pav.** Trans riebalų rūgščių pasiskirstymas frakcijose priklausomai nuo užnešamo mėginio kiekio.



**3.2.2.5 pav.** C18 riebalų rūgščių atskyrimas optimizuotomis sąlygomis į kolonėlę įnešant 1 mg esterių mišinio.

Metodas buvo pritaikytas žmogaus riebalinio audinio trans riebalų rūgščių metilo esterių išskyrimui ir chromatografiniai analizei (3.2.2.6 pav.).



**3.2.2.6 pav.** Esterifikuoto žmogaus riebalinio audinio chromatogramos C18:1 trans frakcijos fragmentas. 1 – C18:1-6tr; 2 – C18:1-9tr; 3 – C18:1-10tr; 4 – C18:1-11tr; 5 – C18:1-9c; 6 – C18:1-11c.

Aukščiau pateikti rezultatai rodo, kad tiek savo gamybos Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėlės, tiek komercinė Discovery Ag-Ion kolonėlės yra tinkamos riebalų rūgščių geometrinių izomerų frakcionavimui biologinėse matricose. Norėdami pritaikyti kietafazės ekstrakcijos metodus kiekybiniam trans riebalų rūgščių nustatymui žmogaus riebaliniame audinyje, naudojome išorinės kalibracijos ir vidinio standarto metodus ir nustatėme šių sistemų analizines charakteristikas.

### *Išorinė kalibracija*

Siekiant kiekybiškai įvertinti keturis C18:1-trans izomerus (C18:1-6tr, C18:1-9tr, C18:1-10tr ir C18:1-11tr), buvo sudaryta kalibracinė kreivė etalonu naudojant trans-9-elaidino metilo esterį. Kadangi liepsnos jonizacinio detektoriaus atsakas nepriklauso nuo dviguvojo ryšio padėties anglies atomų grandinėje, trans-9-elaidino rūgšties kalibravimo kreivė, kuri buvo sudaryta intervale 0,0005 – 0,01 mg ml<sup>-1</sup>, buvo taikoma C18:1-6tr, C18:1-9tr, C18:1-10tr ir C18:1-11tr kiekybiniam įvertinimui. Sudaryta

kalibravimo kreivė šiame intervale atitiko tiesės lygį. Koreliacijos koeficientas 0,9999. Siekiant įvertinti metodo sklaidą buvo atlikta po 10 to paties esterifikuoto žmogaus preperitoninio (pilvaplėvės) riebalinio audinio sluoksnio mėginio analizių frakcionavimui naudojant savo gamybos silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėles bei komercines Discovery Ag-Ion SPE kolonėle. Surinktos trans izomerų frakcijos buvo sukonzentruotos iki 1 ml. Pagal kalibracinės kreivės tiesės lygtį buvo apskaičiuotos kiekvieno geometrinio izomero koncentracijos ir santykiniai standartiniai nuokrypiai (3.2.2.2. lentelė).

### ***Vidinio standarto metodas***

Abi kietafazės ekstrakcijos sistemos visiškai eliminuoja polinesočiąsias riebalų rūgštis iš trans frakcijos. Dėl šios priežasties bet kuri polinesočioji rūgštis gali būti papildomai pridedama į surinktąją frakciją prieš jos koncentravimą ir naudojama kaip reprezentatyvus vidinis standartas. Kiekybiniam trans izomerų įvertinimui vidinio standarto metodu pasirinkome linolo rūgšties metilo esterį (C18:2-9,12c). Siekiant pagerinti metodo jautrį ir sumažinti integravimo įtaką sklaidai, mėginiai su pridėtinu vidiniu standartu buvo koncentruojami iki ~100 µl. Metodo sklaidos įvertinimui buvo atlikta 10 to paties esterifikuoto žmogaus preperitoninio (pilvaplėvės) riebalinio audinio sluoksnio mėginio analizių frakcionavimui naudojant savo gamybos silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėles, bei komercines Discovery Ag-Ion SPE kolonėles. Apskaičiuotos kiekvieno geometrinio izomero koncentracijos ir santykiniai standartiniai nuokrypiai (3.2.2.2. lentelė).

### ***Kietafazės ekstrakcijos sistemų ir metodų palyginimas***

Apibendrinti kiekybinio keturių C18:1-trans izomerų nustatymo metodų duomenys pateikti 3.2.2.2 lentelėje. Trans riebalų rūgščių kiekiai perskaičiuoti į procentinę pradinio esterių mišinio dalį.



### 3.2.2.2. lentelė

#### Kietafazės ekstrakcijos metodų sklaida

Izomeras	Silikagelio Ag <sup>+</sup> -SPE				Komerčinė Discovery Ag <sup>+</sup> -SPE			
	Vidinis standartas		Išorinė kalibracija		Vidinis standartas		Išorinė kalibracija	
	Kiekis, %	s <sub>r</sub> , %	Kiekis, %	s <sub>r</sub> , %	Kiekis, %	s <sub>r</sub> , %	Kiekis, %	s <sub>r</sub> , %
C18:1-6tr	0,124	9,3	0,123	13,0	0,115	10,0	0,108	9,8
C18:1-9tr	0,192	4,5	0,199	6,5	0,190	6,6	0,187	7,0
C18:1-10tr	0,119	6,0	0,116	7,4	0,116	9,0	0,109	9,0
C18:1-11tr	0,255	9,6	0,268	6,7	0,277	6,1	0,281	6,7

Iš 3.2.2.2 lentelės duomenų matome, kad abiejų metodų – vidinio standarto ir išorinio kalibravimo – sklaida skiriasi nežymiai tiek atliekant kietafazę ekstrakciją pačių gamintomis silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėlėmis, tiek komercinėmis Discovery Ag-Ion SPE kolonėlėmis. Galima teigti, kad abu metodai tinkami kiekybiniam C18:1-trans izomerų nustatymui, tačiau vidinio standarto metodas yra greitesnis (nereikia kalibruoti prietaiso) ir leidžia stipriai pagerinti metodo jautrį, kas itin aktualu trans riebalų rūgščių nustatymui biologiniuose mėginiuose. Pagrindinis savo gamybos silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėlių ir komercinių Discovery Ag-Ion SPE kolonėlių skirtumas yra jų kaina. Viena komercinė kolonėlė kainuoja beveik 8 eurus, tuo tarpu silikagelio Ag<sup>+</sup>-SPE kolonėlės savikaina yra vos 15 – 20 centų.

### 3.2.3 Sidabro nanodalelių sintezė

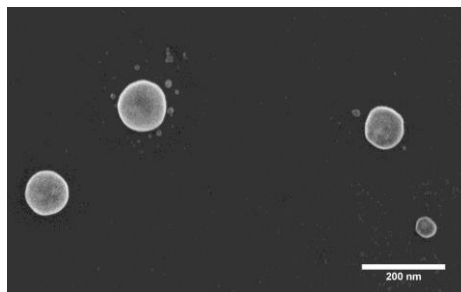
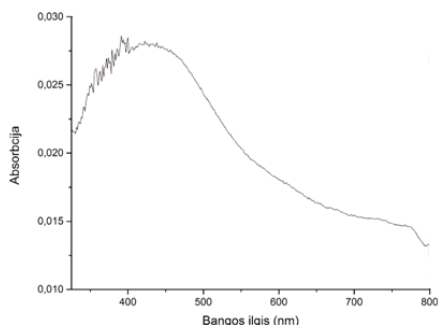
Literatūroje teigiama, kad sidabro nanodalelėmis modifikuotų monolitinių sorbentų veikimo principai yra panašūs kaip sidabrojonais modifikuotų sorbentų [118], tačiau į sorbentą inkorporuotos sidabro nanodalelės yra daug stabilesnės už joninį sidabrą. Apžvelgus sidabro nanodalelių sintezės metodus, buvo nuspręsta išbandyti keletą cheminės redukcijos sąlygų, siekiant parinkti tokį metodą, kuriuo būtų gaunamos mažiausios nanodalelės. Tikėtina, kad kuo mažesnėmis dalelėmis modifikuotas sorbentas, tuo didesnis nanodalelių paviršiaus plotas ir tuo stipresnė sąveika su nesočiais junginiais.

Buvo ištirti keturi sidabro nanodalelių sintezės būdai: sidabro nitrato tirpalus redukuojant trinatrio citratu, askorbo rūgštimi, alkoholiais ir

formaldehidu. Užrašyti UV-VIS spektrai patvirtina, jog sidabro nanodalelių sintezės buvo atliktos sėkmingai. Visuose spektruose matomos sidabro nanodaleles charakterizuojančios absorbcijos smailės ties 400 – 430 nm.

### ***Sidabro jonų redukcija trinatrio citratu***

Šiame sintezės metode nenaudojamas stabilizatorius. Trinatrio citratas atlieka ir reduktoriaus ir stabilizatoriaus funkciją. Į stipriai maišomą sidabro nitrato tirpalą lėtai sulašinamas trinatrio citrato tirpalas ir mišinys paliekamas 90 °C temperatūroje 2 valandas. Plati absorbcijos smailė UV-VIS spektre (**3.2.3.1 pav.**) rodo, kad gautos sidabro nanodalelės yra skirtingo dydžio. Taip pat absorbcijos smailės intensyvumas yra labai mažas, iš ko galime spręsti apie labai mažą sidabro nanodalelių koncentraciją tirpale. Šiuos teiginius patvirtino ir SEM mikroskopu gautos nuotraukos (**3.2.4.1 pav.**), kuriose matomos pavienės skirtingo dydžio sferinės sidabro nanodalelės. Dalelių skersmuo svyruoja nuo 50 iki 120 nm.

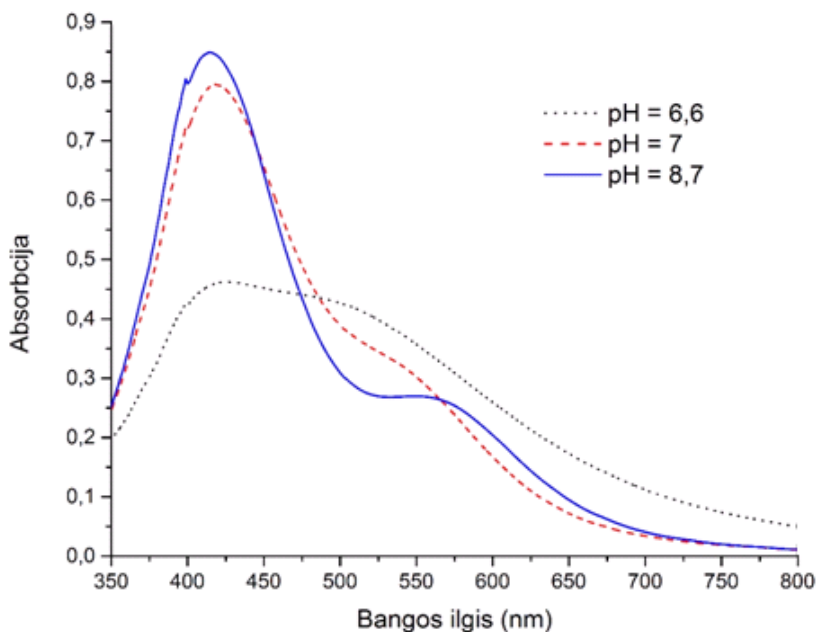


**3.2.3.1 pav.** Sidabro nanodalelių, susintetintų reduktoriumi naudojant trinatrio citratą, UV-VIS spektras ir SEM nuotrauka.

### ***Sidabro jonų redukcija askorbo rūgštimi***

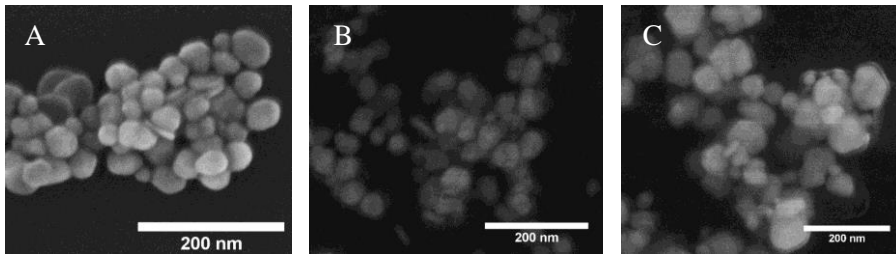
Siekiant rasti efektyvesnę sintezės metodą, buvo iširta sidabro jonų redukcija askorbo rūgštimi stabilizatoriumi naudojant citratą. Literatūros duomenimis [180] susidariusių sidabro nanodalelių dydį šioje sistemoje galima kontroliuoti keičiant tirpalo pH. Eksperimentui buvo imamos 3 porcijos askorbo rūgšties ( $6 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) ir trinatrio citrato ( $3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) tirpalų, kurių pH buvo koreguoti 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaOH tirpalu iki: 6,6, 7,0 ir 8,7. Intensyviai maišant į šiuos tirpalus pridedama tiek 0,1 mol l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>

tirpalo, kad jo dalis mišinyje sudarytų 1 %. Tirpalas maišomas kambario temperatūroje 15 minučių. Užrašytuose UV-VIS spektruose (3.2.3.2 pav.) matoma, kad didėjant tirpalo pH, absorbcijos smailės siaurėja ir šiek tiek pasislenka link trumpesnių bangos ilgių. Tai leidžia manyti, kad didinant tirpalo pH ne tik mažėja susintetintų sidabro nanodalelių dydis, bet ir jų dydžio sklaida.



**3.2.3.2 pav.** Askorbo rūgštimi redukuotų sidabro nanodalelių, susintetintų skirtinguose pH, UV-VIS spektrai.

Spektrinius duomenis patvirtina nuotraukos, padarytos SEM mikroskopu (3.2.3.3 pav.). Jos rodo, kad tirpalo pH esant 6,6 sidabro nanodalelių dydis yra apie 90 - 100 nm, pH padidėjus iki 7,0 dalelių dydis sumažėja iki 70 – 80 nm, o pH esant 8,7 sidabro nanodalelių dydis yra 40 – 50 nm.



**3.2.3.3 pav.** Askorbo rūgštimi redukuotų sidabro nanodalelių SEM nuotraukos: A – pH 8,7; B – pH 7,0; C – pH 6,6.

Iš SEM nuotraukų matyti, kad sidabro nanodalelės yra agregavusios tarpusavyje, o mažėjant tirpalo pH, didėja ne tik pačios dalelės, bet ir jų agregacija. Dalelių agregatų formavimasis yra vienas pagrindinių šio metodo trūkumų, siekiant jį pritaikyti kietafazės ekstrakcijos sistemų kūrime.

#### ***Sidabro jonų redukcija formaldehidu***

Tęsiant tinkamos sidabro nanodalelių sintezės schemas paieškas buvo nuspręsta išbandyti sidabro redukcijos sąlygas naudojant amininius sidabro kompleksus. Šie kompleksai turi mažesnę redukcijos potencialą nei sidabro jonai ( $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+/\text{Ag}$  redukcijos potencialas yra + 0,373, o  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  + 0,799), o tai leidžia atlikti sintezę naudojant švelnesnius reduktorius tokius kaip formaldehidą [181].

Stabilizatoriumi tokiai sistemai buvo pasirinktas polietileniminas. Tai unikalus, vandenyje tirpus, dendrimerinis polimeras turintis šakotų grandinių su pirminėmis, antrinėmis ir tretinėmis amino grupėmis, kurios nesunkiai gali sudaryti chelatininius kompleksus su sidabro jonais, kurie gali būti naudojami kaip alternatyvūs sidabro pirmtakai.

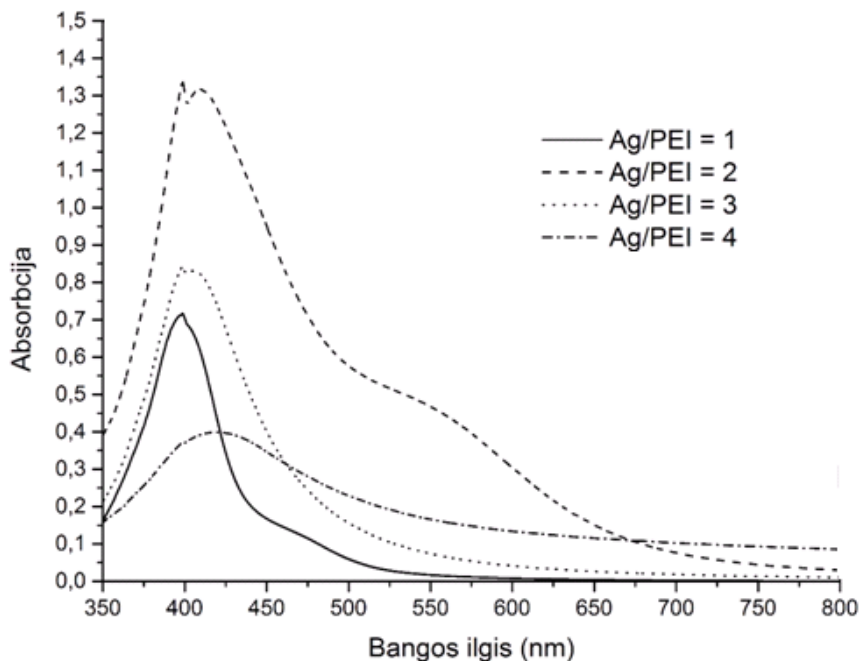
Buvo ruošiami 5 skirtingi tirpalai, kuriuose sidabro ir PEI santykiai būtų 1; 2; 3; 4. Tirpalų sudėtis pateikta 3.2.3.1 lentelėje. Penktasis tirpalas buvo kontrolinis – neturintis PEI. Tirpalus intensyviai maišant, pridedama 160  $\mu\text{l}$  37 % formaldehido, ir paliekama maišytis 15 min.

## 3.2.3.1. lentelė

## Sintezei reikalingų reagentų kiekiai

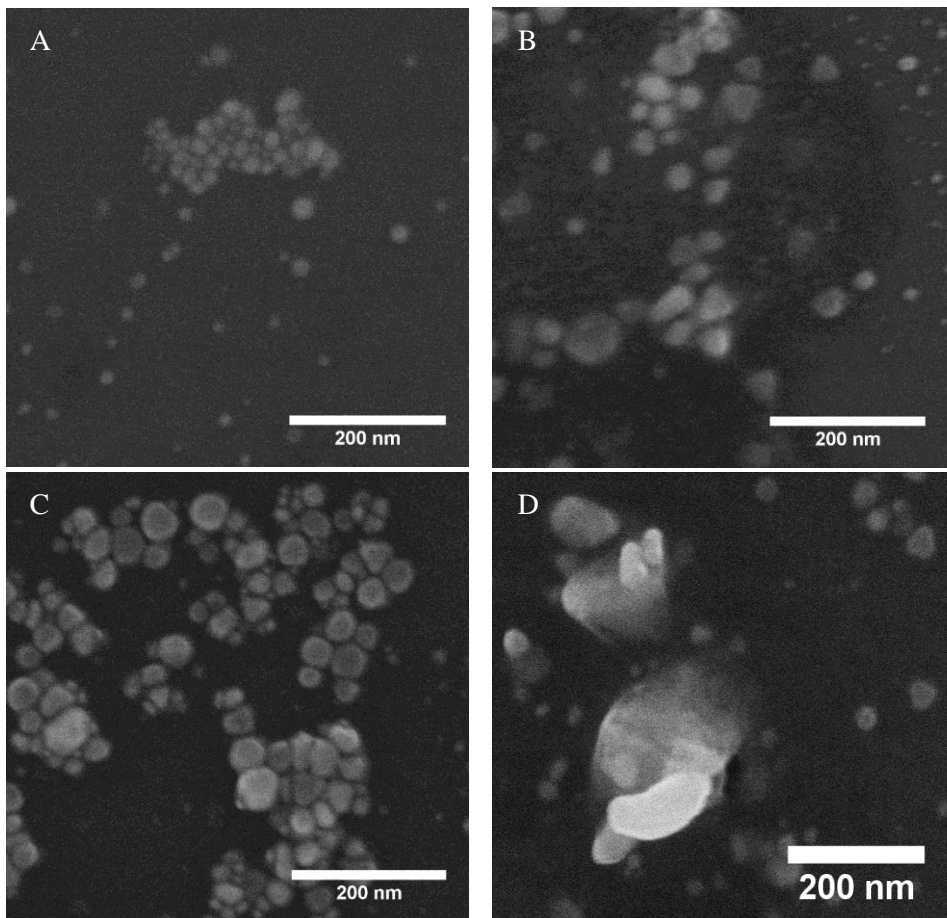
Ag/PEI santykis	0,1 g ml <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub> tirpalo kiekis, ml	Distiliuoto vandens kiekis, ml	1,7 % PEI tirpalo kiekis, ml
1	1,36	6,64	8
2	2,72	5,28	8
3	4,08	3,92	8
4	5,44	2,56	8

Pasibaigus sintezei buvo užrašomi gautų tirpalų UV-VIS spektrai. Siauriausia ir mažiausiame bangos ilgyje absorbcijos maksimumą turinti smailė gauta Ag/PEI santykiui esant 1:1 (**3.2.3.4 pav.**). Iš to galime spręsti apie smulkiausių ir vienodžiausio dydžio dalelių susidarymą. Kai Ag/PEI santykis didesnis už 1, smailės ima platėti. Tai yra būdinga įvairaus skersmens dalelių susidarymui tirpale. Taip pat absorbcijos maksimumas slenkasi link ilgesnių bangų, iš ko galime spręsti, kad dalelės didėja. Absorbcijos intensyvumo mažėjimas esant dideliame sidabro jonų pertekliui rodo agregatų susidarymą dėl stabilizatoriaus trūkumo.



