

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**Slāpekli saturošu savienojumu  
hidrofilās mijiedarbības likumsakarības  
šķidrums hromatogrāfijā HILIC režīmā**

Promocijas darbs

doktora grāda iegūšanai ķīmijas zinātnes nozarē  
analītiskās ķīmijas apakšnozarē

**Juris Hmeļņickis**

Zinātniskais vadītājs  
Dr.chem., prof. Arturs Vīksna

RĪGA  
2010

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē un AS „Grindeks” hromatogrāfijas laboratorijā laika posmā no 2005.gada līdz 2010.gadam.

**Darba raksturs:** promocijas darbs ķīmijas zinātnes nozares analītiskās ķīmijas apakšnozarē

**Zinātniskais vadītājs:**

Dr.ķīm., prof., Arturs Vīksna (Latvijas Universitāte)

**Darba recenzenti:**

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas zinātnes nozares Promocijas padomes atklātā sēdē

2010.gada

Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē

Kr. Valdemāra ielā 48

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Kalpaka bulvārī 4

# SATURA RĀDĪTĀJS

SAĪSINĀJUMI.....	6
IEVADS.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	10
1.1. Mildronāta un to iespējamo piemaisījumu kvantitatīvās analīzes metodes..	10
1.2. HILIC princips.....	13
1.3. HILIC darbības mehānisms.....	15
1.4. HILIC stacionāras fāzes.....	18
1.5. Organiskie šķīdinātāji un kustīgās fāzes HILIC režīmā.....	23
1.6. Temperatūras ietekme AEŠH un HILIC režīmā.....	29
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	31
2.1. Darbā izmantotie reaģenti un pētītie paraugi.....	31
2.2. Hromatogrāfiskās kolonnas.....	34
2.3. Aparatūra.....	34
2.4. Aprēķinu formulas .....	36
2.5. Jonu pāru hromatogrāfija ar masspektrālo detektoru .....	37
2.6. HILIC sorbenti un organiskie šķīdinātāji.....	37
2.7. Buferšķīduma buferkapacitātes un pH ietekme.....	37
2.8. Kolonnas temperatūras ietekme.....	38
2.9. Dažādu buferkomponentu ietekme.....	38
2.10. Validācijas izstrādes parametri FAV piemaisījumu noteikšanai.....	39
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS.....	41
3.1. Jonu pāru hromatogrāfija.....	41
3.2. Organisku šķīdinātāju ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā.....	45
3.3. Dažādu sorbentu sorbcijas spējas HILIC režīmā.....	49
3.4. Buferšķīduma pH ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā.....	55
3.5. Amonija formiāta daudzuma ietekme uz izdalīšanas laikiem polārās stacionārajās fāzēs.....	57
3.5.1. Silikagela stacionārās fāzes.....	59
3.5.2. Aminogrupas saturoša stacionārā fāze.....	63

3.5.3. Amīdgrupas saturoša stacionārā fāze.....	64
3.5.4. Sulfobetaīna tipa cviterjonu stacionārā fāze.....	65
3.6. Dažādu buferšķīdumu ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā.....	67
3.7. Temperatūras ietekme analītiskās kolonnās ar dažādām stacionāram fāzēm...	74
3.8. Analīzes metodes validācijas rezultāti.....	79
SECINĀJUMI.....	82
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	83
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS.....	93

## Saīsinājumi

AEŠH - Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija

AEŠH-MS - Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija ar masselektīvo detektoru

AF-AEŠH – Apgrieztās fāzes augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija

AFŠH – Apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfija

AF – Apgrieztā fāze

ESI – Elektroizsmidzināšanas jonizācija

NP – Normālas fāzes hromatogrāfija

TMA - Trimetilamonija bromīds

TMH - 1,1,1-Trimetilhidrazīnija bromīds

HDDH - 3-Hidroksi-1,1-dimetil-4,5-dihidro-1H-pirazolīnij-1-betaīna hidrāts

Me-TMH - 3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)metilpropionāta bromīds

Et-TMH - 3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)etilpropionāta bromīds

iPr-TMH - 3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)prop-2-ilpropionāta bromīds

mildronāts - 3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrāts

FA – Skudrskābe

TFA – Trifluoretiķskābe

HFBA- Heptafluorsviestskābe

MeCN – Acetonitrils

MeOH – Metanols

THF – Tetrahidrofurāns

iPrOH – Izopropanols

EtOH – Etanols

HILIC – Hidrofīlās mijiedarbības hromatogrāfija

RT – smailes izdalīšanās laiks

a - Virziena koeficients

b - Brīvais loceklis

FAV – Farmaceutiski aktīvā viela

## IEVADS

Starp hromatogrāfijas metodēm organisko vielu analīzē nozīmīgu vietu ieņem AEŠH. Pateicoties augstai sadalīšanas spējai un jutībai, ātrumam un samērā vienkāršam aparatūras noformējumam, AEŠH ir apsteigusi citas fizikāli ķīmiskās analīzes metodes un kļuvusi par visplašāk lietoto analītiskās ķīmijas metodi. AEŠH lieto mazu vielu daudzumu sadalīšanai, identificēšanai un kvantitatīvai noteikšanai daudzkomponentu maisījumos.

Farmaceutiskiem produktiem ar katru gadu tiek izvirzītas arvien stingrākas prasības to ražošanas kvalitātei, kas automātiski prasa izmantot arvien selektīvākas analīzes metodes, lai izpildītu izvirzītās prasības. Viens no svarīgākajiem kontroles efektivitātes priekšnosacījumiem ir precīzu, ātru un jutīgu analīzes metožu izmantošana. Pēdējos gados ir vērojama strauja attīstība AEŠH-MS analīžu jomā. To nosaka iespēja veikt analīzes ar lielāku jutību un vienlaicīgi iegūt informāciju par vielas struktūru, ko pašlaik ļoti plaši izmanto farmaceutisko produktu analīzei.

3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrāts (mildronāts, skat. 1.1. tabulu, savienojums **4**) ir izgudrots Latvijas Organiskās sintēzes institūtā jau 1982.gadā, bet līdz pat mūsdienām nebija izstrādāta jutīga tā analīzes metode, lai varētu noteikt piemaisījumus, kuru saturs ir zem 0,1 %. Līdz šim brīdim izmantoja plānslāņa hromatogrāfijas analīzes metodi, kas nedod iespēju kvantitatīvi novērtēt ārstnieciskās vielas kvalitāti. Ņemot vērā, ka mildronāts un zināmie piemaisījumi pēc savas dabas ir ļoti polāri un nav hromoforu grupu, tas ļoti sarežģī analīzes metodes izstrādi. Lai atrisinātu šo problēmu, nepieciešams veikt lielu eksperimentu skaitu metodes un iekārtas izvēlei.

Pašlaik pasaulē intensīvi notiek pētījumi, izstrādājot hromatogrāfiskās analīzes metodes ļoti polāriem savienojumiem (proteīni, peptīdi, aminoskābes, ogļhidrāti) ar hidrofilās mijiedarbības hromatogrāfijas principiem (HILIC), kurus pirmo reizi pieminēja zinātniskajā literatūrā tikai 1990.g [1]. Pēdējos 3 gados hidrofilās mijiedarbības hromatogrāfijas metode kļūst arvien populārāka, ko apliecina zinātnisku rakstu skaitu pieaugums par HILIC, salīdzinot ar pirmajiem piecpadsmit gadiem no pirmās pieminēšanas zinātniskajā rakstā.

Izstrādājot analīzes metodi, izmantojot HILIC principus, tika detalizēti pētīti dažādu hromatogrāfisku parametru (dažādu buferšķīdumu lietošana un to buferkapacitātes un pH, analītiskās kolonnas temperatūra, dažādu organisku šķīdinātāju, dažādu sorbentu) ietekmi

uz mildronāta un tā piemaisījumu izdalīšanas laikiem, kā arī tika noskaidrotas hromatogrāfiskās likumsakarības. Noskaidrotās likumsakarības ir iespējams izmantot, izstrādājot jaunas šķidrums hromatogrāfijas analīzes metodes ļoti polāriem slāpekli saturošiem savienojumiem.

#### **Darba mērķis:**

- Noskaidrot dažādu parametru ietekmi uz slāpekli saturošo savienojumu izdalīšanas laikiem HILIC režīmā. Uz tā bāzes izstrādāt vienlaicīgu un piemērotu mildronāta un tā piemaisījumu hromatogrāfiskās analīzes metodi farmaceutiski aktīvās vielas kvalitātes pārbaudei.

#### **Darba uzdevumi:**

Izpētīt likumsakarības, kas veido racionālu bāzi analītisko metožu izstrādē:

- Izpētīt slāpekli saturošiem savienojumiem hromatogrāfisku selektivitāti lietojot dažādus sorbentus (silīcija, amino, amīda, ciano, cviterjonu sulfobetaīns) HILIC režīmā;
- Izpētīt slāpekli saturošo savienojumu hromatogrāfisko selektivitāti atkarībā no dažādiem buferšķīdumiem un buferšķīdumu satura kustīgajā fāzē;
- Izpētīt kolonnas temperatūras un dažādu šķīdinātāju ietekmi uz pētāmo slāpekli saturošo savienojumu atdalīšanas selektivitāti;
- Izstrādāt modeļvienādojumu jaunu slāpekli savienojumu prognozēšanai hromatogrāfiskai analīzei HILIC režīmā;
- Izstrādāt un validēt mildronāta piemaisījumu noteikšanas metodi ar šķidrums hromatogrāfiju - tandēma masspektrometriju.

#### **Darba zinātniskā novitāte ir formulējama sekojoši:**

Līdz šim brīdīm pasaulē nav pētīta slāpekli saturošu savienojumu sorbcija HILIC režīmā, izmantojot dažādus sorbentus, buferšķīdumus ar mainīgām buferkapacitātēm un kolonnu temperatūra. Noskaidrotās likumsakarības slāpekli saturošiem savienojumiem HILIC režīmā sniedz informāciju par sorbcijas mehānismu, kā arī

dod iespēju paredzēt arī citu slāpekli saturošu savienojumu izturēšanos HILIC režīmā.

**Praktiskā nozīmība:**

Pasaulē ļoti plaši izmanto slāpekli saturošus savienojumus, tai skaita farmācijā un ķīmiskajā ražošanā, tāpēc noskaidrotās likumsakarības HILIC režīmā ļauj prognozēt, kā izturēsies citi slāpekli saturošie savienojumi un būtiski atvieglo analīzes metožu izstrādi, lietojot šķidrums hromatogrāfiju. Noskaidrotās likumsakarības ļauj saprast slāpekli saturošo savienojumu darbību HILIC režīmā. Izstrādāto analīzes metodi jau vairāk nekā divus gadus izmanto AS „Grindeks” mildronāta produkta kvalitātes kontrolei.

**Darba aprobācija:**

Galvenie darba rezultāti apkopoti 5 publikācijās, tai skaitā 2 starptautiski citējamās žurnālos, par darba rezultātiem sniegti 3 ziņojumi konferencēs, tai skaitā 2 starptautiskās konferencēs. Uzrakstīta viena nodaļa „Retention behavior of Hydrazine Derivatives in HILIC mode” grāmatai ar nosaukumu ” Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications”, kuru plāno izdot ASV 26.11.2010.g. (ISBN: 9781439807538).

**Pateicība:**

Autors izsaka pateicību AS „Grindeks” par iespējām izmantot tās analītiskās iekārtas un materiālus, kā arī par finansiālu atbalstu doktorantūras studiju laikā. Īpaši pateicos Osvaldam Pugovičam par vērtīgām zinātniskām diskusijām un ieteikumiem, Imantam Dāvidsonam un Jānim Romanovskim par atbalstu un pretimnākšanu.



# 1. LITERATŪRAS APSKATS

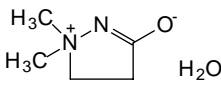
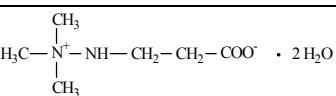
## 1.1. Mildronāta un to iespējamo piemaisījumu analīzes metode

3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrāts (mildronāts) – karnitīna priekšteča  $\gamma$ -butirobetaīna (GBB) struktūranalogs [2].

Katrai vielai sintēzes procesā vai citu apstākļu rezultātā rodas piemaisījumi. Mildronāta (savienojums **4**) sintēzes ceļā rodas vairāki blakusprodukti (savienojumi **1**, **2**) un piemaisījumi (savienojumi **3**, **5-7**), skatīt 1.1. tabulu. Savienojumi **8-15** tika izmantoti kā modeļsavienojumi.

1.1. tabula

**Mildronāta un tā piemaisījumu struktūrformulas**

Nr.	Savienojums	Struktūrformula
<b>1</b>	Trimetilamonija bromīds	$(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}\text{H}$ $\text{Br}^-$
<b>2</b>	1,1,1-Trimetilhidrazīnija bromīds	$(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}-\text{NH}_2$ $\text{Br}^-$
<b>3</b>	3-Hidroksi-1,1-dimetil-4,5-dihidro-1H-pirazolīnija-1-betaīna hidrāts	
<b>4</b>	3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrāts	
<b>5</b>	Metil-3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)-propionāta bromīds	$(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}-\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ $\text{Br}^-$
<b>6</b>	Etil-3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāta bromīds	$(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}-\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ $\text{Br}^-$
<b>7</b>	Prop-2-il 3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāta bromīds	$(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}-\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{Br}^-$

Pirmo reizi zinātniskais raksts par mildronāta noteikšanu parādījās 1993.gadā [3]. Mildronāts, karnitīns un  $\gamma$ -butirobetaīns tika noteikts asins plazmā ar derivatizācijas metodi. Detektēšanai izmantoja ultravioleto (UV) detektoru pie 262 nm un Silasorb 600 (garums 150 mm, iekšējais diametrs 4,6 mm) analītisko kolonnu ar kustīgo fāzi acetonitrils maisījumā ar 0,025 M kālija fosfāta buferšķīdumu (attiecībā 10:90, v/v) ar pH 5,7.

Detektēšanas robeža visiem savienojumiem tika sasniegta 0,75 µg/ml un mildronāta izdalīšanās 6,0 minūtēs.

Kā alternatīvo metodi šķidrums hromatogrāfijai mildronāta noteikšanai plazmā tika izstrādāta stripingpotenciometriskā analīzes metode [4].

Pirmās publikācijas par mildronāta un tā piemaisījumu noteikšanu aktīvajā vielā ar šķidrums hromatogrāfijas metodi, izmantojot gaismas izkliedes detektoru, tika publicētas 2005.gadā [5]. Detektēšanai izmantoja gaismas izkliedes detektoru un Inertsil CN-3 (garums 250 mm, iekšējais diametrs 4,6 mm, daļiņu izmērs 5 µm) analītisko kolonnu ar acetnitrilu-ūdeni (attiecībā 20:80, v/v) kā kustīgo fāzi. Mildronāta lineārais noteikšanas intervāls tika noteikts masas koncentrācijās no 10,3 līdz 814,4 µg/ml ar izdalīšanās laiku 3,5 minūtes.

Publikācijas par mildronāta un tos piemaisījumu noteikšanu gatavajā zāļu formā (injekcijās) ar šķidrums hromatogrāfiju un gaismas izkliedes detektoru palīdzību tika publicētas 2006.gadā [6]. Detektēšanai izmantoja gaismas izkliedes detektoru un Inertsil NH<sub>2</sub> (garums 250 mm, iekšējais diametrs 4,6 mm, daļiņu izmērs 5 µm) analītisko kolonnu, izmantojot par kustīgo fāzi acetnitrila ūdens šķīdumu (attiecībā 35:65, v/v). Mildronāta lineārais noteikšanas intervāls tika konstatēts no 5,0 līdz 600,0 µg/ml ar izdalīšanās laiku 6.5 minūtes.

Mildronāta kvantitatīvā noteikšanas metode cilvēka asins plazmā un urīnā, izmantojot AEŠH-MS metodi, tika publicēta 2007.gadā [7]. Detektēšanai izmantoja masspektrālo detektoru un Inertsil NH<sub>2</sub> (garums 250 mm, iekšējais diametrs 4,6 mm, daļiņu izmērs 5 µm) analītisko kolonnu, izmantojot par kustīgo fāzi acetnitrila ar ūdeni (attiecībā 40:60, v/v). Lineārais noteikšanas intervāls sasniegts no 1,0 līdz 20,0 ng/ml ar mildronāta izdalīšanās laiku 7,0 minūtes.

Labai analītiskai metodei jāizvairās gan no pārāk maziem izdalīšanas laikiem (kas parasti izraisa vāju analizējamo vielu atdalīšanu), gan pārāk garu izdalīšanas laiku (kas paildzina analīzes laiku un ko bieži pavada signāla smailes deformācija). Lai izstrādātu labu hromatogrāfisku metodi, jāveic metodes parametru optimizācija. Apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfija (AFŠH) pašlaik ir vispopulārākais no AEŠH režīmiem. Lai gan apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfija ir plaši lietota, taču tās galvenais trūkums ir nepietiekama polāro savienojumu sorbcija.

Ir tāds pieņēmums: ja organiskajiem savienojumiem nav pietiekama sorbcija tradicionālajā AFŠH uz oktadecilsilikagela (C18) sorbenta ar ūdens kustīgo fāzi, kurā ir

amonija acetāta buferšķīdums ar pH 5,5 un 2% acetonitrila (MeCN), tad šie savienojumi pieskaitāmie pie augsti polāriem analītiem [8].

Tā kā mildronāts un tā piemaisījumi ir mazmolekulāras, polāras un labi ūdenī šķīstošas vielas, tad ir sagaidāma to vājā izdalīšanās apgrieztās fāzēs režīmā, un šajā gadījumā jonu pāru hromatogrāfijas lietošana šķiet perspektīvāka.

Taču mildronātam un tā piemaisījumiem ir vēl viens ierobežojums – tajos nav izteiktu hromoforu. Šis trūkums par piemērotu, jutīgu detektēšanas metode izvirza masspektrometriju. Par nelaimi, jonu pāru reaģenti, kā arī augsts ūdens saturs kustīgajā fāzē parasti samazina masspektrometrijas detektēšanas jutīgumu [9,10]. Jonu pāru reaģents ir savienojums, kas iedarbojas uz analizējamās vielas jonizētām vai jonizējamām funkcionālajām grupām, uzlabojot hromatogrāfisko izšķirtspēju. Jonu pāru augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija jau ilgu laiku ir ieteicamā kā metode ļoti polāru vai pat jonogēnu molekulu, arī daudzu farmakoloģiski un klīniski svarīgu medikamentu analīzei, izdalīšanai, atdalīšanai un attīrīšanai [11].

Jonu apmaiņa vai jonu pāru veidošana [12], manipulēšana ar kustīgās fāzes pH [13] un apgrieztās fāzes hromatogrāfijai speciāli izstrādātās kolonnās [14] ir tradicionāli paņēmieni polāru vielu izdalīšanai. Tomēr katram no šiem paņēmieniem ir savas priekšrocības un trūkumi. Jonu apmaiņa vai jonu pāru veidošana labi darbojas tikai tad, ja interesējošās vielas ir jonizējamās. Arī kustīgās fāzes pH mainīšana labi darbojas jonizējamiem savienojumiem, jo šādu savienojumu izdalīšana ir funkcionāli atkarīga no kustīgās fāzes pH [13]. Savienojumu izdalīšanas būtība ir sekojoša: piemeklēt šķīduma pH tā, lai analizējamā viela ir neitrālā formā (piemēram, bāzisks savienojums sārmainā pH apgabalā). Tomēr kustīgās fāzes pH piemērošana ne vienmēr ir sekmīga ļoti polāriem savienojumiem. Bez tam, analizējamie savienojumi var būt nestabili neitrālā vidē. Apgrieztās fāzes hromatogrāfija farmaceitiskajā rūpniecībā ir visplašāk lietotā metode tās daudzveidīguma dēļ, un tās iespējas atdalīt dažādu tipu savienojumus ir plašas. Tomēr polāru savienojumu izdalīšanai bieži nepieciešamas kustīgās fāzes ar augstu ūdens saturu, kas rada papildus problēmas, piemēram, stacionārās fāzes dezaktivāciju [15]. AEŠH kolonnu ražotāji cenšas risināt šo problēmu, veidojot stacionārās fāzes ar iekļautu polāru grupu, kas uzturētu poru slapināšanos [16-18]. Šādi kolonnu pildījuma materiāli raksturojas ar augstu izšķirtspēju un atrisina fāzes atūdeņošanas problēmu, taču bieži vien demonstrē zemāku izdalīšanas laiku. Cita pieeja, speciāli polāru vielu izdalīšanai, ir izstrādātu alkilķēžu kolonnu izmantošana. Šādas kolonnas no atūdeņošanas pasargā pareizi

izvēloties vairākus optimizētus kolonnas parametrus: poru izmērs, ligandu blīvums, specifiskais virsmas laukums un ligandu piešķūšanas veids [14]. Lai gan šādas kolonnas var lietot kopā ar masspektrometru, augstais ūdens saturs kustīgā fāzē polāru savienojumu izdalīšanai nav labākais veids kustīgās fāzes iztvaicēšanai elektroizsmidzināšanas masspektrālā (ESI-MS) detektorā [19]. Bet tam, daudzi šādu kolonnu tipi joprojām nesorbē īpaši polāras molekulas. Pēdēja laikā lielu popularitāti ļoti polāru savienojumu sadalīšanai ir guvuši hidrofilās mijiedarbības hromatogrāfija (HILIC). Ņemot vērā, ka mūsu pētāmie savienojumi ir ļoti polāri, tika nolemts izpētīt promocijas darbā lietotos savienojumus HILIC režīmā.

Jaunākā publikācija (2009.gadā), apraksta līdzīgu, mūs interesējošu, struktūru 1,1-dimetilhidrazīna (šis savienojums, tāpat kā hidrazīns, ir atzīts par stingri kontrolējamu kancerogēnu vielu) detektēšanu HILIC režīmā ar hemiluminiscento slāpekļa detektoru (*CLND*), acetoniitrilu kustīgajā fāzē aizstājot ar metanolu [20]. Tie paši zinātnieki atsauca arī uz citiem pētījumiem, kuros izmantota jonu hromatogrāfija ar elektrovadītspējas detektēšanu [21]. Citi pētnieki izmanto gāzu hromatogrāfiju vai šķidrums hromatogrāfiju pēc savienojumu derivatizācijas [22-28]. Taču derivatizācija ir komplicēta, laikietilpīga un reizēm nav izmantojama hidrazīna un tā atvasinājumiem detektēšanai.

## 1.2. HILIC princips

HILIC ir augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas paveids, kurā izmanto hidrofilas stacionārās fāzes un hidrofobas, ar augstu organiskā šķīdinātāja saturu, kustīgās fāzes. HILIC domāts nelielām, stipri polārām molekulām, jo īpaši bāzēm, kuru izdalīšanai apgrieztās fāzes hromatogrāfijā nepieciešami jonu pāru reaģenti. HILIC ir cita pieeja mazmolekulāru polāru savienojumu atdalīšanai [29-33] salīdzinot ar AF-AEŠH. Pirmoreiz HILIC metode detalizēti aprakstīta Alperta zinātniskā rakstā [1].

Saīsinājumu „HILIC” 1990. gadā ierosināja Alperts, lai aprakstītu hromatogrāfijas veidu, kurā analizējamās vielas mijiedarbojas ar hidrofilu stacionāro fāzi un tiek eluētas ar samērā hidrofobu eluentu, kurā ūdens ir spēcīgākais eluējošais komponents [1]. Šāds atdalīšanas paņēmiens kopš 1975. gada tiek izmantots AEŠH cukuru un oligosaharīdu analīzē [34, 35]. Hromatogrāfija ar hidrofilu sorbentiem tiek regulāri izmantota kopš 1975. gada, un nelielu ūdens daudzumu izmantošanu organiskajos šķīdinātājos, lai nodrošinātu hromatogrāfisko izskalošanu, pirmais aprakstījis Samuelsons 1950.-tajos gados [36, 37], taču Alperts pirmais izmantoja saīsinājumu “HILIC”.

Pēc būtības, vistrāpīgākais apzīmējums stipri hidrofilu un nelādētiem savienojumiem šķidrums hromatogrāfijā būtu „apgrieztā apgrieztā fāze”, tas ir, režīms, kurā polāra stacionārā fāze pievelk eluenta polārāko komponentu un ir bagātināta ar to, darbojoties kā kavējošais elements, bet eluentam tajā pat laikā ir atzīstamas šķīdinātāja īpašības, nodrošinot ātru un lineāru nošķiršanos starp abām fāzēm.

HILIC ir metode, kurā – kā uzskata – analizējamās vielas izdalīšanu izraisa šīs vielas pāreja starp mazkustīgu, ar ūdeni bagātinātu eluenta slāni uz hidrofilas stacionārās fāzes virsmas un relatīvi hidrofoba eluenta pamatmasu, kura galvenais komponents ir 5-40 % ūdens acetonitrilā.

Ūdens, kā stiprāk eluējošā solventa izmantošana, dod HILIC vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar tradicionālo normālās fāzes (NP) hromatogrāfiju. Eluenta pagatavošana ir vienkāršāka, nav nepieciešama precīza ūdens satura kontrole solventā. Bez tam NP eluēti ir nepolāri (bieži uz heksāna bāzes), un polārām vielām šādos eluentos ir zema šķīdība. Nepolārās fāzes hromatogrāfijas savienošana ar ESI-MS arī ir problemātiska, jo pilnībā organiskus, nepolārus eluentus ir grūti jonizēt. HILIC eluēšanas secība parasti ir pretēja AFŠH novērojamajai, tātad HILIC labāk darbojas vielām, kas ir problemātiskas apgrieztajai fāzei. Uz šīs īpašības balstās viena no HILIC priekšrocībām [1]: izmantojot HILIC kopā ar cietfāzes ekstrakcijas metodi (SPE), ir iespējama cietfāzes ekstrakcijas eluāta tieša injekcija pretējas polaritātes dalošajā kolonnā, kas ietaupa laiku un novērš parauga zudumus [38]. Lai gan plaši lietotie SPE eluējošie šķīdinātāji (piemēram, acetonitrils) ir spēcīgāki kā kustīgā fāze apgrieztās fāzes hromatogrāfijā, taču tie ir vāji šķīdinātāji silikagela kolonnā ar ūdeni/organisko šķīdinātāju kā kustīgo fāzi, un tāpēc tie var tikt ievadīti uzreiz hromatogrāfiskā sistēmā. Šādi tiek likvidēti manuāli veicamais darba posms, parauga ietvaicēšana un atkārtota šķīdināšana, piemēram, 96 ligzdu platēm ietaupot 50% paraugu sagatavošanas laiku no cietfāzes ekstrakcijas [39]. Kustīgā fāze ar zemu ūdens un augstu organiskā šķīdinātāja saturu dod iespēju tieši ievadīt ar ūdeni nejaucošos šķīdinātājus bez negatīviem hromatogrāfiskiem efektiem. Augsts acetonitrila saturs sniedz HILIC vēl divas priekšrocības: augstu jutību ESI-MS sistēmā [40, 41] un ātrāku savienojumu atdalīšanu, jo HILIC eluētiem (salīdzinot ar AFŠH eluētiem) ir zemāka viskozitāte [42].

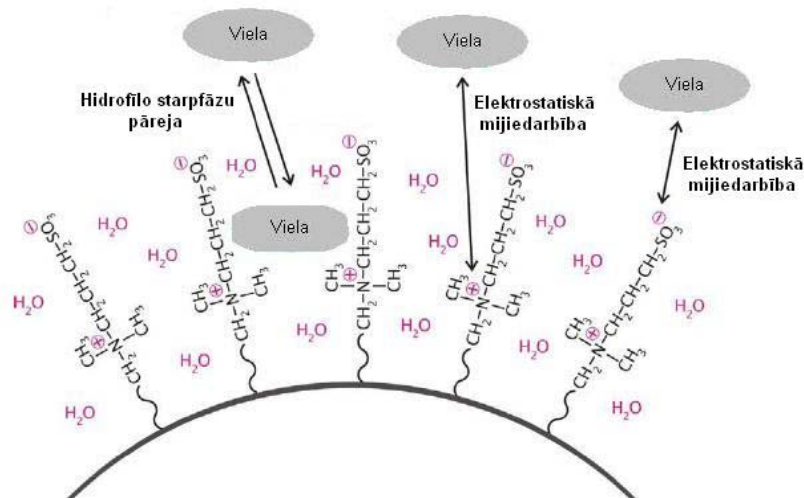
Lai gan apgrieztā fāze ir visplašāk lietotais hromatogrāfijas princips un to var lietot dažādu FAV analīzes metodēm, kombinācijā ar populārākiem detektēšanas veidiem, tomēr atsevišķas vielas – visbiežāk polāri un hidrofilu savienojumi eluejas „mirušajā” tilpuma zonā. Daudzus gadus šādiem mērķiem tika izmantota normālās fāzes šķidrums

hromatogrāfija (NPLC), kas izmanto apkārtējai videi kaitīgu neūdens kustīgo fāzi (heksāns, dioksāns). Taču šādos analīzes metodes apstākļos polārus un hidrofilus savienojumus izšķīdināt ir grūti. Šādā situācijā HILIC ir alternatīva, ar AFŠH pretēju izdalīšanas secību. Citiem vārdiem, vielas ar mazu izdalīšanas laiku vai kuras netiek sorbētas AFŠH kolonnās uzrāda stipru sorbciju HILIC kolonnās.

Tātad HILIC metode vairākos aspektos uzrāda līdzību ar tradicionālo NPLC, taču svarīgā atšķirība ir ūdeni saturoša kustīgā fāze. Tā rezultātā, ņemot vērā analizējamās vielas šķīdību eluentā, HILIC ir labāka metode, jo kustīgās fāzes sastāvs ir līdzīgāks AFŠH lietotajai. Tipiski HILIC kustīgā fāze sastāv no 40-97% acetonitrila ar ūdeni vai buferšķīduma. HILIC ir masspektrometrijai „draudzīga” metode un, pārejot no AFŠH uz HILIC, hidrofilām vielām bieži novērojama 10-1000 - kārtīgi augstāka jutība. Nav nepieciešami arī nekādi jonu pāru reaģenti – tas ir izdevīgi preparatīvajai hromatogrāfijai [43].

### **1.3. HILIC darbības mehānisms**

HILIC apstākļos stacionārajā fāzē izveidojas ar ūdeni bagātināts šķidrums slānis. Vielu atdalīšana tiek panākta, izšķīdinātajām vielām pārejot no eluenta šajā hidrofilajā vidē (skat. 1.1. attēlu). Šeit gan ūdeņraža saites, kuru stiprums atkarīgs no izšķīdināto vielu skābuma vai bāziskuma, gan dipolu-dipolu mijiedarbības, kas atkarīga no dipolu momentiem un vielu polarizējamības, ir sorbciju noteicošie faktori. HILIC stacionārās fāzes galvenā funkcija ir piesaistīt ūdeni. Tomēr, jebkurai no pieejamajām lādētajām HILIC stacionārajām fāzēm vielu izdalīšanu ietekmēs arī elektrostatiskā jonu mijiedarbība, kā tas parādīts 1.1. attēlā ar cviterjonu stacionāro fāzi kā piemēru. Izdalīšanas procesi HILIC sorbentā tiek skaidroti ar hidrofilo starpfāžu pāreju un ar elektrostatisku mijiedarbību ar pozitīvajiem vai negatīvajiem lādiņiem [43].



1.1. att. Izdalīšanas procesi HILIC sorbentā [43].

Lai gan tāds fakts nav tik svarīgs kā HILIC pamata izdalīšanas mehānismi, lādētās stacionārās fāzes dod selektivitātei vēl vienu vērā ņemamu aspektu: elektrostatisku iedarbību uz analizējamajām vielām. Elektrostatiskās mijiedarbības negatīvā puse ir nepieciešamībā pievienot kustīgai fāzei sāļus vai bufervielas, lai izjauktu šo mijiedarbību un lai analizējamās vielas tiktu eluētas no kolonnas. Palielinot buferšķīduma saturu eluentā, var samazināties masspektrālās detektēšanas jutīgums. Tomēr, cviterjonu stacionārajām fāzēm katra lādiņa elektrostatisko spēku daļēji neitralizē pretēji lādēta jona tuvība, tas ir, summārā elektrostatiskā mijiedarbība ir vājāka. Vājāka elektrostatiskā mijiedarbība ļauj izmantot zemākas koncentrācijas buferšķīdumus, kas ir izdevīgi augsti jutīgai masspektrālai detektēšanai. Neitrālām HILIC stacionārajām fāzēm parasti arī nepieciešamas zemākas buferšķīduma koncentrācijas, taču to vājā selektivitāte izceļ lādētās stacionārās fāzes.

Lādiņa blīvums uz vāja jonapmainītāja (piemēram, silikagels un amīnu fāzes) virsmas ir atkarīgs no pH. Tāpēc izšķīdināto vielu elektrostatiskās mijiedarbības spēks ar tādiem materiāliem būs atkarīgs gan no analizējamās vielas, gan stacionārās fāzes jonizācijas. pH inerta sorbentu (piemēram, cviterjonu stacionārās fāzes) gadījumā kustīgās fāzes optimālo pH nosaka tikai analizējamās vielas īpašības [43].

Kā jau tika minēts iepriekš, tipiski HILIC kustīgā fāze sastāv no 40-97% acetonitrila maisījumā ar ūdeni vai buferšķīdumu. Lai rezultāti būtu atkārtojami, eluentam jā satur vismaz 3% ūdens. Tāds daudzums nepieciešams, lai garantēti hidratētu (samitrinātu ar ūdeni) stacionārās fāzes virsmu. Bez tam, nedrīkst aizmirst, ka ar organiskā šķīdinātāja

satura palielināšanos kustīgajā fāzē palielināsies analītu izdalīšanās laiks. HILIC eluentiem var izmantot vairākus polārus, ūdenī šķīstošus organiskos šķīdinātājus, tomēr acetoniitrils ir vispopulārākais. Šķīdinātāju stiprums ir aptuveni pretējs AFŠH novērojamajam, un šķīdinātāju relatīvais stiprums ir šāds:

tetrahidrofurāns < acetons < acetoniitrils < izopropanols < etanols < metanols < ūdens [43] (citi literatūras avoti norāda sekojošu secību: acetoniitrils < tetrahidrofurāns < izopropanols < metanols [44])

No Snaidera (*Snyder*) pētījumiem [45] izriet trīs galvenie šķīdinātāja selektivitāti noteicošie parametri: šķīdinātāja spēks, solventa un izšķīdinātās vielas lokalizācija un šķīdinātāja/vielas ūdeņraža saišu intensitāte. Pēc šķīdinošā spēka metanols ( $E_0=0,73$ ) un izopropanols ( $E_0=0,60$ ) ir daudz stiprāki par tetrahidrofurāna ( $E_0=0,48$ ) un acetoniitrilu ( $E_0=0,50$ ), tāpēc izšķīdināto vielu izdalīšanas laiki pirmajiem diviem komponentiem ir mazāki nekā otrajam pārim šķīdinātāju.

Ir pētīta citu eluentu (bez acetoniitrila un ūdens) izmantojamība, taču metanols dod platākas smailes un tikai nelielas izmaiņas selektivitātē [46]. Spirtu kā vājo šķīdinātāju izmantošana ir pārbaudīta un var būt noderīga, ja analizējamā viela nešķīst acetoniitrilā. Lī un Huang [44] salīdzināja epirubicīna atdalīšanu no trim tā analogiem ar metanolu, izopropanolu, tetrahidrofurāna un acetoniitrilu kā vājajiem šķīdinātājiem ar 10% ūdens buferšķīdumu; metanolā izdalīšanas laiks bija "mirušajā" tilpuma zonā. Salīdzinot ar metanolu, izopropanola izdalīšanas laiki ir lielāki, tomēr nespēja nošķirt struktūras izomērus vienu no otra. Tetrahidrofurānā, pēc šķīdinātāja stipruma ( $E_0=0,48$ ), vajadzētu būt lielākam izdalīšanas laikam nekā acetoniitrilam ( $E_0=0,50$ ), taču eksperimentāli konstatēts, ka doksorubicīna izdalīšanās laiks acetoniitrilā ir aptuveni četrreiz ilgāks nekā tetrahidrofurānā, un arī savienojumu izdalīšanās secība bija daļēji atšķirīga. Tas tika izskaidrots ar to, ka THF ir labāks ūdeņraža saišu akceptors nekā acetoniitrils, un šī atšķirība izmaina analizējamo vielu efektīvo  $pK_a$ , dodot analizējamajām vielām augstāku  $pK_a$  acetoniitrilā. Tikpat loģiski šķiet skaidrojums, ka THF ūdeņraža saišu akceptora spējas noārda ūdens slāni uz stacionārās fāzes virsmas (tas ir, palielina eluēšanas spēku, salīdzinot ar  $E_0$  skaitlisko vērtību šķīduma hromatogrāfijas apgrieztajās fāzēs).

Stipri hidrofilo savienojumu izdalīšanu bez sorbcijas daudzos gadījumos izraisa solvofīlie faktori, kad polāras funkcionālās grupas aktīvi veido dipolāras saites ar šķīdinātāju. Tā kā nepolāra stacionārā fāze nespēj veidot šādas saites, vielas paliek šķīdumā un stipri polāri savienojumi ar ūdeņraža saites palīdzību sorbējas uz stacionārās fāzes [47].



Ideālos apstākļos šķidrums hromatogrāfijā paraugi jāšķīdina tādā pašā šķīdinātājā vai to maisījumā kāda ir kustīgā fāze. Atšķirības parauga un eluenta viskozitātē var izraisīt smailes deformāciju, bet atšķirība šķīdinātāja stiprumā – hromatogrāfiskās joslas platuma palielināšanos [48, 49].

Gadījumos, kad sorbcija nav vienas vai vairāku lādētu funkcionālo grupu dēļ, sorbcija ir viegli nodrošināma ar elektrostatiskās mijiedarbības mehānismu. Acīmredzams piemērs ir jonu apmaiņas hromatogrāfija, un tā ir izmantojama praktiski visām lādētām vielām, no maziem neorganiskiem joniem līdz olbaltumvielām un citām bioloģiskām makromolekulām. Alternatīva jonu apmaiņai ir jonu pāri, kas dod iespēju lietot lētākas AFŠH kolonnas un bieži vien ir ar lielāku atdalīšanas efektivitāti. Palielināts izdalīšanas laiks tiek sabalansēts ar jonu pāru reaģentu, kas ir jonogēns savienojums ar analizējamajai vielas pretēju lādiņu un spēj veidot jonu pāru līdzsvaru. Jonu pāru veidošana galvenokārt tiek lietota gadījumos, kad disociācijas/protonēšanās līdzsvars nav efektīvi izmantojams, lai izšķīdināto vielu pārveidotu nelādētā formā, to paveicot izmantojamās kolonnas sorbenta darbības pH diapazonā. Vielas izdalīšana ir aplūkojama vai nu kā nelādētu jonu pāru atdalīšana uz hidrofobas stacionārās fāzes, vai kā stacionārās fāzes dinamiska pārklāšana ar jonu pāru reaģentu, kas izraisa jonu apmaiņai līdzīgu izdalīšanas mehānismu [33]. Tipiskākie kustīgai fāzei pievienojamie jonu pāru reaģenti ir trifluoretiķskābe (TFA) vai nātrija heptānsulfonāts, taču zināms, ka šie savienojumi ievērojami samazina masspektrālā detektora signālu elektroizsmidzināšanas jonizācijā (ESI) [9]. Vispārīnnot: kustīgās fāzes sastāvs ESI-MS detektēšanā ir kritiski svarīgs. Jāņem vērā, ka kustīgā fāze ar augstāku ūdens saturu ir grūtāk izsmidzināma par tīriem organiskiem šķīdinātājiem, jo ūdenim ir augsts virsmas spraigums, un pilienu elektrizācija ir mazāk efektīva [50-52].

Izpētot zinātnisko literatūru, var secināt kā organiskā šķīdinātāja stiprums HILIC režīmā katrai savienojuma grupai varētu būt citādāks.

#### **1.4. HILIC stacionārās fāzes**

Principā HILIC stacionārās fāzes var iedalīt trīs grupās:

- neitrālās (elektrostatiskās mijiedarbības nav) – diolu, amīdu fāzes,
- lādētās (spēcīga elektrostatiskā mijiedarbība) – nemodificēts silikagels, aminopropilsilikagels
- cviterjonu (vāja elektrostatiskā mijiedarbība) – sulfoalkilbetaīna silikagels.

Lai gan komerciāli pieejamo hromatogrāfisku kolonnu klāsts speciāli HILIC mērķiem kļūst arvien plašāks, stacionāras fāzes izvēle vēl ir visai ierobežota.

Ir populārs viedoklis, ka nemodificētu silikagelu (silīcija dioksīds) nav iespējams izmantot bioanalītiskajā maisījumu atdalīšanā un citās metodēs, kur sarežģītās matricās atrodas polāras vielas. Šis skepticisms nāk no tradicionālās tiešās fāzes hromatogrāfijas, kurā tika izmantoti tikai organiskie šķīdinātāji. Ūdens ir viens no spēcīgākajiem deaktivējošajiem aģentiem, un pievienojot ievērojamu daļu ūdens (~10%) eluentam, neaizsargāts silikagels šķiet pietiekami deaktivēts, nenodrošinot atkārtos rezultātus. Taču reizēm uz nemodificēta silikagela HILIC režīmā novērojama neatgriezeniska sorbcija [47].

Viena no īpašībām, kas padara nemodificētu silikagelu pievilcīgu AEŠH-MS materiālu, ir iztikšana bez ligandiem, jo ligandi var atšķelties no nekustīgās fāzes un parādīties lieku smaiļu veidā masspektā. Jaunākie saistītās stacionāras fāzes sorbenti, šķiet, ir ņēmuši vērā šo problēmu, un dažādas specializētas stacionāras fāzes uz silikagela bāzes mūsdienās HILIC-MS metodēs kļūst tikpat pierastas kā nemodificēts silikagels. Lai gan ūdens pārklās virsmu, tas joprojām nekavēs silanolu disociāciju un ar šo disociāciju saistītās katjonu apmaiņas īpašības. Būtībā, ūdens klātbūtnē stimulē brīvu silanolu veidošanos un atvieglo disociāciju. Negatīvi lādētā virsma piesaistīs šķīduma katjonus, taču vienlaikus tā samazina izdalīšanas laiku negatīvi lādētiem polāriem savienojumiem, kas tiek elektrostātiski atgrūsti no virsmas. Elektrolīta (vēlams – buferšķīduma) pievienošana tāpēc ir obligāta, lai kontrolētu jaukta tipa atdalīšanu, kuru stimulē disociējušie silanoli, jo īpaši ar bāziskām izšķīdinātajām vielām. Silikagela tīrība tiek izmantota kā mārketinga arguments, un tā racionālais pamatojums ir indukcijas efekts, ko metāla joni dod silanola grupas aciditātei. Tas var būt saistīts ar stacionārās fāzes pagatavošanai izmantotā silikagela tīrību, taču var rasties arī no atšķirībām kolonnu sagatavošanas procedūrās. Smaiļu simetriskuma problēmas speciāli HILIC izstrādātajiem silikagela sorbentiem, šķiet, ir atrisinātas [47]. „A tipa” silikagels parasti ir skābāks un mazāk attīrīts. Šiem materiāliem acīmredzot ir mazāk enerģētiski homogēna virsma un lielāka nosliece uz smaiļu asimetriskumu. „B tipa” silikagels ir rūpīgāk attīrīts un mazāk skābs, un bieži tam tiek dota priekšroka daudzās AFŠH metodēs [53].

Monolītās kolonnas ļauj izmantot lielus plūsmas ātrumus bez būtiska kolonnas efektivitātes zuduma. Runājot par šādām silikagela kolonnām, efektivitāte lielās plūsmās nedaudz samazinās, bet šis efektivitātes zudums nav tik ievērojams kā AF kolonnām. Iespējams, tas ir difūzijas viskozitātes un masas pārnese faktoru ieguldījuma dēļ [54].

## Aminopropilsilikagels

Ar aminopropilgrupu saturošu reaģentu apstrādāts silikagels bija pirmā HILIC režīmā regulāri lietotā saistītā stacionārā fāze. Tā tiek lietota ogļhidrātu sadalīšanā. Tās priekšrocība, salīdzinot ar neapstrādātu silikagelu, ir palielināts mutarotācijas ātrums, kas novērš dubultotu smaīļu veidošanos, atdalot anomērus. Pirmajos pētnieciskajos darbos ar silikagela izmantošanu HILIC režīmā tika aplūkots arī tīrs silikagels, taču, lai paveiktu mutarotāciju, parasti bija jāpievieno neliels daudzums amonija hidroksīda ūdens šķīdums [55]. Liela daļa kolonnu ražotāju piegādā aminopropilsilikagela kolonnas HILIC vai NPLC metodēm. Aminopropilsilikagels un nemodificēts silikagels ir izturīgāki par alkilgrupu saturošiem sorbentiem – tāpēc neatgriezeniska adsorbēcija šīm kolonnām ir mazticamāka nekā AF-AEŠH kolonnām [55]. Bez tam aminopropilsilikagelam, salīdzinot ar polimēru matricu materiāliem, ir ilgāks līdzsvara iestāšanās laiks atsevišķiem buferšķīdumu joniem [56]. Nopietnas bažas rada aminopropilsilikagela ierobežotā stabilitāte ūdeni saturošos eluentos [57, 58], kas izraisa ligandu ātru nošķelšanos, ko pavada smailes formas pasliktināšanās HILIC apstākļos [59]. Šī nestabilitāte šķiet saistīta ar liganda pirmējās aminogrupas pašiznīcinošo darbību, un citi stipri hidrofilie, saistītās fāzes silikageli ir krietni stabilāki pret fāzes noārdīšanos [59]. No silikagelu tipiem „C tipa” silikagels, kas tiek ražots, hidroksilējot silikagelu, atrodas īpašā situācijā [60]. Tā saukšana par neaizsargātu silikagelu ir apstrīdama, jo lielākā daļa virsmas silanolu ir aizstāti ar silīcija hidrīda (Si-H) grupām. No „C tipa” silikagela izgatavotie AF oktadecil- sorbenti uzrāda unikālu selektivitāti daudziem polāriem savienojumiem eluentos ar augstu organisko šķīdinātāju saturu [61]. Ir apsvērtas vairākas metodes saistīto aminofāzu izgatavošanai, kas balstās uz „C tipa” silikagela modificēšanu, un šīs fāzes ir salīdzinātas ar neapstrādātu „C tipa” silikagelu ar vai bez atlikušo silanolgrupu bloķēšanas, HILIC režīmā atdalot nederivatizētus mono- un oligosaharīdus. Nebloķētajam neapstrādātajam „C tipa” silikagelam izdalīšanas laiks bija mazāks nekā „B tipa” silikagelam, bet, „C tipa” silikagelu bloķējot, sorbcijas efektivitāte samazinājās pilnīgi. Tāpēc tika secināts, ka nebloķētam „C tipa” silikagelam izdalīšanas laiku rada atlikušās silanolgrupas un ka „C tipa” silikagelam HILIC režīmā cukuriem sorbcijas nav [62]. No „C tipa” silikagela gatavotās saistītās fāzes tiek pievienotas pie Si-C saitēs, un šādas fāzes ar citiem ligandiem ir stabilākas par tradicionālajām, pēc sililācijas metodes pagatavotajām [61].

### **Amīda silikagels**

Ar amīdu saistīts silikagels – hidrofila fāze, kam pie īsa alifātiska speisera atrodas karbamoila (amīda) grupa [32, 63]. Amīdgrupa ir ķīmiski mazāk aktīva nekā amīngrupa un bez amīna bāziskuma. Tāpēc izdalīšanas laiks šādās kolonnās ir mazāk atkarīgs no kustīgās fāzes pH un mazāk nosliecas uz neatgriezenisku hemosorbciju, un pirmējo amīngrupu trūkuma dēļ neveidojas Šifa bāzes, tātad cukuri un citi karboksilsavienojumi netiek reducēti. Amīda kolonnas plaši lieto, analizējot peptīdu savienojumus. Amīda silikagels uzrāda labu atgūstamību un stabilitāti pat pēc 5000 injekcijām [63].

### **Diola silikagels**

Diola silikagels ir saistītā fāze, kas pēc polaritātes visvairāk atgādina neaizsargātu silikagelu [64]. To pagatavo, silikagelam reaģējot ar alkoksi-aktivētu glicidopropilsilānu, kam seko skābes katalizēta cikla atvēršana – oksirāngrupas hidrolīze, veidojot siloksānam pievienotu 2,3-dihiroksipropila ligandu. Diola fāze bija viena no pirmajām izveidotajām saistītajām fāzēm uz silikagela bāzes, un viens no tās izstrādes nolūkiem bija: risināt neaizsargāta silikagela adsorbcijas problēmas. Diola kolonnu augstā polaritāte un ūdeņraža saišu veidošanas īpašības, kā arī niecīgais disociējošo fragmentu daudzums varētu būt gandrīz ideāli apstākļi HILIC metodēm, kurās jaukta režīma mijiedarbība, ieskaitot jonu mijiedarbību ar silanola grupām, nav vēlama. Bufēršķīduma pH, kas zemāks par pH 3,2, stacionārajai fāzei nav vēlams, jo tas aktivizē hidrolīzi [65].

### **Sulfoalkilbetaīna silikagels**

Jaunākais papildinājums HILIC fāžu paletei pamatojas uz polimēra slāņa ar sulfoalkilbetaīna cviterjonu grupām (3-sulfopropildimetilalkilamonija iekšējā sāls) kā funkcionālajām grupām uz lielporu silikagela. Ceturtējā amonija un sulfonskābes grupu klātie molārā attiecībā 1:1 uz atsevišķa, izvirzīta fragmenta nodrošina summā elektroneitralitāti, tomēr sulfoalkilbetaīna cviterjoni joprojām ir stipri osmolīti ar labām spējām piesaistīt virsmai ūdeni [66]. Veids, kādā šīs fāzes mijiedarbojas ar ūdeni, ir ļoti īpatnējs, jo daļa no shēmas (1.1. att.) ir ūdens slāņa izveidošana. Ar sulfoalkilbetaīna cviterjonu polimēriem šķīdumos saistītā ūdens ūdeņraža saišu shēma, cik zināms, mainās maz, un ūdens saistībā ar šādiem cviterjoniem pastāv kā šķīdra ūdens masa [67-69]. Šie

materiāli sākotnēji tika izstrādāti neorganisko sāļu, mazu jonu tipa savienojumu un arī olbaltumvielu atdalīšanai, bet tikai ūdeni saturošos eluentos ar zemu sāļu saturu [70-73], taču mūsdienās to plašākais pielietojums HILIC ir dēļ to ūdeni aizturošajām īpašībām cviterjonu vidē un zemā virsmas lādiņa, kas neveicina stipru jonu apmaiņas mijiedarbību. Šādu sorbentu selektivitāte atbilst HILIC vispārējām sakarībām ar palielinātu sorbciju kā izšķīdinātās vielas polaritātes funkciju, bet lielākoties bez nemodificēta silikagela vai aminogrupas saturošu materiālu silanofilajām un jonu aizturēšanas īpašībām. Tam ir vājš devums no sulfongrupas puses, iespējams, no tālākās lādētās vietas cviterjoniskajā funkcionālajā grupā (1.1. att.). Šis nelielais papildus lādiņš ir būtiski neatkarīgs no pH un var tikt regulēts, pievienojot haotropus/kosmotropus sāļus vai divlādiņa katjonus milimolārās koncentrācijas [70-73]. Sulfoalkilbetaīna cviterjonu fāze uz silikagela bāzes tika salīdzināta ar nemodificētu silikagelu, ar aminopropil-silikagelu un amīda silikagelu, un konstatēts, ka sulfoalkilbetaīna cviterjonu fāzi vismazāk – no salīdzinātajām kolonnām – ietekmē pH izmaiņas. Tika ievērots arī, ka sulfoalkilbetaīna sorbents atšķiras no citām pētītajām, brīvi pieejamajām HILIC stacionārajām fāzēm [32].

HILIC apstākļos ar ūdeni bagātinātais šķidrums slānis tiek izveidots stacionārās fāzes iekšienē, un parasti eluentā organiskā šķīdinātāja saturs ir augsts. Pretēji AFŠH, vielas tiek izdalītas hidrofilītātes pieauguma (hidrofobitātes samazināšanās) secībā. Atdalīšana tiek panākta, analizējamajām vielām migrējot no eluenta uz hidrofilo vidi uz stacionārās fāzes virsmas; process parasti ir eksotermisks. Tādējādi gan ūdeņraža saites, kuru stiprums atkarīgs no izšķīdināto vielu skābuma vai bāziskuma, gan dipolu-dipolu mijiedarbība, kas atkarīga no izšķīdināto vielu dipolmomentiem un polarizējamības, ir izdalīšanas laiku noteicošie faktori. Ja izmanto lādētu stacionāro fāzi, izdalīšanas laiku ietekmēs arī elektrostatiskā jonu mijiedarbība. Šajā metodē cviterjonu hidrofilā stacionārā fāze demonstrē vāju elektrostatisko mijiedarbību vai nu ar pozitīvu, vai negatīvu lādiņu. Tāda pieeja vienlaikus izdevīgi izmanto gan cviterjonisko lādiņu veidu, gan to hidrofilās īpašības, piemēram, papildus hidroksilgrupu dotās. Tas var dot ievērojamus izdalīšanas laikus pašām hidrofilākajām un lādētajām vielām. Jāpiebilst, ka cviterjonu stacionārajai fāzei ir kustīgai fāzē izvirzīta negatīvi lādēta sulfonskābes grupa, un pozitīvi lādēta ceturtējā amonija grupa „paslēpta” alkilķēdē. Tāpēc jebkuras pozitīvi lādētas analizējamās vielas pievilkšanās pie cviterjonu stacionārās fāzes sulfonskābes grupas ir stiprāka par atbilstošu mijiedarbību starp analizējamās vielas negatīvo lādiņu un cviterjonu stacionārās fāzes pozitīvi lādēto grupu. Analogiski, analizējamās vielas ar negatīvo lādiņu tiek stiprāk

sulfonskābju grupu atgrūstas nekā pozitīvi lādētās vielas atgrūž „slēptās” amonija grupas. Kopā tas palielina izdalīšanas laikus negatīvi lādētām analizējamajām vielām [74]. Ņemot vērā, ka HILIC sorbenti savā starpā ļoti būtiski atšķiras, ir kļuvis nepieciešams sīkāk izpētīt dažādu sorbentu mijiedarbību ar slāpekli saturošiem savienojumiem.

### 1.5. Organiskie šķīdinātāji un kustīgās fāzes HILIC režīmā

AEŠH-MS metodes selektivitāte un jutīgums atkarīgi ne tikai no jonizēšanas veida, bet arī no AEŠH metodes. Viens no svarīgākajiem parametriem ir kustīgas fāzes sastāvs. Organiskā šķīdinātāja (acetonitrila, metanola, etanola, izopropanola, acetona, tetrahidrofurāna) koncentrācijas maiņa ir universāls līdzeklis izdalīšanas laika regulēšanā, selektivitātes un jutīguma ietekmēšanā.

HILIC kustīgās fāzes organiskos komponentus var iedalīt polāros protonajos un aprotonajos šķīdinātājos. Metanols, etanols un izopropanols pārstāv polāros protonos šķīdinātājus. Polāro aprotono šķīdinātāju piemēri ir acetonitrils un tetrahidrofurāns. Protonie šķīdinātāji ūdeņraža saitēm var būt gan donori, gan akceptori, bet aprotonie šķīdinātāji var būt tikai ūdeņraža saišu akceptori. Spējot veidot ūdeņraža saites, protonie šķīdinātāji var konkurēt uz stacionārās fāzes virsmas aktīvajiem centriem, traucējot ūdens slāņa veidošanos uz šīs virsmas, tādējādi padarot stacionāro fāzi mazāk hidrofilu. Tā rezultātā pētāmās vielas ar spēcīgu ūdeņraža saišu veidošanās potenciālu tiek izdalītas vāji.

Ūdeņraža saišu stiprās veidošanās spējas dēļ metanols var traucēt ūdens saistīšanos uz silīcija dioksīda virsmas, aizvietojojot ūdens molekulas un izveidojot vairāk hidrofobu stacionāro fāzi [75]. Tā (nestabila ūdens slāņa) rezultātā jonu veidā šķīdumā esošās vielas tiek sorbētas vāji. Izopropanola zemāko hidrofilitāti (salīdzinot ar metanolu) izraisa garāka alkilgrupa. Un tas mazāk aktīvi aizņem stacionārās fāzes aktīvos centrus, atstājot daudz vairāk vietas izšķīdināto vielu molekulu adsorbijai. Ūdeņraža saišu veidošanās starp šķīdinātāja un izšķīdinātās vielas molekulām aktivizējas gan kustīgajā, gan stacionārajā fāzē, ievērojami ietekmējot vielu izdalīšanu un šķīdinātāju selektivitāti. Pretēji metanolam un izopropanolam, acetonitrila un THF ūdeņraža saišu donora spēks (apzīmē ar ‘ $\alpha$ ’) ir vājš, attiecīgi 0,15 un 0,01. Eluējošais spēks MeCN un THF ir aptuveni vienāds, taču pētāmās vielas MeCN sorbējas stiprāk nekā THF. Tas tāpēc, ka THF ir labāks ūdeņraža saišu akceptors (atbilstošo koeficientu sauc ‘ $\beta$ ’) kā acetonitrils, un šķīdinātāja/izšķīdinātās vielas lokalizācijas efekts korelē ar šķīdinātāja konstanti  $\beta$  [45]. Jo lielāks ir šķīdinātāja

raksturlielums  $\beta$ , jo zemāka kļūst bāziskās analizējamās vielas pKa vērtība [76]. Koeficients  $\beta$  vērtības THF un MeCN ir atbilstoši 0,49 un 0,25.

Ir konstatēts, ka izdalīšanās faktori izšķīdinātajām vielām ir tieši proporcionāli šo vielu aminogrupu pKa (ar metanolu kustīgajā fāzē) [77]. Šie rezultāti atkal demonstrē, ka jonu apmaiņas mijiedarbība neapšaubāmi dominē vielu izdalīšanas mehānismā, jo silikagela (silīcija dioksīda) silanolgrupas pie augstāka pH ir jonizētas, kas pavājina adsorbcijas mijiedarbību starp metanolu un silikagela virsmu.

Analizējamā parauga atšķaidīšanas šķīdinātājs var spēcīgi ietekmēt analizējamo vielu izdalīšanās smaīļu formas [78, 79]. Paraugu šķīdinātāja īpašībām jābūt pēc iespējami tuvākām kustīgās fāzes sastāvam. Smaīles forma uzlabojas, samazinot ūdens saturu parauga šķīdinātājā. Tomēr, samazinot ūdeni pilnīgi, piemēram, pagatavojot paraugu 100% metanolā, tiek novērotas platas smaīles un savienojumu izšķiršana samazinās. Kastels ar kolēģiem [79] izvērtējuši, ka labākais kompromiss starp šķīdību un smaīles formu ir 75:25 (v/v) acetonitrila un metanola maisījums. Ir jāatgādina, ka šķīdība organisko šķīdinātāju maisījumos ir individuāla katrai vielai un tā jāoptimizē katrai vielai.

Ir svarīgi atcerēties, ka organiskie šķīdinātāji kustīgajā fāzē spēj mainīt gan buferšķīduma, gan analizējamās vielas pKa. Tas, protams, nobīda protolītisko līdzsvaru, izmainot hromatografēšanas apstākļus.

Ir pētnieki, kuri pētījuši ūdens aizvietošanu kustīgajā fāzē ar citiem polāriem šķīdinātājiem, visbiežāk ar spirtiem [46]. Šādos apstākļos hidrofilā mijiedarbība joprojām tiek novērota, taču lielāks (aptuveni divreiz) metanola saturs nepieciešams, lai nodrošinātu tādu sorbciju kā ūdeni saturošā kustīgajā fāzē. Daži savienojumi eluējas ‘‘mirušajā’’ tilpuma zonā pat ar 100% n-propanolu, domājams, hidrofilītāti samazinošās garākās alkilgrupas dēļ.

HILIC režīmā silikagela virsmas silanolgrupu jonizēšanās var būt vērā ņemams analizējamās vielas izdalīšanas faktors. Tieši silanola jonizācija vai nu piesaista imobilizēto ūdens slāni, veicinot HILIC mijiedarbību, vai arī tieši iesaistās jonu apmaiņā; abi procesi uzlabo analizējamās vielas mijiedarbību ar stacionāro fāzi, tātad uzlabo vielas izdalīšanu. Mijiedarbība starp stacionārās fāzes Si-OH un polārām analizējamām vielām – gan HILIC veidā, gan jonu apmaiņā – kļūst vājāka, pastiprinoties kustīgas fāzes skābumam [80].

Elektrostatiskās jonu hromatogrāfijas (EIC) jeb, kā to vēlāk nosauca, cviterjoniskās jonu hromatogrāfijas (ZIC) koncepciju ar cviterjonu stacionāro fāzi jonu atdalīšanai pirmoreiz piedāvāja Hu ar kolēģiem 1993. gadā. [81]. Šī atdalīšana izmanto cviterjonu stacionāro fāzi, kas saglabā fiksētus pozitīvos un negatīvos lādiņus cieši vienu pie otra.

Analizējamās vielas joni var piekļūt gan fiksētam pozitīvajam lādiņam (anjonu gadījumā), gan fiksētam negatīvajam lādiņam (katjona gadījumā). Lādiņu tuvības dēļ analizējamās vielas joni vienlaikus tiks gan pievilkti, gan atgrūsti. Šādi tiek panākta neatkārtojama un reizēm sarežģīta selektivitāte. Daudzi pētījumi cenšas noformulēt lādiņu mijiedarbības molekulārā līmenī. Hu un Haddads, skaidrojot izdalīšanas mehānismus, ziņoja par elektriskā dubultslāņa veidošanos [82, 83]. Okada un Patils modelēja cviterjonu izdalīšanu, balstoties uz Puasona-Bolcmaņa teoriju [84]. Donnana membrānas veidošanās apvienoja iepriekšējās teorijas – Hu (elektriskais dubultslānis) un Patila (lādētās virsmas) – lai izskaidrotu gan eluēšanas secību, gan kustīgās fāzes sastāva ietekmi uz analītu izdalīšanu [85,86]. Ir publicēti tikai daži pielietojumi, kas izmanto šīs neparastās stacionārās fāzes atdalošo spēku [87]. Jonsons un Apelblads demonstrēja polāru un hidrofilu savienojumu atdalīšanu, lietojot sulfobetaīna tipa cviterjonu stacionārās fāzes. Viņu raksts pievērsa uzmanību selektivitātei no HILIC viedokļa, un acetonnitrila un metanola ietekme tika vērtēta pēc RNS-DNS bāzu izdalīšanu rezultātiem amonija formiāta buferšķīduma sistēmā [88].

Atdalīšanas mehānismu (tas ir, HILIC un EIC) kombinēšana teorētiski var sarežģīt atdalīšanas mehānisma izprašanu; tomēr cviterjonu kolonnas efektivitāti būtiski uzlabo organisko šķīdinātāju pievienošana kustīgajai fāzei, lai izmantotu HILIC efektu. Ir jau pierādīts, ka acetonnitrils HILIC efektu pastiprina vairāk nekā metanols [88].

pH diapazonā no 3,1 līdz 6,6 sulfobetaīna tipa cviterjonu stacionārā fāze saglabā savus stabilos pozitīvos un negatīvos lādiņus. Palielinoties kustīgās fāzes pH (norādītajā diapazonā), izdalīšanas laiki visiem katjoniem palielinās un visiem anjoniem – samazinās. Katjonu izdalīšanas laiku izmaiņu, domājams, izraisa ūdeņraža jonu ( $H^+$ ) mijiedarbība ar cviterjona negatīvi lādēto daļu ( $SO_3^-$ ), šādi pie zemāka pH pilnīgi ekranējot no katjona. Anjoni darbojas pēc jonu apmaiņas standartteorijas. Šie paši pētījumi parādīja, ka, mainot amonija acetāta buferšķīduma koncentrāciju no 10 mM līdz 200 mM, krasi mainās smaiļu forma un izdalīšanās laiks. Par smaiļu formu runājot: buferšķīduma zemākajās koncentrācijās katjonu hromatogrāfiskajām smailēm bija ‘aizmugures astes’, bet augstākajās koncentrācijās šīm smailēm bija ‘astes priekšā’. No šiem rezultātiem turpmākajiem pētījumiem tika ieteikts buferšķīduma koncentrāciju diapazons no 50 līdz 100 mM. Šādas koncentrācijas buferšķīdumus ir problemātiski savietot ar kustīgās fāzes organisko daļu (acetonnitrilu): šķīdība ir ierobežota. Bez tam, augsta buferšķīduma koncentrācija nav pieņemama MS detektoram [87].



Izdalīšanās laika izmaiņas var izskaidrot ar divdaļīgu mehānismu. Mijiedarbības pamatmehānisms HILIC režīmā balstās uz jonu iekļūšanu ūdens slānī uz stacionārās fāzes virsmas, tāpēc izdalīšanas laika samazināšanos vislabāk var saprast kā līdzsvara koncentrāciju nobīdi. Tā kā buferšķīduma katjona ( $\text{NH}_4^+$ ) koncentrācija pārsvarā pieaug ūdens slānī, analizējamās vielas pretjoniem ir mazāk iespēju iekļūt ūdens slānī. Tādējādi, šie joni tiek izdzīti caur kolonnu (galvenokārt paliekot organiskajā slānī), maz mijiedarbojoties ar kolonnas pildījumu vai ūdens slāni. Bez tam,  $\text{NH}_4^+$  intensīvi iedarbojoties uz  $\text{SO}_3^-$  fiksēto negatīvo lādiņu, un buferšķīduma koncentrācijai pieaugot, samazinās piekļuve šiem fiksētajiem lādiņiem. Rezultātā katjoni nepieķeras  $\text{SO}_3^-$  un izdalīšanas laiks palielinās; anjonu sorbcija tiek ietekmēta pretējā veidā. Anjoni nesaņem no  $\text{SO}_3^-$  grupas tradicionālo atgrūšanu, tāpēc var piekļūt trešējam amīnam, lai veiktu jonu apmaiņu. Šī jonu apmaiņas mijiedarbība palielina izdalīšanu laiku anjoniem [87].

Džiāngs un Fišers pētīja peptīdus HILIC režīmā. Peptīdi ir amfotēras molekulas, kuru lādiņi mainās atkarībā no vides pH. Šo molekulu summārais lādiņš ir nulle pie  $\text{pH}=\text{pI}$  (izoelektriskais punkts) un pieaug, samazinot buferšķīduma pH un pretēji; tā notiek, protonējoties un disociējot peptīda vāji skābām vai bāziskām sānvirknēm un amino- un karboksilgrupu galiem. Šajā pētījumā teikts, ka hidrofilās mijiedarbības intensitāte un kustīgas fāzes īpašības tika uzturētas konstantas (mainot bufera pH, bet acetoni-trila saturu un buferšķīduma koncentrāciju uzturot konstantus), un izdalīšanas laiki atkarīgi galvenokārt no peptīda un stacionārās fāzes lādiņu izmaiņām [89]. Tādā veidā izdalīšanas laikus var salīdzināt arī no pH atkarīgā peptīda lādiņa. Palielinot pH no 3 līdz 7, nelielu peptīdu izdalīšanas faktora ( $k$ ) vērtības nedaudz samazinājās. To var izskaidrot ar palielinātu pozitīvo lādiņu kopā ar peptīdu palielināto hidrofilitāti pie zemākiem pH, kas savukārt palielina izdalīšanas faktoros HILIC sadalīšanas režīmā. Pretēju sakarību konstatējis Guo ar kolēģiem, tas ir: pozitīvs lādiņš pie zemāka pH izraisa stipru izdalīšanas laiku samazinājumu AF-AEŠH režīmā [89, 90]. Mazie peptīdi tiek labi atdalīti (viens no otra), izmantojot hidrofilās mijiedarbības un stacionārās fāzes/analizējamo vielu jonu mijiedarbības mehānismu. Salīdzinot ar nemodificētu silikagelu, cviterjonu sorbents parādīja stabilākus izdalīšanas laikus bāziskiem peptīdiem pH diapazonā no 3 līdz 7 un augstākus izdalīšanas faktoros skābajiem peptīdiem. Arī jonu mijiedarbības ieguldījums pie  $\text{pH}>5$  cviterjonu sorbentam bija mazāks nekā silikagelam, un to var novērst pavisam, palielinot buferšķīduma koncentrāciju eluentā virs 20 mM.

Peks un Rislijs izmantojot silikagela kolonnu HILIC režīmā, nonāca pie secinājuma, ka organiskā šķīdinātāja satura palielināšana kustīgajā fāzē būtiski palielina katjonu

izdalīšanas laikus. Papildus tam, stacionārai fāzei vajadzētu daļēji uzrādīt jonu apmaiņas īpašības; tātad katjonu izdalīšanu vajadzētu ietekmēt buferšķīduma koncentrācijas un pH izmaiņas. Peks un Rislijs eksperimentāli pierādīja: palielinot amonija acetāta buferšķīduma (pH 6,65) koncentrāciju no 10 līdz 200 mM, katjonu izdalīšanas laiki samazinās 2-4 reizes. Samazinot pH no 6,65 uz 3,55 pie konstantas buferšķīduma koncentrācijas (50 mM amonija acetāta), tika novērots, ka katjonu izdalīšanas laiks samazinājās aptuveni par vienu trešdaļu. Visus šos novērojumus var piedēvēt aktīvajiem silanola centriem un jonu apmaiņai [29].

HILIC režīmā parasti tiek izmantotas trīs tipu kustīgās fāzes: acetonitrils/ūdens, acetonitrils/sāls šķīdums vai acetonitrils/buferšķīdums. Kustīgās fāzes tips jāizvēlas pēc analizējamo vielu ķīmiskajām īpašībām. Piemēram, neitrālām molekulām priekšroka dodama acetonitrila/ūdens kustīgajai fāzei, taču iespējams lietot jebkuru no trim minētajiem tipiem. Kustīgās fāzes acetonitrila/buferšķīduma tips ir labākais vājām skābēm vai vājām bāzēm, kā arī paraugiem, kuros ir nezināmi komponenti. Izmantojot kustīgo fāzi ar sāls šķīdumu (amonija hlorīds, taču ar UV diožu matricas detektoru), novērotas likumsakarības, kas saskan ar HILIC izdalīšanas mehānismu. Tika izteikts pieņēmums, ka uz polāras stacionārās fāzes virsmas varētu atrasties stāvošs ūdens slānis, kas izšķīdinātajām vielām nodrošinātu fāžu pārejas mijiedarbību. Jonizētam analītam bez sāļu vai buferšķīdumu klātbūtnes ir krietni lielāka iespēja palikt ūdens slānī. Tādējādi izšķīdinātajām vielām ir vai nu liels izdalīšanas laiks vai arī tās paliek kolonnā. Sāls koncentrāciju palielinot, pretjonu pārākuma klātie veicinās jonizētu izšķīdušo vielu jonu pāru veidošanās. Izveidotie jonu pāri ir labāk šķīstoši kustīgajā fāzē, un līdz ar to izdalīšanas laiki samazināsies [38].

Šobrīd visi HILIC kolonnu ražotāji iesaka izmantot buferētus eluentus, lai samazinātu elektrostātisko mijiedarbību starp lādētām analizējamajām vielām un deprotonētām stacionārās fāzes silanolgrupām. Šāda mijiedarbība ir svarīgs faktors visu modifikāciju HILIC kolonnām, atdalot lādētas molekulas; piemēram, bāziskas vielas var tikt atdalītas ar jonu apmaiņas mehānisma palīdzību uz tīra silikagela. Ir pierādīts, ka kolonnas ar augstāku silikagela tīrības pakāpi nodrošina mazākus izdalīšanas laikus un mazāku selektivitāti nekā silikagela kolonnas ar metālu piemaisījumiem sorbentā [91, 92]. Tas tiek skaidrots kā kombinētais mehānisms, ko izraisījis silanolu paaugstinātais skābums, ko aktivē metāla piemaisījumi (visbiežāk – alumīnija vai dzelzs) tuvums. Ir jāpievērš uzmanība, ka šie eksperimenti veikti ar samērā augstu ūdens daudzumu saturošiem eluentiem, padarot AF sorbentu vai tiešu mijiedarbību ar metāla joniem par sekundāro sadalīšanas mehānismu.

Šie atklājumi būtu jāizmanto arī HILIC sistēmās. Skābo vai negatīvi lādēto daļiņu elektrostatiskā atgrūšana var izraisīt šādu vielu pilnīgu atgrūšanu no silikagela porām. Visieteicamākie ir amonija sāļi - formiāts vai acetāts, jo tiem ir laba šķīdība kustīgajā fāzē ar augstu acetonitrila saturu, buferēšanas diapazons pieņemams vairumam HILIC metožu, un tie savas gaistamības dēļ ir pieņemami AEŠH masspektrālai (MS) detektēšanai [9].

Daudzi apgrieztās fāzes hromatogrāfijai tradicionālie sāļi nav izmantojami HILIC, jo tie vāji šķīst kustīgajā fāzē ar augstu MeCN saturu. HILIC izmanto ne tikai amonija acetātu un formiātu, bet arī citus sāļus ar relatīvi labu šķīdību organiskajos šķīdinātājos: amonija hidrogenkarbonātus, trietilamonija fosfātu un nātrija perhlorātu. Taču pēdējie divi sāļi nav pieņemami MS detektēšanai.

Fakts, ka izdalīšanas laiks HILIC režīmā pieaug salīdzinot ar AFŠH, tika novērots. Izdalīšanas laika palielināšanās var būt izsaukta nevis no kādas specifiskas mijiedarbības ar stacionāro fāzu funkcionālajām grupām, bet no hidrofilās nošķiršanās procesa. HILIC atdalīšanās modelī ietverts ar ūdeni piesātināts slānis uz poru virsmas [1]. Augsta organiskā šķīdinātāja koncentrācija kustīgajā fāzē liek sālim pāriet uz ūdeni saturošo slāni. Augstāka sāls koncentrācija ar ūdeni bagātinātajā slānī izspiedīs vairāk solvatētus sāls jonus. Tas palielinās šķidrums slāņa apjomu vai hidrofilītāti, palielinot izšķīdināto vielu izdalīšanas laiku [32].

Svarīgākais mijiedarbības mehānisms HILIC režīmā balstās uz jonu iekļūšanu un izkļūšanu no ūdeni saturoša, mazkustīga slāņa uz silikagela virsmas. Izdalīšanas laiks vislabāk izprotams kā līdzsvara koncentrācijas nobīde un jonu apmaiņa ar aktīvajām silanola grupām. Tā kā amonija jonu saturs palielinās ūdeni saturošajā slānī, analizējamās vielas pretjoniem ir mazāka iespēja iespiesties mazkustīgā ūdens slānī, pamatojoties uz difūzijas gradientu. Buferšķīduma koncentrācijas pieaugums konkurē ar aktīvajām silanola grupām, tas samazina pozitīvi lādēto analizējamo vielu spēju mijiedarboties ar šīm grupām. Tādējādi, joni iziet caur kolonnu (lielākoties paliekot organiskajā slānī), mazāk mijiedarbojoties ar kolonnu un ar ūdeni saturošo fāzi. Līdz ar izdalīšanas laika izmaiņām, buferšķīduma koncentrācija ietekmē arī smailes formu. Ļoti zemās buferšķīduma koncentrācijās (10 mM) novērojama smailes asimetrija. Palielinot bufera koncentrāciju, smailes simetriskums uzlabojas. Šis efekts apstiprina apgalvojumu, ka jonu apmaiņa ir daļa no aiztures mehānisma [30].

Ir publikācijas par sāls koncentrācijas ietekmi HILIC sorbentos, taču nav atrodama informācija par 1.1. tabulā apskatītajiem savienojumiem [8, 29, 32, 38, 93].

## 1.6. Temperatūras ietekme AEŠH un HILIC režīmā

Kustīgās fāzes sastāvs un kolonnas temperatūra ir maināmi parametri, kas plaši tiek lietoti adsorbcijas procesu kontrolēšanai AF hromatogrāfijā. Ir veikti vairāki pētījumi par kustīgās fāzes sastāvu un temperatūras ietekmi uz to [94-96]. Ir konstatēts, ka temperatūra izdalīšanas laika samazināšanai ir mazāk efektīva nekā šķīdinātāja stiprums. Liela temperatūras ietekme tika novērota tikai jonizējamiem savienojumiem, tāpēc manipulācija ar temperatūru ir noderīgs instruments galvenokārt jonu apmaiņas un jonu pāru hromatogrāfijā [96]. Neitrāliem komponentiem temperatūras izmaiņa par 4-5 grādiem atbilst aptuveni 1% kustīgās fāzes sastāva izmaiņai [94, 95]. Taču izmantojamais temperatūras diapazons parasti ir ierobežots no istabas temperatūras līdz 50-60 °C, jo klasiskās modificētās silikagela stacionārās fāzes ir termiski nestabilas, un ekspluatācijai augstākās temperatūrās nepieciešamas noturīgas, termiski stabilas jaunāko paaudžu kolonnas, taču tās ir dārgas. Augstākas temperatūras izmantošana var izraisīt arī termiski nestabilu izšķīdināto vielu sadalīšanos.

Tomēr šķīdinātāja stipruma un temperatūras optimizēšana var dot spēcīgu ietekmi apgrieztās fāzes hromatogrāfijas atdalīšanas efektivitātē, uzlabojot atdalīšanas selektivitāti un kolonnas efektivitāti. Temperatūras svarīguma atzīšana balstās uz labi zināmiem kustīgās fāzes viskozitātes samazināšanās un izšķīdinātās vielas difuzivitātes efektiem. Pirmais efekts izraisa spiediena pazemināšanos kolonnā, ļaujot palielināt plūsmas ātrumu. Tas uzlabo procesa ražīgumu, kas tieši saistīta ar atdalīšanas procesa ātrumu. Palielinātas difuzivitātes rezultāts ir straujāka masas pārnese kinētika, kas uzlabo kolonnas efektivitāti.

Sakarību starp izdalīšanās faktoru ( $k$ ) un kolonnas temperatūru ( $T$ ) AFŠH bieži apraksta ar vant Hofa vienādojumu [97]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi, \quad (1.1)$$

kur  $\Delta H^0$  un  $\Delta S^0$  ir sorbcijas entalpija un entropija,

$R$  – gāzu universālā konstante.

$\phi$  – fāžu attiecība,  $T$  – absolūtā temperatūra.

Ja polāru savienojumu izdalīšanu HILIC režīmā izraisa fāžu pāreja starp pārsvarā organiska satura kustīgo fāzi un ar ūdeni bagātu šķidrums slāni uz kolonnas pildījuma virsmas, kā ierosinājis Alpert [1], tad van't Hofa vienādojums ir piemērojams arī HILIC.

Ir pētījumi, kuros attiecību starp izdalīšanas faktoru ( $k$ ) un ūdens saturu kustīgajā fāzē skaidro izšķīdināto vielu fāžu pārejas un/vai sorbcijas mehānismu [98]. Bez tam, izšķīdināto vielu sakarības līknes vielām, kurām ir vairāki polāri interaktīvi centri, ir stāvāki, un parasti negatīvās entalpijas vērtības ir lielākas polārākajām fāzēm un polārākajām analizējamajām vielām.

Jonu apmaiņas hromatogrāfijā entalpijas izmaiņas parasti ir lielas, un pārsvarā ir sorbcijas mijiedarbība. Entalpijas izmaiņas var būt gan pozitīvas, gan negatīvas (eksotermiskas vai endotermiskas reakcijas), un jonu apmaiņa parasti būtiski ietekmē izdalīšanās laiku. Tāpēc visai bieži literatūrā aprakstīta hromatogrāfija augstākā temperatūrā.

Apgrīztās fāzes hromatogrāfijā sorbcijas mijiedarbības parasti ir eksotermiskas ar relatīvi nelielām izmaiņām entalpijā. Tas parasti izpaužas tikai pieticīgā izdalīšanas laika samazinājumā, temperatūru palielinot, pretēji jonu apmaiņas hromatogrāfijā notiekošajam [98-100].

Kad paaugstināta temperatūra tiek apspriesta hromatogrāfistu aprindās, parasti tiek pieminēts temperatūras izraisītais sistēmas spiediena samazinājums, no kā izriet dažādas ekspluatācijas priekšrocības. Zemāks spiediens samazina slodzi uz detaļām (vārstuļiem, blīvēm u.c.) un rada iespēju izmantot lielāku plūsmas ātrumu, ja ir tāda vēlēšanās. Tas kļūst īpaši svarīgi, izmantojot dažas mūsdienīgās kolonnas, kuru pildījuma daļiņas ar diametru 1,7  $\mu\text{m}$  dod iespēju palielināt spiedienu vairāk nekā plaši lietotās kolonnās ar 5  $\mu\text{m}$  sorbenta daļiņu izmēru.

Kolonnas temperatūra var ietekmēt entalpiju, analizējamajai vielai pārejot no kustīgās fāzes stacionārajā, it īpaši – ja tas saistīts ar jonu mijiedarbībām [95]. Dongs un Huangs pētīja bāziskus savienojumus, kur vant Hofa līknem ir negatīvs virziena koeficients [101]. Tas nozīmē, ka izdalīšanas laiki šīm vielām mainās netradicionāli: tie palielinās, temperatūrai pieaugot. Minētie autori vienlaikus novēroja arī kolonnas šķīvju skaita pieaugumu, tādējādi kolonnas temperatūras palielināšana uzlaboja pētīto savienojumu hromatogrāfisko smaiļu izšķiršanu.

Literatūrā ir vairākas publikācijas par HILIC kolonnu temperatūras ietekmes pētījumiem [30, 65, 77, 93], taču nekāda informācija nebija atrodama par 1.1. tabulā uzskaitītajiem savienojumiem, un ir vērts izpētīt slāpekļa saturošus savienojumu izturēšanos atkarībā no kolonnas temperatūrās.

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

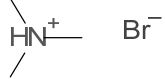
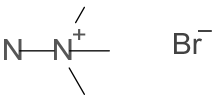
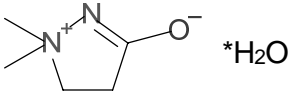
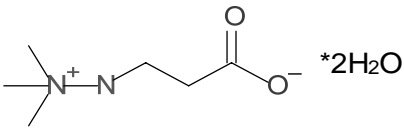
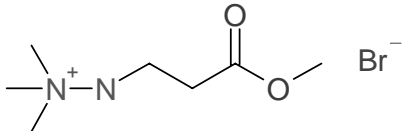
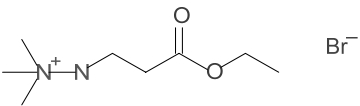
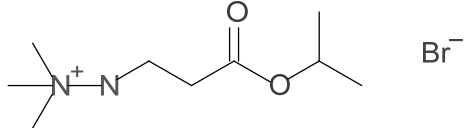
### 2.1. Darbā izmantotie reaģenti un pētītie paraugi:

Analīzes tika veiktas, izmantojot sekojošus reaģentus un palīgvielas.

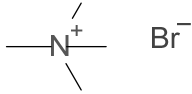
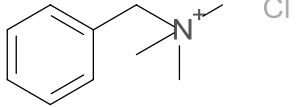
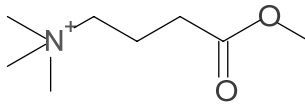
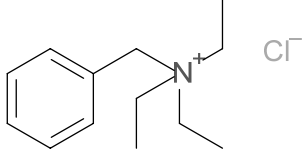
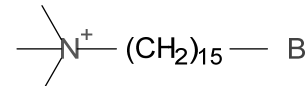
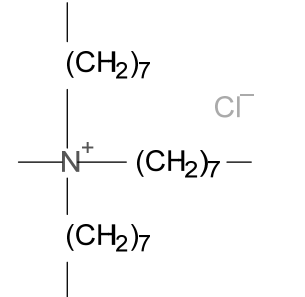
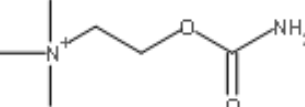
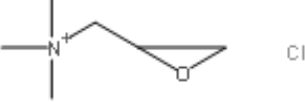
1. Dejonizēts ūdens H<sub>2</sub>O (Millipore MilliQ-plus gradient) (R<sub>z</sub>≥18,2 MΩ·cm; TOC: 3 μg l<sup>-1</sup>);
2. Metanols, (Merck, AEŠH tīrība);
3. Acetonitrils, (Merck, AEŠH tīrība);
4. Tetrahidrofurāns, (Merck, AEŠH tīrība);
5. Izopropanols, (Across organics, AEŠH tīrība);
6. Acetons, (Merck, AEŠH tīrība);
7. Etanols, (Merck, AEŠH tīrība);
8. Heptafluorsviestskābe, (Merck, AEŠH tīrība);
9. Trifluoretiķskābe, (Acros organics, tīrība > 98%);
10. Skudrskābe, (Acros Organics, tīrība > 99,7%);
11. Amonija formiāts, (Fluka, tīrība > 99,0 %);
12. Amonija acetāts;
13. Amonija propionāts;
14. Amonija butirāts;
15. Amonija izobutirāts;
16. Amonija trifluoracetāts;
17. Amonija heptafluorbutirāts;
18. Fosforskābe, (Merck, 58 %);
19. Membrānfiltri – 0,22 μm kustīgās fāzes filtrēšanai (Millipore);
20. Analītiskie svāri Sartorius MP21 (max 120 mg; ± 0,01mg);
21. pH metrs – InoLab (± 0,01);
22. Millipore kustīgas fāzes filtrēšanas iekārta, ar Air Admiral vakuumsūkni;

2.1. tabula

## Pētījumā izmantotie savienojumu raksturojums

Nr.	Savienojuma nosaukums	Struktūrformula	Tīrība, %
1	2	3	4
<u>1.</u>	Trimetilamonija bromīds		99,2
<u>2.</u>	1,1,1-Trimetilhidrazīnija bromīds		99,5
<u>3.</u>	3-Hidroksi-1,1-dimetil-4,5-dihidro-1H-pirazolīnija-1-betaīna hidrāts		98,8
<u>4.</u>	3-(2,2,2-Trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrāts		99,3
<u>5.</u>	Metil-3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)-propionāta bromīds		99,1
<u>6.</u>	Etil-3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāta bromīds		99,0
<u>7.</u>	Prop-2-il 3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāta bromīds		99,0

2.1. tabulas turpinājums

1	2	3	4
<u>8.</u>	Tetrametilamonija bromīds		98,7
<u>9.</u>	Benzil(trimetil)amonija hlorīds		99,2
<u>10.</u>	Metil-4- (1,1,1 – trimetilamonij)butīrate hlorīds		98,8
<u>11.</u>	Benzil(trietil)amonija hlorīds		98,0
<u>12.</u>	Heksadecil(trimetil)amonija bromīds		98,4
<u>13.</u>	Metil(trioktil)amonija hlorīds		98,6
<u>14.</u>	Karbamoiloksietil(trimetil)amonija hlorīds		99,2
<u>15.</u>	Trimetil(2,3-epoksipropil)amonija hlorīds		99,4



## 2.2. Hromatogrāfiskās kolonnas

Informācija par hromatogrāfiskām kolonnām ar to raksturlielumiem, kuras izmantotas pētījumos, apkopota ir 2.2.tabulā.

2.2. tabula

### Pētījumā izmantoto hromatogrāfisko kolonnu raksturojums

Nr.	Kolonna	Stacionārā fāze	Poru izmērs (Å)	Daļiņu izmērs (µm)	Specifiskais virsmas laukums (m <sup>2</sup> /g)	Kolonnas izmēri (mm)
1.	Discovery <sup>®</sup> Cyano	Cianosilikagels	180	5	200	2,1 x 100
2.	Hypersil APS-1	Amino silikagels	120	3	170	3,2 x 100
3.	Atlantis HILIC Silica	Silikagels	100	3	330	2,1 x 150
4.	Alltima HP Silica	Silikagels	100	3	450	2,1 x 150
5.	Spherisorb <sup>®</sup> Silica	Silikagels	80	3	220	2,1 x 100
6.	ZIC <sup>®</sup> -HILIC	Sulfobetaīns	200	5	135	2,1 x 100
7.	TSKgel Amide-80	Amīdsilikagels	80	5	313	2,0 x 100
8.	Spherisorb <sup>®</sup> NH <sub>2</sub>	Aminosilikagels	80	3	220	2,1 x 100
9.	Symmetry <sup>®</sup> C18	Oktadecilsilikagels	100	5	335	3,0 x 150
10.	Atlantis dC18	Oktadecilsilikagels	100	5	330	3,0 x 150

## 2.3. Aparatūra

*AEŠH* aparatūra - Waters 2695 Alliance, ar Quattro Micro API trīskāršais kvadrapolu masspektrometrs ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju. Analītiskais signāls tiek iegūts ar pozitīvu elektroizsmidzināšanas jonizācijas jonu režīmu, lietojot kolonnas un paraugu termostatēšanas un nepārtrauktu kustīgās fāzes degazēšanas iekārtu.

Darbā tika izmantoti sekojoši iekārtas darbības parametri:

Konusa spriegums 15 V

Kapilāra spriegums 3,0 kV

Sadursmju enerģija	20-35 V
Sadursmju gāze	Argons (tīrība 99,99999 %)
Jonu avota temperatūra	110 °C
Desolvatācijas temperatūra	220 °C
Iztvaicēšanas gāze (N <sub>2</sub> , 99,5 %)	500 L/h

Kustīgās fāzes plūsma 0,2 ml/min tika izmantota visiem eksperimentiem. Savienojumi tika pārbaudīti, izmantojot jonu pāreju monitoringa režīmu (multiple reaction monitoring - MRM) ar raksturīgam pārejām, kuras parādītas 2.3. tabulā. Masspektrometra darbība tika kontrolēta, izmantot MassLynx v. 4.0 Data System programmatūras nodrošinājumu. Konusa spriegums (skat. 2.3 tabula) katram savienojumam tika piemeklēts atsevišķi, izvēloties maksimālo analītiskā signāla jutību, protonējot molekulu ( $[M+H]^+$ ) un izmantojot tiešu izšķīdinātā savienojuma ievadišanu ar plūsmu 20  $\mu$ l/min. Pētāmo savienojumu šķīdumi ar masas koncentrāciju 1  $\mu$ g/ml tika pagatavoti, tos šķīdinot acetnitrila-ūdens (90:10, v/v) maisījumā.

### 2.3. tabula

#### Pētāmo savienojumu (skat. 2.1. tabulu) masspektrālā detektora parametri

Nr.	Konusa spriegums (V)	Sadursmju enerģija, eV	Skenēšanas pārejas, Da
<b>1.</b>	20	18	60→45
<b>2.</b>	25	15	75→59
<b>3.</b>	35	19	115→72
<b>4.</b>	25	18	147→59
<b>5.</b>	20	23	161→59
<b>6.</b>	22	23	175→58
<b>7.</b>	25	22	189→58
<b>8.</b>	25	26	74→58
<b>9.</b>	20	20	150→91
<b>10.</b>	25	10	160→101
<b>11.</b>	20	15	192→91
<b>12.</b>	30	30	284→60
<b>13.</b>	25	40	369→156
<b>14.</b>	21	26	147→88
<b>15.</b>	24	30	116→57

## 2.4. Aprēķinu formulas

Izdalīšanas faktoru  $k$ , kas raksturo sorbāta sadalījumu starp kustīgo un nekustīgo fāzi, no eksperimentā iegūtajiem rezultātiem aprēķina pēc 2.1. vienādojuma [102]:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (2.1.),$$

kur:

$t_R$  – izdalīšanas laiks, min;

$t_0$  – nesorbējošās vielas izdalīšanas laiks, min,

Lielums  $R_s$  raksturo divu blakus esošu joslu savstarpējo izšķiršanu (2.2. vienādojums) [102].

$$R_s = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1}, \quad (2.2.),$$

kur:

$R_s$  – izšķiršana;

$t_R$  - izdalīšanās laiks,

$w_2, w_1$  – blakus esošu joslu platumi augstuma pusē.

Hromatogrāfiskās sorbcijas entalpijas un entropijas vērtības tika aprēķinātas, izmantojot Van't Hofs līknes, izmantojot 2.3 vienādojumu [97].

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi, \quad (2.3.),$$

kur:

$k$ - sorbcijas koeficients;

$\Delta H^0$  – sorbcijas entalpija, kJ/mol;

$\Delta S^0$  – sorbcijas entropija, J/mol·K;

$T$  – absolūta temperatūra, K;

$R$  – gāzu universālā konstante, 8,314 J/mol·K;

$\phi$  - fāžu attiecība.

## **2.5. Jonu pāru hromatogrāfija ar masspektrālo detektoru**

Pagatavo pētāmo savienojumu 1-7 (2.1. tabula) šķīdumus 10% metanolā ar katra savienojuma masas koncentrāciju 1 µg/ml. Hromatogrāfisko kolonnu termostata temperatūru uzstāda 30 °C un visos eksperimentos izmanto nemainīgu ievadāmo parauga tilpumu - 20 µl. Par kustīgajām fāzēm izmantoti organiskais modifikators - MeOH 0,1% šķīdums (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) trifluoretiķskābē un heptafluorsviestskābē. Eluēšanai tiek lietots izokrātiskais un organiskā šķīdinātāja gradienta režīms. Pētījumā tika izmantotas analītiskās kolonnas Nr.9-10 (skat. 2.2. tabulu).

## **2.6. HILIC sorbenti un organiskie šķīdinātāji**

Pagatavo pētāmo savienojumu 1-7 (2.1. tabula) šķīdumus 90% acetonitrila šķīdumā ar katra savienojuma masas koncentrāciju 1 µg/ml. Hromatogrāfisko kolonnu termostata temperatūru uzstāda 30 °C un visos eksperimentos izmanto nemainīgu ievadāmo parauga tilpumu - 4 µl. Kā injektora sistēmas skalošanas šķīdinātājs tika lietots acetonitrils. Par kustīgajām fāzēm tika izmantoti: MeOH šķīdumi 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē dažādās attiecībās; EtOH šķīdums 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē; MeCN šķīdums 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē; acetona šķīdums 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē; iPrOH šķīdums 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē; THF šķīdums 0,1% (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābē. Eluēšana tiek veikta izokrātiskajā režīmā. Pētījumā tika izmantotas analītiskās kolonnas Nr.1-6 (skat. 2.2. tabulu).

## **2.7. Bufēršķīduma buferkapacitātes un pH ietekme**

Pagatavo pētāmo savienojumu 1-7 (2.1. tabula) šķīdumus 90% acetonitrilā, ar katra savienojuma masas koncentrāciju 1 µg/ml. Eksperimentos tika izmantots acetonitrils ar amonija formiātu dažādās šķīduma pH un masas koncentrācijās. Bufēršķīduma pH 5 tika ieregulēts ar 10 % v/v skudrskābes šķīdumu dejonizētā ūdenī (elektroda precizitāte ± 0,01), pirms tika pievienots acetonitrils. Hromatogrāfisko kolonnu termostata temperatūru uzstāda 30 °C un visos eksperimentos izmanto nemainīgu ievadāmo parauga tilpumu - 4 µl. Kā injektora sistēmas skalošanas šķīdinātājs tika lietots acetonitrils. Eluēšana tiek

veikta izokrātiskajā režīmā. Pētījumā tiek izmantotas analītiskās kolonnas Nr.3-8 (skat. 2.2. tabulu).

## 2.8. Kolonnas temperatūras ietekme

Pagatavo pētāmo savienojumu **1-7** (2.1. tabula) šķīdumus 90% acetonitrilā, ar katra savienojuma masas koncentrāciju 1 µg/ml. Hromatogrāfisko kolonnu termostata temperatūru ieregulē temperatūras diapazonā no 30 līdz 55 °C ar soli 5 °C. Kolonnā tika ievadīti 4 µl pagatavotā pētāmā savienojumu šķīduma. Kā injektora sistēmas skalošanas šķīdinātājs tika lietots acetonitrils.

Par kustīgajām fāzēm tika izmantoti sekojoši šķīdumi: 0,1 % (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābe – acetonitrils (attiecība 10/90); 0,1 % (1 ml/1000ml H<sub>2</sub>O) skudrskābe – metanols (attiecība 10/90), 15 % 5mM amonija formiāts ar pH 5 – 85 % acetonitrils. Izokrātiskajā režīmā tika veikta analīze. Pētījumā tika izmantotas analītiskās kolonnas Nr.3, 5-6 (skat. 2.2. tabulu).

## 2.9. Dažādu buferkomponentu ietekme

Pagatavo pētāmo savienojumu **1-2**; **5-15** (2.1. tabula) šķīdumus 90% acetonitrilā, ar katra savienojuma masas koncentrāciju 1 µg/ml. Hromatogrāfisko kolonnu termostata temperatūru uzstāda 30 °C un visos eksperimentos izmanto nemainīgu ievadāmo parauga tilpumu - 4 µl. Kā injektora sistēmas skalošanas šķīdinātājs tika lietots acetonitrils.

Par kustīgajām fāzēm tika izmantoti 2mM un 20 mM koncentrācijas (amonija formiāta, amonija acetāta, amonija propionāta, amonija butirāta, amonija izo-butirāta, amonija heptafluorbutirāts, amonija trifluoracetāts) buferšķīdumi kopā ar acetonitrilu (attiecība 20/80). Buferšķīdumu nepieciešamie raksturlielumi sakopoti 2.4. tabulā. Buferšķīdumu teorētiskās log P vērtības tiek aprēķināti ar MOE programmas iekšējo modeli [103]. Savienojumu nepieciešamie raksturlielumi sakopoti 2.5. tabulā. Savienojumu hidrofobās virsmas īpatsvara vērtība tiek aprēķināta kā molekulas virsma pie atomiem ar parciālā lādiņa absolūto vērtību <0,2 [103]. Eluēšana tiek veikta izokrātiskajā režīmā. Pētījumā tika izmantota analītiskā kolonna Nr.3 (skat. 2.2. tabulu).

2.4. tabula

## Pētījumā izmantoto buferšķīdumu raksturlielumi

Bufēršķīduma nosaukums	Molmasas, g/mol	Teorētiskais log P	pK <sub>a</sub>
Amonija formiāts	45	0,0190	3,74
Amonija acetāts	59	0,0420	4,76
Amonija propionāts	73	0,5170	4,88
Amonija butirāts	87	0,9590	4,82
Amonija izobutirāts	87	0,8870	4,84
Amonija heptafluorbutirāts	213	2,7146	0,40
Amonija trifluoracetāts	113	0,6788	0,30

2.5. tabula

## Pētījumā izmantoto savienojumu (skat. 2.1. tabula) raksturojums

Savienojuma Nr.	Molmasa, g/mol	Hidrofobās virsmas īpatsvars
<b>1</b>	59,112	160,281
<b>2</b>	74,147	180,334
<b>5</b>	161,225	242,544
<b>6</b>	175,252	282,609
<b>7</b>	189,279	329,210
<b>8</b>	75,135	142,567
<b>9</b>	150,245	307,614
<b>10</b>	160,237	262,043
<b>11</b>	192,326	412,619
<b>12</b>	284,550	578,939
<b>13</b>	368,714	755,102
<b>14</b>	147,200	169,558
<b>15</b>	116,200	239,037

## 2.10. Validācijas izstrādes parametri FAV piemaisījumu noteikšanai

Neatkarīgi no analīzes metodes, lai pārliecinātos par metodes darbību reālajā analīzē nepieciešams veikt kvantitatīvās analīzes metodes validāciju. Analītiskās metodes validācijai jābūt apliecinātam ar rezultātiem, kuri pierāda tās atbilstību paredzētajam mērķim.

Izstrādātajai metodei ir ne tikai jādarbojas, bet tai vienlaikus arī ir jābūt pietiekoši modernai, precīzai un ekonomiskai (gan finansiālo līdzekļu, gan laika vienībās). Farmaceutiskajā ražošanā validāciju veic atbilstoši Eiropas Farmakošanas vadlīnijām [104-107].

Analītiskās metodes validācija ir jāveic pēc šādiem parametriem:

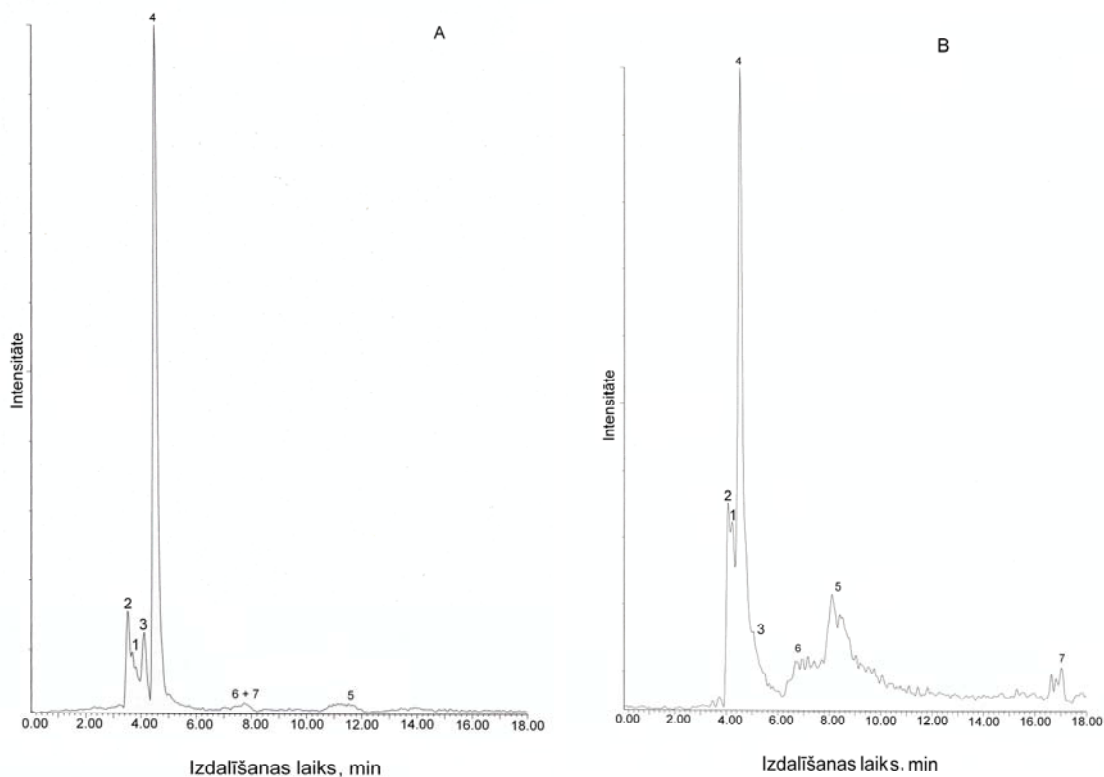
1. Selektivitāte;
2. Linearitāte;
3. Precizitāte;
  - Atkārtojamība;
  - Reproducējamība;
4. Pareizība;
5. Detektēšanas robeža;
6. Kvantificēšanas robeža;
7. Robustums jeb drošība.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

#### 3.1. Jonu pāru hromatogrāfija

Izmantojot parasto apgrieztās fāzes kolonnu (*Symmetry C18*) ar 100% ūdeni saturošu kustīgo fāzi, izdalīšanās laiks visiem 1.1. tabulā minētajam savienojumiem ir „mirušā” laika zonā.

Polāru savienojumu šķidrums hromatogrāfijas analīzei speciāli izstrādātā kolonna „Atlantis dC18” (2.2. tabula Nr.3) eluēja vāji mildronātu un visus tā piemaisījumus, kad kā kustīgo fāzi izmantoja 0,1% skudrskābes ūdens šķīdumu (skat. 3.1. att.), bet, palielinot šķīduma pH līdz 5, tika novērota esteru savienojuma 5-7 (skat. 2.1. tabula) labāka izdalīšanās. Tomēr mildronāta un tā piemaisījumu 1-3 (skat. 2.1. tabula) izdalīšanās laiki šādos apstākļos mainījās tikai nedaudz (3.1. attēls).

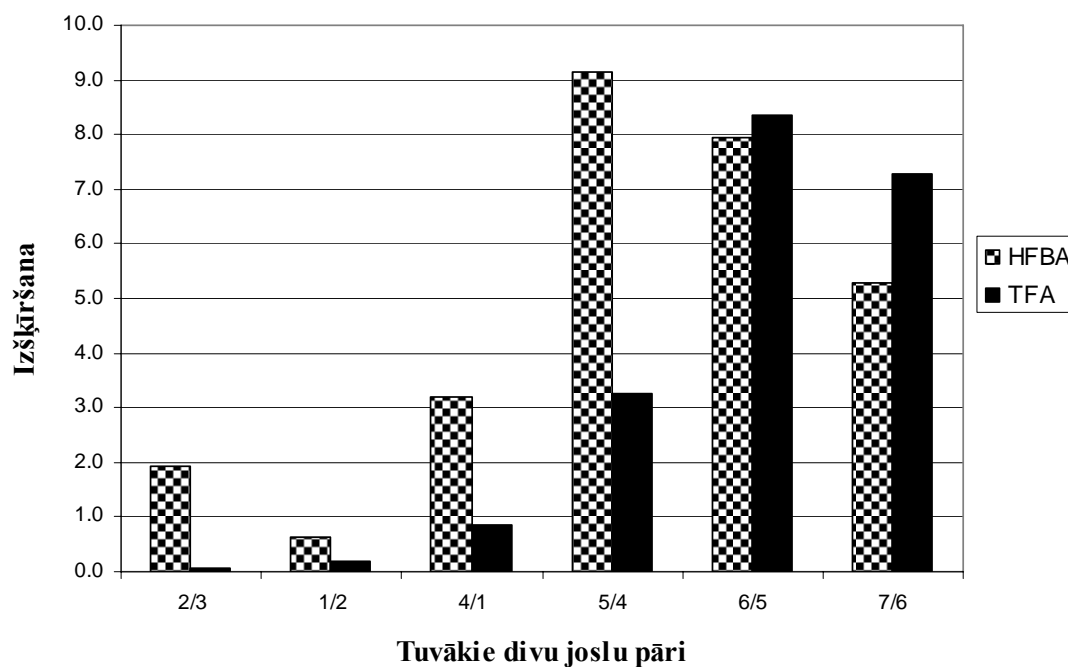


3.1. att. Mildronāta un tā piemaisījumu hromatogramma, kas uzņemta ar Atlantis dC18 kolonnu. Kustīgā fāze: (A) hromatogramma – 0,1 % skudrskābe (FA), (B) hromatogramma – amonija formiāts (5 mM, pH 5,0).



Labi zināma pieeja AEŠH, lai palielinātu vielas izdalīšanas laiku, ir jonu pāru reaģentu pievienošana kustīgai fāzei. Taču masspektrometrijai nepieciešami gaistoši jonu pāru aģenti, kas būtiski ierobežo jonu pāru reaģentu izvēli. Strādājot zemā pH diapazonā, izvēle tiek sašaurināta līdz fluoraizvietotām karbonskābēm. Pētījumiem vispieejamākās bija trifluoretiķskābe (TFA) un heptafluorsviestskābe (HFBA).

Izmantojot stacionāro fāzi (kolonna *Symmetry C18*) un 0,1% TFA šķīdumu kā eluentu izokrātiskajā režīmā, būtiski tika palielināti visu analizējamo vielu izdalīšanās laiki, tāpēc tika pārbaudīts eluēšanas gradients, lai panāktu pieņemamu izšķiršanu starp pētāmiem savienojumiem. Taču mildronāta un trimetilamonija bromīda (savienojums **1**) atdalīšana bija vāja ( $R_s < 1$ ), un piemaisījumi **1**, **2** un **3** izdalījās praktiski vienlaicīgi (izšķiršanas faktorus skat. 3.2. att. un hromatogrammā – 3.4.A. attēlā).

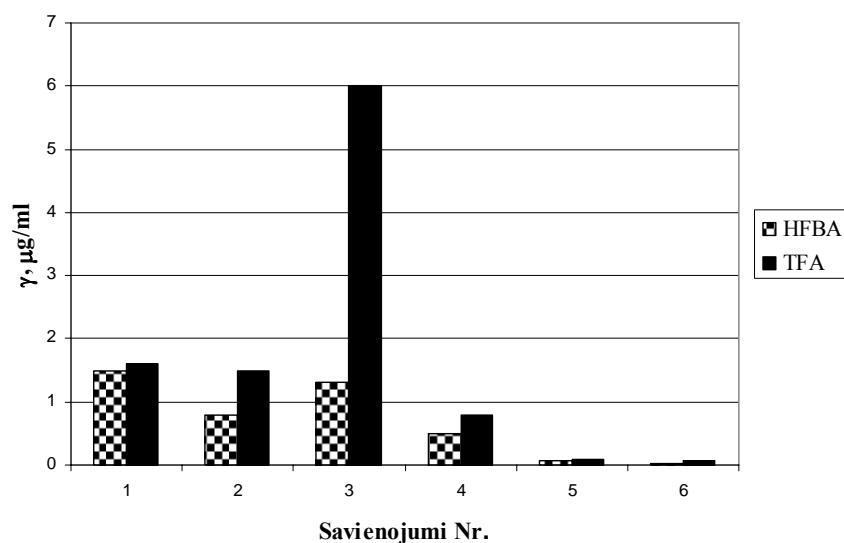


**3.2. att. Izšķiršanas spēju salīdzinājums mildronātam un dažu piemaisījumu standartmaisījumā, kā jonu pāru reaģentus lietojot TFA un HFBA.**

Izšķiršana ( $R_s$ ) raksturo divu vai vairāku blakus esošu joslu savstarpējās atdalīšanās pakāpi (2.2. vienādojums); tā nedrīkst būt mazāka par 1,5. Gadījumā, ja savienojumu  $R_s < 1,5$ , tad nav iespējams kvantitatīvi ar augstu precizitāti noteikt šo savienojumus.

Kustīgās fāzes sastāvam ir liela nozīme ESI-MS detektēšanas režīmā. Pirmkārt, ir jāņem vērā, ka kustīgās fāzes ar augstāku ūdens saturu ir grūtāk izsmidzināt nekā organiskos šķīdinātājus, jo ūdenim ir augsts virsmas spraigums un ūdens nodrošina mazāk efektīvu pilienu uzlādēšanos [10-12]. Viena no problēmām AFŠH ESI-MS režīmā ir vairāku kustīgās fāzes piedevu nepiemērotība detektēšanas režīmam.

Izmantojot TFA kā jonu pāru aģentu, novērojama stipra jonizācijas nomākšana (signāla samazināšanās). Detektēšanas robeža (LOD) pirazolija betaīnam (**3**), izmantojot TFA, ir apmēram 5 reizes zemāka nekā izmantojot HFBA kā jonu pāru reaģentu (skat. 3.3. att.). To var izskaidrot gan ar TFA jonizāciju nomācošajām īpašībām [13, 14], gan ar signālu pārklāšanos, kas samazina metodes jutību atsevišķiem savienojumiem.



**3.3. att. Kvantificēšanas robežu salīdzinājums savienojumiem 1-6 (skat. 2.1. tabula).**

Ja HFBA lieto kā jonu pāru reaģentu, tad nepieciešams izmantot gradientu eluēšanai divos posmos: ļoti lēzenu analīzes sākumā, lai atdalītu stipri polāro trimetilamonija sāli **1** un trimetilhidrazīnija sāli **2**, ar sekojošu stāvu eluentu gradientu, kas nodrošina pirazolija betaīna **3** atdalīšanu no mildronāta **4** un esteriem **5-7** (skat. 3.1. tab.).

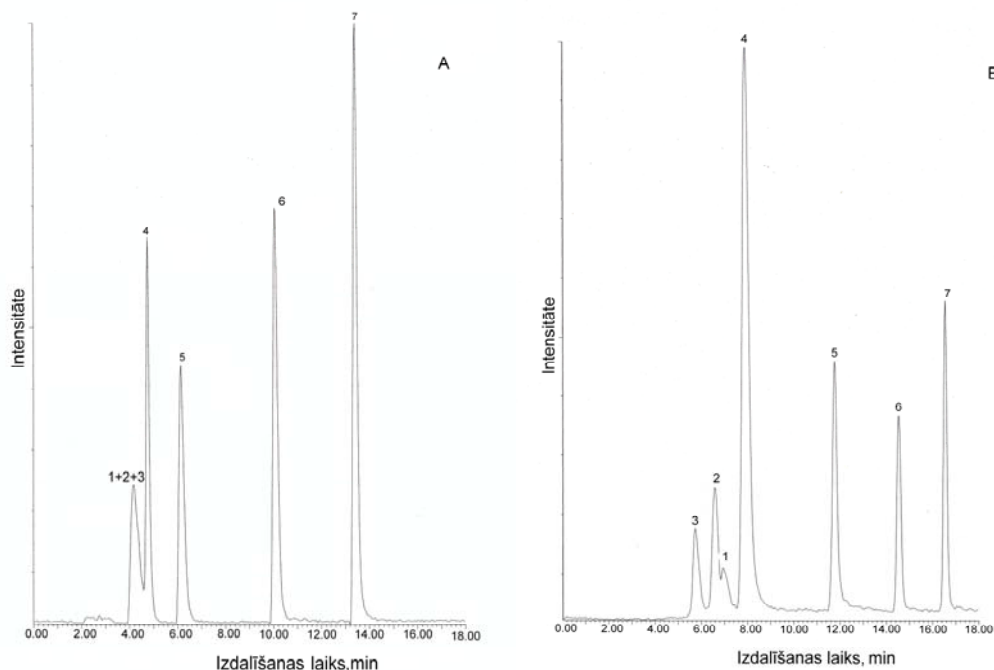
### 3.1. tabula

#### Gradients programma HFBA kā jonu pāra reaģentam

Laiks, min	0,1 % HFBA šķīdums, %	metanols, %
0	90	10
7	65	35
12	40	60
18	25	75
19	90	10
25	90	10

Šāda pieeja nodrošināja pieņemamu izdalīšanās laiku un hromatogrāfisko smaīļu formas lielākai daļai pētāmo savienojumu (skat. 3.4. B. att.). Taču izšķiršana starp trimetilamonija sāli 1 un trimetilhidrazīnija sāli 2 joprojām bija zem 1,5, tomēr detektēšanas robežas abiem savienojumiem bija zem 0,1% no mildronāta analizējamā satura, kas ir pietiekoši, lai kontrolētu piemaisījumu daudzumu mildronātā atbilstoši Eiropas Farmakopejas prasībām.

Salīdzinot TFA un HFBA kā jonu pārus reaģentus, tālākiem pētījumiem, kā labākais, tika izvēlēts HFBA. Tas nodrošina pieņemamu izdalīšanas laiku un smaīles formu lielākajai daļai savienojumu (skat. 3.4.B att.). Tomēr savienojumu 1 un 2 atdalīšana joprojām nav ideāla ( $R_s < 1,5$ ), tāpēc tika nolemts turpmāk veikt pētījumus HILIC režīmā, lai panāktu pietiekamu savienojumu 1 un 2 atdalīšanu.



**3.4. att. Mildronāta un tā piemaisījuma hromatogramma jonu pāra hromatogrāfijas režīmā.**

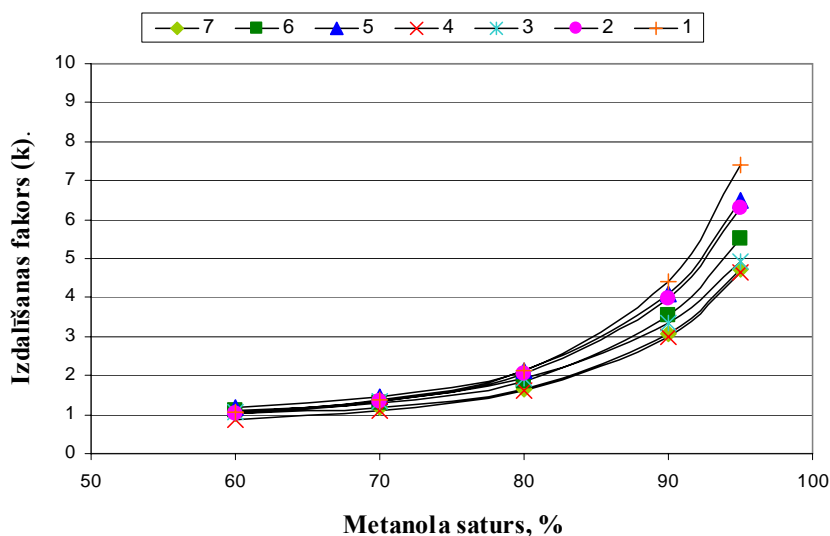
Kolonna: Symmetry C18. Hromatogramma (A) – kustīgā fāze A: 0,1% TFA ūdenī, B: 0,1 % TFA metanolā. Hromatogramma (B)– kustīgā fāze A: 0,1% HFBA ūdenī, B: 0,1 % HFBA metanolā. Gradients: 7 min 10% līdz 35% B, pēc tam 5 min 35% līdz 60% B, un 6 min 60% līdz 75% B, pēc tam 1 min atpakaļ līdz 10% B, pēc tam izokrātiskais režīms. Kopējais analīzes laiks: 25 min.

**3.2. Organisko šķīdinātāju ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā**

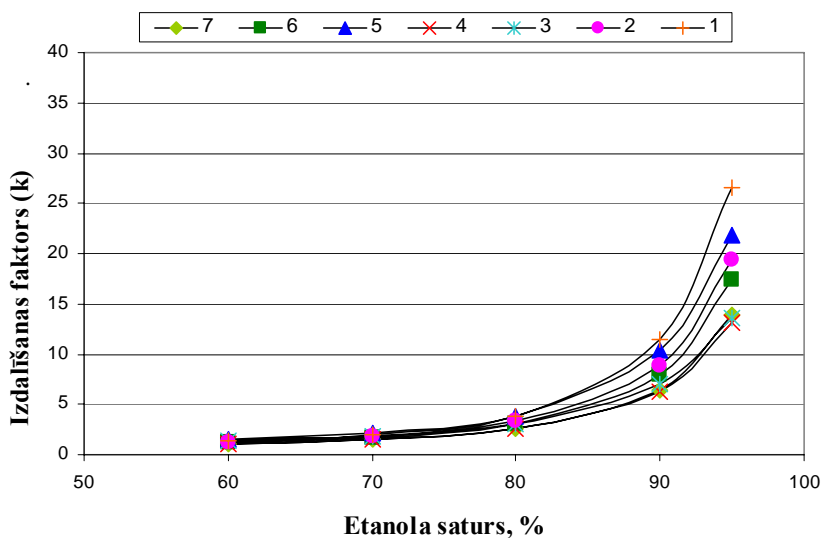
Vispirms tika veikta savienojumu 1-7 (skat. 2.1. tabulu) hromatogrāfiskā izpēte atkārtībā no ūdens satura kustīgā fāzē, kā arī no izmantotā organiskā šķīdinātāja dabas. Izvērtējot iegūtos rezultātos (3.5 – 3.10. att), tika novērota sekojoša būtiska tendence: izdalīšanas laiki palielinās, palielinot organiskā šķīdinātāja saturam kustīgajā fāzē. Kustīgās fāzes ar zemu organiskā šķīdinātāja saturu eluē pārāk spēcīgi: neviens no savienojumiem netika pietiekami sorbēts kolonnā, un komponentu atdalīšanās netika novērota.

Izdalīšanās faktors bija vērā ņemams kustīgajām fāzēm ar vismaz 80-85% organiskā šķīdinātāja satura. Tomēr, palielinot organiskā šķīdinātāja saturu kustīgajā fāzē virs 95% (ūdens saturs zem 5%), izdalīšanas laiks bija pārāk liels, un vienas analīzes laiks palielinājās virs divām stundām. Tika apstiprināts, ka homologu rindā (metanols - etanols -

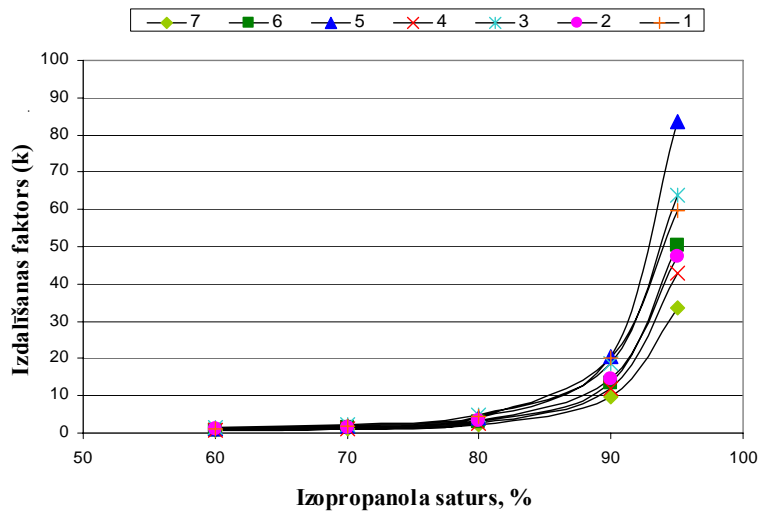
izopropanols) (skat. 3.5.-3.7. att.) analizējamajām vielām vislielāko izdalīšanas laiku nodrošināja vismazāk polārais šķīdinātājs – izopropanols, un pārējie šīs rindas locekļi uzrādīja prognozējamas īpašību izmaiņas. Netika konstatēta tieša sakarība starp analizējamo vielu izdalīšanas laikiem un kādu no šķīdinātāju īpašībām, iespējams HILIC sorbentu sarežģītā sorbcijas mehānisma dēļ.



3.5. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no metanola satura kustīgajā fāzē.

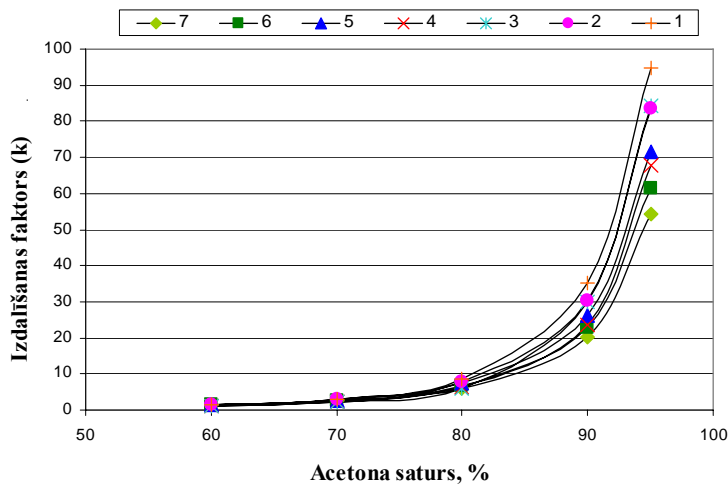


3.6. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no etanola satura kustīgajā fāzē.



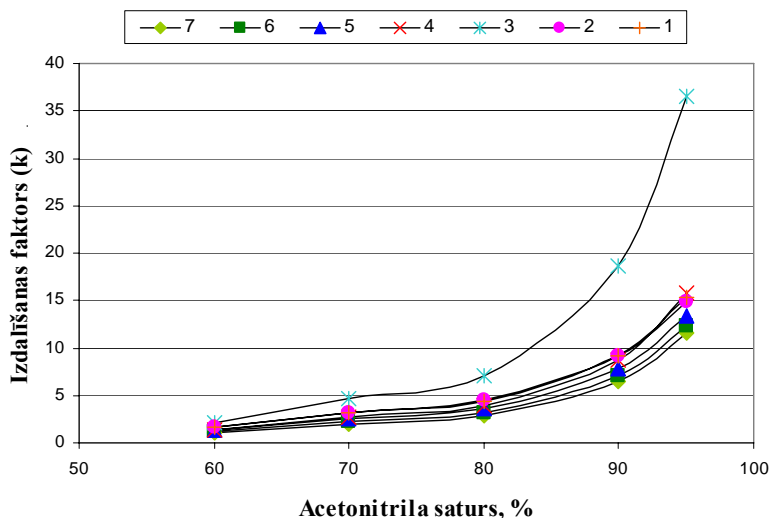
**3.7. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no izopropanola satura kustīgajā fāzē.**

Acetons tika izraudzīts, ņemot vērā tā zemo viskozitāti un labo šķīdību ūdenī. Kā jau bija paredzams, acetons izrādījās vājš eluents Literatūrā netika atrasti pētījumi par acetonu kā kustīgo fāzi AEŠH, iespējams tā UV absorbcijas dēļ (nav iespējams izmantot UV detektēšanai zem 340 nm). Taču domājams, ka šis piemērs iedrošinās citus pētniekus meklēt netradicionālus šķīdinātājus konkrētu problēmu risināšanai.

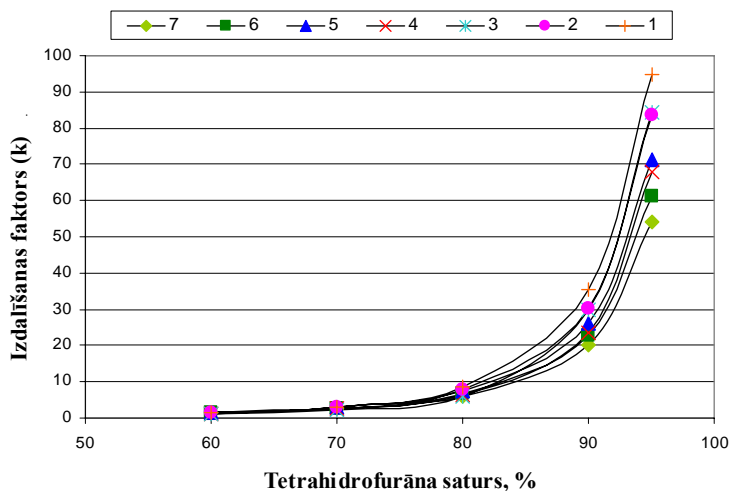


**3.8. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetona satura kustīgajā fāzē.**

Acetonitrils, ļoti populārs AEŠH šķīdinātājs, uzrādīja metanolam līdzīgas (3.9. un 3.6. att.) eluenta īpašības. THF, retāk lietots šķīdinātājs AEŠH apgrieztās fāzes režīmā, uzrādīja (3.10. att.) acetonam (3.8. att.) līdzīgākas eluenta īpašības.



**3.9. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila satura kustīgajā fāzē.**



**3.10. att. Savienojumu 1-7 (skat., 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no tetrahidrofurāna satura kustīgajā fāzē.**

Pētījums par organisko šķīdinātāju ietekmi uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā parāda, ka šķīdinātāju eluējošais spēks slāpekli saturošiem savienojumiem ir sarindojams sekojošā rindā:

tetrahidrofurāns < acetons < izopropanols < acetonitrils < etanols < metanols < ūdens.

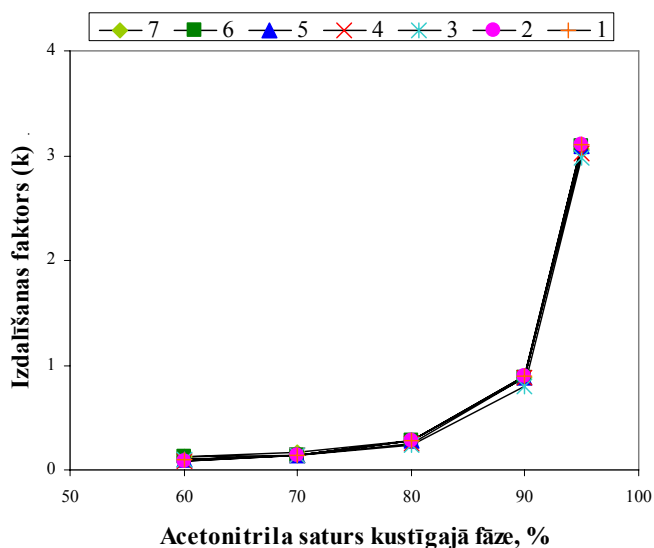
Zinātniskā literatūra apstiprina, ka šķīdinātāja eluējošās spējas atšķiras dažādu savienojumu tiem [43, 44].

### 3.3. Dažādu sorbentu sorbcijas spējas HILIC režīmā

No molekulārās uzbūves viedokļa pētāmos savienojumus 1-7 (skat. 1.1. tab.) var iedalīt trīs grupās: 1-2 (katjoni), betaīns 3 un mildronāts (cviterjoni) un 5-7 (katjonus saturoši esteri).

Kolonnas 1-6 (2.2. tab.) izvēlētas pētījumā, ņemot vērā to spējas atdalīt septiņas analizējamās vielas HILIC apstākļos. Acetonitrila saturs eluentā tika pētīts diapazonā no 60 līdz 95% ar dejonizētu ūdeni, kam pievienots 0,1% skudrskābes.

Noskaidrots, ka polārā saistītā nekustīgā fāze *Discovery Cyano* raksturojas ar vismazākiem izdalīšanas laikiem (3.11. att.). Ja acetonitrila koncentrācija bija līdz 90% izdalīšanas laiki bija neievērojami. Pat pie 95% acetonitrila satura izdalīšanas faktorus lielums bija tikai ap 3. Tas rāda, ka šajos analīzes apstākļos dinamiski ģenerētā, ar ūdeni bagātā stacionārās fāzes slāņa tilpums ir mazs. Iespējams, atlikušās silanolgrupas nav spējīgas sorbēt ūdeni sorbenta virsmas ekranēšanai.



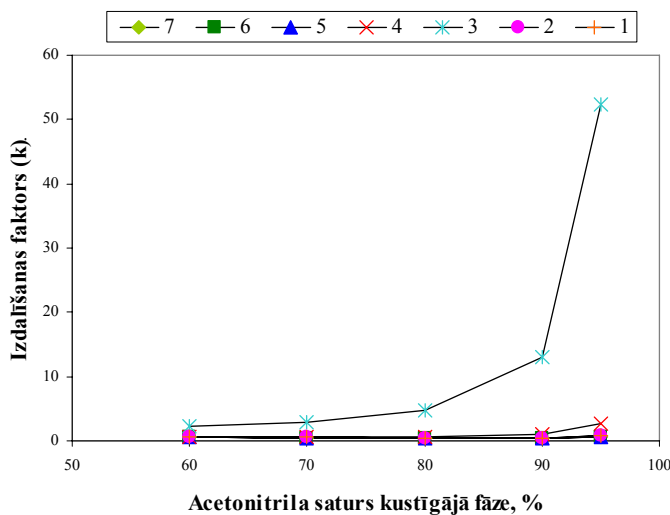
#### 3.11. att. Savienojumu 1-7 (sorbents cianogrupas saturošs silikagels Nr.1, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila daudzuma kustīgajā fāzē

Šī cianogrupas saturoša sorbenta interesantā īpašība ir gandrīz pilnīgs strukturālās selektivitātes trūkums. Visas vielas, neatkarīgi no molekulas lieluma, funkcionālajām



grupām un jonizētu vietu klātbūtnes, eluējas ļoti šaurā izdalīšanas faktora ( $k$ ) diapazonā. Neapšaubāmi, tāda šo vielu uzvedība nav vilinoša no analītiķa viedokļa. Tomēr šīs parādības mehānisms nākotnē varētu tikt pētīts rūpīgāk.

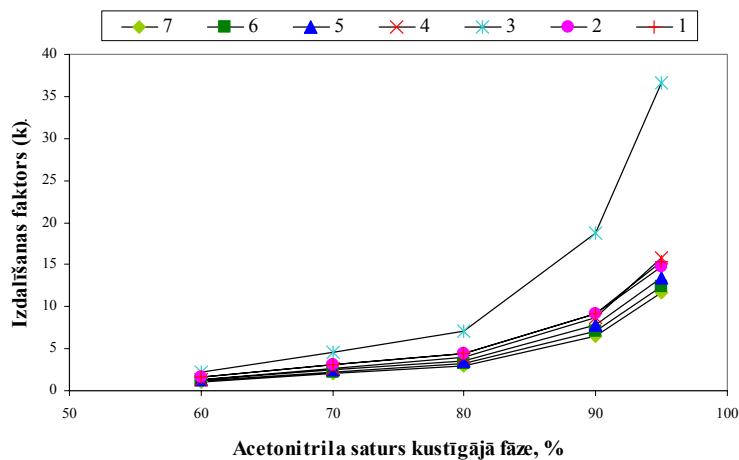
Aminogrupas saturoša stacionārā fāze (kolonna Hypersil APS-1) darbojās (3.12. att.) citādāk, salīdzinot ar cianogrupas saturošu silīcija dioksīda sorbentu. Katjoni eluējās ļoti vāji visā pētīto acetonitrila koncentrāciju diapazonā (60-95%). No otras puses, cviterjonus veidojošiem savienojumiem (**3** un mildronāts) izdalīšanas laiks ir pārāk liels. Tas norāda uz iespējamo elektrostatisko mijiedarbību starp sorbenta aminogrupām (kas kustīgajā fāzē ir protonētas) un negatīvi lādētām cviterjonu daļām.



**3.12. att. Savienojumu 1-7 (sorbents aminogrupas saturošs silikagels Nr.2, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora ( $k$ ) atkarība no acetonitrila daudzuma kustīgajā fāzē.**

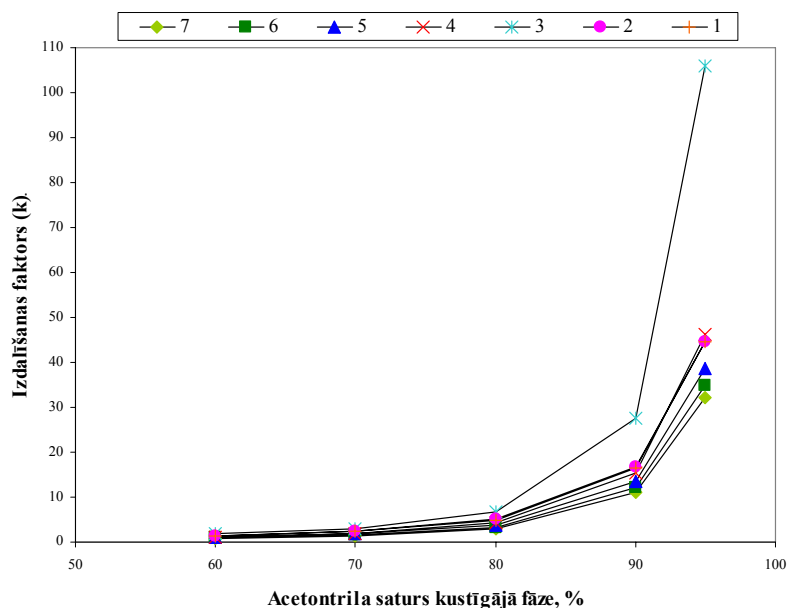
Specializētā HILIC silikagela kolonna (*Atlantis HILIC Silica*) uzrādīja ļoti stabilas izdalīšanas laika izmaiņas, palielinot acetonitrila saturu kustīgajā fāzē (3.13. att.). Katjonu saturoši esteri **5-7** atšķiras par vienu oglekļa atomu, citādā ziņā funkcionāli tie ir identiski. Šādu, strukturāli tuvu savienojumu izdalīšanas laikus galvenokārt nosaka hidrofilās un hidrofobās daļas līdzsvars analizējamā vielā. Lineāra sakarība starp oglekļa atomu skaitu analizējamā vielā un izdalīšanas laiku šādā situācijā ir plaši zināma, tā norāda uz analītu migrāciju starp stacionāro un kustīgo fāzi. Katjonos savienojumus **1-2** ar šo kolonnu nav iespējams atdalīt, pat pie ievērojama izdalīšanas laika, eluējot ar 95% acetonitrilu. Varētu sagaidīt, ka mildronāta izdalīšanas laiks būs daudz lielāks nekā katjonu esterim **4**. Tomēr eksperimentālie rezultāti uzrāda tikai nelielu atšķirību šo abu savienojumu izdalīšanas laikos. Visticamāk, ka šajos pētījumā apstākļos, izmantotajā skābajā vidē, karboksilgrupa

neietekmē disociācijas līdzsvaru. Šīs grupas ietekme šķiet tik nenozīmīga, ka savienojumi **4-6** (esteri) un mildronāts darbojas kā homologi (3.13. att.). Savienojuma **3** izdalīšanas laiks „izlec” no kopējās rindas, salīdzinot ar mildronātu un savienojumiem **5-7**. To var izskaidrot ar izteiktāku jonu apmaiņas mehānisma ieguldījumu šī cikliskā savienojuma gadījumā.



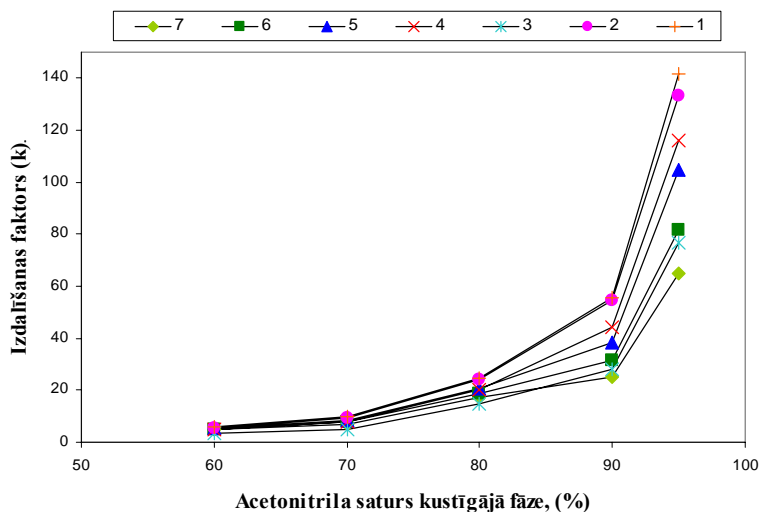
**3.13. att. Savienojumu 1-7 (sorbents silikagels Nr.3, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila satura kustīgajā fāzē.**

Tika noskaidrots, ka bieži lietotā, silikagela kolonna *Alltima HP Silica*, izmantojot par eluentu 70-80% acetonitrila, uzrāda specializētajai HILIC silikagela kolonnai *Atlantis HILIC Silica* līdzīgu izdalīšanas laikus un līdzīgu izdalīšanas kārtību (3.14. att.). Tas liek domāt, ka vielas izdalīšanas mehānismi abu sorbentu gadījumos ir līdzīgi. No otras puses, augstākām (90-95%) acetonitrila koncentrācijām izdalīšanas laiki uz šīs silikagela kolonnas ir daudz lielāki nekā HILIC silikagela kolonnas. Šīs parādības iespējamais izskaidrojums ir *Alltima HP Silica* lielākais specifiskais virsmas laukums (skat. 2.2. tabulu) - 450 m<sup>2</sup>/g pret 330 m<sup>2</sup>/g sorbentam *Atlantis HILIC Silica*. Tādēļ šī kolonna var aizturēt lielāku tilpumu ar ūdeni bagātināta eluenta slāni, kas darbojas kā stacionārā fāze.



**3.14. att. Savienojumu 1-7 (sorbents silikagels Nr.4, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila saturs kustīgajā fāzē.**

Kolonna ar sorbentu *Spherisorb silica* raksturīga ar apmēram trīs reizes lielākiem izdalīšanas laikiem (3.15. att.) nekā sorbents *Alltima HP silica*, par kustīgo fāzi izmantojot 70% acetonitrilu. Augstākās acetonitrila koncentrācijās šī atšķirība ir vēl izteiktāka. Izdalīšanas laika sakarības homologu grupai 5-7 ir līdzīgas kā uz sorbenta *Alltima HP* un *Atlantis HILIC silica* novērotajām. Vienlaikus strukturālās selektivitātes profils ir atšķirīgs. Piemēram, *Spherisorb silica* kolonnas pildījums samērā vāji sorbē cviterjonus veidojošus savienojumus. Savienojuma 3 izdalīšanas laiks ir vismazākais, un mildronāta izdalīšanās ir atšķirīga no esteru (5-7) izdalīšanas. Iespējamais izskaidrojums meklējams *Spherisorb silica* īpašībās. Tas ir viens no pirmajiem AEŠH kolonnas tipiem (A tipa silikagels), visticamāk – ražots pēc novecojušas tehnoloģijas no silikātiem un satur metālu piemaisījumus, kuri var reaģēt ar slāpekli saturošiem savienojumiem.



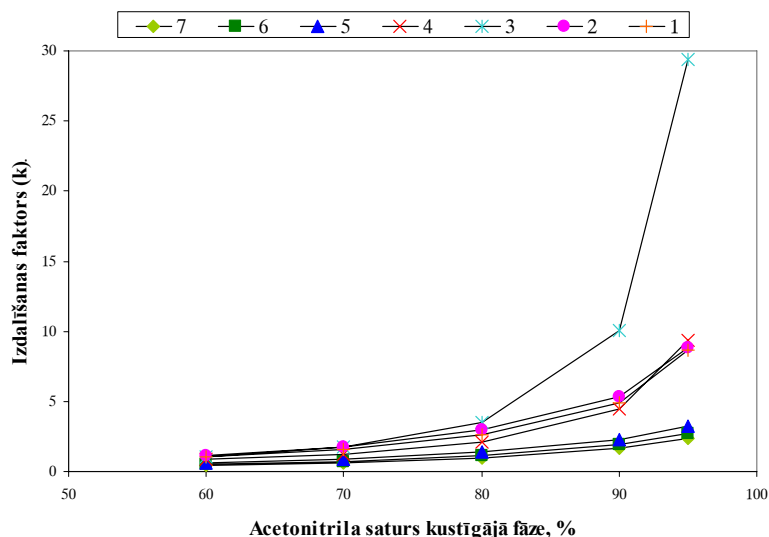
**3.15. att. Savienojumu 1-7 (sorbents silikagels Nr.5, skat. 2.2. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila satura kustīgajā fāzē.**

„A tipa” silikagels (Waters Spherisorb kolonna), kuru pagatavo, izgulsnējot no silikātu šķīdumiem, ir skābs, jo tas parasti ir piesārņots ar dažiem metālu piemaisījumu, kas aktivē virsmas silanolgrupas un var veidot kompleksos savienojumus ar helātus veidojošām izšķīdinātajām vielām, izraisot spēcīgu asimetrisku smaiļu veidošanos. Modernāks sorbents ar rūpīgi attīrītām, mazāk skābām sfēriskām silīcija dioksīda daļiņām (B tipa silikagels – Atlantis HILIC kolonna), kuras ražošanā izmanto silīcija dioksīda solu metodi, satur ļoti mazus daudzumus metālisko elementu piemaisījumus un ir stabilākas neitrālā un bāziskākā pH vidē nekā *xerogel* tipa sorbenti, vismaz līdz  $\text{pH} < 9$ . Atlantis HILIC Silica kolonna kā sorbentu satur šādu B tipa silikagelu. Pie augstākām pH vērtībām sorbenta silanolgrupas tiek jonizētas, un katjonu apmaiņa var spēlēt ievērojamu lomu hromatogrāfiskajā sorbcijā, jo īpaši ar pozitīvi lādētiem bāziskiem savienojumiem. Silanolgrupu jonizācijas apspiešana, pievienojot trifluoretiķskābi (TFA), var novērst dominējošo jonu pāru hromatogrāfisko mehānismu. Dažos gadījumos uz nemodificēta silikagela HILIC režīmā var notikt neatgriezeniska sorbcija. ”C tipa” (Alltima silica kolonna) silikagelam ir hidrosilanizēta virsma, kas silanola grupu vietā no klāta ar silīcija hidrīda (Si-H) grupām (aizvietotas līdz 95% sākotnējo silanolgrupu), tāpēc šis silikagels ir mazāk polārs nekā tikai silanolgrupu saturošie sorbenti. Hidrīda fāzes svarīga īpašība ir tā nelielā tieksme pēc ūdens, tāpēc izdalīšanas laiku atkārtamība ir labāka, eluējot gan ar bezūdens kustīgo fāzi, gan ar ūdeni saturošām kustīgām fāzēm normālās fāzes hromatogrāfijas apstākļos [108].

Daži pētnieki ir konstatējuši, ka sevišķas tīrības silikagela kolonnās analizējamam vielām ir mazāki izdalīšanas laiki un šo kolonnu selektivitāte mazāka nekā kolonnām ar metālu piemaisījumiem saturošā silikagela sorbentā [109]. Šādu efektu izraisa metālu, galvenokārt alumīnija un dzelzs, klātbūtne, aktivētu silanolu paaugstināts skābums. Makjūns (*McKeown*) to izskaidro ar apgrieztās fāzes un jonu apmaiņas mijiedarbības darbības mehānismiem, taču Hemstrēms un Irgums (*Hemström, Irgum*) uzstāj, ka minēto ietekmi var izskaidrot arī ar katjonu apmaiņas un HILIC darbības režīmu [47, 91].

Fakts, ka ievērojami lieli izdalīšanas laiki novērojami pat pie 60% acetoniitrila satura kustīgajā fāzē (kad adsorbētais ūdens slānis stacionārās fāzes tilpumā ir relatīvi neliels), liek domāt par tiešu analizējamo vielu mijiedarbību ar sorbenta virsmas funkcionālajām grupām.

Analizējamo vielu izdalīšanas laiki HILIC apstākļos kolonnā ar sorbentu *ZIC-HILIC* parādīti 3.16. att. Izdalīšanas laika vidējās vērtības no *ZIC-HILIC sorbenta* saturošās kolonnas ir mazākas nekā silikagela kolonnām, taču savienojumu izdalīšanas secība ir līdzīga. No otras puses, struktūras ietekme *ZIC-HILIC* sorbenta kolonnā ir pamanāmāka. Pirmkārt, līdzīgi kā silikagela kolonnām, katjoniem savienojumiem **1** un **2** izdalīšanas faktoru skaitliskās vērtības ir tuvas. Otrkārt, katjonus saturošo esteru **5-7** izdalīšanas laiki ir daudz mazāki nekā no kolonnas ar silikagelu. Cviterjonu veidojošie savienojumi uzvedas atšķirīgi. Kustīgajā fāzē ar acetoniitrila saturu līz 80 % mildronāta izdalīšanas laiks no kolonnas būtiski neatšķiras no tā piemaisījumu izdalīšanās laikiem, bet, palielinot acetoniitrila saturu virs 80%, mildronāta izdalīšanas laiks pieaug straujāk nekā tā piemaisījumiem. Līdzīga aina, tikai mazāk izteikta, novērota Atlantis *HILIC* un *Alltima HILIC* kolonnām, kurās kā sorbents ir aminogrupu saturošs silikagels

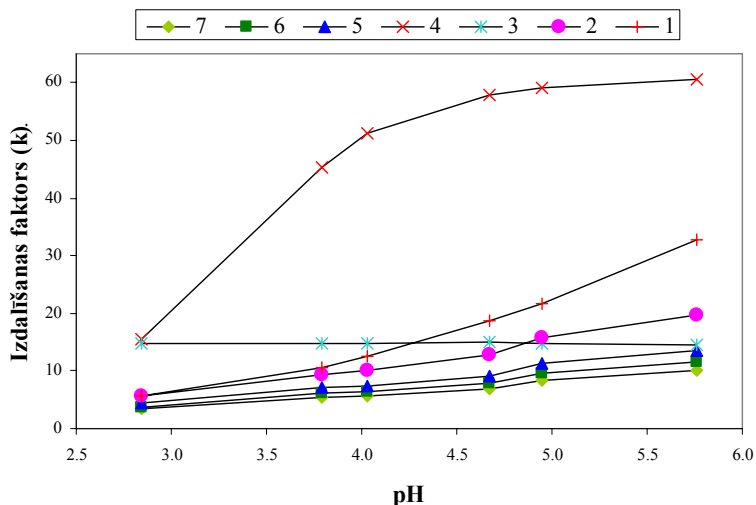


**3.16. att. Savienojumu 1-7 (sorbents sulfobetaīns Nr.6, skat. 2.2. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no acetonitrila koncentrācijas kustīgajā fāzē.**

#### **3.4. Bufēršķīduma pH ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā**

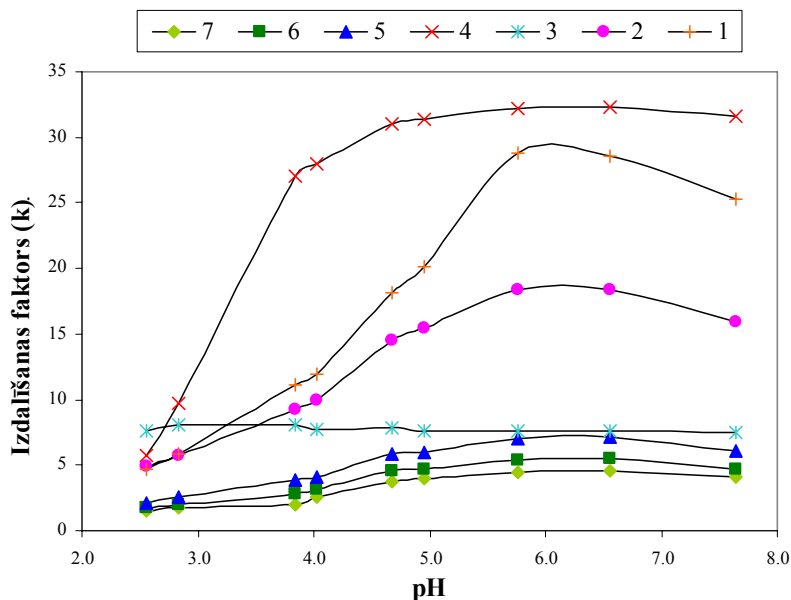
Kustīgās fāzes pH ietekme uz septiņu savienojumu izdalīšanu un selektivitāti tika pārbaudīta pH diapazonā 2,6-5,8 kolonnai ar sorbentu *Atlantis HILIC Silica* (3.17. att.) un pH diapazonā 2,5-7,6 kolonnai ar sorbentu *ZIC-HILIC* (3.18. att.).

Palielinot pH no 2,8 līdz 5,8, izdalīšanas faktori katjoniem 1-2 un katjonu esteriem 5-7 palielinājās. Šādas pH ietekmes iespējamais iemesls ir jonu apmaiņa. Pie augstākām pH vērtībām palielinās virsmas silanolgrupu jonizācijas pakāpe, tādējādi radot labvēlīgākus apstākļus šādai mijiedarbībai. Mildronāts uzvedas līdzīgi katjoniem savienojumiem 1-2. Otram cviterjonu veidojošam savienojumam, 3, ir pilnīgi atšķirīga izdalīšanas faktora atkarība no kustīgās fāzes pH - tas nav būtiski atkarīgs no pH izmaiņām.



**3.17. att. pH ietekme uz savienojumu 1-7 izdalīšanas faktora ( $k$ ) vērtību. Kolonna: Atlantis HILIC Silica; kustīgā fāze: acetonitrils : 5 mM amonija formiāts (85/15, v/v).**

Izdalīšanas laika izmaiņas no kolonnām ar *Atlantis HILIC* sorbentu bija monotonas, bet līdzīgi eksperimenti ar *ZIC-HILIC* kolonnu plašākā pH diapazonā atklāja maksimumu pie pH ~6. Savienojums **3** atkal uzvedās atšķirīgi, stabili nemainot izdalīšanas laiku visā pētītajā pH diapazonā.



**3.18. att. pH ietekme uz savienojumu 1-7 izdalīšanas faktora ( $k$ ) vērtībā. Kolonna: Zic-Hilic; kustīgā fāze: acetonitrils : 5 mM amonija formiāts (85/15, v/v).**

Iegūtie rezultāti 3.18.att. apstiprina literatūras datus [87], ka sulfobetaīna tipa cviterjonu stacionārā fāzē pH diapazonā no 3,1 līdz 6,6 saglabā gan pozitīvos, gan negatīvos lādiņus. Palielinoties kustīgās fāzes pH vērtībai (norādītajā diapazonā), visu savienojumu (izņemot pirolidīnija betaīnu **3**) izdalīšanas faktori pieaug. Šo pieaugumu var izskaidrot ar faktu, ka, palielinoties vides pH vērtībai, pieaug to sulfonskābes grupu daudzums, kuras eksistē sulfonāta anjona veidā. Sorbātu katjoni pēc jonapmaiņas mehānisma saistās ar negatīvi lādētajiem sulfonāta anjoniem, tādējādi palielinoties izdalīšanas faktoriem.

Mildronāta (**4**) gadījumā vides pH vērtības pieaugums izraisa arī negatīvi lādētu karboksilāta daļiņu skaita pieaugumu, kas elektrostātiski atgrūžas no sorbenta sulfonāta anjoniem, tāpēc pie  $pH \approx 4,5$  iestājas sava veida līdzsvars, kad vides pH vērtības pieaugums vairs nepalielina mildronāta izdalīšanās faktora vērtību.

Savienojumu **1**, **2**, **5**, **6** un **7** gadījumā izdalīšanās faktora maksimums tiek sasniegts pie aptuveni  $pH \approx 6$  vai nedaudz lielākas vērtības, neatkarīgi no savienojuma struktūras. To varētu izskaidrot, pieņemot, ka pie šādas pH vērtības praktiski visi sorbenta sulfonskābes atlikumi eksistē sulfonāta veidā un tālāka pH vērtības palielināšana vairs nepastiprina sorbāta molekulu elektrostātisko saistību ar sorbenta virsmu.

Vēl lielākas pH vērtības izraisa nelielu savienojumu **1**, **2**, **5**, **6** un **7** izdalīšanās faktoru samazināšanos, ko varētu izskaidrot ar lielu formiāta anjonu koncentrācijas pieaugumu stacionārajā ūdens fāzē un sava veida savienojumu izsālīšanu no tās, sekmējot pāreju uz kustīgo fāzi. Šādu pieņēmumu apstiprina arī fakts, ka visizteiktākā izdalīšanās faktoru samazināšanās ir novērojama savienojumu **1** un **2** –vispolārāko molekulu – gadījumā.

Pirolidīnija betaīns **3** eksperimenta apstākļos praktiski neuzrāda izdalīšanās faktora atkarību no vides pH vērtības.

### **3.5. Amonija formiāta daudzuma ietekme uz izdalīšanas laikiem polārās stacionārajās fāzēs**

Šim pētījumam tika izraudzītas sešas kolonnas (3-8, skat., 2.2. tabulu) ar dažādām stacionārajām fāzēm uz silikagela bāzes.

Daudzi apgrieztās fāzes hromatogrāfijā izmantojamie sāļi neder HILIC režīmam – tie vāji šķīst kustīgās fāzēs ar augstu acetnitrila saturu. HILIC izmanto ne tikai amonija formiātu, bet arī citus sāļus ar samērā augstu šķīdību organiskos šķīdinātajos: amonija



acetātu un hidroģenkarbonātus, trietilamonija fosfātu un nātrija perhlorātu, taču pēdējie divi sāļi rada grūtības MS detektēšanai.

Ir zināms, ka buferšķīdumu sāļi nelielās koncentrācijās kustīgajā fāzē uzlabo vielu hromatogrāfisko smaiļu formas un atdalīšanas efektivitāti HILIC režīmā [10].

Tradicionāli, buferšķīdumu izmantošana kustīgās fāzēs ir svarīga, lai iegūtu pieņemamu analītiskā signāla atkārtojamību jonizētu analītu hromatogrāfiskajai atdalīšanai, jo vielu izdalīšana notiek ar elektrostatisķo mijiedarbību starp izšķīdināto vielu un stacionāro fāzi un to kontrolē buferšķīduma pH un tās buferkapacitāte. Tomēr bufervielām jābūt pietiekami gaistošām, lai tās varētu izmantot ESI-MS detektēšanas režīmā, taču ir zināms, ka elektroizsmidzināšanas jonizāciju bufervielas ietekmē negatīvi, tas ir, apspiež jonizāciju. Ir noskaidrots arī, ka HILIC režīmā vielas izdalīšanas laiki ir apgriezti proporcionāli jonu koncentrācijai kustīgajā fāzē, jo bufersāls daudzuma palielināšana kustīgajā fāzē palielina šķīduma hidrofilītāti [8]. Tāpēc nepieciešams veikt gaistošu bufersāļu satura optimizēšanu kustīgajā fāzē, atbilstoši ESI-MS režīma jutības prasībām. Novērots, ka jau 3,3 mM amonija acetāta (pH 5,5) klātbūtne ievērojami uzlabo analizējamo vielu smaiļu formu un atdalīšanas efektivitāti. Parauga analītu izdalīšanu ļoti zemās buferšķīdumu koncentrācijās nosaka vairāki faktori, un starp tiem noteicošie var būt jonu eksklūzija un/vai jonu apmaiņa, ko pastiprina bufersāļu ietekme uz kustīgās fāzes hidrofilītāti. Citi pētījumi pierādīja, ka gan parauga šķīduma pH, gan jonu spēka palielināšanu var samazināt līdz minimumam, izmantojot amonija acetāta buferšķīdumu [8].

Trifluoretiķskābi (TFA) saturošas kustīgās fāzes sekmīgi tiek izmantotas polāru savienojumu normālās fāzes HILIC. Taču šī pētījuma ietvaros, lietojot TFA kā kustīgās fāzes komponenti, vielu izdalīšanas laiki bija nepieņemami mazi, iespējams, jonu pāru ietekmes dēļ, kas samazināja analizējamo vielu hidrofilītāti. Kopumā, buferētās kustīgajās fāzēs pētāmo vielu izdalīšanas laiki, šķiet, sekoja shēmai „acetāts  $\approx$  formiāts  $>$  hidroģenkarbonāts”, līdzīgi anjonu polaritāšu izmaiņām. Līdzīgi rezultāti tika aprakstīti pētījumos [47] par peptīdu atdalīšanu HILIC režīmā, salīdzinot vielu izdalīšanas laikus TFA, skudrskābes un etiķskābes klātbūtnē. Atšķirības tika skaidrotas ar šo skābju efektivitāti jonu apmaiņas mijiedarbības samazināšanā. Tā kā gan skābie, gan bāziskie pētāmie savienojumi, mainot dažādus buferšķīdumus, izturējās visai līdzīgi, tad minētie rezultāti lika domāt, ka pH ietekme uz izšķīdinātās vielas sorbciju ir niecīga salīdzinājumā ar izmaiņām stacionārās fāzes adsorbcijas/desorbcijas mehānismu procesos, kurus ietekmē bufervielu anjona raksturs.

HILIC kolonnas satur hidrofilus ligandus, bieži (noteiktā pH diapazonā) vien uz lādētas stacionārās fāzes. Hromatogrāfiskā atdalīšanās galvenokārt noris ūdens slānī uz stacionārās fāzes virsmas. Taču tad, kad stacionārā fāze ir lādēta, ir nepieciešams ņemt vērā elektrostatisko (jonu) mijiedarbību vai kustīgajā fāzē izmantot sāļus vai buferšķīdumus, lai samazinātu šādu mijiedarbību.

Vielu izdalīšanas laiki atkarībā no buferkomponentes daudzuma tika pētīti, mainot amonija formiāta koncentrāciju (1 - 30 mM) kustīgajā fāzē (acetonitrils : ūdens = 85:15 (v/v); pH 5,0). Palielināt amonija formiāta saturu kustīgajā fāzē nebija iespējams tā ierobežotās šķīdības dēļ.

### 3.5.1. Silikagela stacionārās fāzes

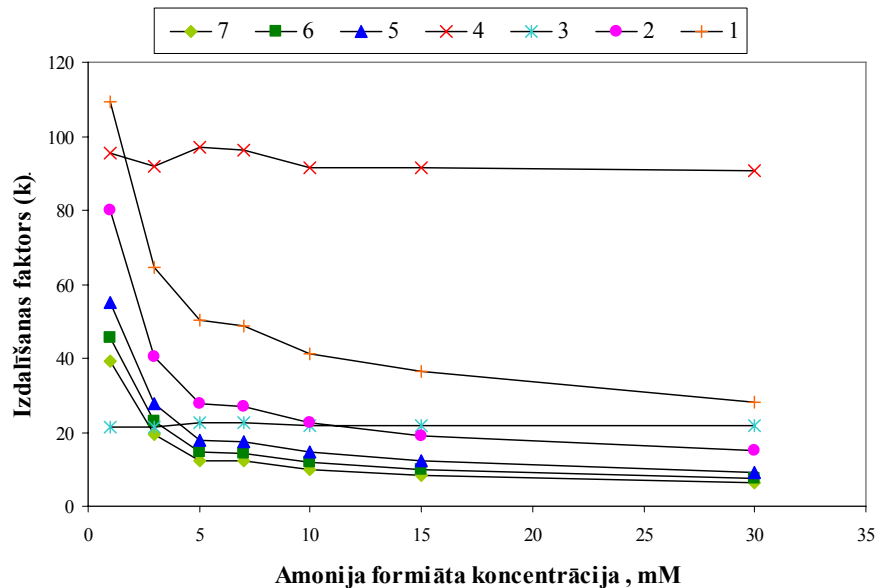
Kustīgās fāzes buferkomponentes satura ietekme uz pētāmo vielu izdalīšanas laikiem tika pētīta, lietojot kolonnas *Atlantis HILIC Silica*, *Alltima HILIC*, *Spherisorb silica*, kas satur nemodificētu (neaizsargātu) silikagelu sorbentu, kuru uzglabā un pilda kolonnās acetonitrilā vidē.

Silikagela tīrība patiesībā ir sava veida indukcijas efekts, kad dažu metālu jonu klātbūtne ietekmē silanola grupas aciditāti un, kā redzams (3.19.–3.21. att.), izmantojot dažādu ražotāju silikagela kolonnas, ievērojami atšķirās izdalīšanas laiki, analizējot mildronātu un tā piemaisījumus, izņemot cviterjonus (mildronāts un savienojums **3**). Cēlonis šai parādībai iespējams ir stacionārās fāzes izmantotā silikagela tīrība [34], taču to var ietekmēt arī atšķirīgās kolonnu pagatavošanas metodes. Ļoti grūti salīdzināt iegūtos izdalīšanas laikus, jo silikagela kolonnu poru izmēri un to specifiskie virsmas laukumi atšķirās.

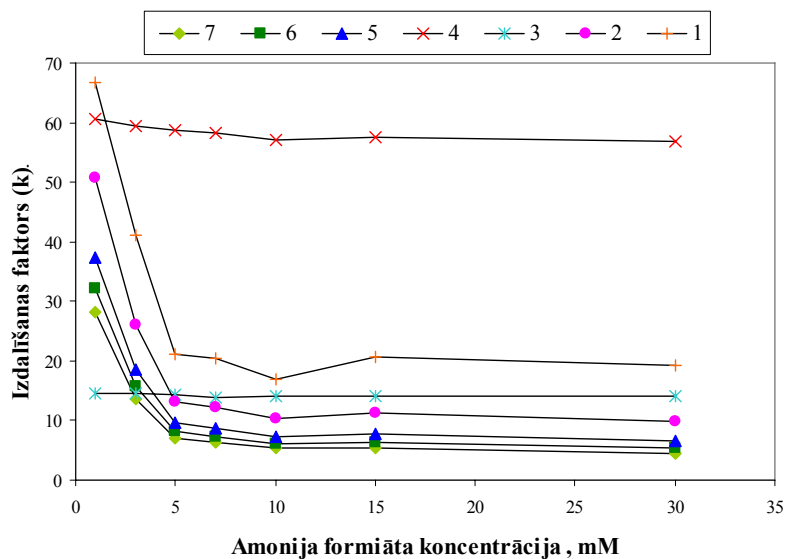
Kā redzams 3.19 – 3.21. attēlos, palielinot amonija formiāta buferšķīduma koncentrāciju no 1 līdz 30 mM, savienojumu **1-2** un **5-7** izdalīšanas laiki mainās eksponenciāli, mildronātam tas nedaudz samazinās, bet savienojuma **3** izdalīšanas laiks praktiski nemainās.

Mijiedarbības mehānisms HILIC režīmā galvenokārt balstās uz jonu migrēšanu ūdeni saturošā slānī uz silikagela virsmas un ārā no tā. Tāpēc izdalīšanas laika samazināšanos vislabāk var saprast kā līdzsvara koncentrācijas nobīdi un jonu apmaiņu ar aktīvajiem silanola centriem. Buferšķīduma koncentrācijas palielināšana paaugstina konkurenci uz aktīvajiem silanola centriem un samazina pozitīvi lādēto analizējamo vielu iespēju mijiedarboties ar šiem centriem [30]. Palielinot buferšķīduma koncentrāciju,

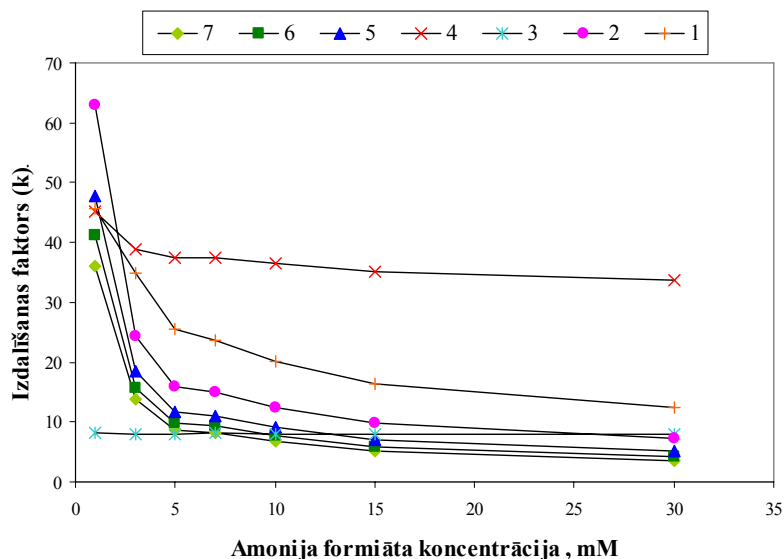
hromatogrāfiskās smailes simetrija uzlabojas. Šī pētījuma rezultāts vēlreiz apstiprina pieņēmumu, ka viens no vielu izdalīšanas mehānismiem HILIC režīmā ir jonu apmaiņa.



3.19. att. Savienojumu 1-7 (sorbents silīcija dioksīds Nr.4, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.



3.20. att. Savienojumu 1-7 (sorbents silīcija dioksīds Nr.3, skat. 2.2.tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.

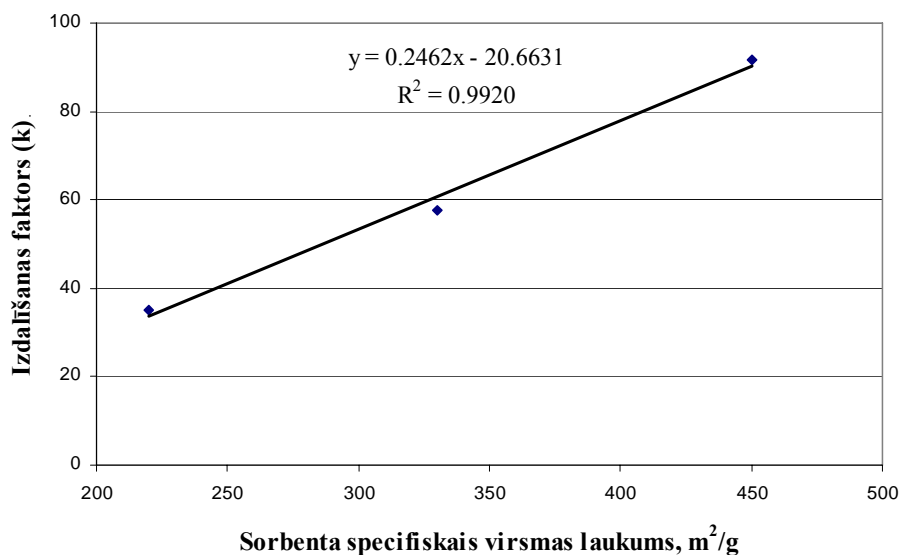


**3.21. att. Savienojuma 1-7 (sorbents silīcija dioksīds Nr.5, skat. 2.2. tab.) izdališanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.**

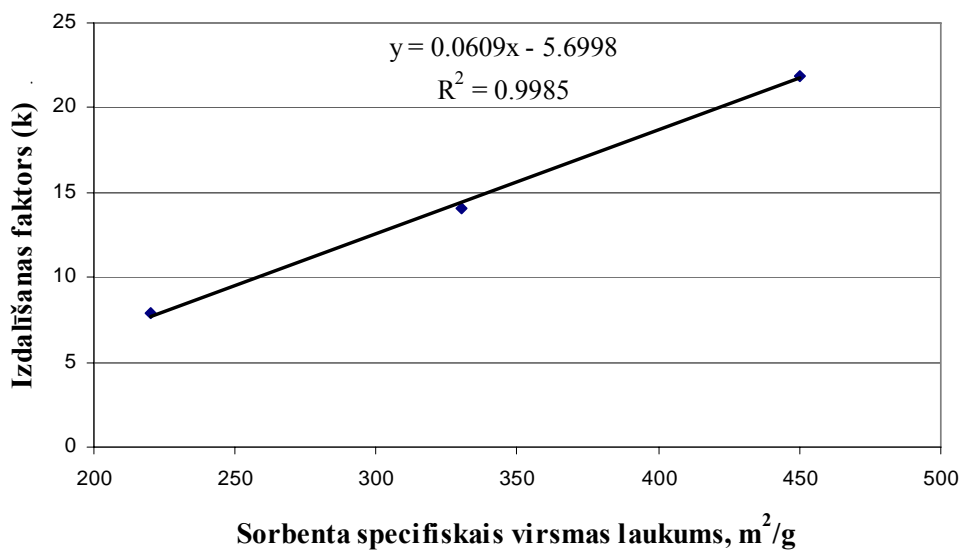
Salīdzinot nemodificēta silikagela sorbentus, konstatēts, ka analizējamo vielu izdališanas faktori ir tieši proporcionāli stacionārās fāzes relatīvajam virsmas laukumam (skat. 3.22. att. un 3.23. att.). Sorbcijas ietilpība (kapacitāte) uz virsmas vienību ir konstanta; tas pats attiecas uz jonu apmaiņas un fāžu pārejas procentuālo sadalījumu.

Amonija formiāta koncentrācijas palielināšana var izraisīt aktīvo silanolu centru noteiktu piesātinājumu, tādējādi samazinot pozitīvi lādēto analizējamo vielu spējas mijiedarboties ar šiem centriem [110]. Iespējams, sāls klātiene kustīgajā fāzē apgrūtina analizējamo vielu šķīšanu. Betaīnam līdzīgo savienojumu **3** un **4** sorbcija notiek saskaņā ar mehānismu, kas atšķiras no pozitīvi lādēto daļiņu tieksmes pēc stacionārās fāzes silanolu grupām.

Vislielākās sorbcijas vērtības ir *Alltima* kolonnai, tai seko *Atlantis* un *Spherisorb* sorbenti. Šāda secība atbilst šo kolonnu pildījumu virsmas laukumiem un rosina uzskatīt, ka fizikāli ķīmiskie procesi uz šo triju silikagelu virsmas ir līdzīgi.



**3.22. att. Savienojuma 4 (skat. 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no sorbenta relatīvā virsmas laukuma, lietojot dažādu ražotāju silikagela kolonnas. Kustīgā fāze: acetonitrils - 15 mM amonija formiāts (85/15, v/v; pH 5,0).**



**3.23. att. Savienojuma 3 (skat. 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no sorbenta relatīvā virsmas laukuma, lietojot dažādu ražotāju silikagela kolonnas. Kustīgā fāze: acetonitrils - 15 mM amonija formiāts (85/15, v/v; pH 5,0).**

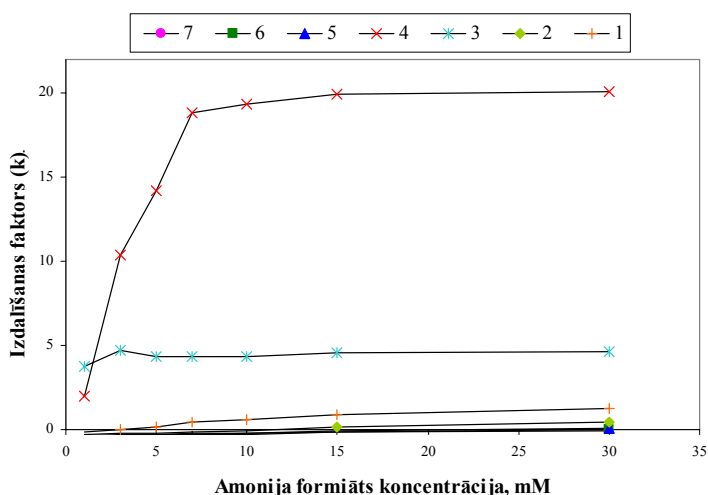
### 3.5.2. Aminogrupas saturoša stacionārā fāze

Kolonna *Waters Spherisorb NH<sub>2</sub>* pildīta ar aminopropilsilikagelu ar nebloķētām grupām sorbentā. Šo sorbentu uzglabā ūdens un acetonnitrila maisījumā, nevis normālās fāzes hromatogrāfijas eluentos (piem., heksānā). Nopietnas grūtības darbā ar aminopropilgrupas saturošu sorbentu sagādā tā ierobežotā stabilitāte ūdeni saturošā kustīgā fāzē, kas HILIC apstākļos izraisa ātru ligandu atšķelšanos, un tā rezultātā notiek hromatogrāfiskās smailes deformēšanās [9]. Šī nestabilitāte, šķiet, saistīta ar pirmējās aminogrupas katalītisku pašiznīcināšanos ligandā, un arī citas augsti hidrofilas silikagela fāzes krietni stabilākas pret fāzes noārdīšanos.

Šim pētījumam lietotā *Waters Spherisorb NH<sub>2</sub>* kolonna pirms darba tika mazgāta ar izopropanolu un tad ar ūdens un acetonnitrila maisījumu (50/50, v/v). Beigās kolonna tika līdzsvarota (vai kondicionēta) amonija formiātu saturošā kustīgajā fāzē.

Aminopropilgrupas saturošais sorbents saistītā stacionārā fāzē ir protonēts neitrālā un skābā pH vidē kustīgajās fāzēs. Savienojumi, kuri kustīgā fāzē ir anjonu formā, papildus hidrofilai mijiedarbībai realizē arī anjonu apmaiņas procesus. Atdalīšanas jonu apmaiņas mehānismu pierāda 3.24. attēls, kurā kustīgās fāzes (ūdens-acetonitrils) saturs tika uzturēts nemainīgs, bet buferšķīduma koncentrācija tika mainīta.

Elektrostatiskās mijiedarbības dēļ uz sorbentiem ar pozitīvi lādētām aminogrupām var sorbēties formiāta buferšķīduma pretjoni. Tas var samazināt pozitīvi lādēto analizējamo vielu atgrūšanos no pozitīvi lādētas stacionārās fāzes, palielinot šo vielu izdalīšanas laiku.



3.24. att. Savienojumu 1-7 (kolonna ar aminogrupas saturošu silikagelu Nr.8, skat. 2.2. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.

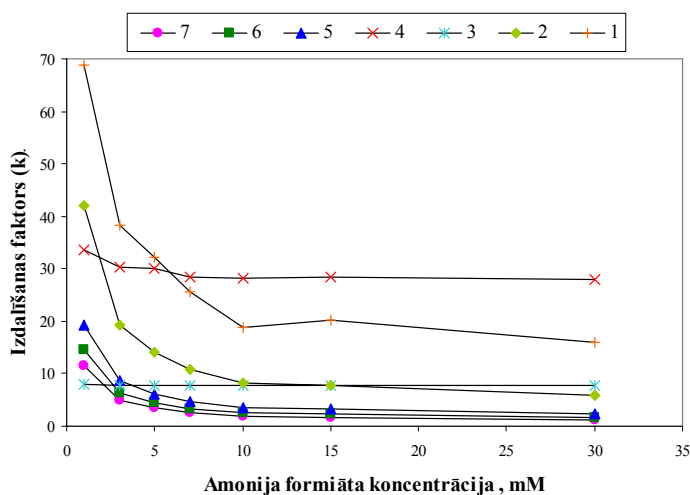
### 3.5.3. Amīdgrupas saturoša stacionārā fāze

*TSKgel Amide-80* kolonnā sorbents satur karbamoilgrupas, kas ar alifātisku oglekļa atomu ķēdīti piesaistītas silikagela virsmai. Amīdgrupa šajā kolonnā ir ķīmiski mazāk aktīva par aminogrupu un nav bāziska [34].

Kā redzams 3.25 attēlā, ja bufersāls koncentrācija ir mazāka par 5,0 mM, savienojuma **1** izdalīšanas laiks ir vislielākais. Šādos apstākļos tika novērota arī slikta hromatogrāfiskās smailes forma. Pielielinot bufersāls koncentrāciju diapazonā no 1 līdz 10 mM, savienojumiem **1-2** un **5-7** būtiski samazinājās izdalīšanas laiks, bet mildronāta izdalīšanas laiks samazinājās tikai nedaudz un savienojuma **3** izdalīšanas laiks praktiski nemainījās.

Izdalīšanas laika samazinājumu savienojumiem **1-2** un **5-7** var izskaidrot ar sorbenta virsmas silanolgrupu jonapmaiņas mehānismu [9].

Iepriekš novērotā bufersāļu ietekme atbilst HILIC izdalīšanas mehānismam. Ir hipotēze, ka uz polāras stacionārās fāzes virsmas var pastāvēt sorbēta ūdens kārtiņa, kas veicina izšķīdušo vielu sadalījumu mijiedarbību [9, 35]. Bez sāļu vai bufervielu klātienē kustīgajā slānī, lādētas analizējamās vielas ar lielāku varbūtību var uzturēties sorbētā ūdens slānī uz sorbenta virsmas. Tāpēc šīm izšķīdušajām vielām būs raksturīgas lielas izdalīšanas laika vērtības, vai arī vielas neelušies no kolonnas. Palielinoties sāls koncentrācijai kustīgajā fāzē, pretjonu klātie veicinās jonu pāru veidošanos ar lādētām izšķīdinātām vielām. Izveidoto jonu pāru šķīdība kustīgajā fāzē būs labāka, kas samazinās analītu izdalīšanas laikus.



3.25. att. Savienojumu **1-7** (amīdgrupas saturošs silikagels Nr.7, skat. 2.2. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.

### 3.5.4. Sulfobetaīna tipa cviterjonu stacionārā fāze

*ZIC-HILIC* kolonnā ir  $N^+(Me)_2CH_2CH_2SO_3^-$  ligandu saturošs sorbents. Šis ligands kopumā ir neitrāls, jo tajā ir divas pretēji lādētas funkcionālās grupas. Šo divu lādēto fragmentu ciešais tuvums kavē to neatkarīgu mijiedarbību ar analizējamajām vielām.

*ZIC-HILIC* stacionārajā fāzē sulfobetaīna tipa cviterjonu funkcionālā grupa ir kovalenti saistīta ar porainu silikagelu. Rezultātā tas ir lādēts ar negatīvu un pozitīvu lādiņu, tomēr kopumā neitrāls, augsti polārs materiāls, kas pilnībā atšķiras no citiem HILIC atdalīšanā izmantojamiem sorbentiem. Atdalīšanu nodrošina hidrofilais (starpfāžu) sadalījums un vājā elektrostatiskā mijiedarbība ar pozitīviem vai negatīviem lādiņiem. *ZIC-HILIC* stacionārās fāzes vājā elektrostatiskā mijiedarbība ļauj izmantot zemas buferšķīduma koncentrācijas, kas atvieglo masspektrometrisku savienojumu atdalīšanu un detektēšanu.

Cviterjonu stacionārajā fāzē atrodas kustīgās fāzes sāļiem pieejamākas, negatīvi lādētas sulfonskābes grupas, un alkilķēdes vidusdaļā „paslēptas” pozitīvi lādētas ceturtējās amonija grupas. Tāpēc jebkura pozitīva analizējamās vielas lādiņa mijiedarbība ar cviterjonu stacionārās fāzes sulfonskābes grupu ir stiprāka nekā atbilstošā mijiedarbība starp analizējamās vielas negatīvo lādiņu un cviterjonu stacionārās fāzes pozitīvi lādēto grupu. Un analogiski, negatīvi lādētās analizējamās vielas spēcīgāk atgrūž sulfonskābes grupas nekā pievelk „slēptās” amonija grupas. Kopumā tas izraisa izdalīšanas laiku palielināšanu pozitīvi lādētām analizējamajām vielām un izdalīšanas laiku samazināšanu negatīvi lādētām analizējamajām vielām [19].

Kā redzams 3.26. attēlā, palielinot buferšķīdumā amonija formiāta koncentrāciju no 1 līdz 30 mM, vielu izdalīšanas laiki krasi izmainās, taču ne visiem savienojumiem.

Protolītiskā pāra  $HCOOH/HCOO^-$  pKa ir 3,75, tāpēc šis buferšķīdums uzrāda vērā ņemamu buferkapacitāti pH diapazonā 2,75-4,75. Taču, kā konstatēts iepriekšējos eksperimentos, pētāmiem savienojumiem optimālais kustīgās fāzes pH ir 5,0. Tātad lielākā daļa protolītiskā pāra šķīdumā ir anjona formā, tādejādi palielinot sistēmas negatīvo lādiņu.

Pētītos savienojumus (mildronāts un tā piemaisījumi) vispārīgi var uzskatīt par cviterjoniem, kur hidrazīnija grupa atrodas molekulas vienā galā, bet karboksilgrupa - otrā:



Apskatot šo septiņu savienojumu struktūras, var redzēt, ka savienojumi savstarpēji ir atšķirīgi: karboksilgrupas ir vai nu bloķētas, vai brīvas (tas ir, jonizējamas). Mildronātam un savienojumam **3** ir abi – negatīvi un pozitīvi lādēti centri. Savienojumiem **5-7** kovalenti bloķētas (esterificētas) ir karboksilgrupas, bet savienojumu **1-2** struktūrās karboksilgrupas



nav vispār, tāpēc nav arī to ietekmes. Atšķirības starp šiem savienojumu tipiem ir redzamas arī eksperimentālajos pētījumos. Savienojumiem ar bloķēto karboksilgrupu novērojama krasa izdalīšanas laiku palielināšanās, bet savienojumiem ar brīvu karboksilgrupu izdalīšanas laiki no kolonnas ar šo sorbentu praktiski nemainās, palielinot amonija formiāta koncentrāciju buferšķīdumā.

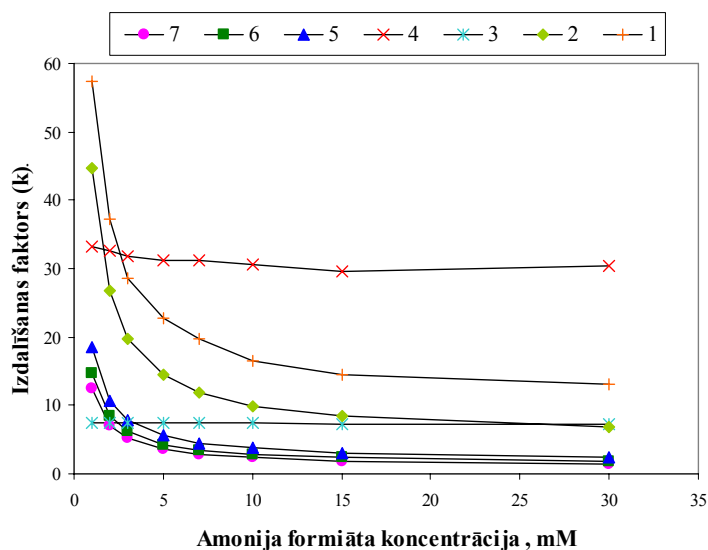
Šādu bufersāls ietekmi var izskaidrot sekopjoši: buferšķīduma koncentrācijas paaugstināšana palielina elektrolīta jonu koncentrāciju. Šie joni elektrostātiski bloķē izšķīdināto savienojumu pretēji lādētās grupas un arī *ZIC-HILIC* sorbenta sulfobetaīna grupas. Tādējādi savienojumu hidrazīnija grupa kļūst mazāk pozitīva un pievilksnās spēja kolonnas sorbenta sulfongrupai ( $-\text{SO}_3^-$ ) ir vājināta. Savienojumi tiek eluēti ātrāk no kolonnas, ko labi apliecina eksperimentālie rezultāti (3.26. att.).

Papildus izdalīšanas laiku ietekmei, buferšķīdumu koncentrācija ietekmē arī smailes formu. Palielinot buferšķīdumu koncentrāciju, smailes simetriskums uzlabojas.

Amonija formiāts kustīgās fāzes šķīdumam ir amonija jonu avots. Pētījuma optimālajos apstākļos (pH 5,0) protolītiskais pāris  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  ( $\text{pK}_a = 9,2$ ), un protolītiskā pāra līdzsvars ir stipri novirzīts uz amonija jonu pusi. Domājams, pozitīvi lādētie amonija joni saistās ar stacionārās fāzes negatīvi lādētajām sulfobetaīna grupām, bloķējot sorbenta negatīvos lādiņus. Tas traucē analizējamo vielu un stacionārās fāzes mijiedarbību, papildus samazinot to izdalīšanas laikus.

Izdalīšanas laika atkarība no buferšķīduma koncentrācijas parādīta 3.26. attēlā. Katjonu savienojumu vielu **1-2** un esteru **5-7** izdalīšanas laiki mainās ļoti līdzīgi, eksponenciāli: palielinot buferšķīdumu sāls koncentrāciju kustīgajā fāzē, samazinās izdalīšanas laiki. Šāds darbības princips ir raksturīgs jonu apmaiņas hromatogrāfijai. Parasti to skaidro kā konkurences palielināšanos uz sorbcijas centriem, pretjonu daudzumam kustīgajā fāzē palielinoties.

No otras puses – cviterjoni izturas atšķirīgi. Bufersāls daudzums kustīgajā fāzē šo vielu izdalīšanas laikus ietekmē ļoti maz. Tas norāda, ka eksperimenta apstākļos jonu apmaiņas loma cviterjonu sorbcijas mehānismā ir nenozīmīga.



**3.26. att. Savienojumu 1-7 (sorbents sulfobetaīns Nr.6, skat. 2.2. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no amonija formiāta daudzuma kustīgajā fāzē.**

### 3.6. Dažādu buferšķīdumu ietekme uz izdalīšanas laikiem HILIC režīmā

Lai gan apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijai ir izstrādāts pietiekami daudz izdalīšanas laika prognozēšanas modeļu, HILIC joprojām trūkst piemērotas teorētiskās bāzes. Ir atrodamas dažas publikācijas, kurās pētāmo vielu hromatogrāfiskā sorbcija HILIC režīmā tiek prognozēta ar kāda matemātiska modeļa palīdzību [111-113]. Džins u.c. [111] pētīja ietekmi tikai ūdens satura eluentā, labāko prognozēšanas sakarību izsaka sekojošā formā:

$$\ln k = a + b \ln C_{\text{ūdens}} + c C_{\text{ūdens}}; \text{ kur}$$

a – konstante, kas atkarīga no molekulas tilpuma un mijiedarbības enerģijas starp stacionāro un kustīgo fāzi;

b – virziena koeficients, kas raksturo tiešu mijiedarbību starp analītu un stacionāro fāzi;

c – koeficients, kas raksturo mijiedarbību starp izšķīdinātajām vielām un šķīdinātajiem;

$C_{\text{ūdens}}$  – ūdens saturs kustīgajā fāzē.

Cits pētījums – Kvimings u.c. [112] – izmantoja daudzparametru lineāro regresiju un mākslīgo nervu tīklu (*artificial neural network*, ANN), lai paredzētu adrenoreceptoru agonistu hromatogrāfisko darbību kā funkciju no acetonitrila satura kustīgajā fāzē, no  $\log D$ , no ūdeņraža saišu donoru klātienēs, no desolvatācijas enerģijas oktanolā un no kopējā absolūtā lādiņā uz atomiem. Iegūtais prognozējošais modelis bija šo parametru

lineāra summa (katrs – ar izskaitļotu koeficientu), kas proporcionāla logaritmam no  $k'$ . Cits šo pašu autoru raksts lietoja līdzīgas metodes ginsenozīdu analīzē [113].

Visas šīs publikācijas pievērš uzmanību organiskā šķīdinātāja saturam kustīgajā fāzē. Pretēji šādai pieejai, mūsu pētījums koncentrējas uz buferpāri veidojošo savienojumu un analizējamo vielu īpašībām, saglabājot acetonitrila saturu nemainīgu, toties mainot pH un buferšķīduma komponentes.

Analizējamo vielu izdalīšanas faktori 2 mM un 20 mM koncentrācijas buferšķīdumos parādīti attiecīgi 3.2 tabulā un 3.3. tabulā.

**3.2 tabula**

**Pētāmo savienojumu 1-2; 5-15 (skat. 2.1.tab.) izdalīšanas faktora vērtības (log k) 2mM buferšķīduma koncentrācijā**

Savienojums Buferšķīdums	log k												
	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Amonija formiāts	1,32	1,42	1,13	1,07	1,01	1,26	1,04	1,19	0,97	0,74	0,58	1,31	1,31
Amonija acetāts	1,54	1,59	1,28	1,21	1,15	1,42	1,17	1,33	1,09	0,84	0,66	1,48	1,48
Amonija propionāts	1,71	1,77	1,45	1,38	1,33	1,60	1,35	1,51	1,27	1,02	0,84	1,66	1,67
Amonija butirāts	1,87	1,93	1,61	1,53	1,47	1,76	1,50	1,67	1,42	1,16	0,98	1,74	1,74
Amonija izo-butirāts	1,89	1,97	1,63	1,56	1,49	1,79	1,52	1,69	1,44	1,16	0,98	1,78	1,77
Amonija heptafluorbutirāts	1,15	1,24	0,92	0,85	0,78	1,07	0,81	0,98	0,73	0,44	0,26	0,53	0,51
Amonija trifluoracetāts	0,33	0,49	0,27	0,23	0,18	0,34	0,20	0,29	0,15	-0,12	-0,15	0,19	0,17

**3.3 tabula**

**Pētāmo savienojumu 1-2; 5-15 (skat. 2.1.tab.) izdalīšanas faktora vērtības (log k) 20 mM buferšķīduma koncentrācijā**

Savienojums Buferšķīdums	log k										
	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	15
Amonija formiāts	0,97	1,01	0,68	0,61	0,54	0,84	0,57	0,74	0,48	0,20	0,0
Amonija acetāts	1,22	1,20	0,85	0,76	0,69	1,03	0,72	0,90	0,63	0,32	0,1
Amonija propionāts	1,33	1,29	0,93	0,85	0,78	1,11	0,81	0,99	0,71	0,42	0,1
Amonija butirāts	1,44	1,39	1,02	0,93	0,86	1,21	0,89	1,08	0,79	0,49	0,2
Amonija izobutirāts	1,47	1,41	1,04	0,95	0,88	1,23	0,91	1,10	0,81	0,51	0,2
Amonija heptafluorbutirāts	-0,01	0,12	-0,07	-0,12	-0,15	0,04	-0,12	-0,05	-0,18	-0,36	-0,1
Amonija trifluoracetāts	0,07	0,20	-0,01	-0,05	-0,09	0,10	-0,07	0,02	-0,12	-0,28	-0,1

Tika novērots, ka alkilķēdes garuma palielināšanās (formiāts, acetāts, propionāts, butirāts un izobutirāts) izraisa izdalīšanās faktora logaritma lineāru palielināšanos visiem analizējamajiem savienojumiem **1-2**; **5-13** (skat. 2.1.tab.). Fluorēto karbonskābju amonija sāļi neiekļaujas alifātisko karbonskābju amonija sāļu sērijas datos, taču pieejamo fluorēto karbonskābju skaits nebija pietiekams atsevišķas sērijas izveidošanai.

Izmantojot pilnīgi fluorētu karbonskābju amonija sāļu par buferšķīdumu komponentiem, izdalīšanās laiki samazinājās salīdzinot ar tādu pašu oglekļa ķēdes garuma nefluorēto skābju sāļiem. Tomēr arī fluorēto buferšķīdumu sērijā oglekļa ķēdes garuma palielināšana izraisa savienojumu izdalīšanas laika palielināšanos.

Saskaņā ar HILIC teoriju [32], bez sāļu vai buferšķīdumu klātienes kustīgajā fāzē elektriski lādētas vielas daudz labprātāk atrodas adsorbētā ūdens slānī. Tāpēc analizējamajām vielām ir ilgāks izdalīšanas laiks vai arī tās pilnīgi sorbējas kolonnā. Palielinoties sāļu koncentrācijai, tiks veicināta elektriski lādēto analizējamo vielu jonu pāru veidošanās. Izveidotie jonu pāri būs labāk šķīstoši kustīgajā fāzē, un izdalīšanas laiki samazināsies. Fluorsaturošiem jonu pāriem ir labāka šķīdība acetnitrilu saturošajā kustīgajā fāzē, tāpēc, izmantojot pilnīgi fluorētu (perfluorētu) karboksilskābju sāļus, izdalīšanās laiki būs mazāki nekā tāda pat oglekļa atoma ķēdes garuma nefluorētiem analogiem.

No otras puses, buferkomponentes oglekļa atoma ķēdes garuma palielināšanās nobīda bufersavienojuma sadalījuma līdzsvaru starp adsorbēto ūdens slāni un kustīgo fāzi kustīgās fāzes virzienā. Tādējādi analizējamo vielu tendenci atrasties ūdens slānī izraisījusi zemāka buferšķīduma lādēto daļiņu polaritāte.

3.4. tabulā apkopoti savienojumu izdalīšanās laiki atkarībā no buferšķīdumu molmasas. Korelācijas koeficienti  $R^2$  ir aplūkoti tikai pieciem buferšķīdumiem (amonija formiātam, acetātam, propionātam, butirātam un izobutirātam). Analogiska aina novērota gan 2 mM, gan 20 mM buferšķīdumiem, atšķirība ir tāda, ka 20 mM buferšķīdumos izdalīšanās faktori ir ievērojami mazāki.

**Korelācijas koeficienti pētāmo savienojumu izdalīšanās laika lineārai atkarībai no buferšķīduma molmasas (amonija formiāta, acetāta, propionāta, butirāta un izobutirāta gadījumā)**

Savienojuma Nr.	2 mM buferšķīdums			20 mM buferšķīdums		
	R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>	a	b
1	0,9937	0,0131	0,5111	0,9644	0,0109	0,3266
2	0,9966	0,0128	0,6080	0,9735	0,0089	0,4743
5	0,9973	0,0117	0,3872	0,9795	0,0079	0,2112
6	0,9968	0,0115	0,3348	0,9804	0,0076	0,1472
7	0,9967	0,0113	0,2893	0,9836	0,0075	0,0899
8	0,9976	0,0123	0,1830	0,9649	0,0084	0,3402
9	0,9964	0,0114	0,3064	0,9832	0,0075	0,1185
10	0,9964	0,0119	0,4256	0,9796	0,0079	0,2694
11	0,9954	0,0113	0,2468	0,9841	0,0074	0,0338
12	0,9925	0,0103	0,0705	0,9932	0,0070	0,2248
13	0,9883	0,0101	0,0733	0,9986	0,0062	0,3774

Kā jau minēts iepriekš, fluorētie buferšķīdumi neiekļaujas šajā lineārajā shēmā, tātad to sorbcijas īpašības ir sarežģītākas, un tās atkarīgas ne tikai no buferšķīduma molmasas. Modelī jāiekļauj arī citi sorbciju ietekmējošie faktori. Fluorēto savienojumu īpašības var atšķirties to pK<sub>a</sub> dēļ, jo dotajā pētījumā šķīdumā ar pH 5 fluoraizvietotajiem buferpāriem ir maza buferkapacitāte.

HILIC apstākļos analizējamo vielu hromatogrāfiskā sadalīšana notiek starp kustīgo fāzi un dinamiskā režīmā izveidotu stacionāro šķidro fāzi. Tāpēc adekvāta hromatogrāfiskās izdalīšanās modeļa veidošana šajā gadījumā nozīmē tāda matemātiskā modeļa izveidi, kas aprakstītu analizējamo vielu sadalījumu starp hidrofobo (kustīgo) un hidrofilo (stacionāro) fāzi.

Jebkuras vielas sadalījumu starp šīm fāzēm lielā mērā ietekmē sorbāta hidrofobitāte. Vispārpieņemta hidrofobitātes skaitliskas novērtēšanas metode ir sadalījums sistēmā oktānols / ūdens, ko apzīmē ar LogP. Šo vērtību iespējams noteikt gan eksperimentālā, gan aprēķinu ceļā. Tomēr lielākajā daļā gadījumu logP vērtību izmanto tādu savienojumu raksturošanai, kuri ir ievērojami mazāk hidrofilu par šajā darbā pētītajām vielām. Tādējādi pazīstamākie logP aprēķinu modeļi, tāpat kā eksperimentālās logP noteikšanas metodes nav pielietojamas pētīto savienojumu hidrofobitātes novērtēšanai. Tāpēc savā darbā iekļāvām modelī analizējamās (izšķīdinātās) vielas molmasu (M<sub>s</sub>) un pieejamo hidrofobo

virsmu (ASA\_H<sub>s</sub>). Šo parametru kombinācija būtībā ilustrē to, cik liela daļa molekulas var dot ieguldījumu hidrofobo mijiedarbību veidošanā un tādējādi, pēc mūsu domām, pietiekami labi apraksta analizējamās vielas hidrofobitāti. Izmantojot buferšķīdumus, HILIC hromatogrāfijas apstākļos analizējamās vielas sadalījumu starp hidrofobo kustīgo fāzi un hidrofilo stacionāro fāzi nosaka ne tikai sorbāta hidrofobitāte. Tas īpaši labi redzams 3.2. tabulas un 3.3. tabulas datos, kur skaidri izsekojama izdalīšanas laika parametru atkarība no buferšķīdumu pagatavošanai izmantoto sāļu molmasas. Tomēr, salīdzinot abu tabulu datus, var secināt, ka fluorēto karbonskābju sāļu rinda neiekļaujas parasto alifātisko karbonskābju sērijā. Tātad arī šajā gadījumā svarīgs hromatogrāfisko izdalīšanos ietekmējošs parametrs būs buferšķīdumu veidojošo sāļu hidrofobitāte. To var viegli izskaidrot, ja zinām, ka buferšķīduma anjonu daudzums, tāpat kā analizējamā viela, sadalās starp stacionāro un kustīgo fāzi. Tātad, faktiskā bufera jonu koncentrācija (līdz ar to ietekme uz sorbāta izdalīšanos) stacionārajā un kustīgajā fāzē būs atkarīga ne tikai no sākotnējās koncentrācijas, bet arī no izmantotā anjona hidrofobitātes. Tātad, modelējot amonija un hidrazīnija katjonu hromatogrāfisko izdalīšanos, modelī būtu jāiekļauj buferšķīduma pagatavošanai izmantotās karbonskābes logP (log P<sub>b</sub>) vērtība.

Veidojot modelim nepieciešamo parametru komplektu, jāņem vērā, ka logP vērtības buferšķīduma pagatavošanai izmantotajai karbonskābei un atbilstošajai disociētajai formai ir ievērojami atšķirīgas. Jonizētās daļiņas koncentrēsies polārajā stacionārajā fāzē, kamēr karbonskābes molekulu koncentrācija būs lielāka kustīgajā fāzē. Buferšķīduma sadalījums starp relatīvi hidrofobo un hidrofilo slāni būs atkarīgs arī no tā jonizācijas pakāpes. Lai ņemtu vērā buferšķīduma jonizācijas faktoru, modelī jāiekļauj buferšķīdumu veidojošā sāls pK<sub>a</sub> (pK<sub>a<sub>b</sub></sub>) vērtība un šķīduma pH (pH<sub>b</sub>) vērtība.

Deskriptori, kas tika izmantoti QSRR (*Quantitative Structure-Retention Relationships*) modelēšanā, tika izskaitļoti ar MOE programmatūras [103] palīdzību un izraudzīti pēc to fizikālās būtības. Tika izraudzīti tikai tādi deskriptori, kas apraksta savienojumu izmēru, formu un hidrofobitāti. Šādi tika atlasīti 5 deskriptori. Deskriptoru raksturlielumi apkopoti 2.4 un 2.5.tabulās.

Lai izstrādātu statistisko modeli, visu 13 savienojumu (**1-2;5-15**, skat. 2.1. tab.) dati tika sadalīti apmācošajā kopā un pārbaudes kopā. 11 savienojumi (**1-2;6-8;10-15**, skat. 2.1. tab.) tika izmantoti kā apmācošā kopa, bet atlikušie divi **5** un **9** savienojumi (skat. 2.1 tab.) tika izmantoti iegūtā modeļa pārbaudei. Lai noskaidrotu izdalīšanas laika atkarību no vides pH, ar formiāta buferšķīdumam tika iegūti papildus dati ar buferšķīduma pH 3,5 un pH 6,0.

Izdalīšanās laika atkarība no izvēlētajā pH diapazonā ir aptuveni lineāra, tāpēc pH deskriptors tika pievienots lineārajam modelim. Šo eksperimentu rezultāti prezentēti 3.5. tabulā.

**3.5. tabula**

**Pētāmo savienojumu izdalīšanas faktori (log k) 2 mM amonija formiāta buferšķīdumā ar dažādām pH vērtībām.**

pH	Savienojuma Nr.												
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>
3,5	0,82	0,94	0,70	0,64	0,60	0,80	0,62	0,75	0,57	0,36	0,23	0,86	0,84
5,0	1,32	1,42	1,14	1,07	1,02	1,26	1,04	1,19	0,97	0,74	0,58	1,31	1,31
6,0	1,51	1,54	1,24	1,17	1,12	1,37	1,14	1,30	1,07	0,82	0,65	1,42	1,41

Prognozējamais statistiskais modelis tika izstrādāts ar apmācošās kopas datiem, mēģinot gan lineāras, gan nelineāras funkcionālās formas ar dažādām deskriptoru kopām un rezultātu novērtējot ar pārbaudes datiem. Augstākās prognozēšanas spējas ar minimālo deskriptoru skaitu tika panāktas ar 3.1. vienādojumu.

$$\log K = -0.709 - 0.00154 \cdot M_s - 0.000613 \cdot \text{ASA}_{H_s} + 0.269 \cdot \log P_b + 0.287 \cdot pK_{a_b} + 0.220 \cdot pH_b \quad (3.1),$$

kur:

$M_s$  - analizējamās vielas molmasa;

$\text{ASA}_{H_s}$  - analizējamās vielas pieejamā hidrofofā virsma;

$\log P_b$  - buferšķīduma sadalījuma koeficients sistēmā 'oktanols/ūdens';

$pK_{a_b}$  - buferšķīduma  $pK_a$  vērtība;

$pH_b$  - buferšķīduma pH.

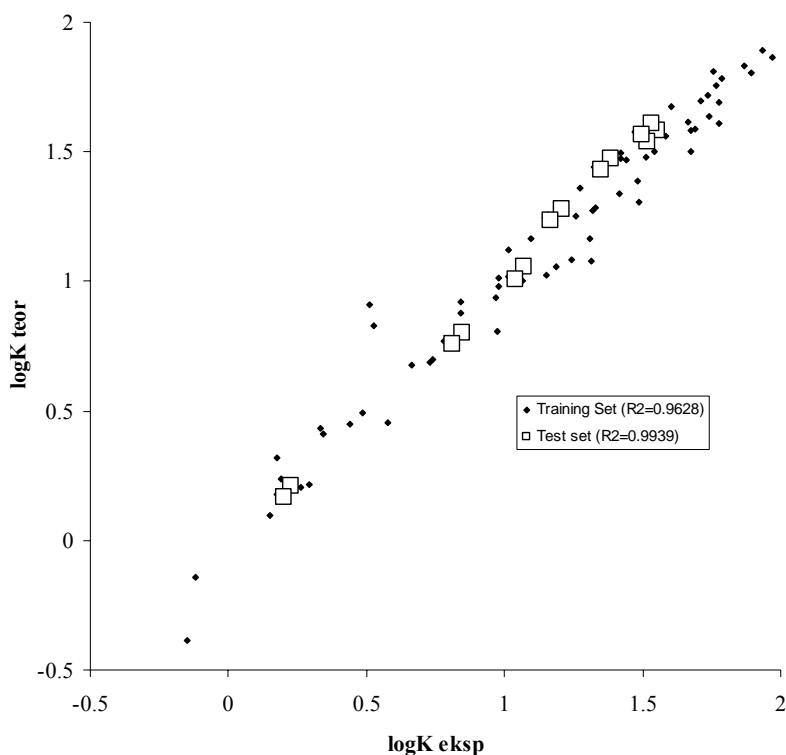
Parciālajā mazāko kvadrātu regresijā iegūtie koeficienti labi saskan ar teorētiskām zināšanām par HILIC izdalīšanās mehānismu. Koeficienta  $\text{ASA}_{H_s}$  negatīvā vērtība apstiprina, ka savienojumiem ar lielāku hidrofilītāti būs lielāks izdalīšanas laiks. No otras puses, izdalīšanas laika un  $\log P_b$  pozitīva korelācija norāda, ka buferšķīduma hidrofofobitātes palielināšana samazina polāras analizējamās vielas afinitāti pret kustīgo fāzi.

Konstatēta pozitīva korelācija arī starp izdalīšanas laiku un buferšķīduma  $pK_a$ . To var aprakstīt kā deprotonēta buferšķīduma īpatsvaru uzturot nemainīgu šķīduma pH. Tas ir, jo mazāks ir  $pK_a$ , jo lielāka daļa buferšķīduma molekulu ir deprotonētas. Negatīvi lādēti organiskā buferšķīduma joni var asociēties ar pozitīvi lādētu organisku analizējamo molekulu un palielina tā afinitāti pret kustīgo fāzi. Tā rezultātā izdalīšanas laiks samazinās.

Izdalīšanas laika izmaiņas, palielinot pH, var tikt izskaidrotas ar elektrostatisko mijiedarbību starp stacionāro fāzi un analizējamo vielu. Šķīdumiem ar augstāku pH virsmas silanolgrupu jonizācijas pakāpe palielinās, radot šādai mijiedarbībai izdevīgākus apstākļus.

Eksperimentāli iegūto rezultātu atbilstību teorētiski prognozētiem ir parādīta 3.27. attēlā. Gala modelim relatīvā mediānas standartnovirze ir 0,11 un 0,089 – attiecīgi, apmācošajai un pārbaudes kopai. Deskriptoru nozīmīguma pārbaude rāda, ka visi deskriptori būtiski ietekmē modeļa kopējo veiktspēju, un nav nepieciešami vēl papildus mainīgie. Ir negaidīti, ka modelis labāk nekā apmācošajai kopai strādā ar pārbaudes kopas datiem. Šo faktu var izskaidrot ar relatīvi plašo ķīmiskās struktūras dažādību savienojumiem apmācošajā kopā un nejauši izvēlētiem savienojumiem pārbaudes kopā.

Slāpekli saturošu savienojumu izdalīšanas laika prognozēšanas modelis tika izveidots, izmantojot programmatūrā [114] iestrādāto lineāro un nelineāro mazāko kvadrātu regresijas metodi.



**3.27. att. Izdalīšanas laika prognozēšana slāpekli savienojumiem ar modeļvienādojumu.**



### 3.7 Temperatūras ietekme analītiskās kolonnās ar dažādām stacionāram fāzēm

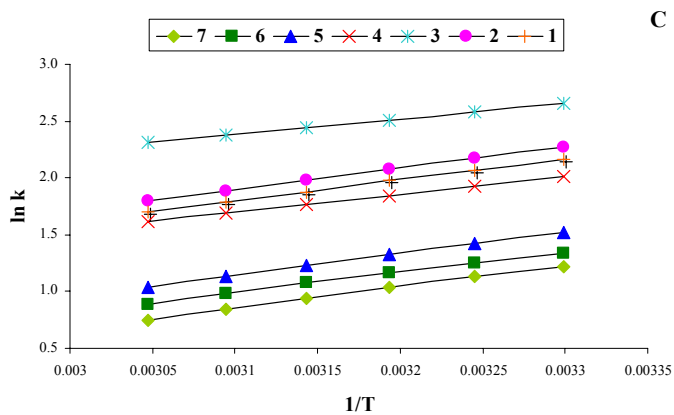
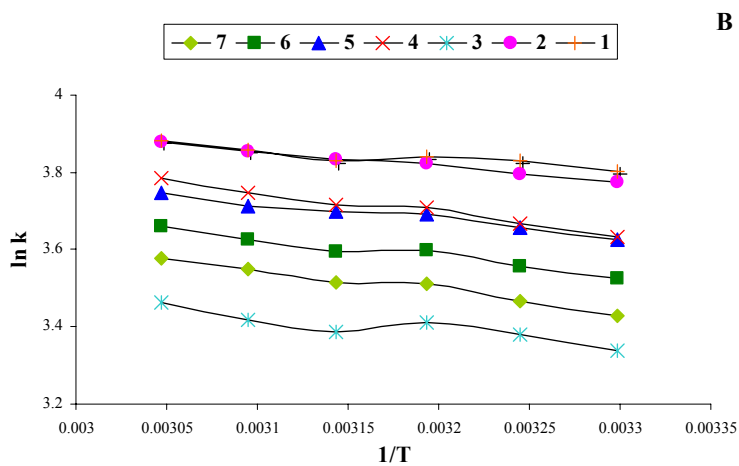
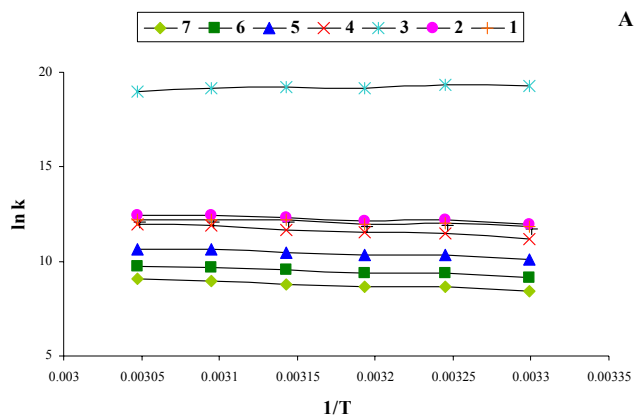
Pētot sakarību starp hromatogrāfisko vielu izdalīšanu atkarībā no kolonnas temperatūras izmantotas stacionārās fāzes ar dažādiem sorbentiem (silikagels un cviterjonu sulfobetaīns, kolonnas 3, 5, 6 (skat. 2.2.tab.)).

Temperatūras ietekme tika noteikta trim kustīgajām fāzēm: 1) 10% ūdens ar 0,1% skudrskābi / 90% acetonitrila; 2) 10% ūdens ar 0,1% skudrskābi / 90% metanola; 3) 15% 5mM amonija formiāta (pH 5,0) ūdens šķīduma / 85% acetonitrila. Šajā pētījuma posmā temperatūras ietekme uz sorbciju tika pētīta, mainot kolonnas temperatūru no 30 °C līdz 55 °C, un norādīto savienojumu izdalīšanas dati tika apstiprināti, izmantojot Van't Hofa funkcionālo sakarību ( $\log k = f(1/T)$ ), un aprakstīti trim augstāk minētajām kolonnām (3.28-3.30. att.).

Silikagela sorbentam ar acetonitrila kustīgo fāzi analizējamo vielu izdalīšanas laiks pieauga, palielinoties temperatūrai; tas norāda vai nu uz pozitīvu entalpiju izšķīdinātās vielas mijiedarbībā ar stacionāro fāzi, vai/un uz būtisku entropijas ieguldījumu. Šī temperatūras ietekmes sakarība ir pretēja apgrieztās fāzes hromatogrāfijas apstākļos novērotajai, tas ir, izdalīšanas laiku samazināšanai, temperatūrai pieaugot. Šāds rezultāts nodrošina alternatīvus risinājumus mildronāta piemaisījuma atdalīšanas selektivitātes uzlabošanai ar temperatūras kontroles palīdzību. Temperatūras paaugstināšana var palielināt vielu izdalīšanas laiku, tādējādi uzlabojot  $R_s$  vērtības. Bez tam, augstākās temperatūrās viskozitāte ir zemāka un masas pārnese ātrāka, kas var samazināt smailes platumu, tādējādi var uzlabot analizējamo vielu izšķiršanu, kas atkarīga no izdalīšanas laika un difūzijas stacionārajā fāzē [61].

Lineāra sakarība starp izdalīšanas faktoru ( $k$ ) un temperatūru pētījāmajiem savienojumiem tika novērota temperatūru diapazonā 30-55 °C uz visām kolonnām ar augstiem korelācijas koeficientiem ( $R^2$ ) diapazonā no 0,950 līdz 0,998. Tas ir analogiski RPLC plaši novērotajam [115, 116], lai gan literatūrā tiek aprakstītas arī nelineārās Van't Hofa funkcionālās sakarības, to attiecinot uz entalpijas ( $\Delta H^0$ ) un fāžu attiecības ( $\phi$ ) atkarību no temperatūras RPLC apstākļos [117, 118]. Vispār, konstatējot nelineārus Van't Hofa funkcionālās sakarības, tiek pieņemts, ka entalpija un entropija mainās atkarībā no temperatūras. Mūsu pētījumi nekonstatēja nekādu nelinearitāti HILIC sorbentu īpašībās.

Šķīduma hromatogrāfijā temperatūras ietekmi var attiecināt uz kolonnas pildījuma temperatūru, uz kustīgās fāzes vai kolonnas sildītāja temperatūru. Vissvarīgākā ir temperatūra kolonnā, taču tā ir grūti izmērāma, mehāniski neietekmējot kolonnu.

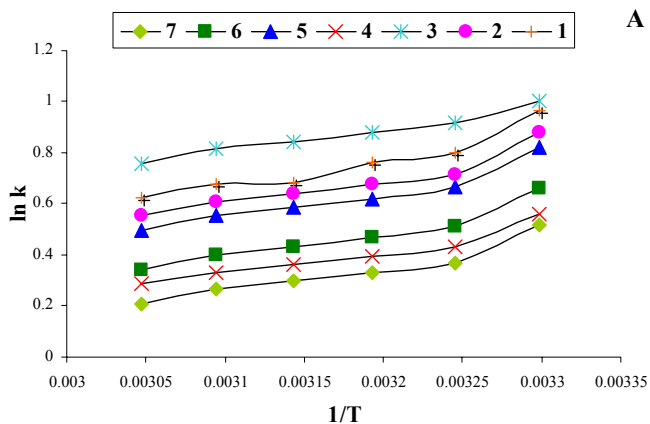


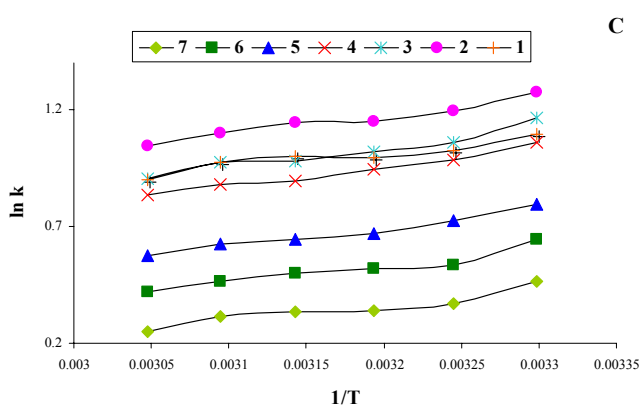
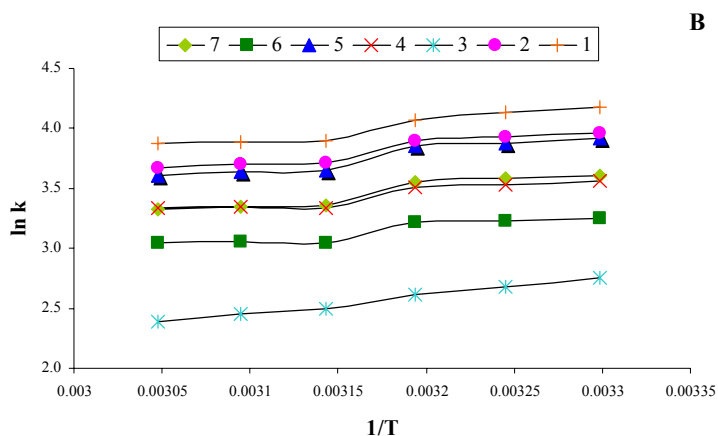
3.28. att. Savienojumu 1-7 (skat. 2.1. tab.) izdalīšanas faktora ( $k$ ) atkarība no kolonnas temperatūras. Kustīga fāze: 90% MeCN /10 % H<sub>2</sub>O (0,1 % FA). Stacionārās fāzes: A - Atlantis HILIC Silica, B - Waters Spherisorb Silica, C - ZIC HILIC.

Vienkāršāks paņēmiens kolonnas temperatūras noteikšanai ir caurplūsmas termopāra lietošana kolonnā ieejošās un no tās iznākošās kustīgās fāzes temperatūru mērīšana. Kustīgās fāzes temperatūras vidējā vērtība kolonnas ieejā un izejā dos pieņemamu novērtējumu temperatūrai kolonnā un informāciju par temperatūras gradientu kolonnas garumā. Kolonnas termostata temperatūra vispārīgā gadījumā atšķirsies no temperatūras kolonnas iekšienē, uzturot termostata temperatūru konstantu.

MeOH kā kustīgās fāzes organiskais komponents ir protonu šķīdinātājs. Izmantojot MeOH kā kustīgās fāzes organisko komponentu acetnitrila vietā, septiņu izšķīdināto vielu izdalīšanas laiki, palielinot temperatūru, uzrādīja dažādas sakarības, kā parādīts attēlos 3.29. A-C. Dažiem savienojumiem paaugstinātā temperatūrā palielinājās izdalīšanas laiki, citi – pretēji. Atšķirīga temperatūras ietekme ir vairāku izdalīšanas mehānismu rezultāts. Papildus hidrofilai un jonu apmaiņas mijiedarbībai, iesaistīts arī šķīdinātāja-izšķīdinātās vielas un šķīdinātāja-stacionārās fāzes udeņraža saišu veidošanās mehānisms [44].

Visi rezultāti norāda uz to, ka temperatūras ietekme izšķīdināto vielu izdalīšanai metanola gadījumā ir sarežģītāka nekā acetnitrila piemērā, izdalīšanas mehānismu sarežģītības dēļ.





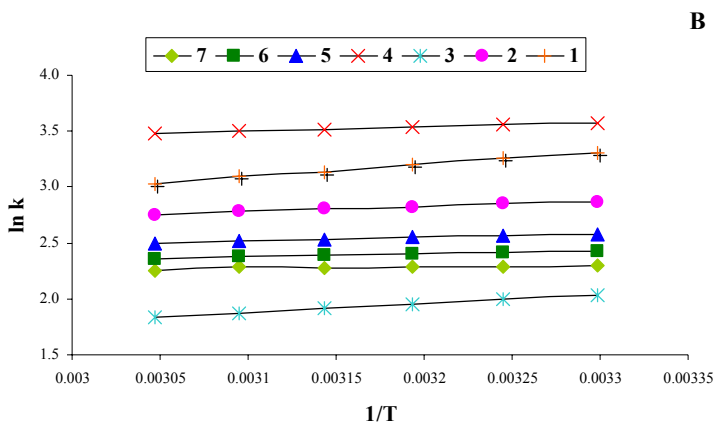
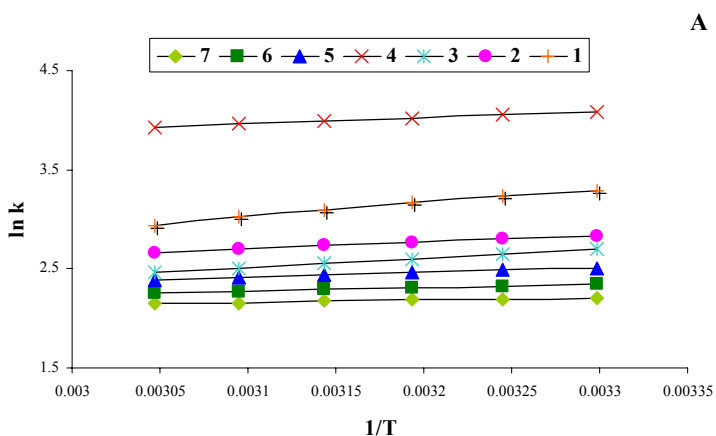
**3.29. att. Savienojumu 1-7 (skat. 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no kolonnas temperatūras. Kustīgā fāze: 90% MeOH/10 % H<sub>2</sub>O (0,1 % FA). Stacionārās fāzes: A - Atlantis HILIC Silica, B - Waters Spherisorb Silica, C - ZIC HILIC.**

Izdalīšanas laika palielināšanās tendence, paaugstinot analīzes temperatūru, tika novērota šķīdumiem ar pH 2,1; bet neitrālākā vidē ar pH 5,0 izšķīdināto vielu izdalīšanas laiku vērtības ievērojami samazinājās. Šie rezultāti ataino izdalīšanas pārnese mehānismu atkarībā no šķīduma pH. Bufersšķīduma pH mainoties no 2,1 uz 5,0, silanolgrupas jonizācija uz silikagela virsmas pakāpeniski pieaug un izšķīdinātās vielas tiek uzturētas protonētā stāvoklī [119], sniedzot aizvien lielāku iespēju katjonu apmaiņai. Izšķīdušo vielu izdalīšanā galvenā loma ir ne vairs hidrofilai mijiedarbībai, bet jonu apmaiņas mijiedarbībai. Kad jonu apmaiņa kļūst par dominējošo sorbciju mehānismu, svarīgu lomu, ietekmējot izdalīšanu laiku un selektivitāti, spēlē analizējamās vielas pK<sub>a</sub>. Agrākās publikācijās [120, 121] konstatēts, ka, temperatūras paaugstināšana var izraisīt protonēto molekulu īpatsvara samazināšanos. Tātad augstākā temperatūrā izšķīdināto vielu

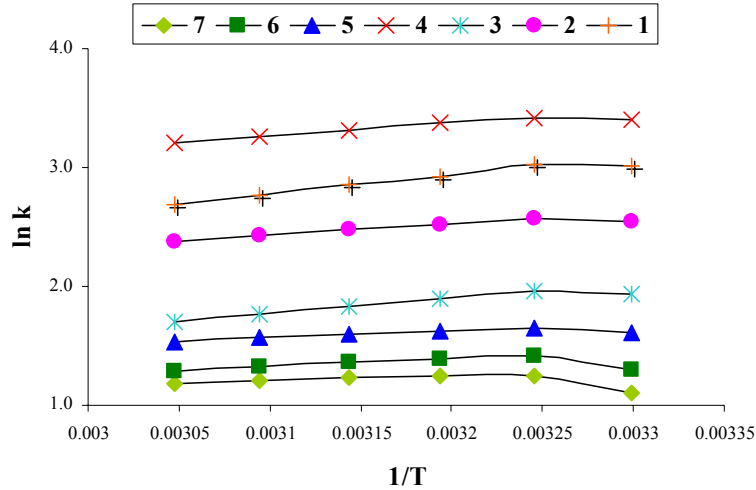
izdalīšanas laikam vajadzētu samazināties, un tas saskan ar 3.28. un 3.30 attēlos (pH 2,1 un pH 5,0) novēroto ainu – pavājināta jonu apmaiņas ieguldījuma rezultātā.

Tādejādi temperatūras ietekme uz dažādu izšķīdināto vielu izdalīšanu ir atšķirīga. Kā minēts iepriekš, pie augstāka pH (pH 5) spēcīgākas jonu apmaiņas mijiedarbības dēļ bāzu  $pK_a$  kļūst par svarīgu, analizējamo vielu sorbciju noteicošu parametru. Kā minēts literatūrā [120, 121], izšķīdināto vielu  $pK_a$  samazinās, paaugstinot temperatūru, un jo mazāks ir bāziskā savienojuma  $pK_a$ , jo lielāks ir šis samazinājums. Tā kā savienojuma 1 (skat. 2.1.tab)  $pK_a$  (9,80) ir mazāks nekā savienojumam 2  $pK_a$  (6,9), tieši savienojuma 1 protonētās daļas īpatsvars kritīsies vairāk. Tas liek domāt, ka jonu apmaiņas ieguldījums izdalīšanā šajā gadījumā ir mazāks.

Ir konstatēts, ka temperatūras ietekme, mainot kustīgās fāzes organiskā komponenta tipu, tā koncentrāciju un fāzes pH, ir dažāda. Organisku šķīdinātāju dominējošā vidē pētītiem savienojumiem temperatūras ietekme mainās atkarībā no izmantotā organiskā šķīdinātāja.



C



**3.30. att. Savienojumu 1-7 (skat. 2.1. tab.) izdalīšanas faktora (k) atkarība no kolonnas temperatūras. Kustīgā fāze: 15% 5 mM amonija formiāta (pH 5) ūdens šķīdums/85% MeCN. Stacionārās fāzes: A - Atlantis HILIC Silica, B - Waters Spherisorb Silica, C - ZIC HILIC.**

### 3.8. Analīzes metodes validācijas rezultāti

Izvērtējot iepriekš izpētītās sakarības, tika izvēlēti analīzes metodes optimālie apstākļi HILIC režīmā ar AEŠH/MS/MS metodi, lai noteiktu piemaisījumus mildronāta aktīvajā farmaceitiskā vielā. Analīzes metode tika validēta saskaņā ar ICH prasībām [104-107]. Pārbaudīti sekojoši parametri: specifiskums, atgūstamība, linearitāte, precizitāte, detektēšanas robeža, kvantitatīvās noteikšanas robeža. Optimālie hromatogrāfiskie analīzes apstākļi tika izvēlēti sekojošie: kustīgā fāze: acetonitrils – 5 mM amonija formiāta ūdens šķīdums ar pH 5,0 (85/15), kolonna – ar sorbentu ZIC-Hilic, pārējie parametri aprakstīti eksperimentālajā nodaļā.

Metodes specifiskums tika pārbaudīts, analizējot visus zināmos un potenciālos savienojumus degradācijas laikā. Tika pagatavoti maksimāli šķīdumi ar piemaisījumu saturu 0,1 % no pamatvielas daudzuma. Pamatvielas (mildronāta) saturs ar masas koncentrāciju 1 mg/ml tika pagatavots dejonizētā ūdenī. Linearitāte tika pārbaudīta 0,0003-0,00125 mg/ml piemaisījumu diapazonā. Analīzes metodes precizitāte un kalibrēšanas taisnes linearitāte ar korelācijas koeficientiem ir apkopoti 3.6.tabulā.

3.6 tabula

**Mildronāta piemaisījumu analīzes metodes precizitāte ( $S_{n,r}$ ) un kalibrēšanas taisnes linearitātes korelācijas koeficienti  $R^2$**

Savienojuma Nr.	$R^2$	$S_{n,r}$ % (n=6)
<u>1</u>	0,991	9,4
<u>2</u>	0,997	3,3
<u>3</u>	0,998	7,7
<u>5</u>	0,992	2,7
<u>6</u>	0,998	2,1
<u>7</u>	0,998	2,7

Atgūstamība tika pārbaudīta, mākslīgi pagatavojot četras dažādas koncentrācijas (50, 75, 100 un 125 % no 0,1% satura). Atgūstamība mainījās diapazonā no 96,9 līdz 116,7 % (n=3; katrai koncentrācijai).

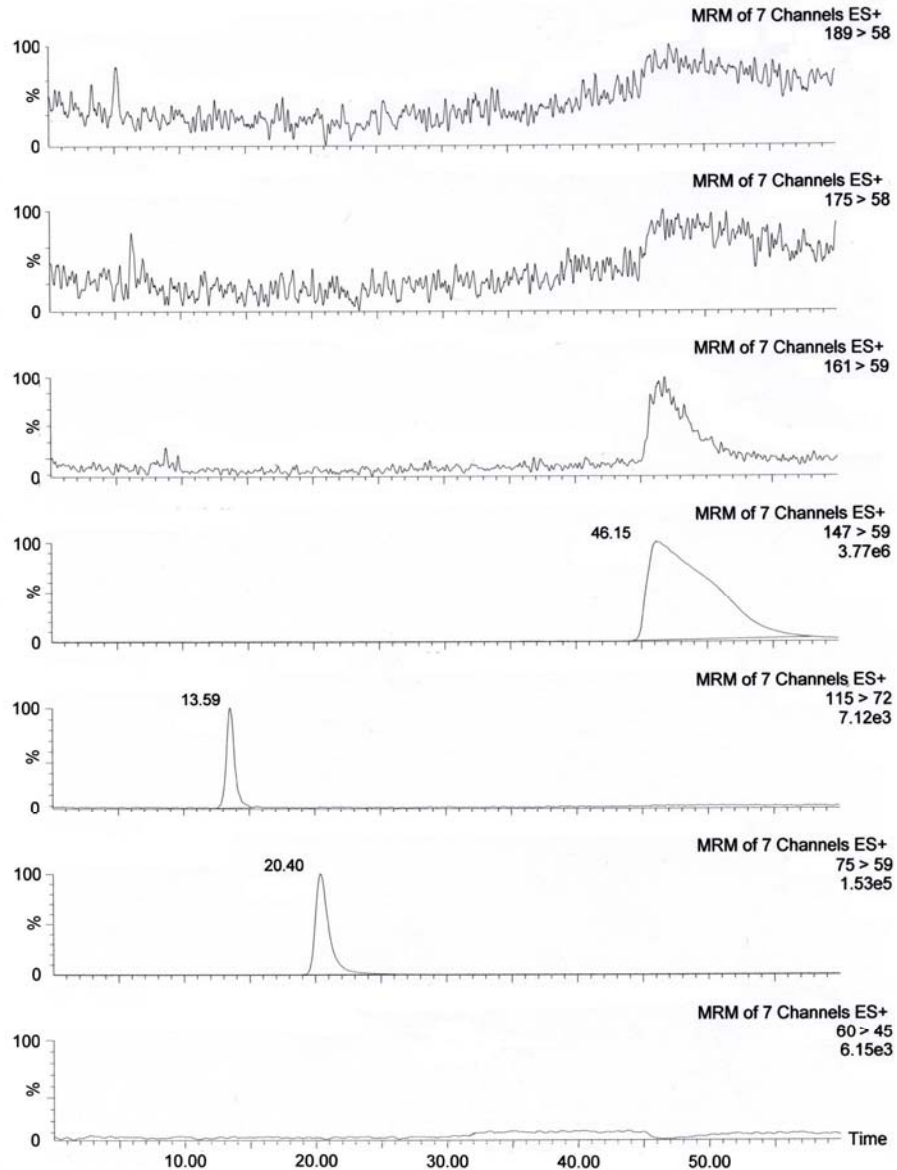
Detektēšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robežas mērīšanas rezultāti ir atspoguļoti 3.7. tabulā.

3.7. tabula

**Detektēšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robeža mildronāta piemaisījumiem**

Savienojuma Nr.	Detektēšanas robeža, %	Kvantitatīvās noteikšanas robeža, %
1	0,0015	0,0051
2	0,0008	0,0025
3	0,0013	0,0043
5	0,0005	0,0016
6	0,00006	0,0002
7	0,00003	0,0001

Mildronāta piemaisījumu kvantitatīvā noteikšanas metode ir stabila un droša kā rutīnas analīze. Ar validētu analīzes metodi tika pārbaudīta Mildronāta ražošanas sērija 2801007 (skat. 3.31. att.) un konstatēts, ka piemaisījuma saturs tajā nepārsniedz 0,01 % no pamatvielas satura.



**3.31. att. Jonu pāreju monitoringa (MRM) hromatogramma Mildronāta sērijai 280107 piemaisījumu kvantitatīvai noteikšanai.**

Līdz 2008.g pasaulē nebija kvantitatīvās analīzes metodes mildronāta (savienojums **4**) un tā piemaisījumu (skat. 1.1. tab.) vienlaicīgai noteikšanai. Pateicoties šim pētījumam, ir publicētas mildronāta un to piemaisījuma analīzes metodes [122,123].



## SECINĀJUMI

1. Ceturtējo hidrazīna atvasinājumu HILIC atdalīšana iespējama gan ražotāju speciāli izstrādātās HILIC kolonnās, gan parastās silikagela kolonnās. Specializētās kolonnas uzrāda vājāku izdalīšanas laiku un ir piemērotākas atdalīšanai, lietojot augstākas acetonitrila koncentrācijas.
2. HILIC režīmā organiskā šķīdinātāja koncentrācijas izmaiņa ir universāls līdzeklis izdalīšanas laika regulēšanai, bet nebūtiski ietekmē selektivitāti. Organisko šķīdinātāju spēks slāpekli saturošiem savienojumiem ir šāds:  
tetrahidrofurāns < acetons < izopropanols < acetonitrils < etanols < metanols < ūdens.
3. Mildronātu un sešus tā piemaisījumus var atdalīt HILIC hromatogrāfijas apstākļos. Validētā metode ir derīga mildronāta substances tīrības pārbaudei.
4. Amonija formiāta buferšķīduma koncentrācija kustīgajā fāzē selektīvi ietekmē pēlto savienojumu izdalīšanas laiku. Būtiskākās izmaiņas ir pie buferšķīduma zemām koncentrācijām, turpretī pie augstākas koncentrācijas, 10-30 mM, izdalīšanas laiki gandrīz nemainās. Buferšķīduma koncentrācija ir ļoti būtiska, regulējot katjonu un katjonus saturošo esteru izdalīšanas laiku, taču maz ietekmē cviterjonu veidojošu savienojumu izdalīšanas laiku.
5. Katjonu un katjonus saturošo esteru izdalīšanas likumsakarības atbilst duālam (starpfāžu pārejas – jonu apmaiņas) mehānismam. Cviterjonu savienojumu sorbcija liek domāt, ka šai grupai jonu apmaiņas loma ir mazāk nozīmīga.
6. Cviterjonu savienojumu izdalīšanas faktori, lietojot nemodificēta silikagela sorbentu, ir proporcionāli stacionārās fāzes relatīvajam virsmas laukumam. Sorbcijas ietilpība (kapacitāte) uz virsmas vienību ir konstanta, un tas pats attiecas uz jonu apmaiņas un fāžu pārejas procentuālo īpatsvaru.
7. HILIC režīmā paaugstinātā temperatūrā silikagela kolonnās polāru savienojumu izdalīšanas faktors atkarīgs no organiskā šķīdinātāja un pH. Taču cviterjonu sulfobetāina tipa sorbentā izdalīšanas faktors samazinās neatkarīgi no organiskā šķīdinātāja un pH vērtības.
8. Slāpekli saturošo savienojumu sorbciju apraksta vienādojums, ar kura palīdzību iespējama HILIC režīma un savienojumu izdalīšanas laiku prognozēšana. Noskaidrots, ka HILIC režīmā izdalīšanas laikus būtiski ietekmē sekojošie parametri: analizējamās vielas molmasa, buferšķīduma pH, bufersāls  $pK_s$ , buferšķīduma  $\log P$  un analizējamās vielas pieejamā hidrofobā virsma.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Alpert A.J. Hydrophilic - interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr.*, 1990, 499,177-196
2. Sjakste N., Gutcaits A., Kalvinsh I. Mildronate: An Antiischemic Drug for Neurological Indications. - *CNS Drug Reviews*, 2005,11, 2,151-168.
3. Sahartova O, Shatz V., Kalvins I. HPLC analysis of mildronate and its analogues in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 1045-1047
4. Ivanovskaya E.A., Anisimova L.S., Belikhmaer Ya.A., Koshelskaya O.A., Sokolov A.A. Quantitative determination of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium)propionate dihydrate in blood serum and plasma by stripping voltammetry. *Pharm. Chem. J.*, 1995, **29**, 219-220
5. Cao G.-Y., Lu R.-F., Hu X., Sun C.-H. Determination of mildronate and related substances by HPLC-ELSD. *Chin. Pharm. J.*, 2005, **40**, 864-866.
6. Lu R.-F., Cao G.-Y., Hu X., Zhang J.-R. HPLC Assay and determination of related substance for mildronate injection. *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2006, **26**, 358-361.
7. Yun-Feng Lv, Xin Hu, Kai-Shun Bi. Determination of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2007, **852**, 35-39.
8. Strege M.A. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 2439-2445.
9. Gustavsson S., Samskog J., Markides K., Langstrom B. Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion pairing reagents. *J. Chromatogr. A*, 2001, **937**, 41-47.
10. Dunphy R., Burinsky D.J. Detection of choline and acetylcholine in a pharmaceutical preparation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **31**, 905-915.
11. Inchauspe G., Delrieu P., Dupin P., Laurent M., Samain D. Mechanism of selectivity in ion-pair high-performance liquid chromatography of aminoglycoside antibiotics using perfluorinated pairing ions. *J.Chromatogr.*, 1987, **404**, 53-66.
12. Bidlingmeyer B.A., Deming S.N., Price W.P., Sachok B., Petrusek M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J.Chromatogr.*, 1979, **186**, 419-434.
13. Neue U.D., Grumbach E.S., Mazzeo J.R., Tran K., Wagrowski-Diehl D.M. In *Bioanalytical Separations Handbook of Analytical Separations.*, Ed. I.D.Wilson by Elsevier Science B.V., New York, 2003, pp. 185-214
14. Diehl D.M., Grumbach E.S., Mazzeo J.R., Neue U.D. Paper no. 800-5, Pittcon 2003, Orlando, Florida.

15. Reid T.S., Henry R.A. Compatibility of C<sub>18</sub> HPLC columns with pure aqueous mobile phase. *Am.Lab.*,1999, pp. 24-28
16. MacCalley D.V. Comparison of the performance of conventional C<sub>18</sub> phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 1999, **844**, 23-38.
17. Silva C.R., Jardim I., Airoidi C. New generation of sterically protected C<sub>18</sub> stationary phases containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 2003, **987**, 127-138.
18. Silva C.R., Jardim I., Airoidi C. Evaluation of the applicability and the stability of a C<sub>18</sub> stationary phase containing embedded urea groups. *J.Chromatogr. A*, 2003, **987**, 139-146.
19. Naidong W., Shou W., Chen Y.-L., Jiang X. Novel liquid chromatographic–tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous–organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids. *J. Chromatogr. B*, 2001, **754**, 387-399.
20. Liu M., Ostovic J., Chen E.X., Cauchon N. Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 2362-2370.
21. Jagota N.K., Chetram A.J., Nair J.B. Determination of trace levels of hydrazine in the penultimate intermediate of a novel anti-infective agent *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **16**, 1083-1087.
22. Carlin A., Gregory N., Simmons J. Stability of isoniazid in isoniazid syrup: formation of hydrazine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 885-90.
23. Gyllenhaal O., Groenberg I., Vessman J. Determination of hydrazine in hydralazine by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection after benzaldehyde derivatization. *J. Chromatogr.*, 1990, **511**, 303-315.
24. Selim S., Warner C.R. Residue determination of hydrazine in water by derivatization and gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1978, **166**, 507-511.
25. Timbrell J.A., Wright J.M., Smith C.M. Determination of hydrazine metabolites of isoniazid in human urine by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1977, **138**, 165-172.
26. Seifart H.I., Gent W.I., Parkin D.P. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids *J. Chromatogr. B*, 1995, **674**, 269-275.
27. Abdou H.M., Medwick T., Bailey L.C. The determination of hydrazine and 1,1-dimethylhydrazine, separately or in mixtures, by high-pressure liquid chromatography *Anal. Chim. Acta*, 1977, **93**, 221-226.
28. Kirchherr H. J. Determination of hydrazine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.*, 1993, **617**, 157-162.

29. Pack B.W., Risley D.S. Evaluation of a monolithic silica column operated in the hydrophilic interaction chromatography mode with evaporative light scattering detection for the separation and detection of counter-ions. *J.Chromatogr. A*, 2005, **1073**, 269-275.
30. Guo Y., Huang A. A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 2003, **31**,1191-1201.
31. Strege M.A., Stevenson S., Lawrence S.M. Mixed-Mode Anion-Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 4629-4633.
32. Guo Y., Gaiki S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2005, **1074**, 71-80.
33. Garcia M.C. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J.Chromatogr. B*, 2005, **825**, 111-123.
34. Linden J.C., Lawhead C.L. Liquid chromatography of saccharides. *J.Chromatogr.*, 1975, **105**, 125-133.
35. Palmer J.K. Versatile system for sugar analysis via liquid-chromatography. *Anal.Lett.*, 1975, **8**, 215-224.
36. Rückert H., Samuelson O. A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography. *Sven. Kem. Tidskr.*, 1954, **66**, 337.
37. Samuelson O., Sjöström E. Adsorption of sugars on ion exchanges from ethyl alcohol – water solutions. *Sven. Kem. Tidskr.*, 1952, **64**, 305-314.
38. Wang X.D., Li W.Y., Rasmussen H.T. Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities *J.Chromatogr.A*, 2005, **1083**, 58-62.
39. Naidong W., Shou W.Z., Addison T., Maleki S., Jiang X., Liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalysis using normal-phase columns with aqueous/organic mobile phases. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 1965-1975.
40. Naidong W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *J.Chromatogr.B*, 2003, 796, 209-224.
41. Shou W.Z., Naidong W. Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *J.Chromatogr. B*, 2005, **825**, 186-192.

42. Shou W., Chen Y., Eerkes A., Tang Y. Magis L., Jiang X., Naidong W. Ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis of polar analytes using packed silica columns. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 1613-1621.
43. A practical guide to HILIC. Umea, Sweden, Published by SeQuant AB., April 2006.
44. Li R.P., Huang X.J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A*, 2004, **1041**, 163-169.
45. Snyder L.R. Mobile phase effects in liquid-solid chromatography : Importance of adsorption-site geometry, adsorbate delocalization and hydrogen bonding. *J.Chromatogr.*, 1983, **255**, 3-26.
46. Olsen B.A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 113-122.
47. Hemstrom P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1784-1821.
48. Dolan J.W. „Broad Peaks,” in *LC Troubleshooting. LC-GC North America.*, 2005, **23**, 738-742.
49. Keunchkarian S., Reta M., Romero L., Castells C. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *J.Chromatogr. A*, 2006, **1119**, 20-28.
50. Kostianen P., Bruins A.P. Effect of Solvent on Dynamic Range and Sensitivity in Pneumatically-assisted Electrospray (Ion Spray) Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 1996, **10**, 1393-1399.
51. Temesi D., Law B. The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionization *LC-GC Int.*, 1999, **12**, 175.
52. Huber C.G., Premstaller A. Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry of proteins: I. Liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 1999, **849**, 161-173.
53. Kirland J.J., Dilks C.H., DeStefano J.J. Normal-phase high-performance liquid chromatography with highly purified porous silica microspheres. *J.Chromatogr.*, 1993, **635**, 19-30.
54. Gary A., Venn R.F. *Principles and Practice of Bioanalysis*, London, 2000. pp.62-64
55. Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R., Yuen S.W., Ferguson M.A., Pauly M., Orlando R. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *J.Chromatogr. A*, 1994, **676**, 191-202.

56. Valette J.C., Demesmay C., Rocca J.L., Verdon E. Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase. *Chromatographia.*, 2004, **59**, 55-60.
57. Wonnacott D.M., Patton E.V. Hydrolytic stability of aminopropyl stationary phases used in the size-exclusion chromatography of cationic polymers. *J.Chromatogr.*, 1987, **389**, 103-113.
58. Bjorklund M., Hearn M.T. Synthesis of silica-based heparin-affinity adsorbents *J.Chromatogr. A*, 1996, **728**, 149-169.
59. Lafosse M., Herbreteau B., Dreux M., Morin-Allorym L. Control of some high-performance liquid chromatographic systems by using an evaporative light scattering detector. *J.Chromatogr.*, 1989, **472**, 209-218.
60. Sandoval J.E., Pesek J.J. Synthesis and characterization of a hydride-modified porous silica material as an intermediate in the preparation of chemically bonded chromatographic stationary phases. *Anal.Chem.*, 1989, **61**, 2067-2075.
61. Pesek J.J., Matyska M.T. Hydride-based silica stationary phases for HPLC: Fundamental properties and applications. *J.Sep.Sci.*, 2005, **28**, 1845-1854.
62. Matyska M.T., Pesek J.J., Suryadevara R. Synthesis and Characterization of Amino-Based Columns for HPLC Made by Silanization/ Hydrosilation *J.Liq.Chromatogr. Relat.Technol.*, 2005, **28**, 2111-2139.
63. Yoshida T. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Anal.Chem.*, 1997, **69**, 3038-3043.
64. West C., Lesellier E. Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases. *J.Chromatogr. A*, 2006, **1110**, 200-213.
65. Tanaka H., Zhou Z., Masayoshi O. Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 2003, **987**, 119-125.
66. Kane R.S., Deschatelets P., Whitesides G.M. Kosmotropes Form the Basis of Protein-Resistant Surfaces *Langmuir.*, 2003, **19**, 2388-2391.
67. Kitano H., Imai M., Gemmei-Ide M., Takaha K., Raman Spectroscopic Study on the Structure of Water in Aqueous Solution of Zwitterionic Surfactants. *J.Colloid Interfac.Sci.*, 2004, **269**, 459-465.
68. Kitano, H.; Imai, M.; Sudo, K.; Ide, M. Hydrogen-Bonded Network Structure of Water in Aqueous Solution of Sulfobetaine Polymers. *J.Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 11391-11396.
69. Kitano H., Mori T., Takeuchi Y., Tada S. Structure of water incorporated in sulfobetaine polymer films as studied by ATR-FTIR *Macromol.Biosci.*, 2005, **5**, 314-321.

70. Jiang W., Irgum K. Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions *Anal.Chem.*, 1999, **71**, 333-344.
71. Viklund C., Irgum K. Synthesis of Porous Zwitterionic Sulfobetaine Monoliths and Characterization of Their Interaction with Proteins K. *Macromolecules*, 2000, **33**, 2539-2544.
72. Jiang W., Irgum K. Synthesis and Evaluation of Polymer-Based Zwitterionic Stationary Phases for Separation of Ionic Species *Anal.Chem.*, 2001, **73**, 1993-2003.
73. Jiang W., Irgum K. Tentacle-Type Zwitterionic Stationary Phase Prepared by Surface-Initiated Graft Polymerization of 3-[*N,N*-Dimethyl-*N*-(Methacryloyloxyethyl)- ammonium] Propanesulfonate through Peroxide Groups Tethered on Porous Silica *Anal.Chem.*, 2002, **74**, 4682-4687.
74. Xuan Y., Scheuermann E.B., Meda A.R., Hayen H., Wiren N., Weber G. Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J.Chromatogr. A*, 2006, **1136**, 73.
75. Scott R.P., W. *Adv. Chromatogr.* 1982, **20**,169.
76. Vervoort R.J.M., Ruyter E., Debets A.J. Claessens H.A., Cramers C. A., Jong G. J. Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2001, **931**, 67-79.
77. Liu M., Chen E., Ji R., Semin D. Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. *J. Chromatogr. A*, 2008, **1188**, 255-263.
78. Grumbach E.S., Wagrowski-Diehl D.M., Mazzeo J.R., Alder B., Iraneta P.C. Hydrophilic Interaction Chromatography Using Silica Columns for the Retention of Polar Analytes and Enhanced ESI-MS Sensitivity. LCGC, North America, 2004.
79. Castells R.C., Castells C.B., Castillo, M.A. Influence of differences between sample and mobile phase viscosities on the shape of chromatographic elution profiles. *J. Chromatogr. A*, 1997, **775**, 73-79.
80. Hao Z., Lu C-Y., Xiao B., Weng N., Parker B., Knapp M., Ho C-T. Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *J.Chromatogr.*, 2007, **1147**, 165-171.
81. Hu W., Takeuchi T., Haraguchi H. Electrostatic Ion Chromatography. 2. Partitioning Behaviors of Analyte Cations and Anions. *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 2204-2208.
82. Hu W., Studies on Behaviors of Interactions between Zwitterionic Surfactants and Inorganic Ions by Using an Ion Chromatographic Technique *Langmuir.*, 1999, **15**, 7168-7171.

83. Hu W., Haddad P.R. Recent developments in ion chromatography. *Trends in Anal. Chem.*, 1998, **17**, 73-79.
84. Okada T., Patil J.M. Ion Uptake by Zwitterionic Surfaces. *Langmuir.*, 1998, **14**, 6241-6248.
85. Cook H.A., Hu W., Fritz J.S. Haddad P.R. A Mechanism of Separation in Electrostatic Ion Chromatography *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 3022-3027.
86. Cook H.A., Diconoski G., Haddad P.R. Mechanistic studies on the separation of cations in zwitterionic ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2003, **997**, 13-20.
87. Riskey D.S., Pack B.W. Simultaneous Determination of positive and negative counterions using a hydrophilic interaction chromatography method. *LC/GC North America.*, 2006, **24**, 776-785.
88. Jonsson T., Appelblad P. Separation of Polar and Hydrophilic Compounds Using a Zwitterionic Stationary Phase in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatogr. *LCGC*, 2004, **17**, 72-73.
89. Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K. Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *J. Chromatogr. A*, 2006, **1127**, 82-91
90. Guo D., Mant C.T., Taneja A.K., Parker J.M., Rodges R.S. Prediction of peptide retention times in reversed-phase high-performance liquid chromatography I. Determination of retention coefficients of amino acid residues of model synthetic peptides. *J. Chromatogr.*, 1986, **359**, 499-518.
91. McKeown A.P., Euerby M.R., Lomax H., Johnson M.C., Ritchie H.J., Woodruff M. The use of silica for liquid chromatographic/mass spectrometric analysis of basic analytes. *J.Sep.Sci.* 2001, **24**, 835-842.
92. Naidong W., Zhou W., Song Q., Zhou S. Direct injection of 96-well organic extracts onto a hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry system using a silica stationary phase and an aqueous/organic mobile phase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, **18**, 2963-2968.
93. Guo Y. J. Analysis of Quaternary Amine Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography/ Mass Spectrometry (HILIC/MS). *Liq. Chromatogr. Relat. Tech.*, 2005, **28**, 497-512.
94. Chen M.H., Horváth C. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. *J. Chromatogr. A*, 1991, **788**, 51-61.
95. Dolan J.W. Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**, 195-205.



96. Kiriden W., Poole C.F., Koziol W.W. Effect of solvent strength and temperature on retention for a polar-endcapped, octadecylsiloxane-bonded silica stationary phase with methanol–water mobile phases. *J. Chromatogr. A*, 2004, **1060**, 177-185.
97. Kazakevics V.Y., McNair H.M. Low-energy interactions in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2000, **872**, 49-59.
98. Melander W.R., Stoveke J., Horvath Cs. Mobile phase effects in reversed-phase chromatography : II. Acidic amine phosphate buffers as eluents. *J. Chromatogr.*, 1979, **185**, 111-127.
99. Melander W.R., Nahum A., Horvath Cs. Mobile phase effects in reversed-phase chromatography : III. Changes in conformation and retention of oligo- (ethylene glycol) derivatives with temperature and eluent composition. *J. Chromatogr.*, 1979, **185**, 129-152.
100. Nahum A., Horvath Cs. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases : I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.*, 1981, **203**, 53-63.
101. Dong L., Huang J. Effect of Temperature on the Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High Purity Silica Using Reversed-Phase Solvents. *Chromatographia*, 2007, **65**, 519-526.
102. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, 2007, 1104, p(17-22).
103. *MOE*, Chemical Computing Group Inc.: Montreal, <http://www.chemcomp.com>.
104. ICH Guideline Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures: Terms and definitions, International Conference on Harmonization 3. Yokahama, November 29 - December 1, 1995. Abstracts. Yokahama, 1995, 12.
105. ICH Guideline Q3A; Impurities in New Drug Substances, International Conference on Harmonization 6, thesis. Osaka, November 12-15, 2003. Abstracts. Osaka, 2003, 4.
106. ICH Guideline Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference on Harmonization 4. Brussel, July 16-18, 1997. Abstracts. Brussel, 1997, 4.
107. ICH Guideline Q3B: Impurities in New Drug Products, International Conference on Harmonization 4. Brussel, July 16-18, 1997. Abstracts. Brussel, 1997, 19.
108. Jandera P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J. Sep. Sci.*, 2008, **31**, 1421-1437.
109. Zhou T., Lucy C.A. Selective preconcentration of chemical warfare agent degradation products using a zirconia preconcentration column *J. Chromatogr. A*, 2008, **1213**, 8-13.

110. Person M., Hazotte A., Elfakir C., Lafosse M. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates. *J. Chromatogr. A*, 2005, **1081**, 174.
111. Jin G., Guo Z., Zhang F., Xue X., Jin Y., Liang X.. Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, 2008, **76**, 522-527.
112. Quiming N.S., Denola N.L., Bin Samsuri S.R., Saito Y., Jinno K. Development of retention prediction models for adrenoreceptor agonists and antagonists on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J.Sep.Sci.*, 2008, **31** 1537-1549.
113. Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Jinno K. Multiple linear regression and artificial neural network retention prediction models for ginsenosides on a polyamine-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J.Sep.Sci.*, 2008, **31**, 1550-1563.
114. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, <http://www.R-project.org>.
115. Philipsen A., Claessens A., Lind H., Klumperman B., German L. Study on the retention behaviour of low-molar-mass polystyrenes and polyesters in reversed-phase liquid chromatography by evaluation of thermodynamic parameters *J. Chromatogr. A*, 1997, **790**, 101-116.
116. Kayillo S., Dennis R., Wormell P., Shalliker A. Retention behaviour of polystyrene oligomers in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2002, **967**, 173-181.
117. Cole L., Dorsey J. Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 1. Stationary-phase considerations *Anal.Chem.*, 1992, **64**, 1317-1323.
118. Chester T., Coym J. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J. Chromatogr. A*, 2003, **1003**, 101-111.
119. Nawrocki J., Rigney R.P., McCormick A., Carr W.P. Chemistry of zirconia and its use in chromatography *J. Chromatogr. A*, 1993, **657**, 229-282.
120. Buckenmaier S.M.C., McCalley D.V., Euerby M.R. Rationalisation of unusual changes in efficiency and retention with temperature shown for bases in reversed-phase high-performance liquid chromatography at intermediate pH. *J. Chromatogr. A*, 2004, **1060**, 117-126.
121. Buckenmaier S.M.C., McCalley D.V., Euerby M.R. Determination of ionisation constants of organic bases in aqueous methanol solutions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 2004, **1026**, 251-259.
122. Hmelnickis J., Pugovičs O., Kažoka H., Viksna A., Susinskis I., Kokums K. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, **48**, 649-656.

123. Hmelnickis J., Pugovics O., Kazoka H., Bartkevics V., Viksna A., Susinskis I., Kokums K. Application of ion-pair chromatography for simultaneous separation of six admixtures in mildronate substance. *Latvijas ķīmijas žurnāls*. 2008, **4**, 333-340.

## PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

1. J.Hmeļņickis, O.Pugovičs, H.Kažoka, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J. Pharm.Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 649-656.
2. J.Hmeļņickis, O.Pugovičs, H.Kažoka, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Application of ion-pair chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *Latv. Ķīm. Žurn.*, 2008, **4**, 333-340.
3. J.Hmeļņickis, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Effect of ammonium formate concentration in mobile phase on retention of Mildronate and related substances on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Latv. Ķīm. Žurn.*, 2009, **1**, 53-60.
4. J.Hmeļņickis, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. The effect of column temperature on retention of Mildronate and related substances on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Latv. Ķīm. Žurn.*, 2009, **2**, 119-128.
5. J.Hmeļņickis, K.Kokums, I.Sušinskis. „Retention behavior of Hydrazine Derivatives in HILIC mode”. CRC, ISBN: 9781439807538, USA, 26.11.2010, „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications”. (Nodaļa grāmatā)
6. J.Hmeļņickis, O.Pugovičs, K.Zinovjevs, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Retention model development for quaternary ammonium and hydrzinium salts in hydrophilic interaction chromatography, pieņemts publicēšanai žurnālā *Journal of Chromatography A*.

### Referāti tēžu krājumos:

1. J.Hmelnickis, O.Pugovičs, H.Kažoka, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Application of ion-pair chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. 27<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography. Munster, Germany, 21-25 september, 2008, p.211.
2. J.Hmelnickis, O.Pugovičs, H.Kažoka, A.Vīksna, I.Sušinskis, K.Kokums. Development of an LC/MS/MS procedure for determination of impurity content in mildronate using hydrophilic interaction chromatography. 25<sup>th</sup> Symposium on

Liquid Chromatography/ Mass spectrometry. Montreux, Switzerland, 12-14 november, 2008, p.43.

**Ziņojums konferencē:**

J. Hmeļņickis, O. Pugovičs, A. Vīksna. Ārstniecisko policiklisko savienojumu un to starpproduktu analītiskās pētniecības iespējas ar šķidrums hromatogrāfiju – masspektrometriju. Latvijas Universitātes 66. konference, Latvijas Universitāte, 7.februāris, 2008.

## Dokumentārā lapa

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē un AS „Grindeks” Hromatogrāfijas laboratorijā laika posmā no 2005.gada līdz 2010.gadam.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors:

Juris Hmeļņickis

Zinātniskais vadītājs:

Dr.ķīm., prof., A.Vīksna

Darbs iesniegts Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomei

2010.gada martā.

Darbu pieņēma: