Karakterizacija nepokretnih faza u kromatografiji reverznih faza ultravisoke djelotvornosti

Škrinjar, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:058362

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Tea Škrinjar

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Tea Škrinjar

KARAKTERIZACIJA NEPOKRETNIH FAZA U KROMATOGRAFIJI REVERZNIH FAZA ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Članovi povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
2. Doc. dr. sc. Šime Ukić
3. Dr. sc. Dajana Milovac

Zagreb, rujan 2015.

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada izrađen je na sveučilištu Nikolaus Kopernikus u Torunu, Poljska u sklopu CEEPUS projekta. Stoga bih se u prvom redu zahvalila svojem mentoru prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči kao i prof. dr. sc. Boguslawu Buszewskom, mojem domaćinu u Poljskoj, koji su mi omogućili izradu ovog rada.

Ujedno željela bih se zahvaliti i dr. sc. Szymonu Bocianu i doc. dr. sc. Šimi Ukiću na kvalitetnim savjetima i pomoći pri izradi ovog rada.

Naposljetku veliko hvala i mojoj obitelji, osobito majci. Bez njihove podrške bi svi moji ciljevi bili znatno teže ostvareni.

SAŽETAK

Tema diplomskog rada sastojala se od proučavanja eksces adsorpcijskih izotermi organskih otapala acetonitrila i metanola iz vode, Korišteno je pet komercijalno dostupnih kemijski vezanih stacionarnih faza tj. pet kromatografskih kolona (Kinetex™ kolone, Phenyl-Hexyl, Biphenyl, C18, XB C18 i PFP tvrtke Phenomenex®). Te kolone karakteriziraju različite funkcionalne skupine.

Eksces adsorpcijske izoterme mjerene su metodom malih poremećaja pod UPLC uvjetima. Dobivene izoterme pružaju korisnu informaciju o strukturi stacionarnih faza. Mjereni parametri pikova otapala su baza za izradu eksces izotermi. Prema tome, injektirana je eksces količina organskog otapala ili vode. Količina ″adsorbiranog otapala″ može pokazati tip distribucijskog mehanizma. Također je mjeren utjecaj temperature na adsorpciju na koloni fenil-heksil.

Bazirajući se na rezultantnim eksces adsorpcijskim izotermama, potvrđeno je da molekule acetonitrila imaju veći afinitet prema promatranim stacionarnim fazama i da reagiraju pomoću π-π veza. Metanol i voda stvaraju vodikove veze sa polarnim i rezidualnim silanolnim grupama na stacionarnoj fazi. Uspoređujući eksces adsorpcijske izoterme za acetonitril i metanol opaža se da je adsorpcija acetonitila oko 3 puta veća od adsorpcije metanola i negativni dio adsorpcije vode u sistemu acetonitril- voda je oko 5 puta veći od onog u sistemu metanol-voda. Adsorpcija acetonitrila se smanjuje s povećanjem temperature i optimalna temperature za adsorpciju je 20 °C.

Ključne riječi: UPLC, RP-LC, adsorpcija, stacionarna faza, eksces izoterma, acetonitril, metanol, voda, otapala, temperatura

SUMMARY

The aim of this master-degree work was studying excess adsorption isotherms of organic solvents: acetonitrile and methanol, from water. Five commercially available chemically-bonded stationary phases, *i.e.* five chromatographic colums (Kinetex™ columns: Phenyl-Hexyl, Biphenyl, C18, XB C18 and PFP, made by Phenomenex®), were used. These columns were characterized by different functional groups.

Excess adsorption isotherms were measured using the minor disturbance method under UPLC conditions. These isotherms provided useful information about structure of the stationary phases. Measured parameters of the solvent peaks were the basis for making excess isotherms. Therefore, excess of organic solvent or water was injected. The amount of ″adsorbed solvent″ can indicate the type of distribution mechanism. Also, the influence of temperature on the preferential adsorption was measured on Phenyl-Hexyl columns.

Based on the resulting excess adsorption isotherms, it was confirmed that molecules of acetonitrile had more affinity for observed stationary phases and they interacted by π-π interactions. Methanol and water formed hydrogen bonds with polar and residual silanol groups on stationary phases. By comparing excess adsorption isotherms for acetonitrile and methanol, one can observe that the adsorption of acetonitrile is approximately 3 times higher than adsorption of methanol, and negative part for adsorption of water in the system of acetonitrile–water is about 5 times above the one in methanol–water system. The adsorption of acetonitrile decreases with the increase of temperature and the optimal temperature for adsorption is 20 °C.

Keywords: UPLC, RP-LC, adsorption, stationary phases, excess isotherm, acetonitrile, methanol, water, solvents, temperature

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. PREGLED RAZVOJA KROMATOGRAFIJE 3
2.2. UPLC 4
2.3. TEORIJA ODSJEČAKA 4
2.4. TEORIJA BRZINE 7
2.5. UTJECAJ EFEKTA VRTLOŽNE DIFUZIJE 9
2.6. UTJECAJ UZDUŽNE DIFUZIJE 11
2.7. UTJECAJ OTPORA MEĐUFAZNOM PRIJENOSU 11
2.8. KEMIJA MALIH ČESTICA 12
2.9. INJEKTIRANJE UZORKA 13
2.10. UVOD U UPLC 13
2.11. PREGLED PRIMJENE UPLC-A 14
2.11.1. Analiza aminokiselina 15
2.11.2. Analiza lijekova 15
2.11.3. Identifikacija metabolita 15
2.11.4. Proučavanje metabolita 15
2.11.5. Testiranje otapala 15
2.11.6. Proučavanja prisiljene razgradnje 16
2.11.7. Proizvodnja/osiguranje kvalitete 16
2.11.8. Razvijanje metode/validacija 16
2.11.9. Određivanje nečistoća 17

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. KEMIKALIJE 19
3.2. APARATURA 19
3.3. EKSPERIMENTALNI DIZAJN 22

4. REZULTATI I RASPRAVA 24
4.1. ADSORPCIJA ACETONITRILA 24
4.2. ADSORPCIJA METANOLA 26
4.3. USPOREDBA ADSORPCIJE ORGANSKIH OTAPALA 27
4.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA ADSORPCIJU 29

5. ZAKLJUČAK 31

6. LITERATURA 32

1. UVOD

Kromatografija je analitička metoda koja se koristi već gotovo stotinu godina te su njene novije inačice poput HPLC-a i UPLC-a jedne od najznačajnijih separacijskih tehnika u današnjim analitičkim laboratorijima. Kemijski karakter, geometrija i sastav kemijski vezanih liganada određuje interakcije između stacionarne faze, analita i mobilne faze i prema tome utječe na mehanizme zadržavanja analita.

Upravo stoga, problematika načina vezanja analita na stacionarnu fazu, od iznimnog je značaja. U ovom radu proučavat će se eksces adsorpcijske izoterme na 5 različitih stacionarnih faza. Detaljnom analizom rezultata dobit će se odgovori na pitanje što se događa na granici faza promatranih sustava, kao i kakav je utjecaj temperature na adsorpcijske procese.

2. TEORIJSKI DIO

Prema IUPAC-ovoj definiciji iz 1993., kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se komponente analita raspodjeljuju između dvije faze, od kojih je jedna nepokretna dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza)[1].

Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, a ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi koja može, ali i ne mora sudjelovati u separacijskom procesu. Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju, na primjer *in situ* polimerizacijom nakon nanošenja.

Glavne metode kromatografije su: frontalna kromatografija, kromatografija istisnućem i kromatografija ispiranjem. Frontalna kromatografija je postupak u kojemu se uzorak (tekućina ili plin) kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu te se u njoj ne koristi dodatna pokretna faza. Kod kromatografija istisnućem i ispiranjem uzorak se mora unositi u sustav u ograničenoj količini. Ukoliko pokretna faza sadrži spoj koji se na nepokretnoj fazi zadržava jače nego sastojak uzorka koji se ispituje, dolazit će do istiskivanja spomenutog uzorka i tada govorimo o kromatografiji istisnućem. U kromatografiji ispiranjem pokretna faza, koja se u ovom slučaju naziva eluens, neprekidno prolazi kroz ili uzduž kromatografske podloge. Eluens sadržava tvari koje se ravnomjerno natječu s ispitivanim uzorkom za aktivna mjesta na kromatografskoj podlozi (kompeticijske tvari).

Prema obliku kromatografske podloge kromatografija može biti plošna gdje je nepokretna faza ploha ili se nanosi na plohu i kolonska gdje se nepokretna faza nalazi unutar cijevi odnosno kolone.

Prema fizikalnom stanju obiju faza kromatografija se dijeli na plinsko-tekućinsku kromatografiju, plinsko-čvrstu kromatografiju, tekućinsko-tekućinsku kromatografiju, tekućinsko-čvrstu kromatografiju, dok se prema fizikalnom stanju pokretne faze dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

Mehanizmi separacije u kromatografiji mogu biti različiti. Prema prevladavajućem mehanizmu kromatografija se dijeli na adsorpcijsku kromatografiju (razdvajanje je temeljeno na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari), razdjelnu kromatografiju (kod plinske kromatografije temelji se na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi), ionsku izmjenjivačku kromatografiju (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni), kromatografija isključenjem (do razdvajanja dolazi poradi isključenja zbog razlika

u veličini, obliku ili naboju čestica) i afinitetnu kromatografiju (za mehanizam separacije se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganda)[2].

2.1. PREGLED RAZVOJA KROMATOGRAFIJE

Povijest kromatografije započinje sredinom 19. stoljeća, pri čemu su nove tehnike kromatografije razvijene tijekom 1930-ih i 1940-ih godina kao korisni separacijski procesi. Izraz kromatografija (grčki: *chroma* – boja, *graphein* – pisati) prvi je upotrijebio ruski kemičar i botaničar Mihail Semjonovič Cvet 1906. godine kako bi opisao svoj rad na separaciji obojenih biljnih pigmenata klorofila i ksantofila na staklenoj koloni napunjenoj usitnjenim Ca-karbonatom. Odijeljeni analiti vidjeli su se kao obojene vrpce pa je tako ova tehnika dobila ime. Značaj njegovog rada nije bio shvaćen do 1930-ih kad su Lederer i suradnici opisali svoj rad na separaciji biljnih pigmenata[3], uključujući karotenoide i ksantofile, a Zechmeister 1937. objavio prvu knjigu o kromatografiji[4]. Tijekom tog perioda brzo su se razvijale papirna i tankoslojna kromatografija te je bilo mnogo objavljenih radova o njihovoj primjeni. 1940-ih došlo je do razvoja kolonske kromatografije i prvih istraživanja ionske i plinske kromatografije. Klasifikaciju kromatografije u tri grupe predložio je 1940. Tiselius[5], odnosno 1946. Claesson[6]. Tiselius i Claesson proučavali su svojstva otopina tijekom kromatografskog procesa i zaključili da se događaju tri različita oblika kromatografije koja se razlikuju u principu separacije to jest frontalna kromatografija, kromatografija istisnućem i kromatografija ispiranjem. Gradijentna elucija, gdje se sastav mobilne faze mijenja sa separacijskim procesom, je predstavljena ranih 1950-ih od strane biokemičara A.J.P. Martina i R.L.M. Syngea koji su razvijali separacijski proces za izolaciju aciliranih aminokiselina iz proteina ekstrakcijom sa vodeno-organskom (kloroform) mobilnom fazom. Pri tome su razvili razdjelnu kromatografiju za što su 1952. dobili Nobelovu nagradu[7].