**3.2.3.4 pav.** Sidabro nanodalelių, susintetintų trečiuoju metodu, tirpalų spektrai.

Šias prielaidas patvirtino SEM mikroskopu darytos nuotraukos (3.2.3.5 pav.). Sidabro ir stabilizatoriaus santykiui esant 1:1, nanodalelių skersmuo yra apie 10 – 20 nm. Santykiui padidėjus iki 2, dalelių skersmuo padidėja iki 40 – 50 nm, tuo pačiu didėja aglomeratų susidarymas. Santykį padidinus iki 3, matomas nedidelis nanodalelių augimas. Jų dydis tampa 60 – 70 nm, aglomeratų susidarymas taip pat intensyvėja. Toliau didinant santykį, matomi susiformavusių sidabro nanodalelių agregatai, kurių skersmuo apie 200 nm. Įdomu tai, kad kontroliniame tirpale, kuriame nebuvo PEI (amininis sidabro kompleksas susidaryti negalėjo) sidabro nanodalelių susidarymas nevyko. Ši savybė suteikia metodui išskirtinį selektyvumą siekiant formuoti nanodaleles kietfazės ekstrakcijos sorbente. Jas galima būtų gauti tikslinėse vietose, o nesuregavusį joninį sidabrą pašalinti.

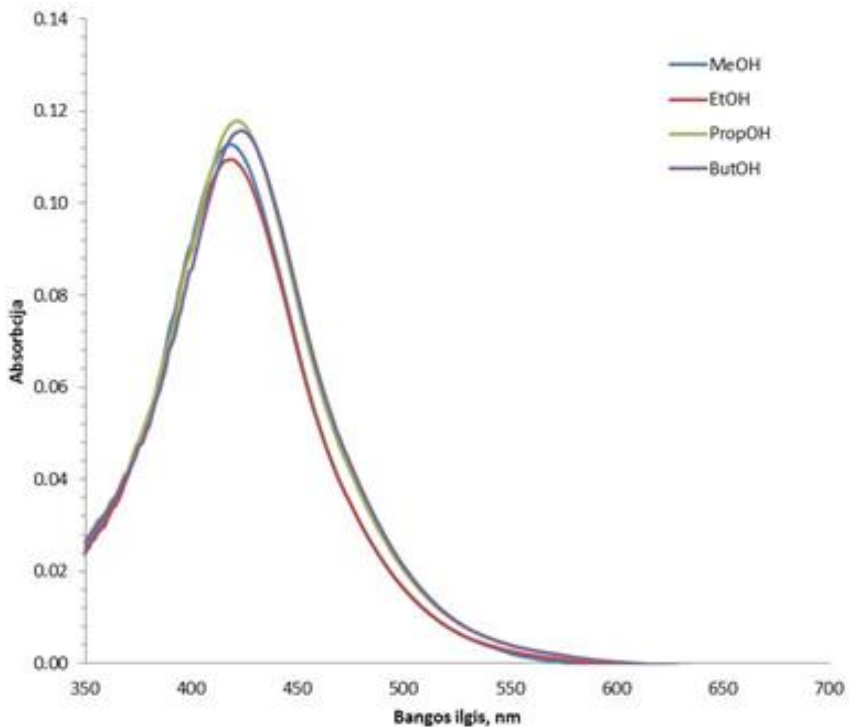


**3.2.3.5 pav.** Sidabro nanodalelių, susintetintų naudojant formaldehidą/polietileniminą SEM nuotraukos. A: Ag/PEI = 1, B: Ag/PEI = 2, C: Ag/PEI = 3, D: Ag/PEI = 4.

#### *Sidabro jonų redukcija alkoholiais*

Dėl amininių sidabro kompleksų redukcijos selektyvumo, juos redukuojant silpnais reduktoriais, buvo nuspręsta šią reakciją patyrinėti plačiau. Analogiškomis sidabro jonų redukcijos formaldehidu sąlygomis, naudojant optimalų sidabro ir PEI santykį, buvo bandoma tirpalus redukuoti skirtingo anglies atomų grandinės ilgio alkoholiais. Eksperimentui buvo pasirinkti: metanolis, etanolis, 1-propanolis ir 1-butanolis. Po 15 minučių maišymo kambario temperatūroje, nebuvo stebimi jokie reakcijos požymiai.

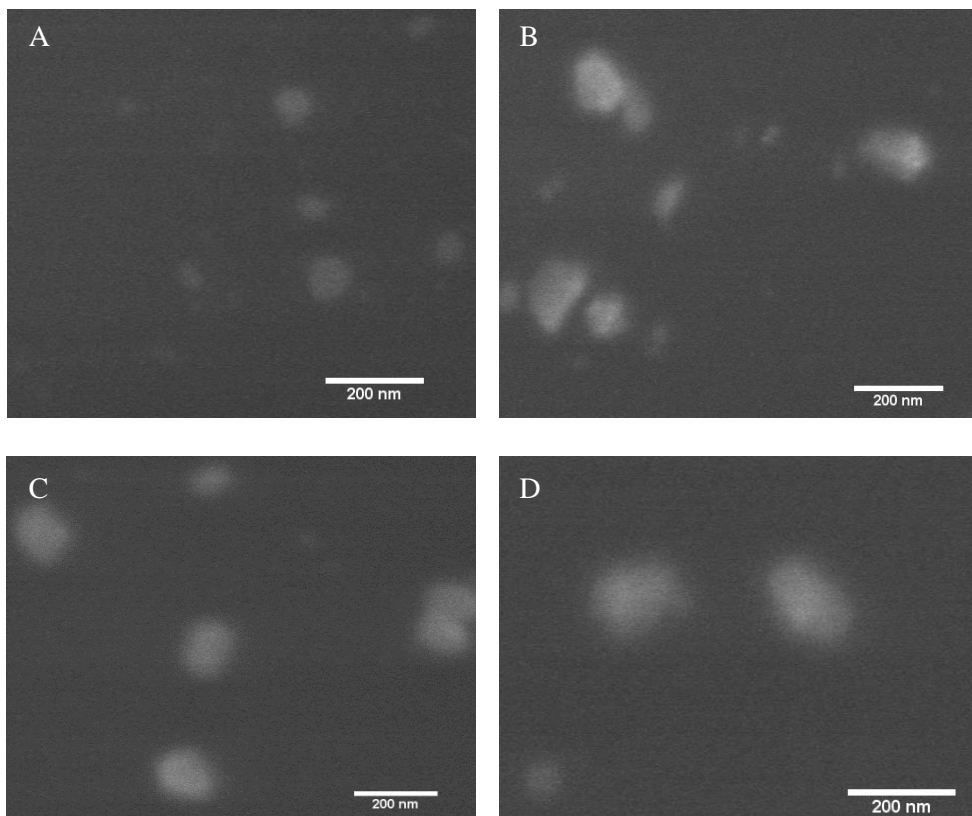
Tirpalai buvo palikti maišytis 48 valandas, tačiau, net ir po tokio laiko tarpo UV-VIS spektruose nanodalelių susidarymas nebuvo stebimas. Buvo nuspręsta tirpalus pašildyti 40 °C temperatūroje 4 valandas. Užrašytuose UV-VIS spektruose (**3.2.3.6 pav.**) matomas absorbcijos maksimumas ties 400 nm identifikuojantis sidabro nanodalelių formavimasi, tačiau spektrai yra beveik identiški visiems naudotiems alkoholiams. Taip pat absorbcijos smailės intensyvumas yra ganėtinai mažas, iš ko galime spręsti apie nedidelę sidabro nanodalelių koncentraciją tirpale.



**3.2.3.6 pav.** Sidabro nanodalelių, redukuotų skirtingais alkoholiais UV-VIS spektrai.



Siekiant įvertinti susidariusių sidabro nanodalelių dydį, buvo padarytos tirpalų nuotraukos SEM mikroskopu (3.2.3.7 pav.).



**3.2.4.7 pav.** Sidabro nanodalelių SEM nuotraukos, susintetintų reduktoriais naudojant. A: metanolį, B: etanolį, C: 1 – propanolį, D: 1 – butanolį.

Nuotraukose matome, kad nepriklausomai nuo naudojamo alkoholio, susidaro labai nedidelis sidabro nanodalelių kiekis, tačiau ilgėjant alkoholio grandinei susidaro didesnes dalelės. Ilginti reakcijos laiko, taip bandant susintetinti daugiau dalelių, nebuvo prasmės, nes dalelės susidarydavo didelės ir jų matmenys buvo labai netolygūs.

Apibendrinus sidabro nanodalelių sintezės tirpaluose rezultatus (3.2.3.2 lentelė) galime teigti, kad mažiausios ir vienodžiausios nanodalelės susidaro iš sidabro amininių kompleksų, reduktoriais naudojant formaldehidą.

### 3.2.3.2. lentelė

Sidabro nanodalelių sintezė tirpaluose.

Reduktorius	Sintezės terpės / sąlygos	Susintetintų dalelių dydis, nm
<b>Trinatrio citratas</b>	–	50 – 120
<b>Askorbo rūgštis</b>	pH = 6,6	90 – 100
	pH = 7	70 – 80
	pH = 8,7	40 – 50
<b>Formaldehidas</b>	Ag/PEI = 1	10 – 20
	Ag/PEI = 2	40 – 50
	Ag/PEI = 3	60 – 70
	Ag/PEI = 4	≥ 200
<b>Metanolis</b>	Ag/PEI = 1	70 – 90
<b>Etanolis</b>	Ag/PEI = 1	70 – 150
<b>1-Propanolis</b>	Ag/PEI = 1	100 – 150
<b>1-Butanolis</b>	Ag/PEI = 1	100 – 200

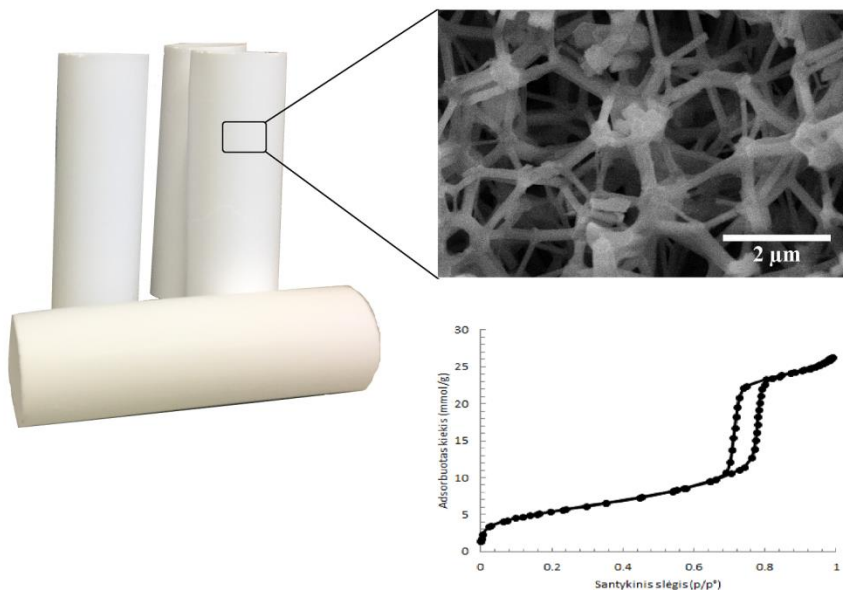
#### 3.2.4 Sidabro nanodalelėmis padengto monolitinio sorbento sintezė

Apžvelgus literatūroje pateikiamus įvairių monolitinių sorbentų privalumus ir trūkumus, buvo nuspręsta sintetinti silikagelio pagrindo monolitinius sorbentus. Šie sorbentai pasižymi dideliu mechaniniu stabilumu, atsparumu tirpikliams ir yra itin porėti. Taip pat juos paprasta funkcionalizuoti amino grupėmis, kurios būtinos selektyviai sidabro nanodalelių sintezei.

