

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**AUGU IZCELSMES PRODUKTU AUTOMATIZĒTA
PREPARATĪVA CIETFĀZES EKSTRAKCIJA**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Ketlīna Kļaviņa**

Studenta apliecības Nr.: kk13036

Darba vadītājs: Dr.habil.chem. Viktors Šatcs

Darba vadītājs: Dr.chem. Arturs Vīksna

RĪGA

2015

ANOTĀCIJA

Augu izcelsmes produktu automatizēta preparatīva cietfāzes ekstrakcija. Kļaviņa K., zinātniskais vadītājs Dr.habil.chem. Šatcs V., zinātniskais vadītājs Dr.chem. Vīksna A. Maģistra darbs, 42 lappuses, 22 attēli, 12 tabulas, 38 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Darbā iekļauts īss literatūras apskats par trīs biežāk izmantotajām vielu attīrīšanas un koncentrēšanas metodēm – šķīdumu-šķīdumu ekstrakciju, šķīdumu hromatogrāfiju un cietfāzu ekstrakciju, kā arī par dažiem ekstrakcijai izvēlētiem dabas produktu piemēriem. Eksperimentālajā daļā ir veikta automatizētas preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārtas konstruēšana un tās darbības pārbaude, koncentrējot augu izcelsmes produktus. Augu izcelsmes vielu analīze veikta ar augsti efektīvo šķīdumu hromatogrāfijas metodi, savienojumu identifikācijai izmantojot viena kvadrupola masspektrālo detektoru.

PREPARATĪVĀ CIETFĀZU EKSTRAKCIJA, PILOTIEKĀRTA, KONCENTRĒŠANA, ŠĶIDRUMU HROMATOGRĀFIJA, MASSPEKTROMETRIJA, ZĀĻU TĒJAS.

ABSTRACT

Automated preparative solid phase extraction of plant origin products. Kļaviņa K., supervisor Dr.habil.chem. Šatcs V., supervisor Dr.chem. Vīksna A. Master's thesis, 42 pages, 22 figures, 12 tables, 38 literature references. In Latvian.

The work includes a short literature review of the three most popular substance purification and concentration methods - liquid-liquid extraction, liquid chromatography and solid phase extraction. The experimental part consists of constructing an automated preparative solid phase extraction system and checking its work by concentrating plant origin products. The analysis of plant origin substances is done by high performance liquid chromatography, using a single quadrupole mass detector for substance identification.

PREPARATIVE SOLID PHASE EXTRACTION, PILOT EQUIPMENT, CONCENTRATION, LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY, HERBAL TEAS.

SATURS

Ievads	4
1. Literatūras apskats	5
1.1. Šķīduma-šķīduma ekstrakcija	5
1.2. Šķīdumu hromatogrāfija	7
1.3. Cietfāzu ekstrakcija	12
1.4. Augu izcelsmes produktu piemēri	14
2. Eksperimentālā daļa	15
2.1. Preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārta	15
2.2. Izmantotais aprīkojums un materiāli	19
2.3. Zaļās tējas ekstrakcijas process	20
2.4. Zaļās tējas komponentu analīzes metode	21
2.5. Kumelīšu ziedu ekstrakcijas process	26
2.6. Kumelīšu ziedu komponentu analīzes metode	26
3. Rezultāti un to izvērtējums	29
3.1. Zaļās tējas ekstraktu iegūšana	29
3.2. Kumelīšu ziedu ekstraktu iegūšana	35
Secinājumi	38
Izmantotā literatūra	39

IEVADS

Vielu attīrīšana un koncentrēšana analītiskā, preparatīvā un rūpnieciskā līmenī ir būtiska problēma dažādu procesu pētījumos (analīzē) un produktu ražošanā (preparatīvā mērogā). Preparatīvajā mērogā ir nepieciešamība pēc lētiem un vienkārši lietojamiem risinājumiem, lai atvieglotu procesa ieviešanu rūpnieciskā līmenī. Atkarībā no produkta īpašībām attīrīšanai var tikt pielietoti dažādi procesi kā kristalizācija, destilācija, hromatogrāfija, ekstrakcija, un citi. Vienkārša un efektīva preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārta varētu tikt pielietota visdažādākajās jomās gan augu izcelsmes, gan citu produktu ekstrahēšanai. Šo iekārtu pēc izstrādes paredzēts piedāvāt vietējiem institūtiem un ražotājiem, kā relatīvi nedārgu risinājumu produktu izstrādei un izpētei preparatīvā mērogā. Lai gan līdzīgas iekārtas eksistē, tās ir dārgas un bieži vien tām ir funkcijas, kas nav pārlietu nepieciešamas vidējam lietotājam.

Dažādi augu izcelsmes produkti šobrīd ir īpaši aktuāli, jo cilvēki tos cenšas patērēt uzturā arvien vairāk ar mērķi uzlabot savu veselību. Augu izcelsmes produkti parasti satur lielu daudzumu dažādu komponentu, kuru sadalīšana un konkrētu komponentu izdalīšana bieži vien ir sarežģīts vairākstadiju process. Šī procesa atvieglošanai nepārtraukti tiek meklēti jauni risinājumi. Šajā darbā aprakstītā iekārta varētu būt viens no tiem.

Šī darba **mērķis** ir pārbaudīt uzkonstruētās preparatīvās cietfāzes ekstrakcijas iekārtas darbību, koncentrējot augu izcelsmes produktus.

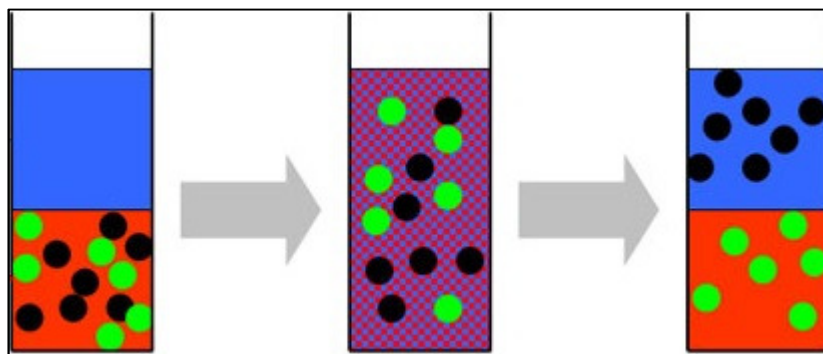
Darba uzdevumi:

1. Uzrakstīt īsu literatūras apskatu par dažām populārākajām vielu attīrīšanas un koncentrēšanas metodēm.
2. Konstruēt automatizētas preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārtu.
3. Izmēģināt iekārtu, ekstrahējot un koncentrējot augu izcelsmes produktus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Šķīduma-šķīduma ekstrakcija

Šķīduma-šķīduma ekstrakcija ir maisījumu sadalīšanas metode, kuru pielieto šķīdriem paraugiem vai paraugiem šķīdumā. To plaši izmanto gan rūpniecībā, gan laboratorijās. Šķīduma-šķīduma ekstrakciju veic, lai izolētu vienu vai vairākus savienojumus, kā arī ar mērķi koncentrēt savienojumu/paraugu [1].



1.1.att. Vienkāršota šķīduma-šķīduma ekstrakcijas procesa shēma [2]

Sadalīšanu panāk, selektīvi ekstrahējot analizējamās vielas no parauga vai no paraugu matricas komponentiem, no kuriem jāatbrīvojas. Koncentrēšanu panāk, ekstrahējot specifiskus savienojumus, kas iepriekš atradušies lielākā šķīduma tilpumā, mazākā ekstrahenta daudzumā [1].

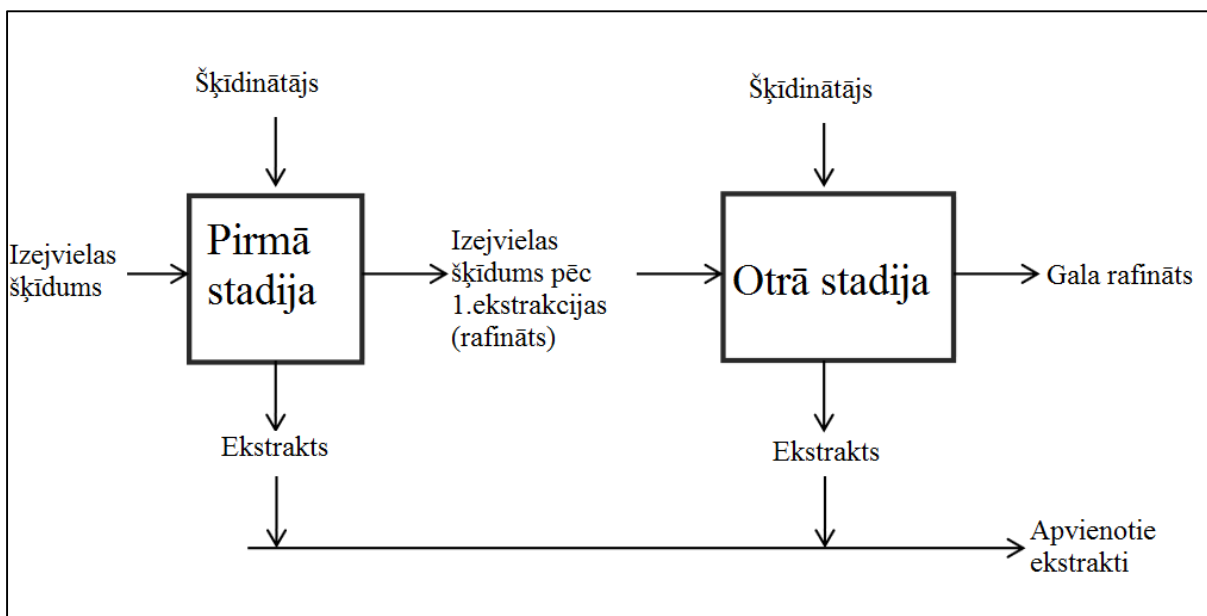
Šķīduma-šķīduma ekstrakcijas pamatprincips ir labāka analīta šķīdība vienā šķīdinātājā, nekā otrā, pie kam fāzēm jābūt tādām, kas savā starpā nesajaucas [3]. Analīta „i” koncentrāciju attiecību abās fāzēs apraksta sadalījuma konstante (koeficients) K_i , kuru var izteikt [1]:

$$K_i = \frac{c_o}{c_w}$$

kur c_o ir analīta līdzsvara koncentrācija organiskā šķīdinātājā un c_w ir analīta līdzsvara koncentrācija ūdens šķīdumā [1].

Sērijveida (batch) ekstrakcija. Visvienkāršākā ekstrakcijas procedūra, ko bieži pielieto laboratorijā analītiskai sadalīšanai, sevī iekļauj konkrēta analītu saturoša šķīduma tilpuma izmantošanu. Šo šķīdumu sajauc ar konkrētu tilpumu ekstrahenta, kas nesajaucas ar esošo šķīdumu. Pēc īsa kratīšanas perioda (bieži vien, izmantojot mehāniskos kratītājus), abiem šķīduma slāņiem ļauj atdalīties. Interesējošo slāni atdala un, ja nepieciešams, atkārtoti ekstrahē, pievienojot jaunu ekstrahenta porciju (vienkāršotu vairākkārtējas ekstrakcijas

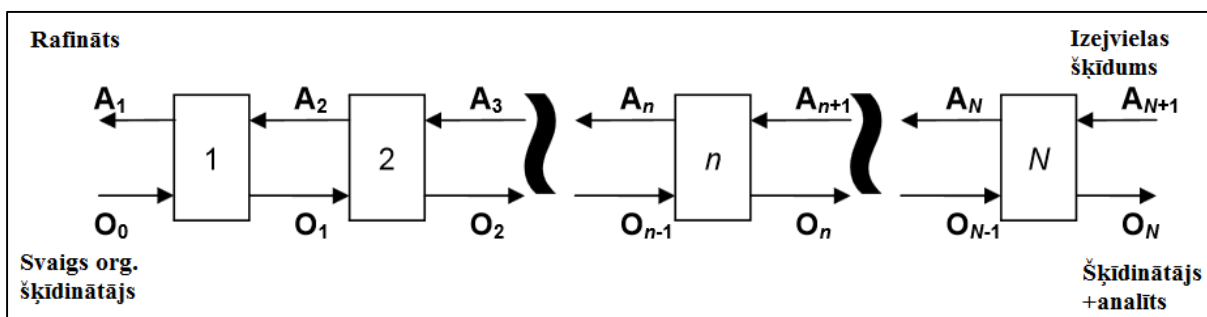
shēmu skat. 1.2.att.). Parasti šīs darbības veic dalāmajā piltuvē. Šāda veida process piedāvā ātru un vienkāršu sadalīšanu un tam ir daudz priekšrocību, sevišķi, ja interesējošās vielas ekstrakcijas efektivitāte ir augsta un procesā iesaistītas tikai dažas ekstrakcijas operācijas [1].



1.2.att. Vairākkārtēja sērijveida ekstrakcija – vienkāršota shēma [4]

Ja ekstrakcijas efektivitāte ir relatīvi maza un nepieciešamas daudzas sērijveida ekstrakcijas, lai panāktu kvantitatīvu sadalīšanu, izmanto nepārtrauktu ekstrakcijas procesu.

Ekstrakcija nepārtrauktā režīmā. Viens no variantiem, kādā iespējams īstenot nepārtrauktu šķīduma-šķīduma ekstrakcijas procesu, ir organizēt šķīdinātāju virzību pretplūsmā. 1.3. attēlā varam apskatīt šāda procesa iespējamo shēmu, kur pa sistēmu vienā virzienā plūst izejvielas ūdens šķīdums, bet otrā virzienā – organiskais šķīdinātājs, kurā ekstrahējas nepieciešamā viela. Pēc N ekstrakcijas stadijām vienā iekārtas galā iegūst vielas ekstraktu organiskajā fāzē, bet otrā pusē – rafinātu, kas palicis pāri no izejvielas ūdens šķīduma [5].



1.3.att. Nepārtraukta ekstrakcija pretplūsmā [5]

Šķīduma-šķīduma ekstrakcijas pielietojumi un ierobežojumi. Šķīduma-šķīduma ekstrakcijas galvenais ierobežojošais faktors ir pietiekama vielas šķīdības atšķirība starp ūdeni un izvēlēto organisko šķīdinātāju. Parasti ir apgrūtināta jonizētu vielu pāreja organiskajā fāzē, bet to var mēģināt novērst ar šķīduma pH izmaiņām. Tā, tendence pāriet organiskajā fāzē pieaug organiskām bāzēm pie paaugstināta pH, bet skābēm – pie pazemināta. Tādējādi var ievērojami uzlabot procesu selektivitāti [1].

Šķīduma-šķīduma ekstrakcija joprojām ir viena no visplašāk izmantotajām darbībām paraugu sagatavošanā. Tā tiek pielietota gandrīz 50% paraugu sagatavošanas metožu ietvaros [1]. Daži pielietojumu piemēri ir: bioloģiskie paraugi, pusgaistošo ūdens piesārņotāju analīze un neorganisko jonu noteikšana [1].

Daudzām vielām kvantitatīva rezultāta sasniegšanai ir nepieciešama vairākkārtēja šķīduma-šķīduma ekstrakcija. Jāņem vērā arī, ka daudzi no pielietotajiem ekstrahentiem ir gaistoši un toksiski. Vēl viena būtiska šķīduma-šķīduma ekstrakcijas problēma ir emulsiju veidošanās [1]. Šie ierobežojumi kļūst īpaši svarīgi, ja ekstrakcijas procesu realizē preparatīvā mērogā.