Od uvođenja gradijentne elucije kreće intenzivan razvoj kromatografskih tehnika. Tijekom 1970-ih većina separacijskih postupaka provodi se korištenjem kromatografskih tehnika na otvorenim kolonama, papirne i tankoslojne kromatografije. Sredinom 1970-ih, razvojem novih punila za kolone i vezanjem direktno na detektore, razvila se visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC, kasnije nazvana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti; eng. *High Performance Liquid Chromatography*). Već 1963. Giddings je ukazao na to da bi se efikasnost kolona mogla povećati ako bi se smanjile čestice punjenja, no proizvodnju čestica tih veličina i pad tlaka u koloni nije bilo moguće riješiti još mnogo godina

nakon toga. Stabilna pakiranja za reverznu fazu razvijena su kada se došlo do zaključka da bi se na čestice silikagela moglo vezati alkilne skupine[8].

Razvitak kromatografije zadnjih se godina usmjerava na poboljšanja u instrumentaciji, ponajprije u kontroli pumpi i ventila za gradijentnu eluciju te spajanje kolona direktno na detektore.

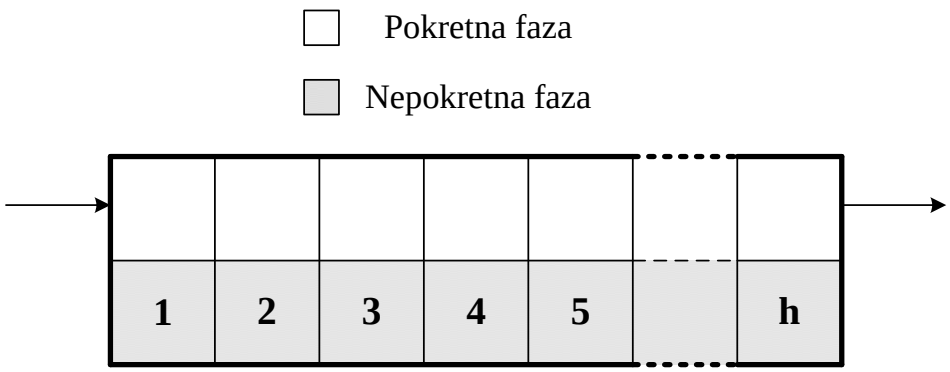
2.2. UPLC

UPLC ili tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) pruža prednosti tehnoloških dosega u djelotvornosti kemije čestica, optimizaciji sistema, dizajnu detektora i obradi podataka te njihovoj kontroli. Ona proizlazi iz HPLC-a koji koristi fine čestice, štedi vrijeme i smanjuje potrošnju otapala. Kako se veličina čestica punila kod HPLC-a smanjuje, efikasnost i time rezolucija se povećavaju. Koristeći manje čestice punila (promjer manji od 2,5 μm) broj pikova koje je moguće odvojiti u jedinici vremena dovodi se u novo područje poznato kao ultra djelotvornost. HPLC ima mnoge prednosti pred klasičnim metodama kao što su: robusnost, lakoća korištenja, dobra selektivnost i prilagodljiva osjetljivost. Glavno ograničenje HPLC metode u usporedbi sa plinskom kromatografijom ili kapilarnom elektroforezom manjak je efikasnosti zbog niskih koeficijenata difuzije u tekućoj fazi, što dovodi do spore difuzije analita u stacionarnu fazu[9].

Kao što je već rečeno, efikasnost kromatografske kolone povećava se korištenjem nepokretne faze manjih veličina čestica (vidi Van Deemterovu jednadžbu: poglavlje 2.4) ali to dovodi do velikog povećanja povratnog tlaka, što nije povoljno za HPLC sustave, jer oni uglavnom mogu raditi samo do 400 bara[10]. Zbog toga se kod UPLC sustava koriste kratke kolone punjene česticama promjera oko 2 μm čime se ubrzava analiza bez gubitka efikasnosti.

2.3. TEORIJA ODSJEČAKA

Teoriju odsječaka (teorijskih odsječaka) u originalu su razvili Martin i Synge[11]. Oni su stvaran kromatografski proces, koji se odvija pri neravnotežnim uvjetima, predočili hipotetskom kolonom sastavljenom od niza odsječaka gdje se unutar svakog od njih uspostavljaju ravnotežni uvjeti.



Slika 1. Hipotetska kolona sastavljena od *h* teorijskih odsječaka.

Razmotrit će se jedna takva kolona prikazana na slici 1. Neka svaki odsječak, *h*, sadrži konstantni volumen pokretne, V_M, i nepokretne faze, V_S.

$$K_V = \frac{V_{S,h}}{V_{M,h}} = \text{konst.} \tag{1}$$

Zbivanja u koloni odvijaju se u nizu koraka gdje sadržaj pokretne faze iz jednog odsječka, nakon procesa uravnoteženja, prelazi u slijedeći odsječak, dok nepokretna faza ostaje u odsječku. Pri tome se pretpostavlja da je razdioba iona unutar svakog odsječka izrazito brz i samim time potpuno uravnotežen proces, te da aksijalna difuzija u sustavu ne postoji.

Konstanta razdjeljenja komponenti između dviju faza jednaka je za svaki odsječak i neovisna o koncentraciji komponente. Jednako kao o konstanti razdjeljenja, može se govoriti i o vjerojatnosti, *p*, da će se komponenta nakon uravnoteženja nalaziti u mobilnoj fazi:

$$p_i = \frac{n_{M,i}}{n_{uk,j}} = \frac{n_{M,i}}{n_{M,i} + n_{S,i}} \tag{2}$$

gdje n_i predstavlja količinu tvari i u pokretnoj (M) i nepokretnoj (S) fazi, odnosno u cjelovitom odsječku (uk). Uvažavajući jednadžbe (1) i (2) lako se uočava ovisnost vjerojatnosti o konstanti razdjeljenja:

$$p_i = \frac{1}{K_V \cdot K_{c,i} + 1} \tag{3}$$

Broj odsječka, *M*, u kojem će se ispitivana komponenta nakon *r* provedenih prijenosa iz odsječka u odsječak nalaziti u maksimalnoj količini, jednostavno se odredi množeći broj provedenih transfera s vjerojatnošću nalaženja komponente u mobilnoj fazi:

$$M = r \cdot p \tag{4}$$

Obrnuto tome, ukoliko je poznat broj odsječaka od kojih se sastoji kolona, *Z*, lako se može izračunati koliko je prijenosa potrebno izvršiti ne bi li komponenta eluirala iz sustava.

$$r = \frac{Z}{p} \tag{5}$$

Volumen pokretne faze potreban da bi promatrana komponenta eluirala do *M*-tog odsječka jednak je umnošku broja izvršenih prijenosa i volumena mobilne faze u pojedinom odsječku:

$$V_{\mathrm{E}} = r \cdot V_{\mathrm{M},n} \tag{6}$$

U slučaju kada je odsječak *M* jednak ukupnom broju odsječaka u koloni, *Z*, volumen V_{E} predstavlja volumen zadržavanja komponente u koloni, V_{R}.

Teorija odsječaka daje i mogućnost predviđanja širenja kromatografske zone, no tada je potrebno promatrati i što se događa u odsječcima nakon što se dogodi prijenos pokretne faze iz jednog odsječka u drugi.

Ukoliko *p* predstavlja vjerojatnost da će se komponenta nalaziti u pokretnoj fazi, neka *q* predstavlja vjerojatnost da će ostati u nepokretnoj fazi. Pogledajmo što se događa ulaskom komponente u kolonu:

- Trenutak unošenja.

  U trenutku unošenja uzorka u kolonu vjerojatnost njegova nalaženja u prvom odsječku kolone iznosi 1.

- Prvi prijenos pokretne faze.

  Nakon prvog prijenosa pokretne faze, u odsječku 1 preostalo je *q* komponente (samo ono što je ostalo u nepokretnoj fazi; novopridošla pokretna faza ne sadrži ispitivanu komponentu). U odsječku 2 nalazi se pak *p* komponente (samo ono što je pristiglo pokretnom fazom; nepokretna faza odsječka 2 ne sadrži ispitivanu komponentu). Vjerojatnost da će se ion nalaziti u koloni jednaka je sumi vjerojatnosti da će se nalaziti u pojedinom odsječku $p + q = 1$.

- Drugi prijenos pokretne faze.

  Nakon drugog prijenosa pokretne faze, u odsječku 1 preostalo je q^2 komponente, a u odsječak 2 ih je prešlo $q \cdot p$. Iz odsječka 2 pristiglo je u odsječak 3 p^2 komponente, a preostalo ih $p \cdot q$. Ukupno se sada u odsječku 2 nalazi $2p \cdot q$ komponente, pa iz bilance tvari za kolonu slijedi da je:

$$q^2 + 2p \cdot q + p^2 = 1 \tag{7}$$

Promatrajući na identičan način sljedeće prijenose pokretne faze, dolazi se do spoznaje da se promatrani ion u koloni raspodjeljuje prema binomnoj raspodjeli:

$$(p+q)^r = 1 \tag{8}$$

Standardna devijacija binomne raspodjele dana je kao[12]:

$$\sigma = (r \cdot p \cdot q)^2 \tag{9}$$

Kada je kolona sastavljena od velikog broja odsječaka, binomna raspodjela teži Gaussovoj[12] pa se funkcijom normalne razdiobe[13] može opisati ovisnost eluirane koncentracije komponente o volumenu eluiranja:

$$c = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{\frac{1}{2}\cdot\left(\frac{V-V_R}{\sigma}\right)^2} \tag{10}$$

Iako model teorijskih odsječaka na kromatografskoj koloni daje rezultate koji se odlično slažu s eksperimentom, on ima i neke ozbiljne nedostatke. Dok korektno opisuje odnos između širenja vrpce i zadržavanja komponente u koloni, nije u stanju predvidjeti magnitudu razdiobe, drugim riječima visinu teorijskog odsječka. Također, model ne uzima u obzir utjecaj promjene nekih vrlo bitnih radnih varijabli, poput protoka ili veličine čestica punila. Stoga je njegova stvarna vrijednost predviđanja mala. Možda najveća odlika modela je upravo njegova jednostavnost.

2.4. TEORIJA BRZINE

U nastojanju da se što kvalitetnije opiše širenje kromatografske zone, veliku važnost ima teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu (eng. *rate theory*). Ova teorija postupno se razvijala istraživanjima i zapažanjima niza znanstvenika tijekom duljeg vremenskog perioda, te se o isključivo jednom autoru ne može govoriti[14-22]. Iako je s vremenom proširivana, teorija je svoje osnovne pretpostavke do današnjih dana očuvala nepromijenjenima. Za razliku od teorije odsječaka, teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu uzima u obzir varijable poput protoka, veličine čestica punila, neidealnog punjenja kolona te brzine prijenosa tvari između faza. Prema Van Deemterovoj jednadžbi općenit razlog nastajanja i širenja zone ili visine teoretskog odsječka (eng. *HETP, height equivalent to theoretical plate*) leži u kombiniranom djelovanju triju efekata pri linearnoj brzini protoka, v[12,23].

$$HETP = A + B \cdot \frac{1}{v} + C \cdot v \tag{11}$$

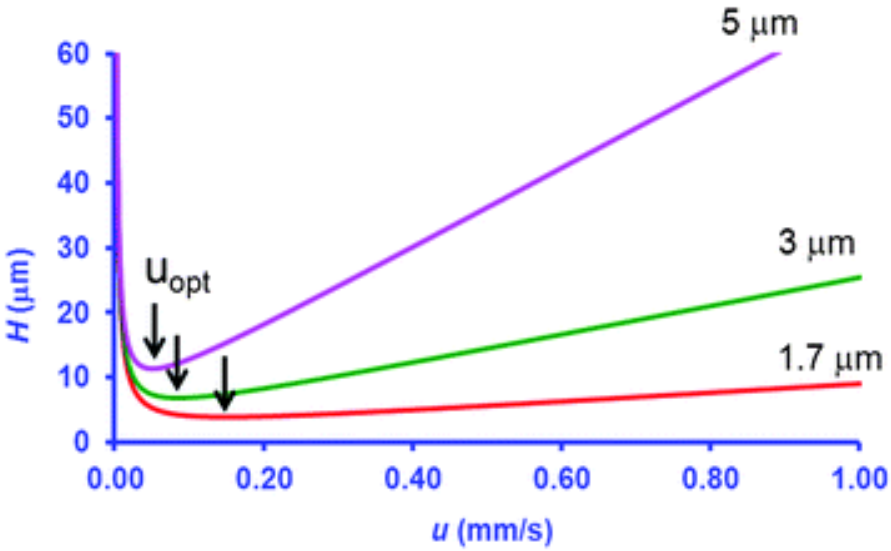
A – vrtložnoj difuziji (eng. *eddy diffusion*)

B – uzdužnoj difuziji (eng. *longitudinal diffusion*)

C – otporu međufaznom prijenosu tvari (eng. *mass transfer resistance*)

v – linearna brzina, protok mobilne faze

Na slici (Slika 2) dan je grafički prikaz Van Deemterove jednadžbe iz kojeg je vidljivo da se najmanje širenje zone (najmanja visina teoretskog odsječka *HETP*), a time i najveća kromatografska učinkovitost postiže u točci kada su sumarni uzroci širenju zone (*A*, *B* i *C*) minimalni, te navedena točka određuje optimalni protok mobilne faze, *v*.



