

Piotr ZIOBROWSKI^{a)}, Marcin CHUTKOWSKI^{a)}, Lidia ZAPAŁA^{b)}, Wojciech ZAPAŁA^{*a)}

^{a)} Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, Wydział Chemiczny, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, al. Powstańców Warszawy 12, 35-959 Rzeszów,

^{b)} Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, al. Powstańców Warszawy 12, 35-959 Rzeszów,

*Autor do korespondencji, e-mail: ichwz@prz.edu.pl

Analiza retencji wybranych testowych związków chemicznych w kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym modyfikowanym grupami aminowymi

Streszczenie: W niniejszej pracy zbadano wpływ składu fazy ruchomej oraz temperatury na proces retencji trzech testowych związków chemicznych: kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Określono także ogólną sprawność kolumny dla badanych związków w układach z fazami ruchomymi zawierającymi 70 i 90% [V/V] rozpuszczalnika organicznego. Badania przeprowadzono w kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym modyfikowanym grupami aminowymi. Temperaturę zmieniano w zakresie od 20 do 50°C, natomiast objętościowe natężenie przepływu eluentów w zakresie 0,05 do 3 [cm³/min]. Otrzymane zależności wykazały istotny wpływ zarówno składu fazy ruchomej jak i temperatury na mechanizm retencji związków testowych. Wykazano także wysoką sprawność kolumny w przypadku badanych układów.

Słowa kluczowe: Chromatografia oddziaływań hydrofilowych, retencja, faza ruchoma, równanie van't Hoffa, zależność van Deemtera

Retention behavior of selected test compounds using column filled with silica gel modified by amine groups

Abstract: In this work, the influence of the composition of mobile phase and temperature on the retention process of three test compounds: caffeine, quercetin and phenol in hydrophilic interaction chromatography (HILIC) were analyzed. The overall efficiency of the column for the tested compounds was also determined in eluent systems with 70 and 90% [V/V] of organic modifier. The tests were carried out using column filled with the stationary phase being silica gel modified by amine groups. Temperature was varied in the range from 20 to 50°C, while the flow rate was set in the range from 0.05 to 3 [cm³/min]. The obtained dependences showed a significant influence of both the composition of the mobile phase and temperature on the retention mechanism of the test chemicals. High efficiency of the column in the investigated systems was also confirmed.

Keywords: Hydrophilic interaction liquid chromatography, retention, mobile phase, van't Hoff equation, Van Deemter's dependence

1. Wstęp (Introduction)

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC) jest obecnie jedną z częściej stosowanych technik analizy związków polarnych. Stanowi ona alternatywę dla innych metod chromatograficznych takich jak chromatografia w normalnym (NPLC) oraz odwróconym układzie faz (RPLC) zapewniając dodatkowe możliwości separacji mieszanin [1, 2]. HILIC jest szeroko stosowana w analizie białek, cukrów, pestycydów, aminokwasów itp. [2-4]. Do zalet HILIC można zaliczyć: możliwość stosowania szerokiego wachlarza metod detekcji (np. spektrometrii mas (MS)), wysoką selektywność, oraz sprawność rozdzielania związków [1, 5].

1.1. Fazy stacjonarne i ruchome w HILIC (*HILIC stationary and mobile phases*)

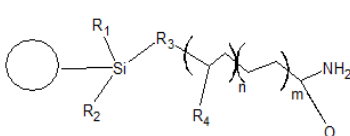
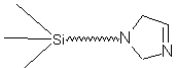
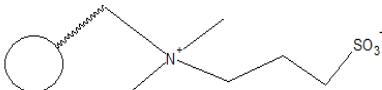
W HILIC wykorzystywane są polarne fazy stacjonarne [6]. Jedną z najpopularniejszych jest niemodyfikowany żel krzemionkowy stosowany między innymi w oznaczeniach bioanalitycznych [7, 8]. Adsorbent ten może też stanowić nośnik różnorodnych grup funkcyjnych [4]. Większość modyfikowanych chemicznie faz stacjonarnych syntezowanych jest właśnie na bazie żelu krzemionkowego. Wprowadzane grupy funkcyjne można podzielić w zależności od ładunku na fazy obojętne, fazy z ładunkiem i fazy dwubiegunowe (zwitterjonowe). Do faz obojętnych zalicza się adsorbenty modyfikowane grupami amidowymi, nitylowymi oraz diolowymi. Fazy obdarzone ładunkiem zawierają grupy aminowe, poliaminowe, imidiazolowe oraz triazolowe. Fazy dwubiegunowe stanowią nową klasę polarnych faz stacjonarnych. Tego typu adsorbenty zawierają zarówno silnie kwaśne grupy kwasu sulfonowego jak i silnie zasadowe grupy amoniowe, oddzielone krótkimi łańcuchami alkilowymi. Ich zastosowanie umożliwia równoczesne rozdzielanie analitów anionowych i kationowych [9]. Przykładowe fazy stacjonarne stosowane w HILIC zestawiono w Tabeli 1. Fazy ruchome w HILIC stanowią roztwory zawierające zwykle 60–95% rozpuszczalnika organicznego w wodzie [8]. Preferowanym rozpuszczalnikiem organicznym w HILIC jest acetonitryl. Stosowanie innych rozpuszczalników często nie zapewnia dostatecznej retencji analitów, a ponadto uzyskiwane w takich układach piki chromatografowanych związków są zwykle zbyt szerokie lub niesymetryczne. Odnosi się to w szczególności do metanolu, który podobnie jak woda, jest rozpuszczalnikiem protonowym, powodującym konkurencyjność w solwatacji powierzchni polarnej fazy stacjonarnej oraz silne, wzajemne oddziaływania wiązań wodorowych. W mniejszym stopniu dotyczy to innych alkoholi, np. etanolu czy propan-2-olu [8].