Pedējos gados, lai uzlabotu tradicionālo šķīduma-šķīduma ekstrakcijas procesu (kā arī citas preparatīvas un analītiskas metodes), tiek pētīti jonu šķīdumi kā alternatīva organiskajiem šķīdinātājiem. Jonu šķīdumi ir organiskie sāļi šķīdrā formā, kas sastāv no organiska katjona pāri ar organisku vai neorganisku anjonu. Tie slikti vada elektrību, ir nepolāri, ļoti viskozi, ar zemu tvaika spiedienu un labu termisko stabilitāti. Kā ekstrahenti, tie sekmē dažādu veidu mijiedarbības starp analītu un šķīdinātāju, jo to sastāvā ir unikālas funkcionālās grupas. Lielākā daļa jonu šķīdumu nesajaucas ar ūdeni, kas ļauj izveidot divfāžu sistēmas, un tajos labi šķīst dažādas organiskās vielas. Šo iemeslu dēļ tie ir piemēroti dažādu bioaktīvu savienojumu ekstrakcijai no augiem. Kā piemērus var minēt auksīnu (augu izcelsmes augšanas hormonu) ekstrakciju no zirņiem, dažu krāsvielu ekstrakciju no čili pulvera un čili eļļas, aminoskābes glicīna ekstrakciju no farmaceitiskiem paraugiem, kā arī hidrolizējamo tannīnu ekstrakciju no vairākām augu sugām. Lielākā daļa minēto piemēru tika ekstrahēti, izmantojot jonu šķīdumus uz imidazolija katjonu bāzes [6]. Jonu šķīdumu pielietošanu var uzskatīt par vienu no iespējamajiem risinājumiem tradicionālās šķīdumu-šķīdumu ekstrakcijas augstajam kaitīgo šķīdinātāju patēriņam [7].

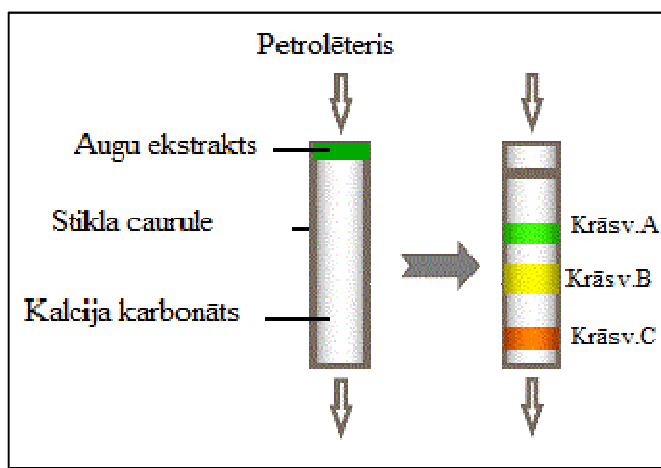
1.2. Šķīdumu hromatogrāfija

Hromatogrāfija ir sadalīšanas process, kas tiek sasniegta, sadalot maisījuma komponentus starp divām fāzēm– stacionāro un kustīgo fāzi [8].

Apskatīsim hromatogrāfiskā procesa pamatelementus, par piemēru ņemot bināra maisījuma sadalīšanu ar kolonnu šķidrums adsorbcijas hromatogrāfijas metodi. Process notiek caurulītē (kolonnā), piepildītā ar porainu sorbentu, caur kuru nepārtraukti plūst šķīdinātājs. Sorbents turas kolonnā ar filtru palīdzību, tas ir nekustīgs un tādēļ tiek saukts par stacionāro fāzi. Šķīdinātāju, kas kustas attiecībā pret sorbentu, sauc par kustīgo fāzi (arī par eluentu). Apzīmēsim savienojumu molekulas – sorbātus, ar X un Y. Kustoties pa kolonnu, šīs molekulas difundē sorbenta porās un tāda vai citāda veida starpmolekulāru mijiedarbību rezultātā sorbējas uz stacionārās fāzes virsmas. Laika daļu, kurā molekulas atrodas sorbētā stāvoklī, nosaka starpmolekulārās mijiedarbības spēki starp sorbātiem X, Y un sorbentu. Ļoti vājas sorbcijas gadījumā molekulas gandrīz visu laiku pavada kustīgās fāzes šķīdumā un tādēļ pārvietojas leļup pa kolonnu ar ātrumu, kas tikai nedaudz atpaliek no kustīgās fāzes kustības ātruma. Pretējā gadījumā, ja sorbcija ir ļoti stipra, molekulas X un Y gandrīz neatraujas no sorbenta virsmas un to pārvietošanās ātrums leļup pa kolonnu ir praktiski neievērojams [9].

No hromatogrāfijas viedokļa mūs visvairāk interesē tādi apstākļi, kuros sorbcijas spēks ir pa vidu abiem minētajiem variantiem un X un Y pārvietošanās ātrums pa kolonnu ir 2-10 reizes mazāks par kustīgās fāzes ātrumu. Palēnināto kustības ātrumu salīdzinājumā ar kustīgo fāzi hromatogrāfijā sauc par aizturi. Ja vielu X un Y sorbcijas konstantes ir atšķirīgas, tad atšķirsies arī to vidējais kustības ātrums kolonnā un no kolonnas tās iznāks dažādos laikos. Tādā veidā tiks sasniegts galvenais hromatogrāfijas mērķis – vielu sadalīšana. Praksē, protams, kolonnā neievada atsevišķas molekulas, tāpēc minētais piemērs ir ļoti vienkāršots [9].

Pirmais, kas izmantoja metodes nosaukumu „hromatogrāfija”, bija krievu botāniķis M. Cvets, ar to sadalot augos atrodamus pigmentus, par stacionāro fāzi izmantojot kalcija karbonātu [10]. Šī eksperimenta shematiskais attēlojums labi parāda hromatogrāfijas procesa būtību:



1.4. att. M.Cveta eksperimenta shematiskais attēlojums [11]

Hromatogrāfiskās metodes balstās uz četriem dažādiem sorbcijas mehānismiem: adsorbciju, sadalījumu, jonapmaiņu un izmēru izslēgšanu [1,10]. M. Cvets savos eksperimentos izmantoja adsorbciju, kur izšķīdušo vielu un cietās stacionārās fāzes polaritāte nosaka izšķīdušo vielu kustības ātrumu cauri kolonnai vai pa virsmu [10].

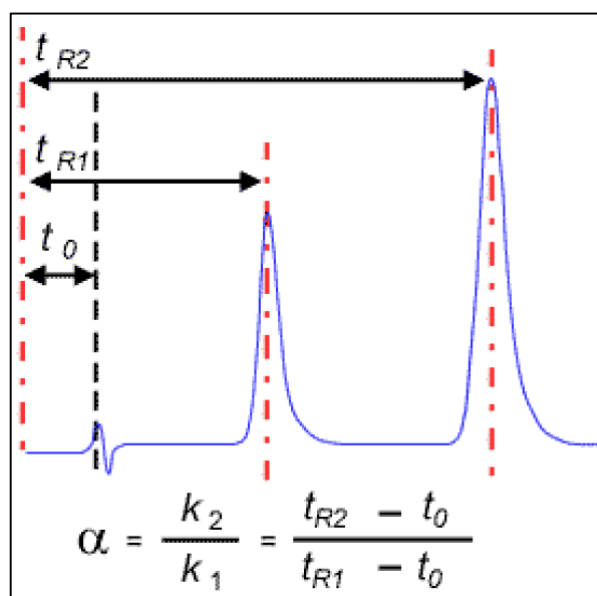
Hromatogrāfijas pamatjēdzieni. *Hromatogramma* – līkne, kas attēlo savienojumu koncentrācijukolonnas izejātkarību no laika. Tā parasti sastāv no *bāzes līnijas* un *smailēm*. Hromatogrāfijas iekārtās nenotiek tieša vielas koncentrācijas mērīšana, bet ar detektora palīdzību tiek mērīts kāds fizikālais lielums, kas funkcionāli saistīts ar koncentrāciju. Laiku, kad uz hromatogrammas parādās smailes maksimums, sauc par vielas *aiztures laiku* t_{Ri} [9].

Savienojuma *kapacitātes/aiztures koeficients* k' konkrētos hromatogrāfiskos apstākļos tiek rēķināts [9]:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kur t_0 – nesorbējošās vielas aiztures laiks.

Selektivitāte α ir salīdzināma īpašība, kas parāda konkrētās hromatogrāfiskās sistēmas spēju sadalīt konkrētu vielu pāri (sk. 1.5. attēlu). Selektivitātes parametrs atspoguļo maisījuma sadalīšanas iespēju no termodinamikas viedokļa[9].



1.5. att. Hromatogrāfiskās sistēmas selektivitātes α shematisks attēlojums [12].

Procesa galvenā **kinētiskā** īpašība ir *augstums* H , kas atbilst viena teorētiskā šķīvja augstumam. Šis lielums atbilst sorbenta slāņa biezumam, kurā sorbcijas-desorbcijas process paspēj notikt vidēji vienu reizi. Tas pēc būtības parāda izmantotā sorbenta kvalitāti, kolonnas

pildījuma kvalitāti un izvēlētā hromatogrāfēšanas režīma kvalitāti. Kolonnas kvalitātes novērtēšanai izmanto apgrieztu lielumu – *teorētisko šķīvju skaitu* [9]:

$$N = \frac{L}{H}$$

kur L – kolonnas garums, mm.

Kā skaitlisku divu vielu sadalīšanas pakāpes mēru izmanto arī *sadalīšanas kritēriju jeb izšķirtspēju* R_s , ko vielu X un Y gadījumā var izteikt [9]:

$$R_s = \frac{2(t_{RY} - t_{RX})}{w_{sY} + w_{sX}}$$

kur w_{sY} , w_{sX} – atbilstošo smaiļu platums pie bāzes līnijas.

Sadalīšanas kritērijs saistīts ar sistēmas pamata raksturlielumiem [9]:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_{vid}}{1 + k'_{vid}} \right) \sqrt{N}$$

kur k'_{vid} – vidējā tilpuma koeficienta vērtība sadalāmajam vielu pārim.

Kolonnu hromatogrāfija. Tā apzīmē hromatogrāfijas veidu, kur stacionārās fāzes slāņa forma ir cilindrs. Tiek izmantotas stikla vai plastmasas kolonnas ar dažādiem diametriem (izplatīti ir iekšējie diametri starp 10 un 50 mm) un garumiem (parasti 10 mm līdz 1 m). Kolonnām apakšdaļā ir filtrs vai stikla vates aizbāznis, un tad kolonna tiek piepildīta ar stacionāro fāzi – silikagēlu, alumīnija oksīdu, Florisil, pulverveida celulozi, kā arī modificētiem silikagēliem ar C18, C8, C4, fenil-, amino- u.c. funkcionālajām grupām. Pieejami arī dažādi organiskie sveķi kolonnu hromatogrāfijas pielietojumiem. Visbiežāk izmantotie daļiņu izmēri ir 50-100 μm. Process noris bez papildu spiediena vai ar nelielu spiedienu, reizēm pielietojot vakuumu. Plūsmu (ja nepieliek spiedienu) izraisa gravitācija, un plūsmas ātrumu kontrolē ar krāna palīdzību [1]. Tā ir pirmā hromatogrāfijas forma, kura mūsdienās ir zaudējusi savu lomu. Analīzei to vairs neizmanto, bet diezgan plaši izmanto preparatīviem nolūkiem.

Augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija (AEŠH) ir šķidrums hromatogrāfija, kas tikusi optimizēta, lai veiktu augstas izšķirtspējas sadalīšanas. AEŠH kolonnas ir pildītas ar sorbentu, kuram ir ļoti smalkas daļiņas (parasti dažu mikrometru diametrā), tādējādi panākot zemo dispersiju, un tātad lielo teorētisko šķīvju skaitu, kas raksturīgs mūsdienās izmantotajām kolonnām. Teorētisko šķīvju skaits vienā kolonnā var sasniegt 25000, ko gan ne vienmēr iespējams novērot konkrētiem analītiem. AEŠH kolonnām smalko sorbentu dēļ ir liela hidrauliskā pretestība. Lai to pārvarētu un sasniegtu vēlamu procesa ātrumu, izmanto sūkņus, kuri rada spiedienu līdz vairākiem simtiem atmosfēru. Rezultējošais sadalīšanas process ir daudz efektīvāks nekā tradicionālā kolonnu hromatogrāfija [13,14].

Preparatīvā AEŠH. Preparatīvajā AEŠH sadalītais paraugs no kolonnas nonāk detektorā, analogi kā analītiskajā AEŠH, kā arī frakciju savācējā. Izmanto lielāka izmēra kolonnas nekā analītiskajā AEŠH – maza apjoma sadalīšanām ar kolonnas iekšējo diametru 4,6 mm, vidēji preparatīvām sadalīšanām – ar iekšējo diametru 7,8 mm, un lielāka apjoma sadalīšanām – kolonnas ar iekšējo diametru 21,2 mm. Vēl ražīgākiem procesiem pieejamas arī kolonnas ar iekšējiem diametriem 30 un 50 mm, un rūpnieciskiem procesiem pat lielākas. Protams, procesi ar lielāku ražību patērē arī lielākus šķīdinātāju daudzumus [15]. Preparatīvās hromatogrāfijas sūkņiem var būt nepieciešami plūsmas ātrumi pat lielāki par $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ [14]. Tomēr preparatīvā AEŠH paliek diezgan dārga metode, ko pārsvarā izmanto nelielu vielu daudzumu pētniecībā.

Šķidrums hromatogrāfijas pielietojumi un ierobežojumi. Preparatīvo AEŠH izmanto vērtīgu produktu izolēšanai ķīmijas un farmācijas jomā, kā arī biotehnoloģijā un bioķīmijā. Industriālā līmenī ar preparatīvo AEŠH attīra pat kilogramiem dažādu vielu, piemēram, zāļu aktīvo komponentu [15].

Kopumā pārskatot pieejamo informācijas apjomu par dažādajiem hromatogrāfisko metožu veidiem un tehnoloģijas attīstību šajā jomā, jāsecina, ka hromatogrāfija ir pielietojama ļoti plašam analizējam/atdalāmo vielu klāstam. Vienkāršotā veidā šķidrums hromatogrāfija ir lēta un viegli pieejama metode, taču ātrākas un efektīvākas iekārtas var būt arī diezgan dārgas. Arī kolonnu un sorbentu izmaksas var pieskaitīt ierobežojošiem faktoriem. Par vienu no būtiskākajiem metodes trūkumiem varētu uzskatīt lielo izmantoto organisko šķīdinātāju daudzumu. Šķīdinātāju patēriņu var censties samazināt ar metožu labāku izpēti un optimizāciju, tomēr tas ne vienmēr ir efektīvs risinājums. Mūsdienās šī problēma ir daļēji atrisināta, radot efektīvākas tehnoloģijas, piemēram, UAEŠH – ultraaugstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfiju, kas patērē mazākus šķīdinātāju tilpumus.

Kā vēl vienu risinājumu šķīdinātāju patēriņam var minēt 1.1. nodaļas beigās minētos jonu šķidrumus – tos var izmantot arī hromatogrāfiskos procesos, gan stacionāro fāžu modifikācijai, gan kā kustīgo fāžu piedevas [6,7].