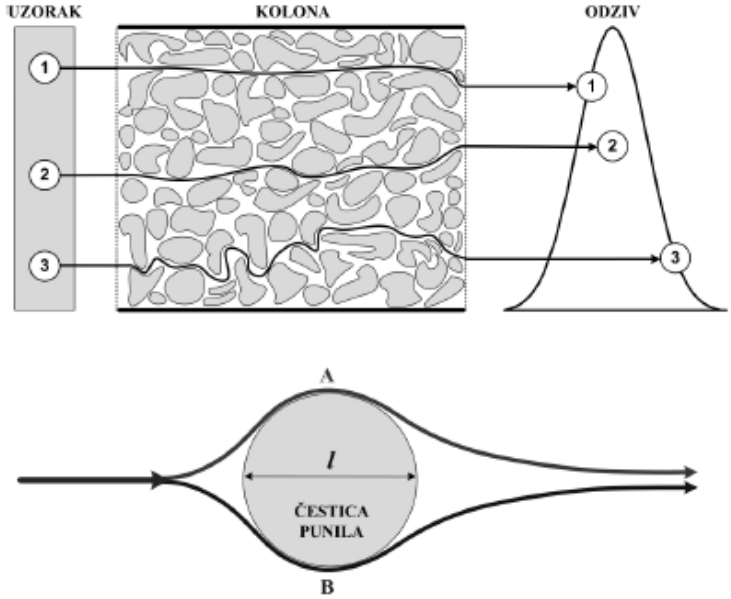
Slika 2. Povećanje kromatografske učinkovitosti odabirom optimalnog protoka

Vrijednost A je neovisna o brzini i predstavlja *"eddyjevo"* miješanje. Najmanja je kad su čestice pakiranja kolone male i uniformne. Vrijednost B predstavlja aksijalnu difuziju ili prirodno svojstvo molekula za difuziju. Taj efekt je smanjen na visokim brzinama protoka pa se on dijeli sa *v*. Vrijednost C odnosi se na otpor međufaznom prijenosu tvari. Što je gušće pakiranje čestica u koloni to će se više čestica iz mobilne faze zadržati. Prema tome ta je vrijednost proporcionalna sa *v* te je moguće povećati izlaz i time brzinu analize bez utjecaja na kromatografsku djelotvornost.

2.5. UTJECAJ EFEKTA VRTLOŽNE DIFUZIJE

Otopljene komponente gotovo nikad ne putuju izravno kroz sustav. tijekom putovanja nailaze na prepreke (čestice punila kolone), te ih zaobilaze. Način na koje se može zaobići prepreka višestruki su, a odabir bilo kojeg načina utječe i na daljnji tijek putovanja. Za takav problem slučajnog odabira (eng. *random walk problem*), teorija vjerojatnosti nudi ovisnost između standardne devijacije, σ_E , duljina svih putova kojima komponenta može zaobići prepreku uzdužne dimenzije l, te broja mogućih putova N:

$$\sigma_E = l \cdot \sqrt{N} \tag{12}$$



Slika 3. Teorija slučajnog hoda.

U pojednostavljenom dvodimenzionalnom prikazu (Slika 3) postoje dvije mogućnosti odabira puta (situacija A i B), što naravno nije slučaj kod realnih trodimenzionalnih sustava. Pretpostavit će se da su sve čestice punila sfernog oblika, identičnih dimenzija i idealno položene unutar kolone. Duljina prepreke na koju komponenta nailazi tada se može zamijeniti njenim promjerom, D_p, dok je broj prepreka po duljini kolone jednak omjeru duljine kolone L i promjera prepreke:

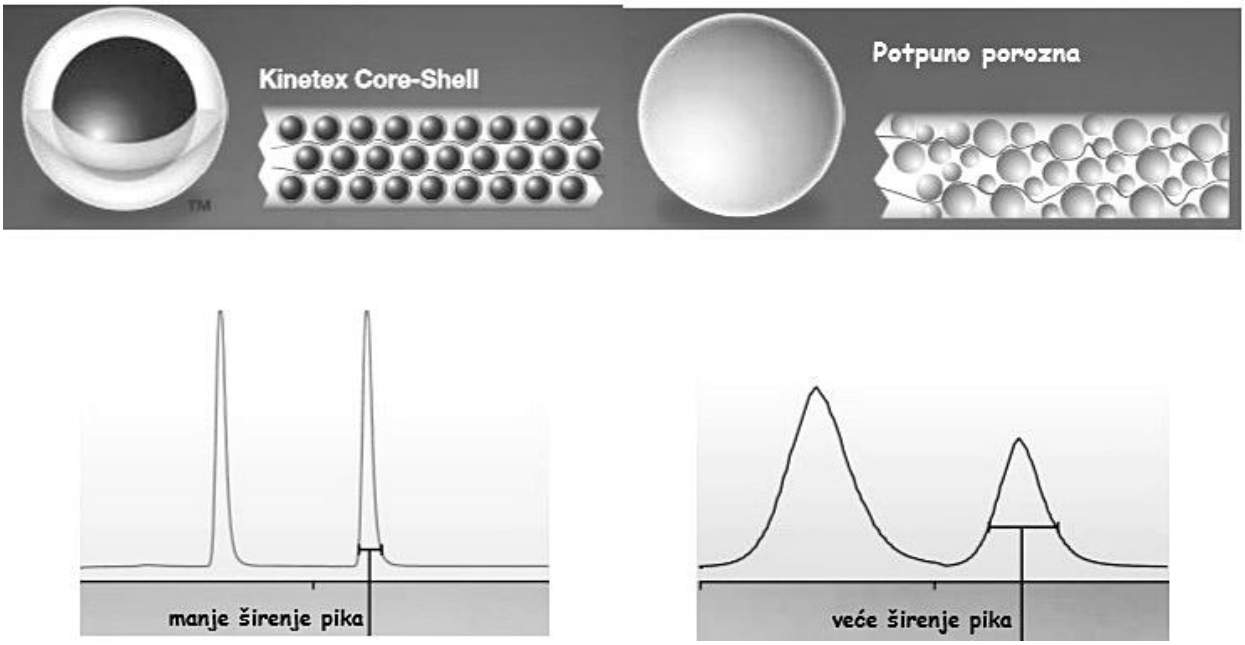
$$\sigma_E = D_p \cdot \sqrt{\frac{L}{D_p}} = \sqrt{L \cdot D_p} \tag{13}$$

Promatrajući izraz (13) uočava se da smanjenje promjera čestica utječe na smanjenje širenja kromatografske zone, čime nema utjecaj na ostale kromatografske veličine. Logično se

nameće ideja da se uporabom što sitnijeg punila minimizira efekt širenja zone. Međutim, time bi se povećao tlak unutar kolone. Veliki padovi tlaka unutar kolone mogu utjecati na veličine poput koeficijenta difuzije tvari, faktora zadržavanja i visine odsječka u koloni (Slika 4). stoga je potrebno uvažiti oba efekta i pronaći realno prihvatljivo rješenje. Slučaj idealno ispunjene kolone sa sferičnim česticama gotovo je nemoguće postići u realnosti. Stoga unutar stvarnih kolona, zbog neidealnosti ispune, postoje kanali različitih duljina i promjera. Prema opće poznatoj jednadžbi kontinuiteta[24] brzina protoka kapljevine, *v*, obrnuto je razmjerna promjeru, odnosno poprečnom presjeku kanala, A, kojim se kreće:

$$v \cdot A = \text{konst.} \tag{14}$$

Uvažavajući tu činjenicu jasno je da upravo neidealnosti u punjenju kolona moraju biti jedan od glavnih razloga širenju kromatografske zone.



Slika 4. Usporedba obične i Kinetex™ kolone.

Međutim, u ovom diplomskom radu korištene su Kinetex™ kolone koje zbog svoje visoke gustoće pakiranja čestica u koloni stvaraju optimalnu strukturu što smanjuje širenje pika i utjecaj *eddy*jeve difuzije. Time se također smanjuje vrijeme koje je potrebno molekuli da difundira u i iz čestice kolone.

2.6. UTJECAJ UZDUŽNE DIFUZIJE

Od trenutka unošenja u kromatografsku kolonu zona komponente dolazi pod utjecaj prirodnih difuzijskih procesa. Tijekom prolaska kroz kolonu otopljena komponenta simetrično će difundirati oko centralne mase tvari pri čemu dolazi do gubitka oštrine elucijske krivulje. Širenje zone pod utjecajem uzdužne difuzije može se izračunati na temelju Einsteinove jednadžbe:

$$\sigma_{\mathrm{L}}^2 = 2Dt_{\mathrm{R}} \tag{15}$$

Gdje D predstavlja difuzijski koeficijent tvari, a σ_L^2 varijancu uzdužne difuzije. U pokretnoj fazi komponenta putuje karakterističnom brzinom, pa se vrijeme potrebno da bi napustila kolonu duljine L može izraziti iz opće definicije brzine:

$$t_{\mathrm{R}} = \frac{L}{v_0} \tag{16}$$

Stoga se može pisati:

$$\sigma_{\mathrm{L}}^2 = 2D\frac{L}{v_0} \tag{17}$$

2.7. UTJECAJ OTPORA MEĐUFAZNOM PRIJENOSU

Način na koji brzina prijenosa tvari utječe na širenje, odnosno oblik kromatografske krivulje, nije tako posve očit kao što je slučaj kod prethodna dva efekta. Kao i u mnogim situacijama i ovdje pomaže usporedba vladanja idealnog i realnog sustava. Idealan slučaj bio bi onaj kod kojeg se ravnoteža uspostavlja u infinitezimalno kratkom periodu. Samim time i period izmjene komponenti u takvom slučaju infinitezimalno je kratak.

U realnim sustavima, uslijed inertnosti prijenosa tvari, komponente ipak za međufazni prijelaz utroše određeno vrijeme. Toliko dugo dok se komponente nalaze u koloni postoji njihova stalna preraspodjela između pokretne i nepokretne faze. Problem se može promatrati na sličan način kao i proces slučajnog odabira puta opisan tijekom objašnjenja utjecaja prethodnog fenomena. Put komponente promatra se kroz niz koraka za vrijeme kojih se odlučuje hoće li u slijedećem intervalu komponenta boraviti u pokretnoj ili nepokretnoj fazi. Brojnost takvih koraka ovisi o srednjem vremenu što ga komponenta provede u pojedinoj fazi; što je proces izmjene brži, veći je broj koraka za donošenje odluke.