Mechanizm retencji w chromatografii oddziaływań hydrofilowych stanowi przedmiot intensywnych badań wielu zespołów badawczych. Jeden z pierwszych proponowanych mechanizmów retencji w HILIC zakłada, że wodna część fazy ruchomej adsorbuje się na powierzchni polarnej fazy stacjonarnej (polarnych ligandów) w postaci cienkiej warstwy, w obrębie której następuje podział analitu pomiędzy tę warstwę i organiczną część fazy ruchomej [10]. Wielu autorów wskazuje także, że istotny wpływ na przebieg tego procesu, szczególnie przy użyciu eluentów o niskiej zawartości wody, mogą mieć również różnego typu oddziaływania adsorpcyjne oraz oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne [8, 11, 12]. Ponadto, w przypadku związków jonizujących, czynnikiem wpływającym na mechanizm retencji może być także wymiana jonowa [5]. Względny udział poszczególnych mechanizmów i oddziaływań związanych z konkretnym przypadkiem procesu HILIC zależy od trzech ważnych czynników: warunków chromatograficznych, rodzaju i właściwości fazy stacjonarnej oraz efektów związanych ze strukturą i własnościami analitu. W rezultacie uzyskiwany obraz mechanizmu retencji w HILIC wydaje się być bardzo złożony [6].

Celem niniejszej pracy była analiza mechanizmu retencji w aminowej kolumnie Purospher STAR NH₂ (długość 125 [mm], średnica 4 [mm], średnica ziarna 5 [μm]). W tym celu przebadano wpływ składu fazy ruchomej oraz temperatury na proces retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu. Dokonano także oceny sprawności testowanej kolumny. Badania przeprowadzono w układach zawierających acetonitryl jako organiczny składnik fazy ruchomej.

Tabela 1. Przykładowe fazy stacjonarne stosowane w chromatografii HILIC [8, 13].

Table 1. Examples of stationary phases used in HILIC [8, 13].

Nazwa fazy (Phase name)	Struktura grupy funkcyjnej (Structure of the functional group)	Typ fazy (Phase type)
Amidowa (amide)		Obojętne (Neutral)
Imidiazolowa (imidazole)		Naładowana (Charged)
Sulfobetaina (sulfobetaine)		Dwubiegunowa (Bipolar)

1.2. Wpływ temperatury na retencję w chromatografii cieczowej – równanie van't Hoff'a (*The influence of temperature on retention in liquid chromatography – van't Hoff equation*)

Zmiany temperatury mają istotny wpływ na selektywność i efektywność chromatograficznego rozdzielania mieszanin, ponieważ wpływają na lepkość fazy ruchomej, współczynniki dyfuzji chromatografowanych związków oraz na ich oddziaływania z fazą stacjonarną. Badania wpływu temperatury na proces retencji umożliwiają ponadto ocenę mechanizmu retencji w rozpatrywanych układach [5, 6, 13]. Wpływ temperatury na proces retencji analizowany jest zwykle w oparciu o wykres van't Hoff'a (zależność $\ln k = f(1/T)$). Wykres ten wykonuje się na podstawie wartości współczynników retencji, k chromatografowanego związku, wyznaczanych dla możliwie szerokiego zakresu zmian temperatury kolumny. W sposób teoretyczny, temperatura fazy ruchomej, T , oraz współczynnik retencji analitu, k , powiązane są ze sobą równaniem van't Hoff'a [14, 15]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln F \quad (1)$$

gdzie: ΔH [J/mol] oraz ΔS [J/mol·K] – odpowiednio zmiany entalpii i entropii związane z przejściem chromatografowanego związku od fazy ruchomej do fazy stacjonarnej, $R = 8,314$ [J/mol·K] – stała gazowa, $F = \frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t}$ – stosunek faz, ε_t – porowatość całkowita złoża.

Liniowy przebieg zależności $\ln k = f(1/T)$ wskazuje zwykle na dominujący wpływ pojedynczego mechanizmu na proces retencji. Natomiast przebiegi nieliniowe oznaczają zwykle zmianę mechanizmu retencji lub pojawienie się w globalnym mechanizmie retencji dodatkowych sił (np. wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych i/lub elektrostatycznych) wpływających na przebieg tego procesu [16-18]. Praktycznie we wszystkich rodzajach chromatografii cieczowej, w zależności od układu chromatograficznego, obserwuje się zarówno liniowe, jak i nieliniowe przebiegi wykresu van't Hoff'a. W głównej mierze świadczą to o złożoności mechanizmu retencji w chromatografii cieczowej, na który wpływają zarówno własności fizykochemiczne składników układu chromatograficznego (analitu, fazy stacjonarnej i ruchomej) jak i wzajemne oddziaływania między nimi.

1.3. Sprawność kolumny chromatograficznej (*The efficiency of the chromatography column*)

Sprawność kolumny chromatograficznej determinuje kształt piku chromatograficznego, a tym samym istotnie wpływa na jakość separacji analizowanych związków chemicznych. Sprawność kolumny określa się wysokością równoważną półce teoretycznej WRPT (*ang.* Height Equivalent to Theoretical Plate, HETP). Półkę teoretyczną definiuje się natomiast jako wysokość warstwy wypełnienia (adsorbentu) w kolumnie, na której ustala się równowaga adsorpcyjna pomiędzy fazą ruchomą, a stacjonarną zgodnie z wartością współczynnika podziału K . Na poszerzenie pasma chromatograficznego mają wpływ zasadniczo trzy czynniki [19]:

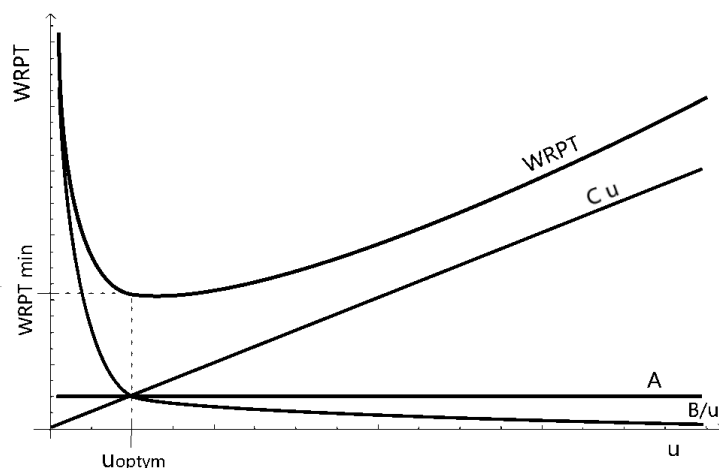
- dyfuzja wirowa, zależna od wypełnienia kolumny,
- dyfuzja wzdłużna, (dyfuzja cząsteczkowa) w fazie ruchomej,
- opory przenoszenia masy.

W 1956 roku van Deemter zaproponował zależność łączącą ze sobą WRPT, kinetykę procesu rozdziału chromatograficznego oraz liniową prędkość przepływu eluentu [19, 20]:

$$WRPT = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2)$$

gdzie: A – określa dyfuzję wirową, B – dyfuzję molekularną w fazie ruchomej, C – opory przenoszenia masy, u – prędkość liniową fazy ruchomej.

Minimum powyższej funkcji dla prędkości $u = u_{\text{optym}}$ odpowiada maksymalnej sprawności kolumny/układu chromatograficznego. Schematyczną, graficzną interpretację zależności van Deemtera przedstawiono na rysunku 1.



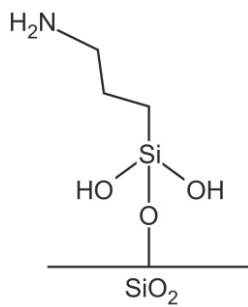
Rys.1. Graficzna interpretacja składowych równania van Deemtera oraz ich sumy (WRPT) w funkcji prędkości liniowej eluentu.

Fig. 1. Graphic interpretation of van Deemter's equation components and their sum (HETP) as a function of eluent linear velocity.

2. Część eksperymentalna (Experimental part)

2.1. Zakres badań (Scope of research)

Badania wykonano w warunkach izokratycznych w układach wodno – acetonitrylowych z kolumną aminową Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂. Fazę stacjonarną w tej kolumnie stanowi jednocząsteczkowa warstwa aminopropylsilanu chemicznie związana z porowatym nośnikiem w postaci żelu krzemionkowego (schemat struktury otrzymany od producenta (Merck) przedstawiono na rysunku 2). Wyznaczono zależność wpływu stężenia wody w eluencie na wartości współczynników retencji *k* trzech testowych związków chemicznych: kofeiny, kwercetyny i fenolu. Dla wymienionych związków oraz dla wybranych składów fazy ruchomej wyznaczono także zależności van't Hoffa i van Deemtera.



Rys.2. Schemat struktury fazy stacjonarnej w kolumnie Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂.

Fig. 2. Scheme of stationary phase structure in the Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂ column.

2.2. Materiały (Materials)

W badaniach zastosowano następujące rozpuszczalniki oraz testowe związki chemiczne:

- Acetonitryl, wyprodukowany przez firmę Merck, czystość $\geq 99,9\%$,
- Woda destylowana,
- Kofeina, wyprodukowana przez Fluka Analytical, czystość $\geq 99,0\%$,
- Kwercetyna, wyprodukowana przez CHEMAL, czystość $\geq 99,0\%$,
- Fenol, wyprodukowany przez SIGMA – ALDRICH, czystość $>99,5\%$.

Badania prowadzono w kolumnie firmy Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂, której fazę stacjonarną stanowi krzemionka modyfikowana grupami aminowymi. Wyznaczony metodą piknometryczną czas retencji inerty wynosił $t_0 = 1,193$ [min]. Odczytane z chromatogramu wartości czasu retencji (mierzonego jako czas wyjścia maksimum pików) korygowano przez odjęcie czasu martwego przewodów $t_d = 0,08$ [min], który został doświadczalnie wyznaczony dla stosowanej aparatury i warunków procesowych.

2.3. Aparatura (Instruments)

Badania wykonano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego Primaide firmy Merck–Hitachi (Niemcy). W aparat składał się z następujących urządzeń:

- pompa eluentu, model 1110,
- termostat kolumnowy, model 1310,
- detektor UV, model 1410.

Pracą chromatografu sterował program D-7000 HSM firmy Merck, przy pomocy którego rejestrowano oraz zapisywano na twardym dysku komputera wyniki eksperymentów.

2.4. Metodyka badań eksperymentalnych (Methodology of experimental research)

Pomiary wpływu składu fazy ruchomej na oraz temperatury na retencję badanych analitów wykonywano w warunkach izokratycznych, przy ustalonym natężeniu przepływu fazy ruchomej (1 [cm³/min]). Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny wodno-acetonitrylowe. Stężenie badanych związków chemicznych wynosiło 20 [µg/cm³]. Roztwory analitów były sporządzane w odpowiednich eluentach. Temperaturę zmieniano co 5°C w zakresie od 20 do 50°C. Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 [µL]. Detekcję pików prowadzono przy długości fali 250 [nm].

Wartości entalpii ΔH i entropii ΔS w równaniu van't Hoff'a (1) wyznaczono metodą regresji liniowej na podstawie doświadczalnie otrzymanych zależności $\ln k = f(1/T)$. Dokładność dopasowania określano na podstawie współczynnika determinacji R^2 .

Sprawność kolumny analizowano na podstawie wykresów van Deemtera dla trzech wymienionych powyżej związków stosując fazy ruchome złożone z acetonitrylu i wody dla dwóch stężeń rozpuszczalnika organicznego (70% i 90% V/V). Badania prowadzono w temperaturze 20°C dla natężeń przepływu eluentu wynoszących: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40, 0,50, 0,65, 0,80, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 oraz 3,0 [cm³/min]. Objętość dozowania oraz stężenia próbek były takie same jak przedstawione powyżej. Wysokość równoważną półce teoretycznej (WRPT) wyznaczano na podstawie pierwszego i drugiego momentu centralnego otrzymanego piku chromatografowanego związku [21-23]. W obliczeniach uwzględniono efekty dyspersyjne powodujące dodatkowe poszerzenie piku, związane z przepływem płynu przez kapilary umieszczone przed i za kolumną chromatograficzną (analogicznie jak powyżej, ale bez kolumny chromatograficznej).

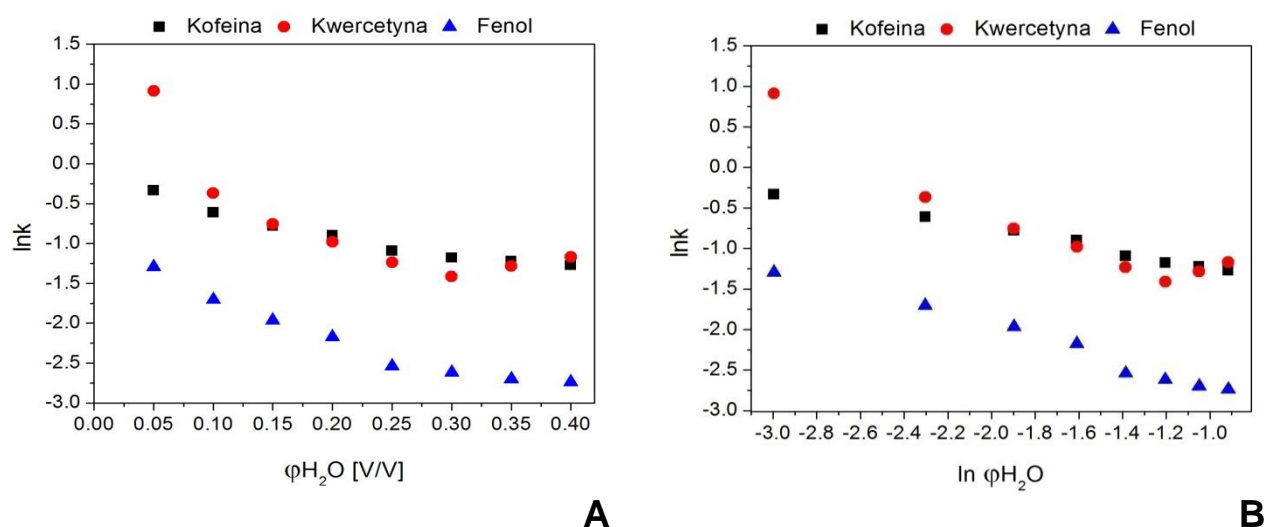
3. Wyniki i ich dyskusja (Results and discussion)

3.1. Wpływ składu fazy ruchomej na retencję (Effect of mobile phase composition on retention)

Na rysunku 3 przedstawiono zależności $\ln k$ dla kofeiny, kwercetyny i fenolu, w funkcji ułamka objętościowego wody w eluencie, φ (rys. 3A) oraz zależności $\ln k = f(\ln(\varphi))$ (rys. 3B) dla tych związków chemicznych w analizowanych układach chromatograficznych. Dla wszystkich testowanych analitów obserwuje się nieliniowe zależności $\ln k = f(\varphi)$ oraz $\ln k = f(\ln(\varphi))$, z tym że dla kwercetyny zależności te są dodatkowo U-kształtne. Zgodnie z teorią Soczewińskiego – Snydera [24, 25], liniowa zależność $\ln k = f(\varphi)$ wskazuje na dominujący podziałowy mechanizm retencji, natomiast liniowa zależność $\ln k = f(\ln(\varphi))$ sugeruje adsorpcyjny mechanizm retencji. Przedstawione na rysunku 3 zależności są nieliniowe, co wskazuje, że w badanych układach mechanizm retencji stanowi kombinację mechanizmu podziałowego oraz adsorpcyjnego. W eluentach bogatych w wodę (tryb RPLC) przeważać mogą oddziaływania typu hydrofobowego (mechanizm podziałowy). Z kolei w eluentach zawierających duże stężenia rozpuszczalnika organicznego (tryb HILIC), dominować może mechanizm adsorpcyjny, w którym istotną rolę odgrywać mogą różnego typu oddziaływania polarne (np. wiązania wodorowe i inne o charakterze elektrostatycznym) [8]. Innymi słowy, adsorpcja powierzchniowa wywołana przez oddziaływania polarne może współistnieć z mechanizmem podziałowym w obrębie warstewki wody wytworzonej na powierzchni ligandów testowanej fazy stacjonarnej.

Wniosek ten jest zgodny z teorią Hemströma i Irguma [11], według której mechanizm retencji (szczególnie w HILIC) jest kombinacją mechanizmów adsorpcyjnego i podziałowego w różnych proporcjach, zależnych od natury fazy stacjonarnej, właściwości analitu oraz składu eluentu. Ze względu na obecność na powierzchni testowanej fazy stacjonarnej łańcuchów alkilowych (umożliwiających zatrzymywanie cząsteczek analitu przez oddziaływania hydrofobowe) mechanizm podziałowy powinien do pewnego stopnia determinować retencję kwercetyny i fenolu w badanych układach (szczególnie w trybie RPLC), tym bardziej, że związki te wykazują własności hydrofobowe (dla kwercetyny $\log P_{o/w}=2,16$, dla fenolu $\log P_{o/w}=1,67$). Kofeina jest najbardziej hydrofilową cząsteczką spośród badanych analitów ($\log P_{o/w}=-0,55$) i w trybie HILIC jej retencja jest prawdopodobnie kontrolowana przez hydrofilowy mechanizm podziałowy. Z drugiej strony kofeina jest dość masywną cząsteczką ($M = 194$ [g/mol]), która może być zatrzymana w bogatych w wodę eluentach, w wyniku oddziaływań hydrofobowych. Warto też zauważyć, że wszystkie badane związki mają zauważalny potencjał do tworzenia wiązań wodorowych, więc tego rodzaju interakcje (szczególnie w trybie HILIC) mogą również wpływać na ich retencję.

Przedstawiony powyżej mechanizm należy oczywiście traktować jako hipotezę wymagającą potwierdzenia w dalszych badaniach obejmujących szersze spektrum układów chromatograficznych.



Rys. 3. Zależności współczynnika retencji od ułamka objętościowego wody w fazie ruchomej: A – $\ln k = f(\phi)$, B – $\ln k = f(\ln(\phi))$.

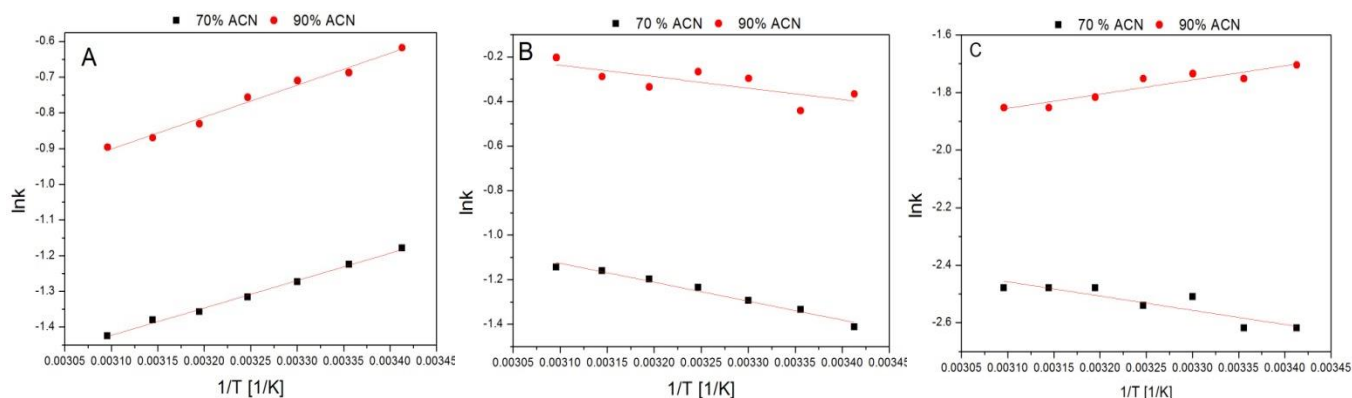
Fig. 3. The dependence of the retention coefficient on the volume fraction of water in the mobile phase: A – $\ln k = f(\phi)$, B – $\ln k = f(\ln(\phi))$.

3.2. Wpływ temperatury na retencję (Influence of temperature on retention)

Zależność współczynnika retencji od temperatury ($\ln k = f(1/T)$) dla analizowanych związków chemicznych przedstawiono na rysunku 4. Wartości entalpii ΔH i entropii adsorpcji ΔS , obliczone z równania van't Hoffa, oraz współczynniki determinacji R^2 zestawiono w tabeli 2. Uzyskane wyniki wskazują na egzotermiczny charakter procesu sorpcji dla kofeiny. Świadczą o tym otrzymane doświadczalne zależności, a także wyznaczone na tej podstawie wartości entalpii ΔH i entropii ΔS . W przypadku kwercetyny, doświadczalne przebiegi zależności $\ln k = f(1/T)$ wskazują na endotermiczny charakter procesów sorpcji, a więc wzrost retencji wraz ze wzrostem temperatury. Przyczyną tego zjawiska może być dominujący udział mechanizmów adsorpcyjnych w ogólnym mechanizmie retencji. W przypadku fenolu uzyskane wyniki pokazują, że dla eluentu zawierającego 90% acetonitrylu procesy sorpcji mają charakter egzotermiczny, natomiast dla przypadku 70% udziału modyfikatora organicznego wyraźniej przejawia się charakter endotermiczny. Wskazuje to na udział dodatkowych oddziaływań, wpływających na ogólny mechanizm retencji.

Analiza otrzymanych doświadczalnie przebiegów zależności współczynnika retencji k od temperatury wskazuje, iż w większości przypadków przebiegi te mają charakter liniowy. Wysokie wartości współczynnika determinacji R^2 wskazują na dominację podziałowego mechanizmu retencji dla kofeiny. W przypadku kwercetyny oraz fenolu odstępstwa od liniowości wskazują na złożoność mechanizmów retencji, ze względu na możliwość występowania dodatkowych oddziaływań. W przypadku nieliniowych zależności van't Hoffa zaobserwowano, że zarówno entalpia ΔH , jak i entropia ΔS zmieniają się wraz z temperaturą. Zmiany te mogą być spowodowane: (i) przechodzeniem, wraz ze wzrostem temperatury, jednego mechanizmu retencji w drugi, (ii) konformacją ligandów związanych z matrycą krzemionkową lub (iii) zależną od temperatury zmiennością grubości warstwy zaadsorbowanej części fazy ruchomej. Dodatkowo, wymienione powyżej

efekty mogą się na siebie nakładać. Na koniec należy także zauważyć, że nieliniowe przebiegi zależności van't Hoffa nie muszą być spowodowane zmianami entalpii i entropii, lecz zmieniającą się wraz z temperaturą dostępnością porów fazy stacjonarnej (i tym samym zmianami wartości stosunku faz, F). Tym nie mniej, przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dotyczących wpływu składu eluentu oraz wpływu temperatury świadczą o dość skomplikowanym mechanizmie retencji kwercetyny w analizowanych układach.



Rys. 4. Zależności van't Hoffa dla związków testowych (A – kofeina, B – kwercetyna, C – fenol).
Fig. 4. Van't Hoff's dependencies for test compounds (A – caffeine, B – quercetin, C – phenol).

Tabela 2. Zmiany entalpii ΔH [kJ/mol] i entropii ΔS [J/mol·K] (regresja liniowa na podstawie równania van't Hoffa) dla analizowanych układów chromatograficznych.

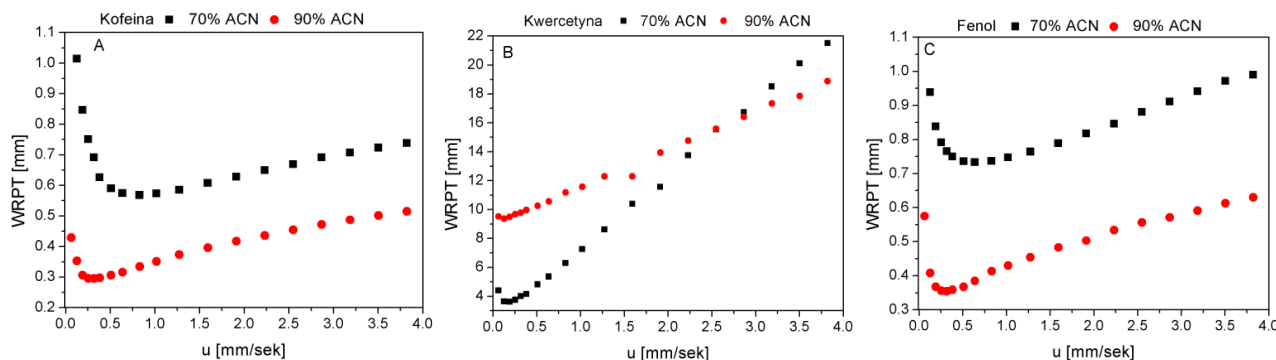
Table 2. Enthalpy ΔH [kJ/mol] and entropy ΔS [J/mol·K] changes of solute transfer (regression results from van't Hoff equation) for the analyzed chromatographic systems.

Analit (Analyte)	ACN – woda 70:30			ACN – woda 90:10		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]	R^2	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]	R^2
Kofeina (Caffeine)	-6,37	-31,6	0,995	-7,43	-30,53	0,982
Kwercetyna (Quercetin)	7,06	12,53	0,970	4,25	11,22	0,500
Fenol (Phenol)	4,11	-7,64	0,761	-4,09	-28,11	0,863

3.3. Sprawność kolumny (Column efficiency)

Zależności van Deemtera dla wszystkich analizowanych układów przedstawiono na rysunku 5. Porównując wpływ składu fazy ruchomej, można stwierdzić, iż dla kofeiny oraz fenolu lepszą sprawność osiąga się dla układów bogatszych w modyfikator organiczny. W przypadku kwercetyny lepszą sprawność kolumny osiąga się z kolei dla układu zawierającego 70% acetonitrylu w eluencie.

Dla wszystkich badanych układów, testowana kolumna osiąga najlepszą sprawność dla prędkości przepływu z zakresu 0,1 – 0,75 [mm/s]. W przypadku układów z kofeiną oraz fenolem sprawność spada w nieznacznym stopniu wraz ze wzrostem liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej. Odmienne zależności obserwuje się w przypadku kwercetyny, gdzie występuje spadek sprawności wraz ze wzrostem prędkości przepływu eluentu.



Rys. 5. Zależności wpływu prędkości przepływu eluentu na WRPT dla związków testowych (A – kofeina, B – kwercetyna, C – fenol).

Fig. 5. The effects of mobile phase linear velocity on HETP of test compounds (A – caffeine, B – quercetin, C – phenol).

4. Wnioski (Conclusions)

W niniejszej pracy zbadano wpływ składu fazy ruchomej, temperatury oraz prędkości przepływu na proces retencji kwercetyny, kofeiny i fenolu w chromatografii oddziaływań hydrofilowych w kolumnie firmy Merck Purospher STAR NH₂. Wyniki badań prowadzonych w układach z chemicznie różnymi analitami testowymi wskazują na występowanie złożonego adsorpcyjno – podziałowego mechanizmu retencji. Badania wpływu temperatury na retencję testowanych związków wskazują, że w testowanej kolumnie, dla szerokiego zakresu temperatur i w zależności od własności fizykochemicznych analitu, sorpcja może mieć zarówno charakter egzotermiczny, jak i endotermiczny. Obserwowane nieliniowe zależności van't Hoffa mogą także wskazywać na zmienność i/lub złożoność mechanizmu retencji w testowanych układach. Analizując uzyskane zależności van Deemtera stwierdzono istotny wpływ składu fazy ruchomej na sprawność badanej kolumny. Stwierdzono, że największą sprawność dla kofeiny i fenolu można uzyskać stosując fazy ruchome zawierające 90% acetonitrylu. Z kolei dla kwercetyny najlepsze efekty obserwuje się dla eluentu zawierającego 70% acetonitrylu. Jednocześnie, optymalne warunki pracy pod względem prędkości przepływu fazy ruchomej występują w zakresie 0,1 – 0,75 [mm/sek].

5. Literatura (Literature)

- [1] A. J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, J. Chromatogr. A, 499, (1990) 177-196.
- [2] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402, (2012) 231-247.
- [3] J. Bernal, A. M. Ares, J. Pól, S. K. Wiedmer, *Hydrophilic interaction chromatography in food analysis*. J. Chromatogr. A. 1218, (2011) 7438-7452.
- [4] G. Kahsay, H. Song, A. V. Schepdael, D. Cabooter, E. Adams, *Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics*, J. Chromatogr. A, 87, (2014) 142-145.
- [5] D. V. McCalley, *Study of the selectivity, retention mechanism and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 3408-3417.
- [6] Y. Guo, S. Gaiki, *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1218, (2011) 5920-5938.
- [7] N. Weng, *Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases*, J. Chromatogr. B, 796, (2003) 209-224.
- [8] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review*. Anal. Chem. Acta., 692, (2011) 1-25.
- [9] Y. Guo, S. Gaiki, *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1074, (2005) 71-80.
- [10] T. Yoshida, *Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review*, J. Biochem. Biophys. Methods, 60, (2004) 265-280.
- [11] P. Hemström, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, J. Sep. Sci, 29, (2006) 1784-1821

- [12] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *HILIC methods in pharmaceutical analysis*, *J. Sep. Sci.*, 33 (6–7), (2010) 698–715.
- [13] M. A. Strega, *Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery*, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2439.
- [14] W. Melander, D. E. Campbell, C. Horvath, *Enthalpy-entropy compensation in reversed-phase chromatography*, *J. Chromatogr.* 158, (1978) 215–225.
- [15] A. Tchapla, S. Heron, H. Cohn, G. Guiochon, *Role of temperature in the behavior of a homologous series in reversed phase liquid chromatography*, *Anal. Chem.*, 60, (1988) 1443–1448.
- [16] F. Gritti, G. Guiochon, *Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, 1099, (2005) 1–42.
- [17] J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmann, M. R. Schure, *Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective*, *Anal. Chem.*, 79, (2007) 6551–6558.
- [18] E. Lundanes, T. Greibrokk, *Temperature effects in liquid chromatography*, *Adv. Chromatogr.*, 44, (2006) 45–77.
- [19] F. Gritti, G. Guiochon, *The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, 1302, (2013) 1–13.
- [20] J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg and A. Klinkenberg, *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography*, *Chem. Eng. Sci.*, 5, (1956) 271–289.
- [21] F. Gritti, G. Guiochon, *Speed-resolution properties of columns packed with new 4.6 μm Kinetex-C18 core-shell particles*. *J. Chromatogr. A*, 1280, (2013) 35–50.
- [22] P. Stevenson, F. Gritti, G. Guiochon, *Automated methods for the location of the boundaries of chromatographic peaks*, *J. Chromatogr. A*, 1218, (2011) 8255–8263.
- [23] F. Gritti, G. Guiochon, *Accurate measurements of peak variances: Importance of this accuracy in the determination of the true corrected plate heights of chromatographic columns*, *J. Chromatogr. A*, 1218, (2011) 4452–4461.
- [24] E. Soczewiński, C. A. Wachtmeister, *The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values*, *J. Chromatogr. A*, 7, (1962) 311–320.
- [25] L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Gant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I Theoretical basis for reversed-phase systems*, *J. Chromatogr. A*, 165, (1979) 3–30.