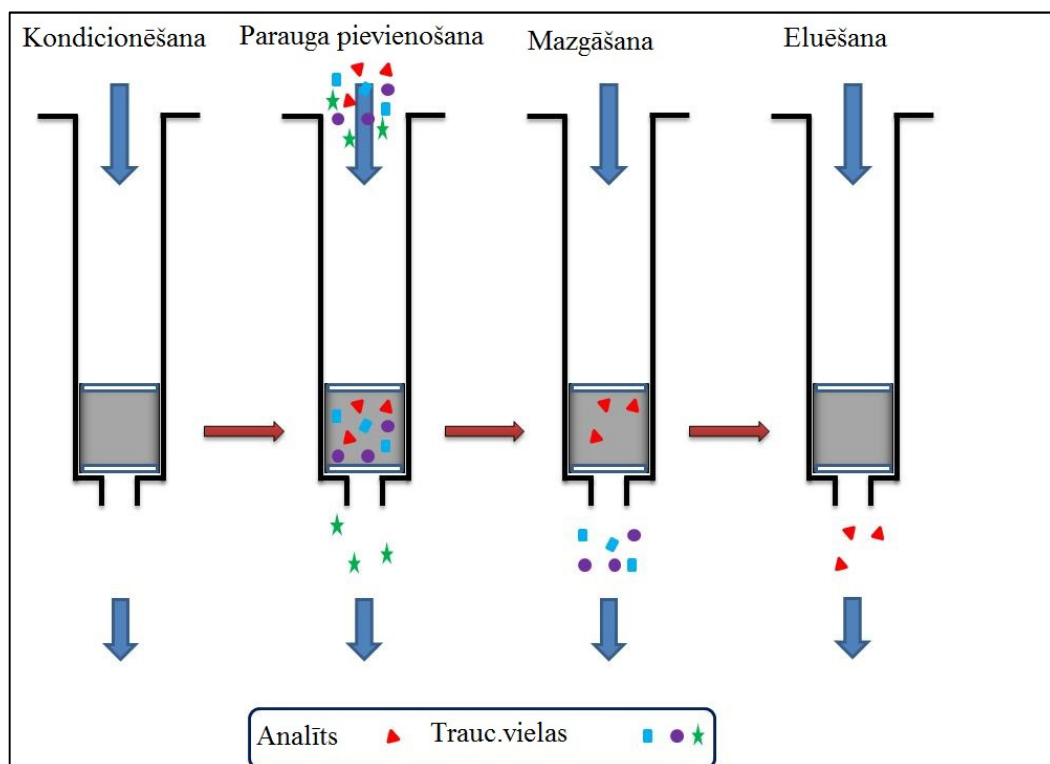
Kā nesen literatūrā aprakstītu preparatīvās šķidrums hromatogrāfijas pielietojumu augu izcelsmes produktiem var minēt, piemēram, epigallokatehīna gallāta izdalīšanu un attīrīšanu, kā izejvielu izmantojot zaļās tējas ekstraktu [16]. Arī šajā darbā tiks iegūts zaļās tējas ekstrakts, tiesa gan, neatdalot konkrētus komponentus. Literatūrā minēti arī citi piemēri šīs metodes pielietojumiem augu izcelsmes komponentu izdalīšanai, piemēram, sulforafēna izdalīšana no redīsu sēklām un tālāka attīrīšana [17].

1.3. Cietfāzu ekstrakcija

Cietfāzu ekstrakcija ir bieži pielietota paraugu sagatavošanas procedūra, kurā pielieto cietu materiālu (sorbentu), lai atdalītu specifiskas šķīduma sastāvdaļas.

Statiskā un dinamiskā cietfāzu ekstrakcija. Cietfāzu ekstrakcija iespējama gan kā statisks, gan dinamisks sorbcijas-desorbcijas process. Statiskajā cietfāzu ekstrakcijā noteikts daudzums sorbenta tiek pievienots šķīdumam. Pēc sorbcijas šķīdums tiek nofiltrēts un iegūstamā viela tiek desorbēta no sorbenta ar tādu šķīdinātāju, kas ir spējīgs konkurēt par adsorbcijas virsmu ar izdalāmo vielu. Sorbcijas un desorbcijas kinētika var tikt uzlabota ar intensīvu kratīšanu, lai samazinātu masas pārnese ierobežojumus [18].

Dinamiskā cietfāzu ekstrakcija tiek veikta ar sorbentu pildītā kolonnā (var būt arī kārtīdža vai diska formā), kur analīts tiek atdalīts. Pēc būtības, šis process ir līdzīgs kolonnu hromatogrāfijai [1,18]. To bieži izmanto paraugu attīrīšanai, kā arī paraugu koncentrēšanai. Attīrīšanu var veikt vairākos veidos. Vienā no pamatprocedūrām cietā fāze selektīvi aiztur traucējošās vielas, kamēr analīti tiek eluēti un savākti analīzei. Cita veida procedūrā uz cietās fāzes tiek aizturēts analīts, kamēr traucējošās vielas tiek aizvadītas projām. Pēc tam analītu eluē ar citu šķīdinātāju un savāc [1]. 1.6. attēlā parādīta otrā veida cietfāzu ekstrakcija.



1.6.att.Cietfāzu ekstrakcija ar analīta atdalīšanu kolonnā [19]

Atšķirība no šķidrums hromatogrāfijas. Sadalīšana un eluēšana cietfāzu ekstrakcijā var tikt uztverta kā sadalīšanas process starp stacionāro un kustīgo fāzi līdzīgi kā šķidrums hromatogrāfijā, tikai izmantojot ļoti īsu kolonnu. Sorbenta daļiņu izmērs cietfāzu ekstrakcijā ir daudz lielāks (tipiski ap 60-100 μm) nekā AEŠH. Tādēļ CFE kolonām ir daudz zemāks teorētisko šķīvju skaits. Ja AEŠH tas sasniedz 10000 un vairāk, tad cietfāzu ekstrakcijā raksturīgi lielumi ir starp 10 un 200. Tādēļ cietfāzu ekstrakcija der tādām atdalāmām vielām, kuru selektivitātes koeficienti α ir pietiekami augsti. Ja AEŠH ļauj sadalīt vielas ar α tik zemu kā 1,05, tad veiksmīgai cietfāzu ekstrakcijai nepieciešams vismaz $\alpha > 10$. Cietfāzu ekstrakcijā sadalīšana ir balstīta uz pilnīgu vielas sorbciju kolonnā, kam seko ātra šķīdinātāja nomainīšana un vielas eluēšana no kolonnas [1]. Šīs metodes sadalīšanas spēja ir lielākā mērā saistīta ar sadalījuma selektivitāti α , nekā ar efektivitāti N. Citiem vārdiem sakot, tā ir vairāk atkarīga no šķīdinātāju gradienta, nekā no teorētiskā šķīvju skaita, kā tas ir šķidrums hromatogrāfijas gadījumā. Šo iemeslu dēļ cietfāzu ekstrakcija, neskatoties uz līdzību ar hromatogrāfiju, terminoloģiski tiek uzskatīta par atsevišķu metodi.

Cietfāzu ekstrakcijas priekšrocības. Cietfāzu ekstrakcija, salīdzinājumā ar šķidrums-šķidrums ekstrakciju, ļauj izmantot mazākus parauga daudzumus un šķīdinātāju tilpumus. Lielākajā daļā gadījumu cietfāzu ekstrakcijai nepieciešams arī īsāks laiks. Šķīdums-šķīdums ekstrakcija ir relatīvi mazselektīva metode, kurā tiek ekstrahētas vielu grupas ar līdzīgiem sadalījuma koeficientiem. Savukārt cietfāzu ekstrakcija telpiski sakārtotas sorbenta virsmas dēļ piedāvā paaugstinātu selektivitāti. Cietfāzu ekstrakcija ir arī viegli automatizējama [20], ko mēs parādīsim arī šajā darbā.

Cietfāzu ekstrakcijas pielietojumi un ierobežojumi. Cietfāzu ekstrakcija uz alkilsaistīta silikagēla vai kopolimēru sorbentiem tiek plaši izmantota analītu ekstrakcijai un koncentrēšanai no paraugiem ūdens šķīdumos un paraugu ekstraktiem – galvenokārt vides, farmācijas nozares un biomedicīnas nozares paraugiem. Tās izmantošana augu izcelsmes produktu ekstrakcijai gan ir relatīvi jauna. Lielākajā daļā gadījumu sorbents ir C18-saistīts silikagēls un parauga šķīdums un šķīdinātāji tiek mazliet paskābināti, lai novērstu, piemēram, flavonoīdu jonizāciju, kas samazinātu to sorbciju. Nesens piemērs ir olīvu metanola ekstraktu attīrīšana [21]. Daudzi sintētiski adsorbenti un biopolimēri ir tikuši pielietoti, lai izdalītu polifenolus no augu ekstraktiem [18].

Cietfāzu ekstrakciju augu izcelsmes produktu gadījumā var izmantot arī kā sagatavošanas soli pirms preparatīvās hromatogrāfijas vai cita veida apstrādes. Lielākā daļa augu valsts produktu sākotnēji ir sarežģīti dažādu ķīmisko savienojumu maisījumi, kurus uzreiz ievadīt preparatīvās hromatogrāfijas kolonnā nebūtu ieteicams, jo tā tiktu ātri piesārņota. Turklāt bieži vien pirmais solis ir produkta ūdens ekstraktu iegūšana, kuros

vajadzīgo komponentu koncentrācijas ir zemas. Tādos gadījumos cietfāzu ekstrakcija ir labs risinājums komponentu atdalīšanai un koncentrēšanai. Kā piemēru var minēt glikozinolātu izdalīšanu no brokoļu sēklām. Tās īstenošanai labs risinājums ir ievadīt paraugu cietfāzu ekstrakcijas kolonnā, kas aiztur glikozinolātu frakciju, un pēc tam eluēt šo savienojumu grupu mazākā daudzumā šķīdinātāja. Iegūto ekstraktu tālāk ievada preparatīvās AEŠH kolonnā un izdala konkrēto nepieciešamo savienojumu [22].

Cietfāzu ekstrakcijas ierobežojumi galvenokārt saistīti ar tās trīs galveno sastāvdaļu – sorbenta, analīta un matricas – savietojamību. Piemēram, var gadīties, ka konkrētajam analītam pats piemērotākais un efektīvākais sorbents nav savietojams ar analīta matricu [22]. Būtisks ierobežojošais faktors ir CFE procesiem raksturīgais relatīvi zems teorētiskais šķīvju skaits, kā rezultātā tā nespēj atdalīt vielas ar tik zemu selektivitātes koeficientu α kā, piemēram, AEŠH.

Arī cietfāzu ekstrakcijas procesu uzlabošanai pēdējos gados sāk pielietot jonu šķīdumus, konkrēti – kā sorbentu modifikatorus. Šādi modificēti cietfāzu ekstrakcijas sorbenti parāda labāku selektivitāti atsevišķu vielu grupu sadalīšanai [23].

1.4. Augu izcelsmes produktu piemēri

Zaļā tēja. Šajā darbā tā tika izvēlēta kā pirmais ekstrahējams augu izcelsmes produkts dažādu iemeslu dēļ. Zaļā tēja ir plaši lietots produkts, kas sākotnēji ieguva popularitāti galvenokārt garšas un stimulējošo īpašību dēļ, taču pēdējos gadu desmitos atklājušās tās veselību uzlabojošās īpašības. Dažādi pētījumi ir parādījuši, ka tējas patēriņš var samazināt dažādu slimību, tai skaitā vēža, sirds un asinsvadu slimību, rašanās risku. Pētījumi uzrādījuši arī dažādus citus tās bioloģiskos efektus, piemēram, pretiekaisuma, antioksidatīvo, pretalerģisku, u.c. iedarbības. Tiek uzskatīts, ka tējas iedarbības pamatā ir tās augstais fenolgrupas saturošo komponentu saturs, galvenokārt tie ir katehīnu grupas savienojumi. Tai ir arī augsts kofeīna saturs, kas stimulē nervu sistēmu [20]. Ir iemesli uzskatīt, ka zaļo tēju turpinās pētīt un tādēļ tas ir produkts, kuram varētu būt noderīgi pielietot jaunas paraugu sagatavošanas un koncentrēšanas metodes, kā, piemēram, preparatīvo cietfāzu ekstrakciju.

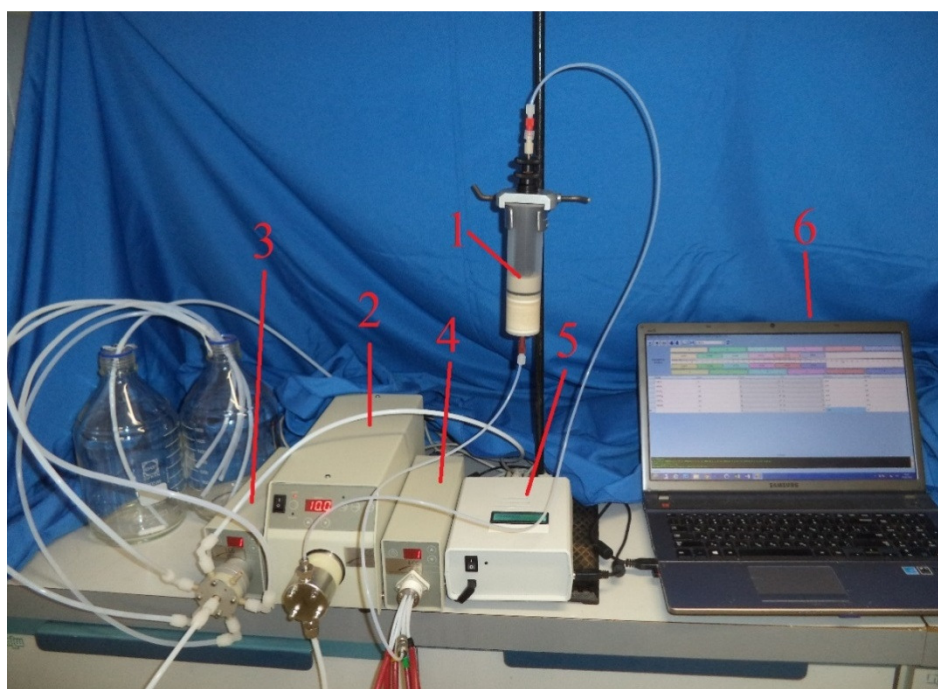
Kumelīšu ziedi. Kumelīšu ziedus plaši izmanto zāļu tējā, ko savukārt izmanto gremošanas sistēmas spazmu un iekaisumu atvieglošanai, kā arī kā maigu miegu veicinošu līdzekli. To farmakoloģisko aktivitāti galvenokārt piedēvē divām to sastāvā esošo vielu frakcijām – ēteriskajām eļļām un flavonoīdiem [38]. Arī kumelīšu ziedi ir pietiekami populāri, lai turpinātu izraisīt gan pētniecisku, gan rūpniecisku interesi. Līdz ar to ir vērts apskatīt cietfāzu ekstrakcijas iekārtas pielietojamību to apstrādei.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārta

Pirmajā kursa darbā [24] tika aprakstīta uzbūvētā preparatīvā cietfāzu ekstrakcijas iekārta. Tās galvenās sastāvdaļas bija (sk.2.1. att.):

- 1 – Kolonna ar aksiālo saspiešanas ierīci, kurā manuāli iepildīts sorbents;
- 2 – Hromatogrāfijas sūknis ar ātrumu 1-100 mL/min;
- 3 – Ieejas šķīdumu sadalītājs ar sešiem kanāliem (izejvielai un šķīdinātājiem);
- 4 – Iegūto frakciju sadalītājs ar sešiem kanāliem;
- 5 – Kontrolieris iekārtas saziņai ar datoru;
- 6 – Dators ar iekārtas kontroles programmatūru.



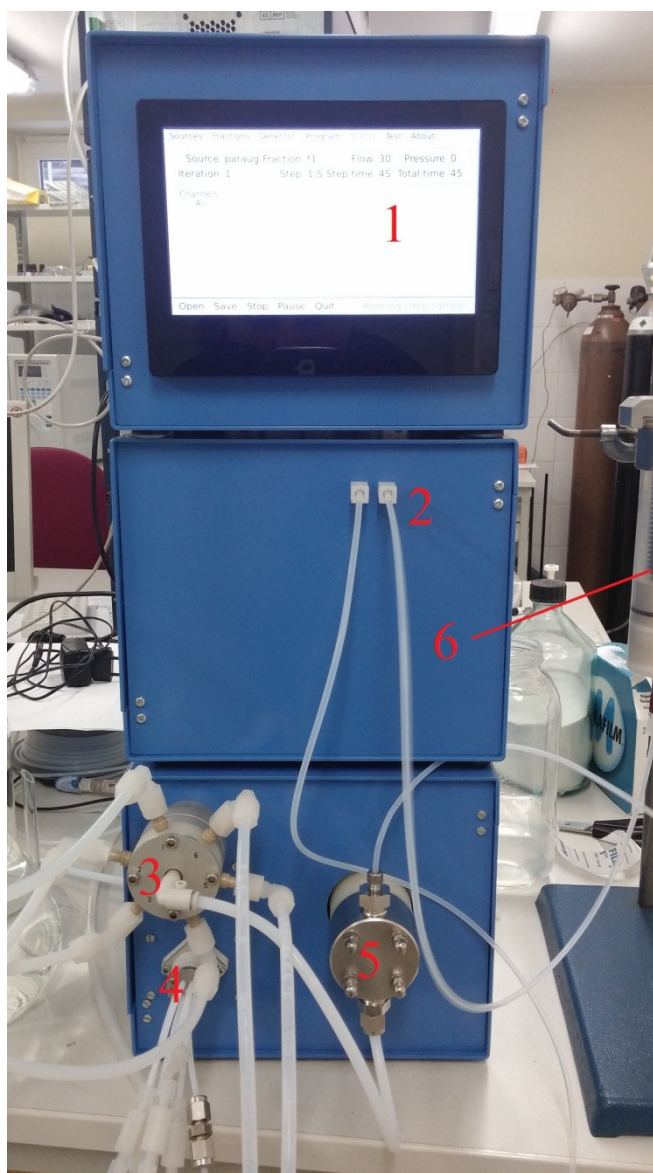
2.1.att. Uzbūvētā preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārta

Šāda iekārta iztur spiedienu līdz 7 bar un tajā var ievadīt līdz pat vairākiem litriem izejvielas šķīduma vienā ciklā (atkarībā no attīrāmās vielas). Iekārtu var atstāt bez uzraudzības pat uz vairākiem darba cikliem, atkarībā no sorbenta mūža ilguma un savācamo frakciju skaita [24].

Iekārtas darbības izmēģinājumu procesā tika nonākts pie secinājuma, ka tās uzbūvē nepieciešami konstruktīvi uzlabojumi. Tā bija jāpadara kompaktāka, ērtāk lietojama, vieglāk kontrolējama un estētiski pievilcīgāka. Turklāt iekārtas konstrukcijā bija jāievieš arī detektors reālā laika procesa monitoringam.

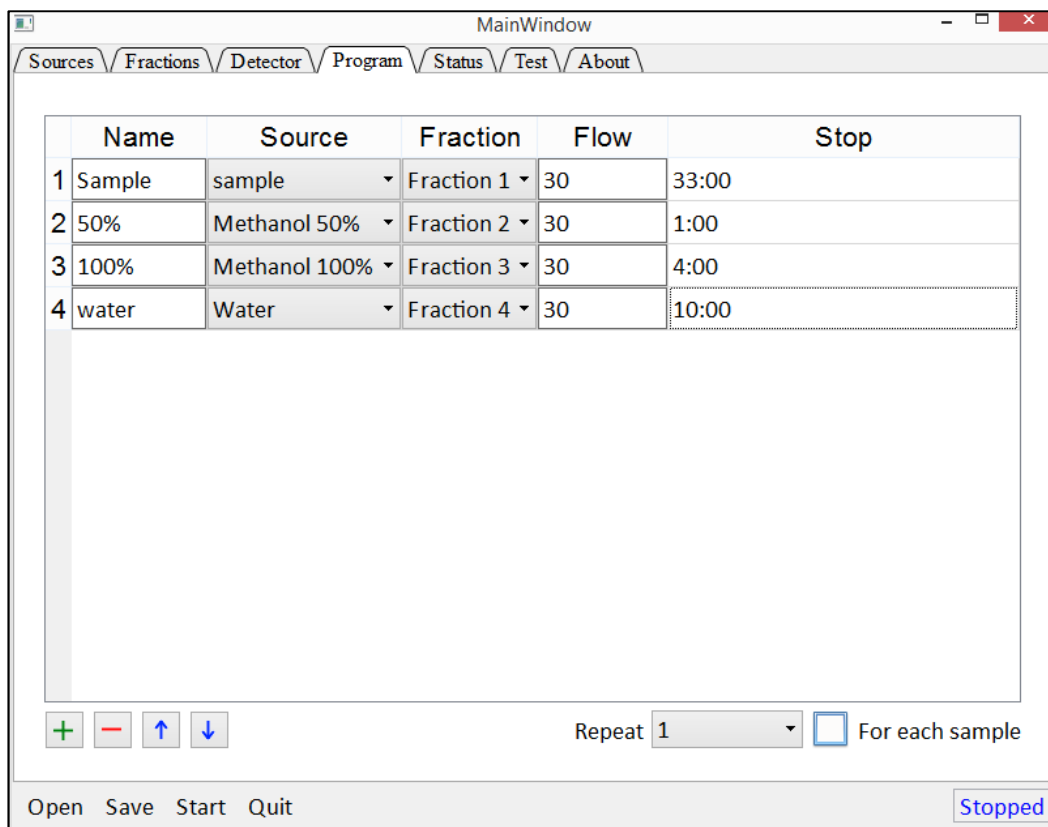
Iekārta tika fundamentāli pārstrādāta. Jaunās iekārtas versijas galvenās sastāvdaļas tika aprakstītas otrajā kursa darbā (sk. 2.2.att.) [25]:

- 1 – Kontroles bloks ar skārienjūtīgu displeju un atbilstošu programmatūru;
- 2 – Fotodiožu matricas detektors;
- 3 – Ieejas šķīdumu sadalītājs;
- 4 – Iegūto frakciju sadalītājs;
- 5 – Hromatogrāfijas sūknis;
- 6 – Kolonna ar aksiālo saspiešanas ierīci, kurā manuāli iepildīts sorbents.



2.2.att. Preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārtas atjaunotā versija [25]

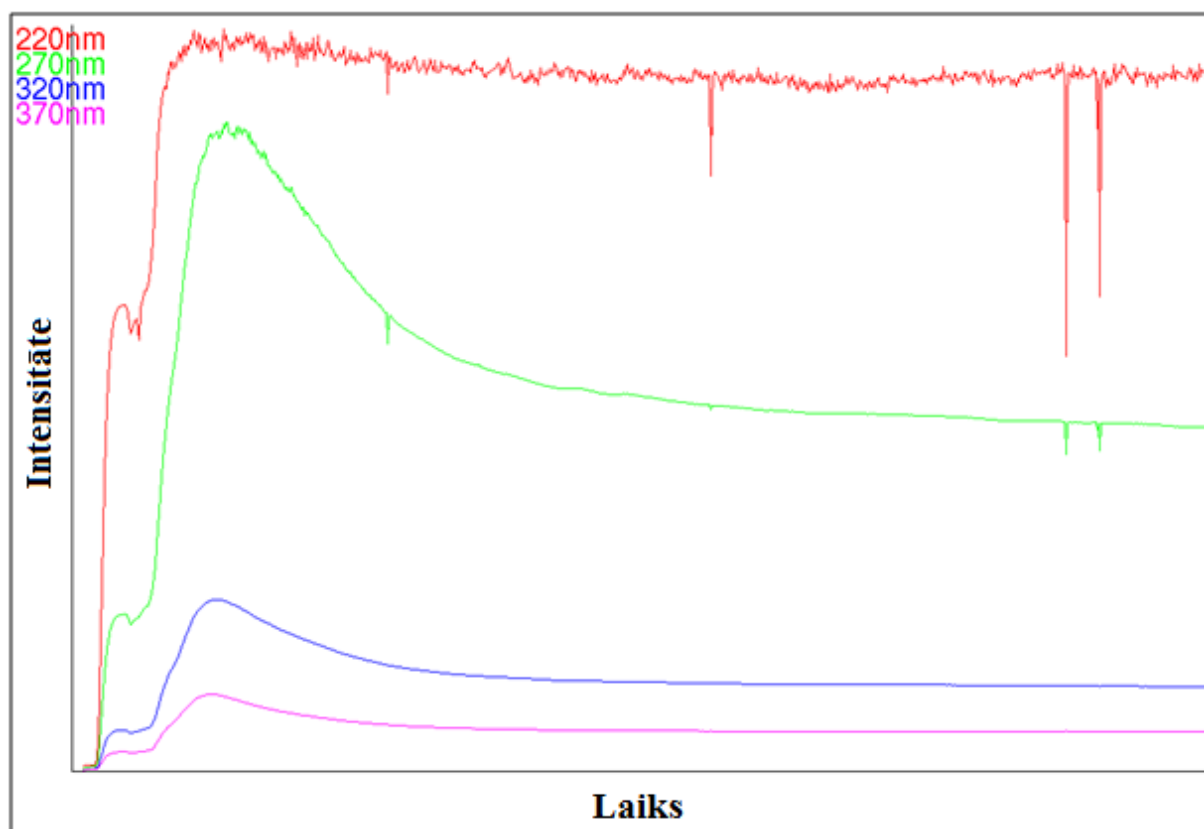
Jāpiebilst, ka detektoru iespējams pieslēgt gan pirms kolonnas, ja ir nepieciešamība monitorēt izejvielu šķīdumus, gan arī pēc kolonnas, lai monitorētu iegūto frakciju sastāvu.



2.3.att. Sastādītās ekstrakcijas programmas piemērs [25]

Būtiski uzlabota ir iekārtas vadība ar programmatūras palīdzību (cikla programmas piemēru skat. 2.3.att.). Skārienjūtīgais displejs novērš vajadzību pēc papildus datora, kas aizņem vietu uz darba virsmas. Citas programmatūras funkcijas [25]:

- 1) Sadaļā „Sources” var pirms procesa sākuma uzstādīt visu ieejošo šķidrumu tilpumus un procesa laikā programmatūra monitorēs to līmeņus, apstādinot programmu, ja kāds no tiem beidzas. Šeit var arī pārdēvēt katru kanālu pēc vajadzības un uzstādīt tam statusu „Paraugs”, „Eluents” vai deaktivizēt kanālu.
- 2) Sadaļā „Fractions” var atrast iegūto frakciju tilpumus saskaņā ar programmu, kā arī pārdēvēt frakcijas pēc vajadzības.
- 3) Sadaļā „Detector” var izvēlēties līdz 4 viļņu garumiem, pie kuriem notiks detektēšana, kā arī redzēt iegūtos datus attēlotus grafiski. Datu grafiskā attēlojuma piemēru skat. 2.4.attēlā. Detektora datus iespējams eksportēt skaitļu formātā uz Excel failu, kur var veikt to tālāku apstrādi. Iespējams eksportēt arī jau iegūto attēlu.



2.4.att. Detektora datu attēlojuma piemērs

- 4) Sadaļā „Status” var sekot aktīvajai programmai, tai skaitā redzēt, cik ilgu laiku tā norisinās, no kura ieejas kanāla uz kuru frakciju šobrīd virzās plūsma, kā arī vērot detektora signālu reālajā laikā.
- 5) Sadaļā „Test” pieejamas iekārtas darbības pārbaudes, kā arī iespēja ieslēgt plūsmu katram ieejas kanālam atsevišķi, tādējādi pirms procesa atbrīvojoties no burbuļiem.

Automatizētās preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārtas galvenās specifikācijas apkopotas 2.1.tabulā.

2.1.tabula

Iekārtas specifikācijas

Parametrs	Raksturlielums
Maksimālais sorbenta tilpums	100 mL
Maksimālais plūsmas ātrums	100 mL/min
Izejvielu/šķīdinātāju kanālu skaits	6
Iegūstamo frakciju kanālu skaits	6
Maksimālais darba spiediens	10 bar
Izejvielas/frakciju monitoringa iespējas	Reālā laika, izmantojot fotodiožu matricas

	detektoru
Detektora viļņu garumu diapazons	200-400 nm
Detektora kanālu skaits	4
Vadības panelis	Ar skārienjūtīgu displeju

Jaunās iekārtas versijas darbības pamatpārbaude, koncentrējot benzola mikropiemaisījumus ūdenī, tika veikta otrajā kursa darbā [25].

2.2. Izmantotais aprīkojums un materiāli

Bez iepriekš aprakstītās uzbūvētās preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārtas darbā tika izmantotas arī citas iekārtas, dažādi materiāli un reaģenti, kas uzskaitīti šajā sadaļā.

Izmantotais tehniskais aprīkojums:

- Automatizēta cietfāzes ekstrakcijas iekārta (sk. sadaļu 2.1.);
- Ūdens vanna *Lauda Alpha RA 8* (darba temperatūras diapazons -25 °C ... 100 °C, vannas tilpums 7,5 litri);
- Laboratorijas svāri *Kern PFB 1200-2* (svēršanas diapazons 1200 g, izšķirtspēja 0,01 g);
- Analītiskie svāri *Kern 770-60* (svēršanas diapazons 60/210 g, izšķirtspēja 0,01/0,1 mg);
- Augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfijas sistēma (*Alliance e2695 Separations Module, Waters*) ar UV/Vis detektoru (2489, *Waters*), viena kvadrupola masspektrālo detektoru (*QDa, Waters*) un autosampleri.

Izmantotie materiāli:

- Termiski izturīga stikla vārglāze, tilpums 1 L;
- Reaģentu pudeles, tilpums 1-5 L;
- Pašgatavots filtrs izejvielas ieejas kanālam – saīsināta preparatīvā kolonna, kurā ievietoti divi kolonnas filtri, starp kuriem ievietota 0,45 μm poru izmēra filtrācijas membrāna;
- Stikla mērcilindri – 500, 100, 50 un 25 mL;
- AEŠH kolonna *Waters XTerra RP18*, daļiņu izmērs 5 μm, kolonnas izmēri 4,6x100 mm (*Waters kat.Nr. 186000488*);
- Šļircs filtri, poru izmērs 0,45 μm, filtru izmērs 25 mm, materiāls – neilons (*Membrane Solutions, kat.Nr. SFNY025045N*).

Izmantotie reaģenti un vielas:

- Dejonizēts ūdens (iegūts iekārtā *Merck Millipore Elix 3*) (ekstrakcijas procesiem), pretestība 10 -15 MΩ·cm;
- Ultratīrais ūdens (iegūts iekārtā *Merck Millipore Direct-Q 3 UV*) (analītiskajai daļai), pretestība 18,2 MΩ·cm;
- Metanols, HPLC kvalitātes (*Sigma Aldrich, kat.Nr. 34885-2.5L-R*);
- Hidrofobais sorbents, alkilsilikagels *Diasorb C16/130*, frakcija 40-100 μm (ražotājs „*СП БуоХумМах*”);
- Zaļā tēja (ražotājs *SIA Inteka*, marka „*Možums Ķīnas zaļā tēja*”);
- Kumelītes (ražots pēc RIMI pasūtījuma Latvijā, marka „*Tea Trader kumelīšu ziedu tēja*”);
- Standartviela – kofeīns (ražotājs *Alfa Aesar, kat.Nr. 39214*, tīrība 99,7%);
- Koncentrēta etiķskābe, analītiski tīra (*Acros, kat.Nr. 22214-0010*);
- Koncentrēta skudrskābe (98%), analītiski tīra (*Lach-Ner, sērijas Nr.PNT 3/13*);
- Acetonitrils, HPLC kvalitātes (*Sigma Aldrich, kat.Nr. 34851-2.5L*).

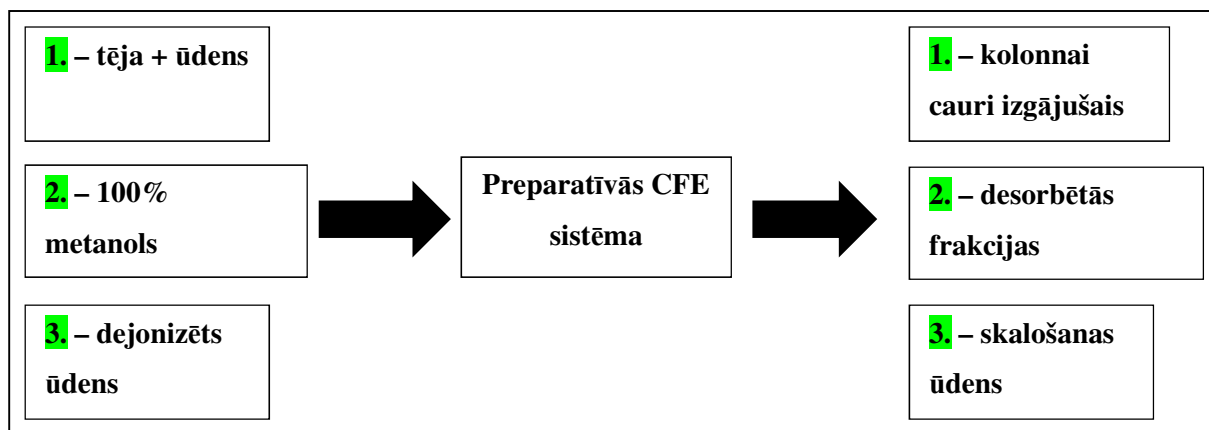
2.3. Zaļās tējas ekstrakcijas process

Kolonnas sagatavošana: kolonnā (D = 38 mm) ielika apakšējo filtru. 200 mL metanola suspendēja 50 mL sorbenta un filtrēja caur kolonnu. Uz sorbenta slāņa uzlika augšējo filtru un slāni sablīvēja ar aksiālās saspiešanas ierīces palīdzību. Kolonnu pievienoja sūknim un frakciju selektoram. Pārsūknēja 200 mL metanola ar ātrumu 50 mL·min⁻¹, tad 300 mL ūdens ar ātrumu 30 mL·min⁻¹. Sorbenta slāni atkārtoti sablīvēja. Pārsūknēja vēl 300 mL ūdens. Iegūtais sorbenta slāņa biezums bija 42 mm.

Kolonnu sagatavojot, tika pievērsta uzmanība hidrofobā sorbenta samitrināšanai ar spirtu un pareizai sablīvēšanai, lai novērstu sorbenta izzūšanu un gaisa burbuļu veidošanos, kas samazinātu tā darbības efektivitāti.

Tējas ekstrakcija ūdenī: 50 g (svērts uz laboratorijas svāriem, precizitāte 0,01 g) sausa tējas parauga iebēra 1000 mL vārglāzē, pievienoja 900 mL dejonizēta ūdens un izturēja ūdens vannā 85°C temperatūrā vienu stundu. Pēc tam veica automatizētu cietfāzu ekstrakcijas procesu.

Cietfāzes ekstrakcija: izejvielas un šķīdinātāju tvertnes, kā arī tvertnes, kas paredzētas frakciju uztveršanai, pieslēdza pie cietfāzes ekstrakcijas sistēmas kā norādīts 2.5. attēlā. 2. frakciju lielā daļā eksperimentu sadalīja apakšfrakcijās, iegūstot vairākus dažādu koncentrāciju metanola ekstraktus. Precīzākas eksperimentu shēmas skat. sadaļā „Rezultāti un to izvērtējums”.



2.5.att. Tējas ekstrakta iegūšanas eksperimenta shēma

Eksperimentus veica divos režīmos:

- 1) *Sērijveida režīmā*, ievadot kolonnā tikai noteiktu tilpumu tējas ūdens ekstrakta un uzreiz veicot desorbciju ar nelielu metanola tilpumu;
- 2) *Nepārtrauktā režīmā*, kur vienu un to pašu izejvielu uznesa uz kolonnas vairākkārt, cirkulējot to pa sistēmu, un desorbciju ar nelielu metanola tilpumu veica pēc tam. Nepārtrauktā režīma variācija: pēc katras sorbcijas veikt desorbciju, bet pēc tam turpināt darbu ar to pašu izejvielas šķīdumu.

Sūkņa ātrums visos eksperimentos bija $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Ieslēdza programmu un savāca visas minētās frakcijas. Skalojamā ūdens tilpums katra eksperimenta beigās bija 300 mL. Katrā eksperimentā mērīja arī iegūto frakciju tilpumus, tādējādi nodrošinot precīzus materiālo bilanču aprēķinus. Starp eksperimentiem veica arī rūpīgu kolonnas mazgāšanu ar metanolu (200 mL) un skalošanu ar ūdeni (300 mL).

2.4. Zaļās tējas komponentu analīzes metode

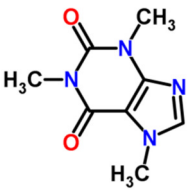
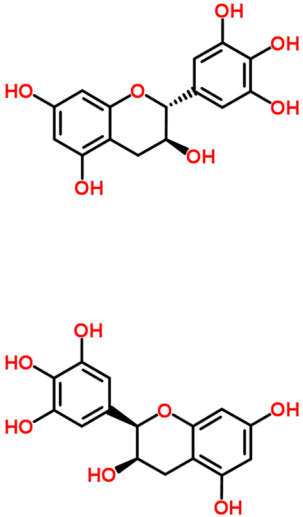
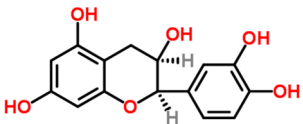
Izejvielu un iegūtās desorbētās frakcijas analizēja ar augstas efektivitātes šķīdumu hromatogrāfijas metodi, galveno komponentu identifikācijai izmantojot viena kvadrupola masspektrālo detektoru.

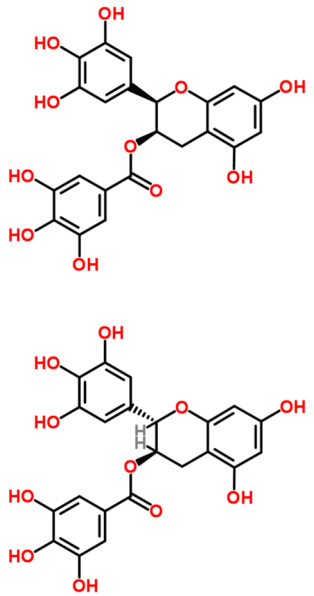
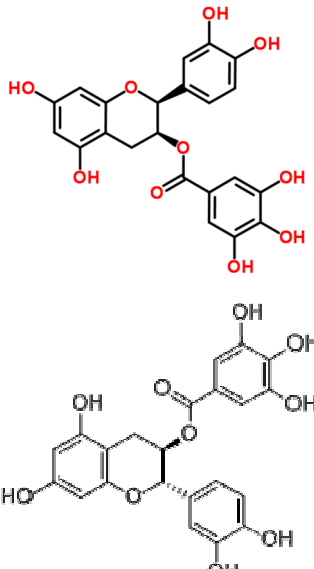
Kā metodes prototipu izmantoja literatūrā atrastu AEŠH metodi [26], ar masspektrālā detektora palīdzību identificēja arī galvenos komponentus, kuru struktūrformulas un

raksturlielumi attēloti 2.2.tabulā. Zaļajā tējā sastopami vairāki strukturāli līdzīgu komponentu pāri, kam ir vienādas molekulmasas. Ja kādai smailei atbilda šāda komponentu pāra masa, izmantojām abu komponentu nosaukumus, jo mūsu darba mērķa sasniegšanai nav principiāli svarīgi precīzi identificēt komponentu. Darba izstrādes gaitā procesa atvieglošanai izlēmām kvantifikācijai izmantot tikai vienu komponentu – kofeīnu, kuram ir viegli pieejama arī standartviela. Pārējos identificētos komponentus nolēmām nekvantificēt, lai vienkāršotu iekārtas pārbaudes procesu.

2.2.tabula

Komponentu raksturlielumi; M/z – masas/lādiņa attiecība, ko nosaka masspektrālais detektors

Nr.p.k.	Vielas nosaukums	Strukturformula	Molmasa, g/mol	Jonizācija	M/z, Da	Izdalīšanas laiks, min
1.	Kofeīns		194,191 [27]	+H	195,12	11,9
2.	Gallokatehīns vai epigallokatehīns		306,267 [28, 29]	-H	305,06	14,7
3.	Epikatehīns		290,268 [30]	-H	289,06	19,5

4.	Epigallokatehīna gallāts/gallokatehīna gallāts		458,372 [31,32]	-H	457,13	24,4
5.	Epikatehīna gallāts/katehīna gallāts		442,372 [33,34]	-H	441,17	30,2

Kustīgā fāze:

A: 1 L mērkolbā ielēja nedaudz ultratīrā ūdens, pievienoja 10 mL koncentrētas etiķskābes un uzpildīja līdz atzīmei ar ultratīro ūdeni.

B: 1 L mērkolbā ielēja nedaudz acetonitrila, pievienoja 10 mL koncentrētas etiķskābes un uzpildīja līdz atzīmei ar acetonitrilu.

Analīzes apstākļi: UV detektorā uzstādāmais viļņa garums 270 nm, plūsmas ātrums 0,4 mL·min⁻¹, eluēšanas režīmu skat. 2.3. tabulā.

Eluēšanas režīms tējas komponentu noteikšanai ar AEŠH

Laiks, min.	% A	% B
0	95	5
21	80	20
30	75	25
32	0	100
39	0	100
40	95	5
45	95	5

Masspektrālā detektora analīzes apstākļi: paraugu ņemšanas biežums 2 punkti sekundē, pozitīvā kapilāra spriegums 0,8 kV, negatīvā kapilāra spriegums 0,8 kV, konusa spriegums 15 V. Skenēšanas režīmi:

- 1) Pozitīvā skenēšana jonu masu diapazonā 50-800 Da (komponentu identifikācijai)
- 2) Negatīvā skenēšana jonu masu diapazonā 50-800 Da (komponentu identifikācijai)
- 3) Vienas masas skenēšana („*Single Ion Monitoring*” režīms) pie masām +195, -305, -289, -457, -441.

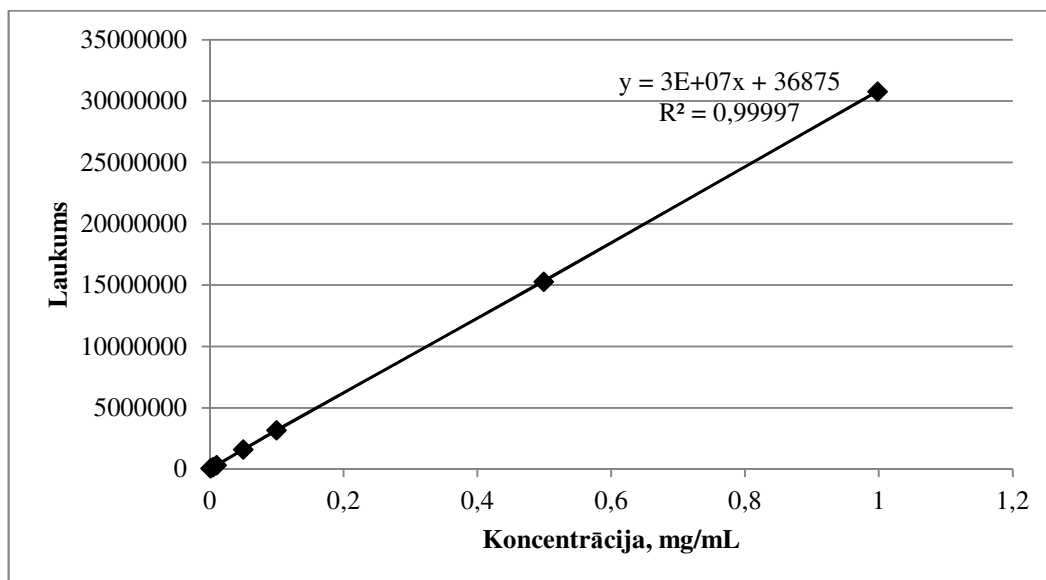
Paraugu sagatavošana: Analizēja iegūtās frakcijas bez papildu apstrādes vai pēc nepieciešamības filtrēja caur 0,45 µm šļirces filtru un/vai atšķaidīja vairākas reizes kustīgajā fāzē A.

Kofeīna kalibrēšanas grafika iegūšana: tā kā eksperimentu laikā bija pieejama tikai kofeīna standartviela, tad to arī izmantoja kalibrēšanai. Sākumā uzņēma kofeīna kalibrēšanas grafiku, hromatogrāfējot 7 dažādu koncentrāciju (no aptuveni 0,001 līdz 1 mg/mL, precīzas koncentrācijas skat. 2.4. tabulā) kofeīna standartvielas šķīdumus tādos pašos apstākļos kā paraugu. No iegūtajiem rezultātiem uzzīmēja kalibrēšanas līkni (sk. 2.6.att.), kas apliecina, ka šajā koncentrāciju diapazonā smaiļu laukuma atkarība no vielas koncentrācijas ir lineāra. Tālākā darbā procesa atvieglošanai izmantoja viena punkta kalibrāciju, izvēloties kofeīna koncentrāciju aptuveni pa vidu lineārajam diapazonam.

Dati kofeīna kalibrēšanas grafika iegūšanai

Koncentrācija (mg/mL)	Smailes laukums
0,000998	80659
0,00499	165868

0,00998	320135
0,0499	1597075
0,0998	3179726
0,499	15283508
0,998	30789768



2.6.att. Kofeīna koncentrācijas kalibrēšanas grafiks

Standartšķīdumu pagatavošana: apmēram 25 mg kofeīna standartvielas (precīzs iesvars) izšķīdināja nelielā daudzumā kustīgās fāzes A, kvantitatīvi pārnese 50 mL mērkolbā un uzpildīja līdz atzīmei ar kustīgo fāzi A (izņemot kalibrācijas grafiku, kura uzņemšanai pagatavoja 7 koncentrāciju šķīdumus, sk. 2.4.tabulu).

Kofeīna satura noteikšana paraugos: hromatogrāfēja vienādus injekciju tilpumus (5 μ L) standartšķīduma un analizējamā parauga šķīduma. Noteica kofeīna smaīļu laukumus. Vielmasu mg katrā paraugā/frakcijā aprēķināja pēc formulas:

$$m_{kofeīna} = \frac{(S_{kofeīna} \times c_{st} \times V_{an.šķ.} \times atšķ.)}{S_{st}}$$

kur: $S_{kofeīna}$ – kofeīna smaīles laukums analizējamā parauga hromatogrammā;

c_{st} – kofeīna koncentrācija standartšķīdumā, mg/mL;

$V_{an.šķ.}$ – analizējamā šķīduma (frakcijas) tilpums, mL;

atšķ. – analizējamā šķīduma atšķaidījums;

S_{st} – kofeīna smaīles laukums standartvielas hromatogrammā.

2.5. Kumelišu ziedu ekstrakcijas process

Kolonnas sagatavošana: kolonnā ($D = 38$ mm) ielika apakšējo filtru. 200 mL metanola suspendēja 50 mL sorbenta un filtrēja caur kolonnu. Uz sorbenta slāņa uzlika augšējo filtru un slāni sablīvēja ar aksiālās saspiešanas ierīces palīdzību. Kolonnu pievienoja sūknim un frakciju selektoram. Pārsūknēja 200 mL metanola ar ātrumu $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, tad 300 mL ūdens ar ātrumu $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Sorbenta slāni atkārtoti sablīvēja. Pārsūknēja vēl 300 mL ūdens. Iegūtais sorbenta slāņa biezums bija 42 mm.

Kumelišu ziedu ekstrakcija ūdenī: 30 g (svērts uz laboratorijas svāriem, precizitāte 0,01 g) sausa tējas parauga iebēra 1000 mL vārglāzē, pievienoja 800 mL dejonizēta ūdens un izturēja ūdens vannā 85°C temperatūrā vienu stundu. Pēc tam veica automatizētu cietfāzu ekstrakcijas procesu sērijveidā.

Cietfāzes ekstrakcija. Izejvielas un šķīdinātāju tvertnes, kā arī tvertnes, kas paredzētas frakciju uztveršanai, pieslēdza pie cietfāzes ekstrakcijas sistēmas tāpat kā eksperimentos ar zaļo tēju (kā norādīts 2.5. attēlā), tējas uzlējuma vietā izmantojot kumelišu ziedu uzlējumu. Veica vairākus eksperimentus, kolonnai uznesot maksimālo iespējamo koncentrējamā parauga daudzumu (aptuveni 500-600 mL, precīzi tilpumi mērīti un ņemti vērā aprēķinos). Desorbcijas procesu ar metanolu sadalīja 3 daļās, katrā izmantojot aptuveni 30 mL 100% metanola. Sūkņa ātrums visos eksperimentos bija $25 \text{ mL}/\text{min}$. Skalojamā ūdens tilpums katra eksperimenta beigās bija 300 mL. Katrā eksperimentā mērīja arī iegūto frakciju tilpumus, tādējādi nodrošinot precīzus materiālo bilanču aprēķinus. Starp eksperimentiem veica arī rūpīgu kolonnas mazgāšanu ar metanolu (200 mL) un skalošanu ar ūdeni (300 mL).

2.6. Kumelišu ziedu komponentu analīzes metode

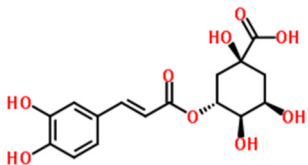
Izejvielu un iegūtās desorbētās frakcijas analizēja ar augstas efektivitātes šķīdumu hromatogrāfijas metodi, galveno komponentu identifikācijai izmantojot viena kvadrupola masspektrālo detektoru.

Kā metodes prototipu izmantoja literatūrā atrastu AEŠH metodi [35], kuras gradientu pielāgoja izmantotajai kolonnai. Ar masspektrālā detektora palīdzību identificēja trīs galvenos komponentus, kuru raksturlielumi attēloti 2.5.tabulā.

2.5.tabula

Kumelišu ziedu komponentu raksturlielumi; M/z – masas/lādiņa attiecība, ko nosaka masspektrālais detektors

Nr.p.k.	Vielas nosaukums	Struktūrformula	Molmasa, g/mol	Jonizācija	M/z , Da	Izdalīšanas laiks,
---------	------------------	-----------------	----------------	------------	------------	--------------------

						min
1.	Ferulskābes glikozīds 1	-	356,325 [36, 37]	veido dimēru - H	711, 38	8,2
2.	Hlorogēnskābe		354,309 [38]	veido dimēru - H	707,35 (reizēm uzrādās arī monomēra –H masa 353 Da)	8,4
3.	Ferulskābes glikozīds 2	-	356,325 [36,37]	veido dimēru - H	711, 38	9,4

Jāpiebilst, ka ferulskābei ir vairāki iespējamie glikozīdi, kuriem ir vienāda molmasa, tāpēc konkrētas struktūras šajā darbā nenorādīsim. Vielu precīza identifikācija ir ārpus šī darba mērķiem.

Kustīgā fāze:

A: 1 L mērkolbā ielēja nedaudz ultratīrā ūdens, pievienoja 1 mL koncentrētas skudrskābes un uzpildīja līdz atzīmei ar ultratīro ūdeni.

B: tīrs acetonitrils.

Analīzes apstākļi: UV detektorā uzstādāmais viļņa garums 330 nm, plūsmas ātrums 1,0 mL·min⁻¹, eluēšanas režīmu skat. 2.6. tabulā:

2.6.tabula

Eluēšanas režīms kumelišu komponentu noteikšanai ar AEŠH

Laiks, min.	% A	% B
0	99	1
2	99	1
20	30	70
25	5	95
30	5	95
31	99	1
35	99	1

Masspektrālā detektora analīzes apstākļi: paraugu ņemšanas biežums 2 punkti sekundē, pozitīvā kapilāra spriegums 0,8 kV, negatīvā kapilāra spriegums 0,8 kV, konusa spriegums 15 V. Skenēšanas režīmi:

- 1) Pozitīvā skenēšana jonu masu diapazonā 50-1000 Da
- 2) Negatīvā skenēšana jonu masu diapazonā 50-1000 Da

Paraugu sagatavošana: Analizēja izejvielu un iegūtās frakcijas bez papildu apstrādes vai pēc nepieciešamības filtrējot caur 0,45 μm šļirces filtru un/vai atšķaidot vairākas reizes kustīgajā fāzē A.

Kumelišu komponentu materiālās bilances aprēķini: hromatogrāfēja vienādus injekciju tilpumus (5μL) izejvielas un iegūto frakciju. Tā kā kumelišu analīzes gadījumā nebija pieejamas standartvielas, komponentu materiālās bilances aprēķināja, izmantojot tikai smaīļu laukumus hromatogrammās. Komponentu laukumus izejvielā pieņēma par 100%. Vielas iznākumu procentos katrā paraugā/frakcijā aprēķināja pēc formulas:

$$Wx_{\%} = \frac{(S_{x\ fr.} \times V_{fr.} \times atšk_{fr.}) * 100\%}{(S_{x\ izejv.} \times V_{izejv.} \times atšk_{izejv.})}$$

kur: $W_{x\%}$ - komponenta iznākums frakcijā, %;

$S_{x\ fr.}$ un $S_{x\ izejv.}$ – komponenta smaīles laukumi attiecīgi frakcijā un izejvielas šķīdumā;

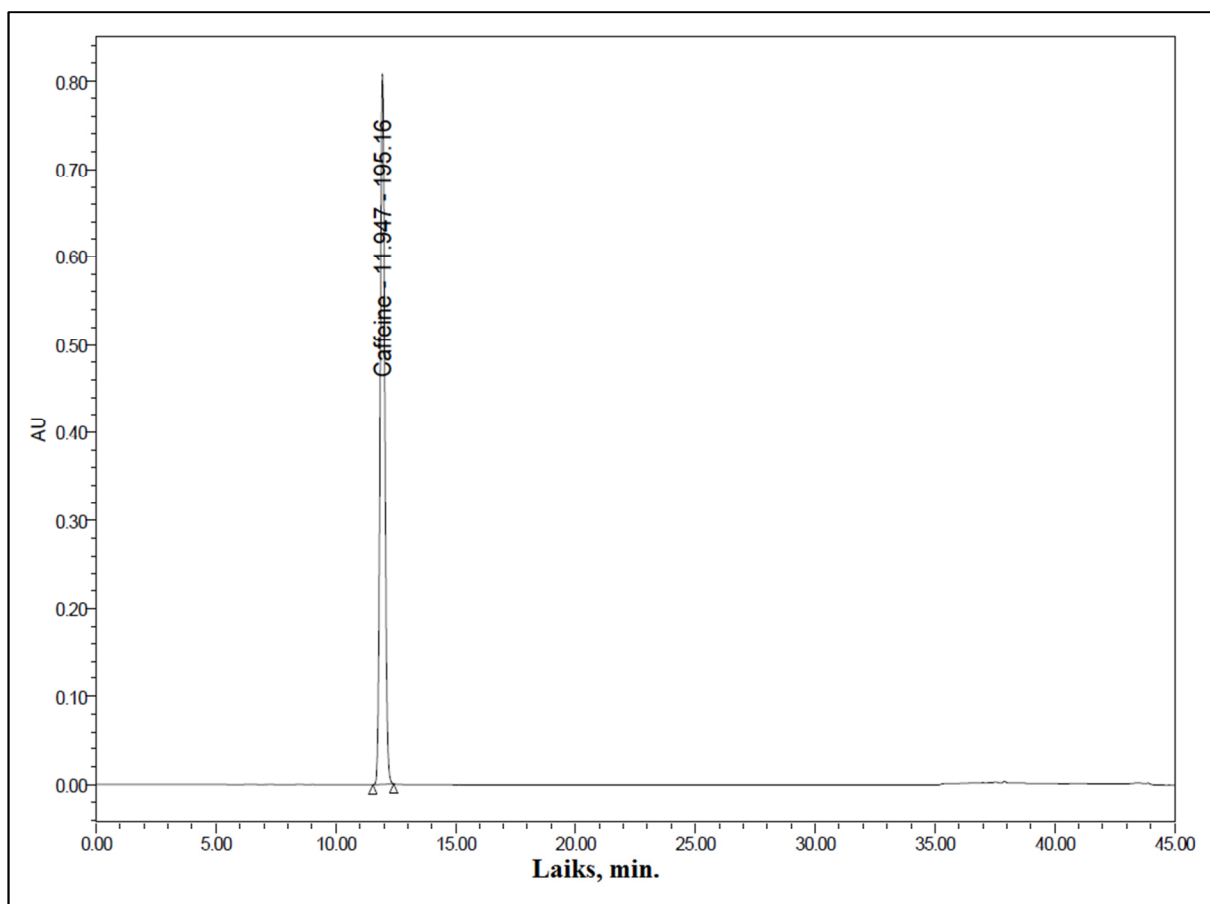
$V_{fr.}$ un $V_{izejv.}$ – frakcijas un izejvielas šķīduma reālais tilpums, mL;

$atšk_{fr.}$ un $atšk_{izejv.}$ – frakcijas un izejvielas šķīduma atšķaidījums pirms analīzes, reizes.

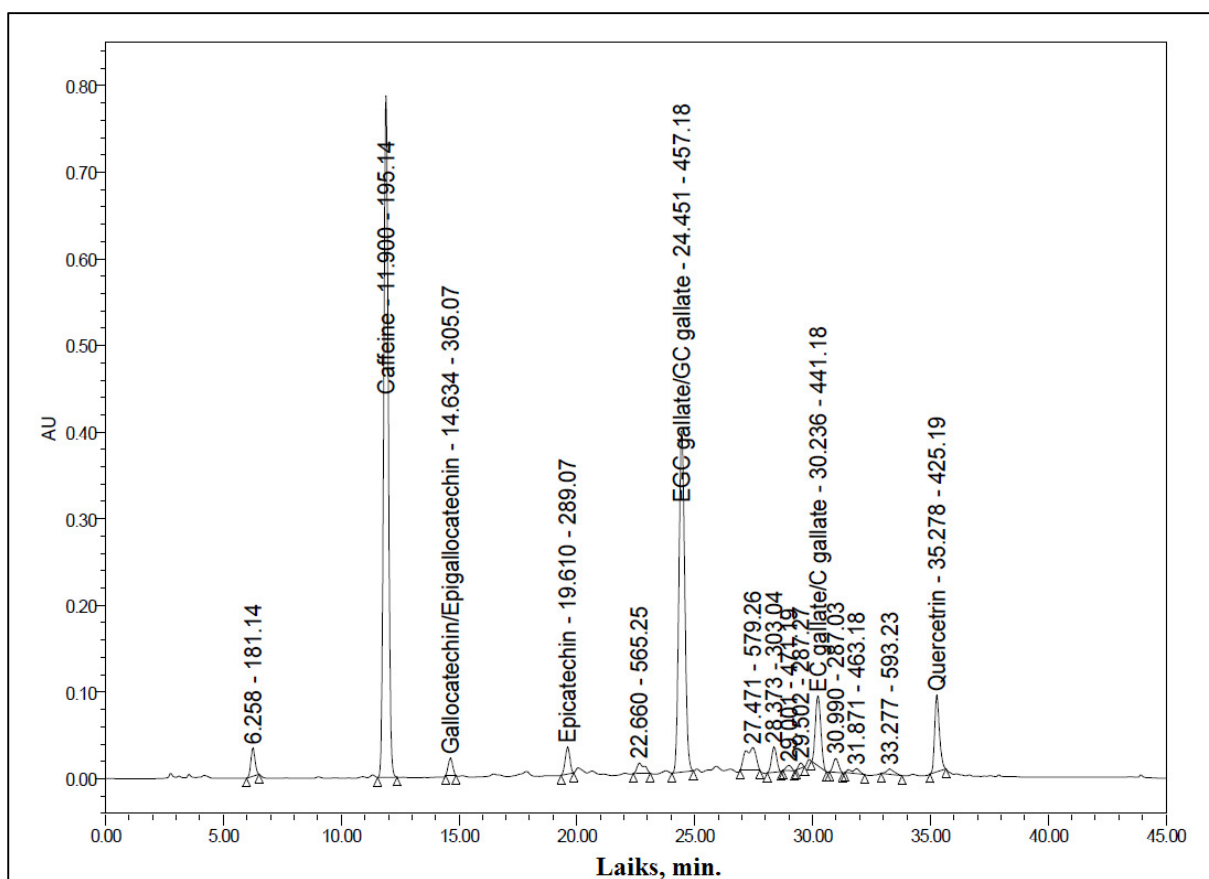
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Zaļās tējas ekstraktu iegūšana

Katra eksperimenta analīžu sērijas sākumā uzņēma kofeīna standartvielas šķīduma hromatogrammu (piemērs 3.1. att.), ar kuru salīdzināja desorbēto frakciju hromatogrammas (piemērs 3.2.att.), un veica aprēķinus saskaņā ar iepriekš doto formulu.

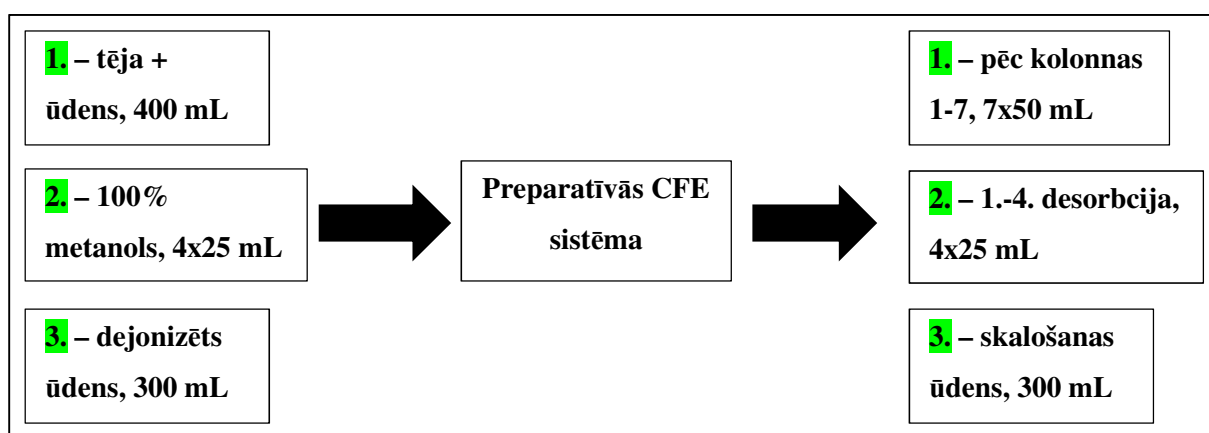


3.1.att. Kofeīna standartvielas hromatogrammas piemērs



3.2.att. Desorbētās frakcijas (ekstrakta) hromatogrammas piemērs.

Sākotnēji veica eksperimentu sērijveida ekstrakcijas režīmā, izlaižot cauri svaigi pagatavotai kolonnai tējas uzlējumu, kurš izfiltrēts caur papīra filtru. Lai novērotu sorbcijas efektivitāti, ņēma paraugus uzreiz pēc kolonnas ik pēc ~50 mL sorbcijas. Desorbciju no kolonnas veica 4 porcijās pa 25 mL. Precīzu eksperimenta shēmu skat. 3.3.attēlā.



3.3.att. Sērijveida ekstrakcijas eksperimenta shēma

Materiālās bilances sastādīšanai izmantoja izejvielas šķīdumu, no kura paņēma paraugu tieši pirms sorbcijas. Eksperimenta rezultāti apkopoti 3.1.tabulā.

Tējas izvilkuma ekstrakcija sērijveida režīmā

Kofeīna masa paraugā, mg	Kofeīna konc.paraugā, mg/mL	Paraugs	Kofeīna koncentrācija, mg/mL	Kofeīna masa, mg	Kopējā iznākusi masa, mg	Iznākums, % no teorētiskā
374,0	0,95	Pēc kolonnas 1	0	0	0,9	0,2
		Pēc kolonnas 2	0,0026	0,16		
		Pēc kolonnas 3	0,0031	0,19		
		Pēc kolonnas 4	0,0030	0,16		
		Pēc kolonnas 5	0,0022	0,11		
		Pēc kolonnas 6	0,0024	0,13		
		Pēc kolonnas 7	0,0025	0,14		
	1.desorbcija	0,0027	0,13	389	104	
	2.desorbcija	6,63	299			
	3.desorbcija	1,48	86			
	4.desorbcija	0,04	4			
	Skalošanas ūdens	0,11	38	38	10	

Eksperimentā novērojams, ka praktiski viss ievadītais kofeīna daudzums sorbējas uz kolonnas un tiek atgūts desorbcijas laikā. Turklāt pat vienreizējā sorbcijas procesā iespējams iegūt ekstraktu, kas ir gandrīz 7 reizes koncentrētāks nekā izejviela. Kā vienīgo rezultātu trūkumu varētu minēt faktu, ka iznākums ir vairāk nekā 100% no teorētiskā. Tas varētu būt saistīts ar nepietiekami precīzu kofeīna masas daļas noteikšanu izejvielā. Galu galā, tējas ekstrakcija ūdenī turpinās arī laikā, kad ekstrakts tiek uzņemts uz kolonnas, un komponentu koncentrācija ekstraktā varētu mainīties.

Lai precīzāk aprēķinātu katra eksperimenta materiālo bilanci, veica vienas tējas porcijas vairākkārtēju ekstrakciju ūdenī un kofeīna masas daļas tējā aprēķinu, ko pieņēma par atskaites punktu visiem nākošajiem eksperimentiem. Iegūtā kofeīna masas daļa bija 18,9 mg kofeīna uz g tējas, jeb 1,89%. Pēc tā noskaidrošanas turpināja tējas ekstrakcijas eksperimentus.

Lai pārbaudītu veiksmīgo eksperimentu, to atkārtoja, rēķinot materiālo bilanci pēc tikko iegūtajiem datiem par kofeīna kopējo saturu tējā. Eksperimenta programma bija tāda pati kā iepriekš, tikai uzreiz pēc kolonnas iznākušo šķīdumu nedalīja sīkākās daļās analīzei, tā kā iepriekšējais eksperiments bija parādījis, ka tajā esošais kofeīna saturs ir minimāls. Atkārtotā eksperimenta rezultāti parādīti 3.2.tabulā.

Tējas izvilkuma ekstrakcija sērijveida režīmā ar precīzākiem aprēķiniem

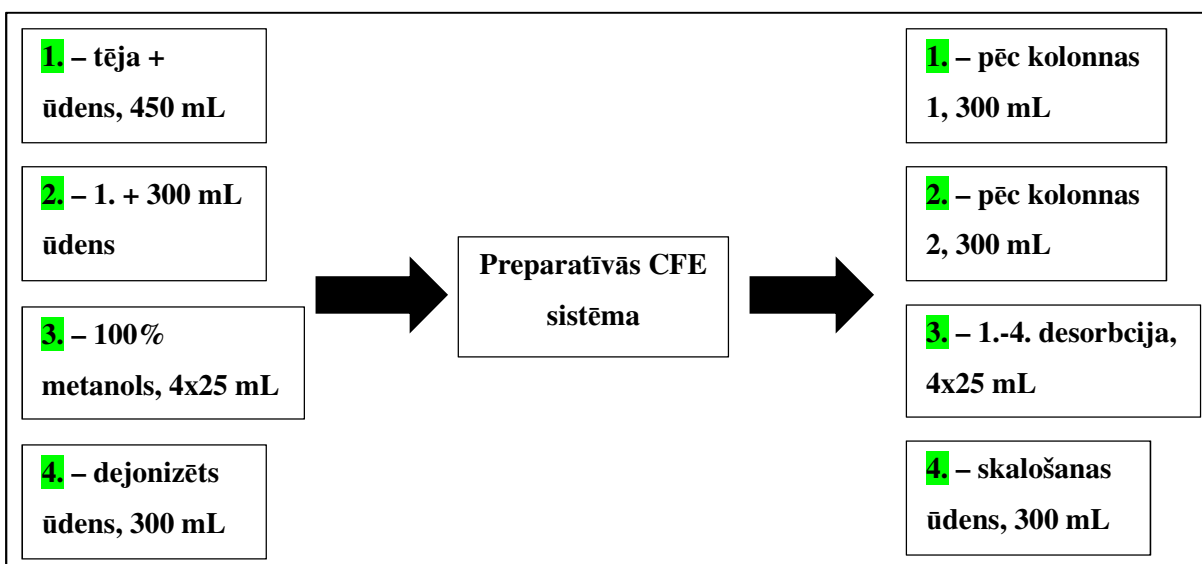
Kofeīna masa paraugā, mg	Kofeīna konc.paraugā, mg/mL	Paraugs	Kofeīna koncentrācija, mg/mL	Kofeīna masa, mg	Kopējā iznākusi masa, mg	Iznākums, % no teorētiskā
408,8	1,05	Pēc kolonnas	0	0	409,04	100
		1.desorbcija	2,6	153		
		2.desorbcija	4,5	252		

		3.desorbcija	0,1	4		
		4.desorbcija	0	0,04		
		Skalošanas ūdens	0	0	0	0

Lai gan šoreiz ieguva mazāk koncentrētu ekstraktu, eksperiments kopumā uzskatāms par veiksmīgu. Pēc sorbcijas no kolonnas iznākušais šķīdums kofeīnu nesatur, kas nozīmē, ka sorbcija ir notikusi pilnībā. Desorbcijas laikā no kolonnas izdodas desorbēt visu teorētisko ievadīto kofeīna daudzumu un skalošanas ūdens arī nesatur kofeīnu. Tātad ir izdevies veiksmīgi ekstrahēt tējas paraugu, sakoncentrējot to apmēram 4 reizes un pilnībā atgūstot ievadīto izejvielas daudzumu.

Pirmie eksperimenti bija veiksmīgi, bet bija jāpārbauda šāda procesa iespēju robežas, izmēģinot ekstrakciju nepārtrauktā režīmā. Šāda procesa īstenošanai parauga ievadcaurules galā pierīkoja filtru, lai varētu nosūknēt paraugu tieši no vārglāzes, kurā notiek tējas ekstrakcija ūdenī, un pēc tam vārglāzi papildināja ar atbilstošu šķidrums daudzumu.

Tika nolemts, ka jāizmēģina eksperiments ar divkāršu sorbciju, bet mazākiem ievadītajiem parauga daudzumiem. Paņēma 25 gramus tējas (puse no iepriekš izmantotās parauga masas) un tiem pievienoja 450 mL ūdens (arī attiecīgi puse). Eksperimenta shēma bija tāda pati, tikai sorbciju tika veica divas reizes. Precīzu eksperimenta shēmu skat. 3.4.attēlā.



3.4.att. Divkāršās sorbcijas eksperimenta shēma

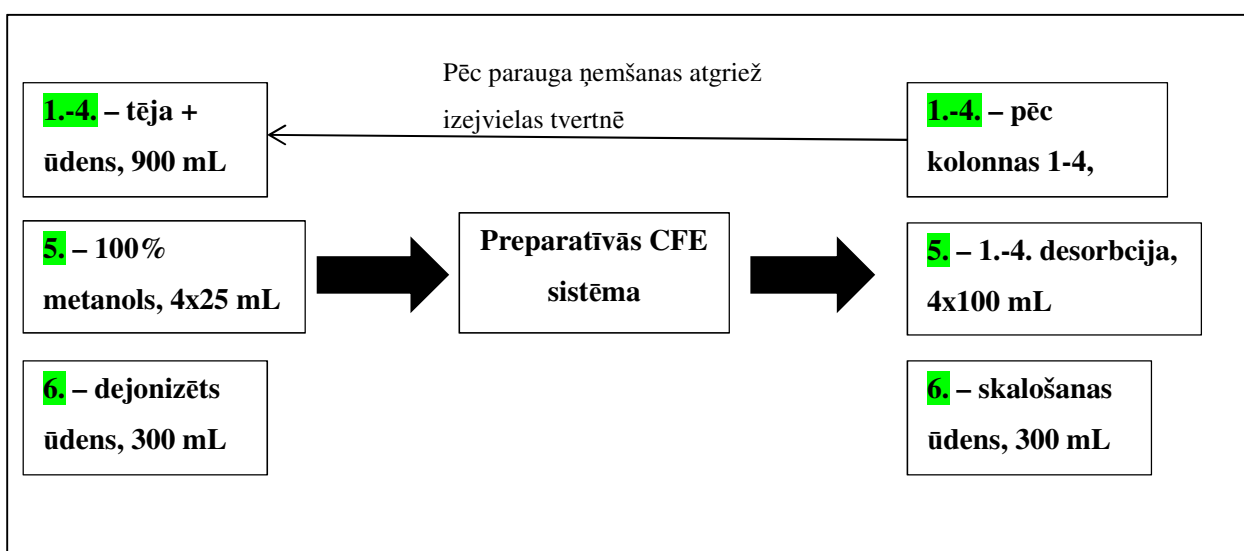
Šī eksperimenta rezultāti apkopoti 3.3.tabulā.

Tējas izvilkuma ekstrakcija ar divkāršu sorbciju

Kofeīna masa paraugā, mg	Kofeīna konc.paraugā, mg/mL	Paraugs	Kofeīna koncentrācija, mg/mL	Kofeīna masa, mg	Kopējā iznākusi masa, mg	Iznākums, % no teorētiskā
306,3	0,9	Pēc kolonnas 1	0	0	0	0
		Pēc kolonnas 2	0	0	0	0
		1.desorbcija	0,23	11	284	93
		2.desorbcija	2,9	145		
		3.desorbcija	1,7	83		
		4.desorbcija	0,9	45		
		Skalošanas ūdens	0,1	26	26	9

Redzams, ka eksperimentu arī šādā režīmā var uzskatīt par veiksmīgu. Vairāk nekā 90% ievadītā kofeīna daudzuma iznāk desorbcijas frakcijās. Ievadītais kopējais daudzums ir mazāks nekā iepriekšējos eksperimentos, tāpēc nav pārsteidzoši, ka viskoncentrētākais ekstrakts tikai 3 reizes pārspēj izejvielas šķīdumu.

Lai pārbaudītu procesa robežas, nākošajā eksperimentā atkal izmantoja parasto tējas un ūdens daudzumu (attiecīgi 50 g un 900 mL) un sorbciju veica nepārtrauktā režīmā četras reizes, katru reizi uznesot uz kolonnas aptuveni 600 mL izejvielas. Šķīdumu pēc kolonnas atgriezta ekstrakcijas vārglāzē. Desorbciju veica 4 porcijās pa 100 mL metanola. Procesu shēmu skat. 3.5.attēlā.



3.5.att. Četrkāršās sorbcijas eksperimenta shēma

Šoreiz neņēma paraugus pēc kolonnas un no skalojamā ūdens. Rezultāti apkopoti 3.4.tabulā.

Tējas izvilkuma ekstrakcija ar četrkāršu sorbciju

Kofeīna masa paraugā, mg	Kofeīna konc.paraugā, mg/mL	Paraugs	Kofeīna koncentrācija, mg/mL	Kofeīna masa, mg	Kopējā iznākusi masa pēc 4-kārtējas desorbcijas, mg	Iznākums, % no teorētiskā
943,4	1,05	1.desorbcija	3,2	306	639	68
		2.desorbcija	2,5	257		
		3.desorbcija	0,6	61		
		4.desorbcija	0,14	15		

Kā redzams, izdevies atgūt tikai 68% no uz kolonnas uznestā kofeīna daudzuma, turklāt ekstrakts atkal ir tikai 3 reizes koncentrētāks par izejvielu. No tā var secināt, ka ir vai nu pārsniegta kolonnas kapacitāte, vai arī kā citādi pasliktinājusies eksperimenta efektivitāte. Iespējams, ka, sūknējot paraugu, tika pastāvīgi nosūknēta tikai augšējā šķīduma daļa, atstājot būtisku komponentu koncentrāciju apakšā.

Pagatavoja svaigu kolonnu un veica līdzīgu eksperimentu, šoreiz desorbcijai izmantojot 4x50 mL metanola un analizējot arī skalošanas ūdeni un pārpalikumus vārglāzē.

Tējas izvilkuma ekstrakcija ar četrkāršu sorbciju un mazāku metanola daudzumu

Kofeīna masa paraugā, mg	Kofeīna konc.paraugā, mg/mL	Paraugs	Kofeīna koncentrācija, mg/mL	Kofeīna masa, mg	Kopējā iznākusi masa, mg	Iznākums, % no teorētiskā
943,4	1,05	1.desorbcija	0,7	26	679	72
		2.desorbcija	14	490		
		3.desorbcija	3,5	130		
		4.desorbcija	0,8	33		
		Pārpalikums	0,3	153	153	16
		Skalošanas ūdens	0,05	12	12	1

Varam redzēt, ka ar svaigi pagatavotu kolonnu eksperiments ir veiksmīgāks. Lai gan joprojām nav atgūts viss teorētiskais kofeīna daudzums, desorbējot atgūti vairāk nekā 70%. Pārpalikumos palikuši tikai 16% kofeīna. Un pats labākais – izdevies iekonzentrēt paraugu veselas 13 reizes.

Kopumā salīdzinot eksperimentus sērijveida un nepārtrauktā režīmā, var secināt, ka pēdējā darbības parametri vēl būtu jāpielāgo. Sērijveida režīmā izdevies iekonzentrēt paraugu līdz 7 reizēm, nepārtrauktā – līdz pat 13 reizēm. Taču nepārtrauktā režīmā neizdodas atgūt visu teorētisko kofeīna daudzumu. Turklāt diezgan ātri pasliktinās rezultāti, iespējams, kolonnas kapacitātes pārsniegšanas dēļ. Taču to varētu labot, veicot vēl eksperimentus un pielāgojot to parametrus.

Sausa tējas ekstrakta iegūšana. Vairākos no minētajiem eksperimentiem ieguva koncentrētus tējas ekstraktus metanolā. Šos ekstraktus atstāja iztvaicēties gaisā velkmes skapī, ļaujot metanolam iztvaikot istabas temperatūrā. Ieguva sausus ekstraktus, ko saberza pulverī. Ekstrakta pulvera piemēru skat. 3.6.attēlā.

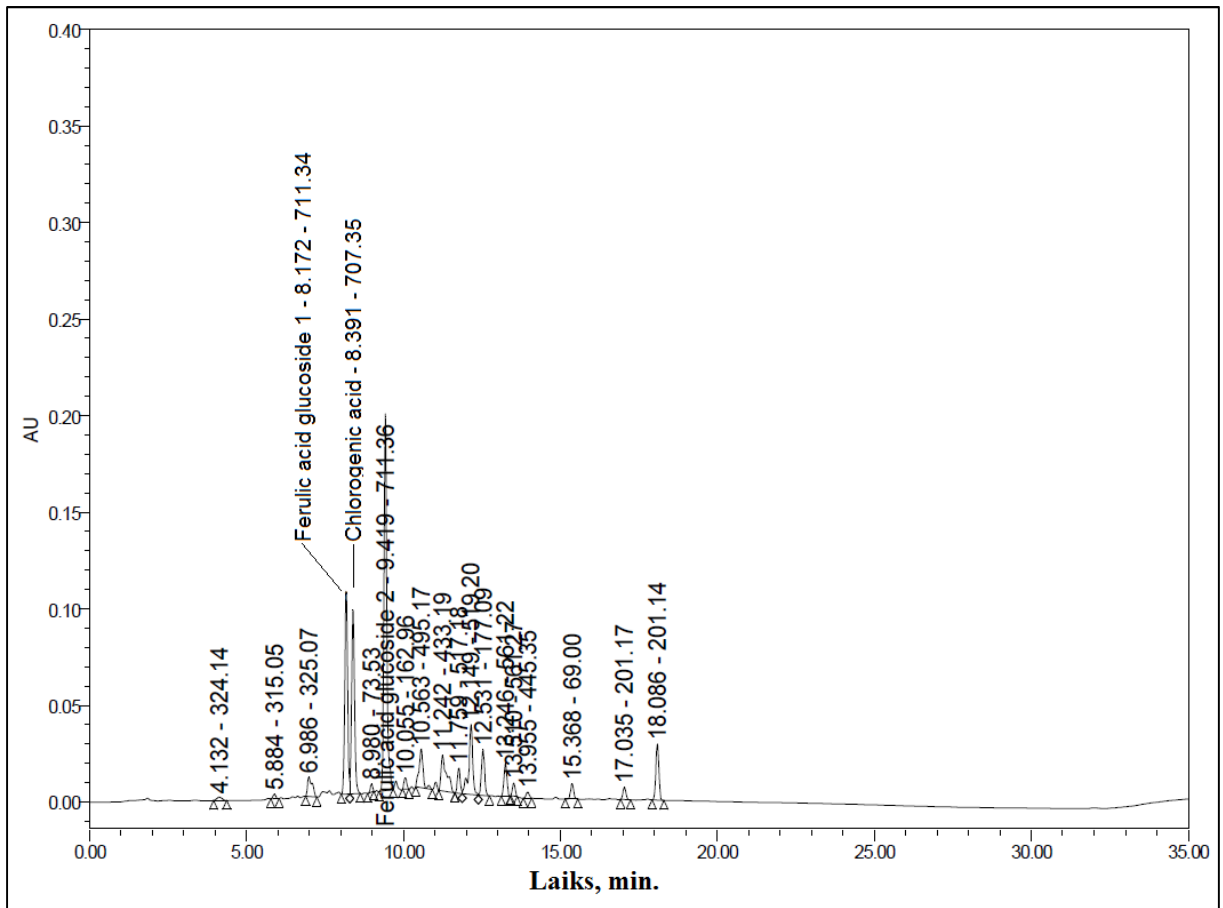


3.6.att. Iegūtā sausā tējas ekstrakta piemērs.

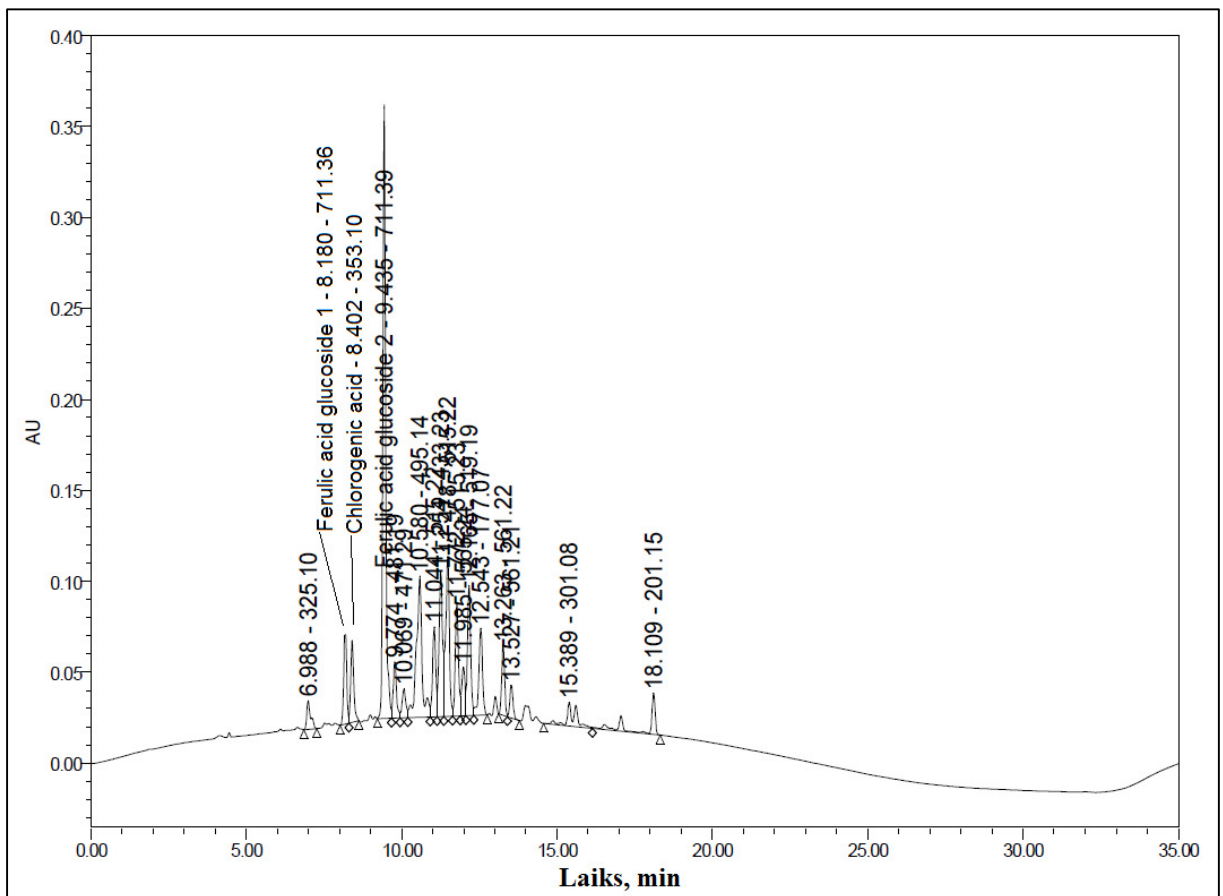
Sausā pulverveida ekstrakta iegūšana šādā veidā labi parāda šādas ekstrakcijas metodes potenciālos pielietojumus. Redzams, ka ir iespējams pagatavot termiski nestabilu vielu ekstraktus, no kuriem savukārt var iegūt gatavu produktu, apejot tādas metodes kā, piemēram, ūdens šķīdumu ietvaicēšanu. Ietvaicēšana, kā zināms, prasa augstu temperatūru izmantošanu, kas savukārt var kaitēt termiski nestabiliem savienojumiem. Turklāt ietvaicēšana patērē arī ļoti daudz enerģijas, kas arī ir būtisks faktors. Tātad, izmantojot cietfāzu ekstrakciju, varam gan pasargāt termiski labilos savienojumus, gan ietaupīt enerģiju.

3.2. Kumelīšu ziedu ekstraktu iegūšana

Katra eksperimenta analīžu sērijas sākumā uzņēma izejvielas (kumelīšu ūdens ekstrakta) hromatogrammu (piemērs 3.7. att.), ar kuru salīdzināja desorbēto frakciju hromatogrammas (piemērs 3.8.att.), un veica aprēķinus saskaņā ar iepriekš doto formulu.



3.7.att. Izejvielas – kumelišu ziedu ūdens uzlējuma – hromatogrammas piemērs.



3.8.att. Desorbētās frakcijas hromatogrammas piemērs.

Kumelišu ziedu uzlējuma koncentrēšanas eksperimenti notika tikai sērijveidā, katru reizi uznesot uz kolonnas konkrētu tilpumu izejvielas un to desorbējot ar metanolu trīs frakcijās. Eksperimentu rezultāti katram komponentam redzami 3.6.tabulā.

3.6.tabula

Kumelišu ziedu uzlējuma koncentrēšanas rezultāti

Komponents	Kopējais laukums izejvielā (SxVx atšķ.)		S kopējais (SxVx atšķ.)	Koncentrācijas izmaiņa, reizes (pret izejvielu)	Iznākums, % no izejvielas
Ferulskābes glikozīds 1	376617810	Kolonnai cauri izgājušais	240593010	0,6	64
		1.desorbcija	36727712	1,7	44
		2.desorbcija	124103000	5,4	
		3.desorbcija	4769975	0,2	
		Mazgāšanas ūdens	0	0	0
Hlorogēnskābe	359058390	Kolonnai cauri izgājušais	265319040	0,7	74
		1.desorbcija	36162688	1,8	42
		2.desorbcija	108349150	4,9	
		3.desorbcija	5758375	0,3	
		Mazgāšanas ūdens	0	0	0
Ferulskābes glikozīds 2	713882820	Kolonnai cauri izgājušais	0	0	0
		1.desorbcija	8909856	0,2	117
		2.desorbcija	761883150	17,4	
		3.desorbcija	66507245	1,5	
		Mazgāšanas ūdens	0	0	0

Kumelišu eksperimentos acīmredzami novērojama frakcionēšana – redzams, ka pirmie divi komponenti slikti sorbējas uz kolonnas un lielākā daļa iziet cauri kolonnai praktiski uzreiz. Savukārt ferulskābes glikozīds 2 tiek sorbēts pilnīgi. Varam redzēt arī, ka šis komponents, kurš vislabāk sorbējas, arī visveiksmīgāk ir sakoncentrējams, sasniedzot pat 17 reizes lielāku koncentrāciju nekā izejvielā.

Kopumā, apskatot iegūtos rezultātus gan eksperimentos ar zaļo tēju, gan kumelišu ziediem, varam secināt, ka automatizētā preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas iekārta ir veiksmīgi pielietojama augu izcelsmes produktu ekstraktu iegūšanai, koncentrēšanai un atsevišķos gadījumos arī frakcionēšanai. Lai veiktu ekstrakciju nepārtrauktā režīmā, būtu jāveic vēl izmēģinājumi un jāpielāgo procesa parametri.

SECINĀJUMI

1. Ir uzbūvēta automatizēta cietfāzu ekstrakcijas iekārta, ko iespējams plaši pielietot vielu attīrīšanai un koncentrēšanai preparatīvā mērogā.
2. Uzbūvētā iekārta ir attīstīta, iebūvējot tajā fotodiožu detektoru un mūsdienīgu vadības sistēmu, kā arī citādi uzlabojot tās funkcionalitāti.
3. Izmantojot uzbūvēto iekārtu, iespējams veiksmīgi sakoncentrēt zaļās tējas ūdens uzlējumus līdz pat 13 reizēm, no aptuveni 900 mL izejvielas iegūstot aptuveni 50 mL koncentrēta tējas ekstrakta metanolā.
4. Iespējams iegūt sausu pulverveida zaļās tējas ekstraktu, neizmantojot apstrādi augstās temperatūrās, kas var novest pie paraugu sadalīšanās riska un liela enerģijas patēriņa.
5. Iespējams veiksmīgi sakoncentrēt kumelīšu ziedu uzlējumus līdz pat 17 reizēm, no aptuveni 800 mL izejvielas iegūstot aptuveni 35 mL koncentrēta kumelīšu ekstrakta metanolā.
6. Iespējams veikt frakcionēšanu, atdalot dažādus izejvielas komponentus atkarībā no to sorbcijas efektivitātes uz kolonnas.
7. Lai pilnveidotu sistēmas darbību, būtu nepieciešami tālāki pētījumi, lai noteiktu procesa ierobežojumus nepārtrauktas ekstrakcijas režīmā, kolonnas mūža ilgumu un sorbenta reģenerācijas iespējas.
8. Veiktais darbs ir labs sākums iekārtas turpmākajiem lietotājiem, kam būs iespēja metodes pilnveidot un turpināt strādāt ar iekārtu, pielāgojot tās darbību saviem apstrādājamiem produktiem.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. *Sample Preparation in Chromatography – Journal of Chromatography Library*, volume 65. Moidoveanu, S., David, V., Ed.; Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002; pp. 287-412.
2. Liquid-Liquid Extraction principle. <http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Extraction/Liquid-Liquid%20Extraction%20Principle.jpg> (skatīts 19.06.2014.)
3. Liquid Extraction Techniques.
<http://info.smithersrapra.com/downloads/chapters/Update%20on%20Undertaking%20Extractables.pdf> (skatīts 11.06.2014.)
4. ERT 313 Bioseparation Engineering - Liquid-Liquid Extraction.
http://portal.unimap.edu.my:7778/portal/page/portal30/Lecturer%20Notes/KEJURUT ERAAN BIOPROSES/Semester%202%20Sidang%20Akademik%2020112012/BIOPROCESS%20%20ENGINEERING%20PROGRAMME/THIRD%20YEAR/ERT%20313%20Bio-Separation%20Engineering/ERT%20313%20Liquid-liquid%20Extraction%20%28LLE%29_0.pdf (skatīts 20.06.2014.)
5. Liquid-Liquid Extraction Equipment.
http://www.cresp.org/NuclearChemCourse/monographs/11_Law_Liquid-liquid%20extraction%20equipment%20jdl_3_2_09.pdf (skatīts 20.06.2014.)
6. Tang B.; Bi, W.; Tian, M.; Row, K.H. Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *J. Chromatogr. B* **2012**, *904*, 1-21.
7. Chen, D.; OuYang, X.; Wang, Y.; Yang, L.; He, C. Liquid-liquid extraction of caprolactam from water using room temperature ionic liquids. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *104*, 263-267.
8. Principles and Practice of Chromatography.
<http://faculty.ksu.edu.sa/Dr.almajed/Books/practical%20HPLC.pdf> (skatīts 11.06.2014.)
9. Шатц В.Д.; Сахартова О.В. *Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии*; Зинатне: Рига, 1988; pp. 11-21.
10. Fifield, F.W.; Kealey, D. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*; Blackwell Science Ltd: Oxford, 2000; pp. 55-85.
11. Lc_basic_1_1_e.gif. http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/img/lc_basic/lc_basic_1_1_e.gif (skatīts 11.06.2014.)

12. The Theory of HPLC Chromatographic Parameters.
http://forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2013/04/Theory_Of_HPLC_Chromatographic_Parameters.pdf
 (skatīts 15.06.2014.)
13. High Performance Liquid Chromatography – HPLC.
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> (skatīts 17.06.2014.)
14. Modern High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).
<http://www.chromatography-online.org/hplc.php> (skatīts 20.06.2014.)
15. Principles of Preparative HPLC. A Primer.
<https://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5989-6639EN.pdf> (skatīts 20.06.2014.)
16. Lai, S.; Gu, J. Two-step chromatographic procedure for the preparative separation and purification of epigallocatechin gallate from green tea extracts. *Food Bioprod. Process.* **2014**, *92*, 314-320.
17. Kuang, P.; Song, D.; Yuan, Q.; Yi, R.; Lv, X.; Liang, H. Separation and purification of sulforaphene from radish seeds using macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* **2013**, *136*, 342-347.
18. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis> (skatīts 12.06.2014.)
19. Chua, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 805-817.
20. *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*. Telepchak, M.J., August, T.F., Chaney, G., Ed., Humana Press Inc., New Jersey, 2004; pp. 3-4.
21. De Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31-63.
22. Rochfort, S.; Caridi, D.; Stinton, M.; Trenerry, V.C.; Jones, R. The isolation and purification of glucoraphanin from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 205-210.
23. Fontanals, N.; Borrull, F.; Marce, R.M. Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *41*, 15-26.

24. Kļaviņa, K. Taksifolīna attīrīšana ar preparatīvās cietfāzu ekstrakcijas metodi. Kursa darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2014.
25. Kļaviņa, K. Automātiskās preparatīvās cietfāzes ekstrakcijas iekārtas izveide un raksturošana. Kursa darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2015.
26. Bae, I.K.; Ham, H.M.; Jeong, M.H.; Kim, D.H.; Kim, H.J. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. *Food Chem.* **2015**, *172*, 469-475.
27. Caffeine – C₈H₁₀N₄O₂ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2424.html> (skatīts 14.05.2015.)
28. (+)-Gallocatechin – C₁₅H₁₄O₇ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58594.html> (skatīts 14.05.2015.)
29. (-)-Epigallocatechin – C₁₅H₁₄O₇ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65231.html> (skatīts 14.05.2015.)
30. Epicatechin – C₁₅H₁₄O₆ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65230.html> (skatīts 14.05.2015.)
31. (-)-Epigallocatechin gallate – C₂₂H₁₈O₁₁ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58575.html> (skatīts 14.05.2015.)
32. (-)-Gallocatechin gallate – C₂₂H₁₈O₁₁ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.172662.html> (skatīts 14.05.2015.)
33. (+)-Epicatechin-3-O-gallate – C₂₂H₁₈O₁₀ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58567.html> (skatīts 14.05.2015.)
34. (-)-Catechin gallate - 130405-40-2. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6476036.htm (skatīts 14.05.2015.)
35. Raal, A.; Orav, A.; Pussa, T.; Valner, C.; Malmiste, B.; Arak, E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chem.* **2012**, *131*, 632-638.
36. Phenol-Explorer: Showing dietary polyphenol Ferulic acid 4-O-glucoside. <http://phenol-explorer.eu/compounds/489> (skatīts 15.05.2015.)
37. TRC - Ferulic Acid Acyl-β-D-glucoside. <http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=F308915> (skatīts 15.05.2015.)
38. Chlorogenic acid – C₁₆H₁₈O₉ – ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1405788.html> (skatīts 15.05.2015.)

Maģistra darbs „**Augu izcelsmes produktu automatizēta preparatīva cietfāzes ekstrakcija**” izstrādāts SIA „Faneks” demonstrāciju un pielietojumu laboratorijā.

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

Autors: _____ Ketlīna Kļaviņa
(*personiskais paraksts*)(*paraksta atšifrējums*)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, Dr. habil.chem. Viktors Šatcs: _____
(*personiskais paraksts*) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, Dr. chem. Arturs Vīksna: _____
(*personiskais paraksts*) (datums)

Recenzents, asoc. prof., Dr.chem. Vadims Bartkevičs: _____
(*personiskais paraksts*) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(*personiskais paraksts*)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (*ieraksta sekretārs*)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____ Zenta Balcerbule
(*personiskais paraksts*)