#### *Silikagelio pagrindo monolito sintezė*

Silikagelio pagrindo monolitinis sorbentas buvo susintetintas pagal 2.8 skyriuje aprašytą metodiką iš TMOS. Sintezeje buvo taikoma dvigubos katalizės sistema, katalizatoriumi naudojant acto rūgštį ir karbamidą. Karbamidą iš lėto hidrolizuojamas į anglies dioksidą ir amoniaką. Išsiskyres amoniakas 60 °C temperatūroje veikia kaip bazinis katalizatorius TMOS polikondensacijos reakcijoje, kurios metu formuojasi silikagelio monolitas. Susintetintas monolitas buvo kalcifikuojamas 800 °C temperatūroje. Po

sintezės ir kalcifikavimo monolitas išlaikė savo formą, tačiau jo diametras sumažėjo 20 %. Sintezės metu susiformavo cilindrinė porų geometrija, kurią galime atpažinti iš SEM nuotraukos ir azoto sorbcijos izotermos pasižyminčios IV tipo histereze (3.2.4.1 pav.). Monolito makroporų dydis yra apie 1,5  $\mu\text{m}$ , o mezoporų – apie 8,2 nm.



**3.2.4.1 pav.** 800 °C temperatūroje kalcifikuoto monolito nuotrauka, SEM nuotrauka ir N<sub>2</sub> adsorbcijos-desorbcijos izoterma.

Azoto adsorbcijos-desorbcijos tyrimas buvo atliktas -196 °C temperatūroje. Prieš adsorbcijos tyrimą mėginys buvo paruoštas jį vakuumuojant 150 °C. Bendras paviršiaus plotas buvo apskaičiuotas pagal BET modelį. Eksperimento duomenys pateikti 3.2.5.1 lentelėje.

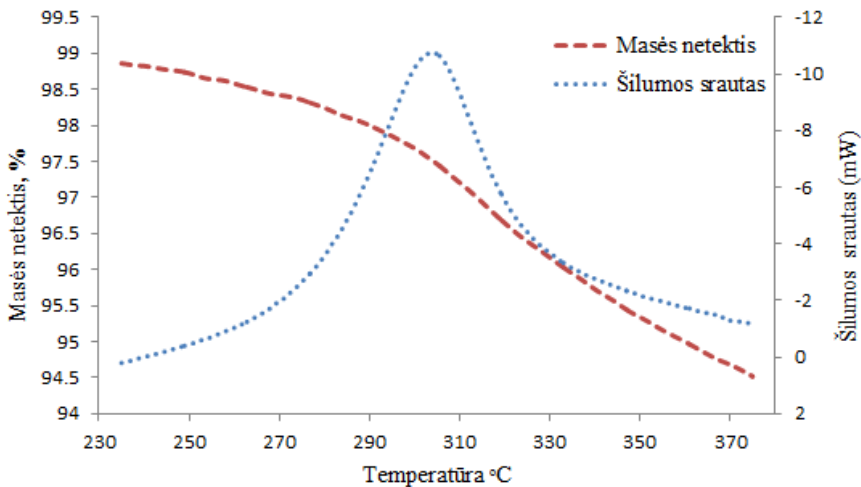
**3.2.5.1 lentelė**

Monolito paviršiaus charakteristikos

Paviršiaus plotas, m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	443
Bendras porų tūris cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	0,902696
Mikroporų tūris cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	0,005488

### *Silikagelio monolito funkcionalizavimas amino grupėmis*

Monolito modifikavimas aminopropilo funkcinėmis grupėmis yra galimas APTES reagento ir silanolinių grupių, esančių monolito paviršiuje, reakcijos metu. Modifikavimo metodika aprašyta 2.9 skyriuje. Norint ištirti, ar pavyko sėkmingai modifikuoti monolitą, buvo atliktos modifikuoto sorbento TG ir DSC analizės (3.2.4.2 pav.).



**3.2.4.2 pav.** Aminopropilo grupėmis modifikuoto monolito TG ir DSC kreivės.

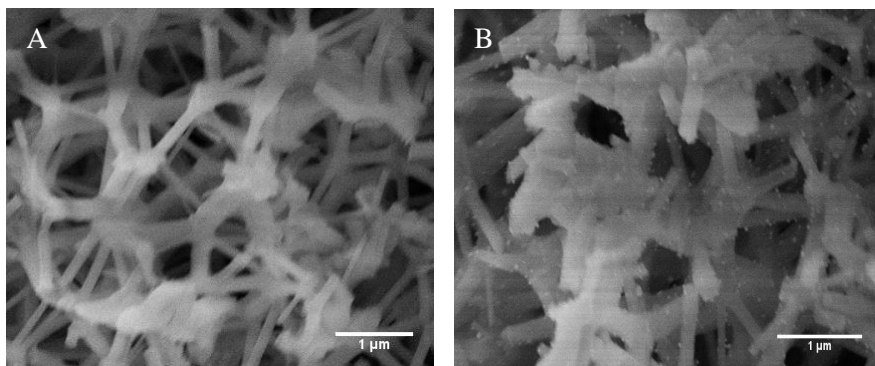
Pateiktoje diferencinės skenuojančios kalorimetrijos kreivėje yra matoma smailė ties 270 – 330 °C, kuri rodo, kad tuo metu sistemoje išsiskiria šiluma. Išsiskirianti šiluma gali būti aiškinama prijungtų aminopropilo grupių terminiu skilimu. TG analizė tame pačiame temperatūrų intervale parodė staigų masės kritimą, kuris patvirtina prijungtų aminopropilo grupių terminį skilimą. Nemodifikuoto monolito TG DSC analizė šiomis charakteristikomis nepasizymi. Dėl to galima teigti, kad sorbento modifikacija aminopropilo grupėmis buvo atlikta sėkmingai.

Siekiant patvirtinti sėkmingą monolito modifikavimą ir nustatyti azoto kiekį jame, buvo atlikta elementinė analizė. Ji parodė, kad azotas sudaro 2,75 % monolito masės.

### ***Sidabro nanodalelių formavimas sorbente***

Kaip matyti iš 3.2.3 skyriuje pateiktų rezultatų, smulčiausios ir vienodžiausios dydžio dalelės gaunamos sidabrą redukuojant formaldehidu iš sidabro amininių kompleksų. Dėl to šis metodas buvo panaudotas sidabro nanodalelių sintezei amino grupėmis modifikuotame sorbente. Skirtingai negu sintezės tirpaluose metu, šioje sistemoje nebuvo naudojamas polietileniminas. Aminopropilo grupėmis modifikuoto sorbento atveju PEI vaidmenį turėjo atlikti monolite esančios aminopropilo grupės.

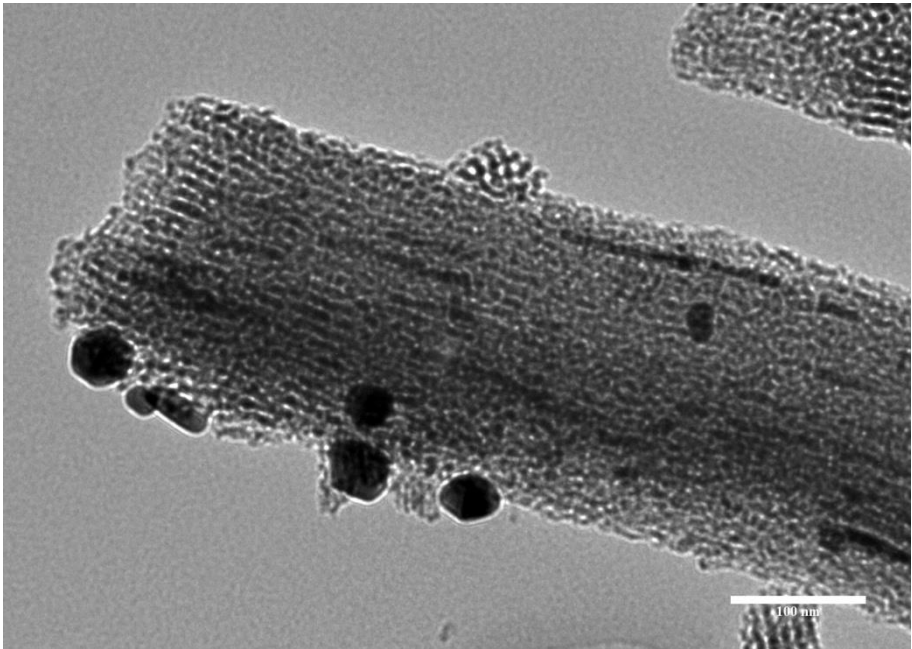
Monolito prisotinimui sidabro jonais jis buvo pamerktas į etanolinį 0,1 mol l<sup>-1</sup> sidabro nitrato tirpalą ir maišomas 48 val. Po to sorbentas išimamas iš šio tirpalo ir pamerkiamas į 37 % formaldehidą, kuriame laikomas 1 val. Po reakcijos sorbentas plaunamas 3 porcijomis etanolio po 20 ml, taip pašalinant iš jo reduktorių ir nesuregavusį joninį sidabrą. Paruoštas sorbentas buvo žalios spalvos iš ko galima buvo tikėtis sėkmingo sidabro nanodalelių susiformavimo. Tai patvirtino SEM mikroskopu padarytos nuotraukos (3.2.4.3 pav.)



**3.2.4.3 pav.** Nemodifikuoto (A) ir sidabro nanodalelėmis padengto (B) silikagelio monolitinio sorbento SEM nuotraukos.

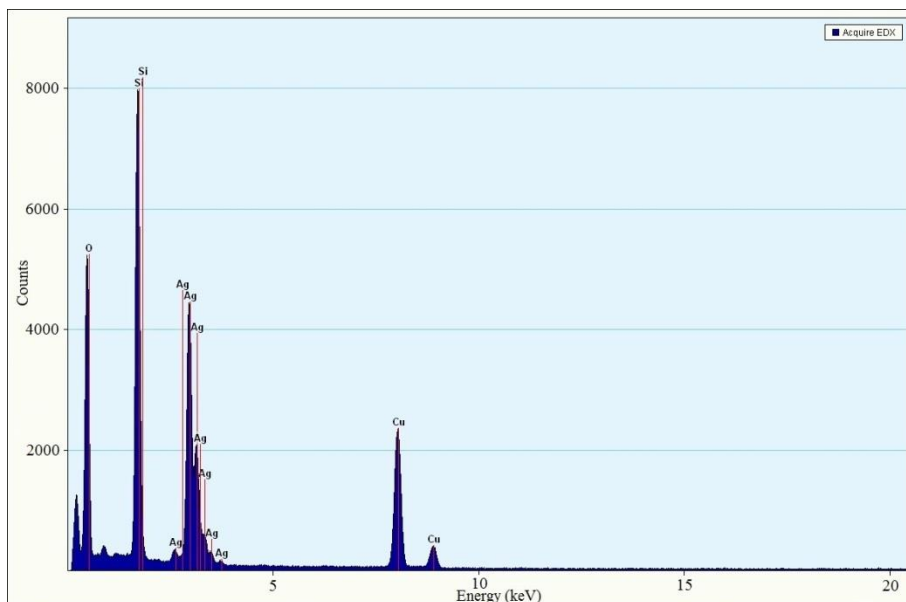
Norint įvertinti susintetintų sidabro nanodalelių pasiskirstymą ir morfologiją, buvo atliktas tyrimas TEM (3.2.4.4 pav.). Iš nuotraukos aiškiai matome susiformavusias nanodaleles, kurių dydis yra ~20 nm. Tokio dydžio nanodalelės turėtų suteikti sorbentui geltoną atspalvį, tačiau paruoštas sorbentas buvo žalias. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad sintezės metu

susiformavusių dalelių dydis varijuoja tarp 10 ir 50 nm. Straipsnyje [81] teigiama, kad žalia spalva yra galima sidabro nanodalelių sistemoms, kuriose dominuojančių nanodalelių dydis yra 20 nm, tačiau kartu egzistuoja ir kitokio dydžio dalelių.



**3.2.4.4 pav.** Sidabro nanodalelėmis padengto silikagelio monolitinio sorbento TEM nuotrauka.

Sorbento EDX analizė (**3.2.4.5 pav.**) patvirtino sėkmingą sidabro įvedimą į sistemą.



**3.2.4.5 pav.** Sidabro nanodalelėmis padengto silikagelio monolitinio sorbento EDX spektas.

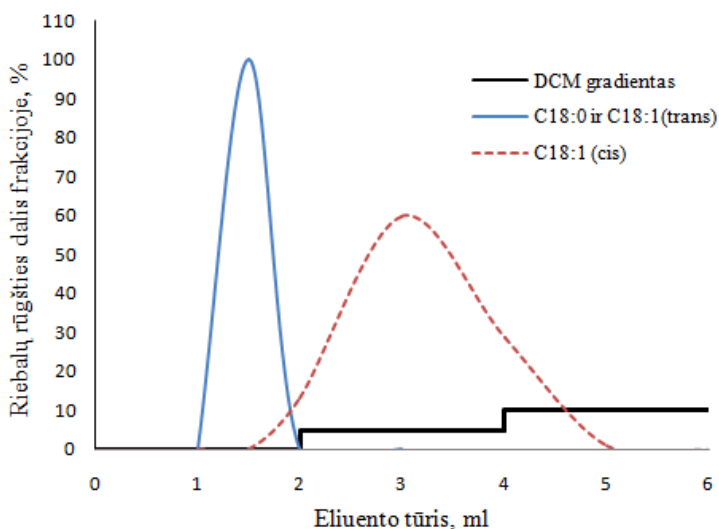
Siekiant įvertinti į sorbentą įvestą sidabro kiekį, buvo atlikta sidabro ICP-OES analizė. Prieš tyrimą 0,1 g susmulkinto mėginio buvo mineralizuota azoto rūgštis – vandenilio peroksido mišinyje, mineralizaciją atliekant mikrobangose. Tyrimo sąlygos aprašytos 2.5 skyriuje. Atlikus tyrimą buvo apskaičiuota, kad sidabro masės dalis sorbente yra 10,9 %.

### 3.2.5 Sidabro nanodalelėmis modifikuoto silikagelio monolito kietafazės ekstrakcijos sistemos tyrimas

Kietafazės ekstrakcijos kolonėlės gamybai buvo naudojamas komerciškai prieinamas 3 ml talpos tuščias polipropileno vamzdelis su dviem stiklo filtrais, tarp kurių buvo patalpintas paruoštas sorbentas.

Siekiant gerai užpildyti kietafazės ekstrakcijos kolonėlę, paruoštas sorbentas buvo susmulkintas agatinėje grūstuvėje ir persijotas per sietus leidžiančius susirinkti 90–200 μm dalelių dydžio frakciją. 0,2 g šios frakcijos buvo pakuojiama į kolonėlę tarp dviejų stiklo filtrų. Prieš darbą kolonėlė plaunama 3 ml n-heksano.

Paruoštos kolonėlės veikimas buvo tiriamas naudojant rapsų aliejaus riebalų rūgščių metilo estrių tirpalą n-heksane ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) į kurį buvo įnešta elaidino rūgšties metilo esterio. Taip buvo suformuota riebalų rūgščių metilo esterių kompozicija, kurioje C18:1-cis ir C18:1-tr santykis yra 100:1, kuris yra būdingas realiems mėginiams. Į paruoštą kietafazės ekstrakcijos kolonėlę užnešama 50  $\mu\text{l}$  šio mišinio ir surenkamos šešios frakcijos po 1 ml. Elientu šioje sistemoje naudojamas dichlormetano : n-heksano mišinys. Šio mišinio sudėtis ir analičių pasiskirstymas frakcijose iliustruotas **3.5.5.1 pav.** Surinktos frakcijos, buvo analizuojamos dujų chromatografu su liepsnos jonizaciniu detektoriumi, tiriant riebalų rūgščių kompozicijos kitimą jose.

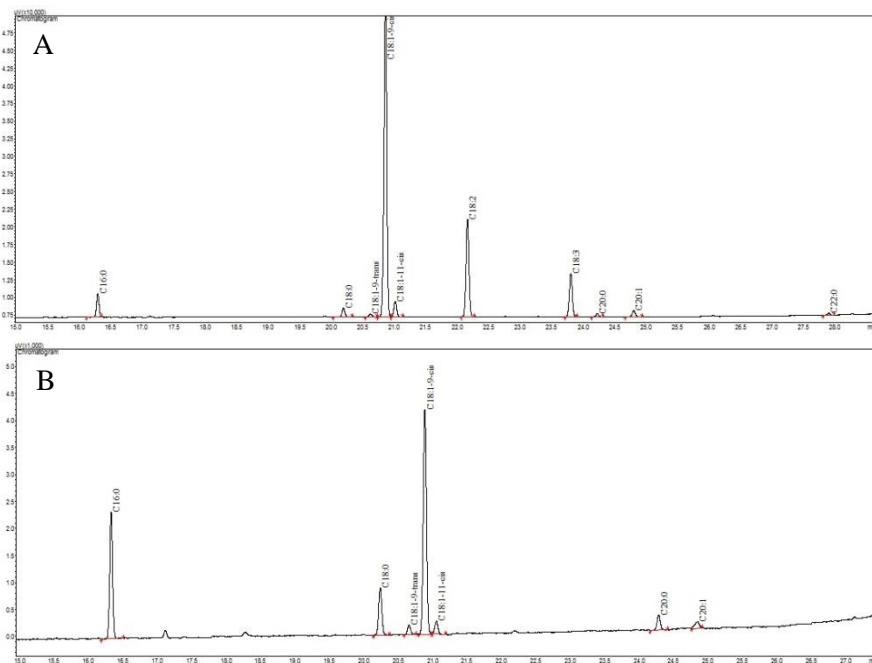


**3.2.5.1 pav.** C18 riebalų rūgščių atskyrimas naudojant sidabro nanodalelėmis padengtą silikagelio monolitinį sorbentą.

Kaip matoma iš 3.2.5.1 pav. antroje frakcijoje yra surenkamos sočiosios ir mononesočiosios trans riebalų rūgštys. Taip pat į šia frakciją patenka nedidelė C18:1-cis riebalų rūgšties dalis. Iš chromatografinės analizės rezultatų prieš frakcionavimą ir po frakcionavimo (**3.2.5.2 pav.**) matome, kad ši kietafazės ekstrakcijos sistema leidžia stipriai sumažinti C18:1-cis ir C18:1-trans rūgščių santykį trans frakcijoje. Mišinio sudėties supaprastinimas ir dominuojančių riebalų rūgščių eliminavimas leidžia koncentruoti mėginius nerizikuojant kolonos perkrova ir atskyrimo suprastėjimu, o visiškas polinesočiųjų rūgščių eliminavimas leidžia naudoti



analogiškus vidinius standartus, kurie buvo pritaikyti sidabro jonų kietafazės ekstrakcijos sistemoms.



**3.2.5.2 pav.** Riebalų rūgščių metilo esterių mišinio chromatograma prieš frakcionavimą (A) ir trans frakcijos chromatograma (B).

Kadangi polinesočiosios riebalų rūgštys šiomis sąlygomis nėra pašalinamos iš kietafazės ekstrakcijos sistemos, jų pašalinimui po frakcionavimo kolonėlė yra plaunama 10 ml dichlormetano.

Tiriant kolonėlės stabilumą ir pakartotinio naudojimo galimybes, išplauta kolonėlė mėnesį buvo laikoma kambario temperatūroje. Po mėnesio atlikus frakcionavimą anksčiau aprašytomis sąlygomis buvo gauti identiški rezultatai.

Norint pagerinti analičių sulaikymą buvo bandoma padidinti sidabro nanodalelių kiekį sorbente. Kadangi sidabro redukcijai formaldehidu yra reikalingi sidabro amininiai kompleksai, kurių kiekis sorbente priklauso nuo jame esančių aminopropilo grupių, buvo bandoma pagerinti sorbento padengimą aminopropilo grupėmis. Silikagelio monolito reakcija su APTEs

vyksta dėl jame esančių silanolinių grupių. Po monolito kalcifikavimo laisvų silanolinių grupių jame stipriai sumažėja. Straipsnyje [183] teigiama, kad silanolines grupes kalcifikuotuose silikatuose galima regeneruoti juos šildant vandenyje. Tiriant šią reakciją, sorbentai buvo šildomi vandenyje 90 °C temperatūroje 6, 24, ir 48 valandas, po to džiovinami 40 °C temperatūroje 48 valandas. Taip apdoroti sorbentai buvo modifikuojami aminopropilo grupėmis pagal 2.9 skyriuje aprašytą metodiką ir padengiami sidabro nanodalelėmis pagal 2.10 skyriaus aprašą.

Norint įvertinti sidabro nanodalelių kiekius sorbentuose, kuriuose buvo bandoma atlikti silanolinių grupių regeneravimą, jie buvo mineralizuoti ir atlikta sidabro analizė kaip aprašyta 2.5 skyriuje. Tyrimo rezultatai pateikti 3.2.5.1 lentelėje.

### 3.2.5.1. lentelė

Sidabro kiekis sorbente po silanolinių regeneracijų.

Silanolinių grupių regeneravimo laikas, val.	Sidabro masės dalis sorbente, %
0	10,9
6	19,9
24	19,9
48	19,0

Iš lentelės duomenų galime teigti, kad po 6 valandų regeneracijos proceso įvedamo sidabro nanodalelių kiekis išaugo beveik dvigubai. Tačiau tolimesnis silanolinių grupių regeneracijos proceso laiko ilginimas įvedamo sidabro kiekio neįtakojo.

Pasigaminus sorbentą turintį dvigubai didesnę sidabro nanodalelių kiekį, buvo bandoma atlikti riebalų rūgščių metilo esterių frakcionavimą, tačiau gautas visiškai priešingas nei tikėtasi rezultatas. Šis sorbentas visiškai nesąveikavo su nesočiais junginiais. Šis efektas gali būti paaiškintas nanodalelių agregatų susiformavimu sorbente.

### 3.2.6 Sidabro kietafazės ekstrakcijos sistemų palyginimas

Apibendrinus sidabro jonų ir sidabro nanodalelių kietafazės ekstrakcijos sistemų tyrimų rezultatus galime teigti, kad visos naudotos sistemos gali būti sėkmingai taikomos trans riebalų rūgščių atskyrimui. Pagrindiniai kiekvienos sistemos privalumai ir trūkumai pateikti 3.2.6.1 lentelėje.

### 3.2.6.1. lentelė

Kietafazės ekstrakcijos sistemų palyginimas.

	Discovery Ag-Ion	Silikagelio Ag <sup>+</sup>	Silikagelio monolitinė Ag <sup>0</sup>
Komerciškai prieinama	✓		
Vidinio standarto naudojimo galimybė	✓	✓	✓
Pakartotinio naudojimo galimybė			✓
Greitas ir efektyvus trans izomerų atskyrimas	✓	✓	✓
Nedidelė kaina		✓	
Maži naudojamų organinių tirpiklių kiekiai	✓		✓

Didžiausias sidabro nanodalelėmis modifikuoto silikagelio monolitinio sorbento trūkumas yra ilga ir specifinės laboratorinės įrangos reikalaujanti sintezė, tačiau priešingai nei joninio sidabro sistemos, ši pasižymi itin dideliu stabilumu ir pakartotinio naudojimo galimybe. Taip pat naudojant šią kietafazės ekstrakcijos sistemą trans izomerų atskyrimas vyksta labai greitai, o tikslinė frakcija surenkama vos 1 ml tūryje.

## IŠVADOS

1. Sukurta sidabro jonais modifikuota kietafazės ekstrakcijos sistema, sorbentu naudojant silikagelį. Ištirtos ir optimizuotos šios sistemos kietafazės ekstrakcijos sąlygos. Sistema pritaikyta trans riebalų rūgščių kiekybiniam įvertinimui žmogaus riebaliniame audinyje.
2. Ištirta komercinė „Discovery Ag-Ion“ kietafazės ekstrakcijos sistema trans riebalų rūgščių kiekybiniam nustatymui žmogaus riebaliniame audinyje. Palyginus laboratorijoje pagamintos ir komercinės Discovery Ag-Ion SPE kolonėlės analizines charakteristikas nustatyta, kad abi kolonėlės tinkamos trans riebalų rūgščių atskyrimui.
3. Atlikta silikagelio monolitinio sorbento sintezė ir modifikavimas aminopropilo grupėmis. Sorbentas pasižymi itin dideliu paviršiaus plotu, kuris lygus  $443 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .
4. Ištirtos ir optimizuotos sidabro nanodalelių sintezės sąlygos tirpaluose. Nustatyta, kad mažiausios ir vienodžiausio dydžio dalelės yra gaunamos redukuojant sidabro amininius kompleksus formaldehidu. Susidariusių nanodalelių dydis 10-20 nm.
5. Optimizuotos sidabro nanodalelių sintezės sąlygos sėkmingai pritaikytos jų formavimui silikagelio monolitiniame sorbente. Vidutinis sidabro nanodalelių dydis 20 nm. Sukurta nanodalelėmis modifikuota kietafazės ekstrakcijos sistema trans riebalų rūgštims atskirti.
6. Sidabro nanodalelėmis modifikuota kietafazės ekstrakcijos sistema riebalų rūgščių atskyrimui veikia taip pat efektyviai kaip joninio sidabro. Junginių sulaikymas priklauso nuo dvigubųjų ryšių skaičiaus ir jų konfigūracijos.
7. Ištirta, kad tik pavienės sidabro nanodalelės pasižymi sąveika su riebalų rūgštimis priklausomai nuo jų nesotumo laipsnio. Sidabro nanodalelių agregatų formavimasis prastina ir gali visiškai panaikinti metalinio sidabro sąveiką su nesočiais junginiais.
8. Sidabro nanodalelėmis modifikuota kietafazės ekstrakcijos sistema pasižymi dideliu stabilumu ir pakartotinio naudojimo galimybėmis. Efektyvus junginių atskyrimas yra pasiekiamas naudojant mažesnius sorbento ir organinių tirpiklių kiekius, nei sidabro jonų pagrindu veikiančiose kietafazės ekstrakcijos sistemose.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

### Moksliniai straipsniai

1. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė, Gintautas Brimas. Silver ion solid-phase extraction for the analysis of trans fatty acids in human adipose. *Chemija* **27** (3), 2016, p. 179.
2. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė, Julita Dargytė, Gintautas Brimas. Home-made silver ion solid-phase extraction system for the analysis of trans fatty acids: comparison with commercial Discovery Ag-Ion SPE. *Chemija* **29** (1), 2018, p. 49.
3. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė. Silver-coated monolithic silica column for separation of trans fatty acids. *Separatios science plus* **1** (11), 2018, p. 738.

### Mokslinių konferencijų tezės

1. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė, Gintautas Brimas. Trans fatty acid separation by home-made silica based Ag ion modified solid phase extraction tube. Konferencijos „International Conference „There is no future without the past““ tezės, Vilnius, Lietuva, (2017) 74-75.
2. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė, Gintautas Brimas. Silver ion solid-phase extraction for the analysis of trans fatty acids in human adipose. Konferencijos „XIX Euroanalysis 2017“Europe’s Analytical Chemistry Meeting“ tezės, Stokholmas, Švedija, (2017) 257.
3. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė. Silver-coated monolithic silica column for separation of trans fatty acids. Konferencijos „Open readings 2018: 61st international conference for students of physics and natural sciences“ tezės, Vilnius, Lietuva, (2018) 283.
4. **Vilius Poškus**, Vida Vičkačkaitė. Trans fatty acids separation by silver nanoparticles modified monolithic silica column.

Konferencijos „International Scientific Conference „EcoBalt““  
tezės, Vilnius, Lietuva, (2018) 29.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Riebalų rūgštys: Visuotinė Lietuvių Enciklopedija [interaktyvus], 2011 m. [žiūrėta 2019 m. vasario 2 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.vle.lt/Straipsnis/riebalu-rugstys-79861>
2. K. Nagy, I. D. Tiuca, Importance of fatty acids in physiopathology of Human Body. [interaktyvus]. 2017 m. [žiūrėta 2019 m. vasario 2 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.intechopen.com/books/fatty-acids/importance-of-fatty-acids-in-physiopathology-of-human-body>
3. D. Mozaffarian, M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer, W. C. Willett, *The New Eng. Jour. Of Med.*, **354** (15), 2006, p. 1601.
4. A. Ascherio, W. C. Willett, *A. Jour. Of Clin. Nutr.*, **66** (4), 1997, p. 1006.
5. A. Aro, I. Salminen, J. K. Huttunen, A. F. M. Kardinaal, P. van't Veer, J. D. Kark, R. A. Riemersma, M. Delgado-Rodriguez, J. Gomez-Aracena, L. Kohlmeier, M. Thamm, B. C. Martin, J. M. Martin-Moreno, V. P. Mazaev, J. Ringstad, F. J. Kok, *Lancet*, **345** (8945), 1995, p. 273.
6. A. Ascherio, C. H. Hennekens, J. E. Buring, C. Master, M. J. Stampfer, W. C. Willett, *Circulation*, **89** (1), 1994, p. 94.
7. A. Ascherio, M. Katan, P. L. Zock, M. J. Stampfer, W. C. Willett, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1999, p. 1994.
8. A. Ascherio, E. B. Rimm, E. L. Giovannucci, D. Spiegelman, M. Stampfer, W. C. Willett, *BMJ*, **313**, 1996, p. 84.
9. A. Baylin, E. K. Kabagambe, A. Ascherio, D. Spiegelman, H. Campos, *J. Nutr.*, **133**, 2003, p. 1186.
10. G. A. Bray, J. C. Lovejoy, S. R. Smith, J. P. DeLany, M. Lefevre, D. Hwang, D. H. Ryan, D. A. York, *J. Nutr.*, **132** (9), 2002, p. 2488.
11. P. M. Clifton, J. B. Keogh, M. Noakes, *J. Nutr.*, **134**, 2004, p. 874.
12. A. M. Lotemberg, M. S. Afonso, M. S. F. Lavrador, R. Markondes Makado, E. R. Nakandakare, *J. Nutr. Biochem.*, **23**, 2012, p. 1027.
13. A. A. Bremer, M. Mietus-Snyder, R. H. Lustig, *Pediatrics*, **129**(3), 2012, p. 557.
14. D. Mozaffarian, H. Cao, G. S. Hotamisligil, *US20160008309 A1*, 2016.
15. B. Nikolova – Damyanova, *J. Chromatogr. A*, **1216** (10), 2009, p. 1815.
16. S. Momchilova, B. Nikolova – Damyanova, *J. Sep. Sci.*, **26** (3-4), 2003, p. 261.
17. A. Stolyhwo, J. Rutkowska, *Food Anal. Methods*, **6**, 2013, p. 457.
18. J. B. Ohlrogge, E. A. Emken, R. M. J. Gulley, *Lipid Res.*, **22**, 1981, p. 955.

19. V. Juturu, *Nutrition 21 Inc*, 2009, p. 287.
22. H. Goto, N. Shinoya, M. Sugie, M. Tominaga, O. Shimelis, M. Taniguchi, T. Igarashi, Y. J.Hirata, *Oleo Sci.*, **61** (2), 2012, p. 49.
21. A. Baylin, E. K. Kabagambe, A. Ascherio, D. Spiegelman, H. J. Campos, *Nutr.*, **133**, 2003, p. 1186.
22. Kenksmingi sveikatai riebalai bus ribojami ir Lietuvoje. [interaktyvus]. 2017m. [žiūrėta 2019 m. vasario 2 d.] Prieiga per internetą: <http://vmvt.lt/naujienos/kenksmingi-sveikatai-riebalai-bus-ribojami-ir-lietuvoje>
23. I. Bronz, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 2002, p. 1.
24. A. T. James, A. J. P. Martin, *J. Biochem.*, **50**, 1952, p. 679.
25. L. R. Cavonius, N. G. Carlsson, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 2014, p. 7313.
26. J. Eras, F. Montanes, J. Ferran, R. J.Canela, *J. Chromatogr. A*, **918**, 2001, p. 227.
27. K. S. Liu, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71** (11), 1994, p. 1179.
28. A. I. Carrapiso, C. Garcia, *Lipids*, **35**, 2000, p. 1167.
29. W. R. Morrison, L. M. Smith, *J. Lipid Res.*, **5**, 1964, p. 600.
30. Y. Kishimoto, N. S. Radin, *J. Lipid Res.*, **6**, 1965, p. 435.
31. W. W. Christie, *Advances in Lipid Methodology – Two*, 1993, p. 69.
32. F. M. Archibald, V. P. Skipski, *J. Lipid Res.*, **7**, 1966, p. 442.
33. H. Hadorn, K. Zuercher, *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, **58**, 1967, p. 236.
34. R. P. Hansen, J. F. Smith, *Lipids*, **1**, 1966, p.316.
35. A. K. Lough, *J. Biochem.*, **90**, 1964, p.4C.
36. T. S. Laakso, I. Laakso, R. Hiltunen, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 2002, p. 39.
37. J. Eras, J. Ferran, B. Perpina, R. J.Canela, *J. Chromatogr. A*, **1047**, 2004, p. 157.
38. A. Salvini, D. Giomi, G. Cipriani, G. Bartolozzi, R. Alfini, A. Brandi, *Roy. Soc. Ch. Adv.*, **2**, 2012, p. 4864.
39. E. Pusvaskiene, B. Januskevic, A. Prichodko, V. Vickackaite *Chromatographia*, **69**, 2009, p. 271.
40. T. G. Sobolevsky, A. I. Revelsky, I. A. Revelsky, B. Miller, V. J. Oriedo, *J. Chromatogr. B*, **800**, 2004, p. 101.
41. S. G. Villas-Boas, K. F. Smart, S. Sivakumaran, G. A. Lane, *Metabolites*, **1**, 2011, p. 3.
42. Z. D. Pozun, K. Tran, A. Shi, R. H. Smith, G. Henkelman, *J. Phy. Chem. C*, **115** (5), 2011, p. 1811.



43. P. W. Atkins, T. L. Overton, J. P. Rourke, M. T. Weller, F. A. Armstrong, *Inorganic chemistry*, 2010, 5th edition. p.824
44. P. Delmonte, A. R. Fardin-Kia, J. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, L. Sidisky, C. Tyburczy, J. I. Rader, *J. Chromatogr. A*, **1233**, 2012, p.137.
45. S. Momchilova, Nikolova – B. Damyanova, *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.*, **24** (10), 2001, p. 1447.
46. B. Nikolova-Damyanova, B. G. Herslof, W. W. Christie, *J. Chromatogr. A*, **609**, 1992, p. 133.
47. T. G. Toschi, P. Capella, C. Holt, W. W. Christie, *J. Sci. Food Agric.*, **61**, 1993, p. 261.
48. R. O. Adlof, *J. Chromatogr. A*, **659**, 1994, p. 95.
49. R. O. Adlof, T. Lamm, *J. Chromatogr. A*, **799**, 1998, p. 329.
50. W. W. Christie, M. G. H. Breckenridge, *J. Chromatogr. A*, **469**, 1989, p. 261.
51. K. M. Phillips, R. D. Lugogo, R. F. Harris, M. T. Tarrago-Trani, J. A. Bailey, K. K. Steward, *J. Food Lipids*, **4**, 1997, p. 173.
52. P. Juaneda, J. L. Sebedio, W. W. Christie, *J. Sep. Sci.*, **17**, 1994, p. 321.
53. S. Momchilova, B. Nikolova-Damyanova, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **23**, 2000, p. 2317.
54. R. O. Adlof, *J. Chromatogr. A*, **764**, 1997, p. 337.
55. B. S. J. Jeffrey, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 1991, p. 289.
56. P. J. W. Schuyf, T. Joode, M. A. Vasconcellos, G. S. M. J. E. Duchateau, *J. Chromatogr. A*, **810**, 1998, p. 53.
57. W. S. Powell, *Anal. Biochem.*, **115**, 1981, p. 267.
58. W. W. Christie, *J. Sep. Sci.*, **10** (3), 1987, p. 148.
59. B. Nikolova-Damyanova, R. O. Adlof (Ed.), *Advances of Lipid Methodology—five*, 2003, p. 43.
60. B. Nikolova-Damyanova, W. W. Christie, B. Herslof, *J. Chromatogr. A*, **653**, 1993, p. 15.
61. W. W. Christie, *J. Chromatogr. A*, **454**, 1988, p. 273.
62. B. Nikolova-Damyanova, T. A. McKeon, J. T. Lin (Eds.), *HPLC of Acyl Lipids*, 2005, p. 221.
63. L. Morris, *Chem. Ind.*, 1962, p. 1238.
64. F. D. Gunstone, I. A. Ismail, M. L. K. Jie, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 1967, p. 376.
65. P. Laakso, W. W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology-One*, 1992, p. 81.
66. P. Laakso, *Food Rev. Int.*, **12** (2), 1996, p. 199.

67. L. G. Blomberg, M. Demirbiiker, P. E. Andersson, *JAOCS*, **70**(10), 1993, p. 939.
68. M. Demirbuker, , I. Hagglund, L. G. Blomberg, N. V. Olsson (Ed.), B. G. Herslof (Ed.), *Contemporary Lipid Analysis*, 1992, p. 30.
69. Y. Shen, S. L. Reese, B. E. Rossiter, M. L. Lee, *J. Microcol. Sep.*, **7**, 1995, p. 279.
70. C. F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **856**,1999, p. 399.
71. J. Sherma, *J. Chromatogr. A*, **880**, 2000, p. 129.
72. B. Nikolova-Damyanova, W. W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology-One*, 1992, p. 181.
73. G. Dobson, W. W. Christie, B. Nikolova-Damyanova, *J. Chromatogr. B*, **671**, 1995, p. 197.
74. B. Nikolova-Damyanova, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **22**, 1999, p. 1513.
75. B. Breuer, T. Stuhlfauth, H. P. Fock, *J. Chromatogr. Sci.*, **25**,1987, p. 302.
76. W. W. Christie, W. W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology-One*, 1992,p. 1.
77. V. Ruiz-Gutierrez, M. C. Perez-Camino, *J. Chromatogr. A*, **885**, 2000, p. 321.
78. X. Belaunzaran, L. Bravo – Lamas, J. K. G. Kramer, N. Aldai, *Europ. J. Lipid Sci. and Tech.*, **116** (12), 2014, p. 1621.
79. H. Goto, N. Shinova, M. Sugie, M. Tominaga, O. Shimelis, M. Taniguchi, T. Igarashi, Y. Hirata, *J. Oleo Sci.*, **61** (2), 2002, p. 49.
80. S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari, *Res. In Phar. Sci.*, **9** (6), 2014, p. 385.
81. P. Mendis, R. M. Silva, K. M. N. Silva, L. A.Wijenayaka, K. Jayawardana, M. Yan, *RSC Adv.*, **6**, 2016, p. 48792.
82. A. Sileikaite, J. Puiso, I. Prosycevas, *Mat. Sci.*, **15** (1), 2009, p. 21.
83. S. J. Oldenburg, *Silver Nanoparticles: Properties and Applications [interaktyvus]*, 2018 m [žiūrėta 2019 m. sausio 20 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>
84. S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *RSC Adv.*, **4** (8), 2014, p. 3974.
85. T. Endo, R. Ikeda, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa, *Anal. Chim. Acta*, **611**, 2008, p. 205.

86. J. Lin, C. He, Y. Zhao, S. Zhang, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **137**, 2009, p. 768.
87. M. Larguinho, P. V. Baptista, *J. Proteomics*, **75** (10), 2012, p. 2811.
88. P. J. Rivero, A. Urrutia, J. Goicoechea, C. R. Zamarreno, F. J. Arregui, I. R. Matías, *Nanoscale Res. Lett.*, **6** (305), 2011, p. 1.
89. M. M. Miranda, *J. Raman. Spectrosc.*, **35** (10), 2004, p. 839.
90. N. A. A. Hatab, J. M. Oran, M. J. Sepaniak, *ACS NANO*, **2** (2) 2008, p. 377.
91. J. Liu, I. White, D. L. DeVoe, *Anal. Chem.*, **83**, 2011, p. 2119.
92. J. R. Greer, R. A. Street, *Acta Mater.*, **55**(18), 2007, p. 6345.
93. Y. Zhu, K. Morisato, G. Hasegawa, N. Moitra, T. Kiyomura, H. Kurata, K. Kanamori, K. Nakanishi, *J. Sep. Sci.*, **38**, 2015, p. 2841.
94. Y. Zhu, K. Morisato, W. Li, K. Kanamori, K. Nakanishi, *Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 2013, p. 2118.
95. J. Neddersen, G. Chumanov, T. M. Cotton, *Appl. Spectrosc.*, **47**(12), 1993, p. 1959.
96. M. Prochazka, P. Mojzeš, J. Štepanek, B. Vlčková, P. Y. Turpin *Anal. Chem.*, **69**, 1997, p. 5103.
97. Y. H. Chen, C. S. Yeh, *Colloid. Surface A*, **197**, 2002, p. 133.
98. C. H. Bae, S.H. Nam, S. M. Park, *Appl. Surf. Sci.*, **197/198**, 2002, p. 628.
99. A.V. Kabashin, M. J. Meunier, *J. Appl. Phys.*, **94**, 2003, p. 7941.
100. F. Mafune, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, H. Sawabe, *J. Phy. Chem. B*, **104** (35), 2000, p. 8333.
101. M. Kawasaki, N. Nishimura, *App. Surf. Sci.*, **253** (4), 2006, p. 2208.
102. D. D. Evanoff, G. Chumanov, *J. Phys. Chem. B*, **108**(37), 2004, p. 13948.
103. A. Panaček, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Večerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevečna, R. Zboril, *J. Phys. Chem. B*, **110** (33), 2006, p. 16248.
104. Y. Yin, Z. Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaranc, *J. Mater. Chem.*, **12**, 2002, p. 522.
105. A. A. El – Kheshen, F. G. El – Rab, *Der Pharma Chem.*, **4** (1), 2012, p. 53.
106. S. Nam, D. V. Parikh, B. D. Condon, Q. Zhao, M. Yoshioka-Tarver, *J Nanopart. Res.*, **13**, 2011, p. 3755.
107. R. Patakfalvi, S. Papp, I. Dekany, *J. Nanopart. Res.*, **9**, 2007, p. 353.
108. D. Malina, A. Sobczak-Kupiec, Z. Wzorek, Z. Kowalski, *J. Nanomat. Biostruct.*, **7** (4), 2012, p. 1527.

109. S. A. AL-Thabaiti, F. M. Al-Nowaiser, A. Y. Obaid, A. O. Al-Youbi, Z. Khan, *Colloid Surface B*, **67**, 2008 p. 230.
110. Y. Xie, R. Ye, H. Liu, *Colloid Surface A*, **279**, 2006 p. 175.
111. P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2003, p. 13940.
112. H. Huang, X. Yang, *Carbohydr. Res.*, **339**, 2004, p. 2627.
113. P. Mohanpuria, N. K. Rana, S. K. Yadav, *J. Nanop. Res.*, **10**(3), 2008, p. 507.
114. A. R. Shahverdi, S. Minaeian, H. R. Shahverdi, H. Jamalifar, A. Nohi, *Process Biochem.*, **42**, 2007, p. 919.
115. N. Mokhtari, S. Daneshpajouh, S. Seyedbagheri, R. Atashdehghan, K. Abdi, S. Sarkar, S. Minaian, H. R. Shahverdi, A. R. Shahverdi, *Mater Res. Bull.*, **44**, 2009, p. 1415.
116. J. Y. Song, B. S. Kim, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**, 2009, p. 79.
117. S. Iravani, B. Zolfaghari, *BioMed Res. Int.*, 2013, ID 639725.
118. M. Navarro-Pascual-Ahuir, M.J. Lerma-Garcia, G. Ramis-Ramos, E.F.Simo-Alfonso, J.M. Herrero-Martinez, *Electrophoresis*, **34**, 2013, p. 925.
119. H. Yu, Y. Zhu, H. Yang, K. Nakanishi, K. Kanamori, X. Guo, *Dalton Trans.*, **43**, 2014, p. 12648.
120. O. Sedlacek, J. Kucka, F. Svec, M. Hruby, *J. Sep. Sci.*, **37**, 2014, p. 798.
121. Z. D. Pozun, K. Tran, A. Shi, R. H. Smith, G. Henkelman, *J. Phys. Chem. C*, **115**, 2011, p. 1811.
122. T. Amatani, K. Nakanishi, K. Hirao, T. Kodaira, *Chem. Mater.*, **17**, 2005, p. 2114.
123. K. Wang, Y. Chen, H. Yang, Y. Li, L. Nie, S. Yao, *Talanta*, **91**, 2012, p. 52.
124. J. Ou, H. Lin, Z. Zhang, G. Huang, J. Dong, H. Zou, *Electrophoresis*, **34**, 2013, p. 126.
125. A. Kurganov, *Anal. Chim. Acta*, **775**, 2013, p. 25.
126. D. Sykora, E. C. Peters, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Macromol. Mater. Eng.*, **275**, 2000, p. 42.
127. A. Maruska, C. Ericson, A. Vegvari, S. Hjerten, *J. Chromatogr. A*, **837**, 1999 p. 25.
128. X. Huang, S. Zhang, G. A. Schultz, J. D. Henion, *Anal. Chem.*, **74**, 2002, p. 2336.
129. A. A. Korolev, V. E. Shiryayeva, T. P. Popova, A. V. Kozin, I. A. Dyachkov, A. A. Kurganov, *Polym. Sci. Ser. A*, **48**, 2006, p. 779.

130. A. A. Korolev, V. E. Shiryayeva, T. P. Popova, A. A. Kurganov, *Russ. J. Phys. Chem. A*, **84**, 2010, p. 1617.
131. A. Greiderer, L. Trojer, C. W. Huck, G. K. Bonn, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2009, p. 7747.
132. A. M. Siouffi, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 2003, p. 801.
133. T. Ikegami, N. Tanaka, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **9**, 2016, p. 317.
134. F. Kirkbir, H. Murata, D. Meyers, S. Ray Chaudhuri, A. Sarkkar, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **6**, 1996, p. 203.
135. G. A. Nicolaon, S. J. Teichner, *Bull. Soc. Chim.*, 1968, p. 1906.
136. S. Dai, Y. H. Ju, H. J. Gao, J. S. Lin, S. J. Pennycook, C. E. Barnes, *Chem. Commun.*, 2000, p. 243.
137. X. Zhang, S. Huang, *J. Chromatogr. A*, **910**, 2001, p. 13.
138. L. A. Colon, Y. Guo, A. Fermier, *Anal. Chem.*, **68**, 1996, p. 2753.
139. S. Constantin, R. Freitag, *J. Chromatogr. A*, **887**, 2000, p. 253.
140. P. Judenstein, J. Titman, M. Stamm, H. Schmidt, *Chem. Mater.*, **6**, 1994, p. 127.
141. A. Venkateswara Rao, D. Haranath, *Micropor. Mesopor. Mater.*, **30**, 1999, p. 267.
142. P. Dieudonne, A. Hafidi Alaoui, P. Delord, J. Phalippou, *J. Non-Cryst. Solids*, **262**, 2000, p. 155.
143. A. Venkateswara Rao, M. M. Kulkarni, *Mater. Res. Bull.*, **306**, 2002, p. 1667.
144. M. A. Einarsrud, E. Nilsen, A. Rigacci, G. M. Pajonk, S. Buathier, D. Valette, M. Durant, B. Chevalier, P. Nitz, F. Ehrburger-Dolle, *J. Non-Cryst. Solids*, **285**, 2001, p. 1.
145. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **13**, 1998, p. 163.
146. C. Alie, F. Ferauche, R. Pirard, A. J. Lecloux, J. P. Pirard, *J. Non-Cryst. Solids*, **289**, 2001, p. 88.
147. G. Wu, J. Wang, J. Shen, T. Yang, Q. Zhang, B. Zhou, Z. Deng, F. Bin, D. Zhou, F. Zhang, *J. Non-Cryst. Solids*, **275**, 2000, p. 169.
148. P. Mezza, J. Phalippou, R. Sempere, *J. Non-Cryst. Solids*, **243**, 1999, p. 75.
149. N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **72**, 2000, p. 1275.
150. T. Zhu, K. H. Row, *J. Sep. Sci.*, **35**, 2012, p. 1294.
151. M. Wu, R. Wu, F. Wang, L. Ren, J. Dong, Z. Liu, H. Zou, *Anal. Chem.*, **81**, 2009, p. 3529.

152. Z. Zhang, M. Wu, R. A. Wu, J. Dong, J. Ou, H. Zou, *Anal. Chem.*, **83**, 2011, p. 3616.
153. A. Lee, S. Dubinsky, E. Tumarkin, M. Moulin, A. A. Beharry, E. Kumacheva, *Adv. Funct. Mater.*, **21**, 2011, p. 1959.
154. M. C. Breadmore, *Anal. Chim. Acta*, **556**, 2006, p. 121.
155. D. Sykora, F. Svec, J. M. J. Frechet, *J. Chromatogr., A*, **852**, 1999, p. 297.
156. X. Wei, J. Yin, G. Yang, C. He, Y. Chen, *J. Sep. Sci.*, **30**, 2007, p. 2851.
157. L. Ye, K. Mosbach, *Chem. Mater.*, **20**, 2008, p. 859.
158. Y. Ueki, T. Umemura, J. Li, T. Odake, K. Tsunoda, *Anal. Chem.*, **76**, 2004, p. 7007.
159. D. Connolly, B. Twamley, B. Paull, *Chem. Commun.*, **46**, 2010, p. 2109.
160. Y. Wei, X. Huang, R. Liu, Y. Shen, X. Geng, *J. Sep. Sci.*, **29**, 2006, p. 5.
161. S. Miyazaki, K. Morisato, N. Ishizuka, H. Minakuchi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A*, **1043**, 2004, p. 19.
162. F. Ye, Z. Xie, K. Y. Wong, *Electrophoresis*, **27**, 2006, p. 3373.
163. D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **21**, 2000, p. 3152.
164. A. Suzuki, L. W. Lim, T. Hiroi, T. Takeuchi, *Talanta*, **70**, 2006, p.190.
165. C. Riordain, E. Gillespie, D. Connolly, P. N. Nesterenko, B. Paull, *J. Chromatogr. A*, **1142**, 2007, p. 185.
166. R. El-Debs, F. Cadoux, L. Bois, A. Bonhomme, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, *Langmuir*, **31**, 2015, p. 11649.
167. H. Qiu, M. Takafuji, T. Sawada, X. Liu, S. Jiang, H. Ihara, *Chem. Commun.*, **46**, 2010, p. 8740.
168. Y. N. Hsieh, R. S. Horng, W. Y. Ho, P. C. Huang, C. Y. Hsu, T. J. Whang, C. H. Kuei, *Chromatographia*, **67**, 2008, p. 413.
169. H. Hana, Q. Wanga, X. Liua, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, **1246**, 2012, p. 9.
170. M. Wua, Y. Chenb, R. Wua, R. Li, H. Zoua, B. Chenb, S. Yao, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 2010, p. 4389.
171. P. Jandera, *J. Chromatogr. A*, **1313**, 2013, p. 37.
172. V. F. Samanidou, E. G. Karageorgou, *J. Sep. Sci.*, **34**, 2011, p. 2013.
173. M. Diaz-Bao, R. Barreiro, J. M. Miranda, A. Cepeda, P. Regal, *Chromatography*, **2**, 2015, p. 79.

174. T. Zhao, Q. Wang, J. Li, X. Qiao, Z. Xu, *J. Sci. Food Agric.*, **94**, 2014, p. 1974.
175. P. Fagan, Ch. Wijesundera, *J. Sep. Sci.*, **36**, 2012, p. 1743.
176. Q. Cao, Y. Xu, F. Liu, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Anal. Chem.*, **82**, 2010, p. 7416.
177. G. Zhu, L. Zhang, H. Yuan, Z. Liang, W. Zhang, Y. Zhang, *J. Sep. Sci.*, **30**, 2007, p. 792.
178. F. Ye, S. Li, S. Zhao, *J. Sep. Sci.*, **30**, 2007, p. 3027.
179. Z. Wang, J. C. Zhao, H. Z. Lian, H. Y. Chen, *Talanta*, **138**, 2015, p. 52.
180. Y. Qin, X. Ji, J. Jing, H. Liu, H. Wu, W. Yang, *Colloid Surface A*, **372** (1-3), 2010, p. 172.
181. M. Manoth, K. Manzoor, M. K. Patra, P. Pandey, S. R. Vadera, N. Kumar, *Mater. Res. Bull.*, **44**, 2009, p. 714.
182. Supelco Technical Report. Discovery® Ag-Ion SPE for FAME Fractionation and Cis/Trans Separation [žiūrėta 2019 m. balandžio 9 d.].  
Prieiga per internetą: [[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t406062.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t406062.pdf)].
183. L. T. Zhuravlev, *Colloid Surface A*, **173**, 2000, p. 1.

UŽRAŠAMS





Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 12 egz.