Dolazak UPLC-a je donio je razvitak novih instrumentalnih sustava za tekuću kromatografiju koji mogu iskoristiti prednost separacijskih performansi (smanjujući mrtvi volumen) i koji mogu izdržati visoke tlakove (500 do 1000 bara u UPLC-u u usporedbi sa 150 do 400 bara u HPLC-u). Ako znamo da je efikasnost je proporcionalna duljini kolone i inverzno proporcionalna veličini čestica, jasno je da kolona može biti skraćena za isti faktor kao i veličina čestica punila bez gubitka rezolucije. Efikasnost je tri puta veća kod 1,7 μm čestica u usporedbi s 5,0 μm česticama i dva puta veća nego kada imamo 3,5 μm čestice punila. Ujedno, rezolucija je 70 % viša naspram 5,0 μm i 40 % viša naspram 3,5 μm čestica. Velika brzina separacije dobiva se jer se duljina kolone punjene 1,7 μm česticama može smanjiti za faktor 3, ili brzina protoka povećati za 3, a da efikasnost bude jednaka onoj kod kolona punjenih 5 μm česticama. Primjena UPLC-a rezultirala je detekcijom dodatnih metabolita lijekova, naprednijom separacijom i poboljšanom spektralnom kvalitetom[25, 26].

2.8. KEMIJA MALIH ČESTICA

„Obećanja“ Van Deemterove jednadžbe mogu biti ispunjena samo s manjim česticama nego što su one korištene u HPLC-u. Dizajn i razvoj čestica manjih od 2 μm bio je velik izazov za znanstvenike. Iako su efikasne neporozne 1,5 μm čestice komercijalno dostupne, one imaju loš kapacitet punjenja i slabo zadržavanje uslijed površine. Da bi se održalo zadržavanje i kapacitet sličan onom u HPLC-u, UPLC mora koristiti nove porozne čestice koje podnose visoke tlakove. Čestice bazirane na siliciju imaju dobru mehaničku jakost, ali i mnoge nedostatke poput limitiranog pH raspona i zadržavanja bazičnih analita. Polimerne kolone nemaju takva pH ograničenja, ali imaju druge probleme, kao što su niska efikasnost i ograničeni kapaciteti. 2000. godine predstavljena je nova, hibridna generacija, koja je uzela prednosti i silikatnih i polimernih kolona. Čestice su napravljene koristeći klasičnu sol-gel sintezu koja uključuje ugljik u obliku metilnih grupa te su takve kolone postale mehanički jake, visoko učinkovite te upotrebljive u širokom pH području. No da bi pružile onu poboljšanu mehaničku stabilnost koju zahtjeva UPLC, razvijena je druga generacija veznih etan hibrida (eng. *bridged ethane hybrid*, BEH) čime su čestice dobile poboljšanu mehaničku stabilnost povezujući metilne grupe u silikatnu matricu.

Pakiranje malih čestica u reproducibilnu i čvrstu kolonu je također bio izazov kojeg je trebalo svladati. Zahtjevi za te kolone su bili glatka unutrašnja površina i redizajn krajeva kako bi se zadržale male čestice i oduprlo začepljivanju kolone. Uniformnost pakiranja

također je trebala biti zadovoljena, posebno kod kraćih kolona koje moraju zadržati rezoluciju, a postižu brzu separaciju. Uz to, na visokim tlakovima, zagrijavanje zbog trenja mobilne faze može biti značajno i to se mora uzeti u obzir. Kod kolona tipično korištenih u HPLC-u (3,0 do 4,6 mm) zbog nejednolike temperature, nastale uslijed trenja, dolazi do gubitka djelotvornosti. Da bi se minimizirao utjecaj zagrijavanja zbog trenja u UPLC-u se koriste kolone manjih promjera 1,0-2,1 mm[26].

2.9. INJEKTIRANJE UZORKA

U UPLC-u je unošenje uzorka kritičnan dio analize. Konvencionalni injekcijski ventili, automatski ili ručni, nisu dizajnirani i očvrsnuti da rade na ekstremno visokim tlakovima kakve nalazimo kod UPLC-a. Da bi se kolona zaštitila od ekstremnih promjena tlaka, injektiranje mora biti izvršeno relativno brzo i bez pulsiranja. Za povećanje osjetljivosti potrebni su mali volumeni injektiranja s minimalnim prijenosom, a za biološke uzorke i direktno injektiranje. [26,27] .

2.10. UVOD U UPLC

U RP-LC mobilna faza je u kontaktu sa hidrofobnom površinom stacionarne faze i organsko otapalo se raspodjeljuje između mobilne i stacionarne faze[28]. Kao rezultat toga, sastav mobilne faze na dijelu uz granicu faza (pokretna/nepokretna) je drugačiji od onog u cjelokupnom volumenu. Prema tome teško je prepoznati radi li se o adsorpcijskoj ili razdjelnoj kromatografiji[29,30,31].

Razdjeljivanje je favorizirano kad je stacionarna faza dovoljno gusta da akumulira molekule otapala u svom volumenu. Razdjeljivanje u RP-LC sistemu se značajno razlikuje od onog u sistemu dvije nemješljive tekućine[28]. Molekule otapala se distribuiraju između mobilne i stacionarne faze te utječu na kromatografsko razdjeljivanje.

U mjerenjima razdjeljenja otapala između pokretne i nepokretne faze pojam „adsorpcija“ se često koristi. Adsorpcija je površinski proces koji se odvija na granici tekuće i čvrste faze. Molekule putuju iz pokretne faze prema nepokretnoj. Taj proces je kontroliran slobodnom energijom sorpcije. Međutim, neka svojstva stacionarne faze kao što su aktivna

površina i struktura nisu dovoljno poznati i ovise o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu mobilne faze.

Za najčešće korištena RP-LC otapala: acetonitril i metanol, poznato je da acetonitril ima veću snagu eluiranja od metanola, odnosno adsorpcija acetonitrila u RP sustavima je mnogo veća nego adsorpcija metanola. Pretpostavlja se da je adsorpcija acetonitrila višeslojna dok je adsorpcija metanola jednoslojna. U slučaju acetonitrila, hidrofobni efekt igra najvažniju ulogu, dok je slučaj metanola kompliciraniji zbog mogućnosti interakcija vodikovim vezama[33]. Adsorpcija organskog otapala i vode je konkurentan fenomen u binarnim vodeno organskim tekućim fazama. Jače otapalo se obično preferencijalno adsorbira na hidrofobnu površinu, osim u sistemima gdje je koncentracija slabijeg otapala (npr. voda u voda-metanol mobilnoj fazi) niska pa slabo otapalo može biti jako adsorbirano. To vidimo kao negativno područje eksces adsorpcijske izoterme organskog otapala iz vode.

Stacionarna faza, uz čvrsti nosač kao temelj, sadrži kombinaciju četiriju komponenti: vezanih liganada, rezidualnih silanola, adsorbiranih molekula vode i organskog otapala [32,33]. U gusto vezanim stacionarnim fazama, rezidualni silanoli koji nisu vezani sa silanima, njih oko 5 %, ponašaju se kao jaki polarni adsorpcijski centri [34].

Pomoću metode malih poremećaja proučavana su različita svojstva efekata površinske adsorpcije u tekućinskoj kromatografiji, na primjer dužina vezanih liganada, pokrivenost površine i specijalne polarne skupine u strukturi liganada.

Kad je vodeno-organska tekuća faza u kontaktu sa stacionarnom fazom na kojoj su vezane alkilne skupine, molekule organskog otapala se preferencijalno adsorbiraju na ligande s površine stacionarne faze hidrofobnim interakcijama. Voda može biti vezana na rezidualne silanole formacijom vodikovih veza.[35,36,37].Razlike u adsorpciji otapala koje mogu biti mjerene eksces izotermama mogu pokazivati svojstva stacionarne faze; na primjer hidrofobna svojstva materijala pakiranja (pokrivenost površine vezanog liganda) i njegova polarna svojstva (količina dostupnih silanola i homogenost pokrivenosti vezanih liganada iz preferencijalne adsorpcije vode).

2.11. PREGLED PRIMJENE UPLC-A

Primjena UPLC-a danas postaje sve zastupljeniji segment u raznim područjima istraživanja.

2.11.1. Analiza aminokiselina

UPLC se koristi za točnu, pouzdanu i reproducibilnu analizu aminokiselina u području karakterizacije proteina, nadziranja staničnih kultura i analize nutritivnih vrijednosti hrane.

2.11.2. Analiza lijekova

Glavna svrha analiza uzoraka lijekova je dobivanje informacija o kompleksnosti matrice i varijabilnosti uzorka. Da bi se odredili kandidati lijekova i karakterizirala efikasnost novih lijekova koriste se metode kvalitativne i kvantitativne kromatografije te masene spektroskopije. UPLC zbog svojih karakteristika separacije i detekcije može analizirati visokokompleksne uzorke prirodnog porijekla.

2.11.3. Identifikacija metabolita

Biotransformacija novih kemijskih spojeva (eng. *new chemical entity*) je bitna za otkrivanje novih lijekova. Kad komponenta dosegne određenu fazu razvoja, identifikacija metabolita postaje regulirani proces. Od velike je važnosti za laboratorij da uspješno identificira i detektira sve cirkulirajuće metabolite supstance koja je kandidat za lijek. Te se studije općenito rade *in vitro* kako bi se identificirali glavni metaboliti tako da se slabe točke tih molekula mogu prepoznati i zaštititi mijenjajući strukturu spoja [38].

2.11.4. Proučavanje metabolita

Proučavanja metabolita se rade u laboratorijima kako bi se ubrzao razvoj novih lijekova. Mogućnost usporedbe velikih grupa uzoraka daje uvid u biokemijske promjene koje se događaju kada je biološki sistem izložen novoj kemijskoj komponenti. Metaboliti daju brzu i otpornu metodu za detektiranje tih promjena, poboljšavaju razumijevanje potencijalne toksičnosti i dopuštaju nadgledanje efikasnosti. Zhao i suradnici proučavali su kronično zatajivanje bubrega gledajući metaboličke produkte uzoraka urina da bi našli potencijalne biomarkere bolesti i istražili patologiju kroničnog zatajivanja bubrega.[39].

2.11.5. Testiranje otapala

Za kontrolu kvalitete u razvijanju lijekova, testiranje otapala je ključno u formulaciji, razvijanju i procesu proizvodnje. U formulacijama lijeka sa produljenim oslobađanjem,

testiranje lijeka je osobito važno jer otapanje može biti limitirajući korak u dostavi lijeka. Profil otapanja se koristi da bi se demonstrirala pouzdanost i uniformnost aktivnog sastojka od serije do serije, a nove formulacija zahtijevaju i povećanu analitičku osjetljivost.

2.11.6. Proučavanja prisiljene razgradnje

Jedan od najvažnijih faktora koji utječe na kvalitetu i stabilnost farmaceutika je kemijska stabilnost. Potrebno je znati kako se kvaliteta aktivnog farmaceutskog sastojka ili produkta lijeka mijenja s vremenom pod utjecajem faktora okoliša kao što su toplina, svjetlo, tlak, vlaga ili vlažnost. Poznavanje tih karakteristika stabilnosti definira uvjete skladištenja i dugotrajnost na policama, odabir prave formulacije i zaštitnog pakiranja i potrebno je za svu regulatornu dokumentaciju. Prisiljena razgradnja ili testiranje na napor se provodi pod još težim uvjetima nego ono korišteno za ubrzano testiranje stabilnosti. Jedan od primjera korištenja UHPLC sa Q-TOF-MS/MS je kod prisilne razgradnje fingolimoda, imunomodulatorskog lijeka koji se koristi za liječenje multiple skleroze i koji je bio podvrgnut hidrolizi (kiseloj, bazičnoj i neutralnoj), oksidaciji, fotolizi i termičkom naprezanju. Radila se kromatografska separacija lijeka i njegovih produkata te su svi produkti raspada identificirani i karakterizirani [40].

2.11.7. Proizvodnja/osiguranje kvalitete

Identitet, kvaliteta, sigurnost i efikasnost su važni faktori koji se uzimaju obzir pri stvaranju lijeka. Uspješna proizvodnja kvalitetnog farmaceutskog proizvoda zahtjeva da sirovi materijali zadovoljavaju zahtjeve čistoće kako bi proces proizvodnje tekao bez problema i tako finalni farmaceutski proizvod zadovoljava ili nadmašuje dane specifikacije. Kontinuirano nadgledanje stabiliteta materijala također je komponenta za osiguranje kvalitete i kontrolu. UPLC se koristi za nadzirane kvantitativne analize koje se izvode u laboratorijima za osiguranje kvalitete i kontrolu[41].

2.11.8. Razvijanje metode/validacija

Prema FDA (eng. *Food and Drug Administration*), validacija se definira kao uspostavljanje dokumentiranog dokaza koji pruža visoki stupanj uvjerenja da će određeni proces konzistentno stvarati proizvod koji zadovoljava sve određene specifikacije i značajke

kvalitete. Razvijanje metode i validacija je proces koji oduzima mnogo vremena: laboratorij mora procijeniti višestruke kombinacije mobilne faze, pH, temperature, kemija kolona i gradijentnih profila da bi došao do otporne, pouzdane separacije za svaku aktivnost. UPLC pomaže u kritičnim laboratorijskim funkcijama povećavajući efikasnost, smanjujući troškove i poboljšavajući poslovne mogućnosti.

2.11.9. Određivanje nečistoća

Testiranje je važni dio za razvoj lijekova i proces formulacije, profiliranja, detektiranja i kvantificiranja supstancija lijekova i njihovih nečistoća u sirovim materijalima i finalnim proizvodima. Određivanje nečistoća zahtjeva kromatografiju visoke rezolucije sposobnu da pouzdano i reproducibilno razdvaja i detektira sve poznate nečistoće aktivnog spoja. Također je kritična sposobnost da se točno mjere nečistoće niske razine u isto vrijeme kad i visoke koncentracije aktivnog farmaceutskog spoja. UPLC sistemi i kolone specifično se odnose na zahtjeve za visokoprotočnu analizu dok zadržavaju visoku rezoluciju pika. UPLC također uključuje novije algoritme za detekciju pika i prilagođene kalkulacije da se optimizira procesuiranje podataka i izvještavanje. Također pouzdano detektira nečistoće u spojevima i u razini tragova.

Kako bi se pokazao dominantni mehanizam međufazne raspodjele otapala, adsorpcija metanola i acetonitrila je bila mjerena za binarne vodeno-organske mobilne faze.

Eksces adsorpcijske izoterme organskih otapala iz vodenih otopina mogu biti mjerene eksperimentalno kao razlika između količine komponente koja bi bila prisutna u hipotetskom sustavu bez utjecaja površine i količina komponente u sistemu sa utjecajem površine. Wang sa suradnicima[42] te Riedo i Kovats[43] opisali su kromatografski proces na temelju teorije adsorpcije[44]. Volumen zadržavanja tvari koja prolazi kroz kolonu rezultat je brzine protoka mase i prijenosa mase između tekuće faze i površine stacionarne faze. Jednadžba protoka omogućava da se zadržavanje kombinira s adsorpcijom. Za binarne smjese univerzalna jednadžba bilance mase se može analitički riješiti.[45]

Eksces izoterma za organski modifikator adsorbiran iz vodene otopine po jedinici površine stacionarne faze može se izračunati upotrebom jednadžbe:[46]

$$\Gamma(c) = \frac{1}{S}\int_0^c \left(V_{\mathrm{R}}(c) - V_{\mathrm{M}}\right) dc \qquad (18)$$

gdje je V_R volumen zadržavanja pika nastalog kao posljedica injektiranja (u daljnjem tekstu *perturbacijskog pika*), a V_M je tzv. *void* volumen, odnosno prazni volumen kolone (volumen kojeg zauzima pokretna faza između čestica u punjenom dijelu kolone). Slovom S označeno je ukupna površina adsorbensa u koloni, a Γ je eksces adsorpcijska izoterma analita pri množinskoj koncentraciji, c. Prazni volumen kolone se dobiva integriranjem vremena zadržavanja perturbacijskih pikova (od 0 do 100 % organskog otapala)[35]:

$$V_M = \frac{1}{c_{max}} \int_0^{c_{max}} V_R(c)\, dc \tag{19}$$

Maksimalnu koncentracija adsorbiranog organskog otapala (c_{ads} [mol m^{-2}]) možemo izračunati ekstrapolacijom nagiba eksces izoterme u linearnom području prema y-osi, ili ju možemo računati kao sjecište ravne linije u odnosu na linearno područje eksces izoterme.

Debljina adsorbiranog sloja (τ [Å]) može se izračunati upotrebom slijedeće jednadžbe:

$$V_{ads} = S \cdot c_{ads} \cdot \upsilon = S \cdot \tau \tag{20}$$

gdje je υ molarni volumen adsorbirane komponente (L mol^{-1}) i V_{ads} volumen adsorbiranog otapala.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

U mjerenjima smo koristili dvije različite mobilne faze: metanol-voda i acetonitril-voda. Metanol i acetonitril visoke čistoće (> 99,9 %) nabavljeni su od tvrtke Baker Chemicals, B.V., Deventer Nizozemska. Ultračista voda dobivena je koristeći Milli-Q sustav (Millipore, El Passo, Teksas, SAD).

3.2. APARATURA

Tekući kromatograf Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan, slika 5) serije Nexera opremljen jedinicom dopreme otapala LC-30 AD, automatskim uzorkivačem SIL 30 AC s 5 µL petljom za injektiranje i mogućnošću mijenjanja volumena injektiranja do minimalno 0,1 µL; termostatiranim kućištem za kolonu Prominence CTO-20 AC (Slika 5.). Temperatura se može regulirati u širokom rasponu, od 10 do 85 °C, a s ciljem postizanja povećane obnovljivosti i separaciju. Kao detektor korišten je detektor indeksa loma Prominence RID-20A (također Shimadzu). Podaci su prikupljani računalno pomoću programa LabSolutions (Shimadzu).

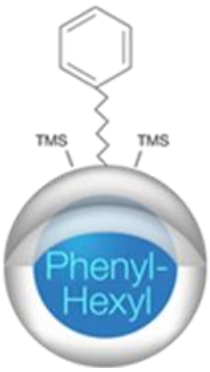
Slika 5. UPLC sustav Nexera

Za eksperiment korišteno je pet kolona različitih fizikalno kemijskih svojstva i različitih funkcionalnih skupina stacionarne faze (Tablica 1). Kod svih korištenih kolona kao završetak za blokiranje rezidualnih silanola (eng. *endcapping*) koristi se tetrametilsilan (TMS), promjer kolona je 2,10 mm, veličina čestica 1,7 µm, veličina pora 100 Å, a efektivna površina 200 m2/g. Sve kolone su komercijalno dostupne i koriste se za UPLC mjerenja jer je zbog male veličine čestica na kolonu potrebno primijeniti visoki tlak (veći od 100 bara). Proizvođač je tvrtka Phenomenex® Inc, Torrance, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države.

Tablica 1. Korištene UPLC kolone.

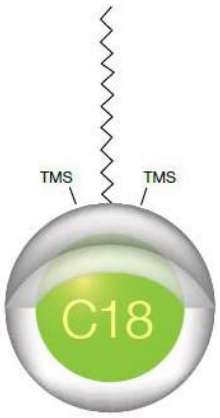
Naziv kolone	Aktivna skupina stacionarne faze	Duljina (mm)	pH područje rada
Kinetex™ Phenyl-Hexyl	fenil-heksil	100	1.5-8.5
Kinetex™ C18	C18	100	1.5-8.5
Kinetex™ XB-C18	C18 s izobutil bočnim lancima	100	1.5-8.5
Kinetex™ PFP	pentafluorofenil	100	1.5-8.5
Kinetex™ Biphenyl	bifenil	150	1.5-8.5

Fenil heksil kolona ima umjereno hidrofobnu nepokretnu fazu selektivnu prema aromatskim ugljikovodicima[47].



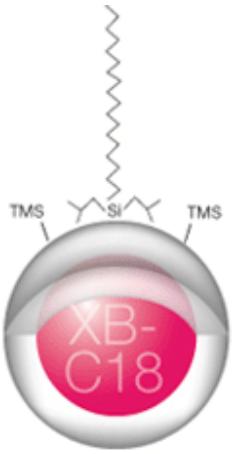
Slika 6. Kinetex™ Phenyl-Hexyl nepokretna faza.

C18 kolona za visoko efikasne separacije postiže selektivnost preko steričkih, vodikovih i kationskih interakcija. Najčešće se koristi za separaciju hidrofobnih spojeva[47,48].



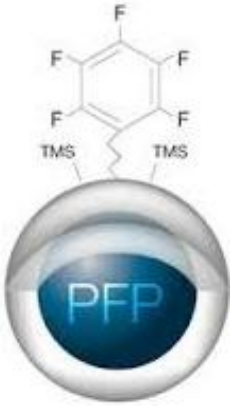
Slika 7. Kinetex™ C18 nepokretna faza.

XB C18 kolona različita je od C18 po tome što ima dva izobutilna lanca sa svake strane. Ima nisku gustoću liganada i neaktivnu površinu što ju čini dobrim akceptorom vodika. XB C18 kolonu karakterizira bolji oblik pika bazičnih spojeve te jače zadržavanje kiselina.



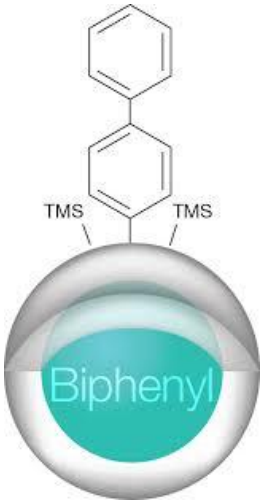
Slika 8. Kinetex™ XB-C18 nepokretna faza.

PFP kolona pruža visok stupanj steričke selektivnosti te je time pogodna za odvajanje strukturnih izomera. Elektronegativne fluoridne skupine pokazuju visoku selektivnost prema kationskim spojevima u lužnatom području, a uglavnom se koriste za separaciju aromatskih i halogeniranih spojeva.



Slika 9. Kinetex™ PFP nepokretna faza.

Bifenil kolona daje povećanu separaciju nepolarnih i polarnih spojeva, a iznimno je popularna u analizi lijekova.



Slika 10. Kinetex™ Biphenyl nepokretna faza.

3.3. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

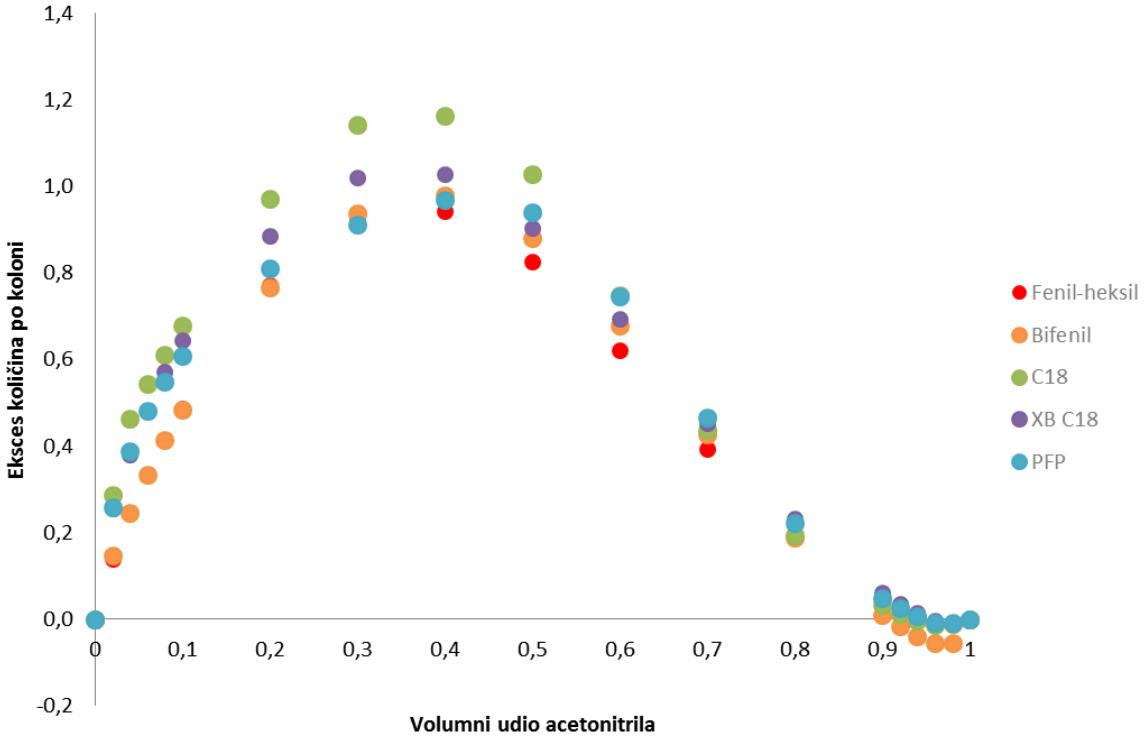
Proučavane su eksces adsorpcijske izoterme organskih otapala i vode na kemijski vezanim stacionarnim fazama koristeći pet prethodno navedenih kromatografskih kolona (poglavlje 3.2). Izoterme su mjerene koristeći metodu manjih poremećaja (perturbacijska metoda). Svaka kolona uravnoteživana je s mobilnim fazama različitih udjela organskog otapala u vodi (100, 98, 96, 94, 92, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 8, 6, 4, 2 i 0 %). Vrijeme uravnoteženja trajalo je najmanje 10 minuta. Mali poremećaj u uravnoteženom sustavu ostvarivan je injektiranjem do 5 μL čistog otapala (voda, acetonitril ili metanol), a svako mjerenje ponavljano je tri puta. Time je u konačnici ostvarena brojka od 1140 injektiranja.

Nakon svakog injektiranja, mjereno je vrijeme zadržavanja perturbacijskog pika. Protok mobilne faze pri svim mjerenjima bio je 0,25 mL min^{-1}. Sva mjerenja su izvedena na temperaturi od 30 °C, osim naravno u situaciji kada se mjerio utjecaj temperature na volumen zadržavanja.

Utjecaj temperature na volumen zadržavanja ispitan je za sustav acetonitril-voda na fenil-heksil koloni. Pri tome su korišteni svi prethodno navedeni udjeli organskog otapala, a temperatura kolone iznosila je 10, 20, 30, 40 i 50 °C.

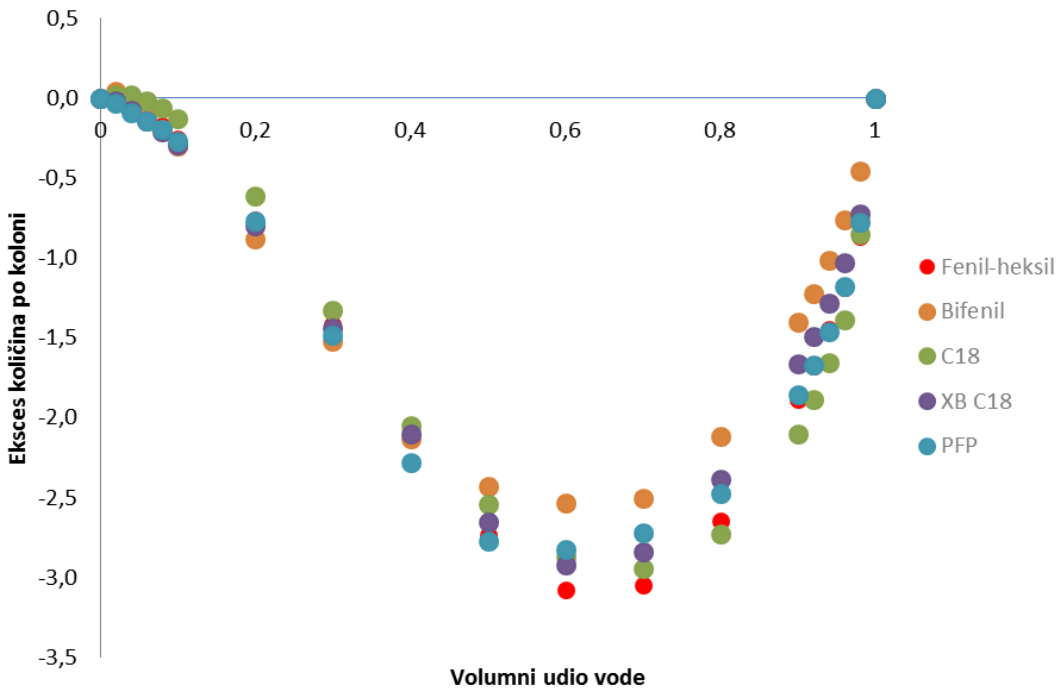
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ADSORPCIJA ACETONITRILA



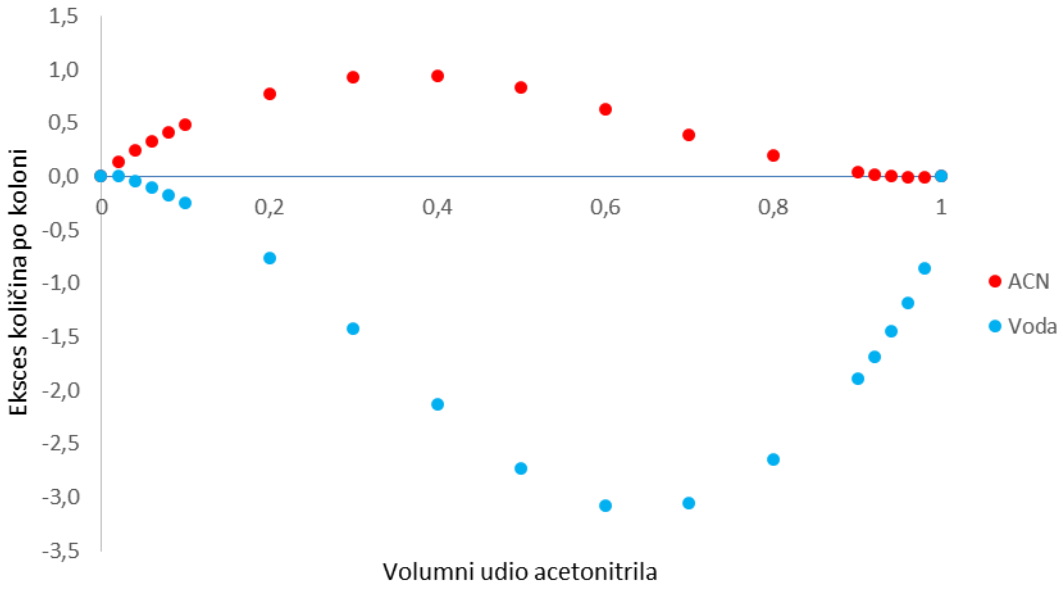
Slika 11. Eksces izoterme acetonitrila na Kinetex™ kolonama

Slika 11 pokazuje izračunate eksces izoterme acetonitrila na promatranim Kinetex™ kolonama, a slika 12 izoterme za vodu. Na slici je uočljiv podjednak oblik krivulja za sve testirane stacionarne faze. Svaka od izotermi ima mali negativni dio za visoku koncentraciju acetonitrila u mobilnoj fazi. To ponašanje je uzrokovano adsorpcijom vode na stacionarnu fazu. Unatoč blokiranju rezidualnih silanola (*endcapping*) u stacionarnoj fazi preostaje manji dio rezidualnih silanola. Acetonitril zbog svoje veličine ne može reagirati (međudjelovati) s njima pa se zato na njih lakše vežu molekule vode. Količina adsorbiranih molekula vode je vrlo mala. Adsorpcija vode na rezidualne silanole se povećava sa smanjivanjem količine molekula vode u mobilnoj fazi. Kada je koncentracija vode u mobilnoj fazi niža od 20%, voda može stvoriti višestruke adsorpcijske slojeve na rezidualnim silanolima; na slici 8 vidimo da je negativni dio adsorpcije vode i do 3 puta veći od adsorpcije acetonitrila.



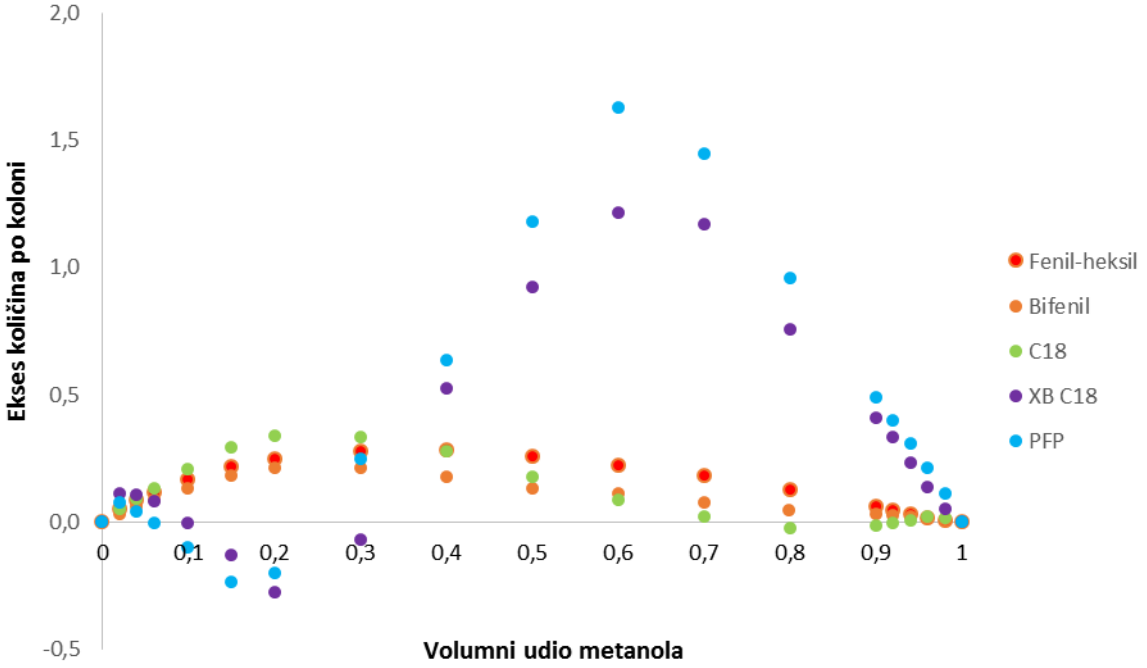
Slika 12. Eksces izoterme vode na Kinetex ™ kolonama

Na slici 12 slici se uočava veliki negativni dio za adsorpciju vode u sustavu mobilne faze acetonitril – voda što ukazuje na to da ne dolazi do adsorpcije vode, osim pri malom udjelu vode u mobilnoj fazi gdje se vidi pozitivni dio, a što se slaže s opažanjima prethodno navedenim kod acetonitrila.



Slika 13. Usporedba eksces izotermi za acetonitril i vodu na Kinetex™ Phenyl-Hexyl koloni

4.2. ADSORPCIJA METANOLA

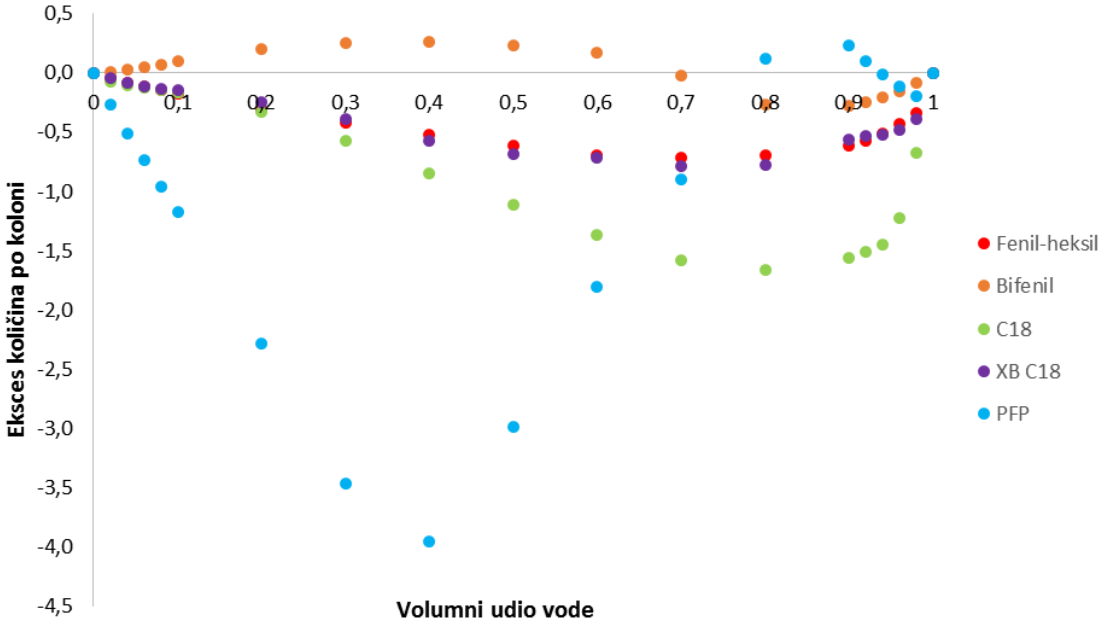


Slika 14. Eksces izoterme metanola na Kinetex™ kolonama

Na slici 14 prikazane su eksces izoterme za metanol izračunate za 5 ispitivanih Kinetex™ stacionarnih faza. Eksces izoterme za kolone C18, fenil-heksil i bifenil imaju sličan tip krivulje dok eksces izoterme za kolone XB C18 i PFP- pentafluorofenil imaju drugi tip krivulje sa negativnim dijelom. Prema tome možemo zaključiti da kod stacionarnih faza XB C18 i PFP dolazi do adsorpcije vode na stacionarnu fazu pri manjim volumnim udjelima metanola (manji od 20%). Nadalje, adsorpcija metanola za dvije navedene stacionarne faze je oko 2,5 do 3 puta veća nego za ostale tri kolone, a najveća je za volumni udio metanola u mobilnoj fazi od 60% za PFP (pentafluorofenil).

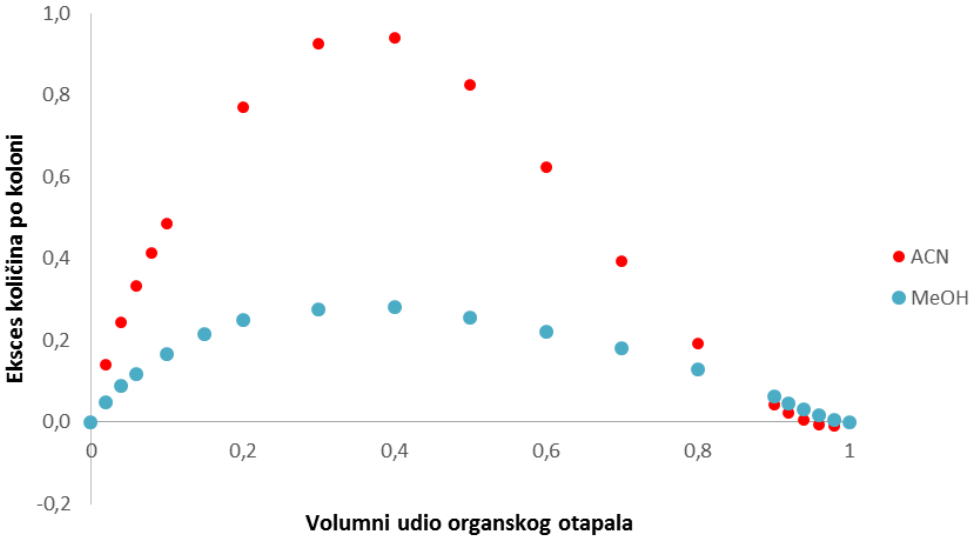
Za kolone C18, fenil-heksil i bifenil možemo sa sigurnošću reći da je preferencijalni tip adsorpcije hidrofobni[29]. Voda se u ovom slučaju može adsorbirati na rezidualne silanole i ostale polarne grupe ako su prisutne u stacionarnoj fazi. Vodikove veze se također mogu formirati između vode i molekula metanola. Taj proces je energetski favoriziraniji nego izolacija molekula u hidrofobnom području. Prema karakterizaciji i funkcionalnim skupinama u sastavu stacionarne faze, XB C18 kolona ima veliku sposobnost formiranja vodikovih veza što može ukazivati na povećanu adsorpciju vode u koloni. PFP kolona karakterizira velika kationska selektivnost i na manjim i na većim pH.

Također, razlika kod mjerenja adsorpcijskih eksces izotermi za sustave ACN- voda i MEOH-voda je što su tlakovi za mobilnu fazu MeOH-voda bili dvostruko veći zbog viskoznosti metanola. U velikoj mjeri to utječe na izgled krivulja u odnosu na krivulje za mobilnu fazu acetonitril-voda.



Slika 15. Eksces izoterma vode za sustav metanol- voda na Kinetex™ kolonama

4.3. USPOREDBA ADSORPCIJE ORGANSKIH OTAPALA



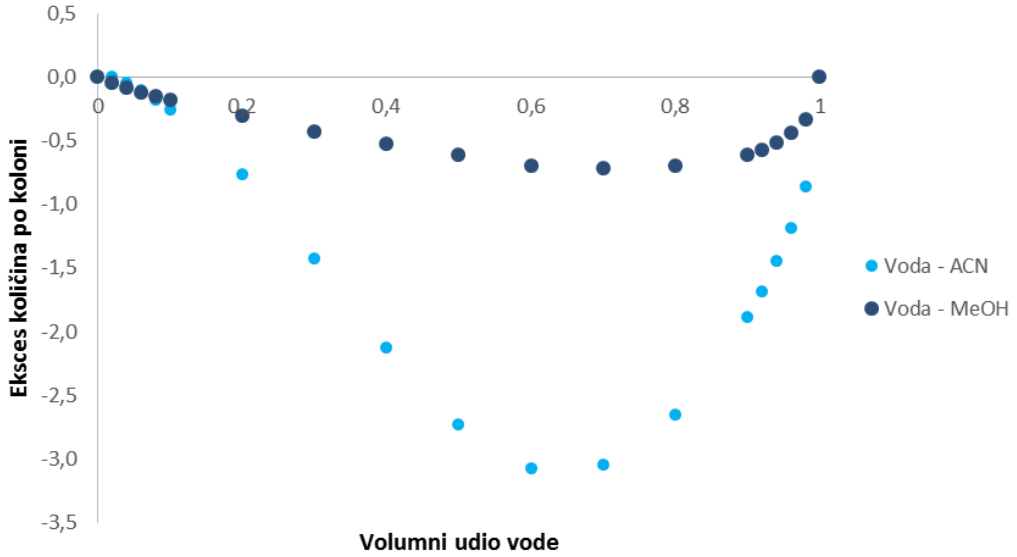
Slika 16. Usporedba eksces izotermi za ACN i MeOH na koloni Phenyl-Hexyl

U ovom poglavlju uspoređeni su rezultati adsorpcije dvaju korištenih organskih otapala. Usporedba je provedena na rezultatima dobivenim za Phenyl-Hexyl Kinetex™ stacionarnu fazu (slika 16).

Prema slici oblici eksces izoterme za metanol i acetonitril su različiti. Poznato je da je adsorpcija acetonitrila na hidrofobnim stacionarnim fazama mnogo jača nego adsorpcija metanola[46], što je i rezultiralo većim nagibom izoterme acetonitrila u linearnom području.

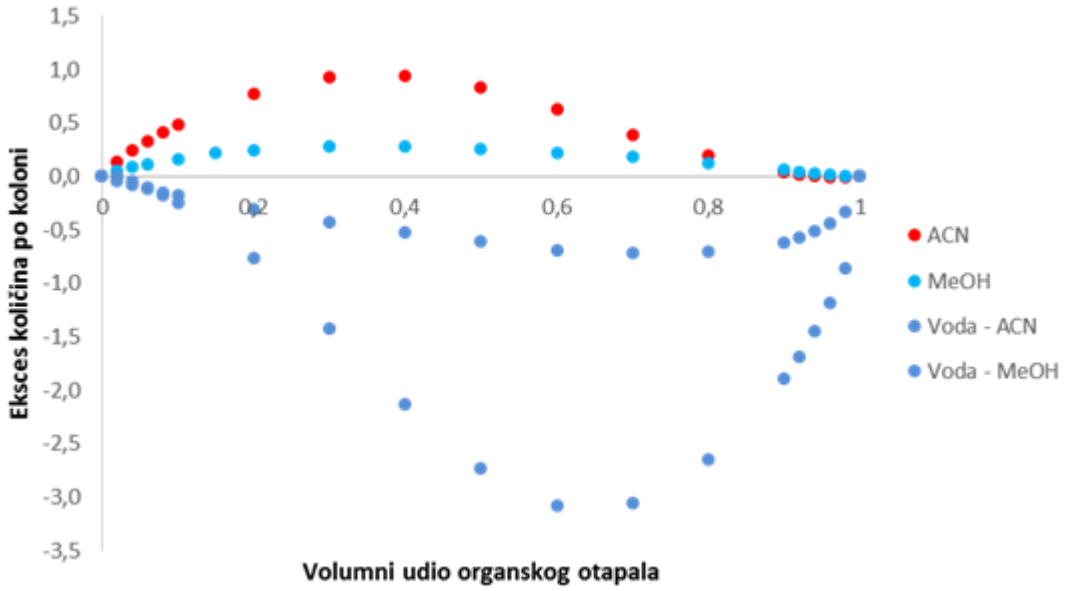
Položaj maksimuma eksces izoterme za acetonitril je pomaknut prema višim koncentracijama organskog otapala nego u slučaju metanola. Razlika u adsorpciji metanola i acetonitrila ovisi o kemijskim svojstvima tih otapala. Acetonitril snažno reagira sa hidrofobnim organskim ligandima zbog svoje više hidrofobnosti. Njegova interakcija sa silanolnim grupama je slaba jer acetonitril ne može stvoriti vodikove veze. Međutim, može reagirati sa silanolima pomoću dipolarnih interakcija. Metanol može reagirati sa oba adsorpcijska centra, nepolarnim organskim ligandima i polarnim silanolima. Metanol je protonsko otapalo koje može stvoriti vodikove veze sa vodom i silanolnim grupama prisutnima na silicijskom nosaču. Unatoč niskom dipolnom momentu metanola, energija hidratacije metanola je skoro dva puta veća zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza.

Usporedbom eksces izotermi za metanol i acetonitril možemo vidjeti da je adsorpcija acetonitrila oko tri puta veća od adsorpcije metanola što ukazuje na stvaranje multisloja adsorpcije acetonitrila na stacionarnoj fazi.



Slika 17. Usporedba eksces izotermi za vodu u sustavu otapala voda -ACN i voda-MeOH na Kinetex™ koloni Phenyl Hexyl

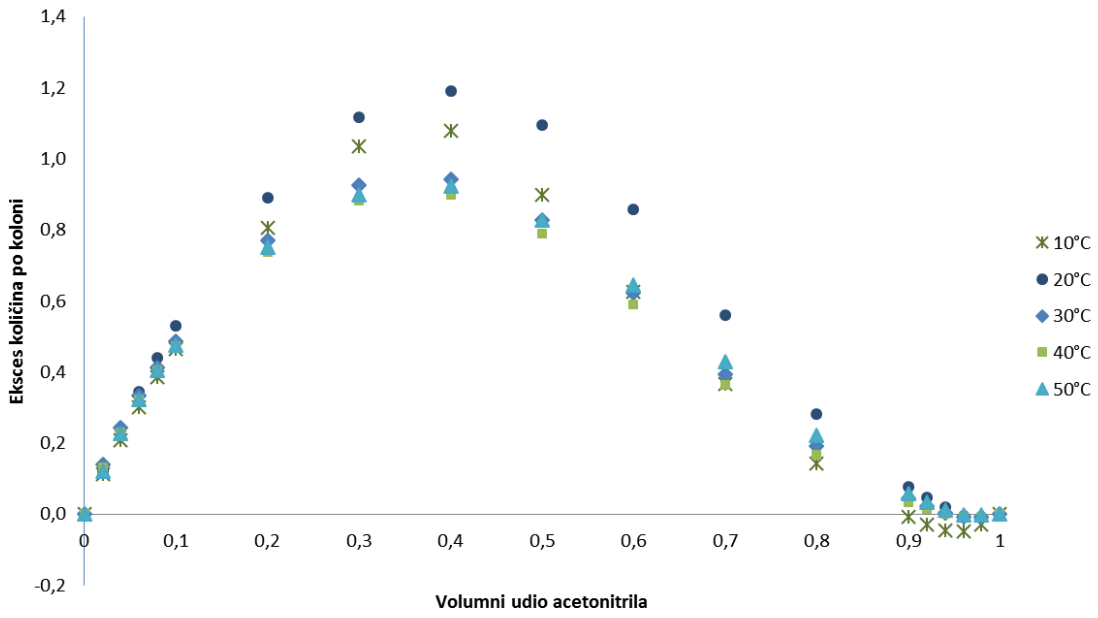
Na slici 17 prikazane su eksces izoterme za vodu u oba sustava otapala te se vidi da je negativni dio eksces količine adsorpcije vode za sustav otapala voda-ACN približno 5 puta veći od onoga za sutav otapala voda-MeOH što upućuje na to da je adsorpcija vode mnogo manja za sustav otapala voda-ACN. Mali pozitivni dio eksces izoterme vidljiv je samo pri malom volumnom udjelu vode što se slaže sa ranijim zaključcima.



Slika 18. Usporedba eksces izotermi za sustav otapala ACN–voda i MeOH–voda na Kinetex™ koloni Phenyl-Hexyl

4.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA ADSORPCIJU

Dva različita utjecaja mogu uzrokovati smanjenje količine adsorbiranog otapala sa porastom temperature. Prvo, ako je adsorpcijski proces egzotermalan, adsorpcija otapala se smanjuje s povećanjem temperature prema van´t Hoffovoj jednadžbi[50,51]. Drugo, povećanje temperature utječe na geometrijske parametre stacionarne faze. Kako je bilo zaključeno u dosadašnjim radovima, mrtvi volumen kolone se smanjuje s povećanjem temperature[52,53]. To je uzrokovano konformacijskim promjenama vezanih liganada. Kao rezultat toga površinsko područje stacionarna faza – mobilna faza koje je dostupno za molekule otapala se također smanjuje i to može uzrokovati smanjenje količine adsorbiranog otapala.



Slika 19. Eksces izoterme za sustav otapala acetonitril – voda u rasponu temperatura od 10°C do 50°C na Kinetex™ koloni Phenyl Hexyl

5. ZAKLJUČAK

Proučavanjem grafova dobivenih eksces izotermi za pojedini sustav otapala i njihovim usporedbama možemo doći do sljedećih zaključaka.

Sve eksces izoterme za adsorpciju acetonitrila i vode u sustavu ACN-voda imaju podjednaki oblik. Najveća eksces količina po koloni za acetonitril u tom sustavu je za kolonu C18, dok je najmanja za fenil-heksil i to pri volumnom udjelu acetonitrila od 40%. Najveći negativni dio adsorpcije vode u istom sustavu je također za fenil-heksil kolonu dok je najmanji za kolonu s bifenil funkcionalnom skupinom. Usporedbe su dane na koloni fenil-heksil jer nam je ona pružila najbolje rezultate zahvaljujući svojoj funkcionalnoj skupini.

Kod adsorpcije metanola vidimo veća odstupanja, eksces adsorpcijske izoterme za kolone sa funkcionalnim skupinama pentafluorofenil i XB C18 daju jednu vrstu krivulje, dok C18, bifenil i fenil-heksil pokazuju drugačiju vrstu krivulje. Pri PFP i XB C18 kolonama maksimum adosrpcije pomaknut je prema većim volumnim udjelima metanola, većim od 60%, to možemo pripisati velikoj mogućnosti interakcije putem vodikovih veza za te kolone. Za kolone s ostalim funkcionalnim skupinama (C18, bifenil i fenil-heksil) maksimumi adsorpcije su pri 20% volumnog udjela metanola.

Također, povećanjem temperature kolone dolazi do smanjenja adsorpcije pa se može reći da je idealna temperatura za analitička istraživanja od 20 do 30 °C (sobna temperatura).

Usporedbom eksces adsorpcijskih izotermi za sustave ACN-voda i MeOH-voda vidimo da je adsorpcija acetonitrila veća za sve korištene kolone i može se reći da je sustav ACN-voda općenito pogodniji za sve korištene kolone u analitičkim istraživanjima.

6. LITERATURA

1. L.S. Ettre, Pure & Appl. Chem. 65 (1993) 819–872.
2. Š. Cerjan–Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993 i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
3. R. Khun, A. Winterstein, E. Lederer, Z. Physiol. Chem. 197 (1931) 141–158.
4. L. Zechmeister, L. Cholnoty, Die Chromatographische Adsporptions Method, 2. izd., Springer, Vienna, 1938.
5. A. Tiselius, Arkiv. Kemi. Mineral Geol. 14B (1940) 22.
6. S. Claesson, Kemi. Mineral Geol. 23A (1946) 1.
7. A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, Biochem J. 35 (1941) 91–121.
8. J.J. Kirkland, J. Chromatogr Sci. 9 (1971) 206–214.
9. C. Zhu, D.M. Goodall, S.A.C. Wren, LCGC 23 (2005) 54–72.
10. M.E. Swartz, UPLC: An introduction and review, J. Liq.Chromatogr. R. T. 28 (2005) 1253–1263.
11. J.P. Martin, R.L.M. Synge: Biochem. J. 35 (1941) 1358–1368.
12. H. Small: Ion Chromatography, Plenum Press, New York, 1989.
13. I.N. Bronshtein, K.A. Semendayayev, G. Musiol, H. Muehlig: Handbook of Mathematics, 5. izd., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2007.
14. L. Lapidus, N.R. Amundson, J. Phys. Chem. 56 (1952) 984–988.
15. J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271–289.
16. A. Klinkenberg, Ind. Eng. Chem. 46 (1954) 2285–2289.
17. B.H. Ketelle, G.E. Boyd, J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 2800–2812.
18. G.E. Boyd, A.W. Adamson, L.S. Myers (Jr.), J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 2849–2859.
19. K. Ogan, R.P.W. Scott, J. High Res. Chromatogr. (1984) 382–388.
20. J.C. Giddings, H. Eyring, J. Phys. Chem. 59 (1955) 416–421.
21. J.C. Giddings, J. Chem. Phys. 26 (1957) 169–173.
22. J. Cazes, R.P.W. Scott, Chromatography theory, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
23. C.F. Poole: The Essence of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
24. M. Iguchi, O.J. Ilegbusi, Basic Transport Phenomena in Materials Engineering, Springer, Tokyo, 2014

25. K.N. Patel i suradnici: A Review: Ultra Performance Liquid Chromatography; International journal of biomedical research and analysis vol. 1 (2010), 1-4.
26. M.E. Swartz, Ultra performance liquid chromatography: Tomorrow's HPLC technology today, Lab Plus Int.18 (2004) 6-9
27. D.A. McLoughlin, T.V. Olah, J.D. Gilbert: J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1893-1901.
28. M. Jaroniec, J. Chromatogr A 656 (1993) 37–50.
29. Y.V. Kazakevich, J. Chromatogr A 1126 (2006) 519–525.
30. S. Bocian, A. Felinger, B. Buszewski, Chromatographia 68 (2008) 19-26.
31. M. Jaroniec, J. Chromatogr A 722 (1996) 19-24 .
32. A.Sandi, L. Szepesy, J. Chromatogr A 845 (1999) 113-131.
33. F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr A 1075 (2005) 117-126.
34. J. Navrocki, J. Chromatogr A 779 (1997) 29-71.
35. Y. V. Kazakevich, H. M. McNair, J Chromatogr Sci 33 (1995) 321-327.
36. F. Gritti, Y. V. Kazakevich, G. Guiochon, J Chromatogr A 908 (2007) 111-124.
37. B. Buszewski, K. Krupzynska, R. M. Gadzala – Kopciuch, G. Rychlicki, R. Kaliszan, J Sep Sci 26 (2003) 313-321.
38. Y.N. Tang,Y.X. Pang, X.C. He, Y.Z. Zhang, J.Y. Zhang, Z.Z. Zhao,T. Yi, H.B. Chen, UPLC-QTOF-MS identification of metabolites in rat biosamples after oral administration of Dioscorea saponins: a comparative study, J. Ethnopharmacol. May 2015, 44-60.
39. Y.Y. Zhao, J. Liu, X.L. Cheng, X. Bai, R.C. Lin, Urinary metabonomics study on biochemical changes in experimental model of chronic renal failure by adenine based on UPLC-Q-TOF/MS, Clinica Chimica, 2012, (642-649)
40. V.K. Marothu, A. Nellutla, M. Gorrepati, S. Majeti, S.K. Mamidala, Forced degradation studies, and effects of surfactants and titanium dioxide on the photostability of paliperidone by HPLC, Annales Pharmaceutiques Francais, July 2015, 289-296.
41. T.Kupiec, Quality Control Analytical Methods: High Performance Liquid Chromatography, International Journal of Pharmaceutical Compounding, May/June 2004.
42. H. L. Wang, J. L. Duda, C. J. Radke, J. Colloid Interface Sci 66 (1978) 153-165.
43. F. Riedo, E. Kovats, J. Chromatogr 239 (1982) 1-28.

44. A. Dabrowski, Adsorption- from theory to practice, Advances in Colloid and Interface Science, October 2001, 135-224.
45. S. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski, J Chromatogr A 1204 (2008) 35-41.
46. Y. V Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, J Chromatogr A 913 (2001) 75-87.
47. https://www.phenomenex.com/.../reversedguide.pdf (pristupljeno 20. ožujka 2015.)
48. http://www.phenomenex.com/Kinetex/Selectivities/C18?returnURL=/Products/Search/HPLC (pristupljeno 20. ožujka 2015.)
49. N. Wu, J.A. Lippert, M.L. Lee: Practical aspects of ultra high pressure capillary liquid chromatography; J. Chromatogr. A (2001) 1-12.
50. G. Guiochon, A. Felinger, S.G. Shirazi, A. Katti: Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, San Diego (2006).
51. U.D. Neue: HPLC Columns, Theory, Technology and Practice, Wiley- VCH, New York (1997).
52. F. Gritti, Y.V. Kazakevich, G. Guiochon: Measurement of hold-up volumes in reverse-phase liquid chromatography, Definition and comparison between static and dynamic methods, J. Chromatogr A 1155 (2007) 85-99.
53. T. Ahmad, G. Guiochon: Numerical determination of the adsorption isotherms of tryptophan at different temperatures and mobile phase compositions, J. Chromatogr A 1129 (2006) 174-188

ŽIVOTOPIS

Tea Škrinjar rođena je 7. veljače 1990. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Vukovini te je 2005. godine upisala Zdravstveno Učilište u Zagrebu. Po završetku srednjoškoloskog obrazovanja upisala je 2009. godine Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjene kemije, gdje je 10. rujna 2013. godine stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije.