



Akademia Medyczna w Gdańsku
Wydział Farmaceutyczny

Michał Piotr Marszał

**Zastosowanie cieczy jonowych do tłumienia oddziaływań
silanofilowych w chromatografii ciekowej**

**Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biofarmacji
i Farmakodynamiki Akademii Medycznej w Gdańsku**

Promotor pracy:

prof. dr hab. Roman Kaliszan, czł. koresp. PAN

**Praca została wykonana przy wsparciu finansowym
Komitetu Badań Naukowych: projekt badawczy nr 2 PO5F 018 26**

Gdańsk 2006

Spis najważniejszych publikacji, w których wykorzystano wyniki pracy doktorskiej:

1. R. Kaliszan, M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, T. Bączek, J. Pernak, Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 263.
2. M.J. Markuszewski, P. Stepnowski, M.P. Marszał, Capillary electrophoretic separation of cationic constituents of imidazolium ionic liquids, *Electrophoresis*, 25 (2004) 3450.
3. M.P. Marszał, T. Bączek, R. Kaliszan, Reduction of silanophilic interaction in liquid chromatography with the use of ionic liquids, *Anal. Chim. Acta*, 547 (2005) 172.
4. T. Bączek, M.P. Marszał, R. Kaliszan, Ł. Walijewski, W. Makowiecka, B. Sparzak, Z. Grzonka, K. Wiśniewski, P. Juszczak, *Biomed. Chromatogr.*, 19 (2005) 1.
5. M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, Separation of nicotinic acid and its structural isomers using 1-ethyl-3-methylimidazolium ionic liquid as a buffer additive by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, przyjęto do druku.
6. M.P. Marszał, T. Bączek, R. Kaliszan, Evaluation of the silanol suppressing potency of ionic liquids, *J. Sep. Sci.*, przyjęto do druku.

Spis treści

1. Wstęp	5
1.1. Ciecze jonowe	6
1.1.1. Właściwości fizyczne i chemiczne cieczy jonowych	7
1.1.2. Zastosowanie cieczy jonowych	10
1.2. Oddziaływania silanofilowe w aspekcie chromatografii związków zasadowych metodą HPLC	10
1.2.1. Modyfikacje krzemionkowych faz stacjonarnych	12
1.2.2. Modyfikacje fazy ruchomej	14
1.3. Chromatograficzna miara hydrofobowości	17
1.4. Wpływ temperatury na retencję związków zasadowych	17
1.5. Ciecze jonowe jako inhibitory oddziaływań silanofilowych w chromatografii cieczowej	19
1.6. Ciecze jonowe jako modyfikatory w chromatografii gazowej (GC)	22
1.7. Ciecze jonowe jako modyfikatory w elektroforezie kapilarnej (CE)	25
1.8. Metody analityczne stosowane w celu identyfikacji cieczy jonowych	28
1.9. Wyznaczanie skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych modyfikatorów fazy ruchomej w HPLC	29
1.9.1. Metoda Horvátha – dwuparametrowy model retencji	29
1.9.2. Metoda Sokolowskiego-Wahlunda	33
2. Cel pracy	35
3. Część doświadczalna	36
3.1. Analiza związków zasadowych metodą TLC	36
3.1.1. Aparatura i materiały	36
3.1.2. Odczynniki chemiczne	36
3.1.3. Procedura TLC oraz wyznaczenie parametrów chromatograficznych	37
3.2. Analiza związków zasadowych metodą HPLC	39
3.2.1. Aparatura i odczynniki chemiczne	39
3.2.2. Pomiary chromatograficzne	40
3.3. Analiza izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego metodą CE	46
3.3.1. Aparatura i materiały	46
3.3.2. Odczynniki chemiczne	46
3.3.3. Dobór warunków analitycznych	47

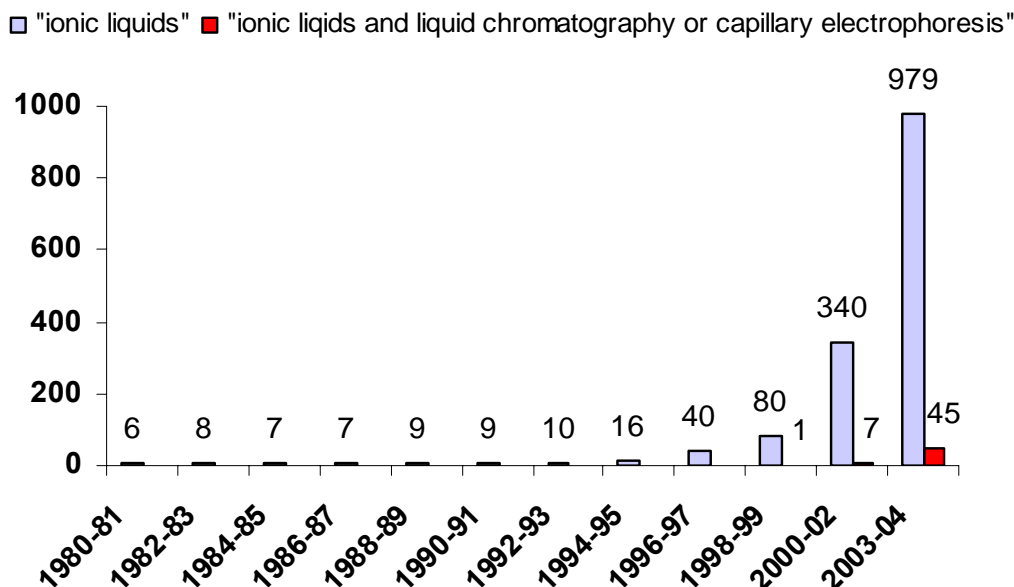
3.3.4. Wyznaczanie parametrów elektroforetycznych.....	47
3.4. Analiza cieczy jonowych metodą CE	50
3.4.1. Aparatura i materiały	50
3.4.2. Odczynniki chemiczne.....	50
3.4.3. Dobór warunków analitycznych	51
4. Wyniki i dyskusja	54
4.1. Analiza związków zasadowych metodą TLC	54
4.2. Analiza związków zasadowych metodą HPLC	63
4.2.1. Wpływ metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego na retencję zasad w HPLC	63
4.2.2. Wpływ pH na skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez metylosiarczan 1,3-dimetyloimidazoliowy.....	66
4.2.3. Wpływ temperatury na retencję związków zasadowych w HPLC z zastosowaniem metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej.....	66
4.2.4. Wyznaczanie hydrofobowości metodą HPLC z użyciem tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej	70
4.2.5. Analiza porównawcza skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych przez imidazoliowe ciecze jonowe z wykorzystaniem dwuparametrowego modelu retencji Horvátha.....	71
4.3. Wpływ tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego na zachowanie elektroforetyczne izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego	73
4.4. Analiza cieczy jonowych metodą CE	80
5. Wnioski.....	83
6. Streszczenie	85
7. Summary	86
8. Podziękowania	87
9. Piśmiennictwo.....	88

1. Wstęp

Rozwój chemii w XX wieku doprowadził do wielu spektakularnych sukcesów wpływając jednocześnie na rozwój nowych dziedzin nauk przyrodniczych związanych z chemią, takich jak farmacja, biochemia czy biotechnologia. Z drugiej strony, przyczynił się w znacznym stopniu do degradacji środowiska naturalnego. W latach 60-tych XX wieku stan środowiska naturalnego stał się przedmiotem powszechnego zainteresowania. W roku 1969 po raz pierwszy oficjalnie przedstawiono w raporcie ONZ potrzebę ochrony środowiska w skali globu. Jednak dopiero w roku 1991 została wprowadzona koncepcja zielonej chemii (*green chemistry*) przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska. Dotyczy ona nowego podejścia do różnych dziedzin chemii, nie tylko związanych z syntezą czy przeróbką związków chemicznych, ale również chemii analitycznej poprzez eliminację lub redukcję ilości odczynników i rozpuszczalników używanych w toku procedury analitycznej.

Mimo, że zsyntezowanie pierwszej cieczy jonowej nastąpiło już w okresie I Wojny Światowej, dopiero w ostatniej dekadzie XX wieku cieczami jonowymi zainteresował się przemysł chemiczny, nazywając je „zielonymi” rozpuszczalnikami [1]. Obecnie są w centrum zainteresowania jako medium zastępcze dla lotnych rozpuszczalników organicznych określanymi mianem VOC (*Volatile Organic Compounds*). Dzięki unikatowym właściwościom fizykochemicznym zastosowanie cieczy jonowych wzrasta z roku na rok, głównie w technologii chemicznej związków organicznych i biotechnologii. Wskazuje na to liczba publikacji dostępna w bazie bibliograficzno-abstraktowej SCOPUS (rycina 1) [2]. Uwagę zwraca gwałtowny wzrost stosowania cieczy jonowych w technikach separacyjnych, takich jak chromatografia ciekłowa (*liquid chromatography*, LC) i elektroforeza kapilarna (*capillary electrophoresis*, CE). Ma to ogromne znaczenie szczególnie w przypadku wysokosprawnej chromatografii ciekłowej (*high performance liquid chromatography*, HPLC), której stosowanie wiąże się ze znacznym zużyciem eleuentów – rozpuszczalników. Konieczna staje się modyfikacja lub wprowadzenie nowych technik analitycznych odpowiadających wymogom „zielonej chemii” [3]. Prawdopodobnie, wyeliminowanie pośrednio uciążliwych dla środowiska naturalnego metod analitycznych poprzez zastosowanie „zielonej chemii analitycznej” jest kwestią czasu.

Nowoczesne fazy stacjonarne do HPLC bazują na krzemionce. Przydatność tlenu



Rycina 1. Liczba publikacji indeksowanych w bazie bibliograficzno-abstraktowej SCOPUS w latach 1980-2004, zawierających w tytule lub abstrakcie słowa kluczowe „ionic liquids” oraz „ionic liquids and liquid chromatography or capillary electrophoresis”.

krzemu w chromatografii cieczowej zależy od rodzaju i ilości powierzchniowych grup hydroksylowych – silanolowych. Problemem utrudniającym rozdzielanie analizowanych związków są specyficzne oddziaływania analitów z niezwiązanymi, wolnymi grupami silanolowymi nośników fazy stacjonarnej. W celu dezaktywacji tych grup wprowadza się do faz ruchomych dodatki typu alkiloamin. Proces ten jednak nie pozwala na uzyskanie dobrych rozdzieleń, zwłaszcza związków zasadowych. Ponieważ większość leków to leki o charakterze zasadowym, więc trudności analityczne dotyczą dużej liczby leków. Dotychczas stosowane modyfikacje technik chromatografii cieczowej nie obejmowały użycia cieczy jonowych. Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia wyniki pionierskich badań dotyczących chromatograficznych rozdzieleń ksenobiotyków zasadowych z zastosowaniem cieczy jonowych jako modyfikatorów fazy ruchomej [4].

1.1. Ciecze jonowe

Ciecze jonowe (*ionic liquids*) są solami organicznymi, które stanowią nową klasę rozpuszczalników o charakterze jonowym. Nazwa ta jest bardziej adekwatna od nazwy „*room temperature ionic liquids*”, gdyż wiele z nowo zsyntezowanych cieczy topi się w temperaturze kilkudziesięciu stopni Celsjusza, czyli w temperaturze pokojowej występują jako ciała stałe. W przeciwieństwie do cieczy jonowych, jedną z najbardziej

charakterystycznych cech soli nieorganicznych jest ich bardzo wysoka temperatura topnienia. W przypadku chlorku sodu wynosi 801 °C. Koszt utrzymania takiej substancji w stanie ciekłym jest wysoki, co praktycznie wyklucza zastosowanie jako rozpuszczalnika dla związków organicznych, gdyż w takich warunkach ulegałyby one zwęgleniu. Dlatego ciecze jonowe jako nowa klasa soli organicznych stanowią najbardziej interesującą grupę związków chemicznych, często nazywanych związkami XXI wieku.

Pierwszymi zsyntezowanymi cieczami jonowymi były czwartorzędowe sole amoniowe [1]. Jednak dopiero synteza pochodnych 1,3-dialkylimidazoli zaowocowała licznymi publikacjami dotyczącymi ich potencjalnego zastosowania. Grupy cieczy jonowych, z którymi przemysł chemiczny wiąże szczególne nadzieje przedstawione są w tabeli 1.

1.1.1. Właściwości fizyczne i chemiczne cieczy jonowych

Ze względu na prostą budowę chemiczną synteza cieczy jonowych nie jest skomplikowana. Problemem pozostaje tylko właściwy wybór jonów, aby uzyskać ciecz jonową o pożądanych właściwościach fizycznych i chemicznych. Dlatego ciecze jonowe często nazywane są rozpuszczalnikami projektowanymi (*designer solvents*).

Dzięki różnej strukturze chemicznej oraz kompozycji kation/anion, ciecze jonowe charakteryzują się zmiennymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi, nawet w obrębie tej samej grupy. Wszystkie są solami zbudowanymi z dużego, asymetrycznego kationu organicznego oraz anionu organicznego lub nieorganicznego, których wielkość i rodzaj w istotny sposób wpływa na właściwości, takie jak gęstość, lepkość, napięcie powierzchniowe oraz temperatura topnienia (tabela 2).

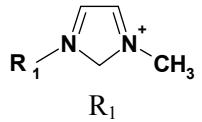
Ciecze jonowe są związkami nielotnymi, charakteryzującymi się znikomo niską prężnością par, dobrą zdolnością do rozpuszczania zarówno związków organicznych jak i nieorganicznych oraz dużą stabilnością termiczną, nawet do 300°C. Do najbardziej stabilnych cieczy jonowych zalicza się pochodne imidazoliowe z następującymi anionami: $\text{BF}_4^- > \text{PF}_6^-$, $\text{AsF}_6^- > \text{Cl}^-$, Br^- , I^- . Sali 1,3-alkylimidazoliowych o symetrycznej budowie atomu, takich jak sole dibutyłowe lub dioktyłowe, nie spotyka się w stanie ciekłym.

Obecność podstawników alkilowych w strukturze kationu nadaje cieczom jonowym charakter hydrofobowy. Polarny charakter cieczy zdeterminowany jest przez elektrostatyczne siły wzajemnych oddziaływań między anionem a kationem. Istotne są także powszechnie występujące w rozpuszczalnikach organicznych międzycząsteczkowe

Tabela 1. Struktury cieczy jonowych najczęściej stosowanych w przemyśle chemicznym.

Kation	Anion
$\begin{array}{c} \text{R}_4 \\ \\ \text{R}_1-\text{N}^+-\text{R}_3 \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$ <p>Czwartorzędowe sole alkiloamoniowe</p>	<p>AlCl_4^- Tetrachloroglinian</p>
$\begin{array}{c} \text{R}_4 \\ \\ \text{R}_1-\text{P}^+-\text{R}_3 \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$ <p>Sole alkilofosfoniowe</p>	<p>$\text{Br}^- \text{Cl}^- \text{I}^-$ Halogenki</p>
$\begin{array}{c} \text{R}_3 \\ \\ \text{R}_1-\text{S}^+-\text{R}_2 \end{array}$ <p>Sole alkilosulfoniowe</p>	<p>CH_3COO^- Octan</p>
$\begin{array}{c} \text{R}_3 \\ \\ \text{R}_1-\text{N}^+-\text{R}_2 \end{array}$ <p>Sole alkilopirolidyniowe</p>	<p>PF_6^- Heksafluorofosforan</p>
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \quad \text{R}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{N}^+ \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}_2 \end{array}$ <p>Sole alkiloimidazoliowe</p>	<p>SCN^- Tiocyjanian</p>
$\begin{array}{c} \text{R}_3 \\ \\ \text{R}_2 \text{---} \text{C}_5\text{H}_3 \text{---} \text{R}_4 \\ \\ \text{N}^+ \\ \\ \text{R}_1 \end{array}$ <p>Sole alkilopirydyniowe</p>	<p>$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ bis(trifluorometylosulfonylo)imid</p>
	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-$ <p>Tosylan</p>

Tabela 2. Temperatura topnienia [°C] soli 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych w zależności od wielkości podstawnika R₁ i rodzaju anionu [5,6].

 R ₁	Anion					
	AlCl ₄ ⁻	BF ₄ ⁻	Cl ⁻	CF ₃ SO ₃ ⁻	(CF ₃ SO ₂)N	PF ₆ ⁻
CH ₃ -	75	-	125	39	22	-
C ₂ H ₅ -	7	5	84	-9	-3	62
C ₃ H ₅ -	-	-13,9	60	-	-	11
C ₄ H ₇ -	-10	-82	65	16	-10	-61
C ₆ H ₁₁ -	-	-81	-75	>-30	-	-80

oddziaływania dyspersyjne i tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomami wodoru w pierścieniu imidazoliowym a atomami tlenu lub fluorowca anionu. Należy ponadto uwzględnić oddziaływania typu π - π w przypadku kationów zawierających pierścień aromatyczny [7].

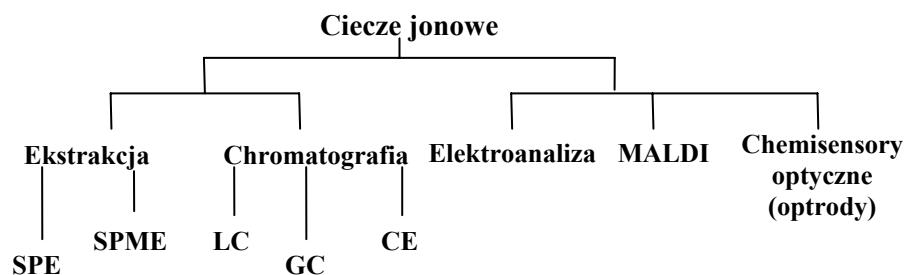
Hydrofobowość kationu oraz rodzaj anionu mają istotny wpływ na rozpuszczalność cieczy jonowych. W wodzie całkowicie rozpuszczają się sole: BF₄⁻, Br⁻, CF₃SO₃⁻, CH₃COO⁻, CH₃SO₄⁻, C₂H₅SO₄⁻, Cl⁻, (CN)₂N⁻, I⁻, NO₃⁻, NO₅⁻, SCN⁻. Natomiast praktycznie nierozpuszczalne są sole PF₆⁻, SbF₆⁻ oraz (CF₃SO₂)₂N⁻. Większość cieczy jonowych jest stabilna na powietrzu i w kontakcie z wodą.

Zależność przewodności od długości podstawnika nie zawsze jest monotoniczna a dostępne dane nie pozwalają na formułowanie jednoznacznych prawidłowości [8]. Najwyższą przewodność elektryczną spośród wszystkich cieczy jonowych, wynikającą prawdopodobnie z braku wiązań wodorowych, mają pochodne AlCl₄⁻. Przypuszcza się, iż obecność tych wiązań jest przyczyną niskiej przewodności innych pochodnych cieczy jonowych. Przewodność soli 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych wzrasta wraz ze zmianą anionu w kolejności: BF₄⁻ < PF₆⁻ < CF₃SO₃⁻ < CF₃CO₂⁻ < AlCl₄⁻. Efekt ten jest wyraźnie zauważalny w przypadku mieszanin cieczy jonowych z rozpuszczalnikami organicznymi. Przewodność elektryczna mieszaniny soli 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych z acetonitrylem wzrasta kilkukrotnie w porównaniu do czystego acetonitrylu [9].

1.1.2. Zastosowanie cieczy jonowych

Zainteresowanie cieczami jonowymi ze względu na unikatowe właściwości wciąż wzrasta. Z roku na rok podejmuje się coraz więcej badań mających na celu wykorzystanie cieczy jonowych w przemyśle chemicznym. Udowodniono, że wykorzystanie tych związków w wielu reakcjach chemicznych znacznie obniża koszty procesów chemicznych, i co najważniejsze obniża stopień degradacji środowiska naturalnego. Badania prowadzone w zakresie technologii chemicznej związków organicznych potwierdziły, że użycie cieczy jonowych pochodnych 1,3-dialkylimidazoliowych w znaczny sposób wpływa na wydajność oraz regio-, stereo- i enancjoselektywność reakcji Friedla-Craftsa, Dielsa-Aldera, Hecka, alkilowania, oraz epoksydacji związków cyklicznych [10]. Coraz powszechniejsze staje się stosowanie soli imidazoliowych w enancjoselektywnych reakcjach z udziałem enzymów [11,12]. Obiecujące rezultaty przyniosły badania mikrobiologiczne z wykorzystaniem cieczy jonowych, wykazujące znaczne działanie bakterio- i grzybobójcze pochodnych imidazoliowych z podstawnikiem alkoksymetylowym [13, 14].

Obecnie ciecze jonowe postrzegane są jako priorytetowy produkt „zielonej chemii”, a współczesne badania mają na celu poszerzyć ich zastosowanie również w dziedzinie chemii analitycznej (rycina 2) [15].



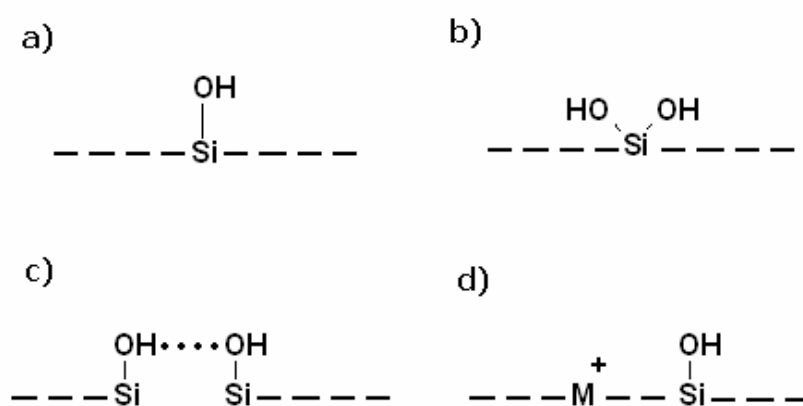
Rycina 2. Przykłady zastosowania cieczy jonowych w chemii analitycznej.

1.2. Oddziaływania silanofilowe w aspekcie chromatografii związków zasadowych metodą HPLC

Nowoczesne fazy stacjonarne do HPLC bazują na krzemionce. Ważną cechą determinującą chemiczne właściwości krzemionki jest obecność na jej powierzchni grup hydroksylowych, tzw. grup silanolowych. Grupy silanolowe stanowią główne źródło

oddziaływań z analizami fazy stacjonarnej bazującej na krzemionce w chromatografii w normalnym układzie faz. Są natomiast przeszkodą w przypadku hydrofobowych faz stacjonarnych (w chromatografii w tzw. odwrotnym układzie faz). Powierzchniowe grupy hydroksylowe mają bardzo silne właściwości polarne oraz są potencjalnymi donorami i akceptorami wiązań wodorowych.

Badania spektrofotometryczne wykazały obecność na powierzchni żelu krzemionkowego różnych typów powierzchniowych grup hydroksylowych, odgrywających rolę jako centra adsorpcji (rycina 3) [16,17]. O adsorpcyjnych

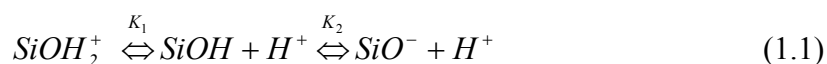


Rycina 3. Schemat przedstawiający różne typy grup silanolowych na powierzchni żelu krzemionkowego:

a) wolne grupy silanolowe, b) podwójne grupy silanolowe (geminalne), c) zaasocjowane grupy silanolowe, d) aktywne centrum metal-grupa silanolowa [16].

właściwościach żelu krzemionkowego decyduje rodzaj i ilość grup silanolowych [18]. W chromatografii najbardziej pożądanymi grupami są silanole podwójne oraz zaasocjowane. Wolne grupy hydroksylowe, ze względu na słaby charakter kwasowy, stwarzają największy problem w przypadku rozdzielania związków o charakterze zasadowym. Głównym mechanizmem determinującym retencję zasad jest wymiana jonowa. Obejmuje ona interakcje z silanolami oraz z metalami, które mogą występować w śladowych ilościach w strukturze fazy stacjonarnej.

Powierzchniowe oddziaływania jonowymienne silanoli tłumaczy model zaproponowany przez Yatesa i in. [19, 20]:



gdzie K_1 i K_2 są stałymi jonizacji.

Aby dokładnie zrozumieć proces wymiany jonowej konieczne jest opisanie parametrów charakteryzujących ten mechanizm: pK_a silanoli oraz punktu ładunku zerowego (*point of zero charge*, PZC). PZC jest to wartość pH, w którym liczba dodatnio naładowanych miejsc $SiOH_2^+$ jest równa liczbie miejsc naładowanych ujemnie SiO^- na powierzchni krzemionki i wynosi:

$$pH_{PZC} = 0,5(pK_{a1} + pK_{a2}) \quad (1.2)$$

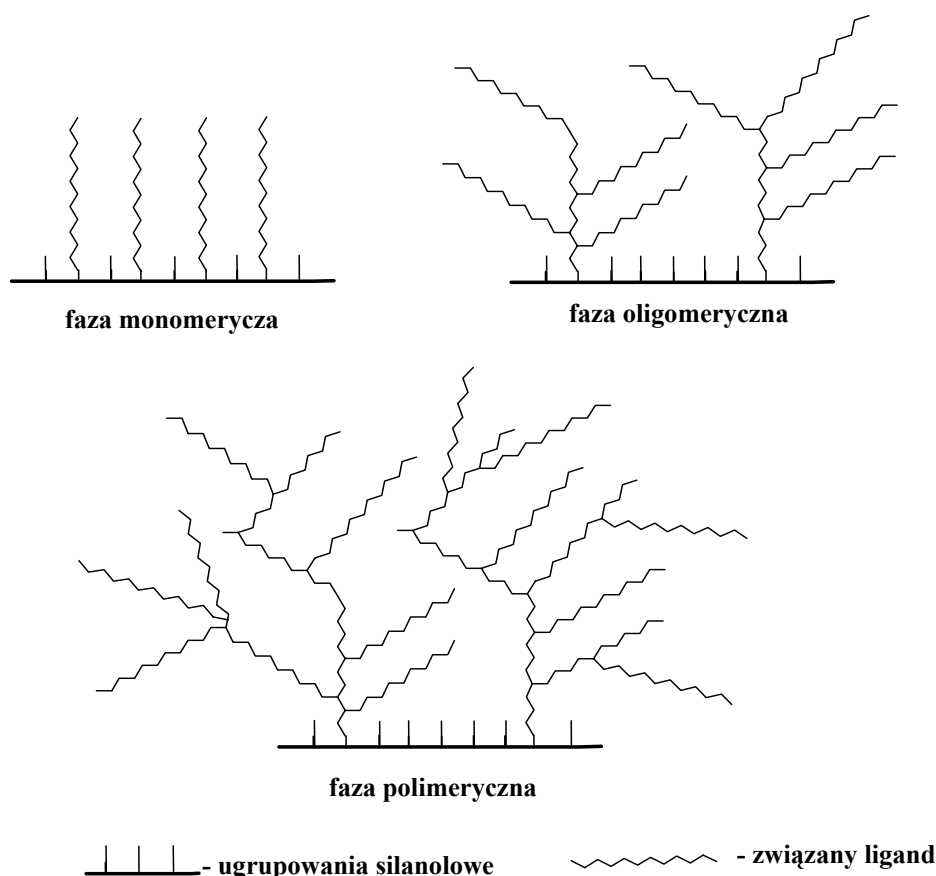
W przypadku, kiedy $pH < pK_{a1}$, tlenek krzemu będzie zachowywał się jak wymiennicz anionowy. Natomiast przy $pH > pK_{a2}$ będzie działał jak wymiennicz kationowy. Ponieważ wartość pH_{PZC} dla tlenku krzemu oscyluje wokół 4 (choć osiąga nawet wartości poniżej 2) oznacza to, że SiO_2 będzie działał jak wymiennicz kationowy [21,22]. W niektórych przypadkach nawet zastosowanie buforu o pH 2 nie powoduje cofnięcia dysocjacji silanoli, a powierzchnia krzemionki przyjmuje ładunek ujemny. Wyznaczona teoretycznie wartość pK_a silanoli wynosi $7,1 \pm 0,5$ [23]. Jednak znaczna liczba doniesień wskazuje na to, iż ze względu na zmienną kompozycję krzemionki, wartość ta może wahać się w zakresie 1,5-10. Szczególnie obecność metali może w znaczny sposób podwyższyć charakter kwasowy krzemionki. Dlatego stosowanie fazy ruchomej o pH 2-3 w przypadku rozdzielenia analitów zasadowych w chromatografii cieczowej nie zawsze jest skuteczne [24].

Redukcja oddziaływań silanofilowych jest możliwa dzięki odpowiednim modyfikacjom fazy stacjonarnej oraz ruchomej.

1.2.1. Modyfikacje krzemionkowych faz stacjonarnych

Badania mające na celu redukcję oddziaływań silanofilowych prowadzone są na szeroka skalę. Początkowo redukcję wolnych grup silanolowych próbowano osiągnąć poprzez termiczną aktywację oraz rehydroksylację krzemionki. Cox i Stout [25] oraz Köhler i Kirkland [26] zauważyli znaczną różnicę w parametrach retencyjnych analitów uzyskanych na rehydroksylowanej krzemionce z zastosowaniem niektórych czwartorzędowych zasad amoniowych, amin oraz fluorowodoroków. Ponadto, proces rehydroksylacji krzemionki usuwał śladowe ilości metali z powierzchni krzemionki.

Obecnie szczególne znaczenie mają wypełnienia otrzymane poprzez modyfikację żelu krzemionkowego. Najprostszą modyfikowaną fazą stacjonarną jest faza o pokryciu monomerycznym uzyskana przez przyłączenie monofunkcyjnego modyfikatora (rycina 4). Fazy oligomeryczne i polimeryczne charakteryzują się dużym stopniem dezaktywacji silanoli, jednak ze względu na złożoną strukturę ich synteza jest skomplikowana.



Rycina 4. Rodzaje chemicznie związanych faz stacjonarnych do HPLC.

Do krzemionki na zasadzie wiązania kowalencyjnego przyłącza się grupy węglowodorowe, nadające fazom stałym charakter hydrofobowy. Fazę związaną alkilosilanową otrzymuje się poprzez wiązanie eterowe lub siloksanowe alkilochlorosilanów z powierzchniowymi grupami hydroksylowymi krzemionki. Najczęściej stosowana jest faza oktadecylosilanowa, w której pozostałe po modyfikacji grupy silanolowe można dezaktywować (*end-capping*) trimetylochlorosilanem (TMCS). Jednak nawet najlepsze procedury syntezy tak zwanych faz odwróconych pozostawiają około 40-50 % wolnych silanoli [16].

Modyfikację faz krzemionkowych można również przeprowadzić poprzez silanizację związkami krzemoorganicznymi zawierającymi grupy polarne. Związane silany

zawierające grupy aminowe bądź peptydowe posiadają ładunek, który na powierzchni krzemionki tworzy tak zwaną tarczę ochronną (*electrostatic shielding*) [27]. Jeżeli posiada ładunek dodatni, odpycha dodatnie naładowane kwasy Brönsteda, chroniąc je przed działaniami wolnych silanoli. Wykazano, że grupy amidowe ułatwiają adsorpcję wody, a w przypadku krótkich łańcuchów alkiloamidowych znacznie obniżają retencję związków polarnych, takich jak aminy [28].

Koncepcja *self-assembled monolayers* (SAM) jest metodą stosowaną w celu modyfikacji powierzchni metali oraz tlenków metali. Wykorzystuje ona zdolność krzemionki do adsorpcji związków organicznych mających zdolność formowania jednorodnej powierzchni. Woda zaadsorbowana na powierzchni krzemionki ułatwia proces polimeryzacji organosilanów [29]. Horyzontalna polimeryzacja silanów tworzy barierę, redukującą wymianę jonową pomiędzy silanolami a fazą ruchomą [30].

Alternatywą dla faz krzemionkowych są fazy stacjonarne bazujące na tlenku cyrkonu, tytanu i glinu [31]. Charakteryzują się one większą stabilnością termiczną i chemiczną wynikającą z odmiennej struktury powierzchni tlenków metali w stosunku do krzemionki. Dodatkowo, nowe nośniki, szczególnie tlenki cyrkonu, osiągają podobną, a czasami lepszą sprawność, dzięki czemu charakteryzują się lepszą selektywnością.

1.2.2. Modyfikacje fazy ruchomej

W celu optymalizacji rozdzielenia chromatograficznych jednym z głównych kryteriów jest dobór eluentu. W chromatografii cieczowej jako fazę ruchomą stosuje się rozpuszczalniki, które muszą charakteryzować się odpowiednią lepkością, czystością, małą toksycznością oraz niskim kosztem. Stosując detekcję UV-VIS nie należy stosować eluentu absorbującego promieniowanie w tym samym zakresie, co cząsteczki rozdzielanych substancji.

Dobór fazy ruchomej do rozdzielania mieszanin ułatwia zaproponowany przez Snydera szereg eluotropowy [16]. Jest to zbiór rozpuszczalników stosowanych w chromatografii adsorpcyjnej uporządkowany według wzrastającej siły elucyjnej. Wielkość siły elucyjnej fazy ruchomej może być regulowana nie tylko poprzez zmianę rozpuszczalnika, ale również poprzez mieszanie rozpuszczalników w różnych proporcjach.

Dodatek organicznego modyfikatora do fazy ruchomej znacząco wpływa na kształt piku analizowanych związków zasadowych oraz na sprawność kolumny chromatograficznej [32,33]. Najczęściej stosowanym organicznym składnikiem eluentu jest acetonitryl, który charakteryzuje się niską lepkością oraz absorbancją przy niskich

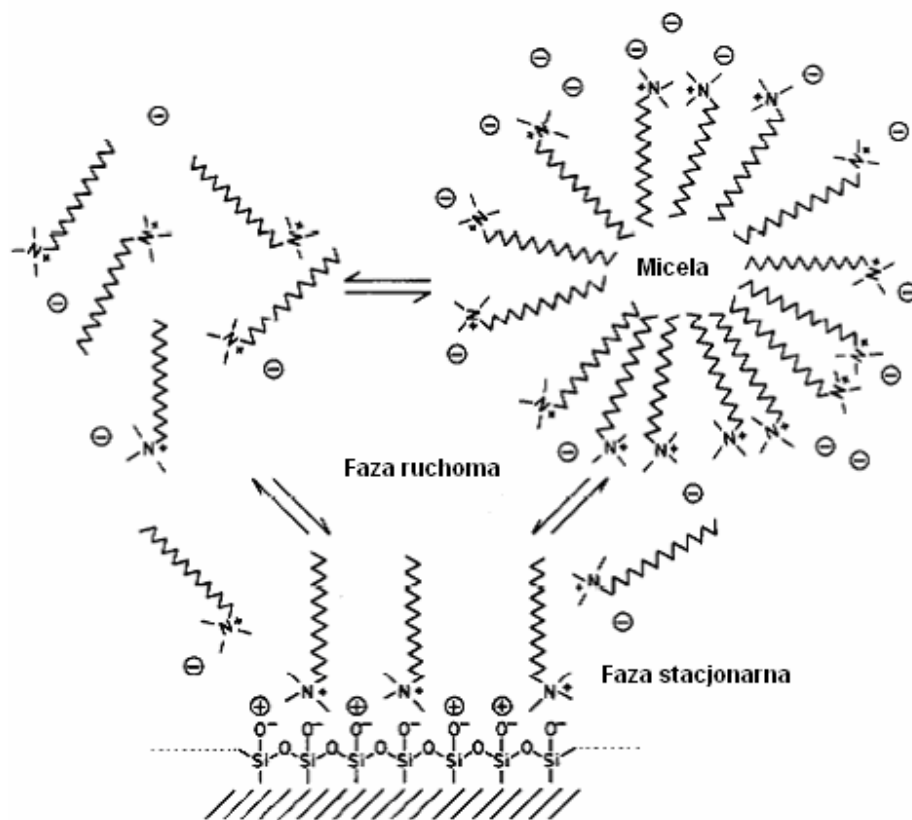
długościach fali w zakresie UV. Stosując acetonitryl otrzymuje się lepszą selektywność oraz symetrię pików. Zjawisko to tłumaczy się brakiem możliwości powstawania wiązań wodorowych z wolnymi silanolami, jak również możliwością interakcji z grupami alkilowymi nośnika [34]. Dodatkowo, acetonitryl jest rozpuszczalnikiem łagodniejszym od metanolu i tetrahydrofuranu: hamuje rozkład krzemionki w $\text{pH} > 9$ [35].

W celu poprawienia sprawności kolumny oraz selektywności metody separacyjnej stosuje się buforowane fazy ruchome mając na celu zmianę pH eluentu. Fazy buforowane wpływają na zmianę dysocjacji analizowanych związków jak również powierzchniowych grup hydroksylowych fazy stacjonarnej. W literaturze naukowej istnieje wiele sprzecznych opinii odnośnie warunków chromatografowania związków zasadowych na złożach krzemionkowych [36,37]. Większość kolumn bazujących na krzemionce jest stabilna w kwaśnym i neutralnym pH , jednak w takim środowisku zasady ulegają protonowaniu i silnie reagują z powierzchniowymi grupami silanowymi krzemionki. Część publikacji podtrzymuje słuszność obniżenia pH fazy ruchomej do wartości $\text{pH} < \text{p}K_a$ silanoli w celu cofnięcia dysocjacji silanoli. Niektórzy autorzy jako optymalne warunki rozdzielania sugerują podwyższoną wartość $\text{pH} > \text{p}K_a$ zasady w celu deprotonacji zasad. Jednak w przypadku skrajnych wartości pH dochodzi do destrukcji kolumny chromatograficznej. W $\text{pH} < 3$ zachodzi hydroliza wiązania siloksanowego między powierzchnią krzemionki a organosilanami. W $\text{pH} > 8$ ma miejsce częściowe wymywanie fragmentów nośnika krzemionkowego.

Stosując buforory wodno-organiczne trzeba pamiętać, że pH fazy ruchomej powinno uwzględniać wartość ^spH , czyli pomiar powinien być przeprowadzony na odpowiedniej mieszance wodno-organicznej względem wzorcowego roztworu zawierającego taką samą ilość danego modyfikatora organicznego. W praktyce mierzy się wartość ^wpH , czyli dla układu wodno-organicznego pomiar pH wykonywany jest względem buforów standardowych, niezawierających modyfikatora organicznego.

Metoda zaproponowana przez Hansena i in. [38,39] określana jest jako dynamiczna modyfikacja krzemionki. Jest prosta w użyciu i można ją stosować w przypadku modyfikowanych oraz niemodyfikowanych faz krzemionkowych do rozdzielania analitów kwasowych, zasadowych oraz związków niejonogennych. Polega na dodaniu do fazy ruchomej czwartorzędowych soli amoniowych w ilości potrzebnej do przekroczenia krytycznego stężenia micelizacji (*critical micellar concentration*, CMC). Po przekroczeniu tej wartości ustala się trójfazowa równowaga w układzie chromatograficznym: pojedyncza

warstwa zaadsorbowanego modyfikatora na fazie stacjonarnej, rozpuszczone cząsteczki w fazie ruchomej oraz micela (rycina 5).



Rycina 5. Schemat przedstawiający trójfazową równowagę w układzie chromatograficznym z użyciem bromku cetylotrimetyloamoniowego [39].

Warunkiem micelizacji modyfikatora jest nie tylko istnienie grupy hydrofilowej i hydrofobowej, ale również spełnienie odpowiednich wymogów sterycznych. Proces ten zachodzi z łatwością dla cząsteczek posiadających długie pojedyncze łańcuchy alkilowe. Nie prowadzi natomiast do tworzenia się micel, gdy grupy niepolarne są silnie rozgałęzione.

Systematyczne badania nad wpływem rzędowości modyfikatorów aminowych na parametry chromatograficzne dowiodły, że aminy czwartorzędowe efektywniej hamują retencję związków zasadowych oraz poprawiają kształt pików [40,41]. Powyższe działanie amin czwartorzędowych Kiel i in. [40] tłumaczą wspólnymi mechanizmami oddziaływań, którymi charakteryzują się obydwie grupy związków wobec krzemionki (wymiana jonowa, wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe). Do zalet tego typu modyfikatorów zalicza się również możliwość spektrofotometrycznej detekcji analizowanych związków przy długości fali 200-254 nm oraz możliwość użycia detektora fluorescencyjnego lub elektrochemicznego [39].

1.3. Chromatograficzna miara hydrofobowości

Hydrofobowość często określa się jako rodzaj „nietolerancji” środowiska wodnego dla danego związku. Jest to ważny czynnik wpływający na stopień rozprzestrzeniania się ksenobiotyków oraz innych związków chemicznych w układach biologicznych. Właściwości hydrofobowe danego związku są wypadkowym efektem jego oddziaływań międzycząsteczkowych z cząsteczkami otoczenia, tzn. oddziaływań orientacyjnych, indukcyjnych i dyspersyjnych, wiązania wodorowego oraz przeniesienia ładunku [42]. Najczęściej stosowanym układem w wyznaczaniu standardowego parametru hydrofobowości, $\log P$, jest układ podziałowy *n*-oktanol-woda [43].

Coraz bardziej powszechne staje się wyznaczanie hydrofobowości za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz RP HPLC [44]. Chromatograficzny parametr hydrofobowości, $\log k_w$, uzyskiwany jest poprzez ekstrapolację liniowej zależności $\log k$ od zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Podstawą takiej ekstrapolacji jest liniowa zależność Snydera-Soczewińskiego między $\log k$ a ułamkiem objętościowym modyfikatora w fazie wodno-organicznej, φ :

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (1.3)$$

gdzie *S* jest stałą charakterystyczną dla danego analitu oraz układu chromatograficznego.

Często dla protonowanych zasad, niektórych faz stacjonarnych oraz rozpuszczalnika wchodzącego w skład binarnej fazy ruchomej innego niż metanol, zależność między $\log k$ i procentem modyfikatora jest nieliniowa [45]. Efekt ten jest między innymi spowodowany występowaniem wolnych grup silanolowych w fazach stacjonarnych bazujących na krzemionce. W celu usunięcia nieliniowości modyfikuje się fazę ruchomą poprzez zmianę siły jonowej i pH buforu oraz dodatek modyfikatorów alkiloaminowych: trietyloaminy, dimetyloktetyloaminy czy decyloaminy [46].

1.4. Wpływ temperatury na retencję związków zasadowych

Temperatura jest ważnym parametrem, wpływającym na selektywność układów chromatograficznych, szczególnie w przypadku rozdzielania związków ulegających dysocjacji. Zmiana w obrębie tego parametru wpływa na stopień dysocjacji oraz wartość pK_a analitów i pH fazy ruchomej, a w konsekwencji doprowadza do zmiany mechanizmu

retencji chromatografowanych związków. Aby efektywnie wykorzystać wpływ temperatury wymagana jest znajomość podstawowych czynników opisanych wzorem:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (1.4)$$

gdzie: K – stała dysocjacji danego związku chemicznego

ΔH° – zmiana entalpii reakcji dysocjacji związku

ΔS° – zmiana entropii reakcji dysocjacji związku

R – stała gazowa

T – temperatura bezwzględna.

Równanie izobary Van't Hoffa opisuje liniową zależność półlogarytmiczną stałej dysocjacji dowolnego związku chemicznego od odwrotności temperatury bezwzględnej [47]. Współczynnik kierunkowy prostej, a , pozwala obliczyć zmianę entalpii dla reakcji dysocjacji danego związku:

$$a = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (1.5)$$

Duża dodatnia wartość entalpii reakcji dysocjacji jest dowodem na silne zwiększanie szybkości tego procesu ze wzrostem temperatury. Zmianę entropii wylicza się poprzez wyznaczenie wartości przecięcia osi rzędnych przez izobarę Van't Hoffa, b :

$$b = \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (1.6)$$

W przypadku zjonizowanej zasady zwiększenie entropii dostarcza energii do reakcji przekształcenia jej w formę niezdysoncjowaną.

Zależność logarytmu współczynnika retencji, $\ln k$, od odwrotności temperatury bezwzględnej, T , w chromatografii przedstawia zależność:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (1.7)$$

gdzie: ΔH° – zmiana entalpii procesu chromatograficznego

ΔS° – zmiana entropii procesu chromatograficznego

ϕ – stosunek fazowy dla zastosowanego układu chromatograficznego.

Zależność (1.7) pozwala na obserwowanie ewentualnych zmian termodynamicznych w trakcie procesu chromatograficznego. Liniowy przebieg tej zależności świadczy o stałym mechanizmie retencji w zakresie badanych temperatur [48].

W przypadku związków obojętnych wpływ temperatury na retencję jest mniejszy. Dla kwasów i zasad powodem większej zmienności retencji związków jest zmiana ich wartości pK_a wraz ze zmianą temperatury, co przedstawia równanie [49]:

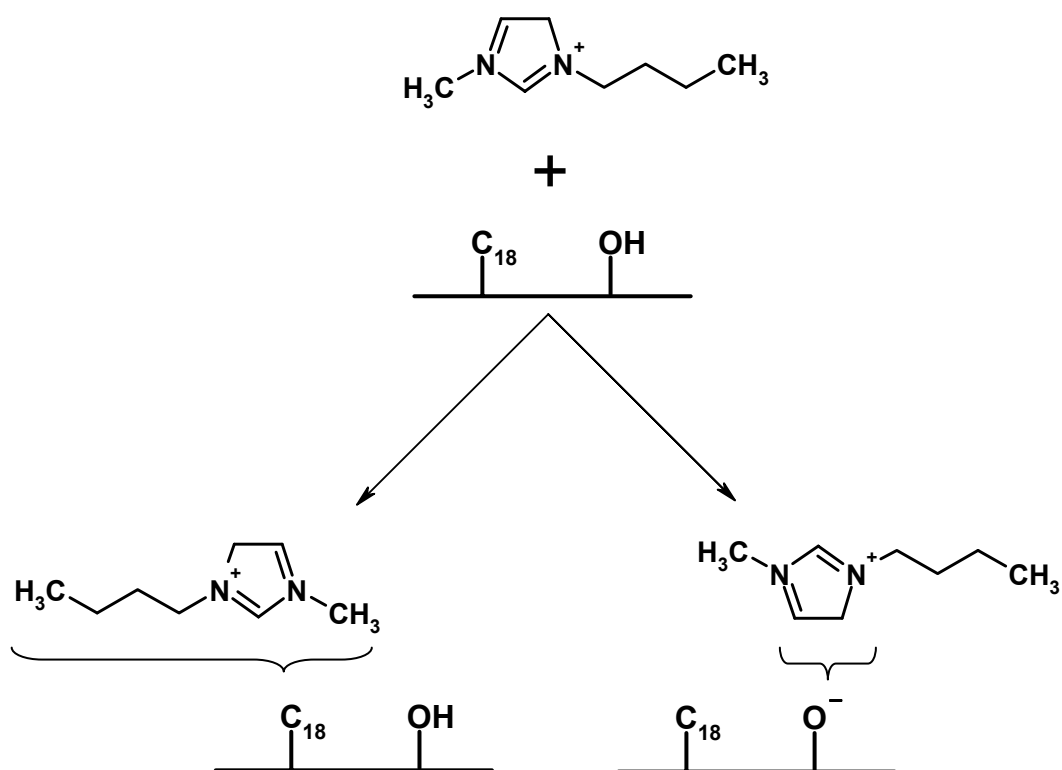
$$-\frac{d(pK_a)}{dT} = \frac{(pK_a - 0,9)}{T} \quad (1.8)$$

Zgodnie z równaniem (1.8) wzrost temperatury obniża wartość pK_a , tym bardziej im mocniejsza jest zasada. Nieliniowe wykresy Van't Hoffa spowodowane są zmianą wartości pK_a chromatografowanych związków w różnych temperaturach, i w konsekwencji, zmianą ich retencji, zdeterminowanej zmiennymi oddziaływaniami z fazą stacjonarną [48].

1.5. Ciecze jonowe jako inhibitory oddziaływań silanofilowych w chromatografii ciekowej

Pierwsze publikacje na temat zastosowania cieczy jonowych w chromatografii ciekowej ukazały się w latach 2004-2005 [4,50]. Powstały one w wyniku badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej. Badane ciecze jonowe okazały się skutecznymi modyfikatorami fazy ruchomej tłumiącymi szkodliwe oddziaływanie silanofilowe. Inhibicja oddziaływań silanofilowych umożliwiła lepszą optymalizację chromatograficznych oznaczeń ksenobiotyków zasadowych.

Mechanizm tłumienia oddziaływań silanofilowych polega na blokowaniu wolnych grup hydroksylowych na powierzchni krzemionki (rycina 6). Wpływ na stopień adsorpcji cieczy jonowej na powierzchni krzemionki ma długość podstawnika alkilowego pierścienia imidazoliowego oddziaływującego z grupami alkilowymi fazy stacjonarnej [51]. Pierwszymi cieczami jonowymi zastosowanymi w Katedrze i Zakładzie Biofarmacji i Farmakodynamiki Akademii Medycznej w Gdańsku w TLC i HPLC były pochodne 1-alkilo- oraz 1-alkoksymetylo-3-alkiloimidazoliowe, zsyntezowane przez zespół profesora Juliusza Pernaka z Politechniki Poznańskiej.

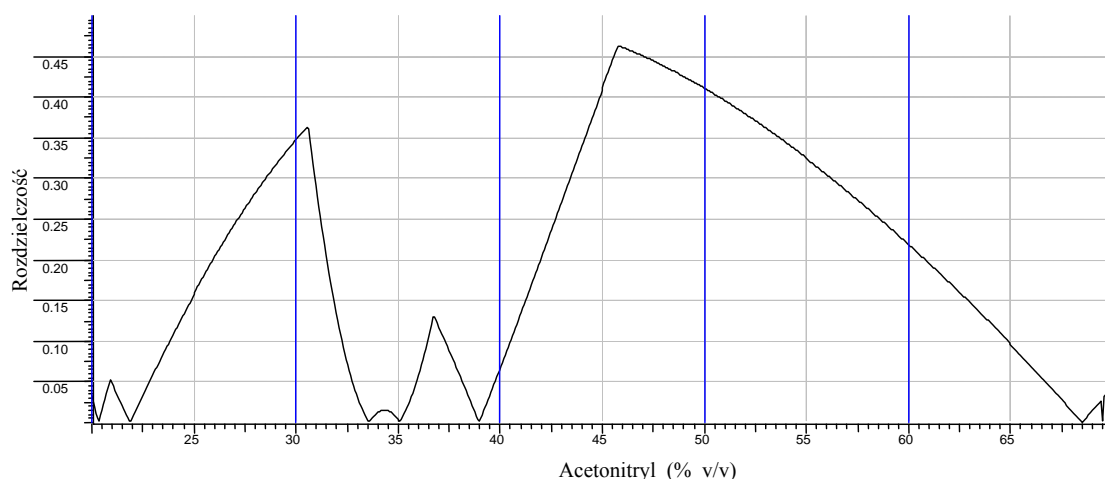


Rycina 6. Schemat oddziaływania tetrafluoroboranu 1-butylo-3-metyloimidazoliowego z fazą RP₁₈.

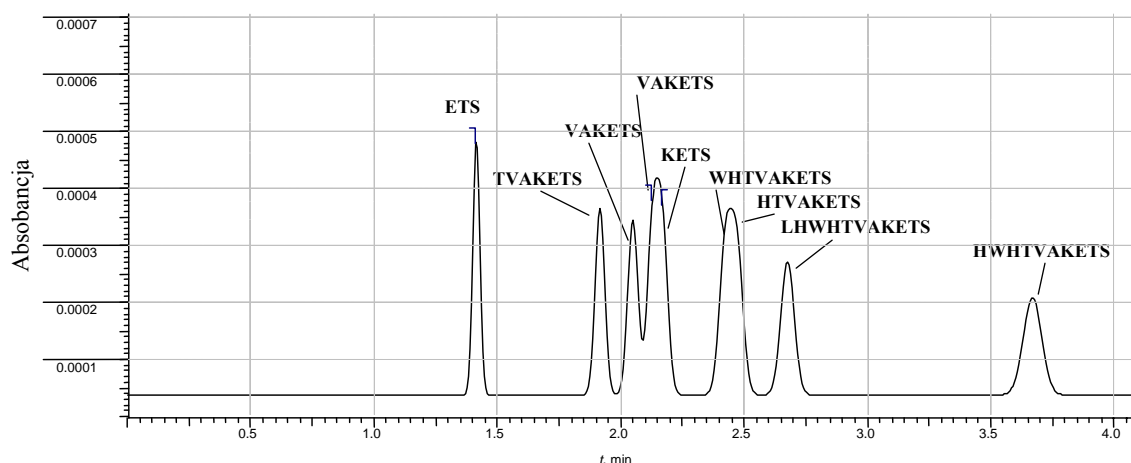
Ciecze jonowe użyto również jako składnika eluentu w celu przeprowadzenia komputerowej optymalizacji rozdzielania mieszaniny peptydów metodą TLC [52]. Zarówno w przypadku braku oraz w obecności cieczy jonowej otrzymano nieliniowe zależności między R_M peptydów a ułamkiem objętościowym acetonitrylu w binarnej fazie wodnej. W układzie chromatograficznym bez soli imidazoliowej parametr R_M został opisany funkcją kwadratową, a dodatek cieczy jonowej pozwolił na opisanie retencji modelem wielomianowym trzeciego stopnia. Parametry retencji uzyskane z układu TLC z dodatkiem cieczy jonowej pozwoliły na lepszą optymalizację rozdzielania mieszaniny peptydów zbudowanych z 3-11 aminokwasów (rycina 7 i 8).

Ciecze jonowe są obiecującą alternatywą dla powszechnie stosowanych modyfikatorów alkiloaminowych w chromatografii ciekłowej. Oprócz niskiej lotności, pochodne amoniowe i imidazoliowe charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w podstawowych rozpuszczalnikach chromatograficznych, takich jak acetonitryl, dichlorometan, heksan, metanol, woda oraz tetrahydrofuran [53].

Obecnie wzrasta liczba publikacji opisujących zastosowanie cieczy jonowych jako modyfikatorów fazy ruchomej w HPLC. Opisano wpływ długości łańcucha alkilowego



Rycina 7. Mapa rozdzielczości dla mieszaniny 9 peptydów oparta na modelu wielomianowym trzeciego stopnia w układzie TLC: faza stacjonarna – Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma – acetonitryl:woda z dodatkiem 1,5 (% v/v) tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego; symulacja przeprowadzona za pomocą programu – ACD (Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada) [52].



Rycina 8. Przewidywany chromatogram na podstawie danych retencyjnych TLC dla rozdzielania mieszaniny 9 peptydów z użyciem fazy ruchomej 46/54 (% v/v) acetonitryl:woda z dodatkiem 1,5 (% v/v) tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego na płytkach Si 60 F₂₅₄; symulacja przeprowadzona za pomocą programu – ACD (Advanced Chemistry Development) [52].

w pierścieniu imidazoliowym cieczy jonowej oraz rodzaj anionu na retencję katecholoamin [54,55]. Rozdzieleniu chromatograficznemu z zastosowaniem 1,3-dialkylimidazoli poddano związki obojętne oraz aminy aromatyczne [55,56]. Oceniono również wpływ 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych na trwałość i sprawność chromatograficznej kolumny krzemionkowej rozdzielając mieszaninę benzenu, bifenyłu,

naftalenu i antracenu. Brak znaczących zmian we współczynnikach retencji, współczynnikach ogonowania pików (*peak tail factor*, PTF) analitów testowych oraz w liczbie pólk teoretycznych uzyskanych przed i po ekspozycji kolumny na ciecz jonową wskazuje na brak jej szkodliwego działania na jej krzemionkową strukturę wewnętrzną [55].

Ciecze jonowe posłużyły również do modyfikacji chemicznej materiału wypełniającego kolumny chromatograficzne. Sun i in. [57] testowali nowosyntezowaną fazę stacjonarną, uzyskaną poprzez silanizację wolnych grup silanolowych na powierzchni krzemionki bromoalkenosilanem, następnie poprzez kowalencyjną immobilizację kationu butyloimidazoliowego. Parametry retencji chromatograficznej badanych analitów uzyskane na tej fazie korelowały z deskryptorami struktury chemicznej zgodnie z koncepcją liniowej zależności energii swobodnej (*linear free-energy relationship*, LFER) silniej niż na standardowych fazach stacjonarnych.

1.6. Ciecze jonowe jako modyfikatory w chromatografii gazowej (GC)

Ciecze jonowe dzięki znacznej stabilności termicznej okazały się ciekawym medium dla chromatografii gazowej. W roku 1999 Armstrong i in. [58] wyznaczyli indeksy retencji Kovátsa oraz stałe McReynoldsa w układzie chromatograficznym gaz-ciecz (*gas-liquid chromatography*, GLC) stosując pięć związków testowych: benzen, 1-butanol, 2-pentanon, nitropropan i pirydynę, dla czterech faz stacjonarnych. Porównano kolumny z chlorkiem oraz bromkiem 1-butylo-3-metyloimidazoliowym oraz difenylopolisilikonem (OV-22) ze standardową, niepolarną fazą stacjonarną – skwalanem. Podczas rozdzielania związków obojętnych oraz słabo polarnych nieposiadających grup zdolnych do odszczepienia bądź przyłączenia protonu, fazy bazujące na cieczy jonowej zachowały się jak typowe fazy niepolarne. W przypadku separacji związków polarnych, zarówno kwasów jak i zasad, fazy te mają charakter faz polarnych. Okazało się, że znaczny wpływ na retencję badanych związków ma rodzaj anionu cieczy jonowej. Heksafluoran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy powoduje silną retencję związków niejonogennych (estry, aldehydy, ketony), natomiast chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy wpływa na związki zawierające ugrupowania donorowo-akceptorowe protonu.

Odkrycie cieczy jonowych jako dobrych rozpuszczalników dla cyklicznych oligosacharydów oraz szeregu antybiotyków stosowanych w technikach chromatograficznych wzbudziło duże zainteresowanie naukowców (tabela 3).

Tabela 3. Rozpuszczalność cyklicznych oligosacharydów oraz antybiotyków makrocyklicznych w chlorku 1-butylo-3-metyloimidazoliowym [BMIM][Cl], heksafluorofosforanie 1-butylo-3-metyloimidazoliowym [BMIM][PF₆] i tetrafluoroboranie 1-butylo-3-metyloimidazoliowym [BMIM][BF₄].

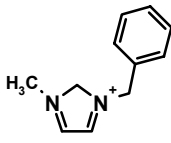
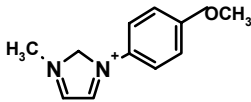
Substancja	Rozpuszczalność (% w/w)		
	[BMIM][Cl]	[BMIM][PF ₆]	[BMIM][BF ₄]
α-Cyklodekstryna (α-CD)	30	<1	<1
β-Cyklodekstryna (β-CD)	21	<1	<1
γ-Cyklodekstryna (γ-CD)	30	<1	<1
2,3-Dimetylo-β-CD	12	<1	10
2,6-Di-O-metylo-β-CD	3	28	5
Permetylo-β-CD	34	16	<1
Awoparcyna	8	<1	<1
Rifamycyna B	3	<1	5
Teikoplanina	~10	<1	<1
Wankomycyna	~15	<1	<1

Chlorku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego użyto w GLC jako ciekłego medium dla cyklodekstryn tworząc chiralne fazy stacjonarne [59]. Enancjoselektywność powyższych faz porównano z powszechnie stosowanymi fazami zawierającymi cyklodekstryny. Jednak spośród przebadanych 64 chiralnych związków, skutecznie rozdzielonych na standardowych fazach chiralnych, tylko 21 uległo rozdzielaniu na fazie bazującej na cieczy jonowej. Wynik ten tłumaczy się powstawaniem kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z kationem imidazoliowym (*IL-CD complex*). Zjawisko to uniemożliwia powstawaniu nowych kompleksów z rozdzielanymi związkami za wyjątkiem analitów zawierających centrum asymetrii w pierścieniu aromatycznym, a separacja ma miejsce tylko na drodze oddziaływań elementów strukturalnych rozdzielanej cząsteczki z grupami hydroksylowymi, obecnymi na powierzchni zewnętrznej cyklodekstryny. Mimo słabszej enancjoselektywności, nowa faza charakteryzuje się krótszymi czasami retencji oraz lepszym kształtem pików.

Anderson i Armstrong [60] zsyntezowali nowe ciecze jonowe: trifluorometylosulfonian 1-benzylo-3-metyloimidazoliowy [BeMIM][TfO] oraz trifluorometylosulfonian 1-(4-metoksyfenylo)-1*H*-3-metyloimidazoliowy [MPMIM][TfO] (tabela 4). Spośród dotychczas stosowanych pochodnych imidazoliowych, nowe ciecze jonowe charakteryzują się większą stabilnością termiczną (do 240°C), a tym samym zapobiegają procesowi rozkładu do lotnych produktów fazy stacjonarnej (*bleeding of stationary phase*) w warunkach analizy (rycina 9). Stwierdzono, że [MPMIM][TfO]

charakteryzuje się większym stopniem rozkładu do lotnych produktów oraz silniejszymi oddziaływaniami donorowo-akceptorowymi z analitami zawierającymi układ π -elektronowy w porównaniu z [BMIM][TfO].

Tabela 4. Parametry i wzory strukturalne trifluorometylosulfonianu 1-benzyl-3-metyloimidazoliowego oraz trifluorometylosulfonianu 1-(4-metoksyfenylo)-1*H*-3-metyloimidazoliowego. ^a gęstość mierzona w temperaturze $T = 0^\circ\text{C}$, ^b gęstość mierzona w temperaturze $T = 50^\circ\text{C}$ [60].

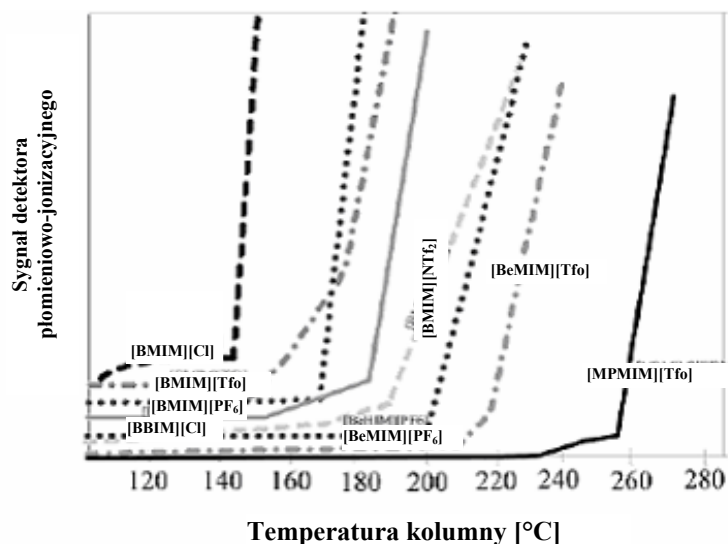
Struktura	Masa molowa	Temperatura topnienia [$^\circ\text{C}$]	Gęstość [g/cm^3]
 <chem>CN1C=NC1C2=CC=CC=C2.[O-]S(=O)(=O)F</chem>	322.30	27	1,30 ^a
 <chem>CN1C=NC1C2=CC=C(C=C2)OC.[O-]S(=O)(=O)F</chem>	338.30	45	1,32 ^b

GLC z użyciem faz stacjonarnych bazujących na cieczach jonowych jest dobrą metodą do wyznaczania ich właściwości solwatochromowych. Charakterystykę nowo zsyntezowanych faz stacjonarnych przeprowadzono za pomocą wieloparametrowej analizy regresji [61]:

$$\log k = c + rR_2 + s\pi_2^H + a\alpha_2^H + b\beta_2^H + l \log L \quad (1.9)$$

gdzie R_2 jest nadmiarową refrakcją molową analitu, π_2^H jest dipolarnością/polaryzowalnością, α_2^H jest efektywną kwasowością wiązania wodorowego, β_2^H jest efektywną zasadowością wiązania wodorowego, L jest miarą oddziaływań dyspersyjnych; c , r , s , a , b , i l są współczynnikami regresji.

Wieloparametrowe równanie regresji opisuje zachowanie retencyjne badanych analitów w danym układzie chromatograficznym a współczynniki regresji r , s , a , b , l opisują wypadkową wartość poszczególnych deskryptorów układu chromatograficznego.



Rycina 9. Proces rozkładu do lotnych produktów fazy stacjonarnej (*bleeding of stationary phase*) przedstawiony zależnością wartości prądu jonizacji w zależności od temperatury w układzie GLC podczas przepuszczania fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną modyfikowaną następującymi cieczami jonowymi: [BMIM][Cl] – chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, [BMIM][TfO] – trifluorometylosulfonian 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, [BMIM][PF₆] – heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, [BBIM][Cl] – chlorek 1,3-dibutyloimidazoliowy, [BMIM][NTf₂] – bis(trifluorometylosulfonylo)imid 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, [BeMIM][PF₆] – heksafluorofosforan 1-benzyl-3-metyloimidazoliowy, [BeMIM][TfO] – trifluorometylosulfonian 1-benzyl-3-metyloimidazoliowy oraz [MPMIM][TfO] – trifluorometylosulfonian 1-(4-metoksyfenyl)-1*H*-3-metyloimidazoliowy [60].

1.7. Ciecze jonowe jako modyfikatory w elektroforezie kapilarnej (CE)

Znaczna ilość publikacji dotycząca badań nad modyfikatorami buforu podstawowego w CE wskazuje, że poszukiwania prowadzące do poprawy rozdzielczości i selektywności układów elektroforetycznych są wciąż aktualne. Od momentu zarekomendowania przez Horvátha aminowych modyfikatorów fazy ruchomej w chromatografii cieczowej jako czynników tłumiących oddziaływania silanofilowe, wiele z nich zastosowano w CE począwszy od prostych związków, takich jak trietyloamina, propyloamina, glukozamina czy etyloetanolamina a skończywszy na bardziej złożonych związkach, takich jak 1,5-diaminopentan, *N,N'*-bis(3-aminopropyl)-1,4-butyloamina, 1,4,7,10-tetraazocykloheksan czy [(*N*-metylo,*N*-4-jodobutylo)-*N'*-metylopiperazyna [62,63].

W poszukiwaniu nowatorskich metod analizy w obrębie technik elektromigracyjnych po raz pierwszy zastosowano ciecze jonowe w roku 2001. Wykazano, że dodatek pochodnych 1-butylo-3-metyloimidazoliowych do buforu podstawowego w

układzie niewodnym (*non aqueous capillary electrophoresis*, NACE) w znaczny sposób wpływa na rozdział mieszaniny barwników syntetycznych, kwasów karboksylowych oraz związków fenolowych [64,65]. Według autorów, to anionowa część cieczy jonowej, Br^- , Cl^- , CH_3COO^- , odpowiedzialna jest za niespecyficzne oddziaływania warunkujące zmienność migracji analitów.

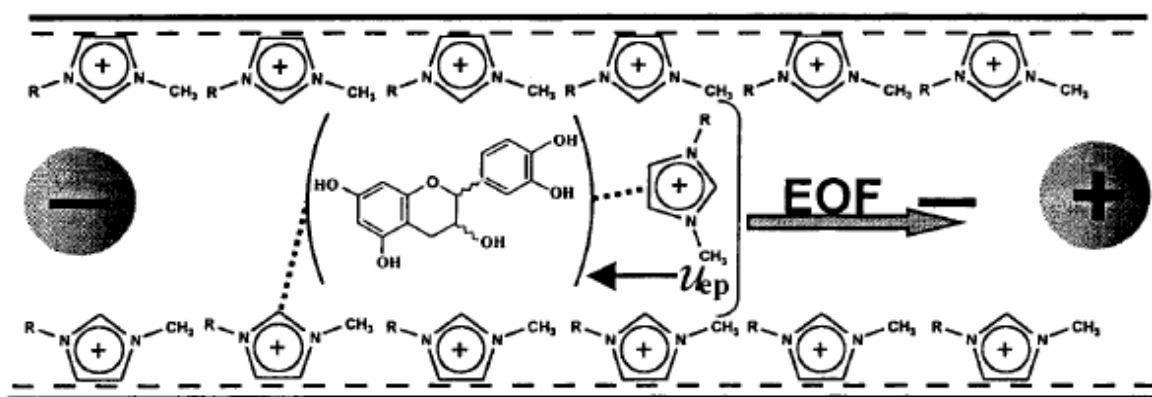
Do ciekawych wniosków doszli Yanesa i in. [66] rozdzielając związki polifenolowe. Dodatek w stężeniu 50 mM pochodnych 1-etylo- oraz 1-butylo-3-metyloimidazoliowych silnie wpłynął na efektywną ruchliwość elektroforetyczną analizowanych związków. Według autorów, aniony cieczy jonowych adsorbowane są na dodatnio naładowanej warstwie dyfuzyjnej nadając jej ładunek ujemny. Dodatkowo naładowane kationy imidazoliowe tworzą wewnętrzną dynamiczną warstwę poruszającą się w kierunku katody (rycina 10). Dodatkowo, w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych oraz tworzenia wiązań wodorowych zachodzi zjawisko asocjacji pomiędzy kationami imidazoliowymi i polifenolami. Mechanizm ten warunkuje szybki i skuteczny rozdział związków polifenolowych.

Możliwość stosowania cieczy jonowych w CE zaowocowała nowymi aplikacjami. Związki te użyto jako modyfikatory BGE w celu rozdzielenia izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego i zasadowych białek: α -chymotrypsynogenu A, trypsynogenu, cytochromu c oraz lizozymu [67,68]. Pochodne 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe użyto również w połączeniu z MECK. Wraz z dodatkiem związków powierzchniowo czynnych (surfaktantów), usprawniają układ elektroforetyczny umożliwiając szybką i powtarzalną separację alifatycznych i aromatycznych ketonów jak również związków chiralnych pochodnych binaftyli [69].

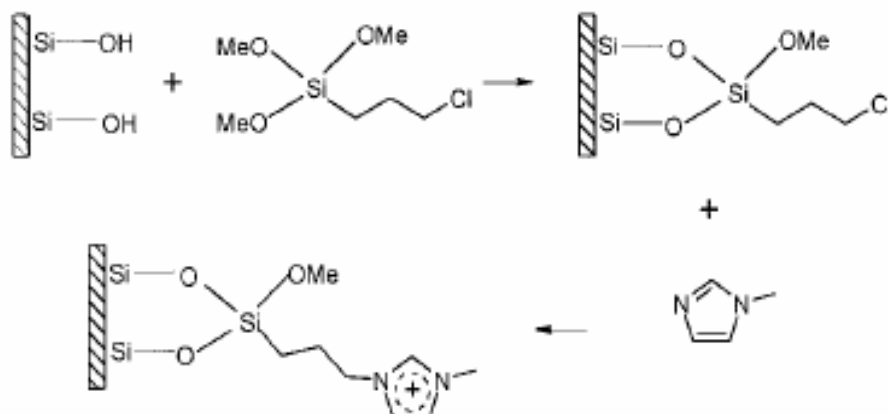
Pochodne 1,3-alkiloimidazoliowe użyto również w analizie antrachinonów. Analizując pochodne antrachinonowe z zastosowaniem chiralnych selektorów (β -cyclodekstryn), uzyskano powtarzalną metodę rozdziału charakteryzującą się dobrą granicą wykrywalności rzędu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ [70].

Zmianę kierunku EOF uzyskano poprzez kowalencyjne „pokrycie” powierzchni wewnętrznej kapilary cieczą jonową. Modyfikację kapilary przeprowadzono za pomocą reakcji silanizacji wolnych grup silanolowych za pomocą 1-chloropropylotrimetoksylanu oraz poprzez dołączenie 1-metyloimidazolu (rycina 11).

Łącząc techniki ekstrakcji na fazie stałej ze strefową elektroforezą kapilarną i tandemową spektrometrią masową (SPE-CZE-MS/MS) uzyskano czułą (14 ng/mL) i



Rycina 10. Mechanizm separacji związków polifenolowych przy użyciu cieczy jonowych pochodnych 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych [66].



Rycina 11. Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą 1-metyloimidazoliową [71].

selektywną metodę pozwalającą na identyfikację i oznaczenie sildenafilu oraz jego metabolitu w ludzkiej surowicy [71].

Dokonano porównania dwóch metod rozdzielania fragmentu DNA zbudowanego z 281 par zasad stosując ciecz jonową kowalencyjnie „związaną” z kapilarą krzemionkową (*ionic liquid coated capillary*, ILCC) oraz „pokrytą” poliakrylamidem (*polyacrylamide coated capillary*, PACC) [72]. W przypadku ILCC, dzięki zmianie kierunku i szybkości EOF, uzyskano lepszą rozdzielczość oraz znacznie obniżono czas analizy, co w przypadku dużych fragmentów DNA ma istotne znaczenie.

Obecnie duże nadzieje wiąże się ze stosowaniem ILCC w układzie MS/MS, którego zasięg analitycznego zastosowania wciąż się rozszerza.

1.8. Metody analityczne stosowane w celu identyfikacji cieczy jonowych

Biorąc pod uwagę ogromny wzrost zapotrzebowania na „rozpuszczalniki przyjazne środowisku” dla przemysłu chemicznego podejmuje się szereg badań mających na celu opracowanie metod analitycznych pozwalających na identyfikację i oznaczanie zawartości cieczy jonowych oraz towarzyszących im zanieczyszczeń w produktach finalnych oraz w próbkach środowiskowych. Do głównych zanieczyszczeń zalicza się substraty i półprodukty syntezy soli imidazoliowych: 1-alkiloimidazole, 2-alkiloimidazole oraz halogenki. Dotychczas zastosowane metody analizy cieczy jonowych bazowały głównie na technikach spektrofotometrii w podczerwieni (IR), magnetycznego rezonansu magnetycznego (NMR) oraz w świetle widzialnym (UV-VIS) [73,74].

W roku 2002 po raz pierwszy ukazało się doniesienie opisujące separację kationów 1-etylo-3-metyloimidazoliowego [EMIM], 1-izobutylo-3-metyloimidazoliowego [iBMIM], 1-butylo-3-metyloimidazoliowego [BMIM] wraz z ich zanieczyszczeniami 1-metyloimidazolem, 2-metyloimidazolem oraz 1,2-dimetyloimidazolem, przeprowadzoną przy użyciu CZE [75]. Zastosowanie 10 mM buforu fosforanowego (pH 4) z dodatkiem 3 mM α -cyklodekstryny pozwoliło na rozdzielenie dwóch izomerów strukturalnych (BMIM) oraz (iBMIM) z detekcją 1,36 ppm. Metoda ta z powodzeniem jest wykorzystywana w monitoringu przebiegu reakcji syntezy imidazoliowych cieczy jonowych w skali laboratoryjnej.

Rok później Stepnowski i in. [76] przeprowadzili analizę kationów cieczy jonowych wykorzystując HPLC z detektorem masowym z jonizacją elektrozpylającą (*electrospray ionization mass spectroscopy*, ESI-MS) w aspekcie analizy próbek biologicznych i środowiskowych. Stwierdzono brak wpływu anionu na parametry retencji tych samych kationów imidazoliowych, a najlepszy rozdział uzyskano w odwróconym układzie faz z użyciem wypełnienia C-8 w warunkach izokratycznych acetonitryl:woda (20 mM octan amonu zakwaszony 1% kwasem octowym). Powyższa metoda okazała się mało selektywna dla niskocząsteczkowych homologów 1-alkilo-3-imidazoliowych zawierających do trzech atomów węgla w łańcuchu alkilowym.

W poszukiwaniu optymalnych warunków analizy chromatograficznej cieczy jonowych przeprowadzono szereg pomiarów wpływu wypełnień fazy stacjonarnej, stężenia i rodzaju buforu, pH, temperatury oraz modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Dzięki zmodyfikowanemu wypełnieniu krzemionkowemu ze związanymi grupami propylosulfonianowymi oraz odpowiedniemu doborowi modyfikatora organicznego w układzie acetonitryl:KH₂PO₄ 30 mM, uzyskano metodę o wysokiej

selektywności rozdzieleń soli imidazoliowych o najniższej hydrofobowości, która z powodzeniem została użyta do analizy próbek pochodzących z badań nad fotodegradacją i biodegradacją cieczy jonowych [77]. Ciecze jonowe to jedna z najbardziej obiecujących grup związków chemicznych, dlatego konieczne jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na ich ilościową ocenę nie tylko z punktu widzenia zastosowania przemysłowego, ale również biorąc pod uwagę nieuniknioną obecność w środowisku.

1.9. Wyznaczanie skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych modyfikatorów fazy ruchomej w HPLC

1.9.1. Metoda Horvátha – dwuparametrowy model retencji

Zgodnie z dwuparametrowym modelem retencji (*two-retention site model*) Horvátha i in. [41,78] retencja (k) kwasów, zasad i związków amfoterycznych w kolumnie chromatograficznej zależy głównie od ich hydrofobowości oraz zdolności do jonizacji w fazie ruchomej:

$$k = k_1 + k_2 \quad (1.10a)$$

$$k_1 = \varphi_1 K_1 \quad (1.10b)$$

$$k_2 = \varphi_2 K_2 \quad (1.10c)$$

gdzie: k_1 – współczynnik retencji analitu spowodowany oddziaływaniami hydrofobowymi

k_2 – współczynnik retencji analitu spowodowany oddziaływaniami silanofilowymi

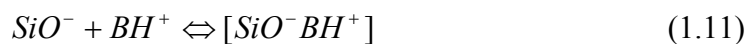
φ_1 – stosunek fazowy łańcuchów węglowodorowych

φ_2 – stosunek fazowy silanoli

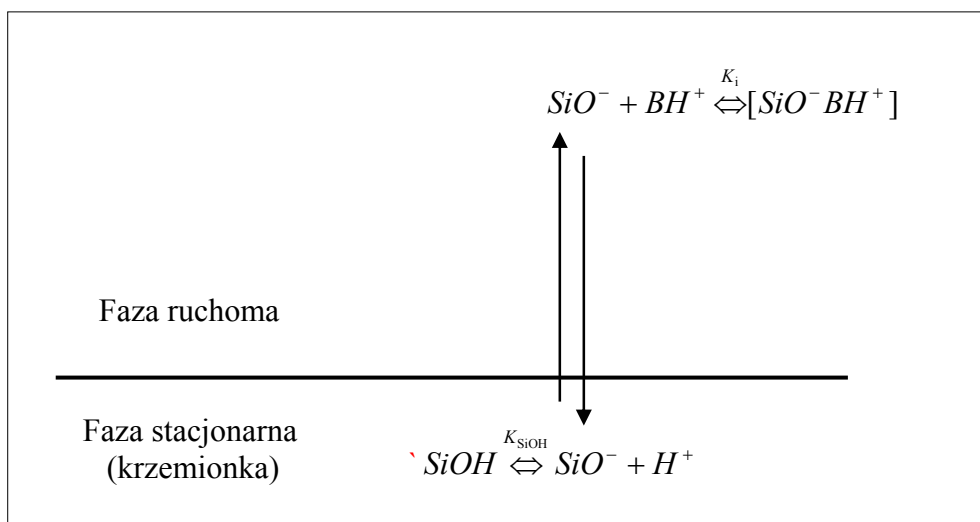
K_1 i K_2 – termodynamiczne stałe równowagi.

Stosunek fazowy jest definiowany jako liczba moli dostępnych miejsc wiążących dla analitu na jednostkę objętości fazy ruchomej.

Wpływ na retencję analitów jonogennych zdeteminowany jest ich wartością pK_a oraz pH fazy ruchomej. Ponieważ fazy krzemionkowe w szerokim zakresie pH charakteryzują się znaczną przewagą reakcji wymiany kationu, powstające jony SiO^- mają powinowactwo do tworzenia par jonowych z protonowanymi zasadami:



Najprostszy model opisujący wymianę jonową protonowanej zasady w kolumnie chromatograficznej przedstawiony jest na rycinie 12.



Rycina 12. Schemat opisujący proces wymiany jonowej pomiędzy protonowaną zasadą a fazą krzemionkową.

Stała jonizacji silanoli K_{SiOH} oraz stała tworzenia par jonowych, zwana stałą trwałości kompleksu jonowego, K_i , wyrażone są wzorami:

$$K_{SiOH} = \frac{[SiO^-][H^+]}{[SiOH]} \quad (1.12)$$

$$K_i = \frac{[SiO^- BH^+]}{[SiO^-][BH^+]} \quad (1.13)$$

gdzie: $[SiO^-]$ – ilość miejsc, które mogą oddziaływać z protonowanymi zasadami

$[BH^+]$ – stężenie protonowanej zasady

$[SiO^- BH^+]$ – stężenie kompleksu jonowego.

W celu tłumienia oddziaływań silanofilowych stosuje się pochodne amin alifatycznych o różnej długości łańcucha alkilowego. Tak zwane związki „maskujące” oddziałują na zasadzie wymiany jonowej z powierzchnią krzemionki, redukując całkowitą ilość miejsc $[SiO^-]$ mogących oddziaływać z protonowanymi zasadami [40].

Analogicznie do wzoru (1.13), stała trwałości kompleksu jonowego, K_A , czynnika „maskującego”, $[AH^+]$, na fazie krzemionkowej przedstawiona jest wzorem:

$$K_A = \frac{[SiO^- AH^+]}{[SiO^-][AH^+]} \quad (1.14)$$

gdzie: $[AH^+]$ – stężenie molowe czynnika „maskującego”.

Całkowita liczba miejsc w fazie stacjonarnej zdolna do oddziaływań silanofilowych określona jest wzorem:

$$[SiO^-]_{max} = [SiO^-] + [SiO^- AH^+] \quad (1.15)$$

Biorąc $[SiO^- AH^+]$ z równania (1.14) otrzymuje się:

$$[SiO^-] = \frac{[SiO^-]_{max}}{1 + K_A[AH^+]} \quad (1.16)$$

Dzieląc to równanie przez ilość miejsc w fazie ruchomej zdolnych do wiązania analitu uzyskuje się:

$$\varphi_2 = \frac{\varphi_{max}}{1 + K_A[AH^+]} \quad (1.17)$$

gdzie: φ_{max} – stosunek fazowy silanoli posiadających aktywne miejsca wiązania analitu bez czynnika „maskującego”

φ_2 – stosunek fazowy silanoli posiadających aktywne miejsca wiązania analitu w obecności czynnika „maskującego”.

Dlatego dodanie modyfikatora $[AH^+]$ redukuje wartość φ_2 .

Zatem, po połączeniu równań (1.10a) i (1.17) całkowita wartość współczynnika retencji zjonizowanej zasady w obecności modyfikatora $[AH^+]$ przedstawiona jest wzorem:

$$k = k_1 + \varphi_2 K_2 = k_1 + \frac{\varphi_{\max} K_2}{(1 + K_A[AH^+])} \quad (1.18)$$

Parametry k_1 , φ_{\max} i K_2 są wartościami uzyskanymi przy użyciu fazy ruchomej bez czynnika tłumiącego oddziaływania silanofilowe. Łącząc równania (1.10c) i (1.18) otrzymuje się:

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A[AH^+]} \quad (1.19)$$

Odpowiednio, k_1 i k_2 są parametrami charakterystycznymi dla danej fazy stacjonarnej i ruchomej a ich wartości są niezienne wobec $[AH^+]$. Dlatego wzrastające stężenie czynnika „maskującego” determinuje całkowitą retencję analitu do jego wartości k_1 . W celu porównania skuteczności modyfikatorów tłumiących oddziaływania silanofilowe konieczne jest wyznaczenie współczynników retencji:

$$k_0 = k_1 + k_2 \quad (1.20)$$

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A[A]} \quad (1.21)$$

gdzie: k_0 – współczynnik retencji zasady bez czynnika „maskującego”

k – współczynnik retencji zasady w obecności czynnika „maskującego” $[AH^+]$.

Parametr K_A posłużył Horváthowi i in. [78] jako wartość oceniająca skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez modyfikatory pochodne amin alifatycznych. Różnicę współczynnika retencji k oraz k_0 przedstawia zależność:

$$k_0 - k = \frac{k_2 K_A[AH^+]}{1 + K_A[AH^+]} \quad (1.22)$$

Przekształcając równanie (1.22) otrzymuje się:

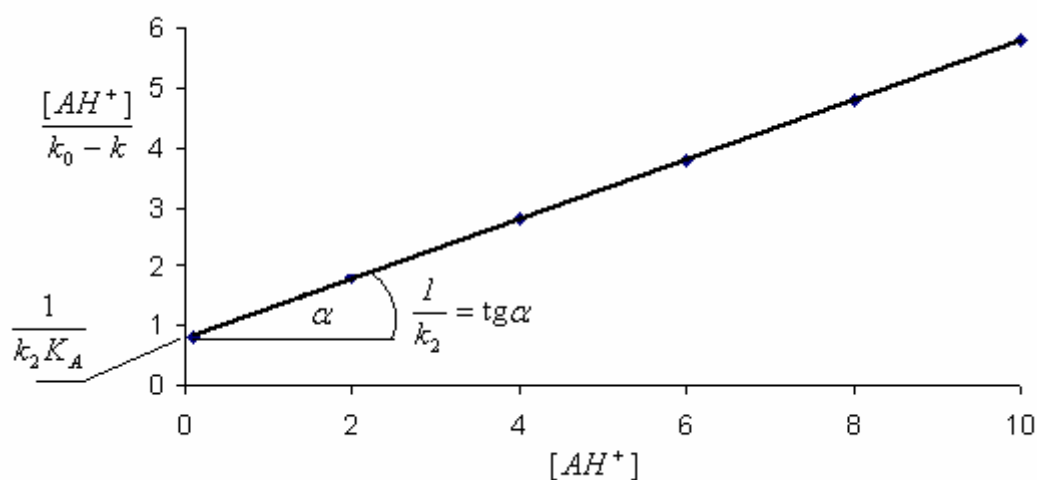
$$\frac{[AH^+]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[AH^+]}{k_2} \quad (1.23)$$

gdzie: k – współczynnik retencji zasady w obecności czynnika „maskującego” $[AH^+]$

k_0 – współczynnik retencji zasady bez czynnika „maskującego”

k_2 – tzw. silanofilowy współczynnik retencji.

Warunkiem zastosowania równania (1.23) jest otrzymanie dobrej korelacji między $\frac{[AH^+]}{k_0 - k}$ i $[AH^+]$. Mierząc współczynniki retencji k dla różnych stężeń $[AH^+]$, łatwo można obliczyć wartości K_A oraz k_2 (rycina 13) [41].



Rycina 13. Schemat wyznaczania wartości K_A oraz k_2 .

1.9.2. Metoda Sokolowskiego-Wahlunda

Podobnie do poprzednio przedstawionej teorii solwofobowości, metoda Sokolowskiego i Wahlunda [79] zakłada podwójny model retencji (równanie 1.10). W celu oceny skuteczności amin alifatycznych jako modyfikatorów w chromatografii związków zasadowych (leków antydepresyjnych) zaproponowano następującą zależność:

$$\frac{I}{k'V_m - a} = \frac{I}{b} + \frac{K_{BZ}^*[Z^-]_m[B^+]_m}{b} \quad (1.24)$$

gdzie: k' – współczynnik retencji zasady w fazie ruchomej bez czynnika „maskującego”

V_m – objętość martwa kolumny chromatograficznej

$[Z^-]_m$ – stężenie jonów buforu w fazie ruchomej

$[B^+]_m$ – stężenie modyfikatora w fazie ruchomej

K_{BZ}^* – stała trwałości potrójnego kompleksu: modyfikator $[B^+]_m$ – jony

przeciwnie buforu $[Z^-]_m$ – miejsca aktywne na krzemionce A_s .

Człon a oznacza $W_s K_o K_{QZ} [Z^-]_m$, zaś b równa się $W_s K_o^* K_{QZ}^* [Z^-]_m$

gdzie: W_s – masa fazy stacjonarnej

K_o – współczynnik adsorpcji miejsc o charakterze hydrofobowym

K_o^* – współczynnik adsorpcji miejsc o charakterze silanofilowym

K_{QZ} – stała równowagi oddziaływań hydrofobowych

K_{QZ}^* – stała równowagi oddziaływań silanofilowych.

Model Sokolowskiego-Wahlunda zakłada powstawanie potrójnego kompleksu jonowego:



gdzie: A_s – stężenie aktywnych miejsc na krzemionce o charakterze silanofilowym.

Odpowiednio do wartości K_A ze wzoru (1.18), w modelu Sokolowskiego-Wahlunda K_{BZ}^* jest wartością oceniającą skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych za pomocą pochodnych amin alifatycznych. Jednak ze względu na prostotę i mniejszą liczbę wymaganych danych, model Horvátha jest lepszy [36].

2. Cel pracy

Głównym celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania cieczy jonowych do skutecznego tłumienia oddziaływań silanofilowych w chromatografii ciekowej. Z uwagi na utrudnione chromatografowanie związków zasadowych ciecze jonowe zastosowano jako modyfikatory fazy ruchomej w technikach TLC, HPLC oraz CE przy oznaczeniach właśnie tego typu analitów

W pierwszej kolejności postanowiono zbadać wpływ dodatku trzech soli imidazoliowych w szerokim zakresie stężeń na retencję zasad, kwasów oraz związków obojętnych w TLC. Badania zamierzono przeprowadzić w różnych układach acetonitryl:woda z zastosowaniem powszechnie stosowanych faz stacjonarnych: krzemionkowej oraz oktadecylokrzemionkowej. Skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych miała być porównana z powszechnie stosowanymi modyfikatorami. Wstępna ocena wpływu badanych modyfikatorów na retencję zasad miała posłużyć planowaniu dalszych badań.

W drugim etapie zamierzano analizować wpływ cieczy jonowych na retencję związków zasadowych w HPLC. Badania miały objąć również wpływ pH roztworu buforowego oraz temperatury na zachowanie chromatograficzne badanych związków. Częstokowym celem tego etapu pracy było porównanie wartości parametru $\log k_w$, wyznaczonych z wykorzystaniem cieczy jonowej jako modyfikatora fazy ruchomej z literaturowymi wartościami $\log P$. Skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych miała być ilościowo porównywana dla piętnastu cieczy jonowych wykorzystując dwuparametrowy model retencji.

W dalszej części pracy badany miał być wpływ cieczy jonowej na przepływ elektroosmotyczny i elektroforetyczny w CE, a w konsekwencji na migrację izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego.

Jako oddzielne zadanie zamierzono też przeprowadzić oznaczenie 10 cieczy jonowych metodą CE przy niskich poziomach ich stężeń.

3. Część doświadczalna

3.1. Analiza związków zasadowych metodą TLC

3.1.1. Aparatura i materiały

Analizę chromatograficzną przeprowadzono na płytkach aluminiowych TLC, pokrytych fazami krzemionkowymi (Si 60 F₂₅₄) oraz oktadecylokrzemionkowymi (RP-18_{254s}) (Merck, Darmstadt, Niemcy). Płytki miały wymiary 5 cm x 7,5 cm x 0,2 cm. Rozwijanie chromatogramów odbywało się w pionowej, prostopadłościowej, szklanej komorze o wymiarach 6 cm x 10 cm x 4 cm. Nasycenie komór uzyskiwano poprzez umieszczenie w nich fazy ruchomej 5 min przed każdą analizą. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Po każdym procesie chromatograficznym płytki umieszczano w cieplarni o temperaturze $T = 120^\circ\text{C}$. Płytki chromatograficzne zawierały adsorbent z dodatkiem związku fluoryzującego. Wizualizacji plam dokonano w świetle UV o długości fali 254 nm lub 366 nm (Spectronics Corporation, Westburg, NY, USA).

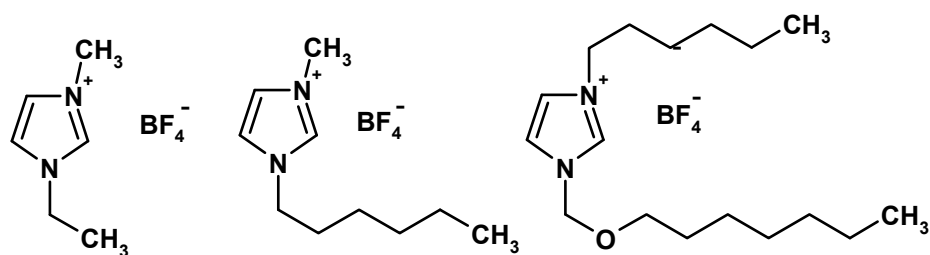
Pomiary pH wodno-organicznych roztworów wykonywano po dodaniu wszystkich składników fazy ruchomej przy użyciu pehametru typu HI 9017 (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA), względem buforów standardowych niezawierających modyfikatora organicznego, w temperaturze, $T = 21^\circ\text{C}$

W celu odważenia substancji używano wagi laboratoryjnej Ohaus Copr. (Florham Park, NY, USA).

3.1.2. Odczynniki chemiczne

Jako fazy ruchomej użyto czysty acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz fazę binarną acetonitryl:woda w proporcjach od 0 do 100 % (v/v). Wodę przygotowano z wykorzystaniem systemu do oczyszczania Milli-Q Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Jako dodatków do fazy ruchomej użyto: trietyloaminę (TEA), dimetylooktyloaminę (DMOA) (Fluka, Buchs, Szwajcaria) oraz amoniak (POCh, Gliwice, Polska).

Analizowane ciecze jonowe tetrafluoroboran 1-hexylo-3-metyloimidazoliowy [HxMIM][BF₄] oraz tetrafluoroboran 1-heptyloksymetylo-3-hexyloimidazoliowy [HpOM-HxIM][BF₄] zsyntezowane zostały przez zespół prof. dr. hab. Juliusza Pernaka z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej (rycina 14). W badaniach zastosowano



Rycina 14. Wzory strukturalne cieczy jonowych: a) tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy [EMIM][BF₄], b) tetrafluoroboran 1-hexylo-3-metyloimidazoliowy [HxMIM][BF₄], c) tetrafluoroboran 1-hexylo-3-heptyloksymetyloimidazoliowy [HpOM-HxIM][BF₄].

również handlowo dostępną ciecz jonową tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy [EMIM][BF₄] (Fluka, Buchs, Szwajcaria).

Użyto analitów testowych przedstawionych na rycinie 15.

Związki zasadowe: chinina, chlorpromazyna, fenazolina, flufenazyna, nafazolina, tiamenidyna, tiorydazyna oraz trifluopromazyna.

Związki kwasowe: kwas salicylowy, kwas acetylosalicylowy oraz fenol.

Związek obojętny: 2,3-dimetoksytoluen.

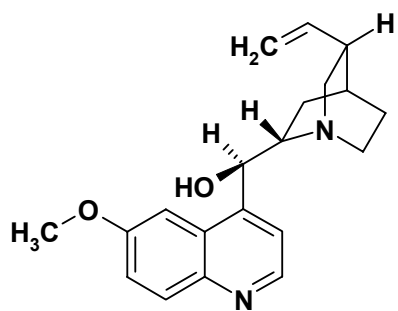
W badaniach użyto roztworów analitów w acetonirylu w stężeniach 300 µg/mL. Do nanoszenia roztworów analizowanych substancji na linię startową użyto mikropipet (Medlab, Gdynia, Polska).

3.1.3. Procedura TLC oraz wyznaczenie parametrów chromatograficznych

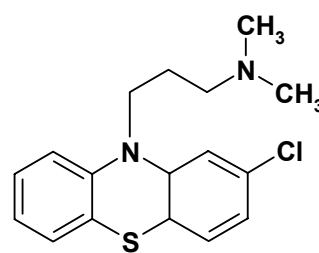
Wstępną analizę TLC rozpoczęto od wyznaczenia współczynnika opóźnienia, R_f , dla analitów testowych stosując jako fazę ruchomą acetonitryl ze zmienną zawartością badanych cieczy jonowych oraz powszechnie stosowanych modyfikatorów: trietyloaminy (TEA), dimetylooktyloaminy oraz NH₄OH w stężeniach od 0 do 3% (v/v), na płytkach chromatograficznych z dwoma rodzajami adsorbentów: Si 60 F₂₅₄ oraz RP-18_{254s}. Parametr R_f został obliczony zgodnie ze wzorem:

$$R_f = \frac{a}{b} \quad (3.1)$$

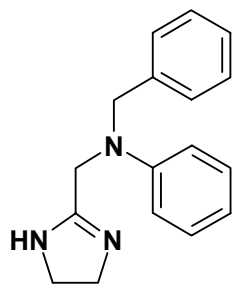
gdzie a jest odległością plamki od punktu startowego, b jest odległością czoła fazy ruchomej od punktu startowego.



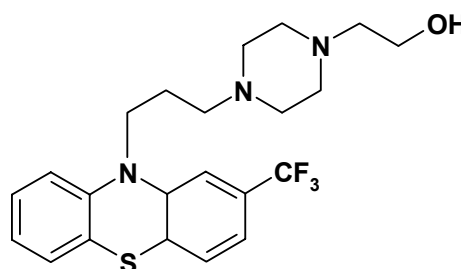
chinina (pK_{a1} 4,1, pK_{a2} 8,5)



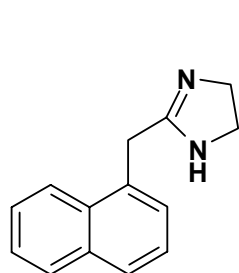
chlorpromazyna (pK_a 9,3)



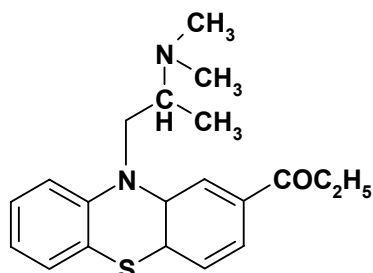
fenazolina (pK_{a1} 2,5, pK_{a2} 10,13)



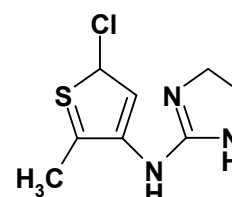
flufenazyna (pK_{a1} 3,9, pK_{a2} 8,1)



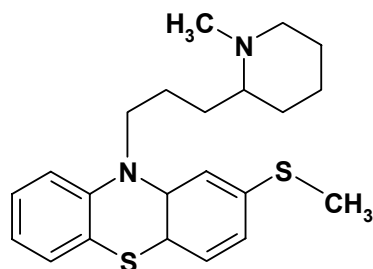
nafazolina (pK_a 10,9)



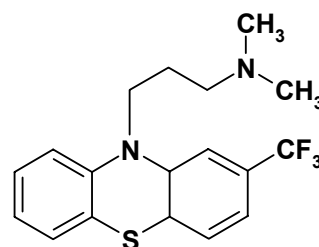
propiomazyna (pK_{a1} 6,6, pK_{a2} 9,1)



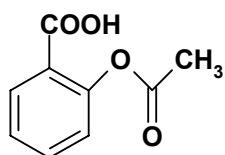
tiamenidyna



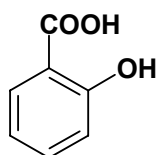
tiorydazyna (pK_a 9,5)



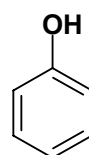
trifluopromazyna (pK_a 9,2)



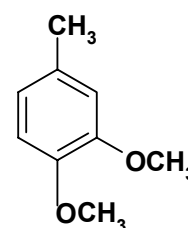
kwas acetylosalicylowy



kwas salicylowy



fenol



2,3-dimetoksytoluen

Rycina 15. Wzory strukturalne analizów testowych wykorzystanych w analizie TLC i HPLC.

Przeprowadzono również analizę TLC z wyznaczeniem współczynnika R_M w różnych kompozycjach fazy ruchomej acetonitryl:woda od 0 do 70 % (v/v) zgodnie równaniem:

$$R_M = \log(1/R_f - 1) \quad (3.2)$$

3.2. Analiza związków zasadowych metodą HPLC

3.2.1. Aparatura i odczynniki chemiczne

Do pomiarów chromatograficznych wykorzystano chromatograf cieczowy (Merck-Hitachi, Frankfurt-Tokio, Niemcy-Japonia) złożony z pompy (L-7100), detektora z matrycą fotodiodową (L-7455), automatycznego dozownika (L-7200), kolumnowego termostatu (L-7350), odgazowywacza membranowego (L-7612). Obsługa chromatografu oraz obróbka danych przeprowadzona została z wykorzystaniem oprogramowania D-7000 HPLC-System-Manager Merck-Hitachi.

Wodę przygotowano z wykorzystaniem systemu do oczyszczania Milli-Q Water Purification System. Acetonitryl i metanol był z Merck KGaA, trietyloamina (Fluka), HCl (POCH).

0,05 M bufor fosforanowy sporządzono przez rozpuszczenie w wodzie dwuwodnego diwodorofosforanu sodowego $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fluka) doprowadzając do pH 3 0,05 M kwasem fosforowym (V) H_3PO_4 (Fluka).

Bufer Brittona-Robinsona pH 2,87 składał się z mieszaniny: 0,04 M kwas octowy, 0,04 M kwas fosforowy i 0,04 M kwas borowy oraz odpowiedniej ilości 0,2 M wodorotlenku sodu w celu ustaleniażądanego pH.

Pomiary pH wodno-organicznych buforów wykonywano po dodaniu wszystkich składników fazy ruchomej przy użyciu pehametru typu HI 9017 (Hanna Instruments Inc.), względem buforów standardowych niezawierających modyfikatora organicznego w temperaturze $T = 21^\circ\text{C}$. Przed użyciem bufor przesączono przez sączeek Minisart 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Niemcy).

Do odważenia substancji użyto wagi laboratoryjnej Ohaus. W badaniach użyto roztworów analitów w stężeniach 150 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Pomiary chromatograficzne

3.2.2.1. Wpływ metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego na retencję związków zasadowych w HPLC

Zmierzono i porównano wartości k następujących zasad: chlorpromazyny, fenazoliny, flufenazyny, nafazoliny, tiorydazyny, trifluopromazyny oraz propiomazyny (rycina 23). Pomiarów dokonano metodą elucji izokratycznej dla układu acetonitryl:bufor fosforanowy pH 3 w dwóch kompozycjach 50/50 oraz 30/70 (v/v) z dodatkiem metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego ([MMIM][MSO₄]) w szerokim zakresie stężeń (0 – 96 mM), w temperaturze $T = 25^{\circ}\text{C}$.

W analizie chromatograficznej wykorzystano krzemionkową kolumnę modyfikowaną grupami oktadecylowymi LiChrospher RP-18, 250 x 46 mm I.D., średnica ziaren wypełnienia 5 μm (Merck KGaA).

Pomiarów chromatograficznych dokonano przy przepływie fazy ruchomej $F = 1$ ml/min, w temperaturze $T = 25^{\circ}\text{C}$ z objętością nastrzykiwanej próbki rozpuszczonej w acetonitrylu wynoszącą 10 μl .

3.2.2.2. Wpływ pH na skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez metylosiarczan 1,3-dimetyloimidazoliowy

Ze względu na wysoką wartość pK_a czwartorzędowe aminy aromatyczne charakteryzują się stałym stopniem jonizacji w szerokim zakresie pH i są często stosowane jako anality w celu określenia pK_a grup silanolowych na powierzchni krzemionki [80]. Zastosowanie benzylotrietyloaminy pozwoliło ocenić skuteczność działania soli imidazoliowych w różnym pH fazy ruchomej.

Wyznaczono parametry retencji, k , benzylotrietyloaminy, chlorpromazyny, fenazoliny, flufenazyny, nafazoliny, tiamenidyny, tiorydazyny oraz trifluopromazyny na kolumnie LiChrospher RP-18, 250 x 46 mm I.D., średnica ziaren wypełnienia 5 μm (Merck KGaA) w układzie acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona 50/50 (v/v) z różną zawartością 0, 6,4, oraz 96 mM [MMIM][MSO₄] w szerokim zakresie pH 2-8.

Pomiarów chromatograficznych dokonano przy przepływie fazy ruchomej $F = 1$ ml/min, w temperaturze $T = 25^{\circ}\text{C}$, z objętością nastrzykiwanej próbki rozpuszczonej w acetonitrylu wynoszącą 5 μl .

3.2.2.3. Wpływ temperatury na retencję związków zasadowych z zastosowaniem metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej w HPLC

Warunki chromatograficzne: acetonitryl:bufor fosforanowy 100 mM 30/70 (v/v) pH 3, 64 mM [EMIM][MSO₄], przepływ fazy ruchomej $F = 1$ ml/min, temperatura, $T = 25-80^{\circ}\text{C}$, kolumna chromatograficzna LiChrospher RP-18, 250 x 46 mm I.D., średnica ziaren wypełnienia 5 μm (Merck KGaA) objętość nastrzykiwanej próbki rozpuszczonej w acetonitrylu 10 μl .

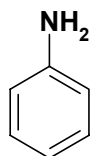
3.2.2.4. Wyznaczanie hydrofobowości metodą HPLC z użyciem tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej

Parametry k dla betaksololu, metoprololu, propranololu, timololu, aniliny, 4-chloroaniliny, 3,4-dichloroaniliny, 3,5-dichloroaniliny, N-etyloaniliny, 4-metoksyaniliny, chininy, fenotiazyny oraz tiorydazyny zmierzone zostały w układzie metanol:bufor Brittona-Robinsona pH 3, aby zapewnić najlepszą korelację pomiędzy wartościami $\log k_w$ oraz $\log P$ [81]. Analogiczne pomiary przeprowadzono w takim samym układzie z dodatkiem 64 mM tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowego [EMIM][BF₄] do binarnej fazy ruchomej. Do porównania wykorzystano literaturowe wartości $\log P$ [82]. Anality testowe przedstawiono na rycinie 15 i 16.

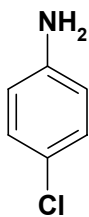
Wartości $\log k_w$ wyprowadzone zostały za pomocą programu DryLab wersja 2.0 (LC Resources, Walnut Creek, CA, USA) na podstawie danych retencyjnych z dwóch liniowych przebiegów gradientowych w czasie $t_G = 20$ min i $t_G = 60$ min, zmieniając zawartość metanolu w mieszaninie z wodą od 5 do 100 % (v/v). Dla uzyskania wiarygodnych wartości $\log k_w$ przy użyciu programu komputerowego, konieczne była znajomość objętości zatrzymania, V_D (*dwel volume*), charakterystycznej dla każdego układu chromatograficznego. Parametr ten wyznaczono z równania:

$$V_D = t_D F \quad (3.3)$$

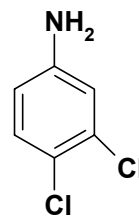
gdzie t_D oznacza czas opóźnienia (*dwel time*) a F – szybkość przepływu fazy ruchomej. t_D wyznaczono poprzez 10 minutowy gradient liniowy od 0-100% B, gdzie A – metanol, B – metanol z 0,2% zawartością acetonu, $F = 1$ ml/min zgodnie z równaniem (rycina 17):



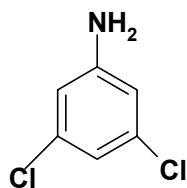
anilina



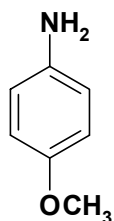
4-chloroanilina



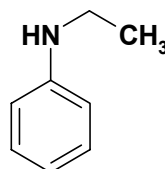
3,4-dichloroanilina



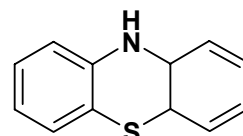
3,5-dichloroanilina



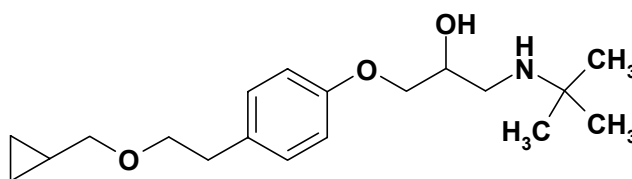
4-metoksyanilina



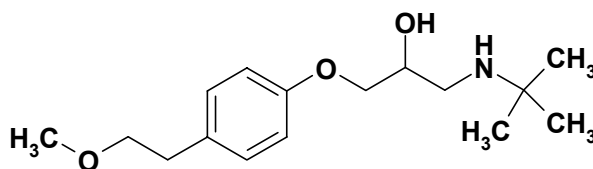
N-etyloanilina



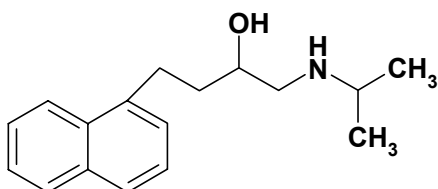
fenotiazyna



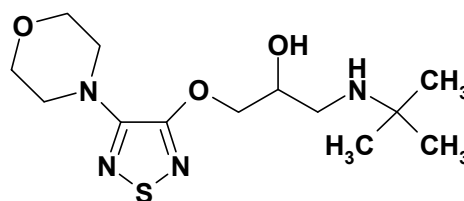
betaksolol



metoprolol



propranolol



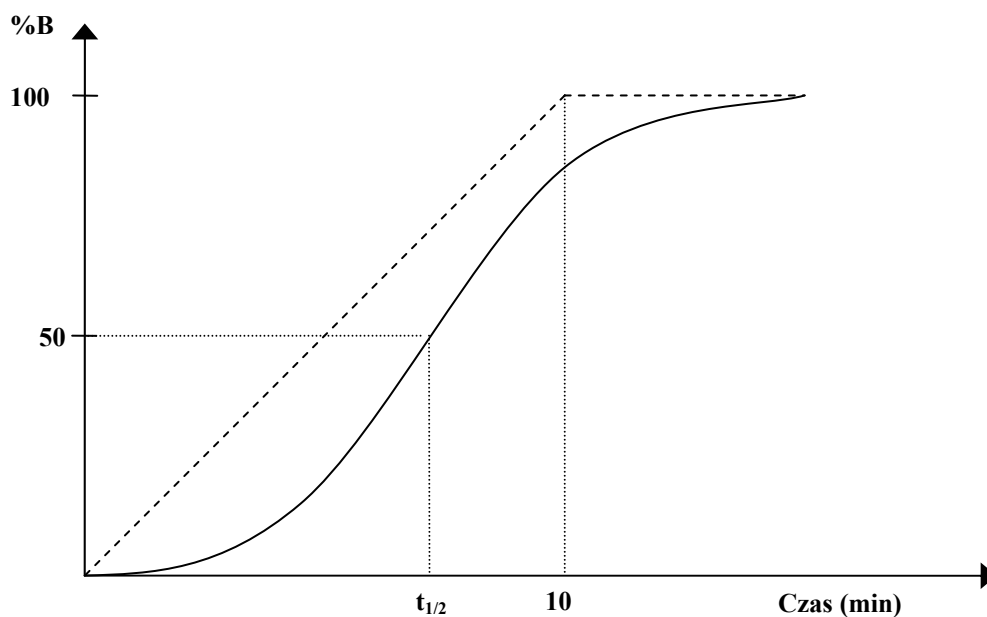
timolol

Rycina 16. Wzory strukturalne analitów testowych wykorzystanych w celu wyznaczenia hydrofobowości metodą HPLC z użyciem tetrafluoroboranu 1-metylo-3-etyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej.

$$t_D = t_{1/2} - (t_G/2) \quad (3.4)$$

gdzie $t_{1/2}$ oznacza absorpcję zarejestrowaną przy 50% B; t_G oznacza czas gradientu. W ten sposób otrzymano wartość $V_D = 1,93$.

W badaniu użyto kolumny chromatograficznej LiChrospher RP-18, 125 x 40 mm, średnica ziaren wypełnienia 5 μm (Merck KGaA). Pomiarów chromatograficznych dokonano przy przepływie fazy ruchomej $F = 1 \text{ ml/min}$, w temperaturze $T = 40^\circ\text{C}$, z objętością nastrzykiwanej próbki rozpuszczonej w acetonitrylu wynoszącą 10 μl .



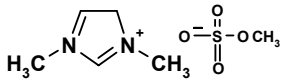
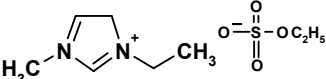
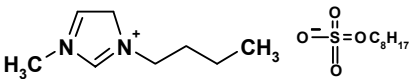
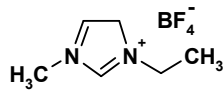
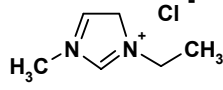
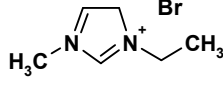
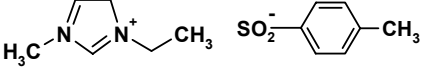
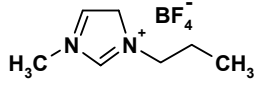
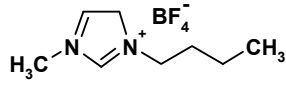
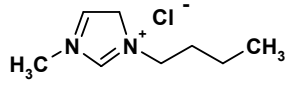
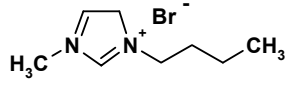
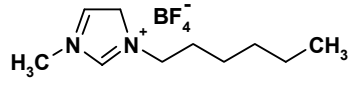
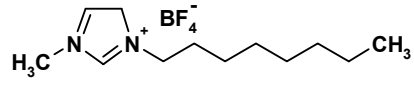
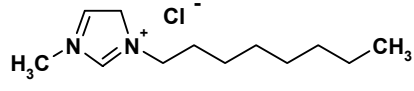
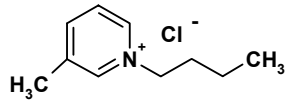
Rycina 17. Wyznaczanie wartości t_D .

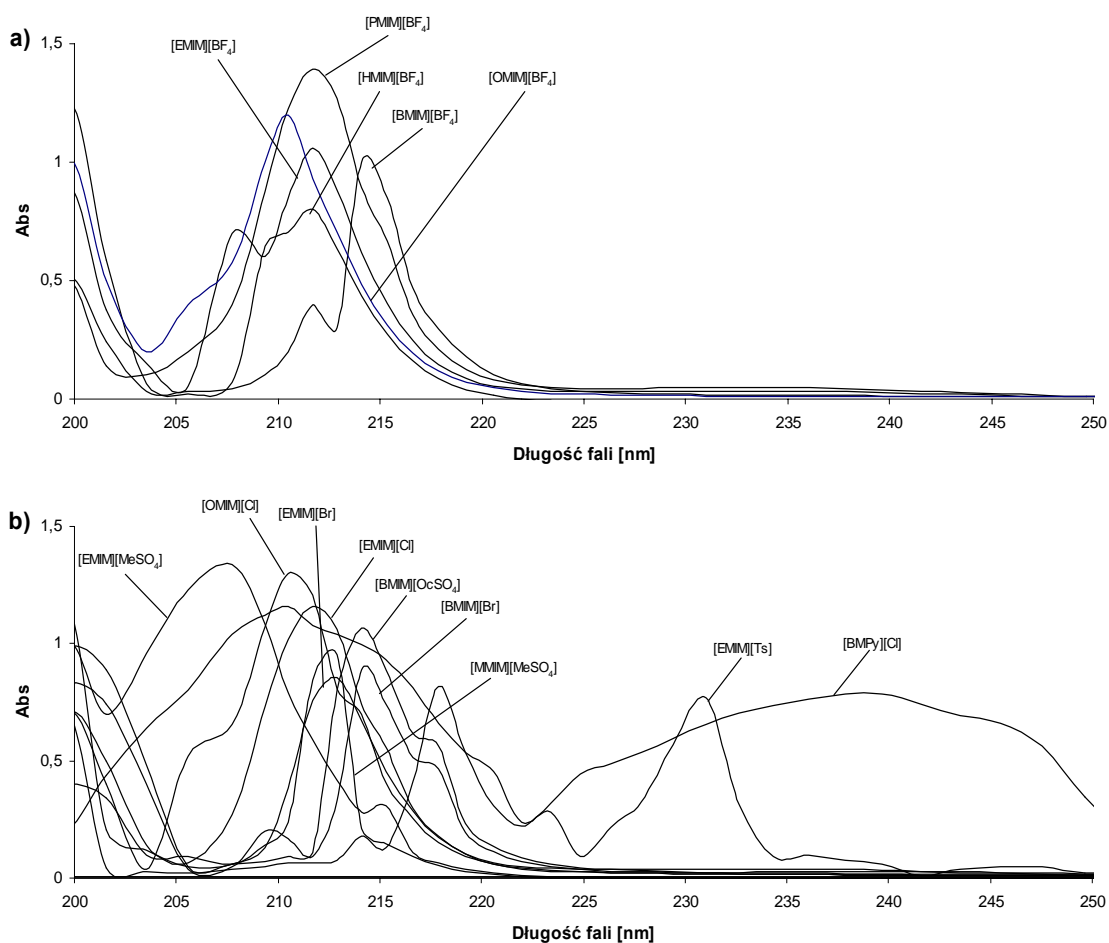
3.2.2.5. Analiza porównawcza skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych za pomocą imidazoliowych cieczy jonowych

3.2.2.5.1. Widma absorpcji i dobór analitycznej długości fali

Przeprowadzono badania porównawcze 15 cieczy jonowych, w tym: 14 pochodnych imidazoliowych oraz 1 pochodna pirydyniowa (tabela 5). Ponieważ wszystkie badane cieczy jonowe posiadają w swojej strukturze chemicznej pierścień aromatyczny odpowiedzialny za absorpcję promieniowania UV, to stosując detektor spektrofotometryczny ważny jest optymalny dobór analitycznej długości fali. W tym celu za pomocą detektora z matrycą fotodiodową wyznaczono widma absorpcji przedstawione na rycinie 18. Zarejestrowane widma tetrafluoroboranowych cieczy jonowych wykazały charakterystyczne maksima przy długości fali $\lambda = 210\text{-}214 \text{ nm}$.

Tabela 5. Struktury chemiczne oraz zapis skrótowy badanych cieczy jonowych.

Struktura chemiczna	Nr	Zapis skrótowy	Nazwa
	1	[MMIM][MSO ₄]	metylosiarczan 1,3-dimetyloimidazoliowy
	2	[EMIM][ESO ₄]	etylosiarczan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	3	[BMIM][OSO ₄]	bytylosiarczan 1-bytylo-3-metyloimidazoliowy
	4	[EMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	5	[EMIM][Cl]	chlerek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	6	[EMIM][Br]	bromek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	7	[EMIM][Ts]	tosylan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	8	[PMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-propylo-3-etyloimidazoliowy
	9	[BMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
	10	[BMIM][Cl]	chlerek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
	11	[BMIM][Br]	bromek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
	12	[HxMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-heksylo-3-etyloimidazoliowy
	13	[OMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy
	14	[OMIM][Cl]	chlerek 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy
	15	[BMPy][Cl]	chlerek 1-butylo-4-metylopirydyniowy



Rycina 18. Widma absorpcji analizowanych: a) tetrafluoroboranów, b) pozostałych cieczy jonowych w stężeniu 32 mM w zakresie 200-250 nm wobec czystej fazy ruchomej acetonitryl:woda pH 3.

W przypadku pozostałych cieczy imidazoliowych maksimum mieściło się w granicach $\lambda = 208-215$ nm. Wyjątkiem jest [EMIM][Ts] posiadający dwa maksima przy długości fali 217 nm oraz 230 nm. Jednak wartości te nie pokrywają się z widmami absorpcji związków zasadowych uzyskanych w oparciu o dane literaturowe [83]. Dlatego analityczną długość fali określono dla $\lambda = 254$ nm. Szerokie spektrum absorpcji dla [BMPy][Cl] wykluczyło użycie tej cieczy w dalszych badaniach.

3.2.2.5.2. Wyznaczanie parametru K_A

Porównując skuteczności soli imidazoliowych w badaniach wyznaczono parametr K_A stosując dwuparametrowy model retencji [41,78]. W analizie porównawczej zastosowano dwa związki zasadowe: benzylotrietyloaminę i chlorpromazyne, w celu

określenia wpływu użytego analitu na K_A . W celu wyznaczenia zależności $\frac{[AH^+]}{k_0 - k}$

względem $[AH^+]$ użyto następujących stężeń cieczy jonowych: 3,2, 6,4, 32, 64, 96 oraz 128 mM (przeprowadzono 5 pomiarów na 6 poziomach stężeń).

Pomiarów chromatograficznych dokonano stosując fazę ruchomą acetonitryl:woda 50/50 (v/v) o pH 3, ustalany poprzez dodatek 10 % kwasu solnego (v/v) przy przepływie $F = 1$ ml/min, w temperaturze $T = 25^\circ\text{C}$, z objętością nastrzykiwanej próbki rozpuszczonej w acetonitrylu wynoszącą 10 μl . Zastosowano kolumnę chromatograficzną LiChrospher RP-18, 250 x 46 mm I.D.; średnica ziaren wypełnienia 5 μm (Merck KGaA).

3.3. Analiza izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego metodą CE

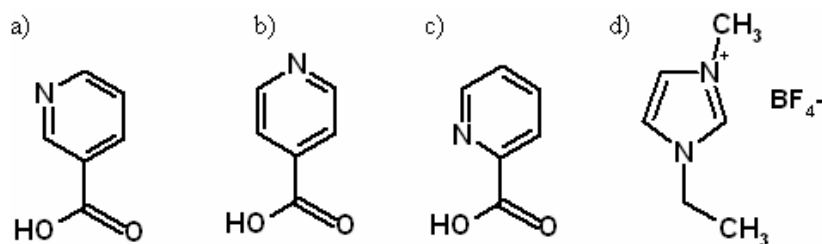
3.3.1. Aparatura i materiały

Analizę elektroforetyczną przeprowadzono za pomocą aparatu do elektroforezy kapilarnej Quanta 4000E (Waters, Milford, MA, USA), z oprogramowaniem Millennium 2.15 (Waters, Milford, Bedford, MA, USA), wyposażonego w detektor UV ze zmienną długością fali. Zastosowano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową (Polimicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) o średnicy wewnętrznej 50 μm , długości całkowitej $L = 46$ cm, długości efektywnej $l = 38,5$ cm. Nową kapilarę przepłukano 1,0 M wodorotlenkiem sodu (30 min), następnie metanolem (30 min) oraz wodą dejonizowaną (30 min).

3.3.2. Odczynniki chemiczne

Jako buforów podstawowych (*background electrolytes*, BGE) do analizy elektroforetycznej użyto gotowego 50 mM buforu tris(hydroksymetylo)aminometanu pH 8 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) oraz buforu boranowego. 20 mM bufor boranowy pH 9,3, otrzymano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości bezwodnego tetraboranu sodowego (Fluka) w wodzie dejonizowanej (Milli-Q Water Purification System). Pomiary pH wodnych roztworów wykonywano przy użyciu pehametru typu HI 9017 Hanna Instruments Inc.

Wykorzystano anality: kwas nikotynowy, kwas izonikotynowy oraz pikolinowy (rycina 19).



Rycina 19. Wzory strukturalne: a) kwasu nikotynowego, b) kwasu izonikotynowego, c) kwasu pikolinowego, d) tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego [EMIM][BF₄].

Jako modyfikatora BGE zastosowano handlowo dostępną ciecz jonową tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy [EMIM][BF₄] (rycina 19).

W badaniach użyto wodnych roztworów kwasów w stężeniach 50 µg/mL.

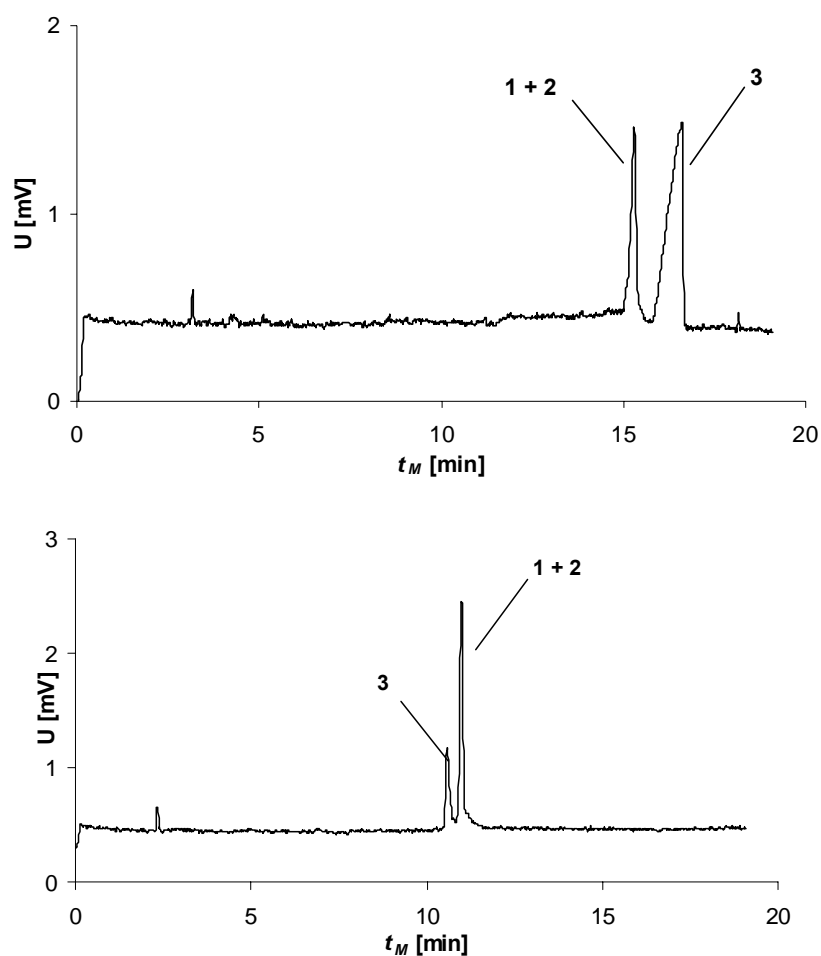
3.3.3. Dobór warunków analitycznych

W normalnych warunkach bez udziału cieczy jonowej w różnych układach buforów elektroforetycznych (różne pH, siła jonowa, rodzaj elektrolitu) nie uzyskano pełnego rozdzielania mieszaniny izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego (rycina 20). Analiza elektroforetyczna poszczególnych kwasów karboksylowych bez dodatku cieczy jonowej w BGE była niewykonalna.

Rozdzielenie mieszaniny związków w CE jest możliwe w oparciu o różną ruchliwość elektroforetyczną analitów, zdeterminowaną stosunkiem ładunku cząsteczki zjonizowanej, q , do promienia tej cząsteczki, r . Zredukowanie przepływu elektroosmotycznego (*electroosmotic flow*, EOF) osiągnięto przez zastosowanie buforu o zasadowym pH oraz dodatku [EMIM][BF₄]. Spośród analizowanych BGE do dalszej analizy wybrano 20 mM bufor boranowy o pH 9,3. Wybór elektrolitu opierał się głównie na porównaniu parametru szerokości piku mierzonego u podstawy. Ostateczne warunki analizy elektroforetycznej były następujące: BGE 20 mM tetraboran sodu pH 9,3, przyłożone napięcie $U = \pm 14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 254$ nm, temperatura $T = 20$ °C.

3.3.4. Wyznaczanie parametrów elektroforetycznych

Opisując wpływ [EMIM][BF₄] na wielkość EOF w powyższych warunkach wyznaczono ruchliwość przepływu elektroosmotycznego, μ_{eof} :



Rycina 20. Przykłady elektroferogramów mieszaniny: 1 – kwasu nikotynowego, 2 – kwasu izonikotynowego oraz 3 – kwasu pikolinowego. Kapilara krzemionkowa niemodyfikowana, napięcie +14 kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20$ °C, a) BGE 50 mM tris(hydroksymetylo)aminometan pH 8, b) BGE 20 mM tetraboran sodu pH 9,3.

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{v_{\text{eof}}}{E} \quad [\text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})] \quad (3.5)$$

gdzie v_{eof} jest prędkością przepływu elektroosmotycznego a E jest natężeniem pola elektrycznego.

Parametr v_{eof} jest stosunkiem efektywnej długości kapilary (od wlotu do detektora), l , do czasu migracji znacznika, t_0 :

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{l}{t_0} \quad [\text{cm/s}] \quad (3.6)$$

Wartość E jest funkcją przyłożonego napięcia, V , i całkowitej długości kapilary, L :

$$E = \frac{V}{L} \text{ [V/cm]} \quad (3.7)$$

Parametrem wyrażającym stopień rozdzielania dwóch pików jest rozdzielczość, R_s , w technice elektroforetycznej wyrażona jako:

$$R_s = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}} \right) (\Delta\mu_{ep}) \sqrt{\frac{V}{(\bar{\mu} + \mu_{eof})D} \cdot \frac{l}{L}} \quad (3.8)$$

gdzie: $\Delta\mu_{ep}$ – różnica ruchliwości elektroforetycznej dwóch składników, $\bar{\mu}$ – średnia efektywna ruchliwość elektroforetyczna, μ_{eof} – przepływ elektroosmotyczny, D – współczynnik dyfuzji.

Dzięki wysokiej sprawności CE otrzymuje się bardzo wąskie piki, ale mała różnica w μ_{eof} badanych analitów wpływa znacząco na R_s . Ponieważ w ostatecznym układzie elektroforetycznym ($U = -14$ kV, stężenie 90-150 mM [EMIM][BF₄]) dochodzi do zredukowania EOF (nie jest możliwe wyznaczenie t_0), obliczenie wartości R_s ze wzoru (3.8) jest niewykonalne. Dlatego w przeprowadzonych badaniach elektroforetycznych zastosowano zależność:

$$R_s = \frac{2(t_{M2} - t_{M1})}{w_1 + w_2} \quad (3.9)$$

gdzie t_1 i t_2 są czasami migracji określanymi w maksimum pików ($t_{M1} < t_{M2}$); w_1 i w_2 są szerokościami pików przy podstawie.

Pole powierzchni pików, A , jest parametrem proporcjonalnym do ilości oznaczanego składnika pozwalającym na określenie liniowości i powtarzalności danej metody. Jednak w przypadku CE, A jest nie tylko funkcją stężenia analitu, ale zależy również od szybkości migracji danego składnika. Bardziej dokładnym parametrem jest skorygowana powierzchnia pików, A° , wyrażona wzorem:

$$A^\circ = \frac{A}{t_M} \quad (3.10)$$

3.4. Analiza cieczy jonowych metodą CE

3.4.1. Aparatura i materiały

Analizę elektroforetyczną przeprowadzono za pomocą aparatu do elektroforezy kapilarnej Quanta 4000E (Waters) z oprogramowaniem Millenium 2.15 (Waters), wyposażonego w detektor UV ze zmienną długością fali. Zastosowano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową (Polimicro Technologies) o średnicy wewnętrznej 50 μm , długości całkowitej $L = 45\text{cm}$, długości efektywnej $l = 37,5\text{ cm}$.

Pomiary pH wodnych roztworów wykonywano przy użyciu pehametru typu HI 9017 Hanna Instruments Inc.

W celu odważenia substancji użyto wagi laboratoryjnej Ohaus Copr.

3.4.2. Odczynniki chemiczne

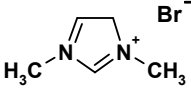
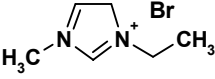
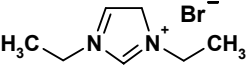
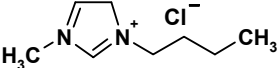
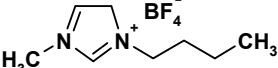
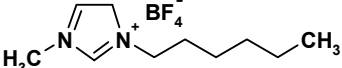
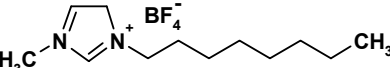
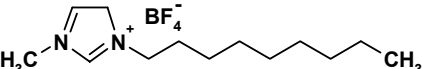
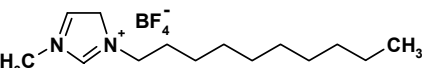
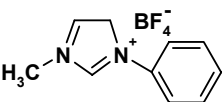
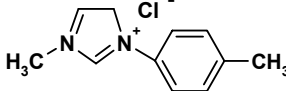
Jako buforów podstawowych BGE użyto:

- 150 mM bufor fosforanowy pH 2,5, otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości KH_2PO_4 i ustalenie pH za pomocą H_3PO_4
- 150 mM bufor fosforanowy pH 6,5, otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości KH_2PO_4 i ustalenie pH za pomocą K_2HPO_4
- 150 mM bufor boranowy pH 9,3, otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$.
- 150 mM bufor mrówczanowy pH 3, otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości HCOOH i ustalenie pH za pomocą NaOH
- 150 mM bufor octanowy pH 4 otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości CH_3COONa i ustalenie pH za pomocą CH_3COOH .
- 50, 100, 150 oraz 200 mM bufor cytrynianowy pH 2 i 6 otrzymany poprzez rozpuszczenie w wodzie odpowiedniej ilości $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COONa})_3$ i ustalenie pH za pomocą $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3$.

Analizowane ciecze jonowe przedstawione są w tabeli 8.

Wszystkie bufony oraz roztwory cieczy jonowych otrzymano poprzez rozpuszczenie w wodzie dejonizowanej (Milli-Q Water Purification System). Bufory przygotowano bezpośrednio przed rozpoczęciem analizy i przesączono przez sącdek Minisart 0,2 μm (Sartorius, Göttingen, Niemcy).

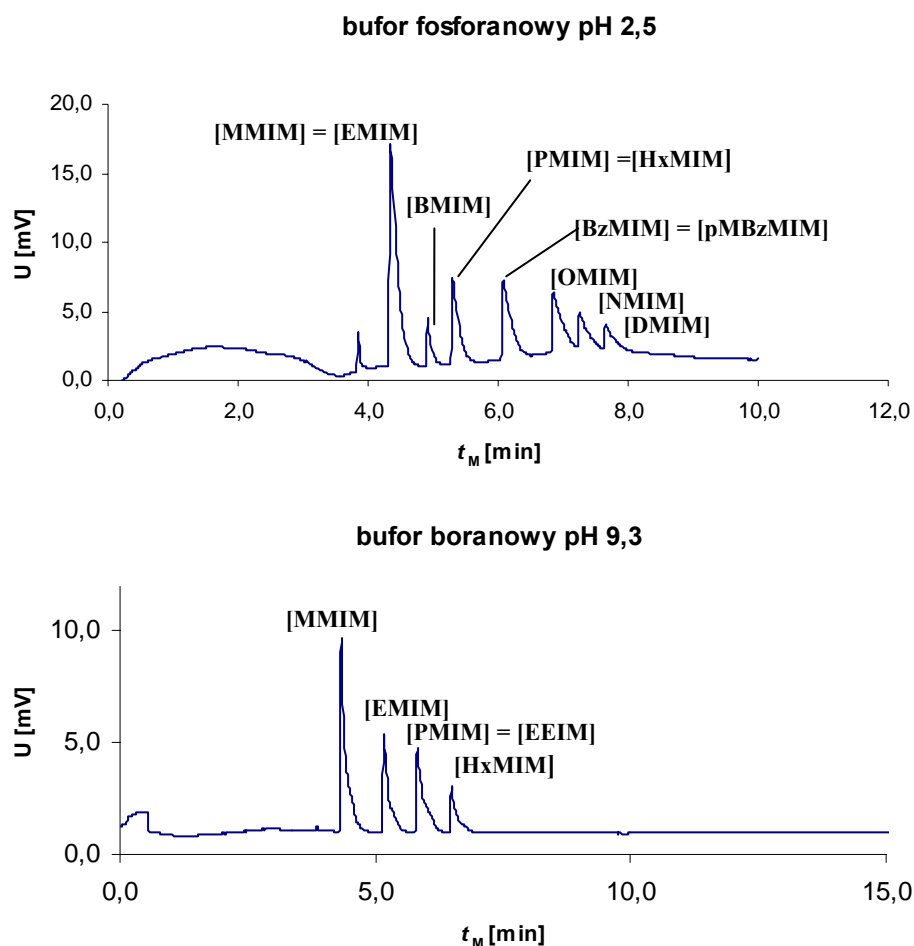
Tabela 6. Wzory strukturalne i zapis skrótowy analizowanych cieczy jonowych oraz masy cząsteczkowe, M_w , poszczególnych kationów imidazoliowych.

Struktura chemiczna	M_w	Zapis skrótowy	Nazwa
	97,14	[MMIM][Br]	bromek 1,3-dimetyloimidazoliowy
	117,17	[EMIM][Br]	bromek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
	126,20	[EEIM][Br]	bromek 1,3-dietyloimidazoliowy
	126,20	[PMIM][Cl]	chlerek 1-propylo-3-metyloimidazoliowy
	141,24	[BMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
	170,30	[HxMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy
	198,35	[OMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy
	212,38	[NMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-nonylo-3-metyloimidazoliowy
	226,41	[DMIM][Cl]	chlerek 1-decylo-3-metyloimidazoliowy
	154,17	[BzMIM][BF ₄]	tetrafluoroboran 1-benzylo-3-metyloimidazoliowy
	169,21	[pMBzMIM][Cl]	chlerek 1-(<i>p</i> -metylo)-benzylo-3-metyloimidazoliowy

3.4.3. Dobór warunków analitycznych

W początkowym etapie optymalizacji rozdzielania kationów imidazoliowych stosując niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową przebadano wpływ buforów w stężeniu 150 mM na rozdzielczość, czas migracji oraz kształt pików. Bufory: octanowy oraz mrówczanowy, użyty jako BGE, charakteryzowały się niską rozdzielczością. Zastosowanie

buforu boranowego pH 9,3 i fosforanowego 2,5 podwyższyło rozdzielczość układu elektroforetycznego jednak ogonowanie pików wpłynęło negatywnie na wybór badanego buforu (rycina 21). W przypadku buforu boranowego udało się tylko zidentyfikować piki pięciu kationów imidazoliowych. Najlepszą rozdzielczość przy akceptowalnym kształcie pików uzyskano stosując bufor cytrynianowy.



Rycina 21. Elektroferogramy mieszaniny kationów imidazoliowych analizowane przy stosowaniu różnych buforów podstawowych.

Dalsze badania polegały na ocenie parametrów elektroforetycznych w buforze cytrynianowym o różnej wartości pH oraz siły jonowej. Niskie pH (pH 3) powodowało stosunkowo duże ogonowanie pików kationów imidazoliowych. Wraz ze wzrostem pH kształt pików uległ poprawie przy jednoczesnym wzroście t_M . Badając wpływ buforu o

stężeniu: 50, 100, 150, 200 mM stwierdzono wzrost t_M oraz stopień rozdzielania wszystkich pików wraz ze wzrostem stężenia BGE.

Analizując wpływ wielkości przyłożonego pola elektrycznego, E , na szybkość migracji analitów stwierdzono spadek t_M wraz ze wzrostem E . Ostatecznie za najbardziej optymalne warunki elektroforetyczne uznano: BGE 200 mM bufor cytrynianowy pH 4, przyłożone napięcie +12 kV, temperatura kapilary 20°C, długość fali pomiarowej $\lambda = 254$ nm.

Oszacowanie poziomu granicy wykrywalności (*limit of detection*, LOD) przeprowadzono w oparciu o wyznaczenie stosunku sygnału do szumu (S/N) 3:1.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Analiza związków zasadowych metodą TLC

Niewątpliwie zaletą TLC jest niski koszt oraz krótki czas przeprowadzanej analizy. Metoda ta pozwoliła na wstępną ocenę wpływu cieczy jonowych na parametr R_f ośmiu związków testowych. Jak można zauważyć w przypadku obydwu faz Si 60 F₂₅₄ oraz RP-18 F_{254s}, wzrost stężenia cieczy jonowej w fazie ruchomej znacznie obniża retencję analizowanych związków zasadowych (tabela 7 i 8). Na uwagę zwraca brak elucji w przypadku użycia acetonitrylu (100 %), mimo bardzo dobrej rozpuszczalności badanych związków w tym eluencie. Wartość $R_f = 0$ w danym układzie świadczy o silnym oddziaływaniu chromatografowanych substancji z fazą stacjonarną. W przypadku zastosowanych faz bazujących na krzemionce można zakładać, że silna retencja spowodowana jest oddziaływaniami między grupami silanowymi i testowanymi zasadami. Największe wartości R_f uzyskano w przypadku największego stężenia cieczy jonowej w fazie ruchomej, 3% (v/v). W zależności od użytej cieczy jonowej dla każdej z badanych zasad maksimum R_f wzrasta w kierunku [HpOM-HxIM][BF₄] < [HxMIM][BF₄] < [EMIM][BF₄].

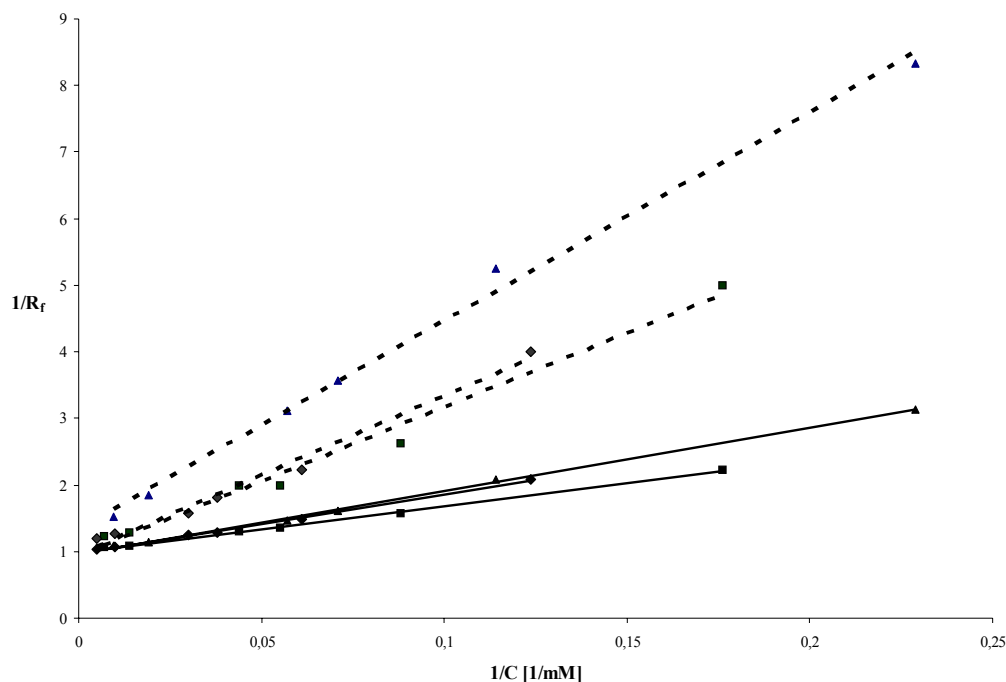
W celu porównania skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych badanych soli imidazoliowych wyznaczono izotermy adsorpcji dla poszczególnych układów ciecz jonowa-acetonitryl-faza stacjonarna (rycina 22). Pozwoliło to określić zależność między ilością zaadsorbowanej na powierzchni krzemionki cieczy jonowej a jej stężeniem w fazie ruchomej. Zarówno dla Si 60 F₂₅₄ oraz RP-18 F_{254s} otrzymano liniowe izotermy Langmuira dla wszystkich trzech badanych cieczy jonowych jako modyfikatorów fazy ruchomej. W przypadku RP-18 F_{254s} izotermy charakteryzują się mniejszym nachyleniem, co świadczy o większym stopniu adsorpcji cieczy jonowych na powierzchni oktadecylokrzemionkowej fazy stacjonarnej. Efekt ten jest spowodowany powinowactwem łańcuchów alkilowych soli imidazoliowych do hydrofobowej fazy RP-18 F_{254s}. Zgodnie z wykresem i wyliczonymi wartościami logarytmu współczynnika podziału *n*-oktanol-woda, [HxMIM][BF₄] (clog *P* = 5,43) charakteryzuje się większym stopniem adsorpcji od [EMIM][BF₄] (clog *P* = 3,31). Jednak biorąc pod uwagę clog *P*, największy stopień adsorpcji powinien mieć miejsce w przypadku [HpOM-HxIM][BF₄]. Tymczasem, mimo najwyższej wartości lipofilowości (clog *P* = 7,94) oraz największej masy cząsteczkowej, izotermy adsorpcji dla [HpOM-HxIM][BF₄] charakteryzują się największym kątem

Tabela 7. Wpływ dodatku badanych cieczy jonowych na średnią wartość współczynnika opóźnienia, R_f , uzyskanego dla ośmiu związków testowych na fazie stacjonarnej Si 60 F₂₅₄. W nawiasach podane są odchylenia standardowe. [HpOM-HxIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-heptyloksymetylo-3-hexyloimidazoliowy, [HxMIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-hexylo-3-metyloimidazoliowy, [EMIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy.

Ciecz jonowa	Stężenie cieczy jonowej w acetonitrylu % (v/v)						
	0,000	0,125	0,250	0,400	0,500	1,500	3,000
Chinina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	0,01 (±0,00)	0,02 (±0,00)	0,03 (±0,01)	0,04 (±0,00)	0,07 (±0,00)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,02 (±0,00)	0,02 (±0,01)	0,03 (±0,00)	0,03 (±0,00)	0,06 (±0,01)	0,08 (±0,01)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,02 (±0,00)	0,03 (±0,01)	0,04 (±0,01)	0,05 (±0,01)	0,08 (±0,01)	0,13 (±0,01)
Flufenazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,01 (±0,00)	0,02 (±0,00)	0,03 (±0,00)	0,04 (±0,00)	0,06 (±0,01)	0,08 (±0,01)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,02 (±0,00)	0,03 (±0,00)	0,04 (±0,01)	0,04 (±0,01)	0,07 (±0,01)	0,10 (±0,01)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,02 (±0,01)	0,04 (±0,02)	0,06 (±0,01)	0,07 (±0,01)	0,13 (±0,02)	0,30 (±0,03)
Tiorydazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,16 (±0,02)	0,30 (±0,03)	0,40 (±0,02)	0,52 (±0,03)	0,71 (±0,02)	0,76 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,28 (±0,03)	0,53 (±0,01)	0,66 (±0,01)	0,68 (±0,03)	0,82 (±0,02)	0,83 (±0,03)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,31 (±0,02)	0,54 (±0,01)	0,65 (±0,02)	0,72 (±0,02)	0,82 (±0,01)	0,84 (±0,02)
Chlorpromazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,15 (±0,01)	0,25 (±0,02)	0,36 (±0,03)	0,46 (±0,03)	0,67 (±0,02)	0,73 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,24 (±0,03)	0,49 (±0,01)	0,62 (±0,02)	0,62 (±0,02)	0,82 (±0,01)	0,82 (±0,01)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,28 (±0,02)	0,51 (±0,01)	0,62 (±0,02)	0,69 (±0,02)	0,81 (±0,01)	0,83 (±0,02)
Trifluopromazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,18 (±0,01)	0,31 (±0,02)	0,44 (±0,03)	0,52 (±0,02)	0,74 (±0,02)	0,78 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,30 (±0,02)	0,55 (±0,01)	0,67 (±0,03)	0,67 (±0,03)	0,82 (±0,01)	0,84 (±0,01)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,34 (±0,02)	0,55 (±0,02)	0,66 (±0,02)	0,74 (±0,01)	0,82 (±0,01)	0,84 (±0,02)
Fenazolina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,27 (±0,01)	0,43 (±0,02)	0,58 (±0,03)	0,65 (±0,02)	0,80 (±0,01)	0,80 (±0,01)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,41 (±0,01)	0,63 (±0,01)	0,75 (±0,02)	0,75 (±0,02)	0,83 (±0,01)	0,84 (±0,04)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,44 (±0,01)	0,64 (±0,01)	0,73 (±0,01)	0,78 (±0,01)	0,83 (±0,01)	0,84 (±0,03)
Tiamenidyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,12 (±0,01)	0,19 (±0,02)	0,28 (±0,02)	0,32 (±0,03)	0,54 (±0,04)	0,65 (±0,03)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,20 (±0,02)	0,38 (±0,02)	0,50 (±0,01)	0,50 (±0,01)	0,78 (±0,01)	0,81 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,25 (±0,01)	0,45 (±0,01)	0,55 (±0,01)	0,63 (±0,01)	0,79 (±0,01)	0,83 (±0,02)
Nafazolina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,18 (±0,01)	0,27 (±0,02)	0,36 (±0,02)	0,41 (±0,03)	0,59 (±0,07)	0,69 (±0,01)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,29 (±0,02)	0,48 (±0,02)	0,59 (±0,01)	0,59 (±0,01)	0,80 (±0,01)	0,81 (±0,04)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,33 (±0,01)	0,50 (±0,02)	0,60 (±0,01)	0,67 (±0,01)	0,80 (±0,01)	0,83 (±0,03)

Tabela 8. Wpływ dodatku badanych cieczy jonowych na średnią wartość współczynnika opóźnienia, R_f , uzyskanego dla ośmiu związków testowych z na fazie stacjonarnej RP-18 F_{254s}. W nawiasach podane są odchylenia standardowe. [HpOM-HxIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-heptyloksymetylo-3-hexyloimidazoliowy, [HxMIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-metylo-3-hexyloimidazoliowy, [EMIM][BF₄] – tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy.

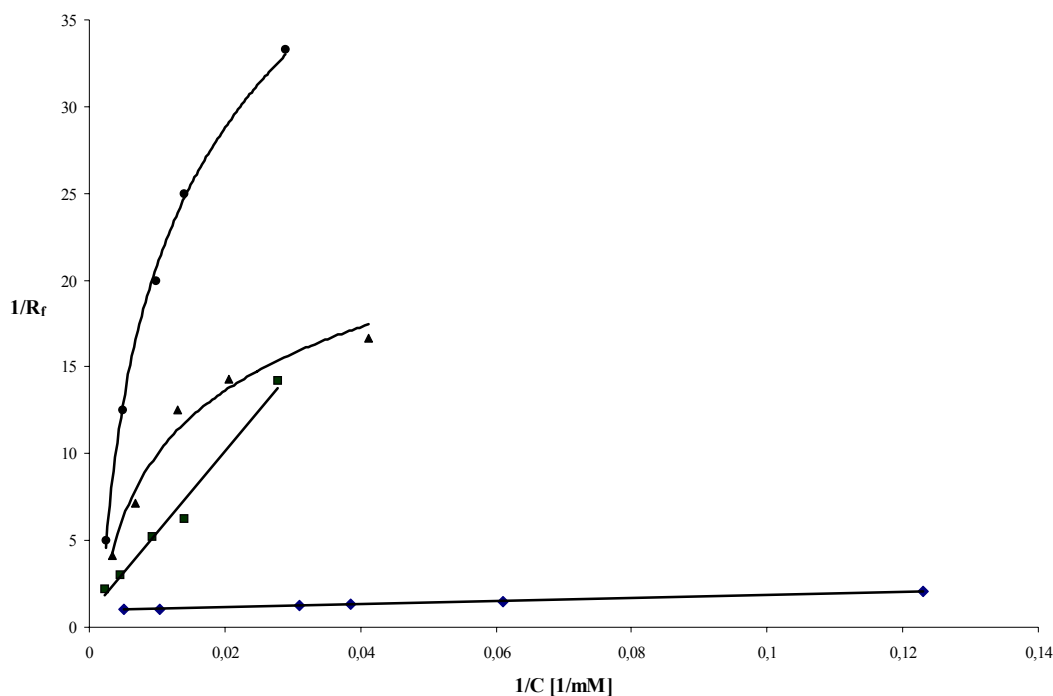
Ciecz jonowa	procent stężenie cieczy jonowej w acetonitrylu % (v/v)						
	0,000	0,125	0,250	0,400	0,500	1,500	3,000
Chinina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,05 (±0,01)	0,09 (±0,01)	0,11 (±0,01)	0,15 (±0,01)	0,27 (±0,02)	0,39 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,10 (±0,02)	0,13 (±0,01)	0,17 (±0,01)	0,18 (±0,01)	0,36 (±0,02)	0,50 (±0,03)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,12 (±0,01)	0,20 (±0,02)	0,24 (±0,01)	0,29 (±0,01)	0,46 (±0,01)	0,57 (±0,03)
Flufenazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,04 (±0,01)	0,08 (±0,01)	0,12 (±0,01)	0,15 (±0,01)	0,31 (±0,02)	0,45 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,10 (±0,02)	0,12 (±0,01)	0,15 (±0,02)	0,19 (±0,02)	0,37 (±0,02)	0,54 (±0,03)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,11 (±0,01)	0,19 (±0,02)	0,24 (±0,02)	0,31 (±0,02)	0,49 (±0,01)	0,63 (±0,03)
Tiorydazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,17 (±0,01)	0,26 (±0,01)	0,34 (±0,02)	0,39 (±0,02)	0,63 (±0,02)	0,75 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,26 (±0,02)	0,39 (±0,01)	0,47 (±0,02)	0,51 (±0,02)	0,73 (±0,01)	0,80 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,31 (±0,02)	0,48 (±0,01)	0,58 (±0,01)	0,63 (±0,02)	0,79 (±0,01)	0,84 (±0,01)
Chlorpromazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,18 (±0,02)	0,28 (±0,01)	0,36 (±0,02)	0,42 (±0,02)	0,65 (±0,02)	0,77 (±0,03)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,28 (±0,02)	0,41 (±0,01)	0,49 (±0,02)	0,54 (±0,03)	0,76 (±0,02)	0,84 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,33 (±0,01)	0,50 (±0,02)	0,61 (±0,01)	0,66 (±0,02)	0,82 (±0,01)	0,88 (±0,01)
Trifluopromazyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,24 (±0,02)	0,38 (±0,02)	0,49 (±0,03)	0,55 (±0,02)	0,77 (±0,02)	0,85 (±0,03)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,38 (±0,01)	0,52 (±0,01)	0,63 (±0,02)	0,69 (±0,02)	0,83 (±0,01)	0,90 (±0,03)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,40 (±0,02)	0,58 (±0,02)	0,69 (±0,01)	0,74 (±0,01)	0,88 (±0,02)	0,91 (±0,02)
Fenazolina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,35 (±0,02)	0,53 (±0,02)	0,65 (±0,03)	0,71 (±0,02)	0,90 (±0,03)	0,94 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,48 (±0,04)	0,67 (±0,02)	0,77 (±0,03)	0,80 (±0,02)	0,93 (±0,01)	0,95 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,52 (±0,01)	0,71 (±0,01)	0,80 (±0,01)	0,84 (±0,01)	0,95 (±0,01)	0,96 (±0,02)
Tiamenidyna							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,32 (±0,02)	0,48 (±0,02)	0,62 (±0,04)	0,68 (±0,01)	0,87 (±0,02)	0,91 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,45 (±0,03)	0,63 (±0,02)	0,74 (±0,02)	0,78 (±0,02)	0,92 (±0,01)	0,94 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,48 (±0,01)	0,67 (±0,02)	0,77 (±0,01)	0,80 (±0,02)	0,94 (±0,01)	0,96 (±0,02)
Nafazolina							
[HpOM-HxIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,29 (±0,02)	0,45 (±0,02)	0,57 (±0,03)	0,63 (±0,01)	0,85 (±0,01)	0,91 (±0,02)
[HxMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,41 (±0,02)	0,60 (±0,02)	0,71 (±0,03)	0,75 (±0,02)	0,92 (±0,01)	0,93 (±0,02)
[EMIM][BF ₄]	0,00 (±0,00)	0,44 (±0,02)	0,63 (±0,02)	0,74 (±0,02)	0,78 (±0,01)	0,93 (±0,01)	0,96 (±0,01)



Rycina 22. Zależność odwrotności współczynnika opóźnienia, $1/R_f$, dla tiamenidyny od odwrotności stężenia użytej cieczy jonowej, $1/C$: [EMIM][BF₄] (◆), [HxMIM][BF₄] (■) i [HpOM-HxIM][BF₄] (▲); Si 60 F₂₅₄ (linia przerywana), RP-18 F₂₅₄ S (linia ciągła).

nachylenia. Przyczyną osłabienia adsorpcji są prawdopodobnie elektrostatyczne oddziaływania odpychające między powierzchniowymi grupami SiO^- i grupami alkiloksyłowymi występującymi w analizowanej cząsteczce cieczy jonowej.

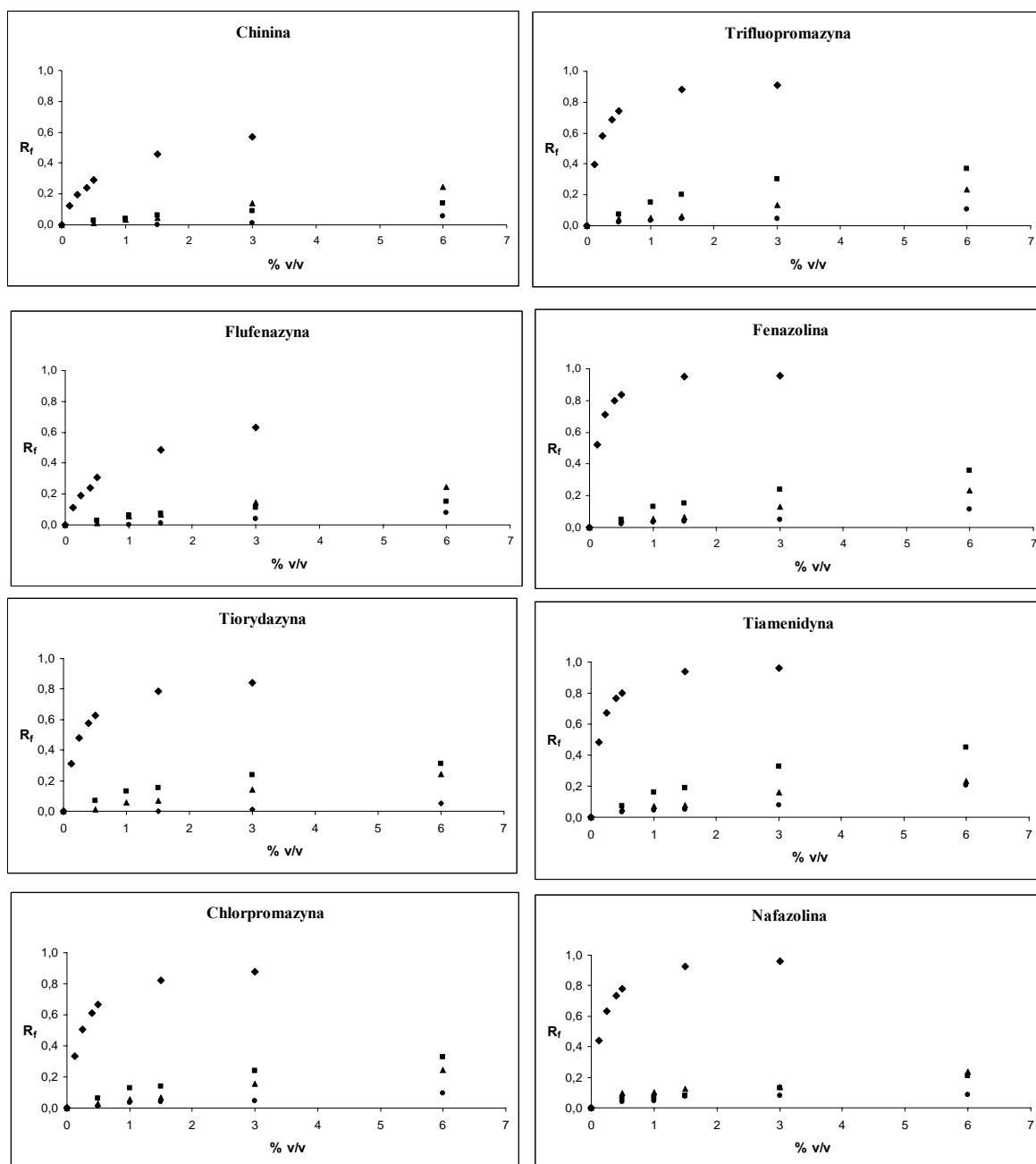
Analogiczne badanie przeprowadzono także dla powszechnie stosowanych w chromatografii cieczowej substancji tłumiących oddziaływania silanofilowe (rycina 23). Spośród porównywanych modyfikatorów fazy ruchomej tylko dla [EMIM][BF₄] i trietyloaminy (TEA) uzyskano liniową zależność między zaadsorbowaną ilością na powierzchni krzemionki i odwrotnością stężenia w fazie ruchomej. W obydwu przypadkach ekstrapolując liniową zależność $1/R_f$ od $1/C$ do nieskończonego wysokiego stężenia modyfikatora fazy ruchomej C (czyli do $1/C = 0$) otrzymano wartość $1/R_f = 1$, co oznaczałoby całkowite zahamowanie retencji tiamenidyny. Nachylenie prostej dla TEA, znacznie większe niż dla [EMIM][BF₄], oznacza znacznie słabszy stopień adsorpcji alkiloaminy w porównaniu z cieczą jonową. Na rycinie 23 ewidentny jest brak liniowości zależności $1/R_f$ od $1/C$ w przypadku DMOA i NH₄OH oraz znacznie słabsza zdolność tych dodatków do fazy ruchomej do adsorpcji na powierzchni fazy RP-18. Ostatnie dwa związki okazują się mało skuteczne jako inhibitory wiązania zasad przez silanole, gdyż



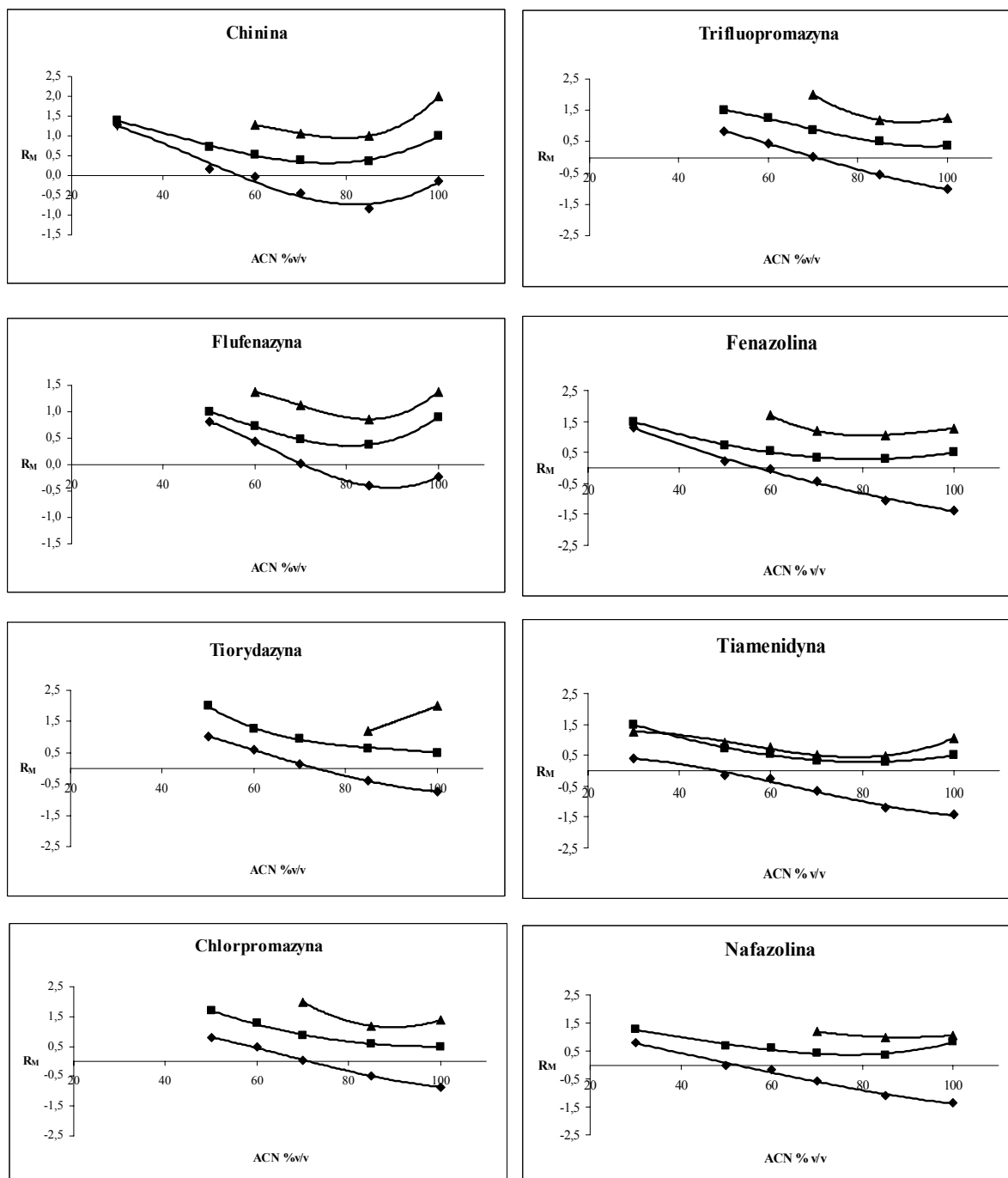
Rycina 23. Zależność odwrotności współczynnika opóźnienia, $1/R_f$, dla tiamenidyny od odwrotności stężenia użytego modyfikatora, $1/C$: [EMIM][BF₄] (◆), TEA (■), DMOA (▲) i NH₄OH (●); faza stacjonarna RP-18 F_{254s}.

nawet w największych stężeniach nie prowadziłyby do wartości $1/R_f = 1$ dla analitu testowego – tiamenidyny. Również w przypadku pozostałych zasad testowych, sole 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe charakteryzują się znacznie większym stopniem adsorpcji od innych badanych modyfikatorów fazy ruchomej. Znaczną przewagę [EMIM][BF₄] nad standardowymi modyfikatorami fazy ruchomej potwierdzają wyniki analizy TLC zamieszczone na rycinie 24.

Podjęto również badania oceniające wpływ inhibitorów silanoli na parametry retencji analitów zasadowych w zależności od stężenia rozpuszczalnika organicznego, acetonitrylu, w wodno-organiczej fazie ruchomej. Przy zastosowaniu [EMIM][BF₄], w przypadku analitów chlorpromazyny, fenazoliny, nafazoliny, tiamenidyny oraz trifluopromazyny widać silną zależność liniową pomiędzy ich wartością R_M i stężeniem acetonitrylu w binarnej fazie ruchomej (rycina 25). Liniowe zależności R_M od procentowej zawartości acetonitrylu (v/v) odpowiadałyby klasycznemu modelowi Snydera-Soczewińskiego retencji w tzw. odwrotnym układzie faz w chromatografii cieczowej. Największe zakresy liniowości, świadczące o skutecznym wytlumieniu oddziaływań silanofilowych obserwować można po zastosowaniu [EMIM][BF₄].



Rycina 24. Zależność współczynnika opóźnienia, R_f , dla ośmiu związków testowych w zależności od stężenia w acetonitrylu modyfikatora fazy ruchomej [EMIM][BF₄] (◆), TEA (■), DMOA (▲) i NH₄OH (●); faza stacjonarna RP-18 F_{254s}.



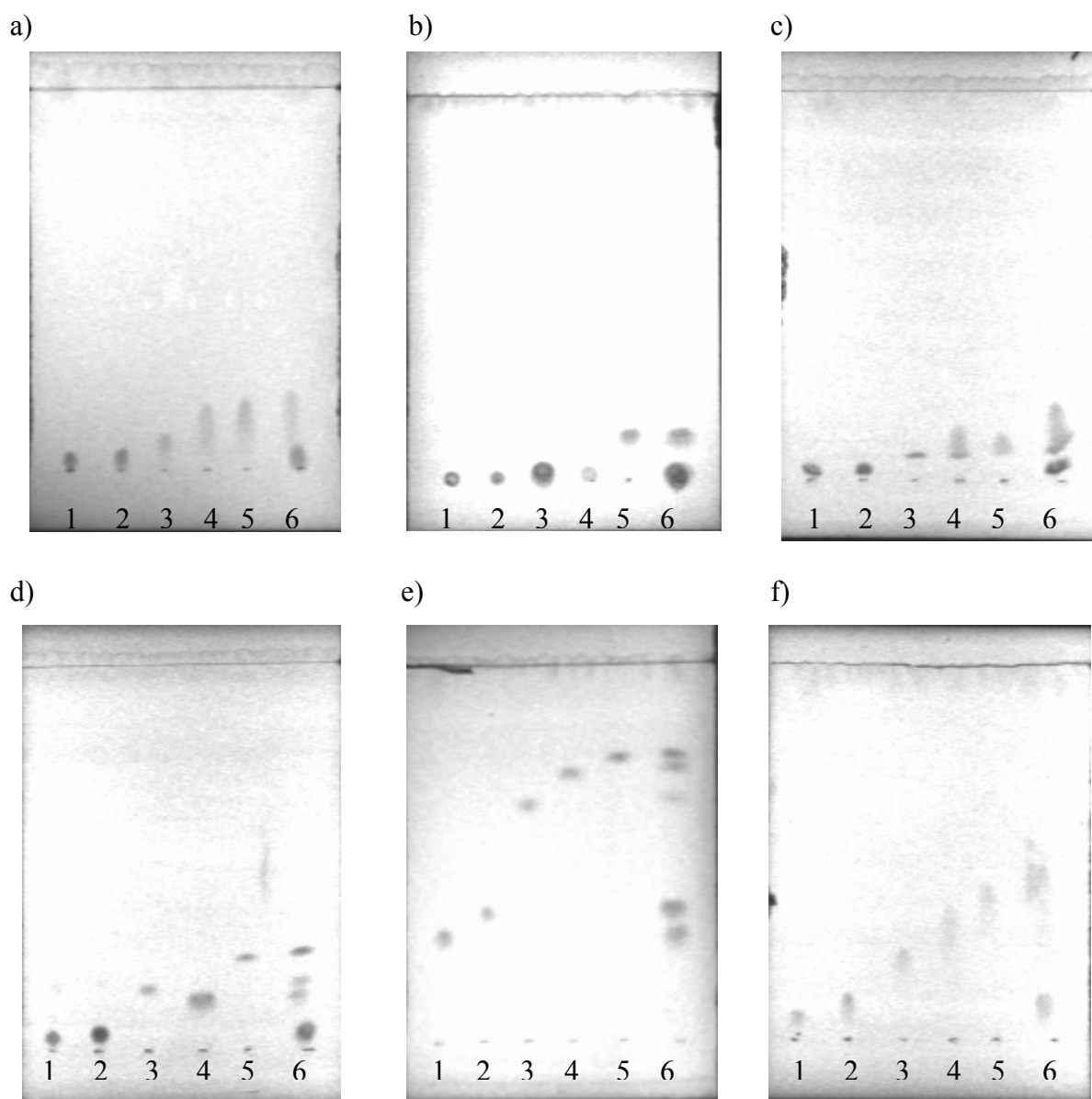
Rycina 25. Wykresy zależności R_M od zawartości procentowej acetonitrylu (% v/v) w wodno-organicznej fazie ruchomej przy stałym stężeniu trzech modyfikatorów (3 % v/v): [EMIM][BF₄] (◆), TEA (■) i NH₄OH (▲); faza stacjonarna RP-18 F_{254s}.

Spełnienie liniowej zależności R_M od stężenia rozpuszczalnika organicznego w eluencie w szerokim zakresie stężeń, umożliwia stosowanie układu chromatograficznego do wyznaczenia miar lipofilowości analitów zasadowych poprzez ekstrapolację do wartości R_M^0 . Uzyskana liniowość może również być wykorzystana do przewidywania zmian retencji wynikających ze zmian składu fazy ruchomej w metodzie elucji izokratycznej lub gradientowej, a w konsekwencji do optymalizacji rozdzieleń HPLC. W przypadku chininy i flufenazyny obserwuje się wyraźne odchylenia od liniowości przy małej zawartości wody w fazie ruchomej. Brak na rycinie 25 wykresów w przypadku DMOA oraz dla pełnego zakresu składu eluentu w przypadku NH_4OH spowodowany jest niemierzalnymi wartościami R_M .

Poprzez modyfikację składu fazy ruchomej dokonano optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego metodą TLC mieszaniny 5 związków zasadowych. Rycina 26 a-e przedstawia rozdzielanie mieszaniny analitów w układzie acetonitryl:woda 60/40 (v/v) na fazie RP-18 F_{254s} z dodatkiem do eluentu 1,5 % (v/v) różnych modyfikatorów hamujących wpływ na retencję wolnych grup silanolowych na powierzchni fazy stacjonarnej. Brak modyfikatora w układzie chromatograficznym oraz wpływ DMOA i TEA okazał się niewystarczający dla osiągnięcia całkowitego rozdzielania mieszaniny zasad testowych. Układ zawierający $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$ charakteryzuje się znacznie lepszą zdolnością elucyjną oraz dużą rozdzielczością (rycina 26 e). Zatem, zastosowanie soli 1-alkilo-3-metyloimidazoliowej umożliwia szybkie rozdzielanie oraz identyfikację wieloskładnikowej mieszaniny zasad.

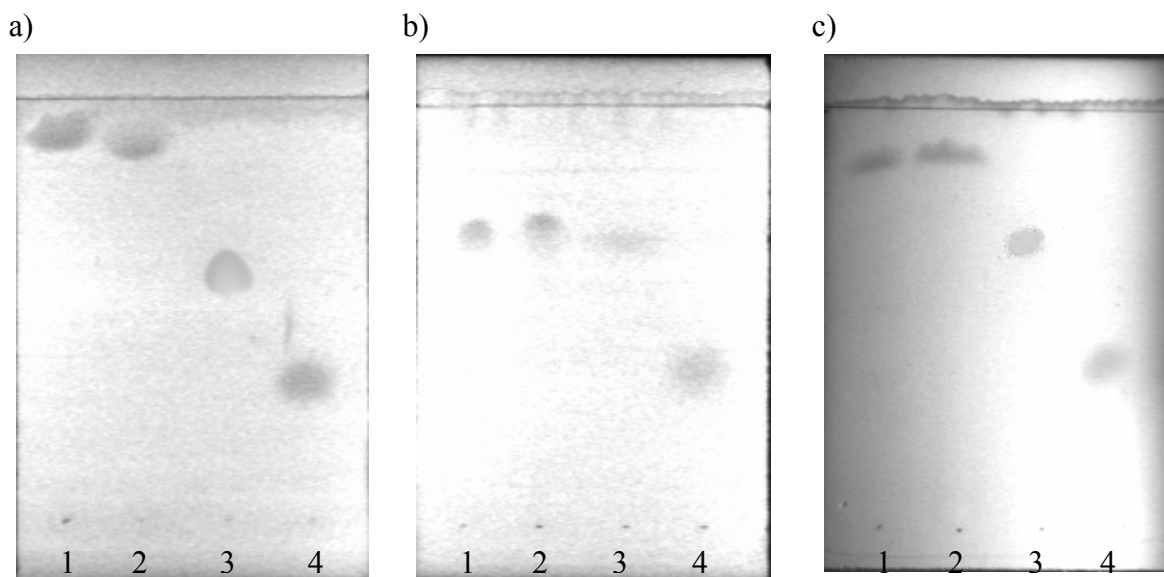
Ponieważ dodatek 1,5 % (v/v) $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$ do roztworu acetonitryl:woda 60/40 (v/v) nadaje fazie ruchomej pH 2,87, to mieszaninę związków testowych poddano analizie chromatograficznej w odpowiednio buforowanym układzie bez dodatku inhibitorów silanoli. Jak można zauważyć na rycinie 26 g, zastosowanie buforu o pH równym pH roztworu soli imidazoliowej nie zapewnia rozdzielania badanych zasad. Uzyskany wynik świadczy o istotności specyficznych oddziaływań cieczy jonowych z powierzchnią krzemionki i małym wpływem niskiego pH, które hamuje dysocjację silanoli.

Wpływ soli 1-etylo-3-metyloimidazoliowej na retencję związków obojętnych i kwasów przedstawiony jest na rycinie 27. Zmniejszona elucja kwasu acetylosalicylowego oraz kwasu salicylowego po zastosowaniu układu z dodatkiem cieczy jonowej, wynika przypuszczalnie z ograniczenia efektu elektrostatycznego odpychania (wykluczania)



Rycina 26. Zdjęcia płytek chromatograficznych przedstawiające rozkład plamek kolejno od lewej: 1 – tiorydazyny, 2 – trifluopromazyny, 3 – fenazoliny, 4 – nafazoliny, 5 – tiamenidyny oraz 6 – ich mieszaniny otrzymany z użyciem eluentu: a) acetonitryl:woda 60/40 (v/v), b) acetonitryl:woda 60/40 (v/v) z dodatkiem 1,5 % (v/v) NH_4OH , c) acetonitryl:woda 60/40 (v/v) z dodatkiem 1,5 % (v/v) DMOA, d) acetonitryl:woda 60/40 (v/v) z dodatkiem 1,5 % (v/v) TEA, e) acetonitryl:woda 60/40 (v/v) z dodatkiem 1,5 % (v/v) $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$, f) acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona 60/40 (v/v) pH 2,87; faza stacjonarna RP-18 F_{254s}.

związków anionogennych przez ujemnie naładowane grupy silanolowe. Analogicznie do zasad, efekt ten nie wynika ze zmiany pH eluentu spowodowanej przez dodatek cieczy jonowej. W przypadku związku niejonogenego, 2,3-dimetoksytolenu, stwierdzono brak wpływu dodatku $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$ na jego retencję. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką skuteczność cieczy jonowych w tłumieniu oddziaływań silanofilowych.



Rycina 27. Zdjęcia płytek chromatograficznych przedstawiające rozkład plamek kolejno od lewej: 1 – kwasu acetylosalicylowego, 2 – kwasu salicylowego, 3 – fenolu, 4 – 2,3-dimetoksytoluenu otrzymany z użyciem eluentu: a) acetonitryl:woda 60/40 (v/v), b) acetonitryl:woda 60/40 (v/v) z dodatkiem 1,5 % (v/v) [EMIM][TFB], c) acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona 60/40 (v/v) pH 2,87; faza stacjonarna RP-18 F_{254s}.

4.2. Analiza związków zasadowych metodą HPLC

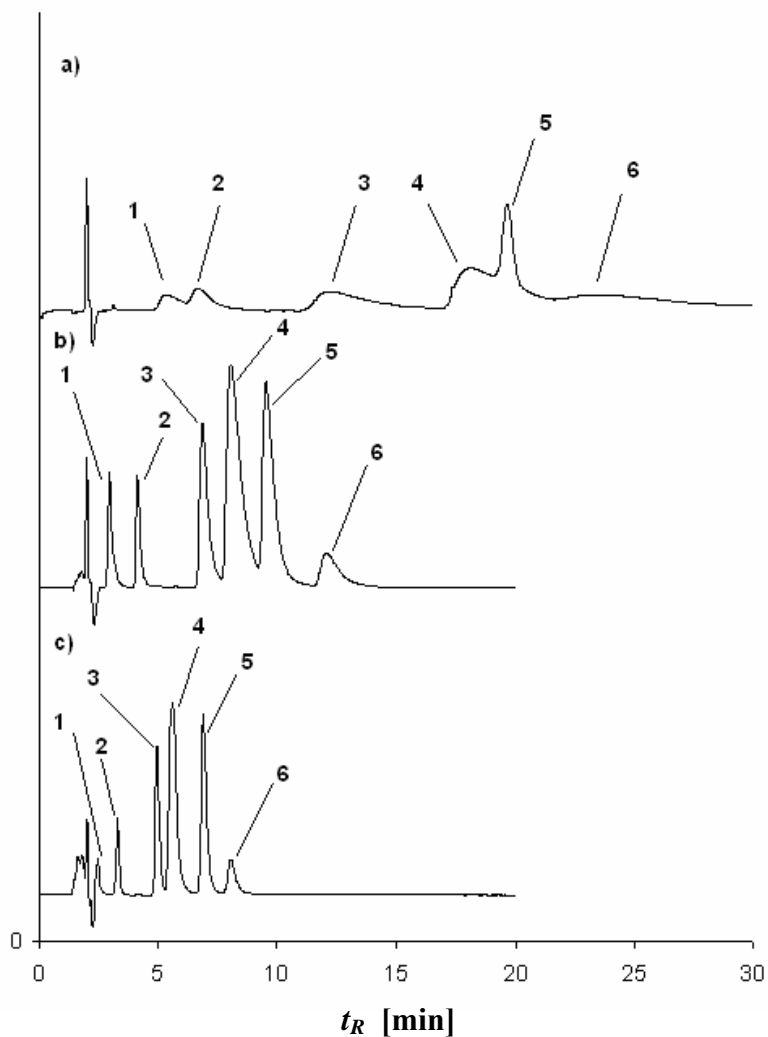
4.2.1. Wpływ metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego na retencję zasad w HPLC

Przeprowadzono wstępne studia nad możliwością zastosowania cieczy jonowych jako modyfikatorów fazy ruchomej w technice HPLC z użyciem kolumny RP-18. Podobnie jak w przypadku TLC, przedstawione w tabeli 9 parametry retencji, t_R , analitów

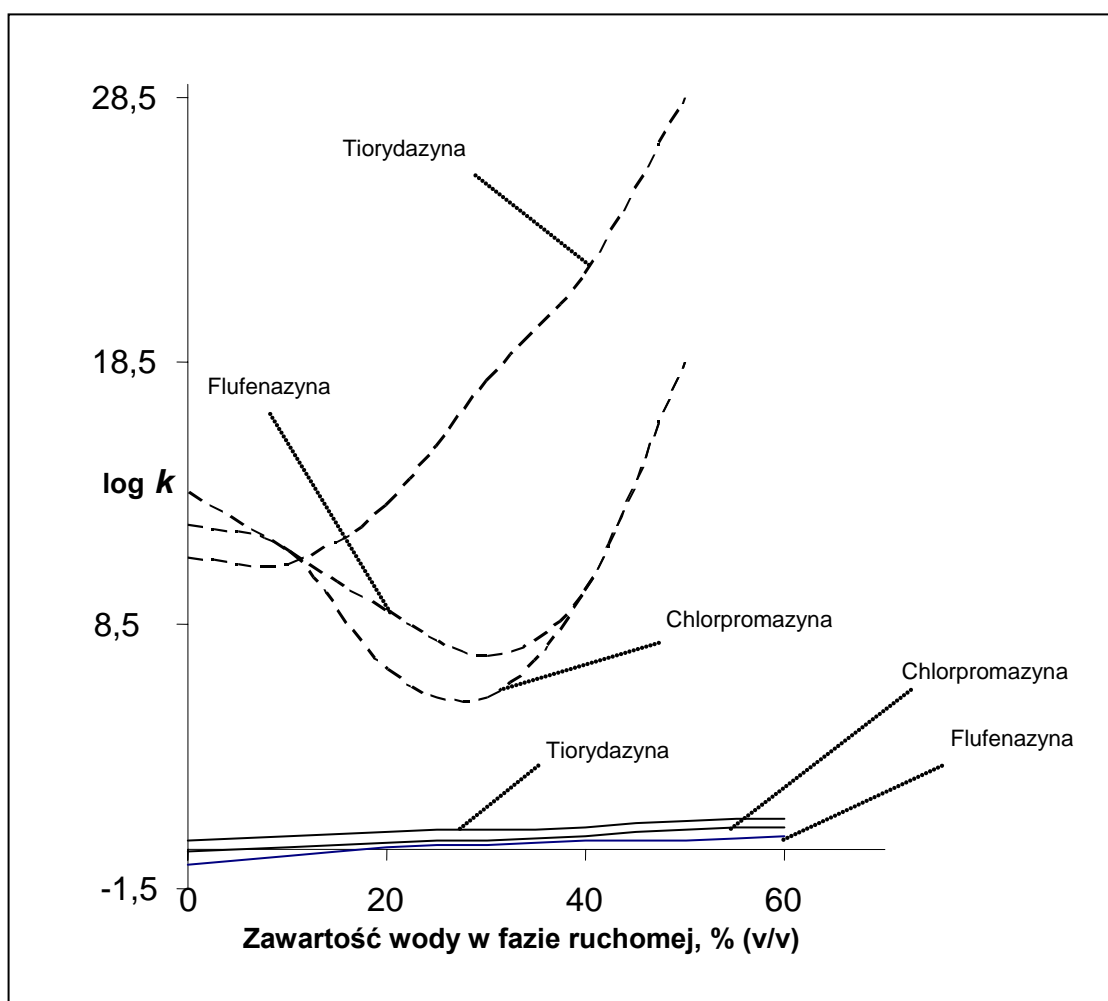
Tabela 9. Średnie wartości czasów retencji, t_R , uzyskanych w układzie 30/70 % (v/v) acetonitryl:bufor fosforanowy pH 3 z dodatkiem [MMIM][MSO₄], na kolumnie chromatograficznej LiChrospher RP-18.

Stężenie [MMIM][MSO ₄] [mM]	t_R [min]						
	0	3,2	9,6	22,4	32	64	96
Anality:							
Flufenazyina	>100	>100	>100	67,71	63,60	41,04	37,65
Tiorydazyina	>100	>100	>100	>100	>100	>100	98,43
Chlorpromazyina	>100	>100	>100	72,51	70,37	50,05	48,43
Trifluopromazyina	>100	>100	>100	>100	>100	88,43	84,45
Fenazolina	27,20	21,44	18,59	13,68	13,01	11,15	10,96
Nafazolina	13,20	6,72	5,84	4,77	4,59	4,19	4,16
Propiomazyina	>100	91,68	72,11	46,51	43,01	33,87	33,39

zasadowych świadczą o silnym spadku retencji w zastosowanym układzie chromatograficznym ze wzrastającym stężeniem [MMIM][MSO₄]. Wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej powinien skrócić czas analizy do mierzalnej wartości. Porównując tabelę 9 i rycinę 28 a wzrost stężenia acetonitrylu znacznie obniża t_R chromatografowanych zasad. Jednak układ charakteryzuje się słabą rozdzielczością oraz nieakceptowanym kształtem pików. [MMIM][MSO₄] w stężeniu 3,2 mM obniża t_R a stężenie 32 mM w znaczny sposób podwyższa rozdzielczość układu (rycina 28 b i c).



Rycina 28. Porównanie chromatogramów mieszaniny zasad otrzymanych przy użyciu fazy ruchomej 50/50 (% v/v) acetonitryl:bufor fosforanowy 100 mM pH 3 na kolumnie LiChrospher RP-18: a) bez dodatku modyfikatora, b) z dodatkiem 3,2 mM [MMIM][MSO₄], c) z dodatkiem 32 mM [MMIM][MSO₄]; anality: 1 – nafazolina, 2 – fenazolina, 3 – flufenazyina, 4 – chlorpromazyina, 5 – trifluopromazyina, 6 – tiorydazyina.



Rycina 29. Zależność logarytmu współczynnika retencji, $\log k$, od zawartości procentowej wody w binarnej fazie ruchomej acetonitryl:woda pH 3 wyznaczonego na kolumnie LiChrospher RP-18; - - - - - faza ruchoma bez cieczy jonowej; ——— faza ruchoma z dodatkiem 32 mM [MMIM][MSO₄].

W celu rozwinięcia badań nad wpływem soli imidazoliowej na retencję związków zasadowych, zasadowe anality testowe poddano procesowi chromatograficznemu z zastosowaniem binarnej fazy stacjonarnej acetonitryl:woda w różnych kompozycjach od 100/0 do 40/60 % (v/v) metodą elucji izokratycznej. Analizę przeprowadzono w pH 3, które powinno zapewnić całkowite zahamowanie dysocjacji silanoli. W przypadku braku [MMIM][MSO₄] w fazie ruchomej widoczny jest nieliniowy przebieg retencji tiorydazyny, chlorpromazyny i flufenazyny (rycina 29). Początkowo retencja analitów spada wraz ze wzrostem stężenia wody. Jednak powyżej 30 % (v/v) wody retencja gwałtownie wzrasta osiągając powyżej 60 % (v/v) wartości niemierzalne. Zjawisko to świadczy o złożonym mechanizmie retencji, który utrudnia przewidywania retencji zasad w oparciu o

standardowe modele matematyczne. Można zauważyć, że dodatek 32 mM [MMIM][MSO₄] do podstawowej fazy ruchomej daje liniowe zależności $\log k$ od ułamka objętościowego wody. Świadczy to o silnym wyeliminowaniu oddziaływań silanofilowych.

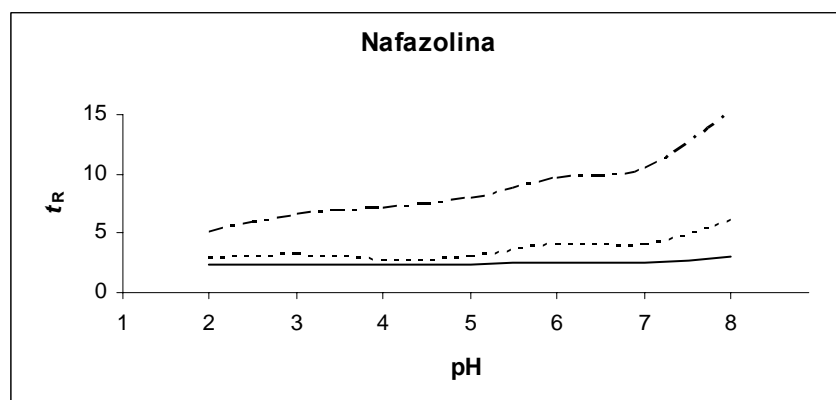
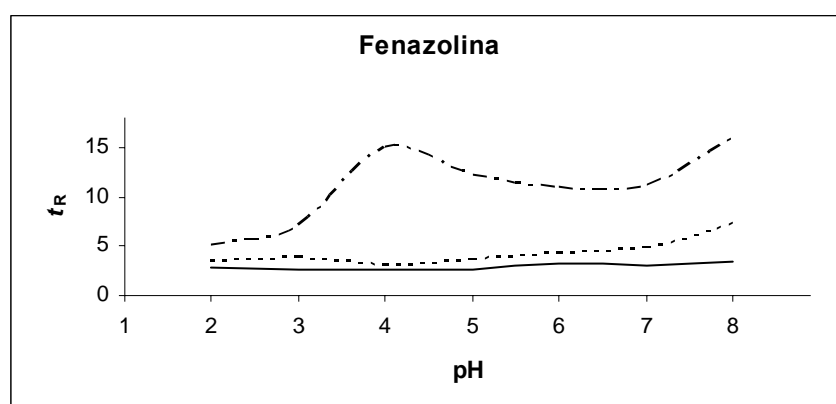
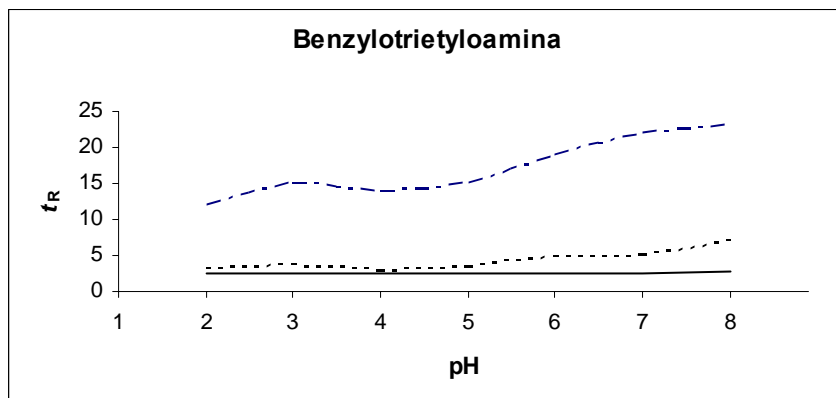
4.2.2. Wpływ pH na skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez metylosiarczan 1,3-dimetyloimidazoliowy

Wpływ stężenia [MMIM][MSO₄] na retencję zasad w różnym pH eluentu przedstawiono na rycinie 30 i 31. W przypadku chromatografowania benzylotrietyloaminy w fazie ruchomej bez cieczy jonowej widoczne są dwa maksima w pobliżu pH 3 i 7. Świadczy to o występowaniu dwóch rodzajów ugrupowań: wolnych grup silanolowych o charakterze słabego kwasu oraz grup bliźniaczych o mniejszym charakterze kwasowym. Analogiczna sytuacja przedstawia się dla pozostałych zasad o $pK_a > 10$: fenazoliny i nafazoliny. Maksimum retencji w pH 4 w przypadku fenazoliny spowodowane jest występowaniem dodatkowego ugrupowania w cząsteczce o pK_a 2,5. Dla zasad, których pK_a wynosi 8,1-9,5 widoczna jest większa retencja w pH > 6 (rycina 31). Stosowanie fazy ruchomej o pH > 5 wydłuża analizę chromatograficzną związków zasadowych powyżej wartości t_R dopuszczalnych w praktyce laboratoryjnej.

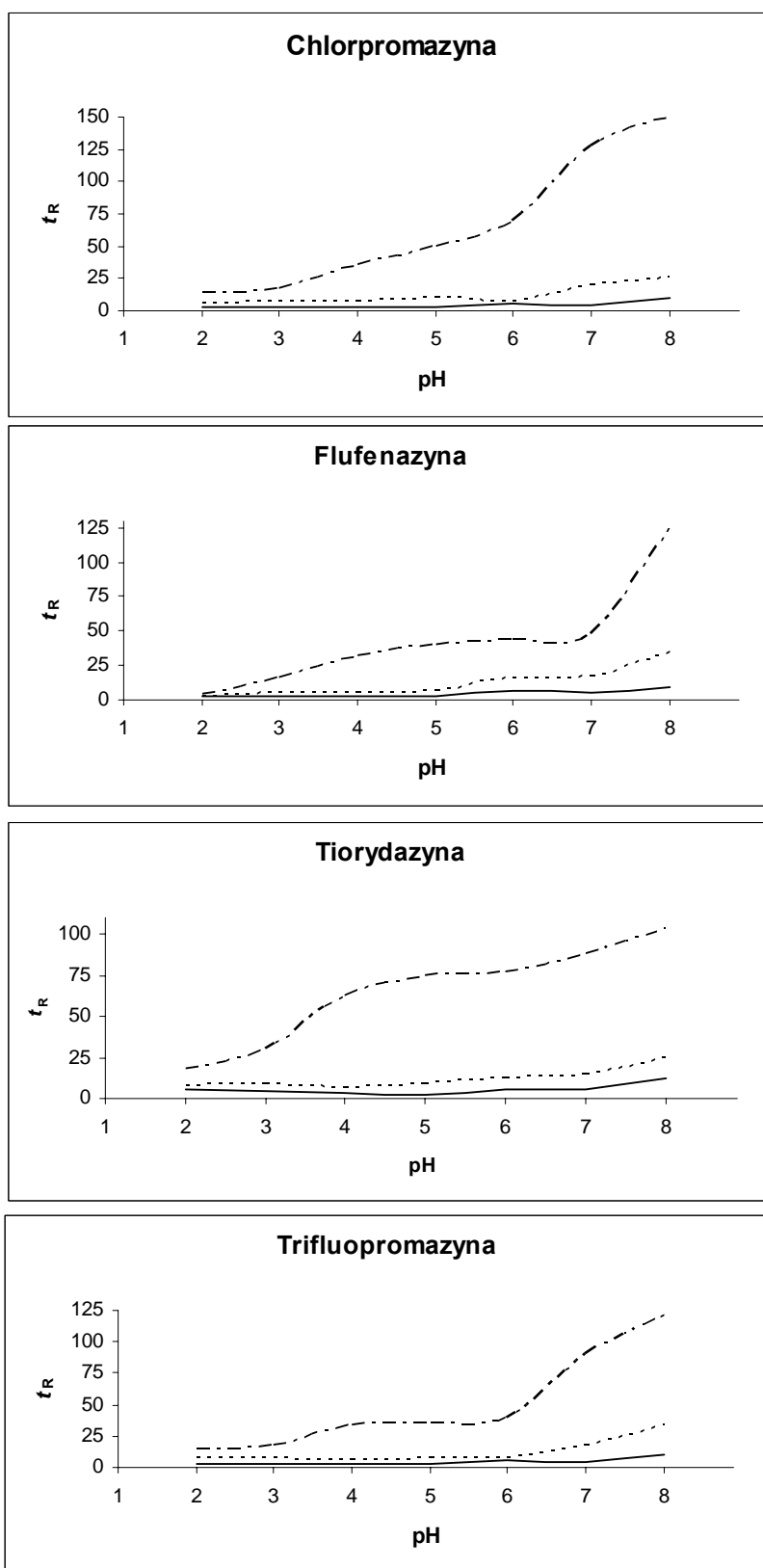
Znając wpływ cieczy jonowych na oddziaływania silanofilowe, w przypadku zastosowania fazy ruchomej modyfikowanej [MMIM][MSO₄] można spodziewać się zmiany t_R analizowanych związków. Już dla 6,4 mM stężenia dodatku widoczny jest stosunkowo duży spadek t_R . Niewielki wzrost retencji w wysokim pH spowodowany jest deprotonacją zasad. Wzrost retencji formy niezdisocjowanej spowodowany jest wzrostem wpływu oddziaływań hydrofobowych. Piętnastokrotny wzrost stężenia [MMIM][MSO₄] (do 96 mM) powoduje dalszy spadek retencji. Jest on jednak stosunkowo niewielki w porównaniu do spadku wywołanego stężeniem 6,4 mM. Świadczy to o szybkim wysyceniu przez kationy imidazoliowe miejsc na krzemionce zdolnych do wymiany jonowej.

4.2.3. Wpływ temperatury na retencję związków zasadowych w HPLC z zastosowaniem metylosiarczanu 1,3-dimetyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej

Porównując dane retencyjne zasad zauważyć można systematyczny wzrost k wraz z



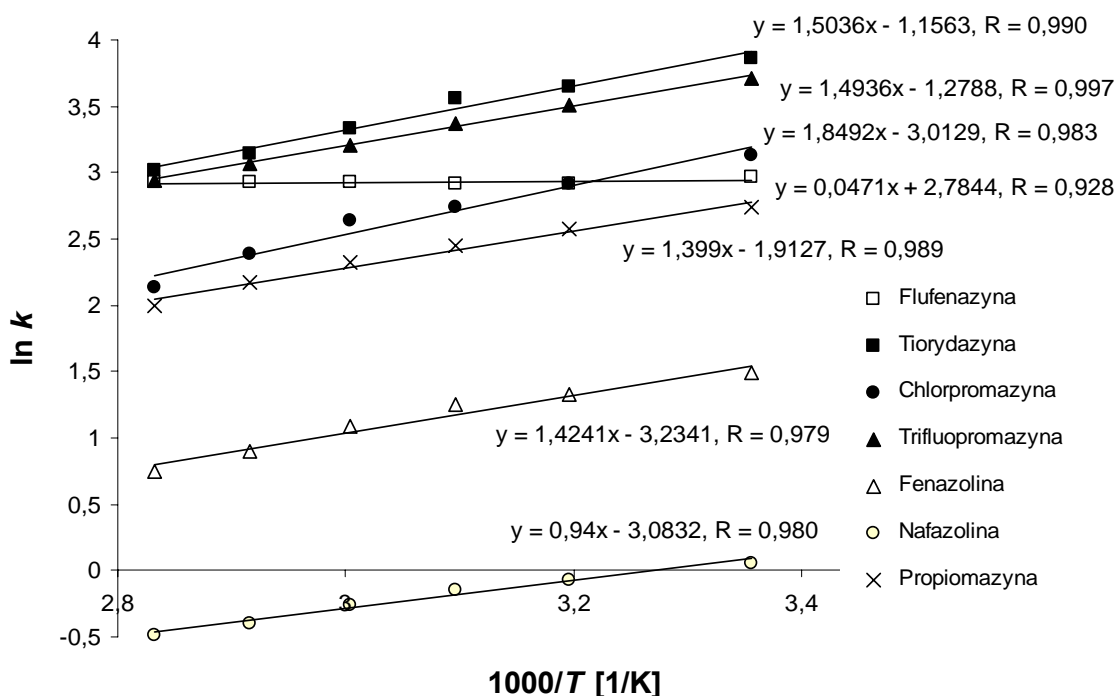
Rycina 30. Wpływ stężenia [EMIM][MSO₄] na retencję zasad o $pK_a > 10$ w różnym pH eluentu:
 - - - - - 50/50 % (v/v) acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona; 50/50 % (v/v) acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona z dodatkiem 6,4 mM [EMIM][MSO₄]; _____ 50/50 % (v/v) acetonitryl:bufor Brittona-Robinsona z dodatkiem 96 mM [EMIM][MSO₄].



Rycina 31. Wpływ stężenia [MMIM][MSO₄] na retencję zasad o pK_a 8,1-9,5 w różnym pH eluentu: - - - - - 50/50 % (v/v) acetonitril:bufor Brittona-Robinsona; 50/50 % (v/v) acetonitril:bufor Brittona-Robinsona z dodatkiem 6,4 mM [EMIM][MSO₄]; _____ 50/50 % (v/v) acetonitril:bufor Brittona-Robinsona z dodatkiem 96 mM [EMIM][MSO₄].

obniżeniem temperatury przy stałym stężeniu [EMIM][MSO₄] (rycina 32). Wpływ temperatury w układzie chromatograficznym niezawierającym [EMIM][MSO₄] był niemożliwy do oceny z powodu wysokich wartości $t_R > 100$ min (tabela 9). Dodatek cieczy jonowej nie tylko umożliwił chromatografię zasad, ale również wpłynął na zachowanie chromatograficzne analitów zgodne z liniową funkcją Van't Hoffa ($\ln k = f(1/T)$) ($R > 0,9288$). Liniowy wykres świadczy o stałym mechanizmie retencji w zakresie badanych temperatur. Stały mechanizm retencji wynika z ustalenia procesu równowagi podziału substancji chromatografowanej między fazą stacjonarną i ruchomą oraz o stabilizacji kompleksu ciecz jonowa-grupa silanolowa.

Na odmienne zachowanie chromatograficzne flufenazyny może mieć wpływ grupa hydroksylowa w strukturze chemicznej cząsteczki ($pK_a = 3,9$). Wraz ze zmianą temperatury zmienia się stała jonizacji tej grupy funkcyjnej. Zjonizowana grupa hydroksylowa przyciąga kationy imidazoliowe tworząc kompleks grupa hydroksylowa

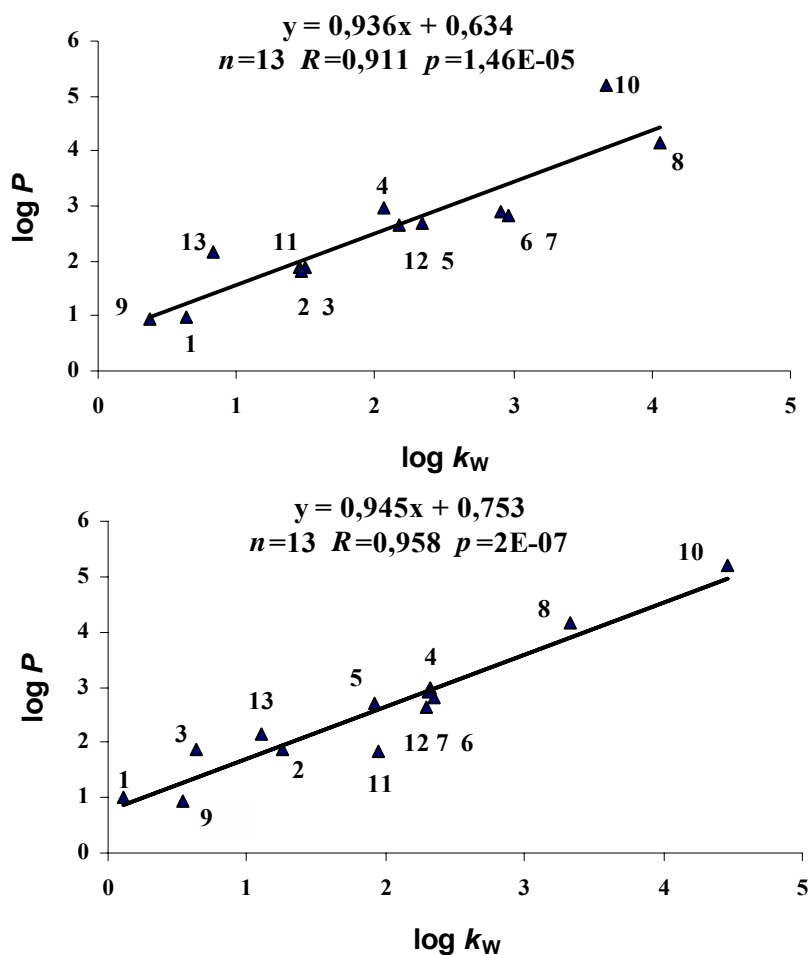


Rycina 32. Zależność $\ln k = f(1/T)$ dla związków zasadowych. Układ chromatograficzny acetonitryl:bufor fosforanowy 100 mM 30/70 (% v/v) pH 3 z dodatkiem 3,64 mM [EMIM][MSO₄]; kolumna chromatograficzna LiChrospher RP-18.

flufenazyny-kation imidazoliowy. Powstałe kompleksy mogą wpłynąć na spadek retencji flufenazyny w funkcji $\ln k = f(1/T)$.

4.2.4. Wyznaczanie hydrofobowości metodą HPLC z użyciem tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego jako modyfikatora fazy ruchomej

Celem eksperymentu było porównanie zależności pomiędzy chromatograficznym parametrem hydrofobowości, $\log k_w$, otrzymanym z dwóch liniowych przebiegów gradientowych i $\log P$, który jest standardową miarą lipofilowości leków. W przypadku kolumny RP-18 wykazano różnicę współczynników korelacji zależności $\log k_w$ vs. $\log P$ uzyskanych w układzie metanolowo-wodnym bez oraz z dodatkiem [EMIM][BF₄] (rycina 33).



Rycina 33. Zależność między logarytmem współczynnika podziału *n*-oktanol-woda, $\log P$, i chromatograficznym parametrem hydrofobowości, $\log k_w$, dla serii analitów: 1 – anilina, 2 – 4-chloroanilina, 3 – metoprolol, 4 – propranolol, 5 – 3,4-dichloroanilina, 3,5 – dichloroanilina, 7 – betaksolol, 8 – fenotiazyna, 9 – 4-metoksyanilina, 10 – tiorydazyna, 11 – timolol, 12 – chinina, 13 – N-etyloanilina; $\log k_w$ wyznaczono na podstawie danych retencyjnych z dwóch liniowych przebiegów gradientowych (t_G 20 min i 60 min), zmieniając zawartość metanolu (5-100 (% v/v)) w mieszaninie: a) metanol:bufor Brittona Robinsona pH 3, b) metanol:bufor Brittona Robinsona pH 3 z dodatkiem 64 mM [EMIM][BF₄].

Stosując ciecz jonową jako modyfikator fazy ruchomej odnotowano wysoką korelację: $R = 0,958$. Korelacja danych $\log k_w$ uzyskanych bez modyfikatora imidazoliowego z $\log P$ jest niższa, ale również relatywnie silna ($R = 0,911$). Różnica we współczynnikach korelacji wynika z obecności wolnych grup silanolowych w fazie węglowodorowej związanej chemicznie z nośnikiem krzemionkowym, zaburzających liniową zależność Snydera-Soczewińskiego. Wartości $\log k_w$ uzyskane z dwóch liniowych przebiegów gradientowych w układzie metanolowo-wodnym z dodatkiem [EMIM][BF₄] są wiarygodne i odzwierciedlają właściwości hydrofobowe rozdzielanego związku.

4.2.5. Analiza porównawcza skuteczności tłumienia oddziaływań silanofilowych przez imidazoliowe ciecze jonowe z wykorzystaniem dwuparametrowego modelu retencji Horvátha

Otrzymanie silnej korelacji $R > 0,939$ między $[AH^+]/(k_o - k)$ i $[AH^+]$ dla wszystkich badanych cieczy jonowych pozwoliło na zastosowanie dwuparametrowego modelu retencji celem wyznaczenia stałej trwałości kompleksu kation imidazoliowy-grupa silanolowa, K_A . Z danych otrzymanych dla serii soli imidazoliowych wynika, że parametr K_A przyjmuje różne wartości w zależności od struktury chemicznej użytej cieczy jonowej (tabela 10). Analizując szereg homologiczny tetrafluoroboranów 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych zauważa się wzrost K_A wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w pozycji C-1 pierścienia imidazoliowego. Systematyczna zmiana wartości K_A dla szeregu homologicznego tetrafluoroboranów widoczna jest w przypadku użycia zasad testowych: benzylotrietyloaminy i chlorpromazyny. Najwyższe wartości K_A uzyskano dla pochodnych 1-oktylo-3-metyloimidazoliowych. Większa wartość K_A dla długołańcuchowych cieczy jonowych jest wynikiem silniejszej adsorpcji kationów 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych na powierzchni oktaedecylorkrzemionkowej fazy stacjonarnej.

Mniejsza skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez TEA niż przez 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe ciecze jonowe spowodowana jest prawdopodobnie jej słabszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi z ujemnie naładowanymi grupami silanolowymi. Dodatkowo, dostępność alkiloaminy do powierzchniowych grup hydroksylowych jest utrudniona poprzez steryczną przeszkodę, jaką są łańcuchy oktaedecylowe fazy stacjonarnej.

Tabela 10. Stała trwałości kompleksu jonowego kation imidazoliowy-grupa silanolowa, K_A , współczynnik korelacji, R , poziom istotności, p , oraz błąd standardowy, s , dla równania $[AH^+]/(k_0 - k) = f([AH^+])$ dla analitów zasadowych (benzylotrietyloaminy i chlorpromazyny) wyznaczonego metodą HPLC z użyciem fazy ruchomej 50/50 (% v/v) acetonitryl:woda pH 3 z dodatkiem 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych i trietyloaminy; n = 6.

Typ cieczy jonowej	Benzylotrietyloamina				Chlorpromazyna			
	$K_A \times 10^{-3} [M^{-1}]$	R	p	s	$K_A \times 10^{-3} [M^{-1}]$	R	p	s
[EMIM][BF ₄]	2,15	0,996	2,41E-08	0,089	7,40	0,992	6,00E-11	0,019
[PMIM][BF ₄]	2,37	0,996	1,78E-08	0,082	8,68	0,998	2,02E-10	0,027
[BMIM][BF ₄]	2,38	0,998	2,51E-08	0,090	9,45	0,997	1,91E-10	0,026
[HxMIM][BF ₄]	2,71	0,997	9,68E-09	0,071	17,95	0,994	2,72E-10	0,029
[OMIM][BF ₄]	3,12	0,998	4,75E-09	0,059	18,43	0,998	0,39E-10	0,022
[MMIM][MSO ₄]	2,45	0,995	3,00E-05	0,532	14,31	0,996	3,49E-10	0,031
[EMIM][ESO ₄]	2,61	0,996	2,14E-05	0,487	7,09	0,998	7,41E-07	0,211
[BMIM][OSO ₄]	1,90	0,998	4,78E-06	0,335	0,94	0,999	7,54E-09	0,037
[EMIM][Br]	3,57	0,999	1,12E-06	0,233	8,24	0,998	2,03E-09	0,048
[EMIM][Cl]	2,99	0,995	6,05E-06	0,355	7,90	0,995	4,10E-09	0,085
[EMIM][Ts]	0,26	0,939	2,14E-05	0,487	6,36	0,998	1,94E-08	0,084
[BMIM][Br]	2,59	0,998	1,87E-06	0,097	7,05	0,998	7,98E-10	0,038
[BMIM][Cl]	2,89	0,998	3,52E-07	0,052	6,94	0,999	7,65E-10	0,037
[OMIM][Cl]	5,58	0,999	8,55E-06	0,068	16,28	0,999	1,18E-10	0,023
TEA	1,13	0,987	6,00E-03	1,122	0,61	0,920	1,80E-02	2,604

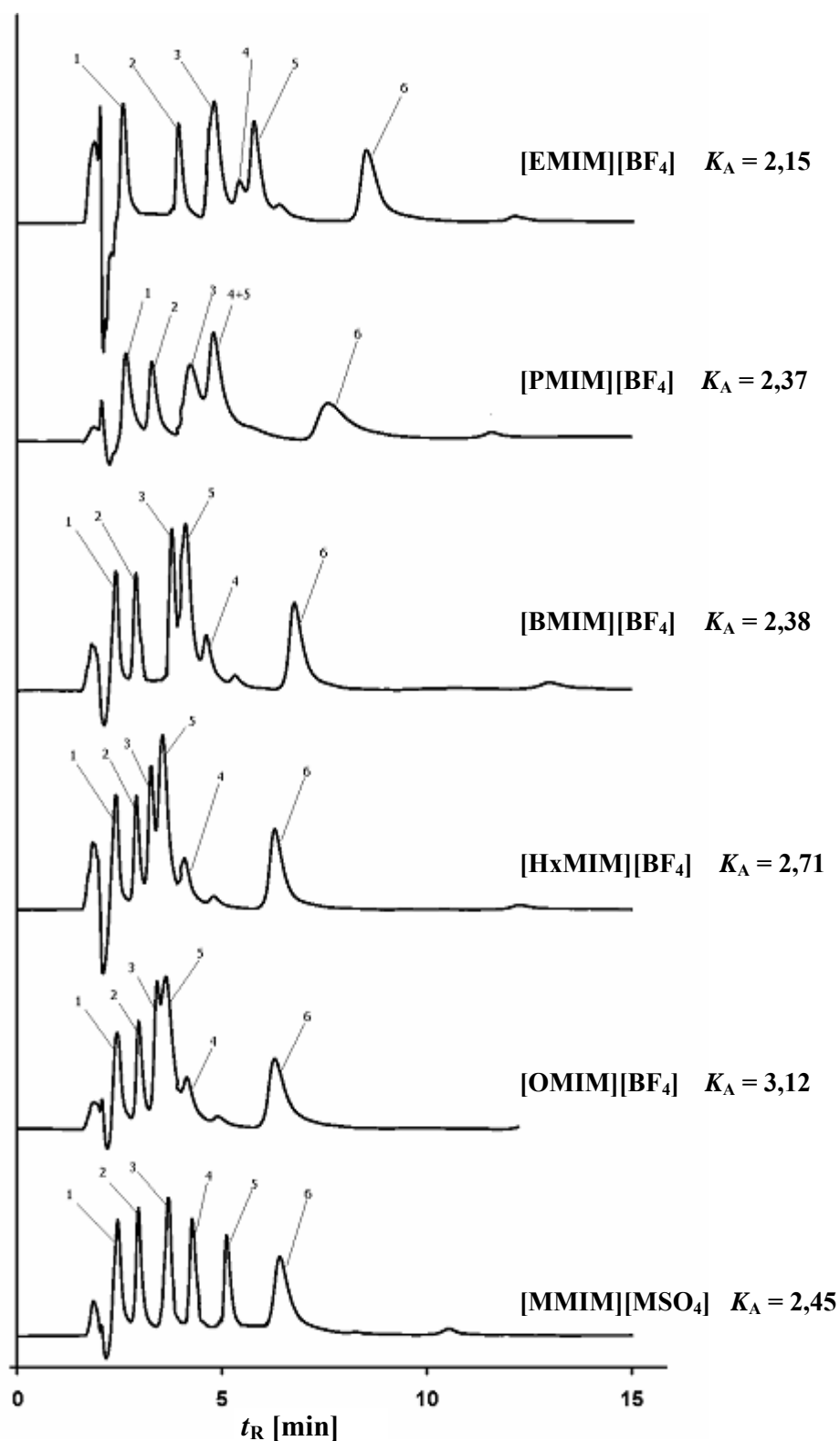
Przeprowadzono również badania wpływu rodzaju anionu wchodzącego w skład cząsteczki cieczy jonowej na wartość K_A . Stosując benzylotrietyloaminę jako zasadowy analit testowy, K_A osiąga się większą wartość dla chlorków i bromków 1-etylo-3-metylo-, 1-butylo-3-metylo- oraz 1-metylo-3-oktyloimidazoliowych niż dla pochodnych alkilosiarczanowych i tetrafluoroboranowych. Niższe wartości K_A dla tetrafluoroboranów oraz alkilosiarczanów świadczą o tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy atomem wodoru łańcucha alkilowego (C-1) pierścienia imidazoliowego a wolną parą elektronową anionu [84]. Powyższe oddziaływania wpływają na obniżenie stałej trwałości kompleksu kation imidazoliowy-grupa silanolowa. W przypadku zasadowego analitu testowego – chlorpromazyny, widoczny jest brak zależności wartości K_A od rodzaju anionu cieczy jonowej.

Porównując uzyskane dane retencyjne dla 6 związków zasadowych chromatografowanych w fazach ruchomych z dodatkiem tetrafluoroboranów 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych, widoczne jest skrócenie czasu analizy wraz ze wzrostem parametru K_A dla benzylotrietyloaminy jako analitu testowego (rycina 34). Spośród pochodnych tetrafluoroboranowych najniższe czasy retencji uzyskano dla fazy ruchomej z dodatkiem [OMIM][BF₄] zgodnie z wartością $K_A = 3,12$. Mimo wzrostu rozdzielczości pików uzyskanych przy zastosowaniu długołańcuchowych cieczy jonowych maleje jednocześnie selektywność układu chromatograficznego. Najlepsze rozdzielanie analizowanej mieszaniny otrzymano w układzie acetonitryl:woda pH 3 (50/50 % v/v) z dodatkiem 32 mM [MMIM][MSO₄].

4.3. Wpływ tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego na zachowanie elektroforetyczne izomerów strukturalnych kwasu nikotynowego

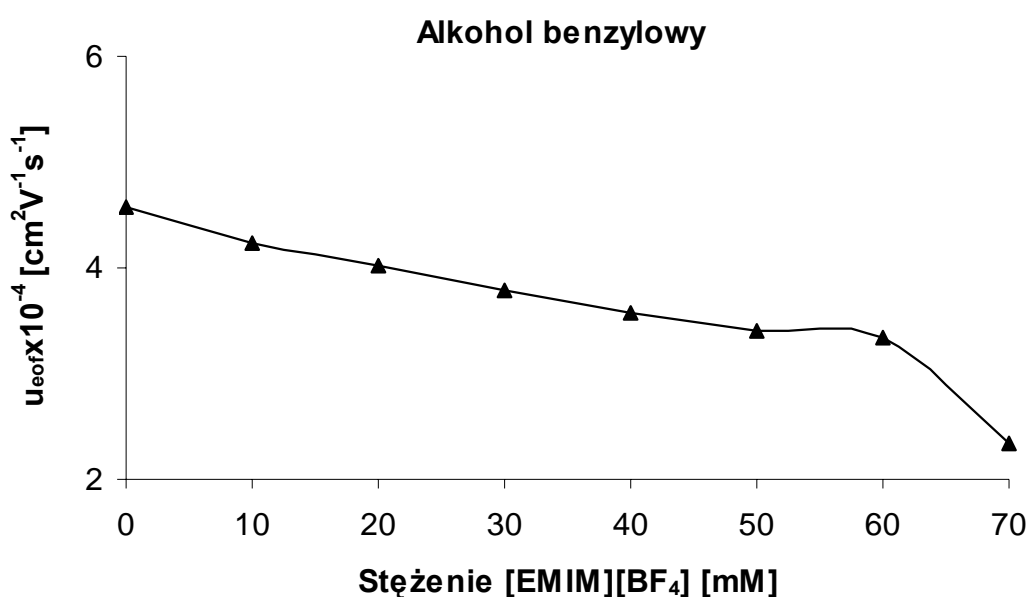
Badania nad kompleksami jonowymi cieczy jonowych i powierzchniowych grup silanolowych niemodyfikowanej kapilary krzemionkowej, określiły wpływ cieczy jonowej na zachowanie się mieszaniny izomerów strukturalnych kwasów pirydynokarboksyłowych rozdzielanych metodą elektroforetyczną.

Stosując dodatek [EMIM][BF₄] do buforu podstawowego (20 mM tetraboran sodu, pH 9,3) zauważono znaczny wpływ na migrację kwasu nikotynowego oraz jego izomerów strukturalnych. Wzrost stężenia [EMIM][BF₄] z 10 mM do 70 mM, przy przyłożonym napięciu +14 kV, powodował systematyczny spadek przepływu elektroosmotycznego,



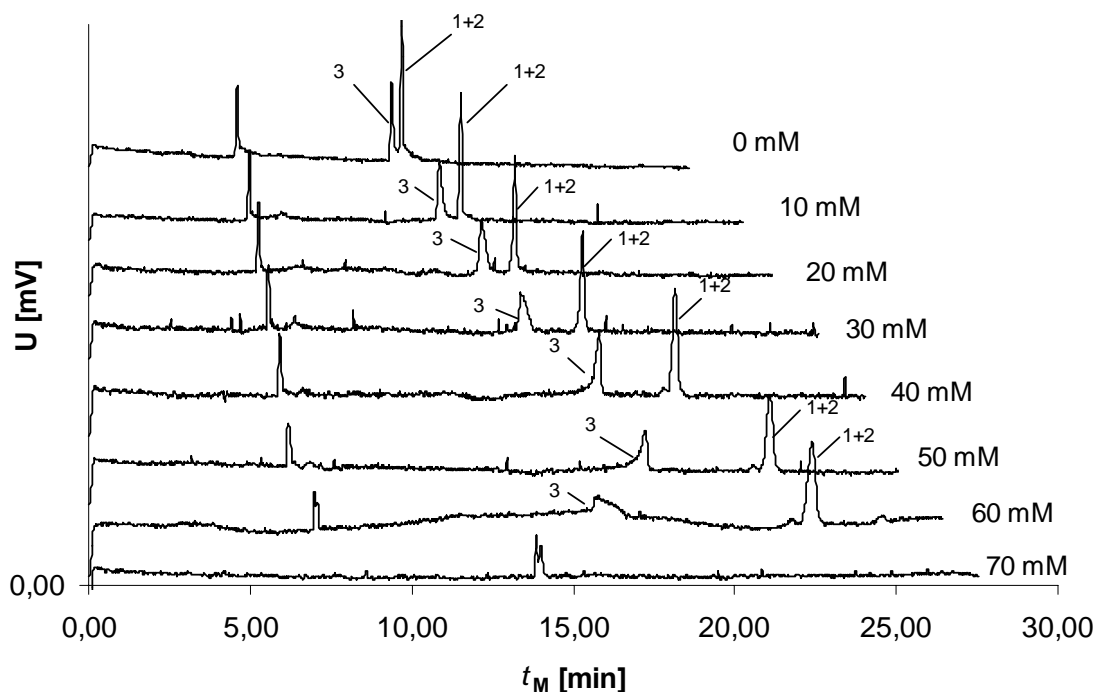
Rycina 34. Chromatogramy przedstawiające rozdzielanie analitów zasadowych w układzie acetonitryl:woda 50/50 pH 3 (% v/v) z dodatkiem 32 mM różnych cieczy jonowych na kolumnie LiChrospher RP-18; objętość nastrzykiwanej próbki 10 μ l, $F = 1$ ml/min, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm. Anality: 1 – nafazolina, 2 – fenazolina, 3 – chlorpromazyna, 4 – flufenazyna, 5 – propiomazyna, 6 – tiorydazyna.

odzwierciedlającego ruchliwość całej objętości elektrolitu wewnątrz krzemionkowej kapilary (rycina 35). Efekt ten jest spowodowany tłumieniem oddziaływań silanofilowych poprzez tworzenie kompleksów jonowych kationów imidazoliowych z ujemnie naładowanymi powierzchniowymi grupami hydroksylowymi krzemionki. Systematyczny spadek ruchliwości elektroosmotycznej wpływa jednocześnie na wzrost czasów migracji analitów, t_M , który osiąga w stężeniu >70 mM [EMIM][BF₄] wartości niemierzalne (rycina 36). W konsekwencji, przy zastosowaniu napięcia +14 kV nie osiągnięto całkowitego rozdzielania mieszaniny kwasów.



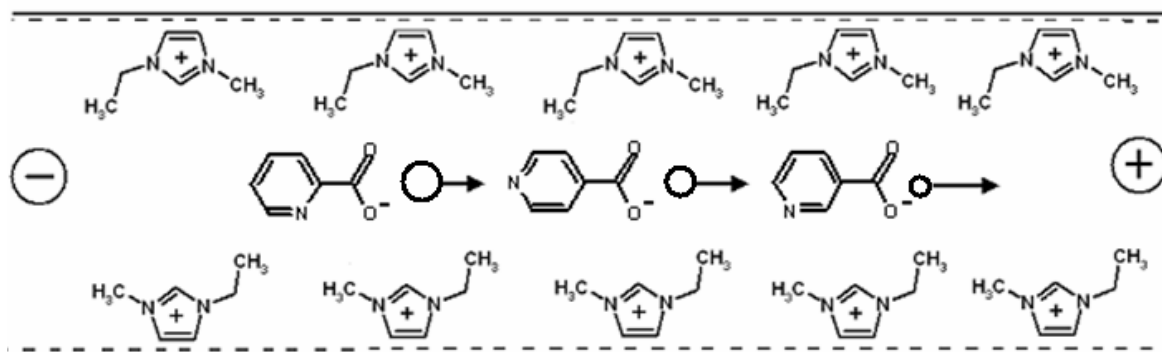
Rycina 35. Wpływ stężenia [EMIM][BF₄] w buforze podstawowym (20 mM tetraboran sodu) na ruchliwość elektroosmotyczną alkoholu benzylowego; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 38,5$ cm, przyłożone napięcie $U = +14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20$ °C.

Należy zwrócić uwagę, że [EMIM][BF₄] w maksymalnym zastosowanym stężeniu (150 mM) powoduje spadek pH buforu do wartości 8,30. W takim środowisku kwas nikotynowy ($pK_{a1} = 2,07$; $pK_{a2} = 4,73$), kwas izonikotynowy ($pK_{a1} = 1,70$; $pK_{a2} = 4,89$) oraz kwas pikolinowy ($pK_{a1} = 1,06$; $pK_{a2} = 5,37$) występują w formie zjonizowanej [85]. Ponieważ ruch analitów jest wypadkową EOF oraz przepływu elektroforetycznego (EPF), to dzięki redukcji EOF ujemnie naładowane kwasy zostają przyciągane do anody, a więc w kierunku przeciwnym do położenia detektora. W tych warunkach identyfikacja oraz oznaczenie powyższych kwasów karboksylowych są niewykonalne.



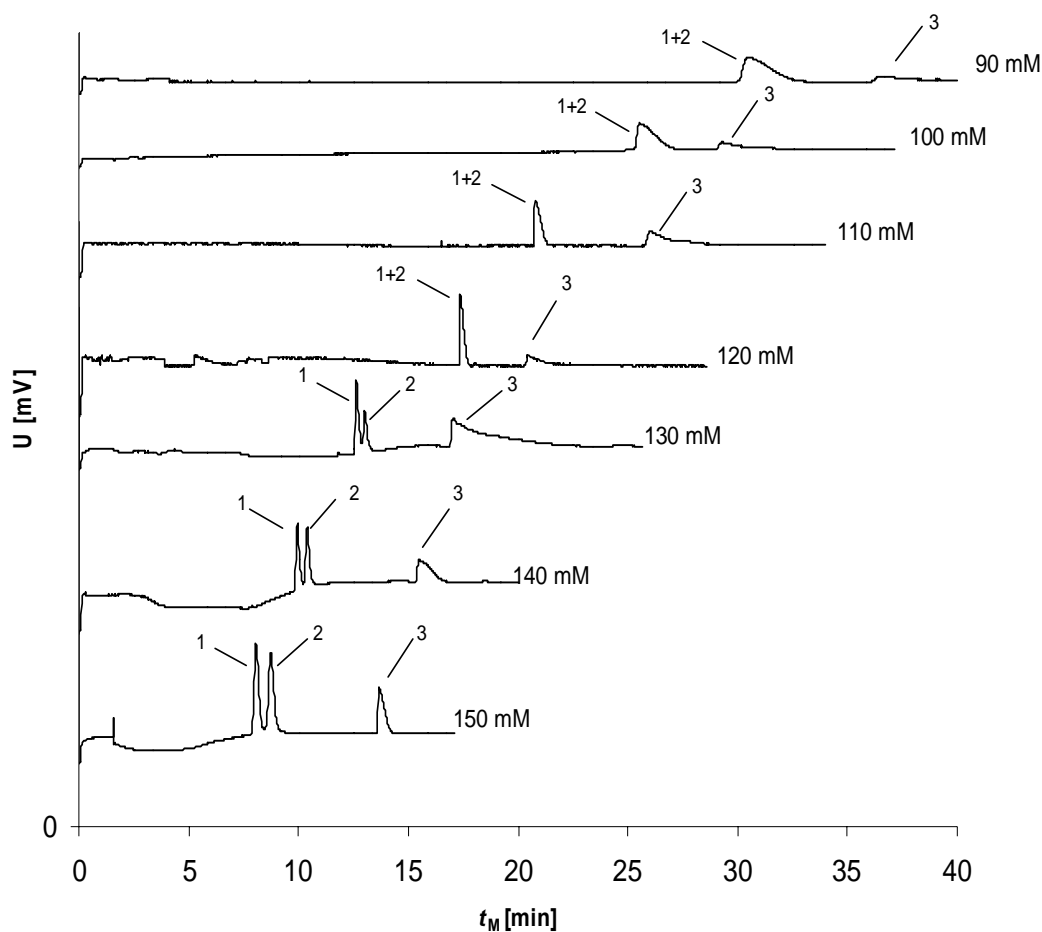
Rycina 36. Elektroferogramy mieszaniny 1 – kwasu nikotynowego, 2 – kwasu izonikotynowego oraz 3 – kwasu pikolinowego przedstawiające wpływ stężenia [EMIM][BF₄] (0-70 mM) w buforze podstawowym (20 mM tetraboran sodu) na migrację i rozdzielczość analitów testowych; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 38,5$ cm, przyłożone napięcie $U = +14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20$ °C, $\lambda = 254$ nm

W przeciwieństwie do standardowych modyfikatorów aminowych, zmiana kierunku przepływu elektroosmotycznego nie jest możliwa w przypadku użytej cieczy jonowej. Spowodowane jest to powstaniem sterycznej bariery imidazoliowej, uniemożliwiającej dostęp swobodnie poruszających się kationów buforu, warunkujących powstanie dyfuzyjnej warstwy podwójnej (rycina 37). Zredukowanie EOF umożliwiło



Rycina 37. Mechanizm rozdzielania kwasów karboksylowych z użyciem [EMIM][BF₄].

rozdzielenie mieszaniny izomerów kwasu nikotynowego w oparciu o różną ruchliwość elektroforetyczną. Całkowite rozdzielanie analizowanych kwasów karboksylowych uzyskano stosując 20 mM bufor tetraboranowy z dodatkiem 150 mM [EMIM][BF₄] oraz odwróconą polaryzację elektrod z katodą na wlocie do kapilary (-14 kV) (rycina 38). Dodatkowo, o redukcji EOF świadczy brak pików cząsteczki obojętnej – znacznika przepływu elektroosmotycznego.



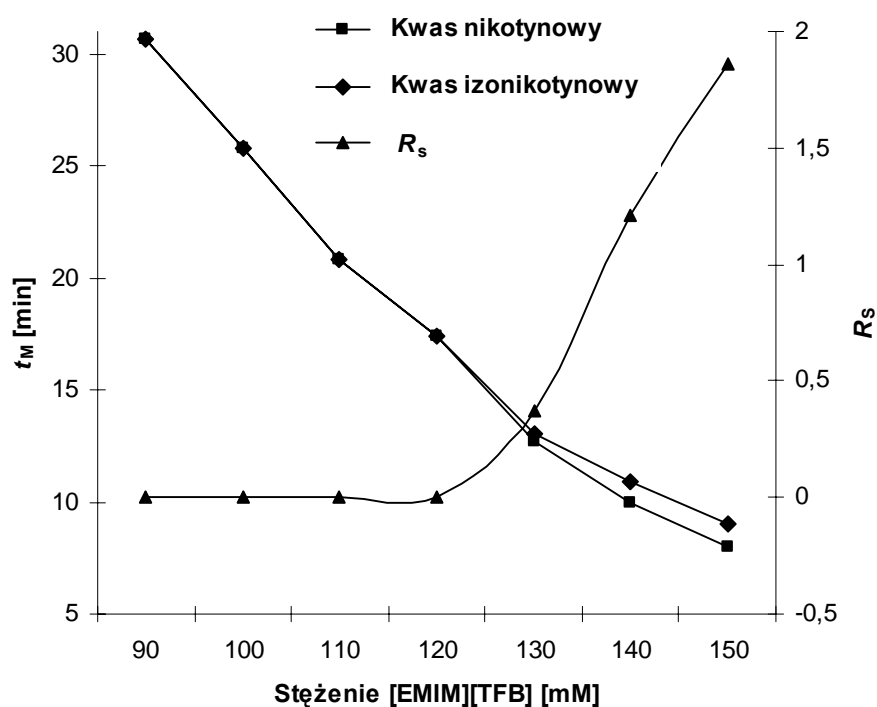
Rycina 38. Elektroferogramy mieszaniny: 1 – kwasu nikotynowego, 2 – kwasu izonikotynowego oraz 3 – kwasu pikolinowego przedstawiające wpływ stężenia [EMIM][BF₄] (90-150 mM) w buforze podstawowym (20 mM tetraboran sodu) na migrację i rozdzielczość analitów testowych; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l=38,5$ cm, przyłożone napięcie $U=-14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h=10$ cm) 5 s, $T=20$ °C, $\lambda=254$ nm.

Zgodnie z mechanizmem EPF, zdolność migracji jonu w polu elektrycznym zależy od jego ładunku i promienia jonowego:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4.1)$$

gdzie μ_{ep} jest ruchliwością elektroforetyczną, q – ładunkiem jonu, η – lepkością buforu, r – promieniem jonu.

Należy podkreślić, że ze wzrostem stężenia [EMIM][BF₄] w buforze podstawowym wzrasta rozdzielczość pików, R_s , oraz zmniejsza się szerokość pików przy podstawie, w_b (rycina 39, tabela 11). Dodatek [EMIM][BF₄] w zakresie stężeń 90-120 mM do buforu podstawowego nie powoduje rozdzielania pików kwasu nikotynowego i kwasu izonikotynowego. Dlatego w tabeli 13, w_b przyjmuje takie same wartości dla obydwu kwasów.



Rycina 39. Wpływ stężenia [EMIM][BF₄] na retencję i rozdzielczość pików kwasu nikotynowego i izonikotynowego; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 38,5$ cm, bufor 20 mM tetraboran sodu, przyłożone napięcie na wlocie do kapilary $U = -14$ kV, czas nastrzyku próbki 5 s, długości fali $\lambda = 254$ nm, $T = 20$ °C.

Tabela 11. Szerokość piku przy podstawie, w_b , dla badanych kwasów pirydynokarboksyłowych w różnych stężeniach [EMIM][BF₄] w buforze podstawowym (20 mM tetraboran sodu); kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 38,5$ cm, przyłożone napięcie $U = -14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm.

Stężenie [EMIM][BF ₄]	w_b		
	Kwas nikotynowy	Kwas izonikotynowy	Kwas pikolinowy
90 mM		1,680	1,472
100 mM		1,481	1,414
110 mM		0,827	1,341
120 mM		0,682	1,269
130 mM	0,543	0,712	1,237
140 mM	0,478	0,527	0,919
150 mM	0,341	0,392	0,696

Powtarzalność parametrów elektroforetycznych dla 5 kolejnych analiz została przedstawiona w tabeli 12. Niskie wartości współczynnika zmienności dla t_M , A oraz A^0 świadczą o powtarzalności oznaczeń w zastosowanym układzie (20 mM bufor boranowy, 150 mM [EMIM][BF₄]), co umożliwia szybkie i skuteczne rozdzielenie badanych kwasów.

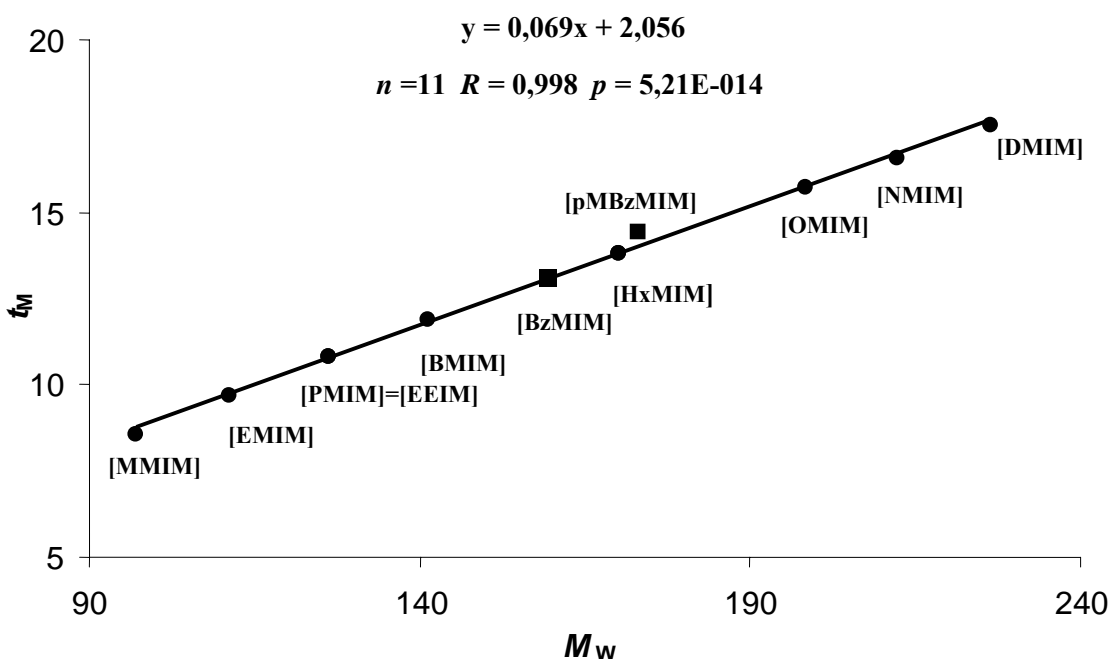
Tabela 12. Powtarzalność czasu migracji, t_M , powierzchni piku, A , oraz skorygowanej powierzchni piku, A^0 , kwasu nikotynowego, kwasu izonikotynowego oraz kwasu pikolinowego w buforze podstawowym (20 mM tetraboran sodu, pH 8,3) z dodatkiem 150 mM [EMIM][BF₄]; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 38,5$ cm, przyłożone napięcie $U = -14$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm.

RSD% (n = 5)	Kwas nikotynowy	Kwas izonikotynowy	Kwas pikolinowy
t_M	0,32	0,35	0,46
A	1,64	1,33	2,60
A^0	0,61	0,62	0,42

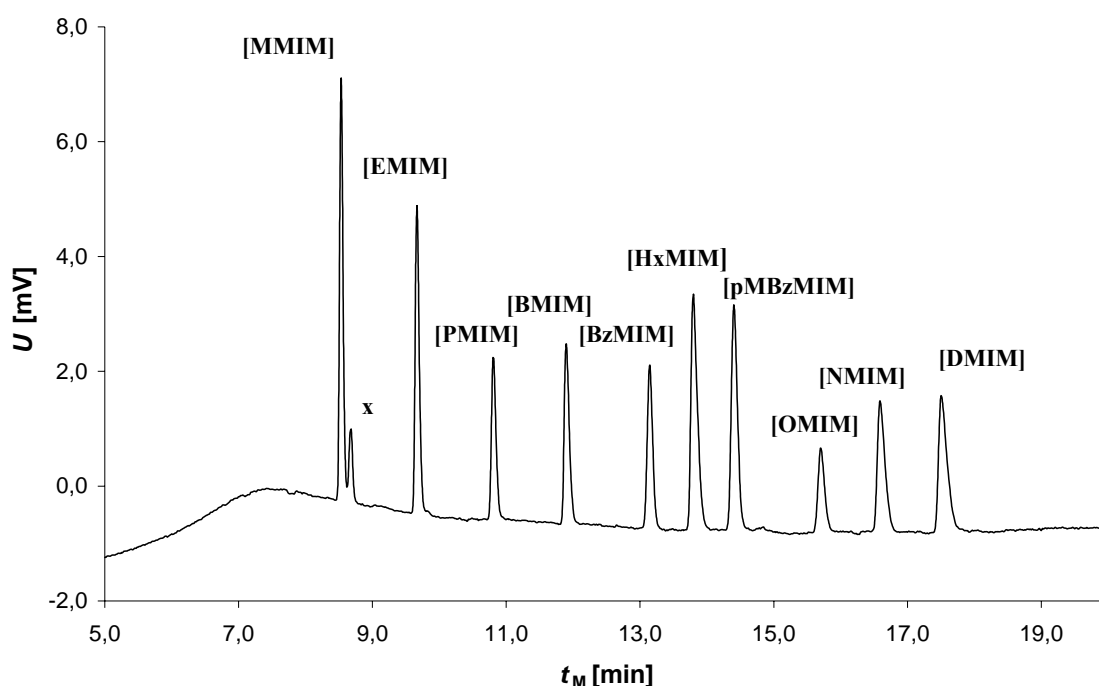
4.4. Analiza cieczy jonowych metodą CE

Przy zastosowaniu CE z użyciem detekcji spektrofotometrycznej UV oznaczono 10 kationów imidazoliowych. Rozdzielenie mieszaniny cieczy jonowych było zgodne z masą cząsteczkową, M_w , poszczególnych kationów imidazoliowych. Uzyskano silną korelację $R = 0,9984$ dla funkcji $t_M = f(M_w)$ zarówno dla 1-alkilo- oraz 1-arylo-3-metyloimidazoliowych (rycina 40). Przy pominięciu aromatycznych pochodnych imidazoliowych ([BzMIM] oraz [pMBzMIM]) współczynnik korelacji wzrasta do wartości $R = 0,9994$. Rozdzielenie [EEIM] oraz [PMIM] było niemożliwe z powodu tej samej wartości $M_w = 170,3$.

Przyłożone napięcie +12 kV pozwoliło na uzyskanie układu elektroforetycznego charakteryzującego się wysoką sprawnością mimo dość wysokiego (ale akceptowanego) natężenia prądu ($\sim 90 \mu\text{A}$). Optymalne rozdzielanie analizowanych cieczy jonowych uzyskano stosując 200 mM bufor cytrynianowy o pH 4 (rycina 42). Duża siła jonowa buforu podstawowego wpłynęła na osłabienie EOF jednocześnie wydłużając t_M analitów. Wodne roztwory cieczy jonowych charakteryzowały się niższym przewodnictwem od buforu podstawowego. Różnica w przewodności wpłynęła na znaczny wzrost natężenia pola elektrycznego w wodnym roztworze analitów, przez co rozdzielane kationy imidazoliowe uległy ogniskowaniu na granicy stref próbka/elektrolit. Proces zawężania



Rycina 40. Zależność t_M od M_w kationów imidazoliowych: ● – kationy 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe, ■ – kationy 1-arylo-3-metyloimidazoliowe.



Rycina 42. Elektroferogram przedstawiający rozdzielanie mieszaniny 10 kationów imidazoliowych; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 37,5$ cm, 200 mM bufor cytrynianowy pH 4, przyłożone napięcie na wlocie do kapilary $U = +12$ kV, stężenie analitów – 5 $\mu\text{g/ml}$, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 50 s, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm.

pasma (*stacking*) wpłynął na osiągnięcie dużej powtarzalności oznaczeń kationów imidazoliowych przy długości nastrzyku 50 s, a nawet 200 s. Powtarzalność t_M , A , oraz A^0 dla pięciu kolejnych analiz określona jest współczynnikiem zmienności w granicach od 0,05 % do 2,48%. Wyniki przedstawia tabela 13.

Tabela 13. Powtarzalność czasu migracji, t_M , powierzchni piku, A , oraz skorygowanej powierzchni piku, A^0 , analizowanych kationów imidazoliowych w układzie elektroforetycznym: 200 mM bufor cytrynianowy pH 4, przyłożone napięcie na wlocie do kapilary $U = +12$ kV, stężenie analitów – 5 $\mu\text{g/ml}$, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 50 s, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm.

RSD % (n=5)	[MMIM]	[EMIM]	[PMIM]	[BMIM]	[BzMIM]	[HMIM]	[pMBzMIM]	[OMIM]	[NMIM]	[DMIM]
t_M	0,08	0,10	0,07	0,08	0,09	0,08	0,06	0,09	0,05	0,8
A	1,55	2,24	1,72	1,30	2,07	1,72	1,84	2,55	1,46	2,32
A^0	1,5	2,15	1,67	1,24	2,07	1,66	1,80	2,48	1,42	2,25

Zoptymalizowaną metodę rozdzielania kationów imidazoliowych poddano analizie liniowości w zakresie stężeń 1–100 μM dla [EMIM] i 1–150 μM dla [BMIM]. Wysoka wartość $R = 0,998$ dla [EMIM] oraz $R = 0,997$ dla [BMIM] świadczy o silnej liniowej zależności pola powierzchni pików od stężenia roztworów wzorcowych w badanym zakresie stężeń (tabela 14). Granica wykrywalności metody analitycznej została określona na poziomie 0,01 $\mu\text{g/mL}$ w przypadku zastosowania długiego czasu nastrzyku (500 s) oraz 0,1 $\mu\text{g/mL}$ przy czasie nastrzyku 5 s.

Tabela 14. Zakres liniowości, równanie regresji liniowej (\pm odchylenie standardowe), współczynnik korelacji, R , poziom istotności, p , oraz liczba punktów użyta przy wyprowadzaniu równania, n , dla zależności pola powierzchni pików względem stężenia [EMIM] i [BMIM]; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości efektywnej $l = 37,5$ cm, 200 mM bufor cytrynianowy pH 4, przyłożone napięcie $U = +12$ kV, nastrzyk hydrodynamiczny ($\Delta h = 10$ cm) 5 s, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 254$ nm.

	[EMIM]	[BMIM]
Zakres liniowości	1 – 100 $\mu\text{g/ml}$	1 – 150 $\mu\text{g/ml}$
Równanie regresji	$y = 353(\pm 73) + 577(\pm 16)x$	$y = 302(\pm 116) + 790(\pm 27)x$
R	0,998	0,997
p	3,19E-08	9E-06
n	8	8

5. Wnioski

W niniejszej pracy wykazano, że ciecze jonowe jako modyfikatory fazy ruchomej w chromatografii cieczowej i technikach elektromigracyjnych hamują niekorzystny wpływ oddziaływań silanofilowych na retencję analitów. Zastosowanie dwuparametrowego modelu retencji oraz otrzymanie liniowych izoterm Langmuira potwierdziło większą skuteczność cieczy jonowych w tłumieniu oddziaływań silanofilowych w porównaniu z powszechnie stosowanymi w chromatografii cieczowej modyfikatorami eluentów – alkiloaminami. Inhibycyjny charakter cieczy jonowych wobec powierzchniowych grup hydroksylowych krzemionki potwierdzony został również metodą elektroforetyczną.

Grupy silanolowe są przeszkodą w przypadku chromatografii związków zasadowych zarówno w NP LC jak RP LC. Ich skuteczna neutralizacja przez modyfikatory imidazoliowe faz ruchomych umożliwia dobre rozdzielanie za pomocą TLC i HPLC ksenobiotyków zasadowych. Siła tłumienia oddziaływań silanofilowych przez ciecze jonowe w niewielkim stopniu zależy od pH eluentu. Duża skuteczność tłumienia niekontrolowanych oddziaływań silanofilowych przez ciecze jonowe pozwala też na dokładniejsze wyznaczanie chromatograficznego parametru hydrofobowości, $\log k_w$, w układzie RP HPLC niż w przypadku zastosowania standardowych eluentów buforowanych.

Zastosowane jako modyfikatory faz ruchomych pochodne 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe w stężeniu 0,1-1,5 % (v/v) umożliwiają rozdzielanie chromatograficzne analitów zasadowych w szerokim zakresie temperatur (25–80°C) oraz odczynu fazy ruchomej (2–8). W przypadku HPLC z użyciem detekcji UV ograniczeniem modyfikatorów imidazoliowych jest długość fali promieniowania powyżej 215 nm. W praktyce wyklucza to użycie pochodnych pirydyniowych. Problem powinna rozwiązać nowa klasa fosfoniowych cieczy jonowych, niezawierających ugrupowania aromatycznego, które w najbliższym czasie staną się komercyjnie dostępne.

Sole imidazoliowe jako modyfikatory fazy ruchomej w chromatografii cieczowej i technikach elektromigracyjnych, dzięki niskiej lotności i toksyczności są wygodne i bezpieczne w użyciu. Zastąpienie mało efektywnych i lotnych dodatków alkiloaminowych przez ciecze jonowe nie tylko poprawia sprawność rozdzieleń związków zasadowych, ale również wpływa na bezpieczeństwo pracy w laboratorium analitycznym.

Ciecze jonowe należą do najbardziej obiecujących grup związków chemicznych. Wykazana w pracy doktorskiej przydatność cieczy jonowych w chromatografii cieczowej i

technikach elektromigracyjnych jest oryginalnym wkładem w rozwój tzw. „zielonej chemii” (*green chemistry*).

6. Streszczenie

Problem niekontrolowanych oddziaływań silanofilowych w chromatografii cieczowej w tzw. odwróconym układzie faz (RP LC) został częściowo rozwiązany po wprowadzeniu nowoczesnych faz stacjonarnych. Jednakże analiza związków zasadowych nadal nastęrcza trudności. Nawet najlepsze procedury otrzymywania chemicznie związanych faz stacjonarnych bazujących na nośniku krzemionkowym pozostawiają około 50 % wolnych silanoli. Dodawanie alkiloamin do fazy ruchomej nie pozwala na całkowite wyeliminowanie oddziaływań silanofilowych powodujących silne zatrzymywanie związków zasadowych

Dogodne i selektywne rozdzielanie ksenobiotyków zasadowych jest szczególnie ważne w analityce farmaceutycznej, farmakokinetycznej i toksykologicznej. Dlatego celem pracy doktorskiej było poszukiwanie skuteczniejszych inhibitorów oddziaływań silanofilowych od standardowych modyfikatorów alkiloaminowych faz ruchomych stosowanych dotychczas w RP LC. Głównym zadaniem badawczym była ocena skuteczności 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych jako inhibitorów oddziaływań silanofilowych. Badano wpływ rodzaju anionu cieczy jonowej, długość łańcucha alkilowego w pozycji C-1 pierścienia imidazoliowego, temperatury i pH fazy ruchomej. Efekt soli imidazoliowych okazał się znacznie wyższy od standardowych modyfikatorów fazy ruchomej, takich jak trietyloamina, dimetylooktyloamina i amoniak. Dodatek do eluentu badanych cieczy jonowych w stężeniu 0,1-1,5 % (v/v) umożliwił rozdzielanie chromatograficzne leków zasadowych zarówno metodą TLC jak i HPLC.

Duża skuteczność tłumienia oddziaływań silanofilowych przez cieczy jonowe została potwierdzona teoretycznie. Dwuparametrowy model retencji umożliwił określenie stałych trwałości kompleksów kationów imidazoliowych z grupami silanolowymi fazy stacjonarnej.

Zastąpienie powszechnie stosowanych dodatków alkiloaminowych tzw. „zielonymi rozpuszczalnikami” usprawnia rozdzielania chromatograficzne i redukuje zużycie ekologicznie szkodliwych alkiloamin. Unikatowe właściwości fizykochemiczne cieczy jonowych czynią je atrakcyjnymi modyfikatorami fazy ruchomej, alternatywnymi do tradycyjnie stosowanych alkiloamin.

7. Summary

Problem of uncontrolled silanol interactions in reversed phase liquid chromatography (RP LC) has partially been resolved by the application of the modern stationary phases. However, analysis of basic compounds still remains an issue. Even the best procedures of manufacturing chemical bonded phases based on the silica causes the remaining about 50 % free silanols. The addition of alkylamines to the mobile phases does not fully remove the deleterious effect of free silanols on basic analytes' retention.

Convenient and selective separation of basic xenobiotics is very important in pharmaceutical, pharmacokinetics and toxicological analysis. Therefore, the aim of Ph.D. thesis was the searching for more efficient suppressors of free silanols in RP LC than standard alkyloamines so far applied. The main goal of the research was the evaluation of silanol suppressing potency of the 1-alkyl-3-metylimidazolium ionic liquids. The effects of counterion of ionic liquid, length of alkyl chain at C-1 position in imidazolium ring of ionic liquid, temperature and pH of mobile phase were studied. The efficiency of ionic liquids markedly exceeded that of the standard mobile phase additives, like triethylamine, dimethyloctylamine and ammonia. The addition studied ionic liquids to the eluent at concentration 0,1-1,5 % (v/v) provided chromatographic separation of basic drugs in both TLC and HPLC.

The high silanol suppressing potency of ionic liquids was also confirmed theoretically. The two-retention site model enabled determination of the stability constant of the complexes of imidazolium cations with the silanols groups of the stationary phase.

The replacement of the commonly used alkylamine additives with the so-called „green solvents” improves chromatographic separations and reduces the use environmentally harmful amines. The unique physicochemical properties of ionic liquids make them an attractive, alternative to traditional alkylamines used as mobile phase modifiers.

8. Podziękowania

Pragnę gorąco podziękować opiekunowi i promotorowi pracy doktorskiej, Panu prof. dr. hab. Romanowi Kaliszanowi za nieustanną pomoc oraz ogromny wysiłek jaki włożył w powstanie tej pracy. Chciałbym podziękować również całemu zespołowi Katedry i Zakładu Biofarmacji i Farmakodynamiki Akademii Medycznej w Gdańsku za życzliwość i okazaną pomoc.

Osobne podziękowania składam całej mojej rodzinie za duchowe wsparcie, a w szczególności żonie Annie oraz synkowi Karolkowi.

9. Piśmiennictwo

1. J.S. Wilkes, *Green Chem.*, 4 (2002) 73.
2. <http://www.scopus.com/scopus/home.url>.
3. J. Namieśnik, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 151.
4. R. Kaliszan, M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, T. Bączek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 263.
5. S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 191.
6. H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 182/183 (2002) 419.
7. J.F. Huang, P.Y. Chen, I.W. Sun, S.P. Wang, *Spectr. Letters*, 34 (2001) 591.
8. M. Kosmulski, B. Tendaj, *Przemysł Chemiczny*, 80/7 (2001) 280.
9. R.L. Perry, K.M. Jonem, W.D. Scott, Q. Liao, C.L. Hussey, *J. Chem. Eng. Data*, 40 (1995) 615.
10. M.J. Earle, K.R. Seddon, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1391.
11. T. Itoh, E. Akasaki, K. Kudo, S. Shirakami, *Chem. Lett.*, (2001) 262.
12. M. Eckstein, P. Wasserscheid, U. Kragl, *Biotechnol. Lett.*, 24 (2002) 763.
13. J. Pernak, J. Krysiński, A. Skrzypczak, *Pharmazie*, 47 (1992) 623.
14. J. Pernak, *Przemysł Chemiczny*, 79/5 (2000) 150.
15. G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F.V. Bright, *Analyst*, 130 (2005) 800.
16. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley, New York, 1997.
17. J. Köhler, D.B. Chale, R.D. Farlee, A.J. Vega, J.J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 275.
18. M. Kamiński, R. Kartonowicz, *Chromatografia cieczowa*, CEEAM, Gdańsk, 2004.
19. D.E. Yates, S. Levine, T.W. Healy, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 70 (1974) 1807.
20. J. Nawrocki, P.W. Carr, Tlenki metali jako fazy stacjonarne w wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w *Nowe horyzonty i wyzwania w analizie i monitoringu środowiskowym* J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek (red), CEEAM, 2003, s. 478.
21. J. Nawrocki, R.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 657 (1993) 229.
22. R.L. Smith, D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 610.
23. M.L. Hair, W. Hertz, *J. Phys. Chem.*, 74 (1970) 91.

24. J. Nawrocki, *Chromatographia*, 31 (1991) 177.
25. G.B. Cox, R. W. Stout, *J. Chromatogr.* 384 (1987) 315.
26. J. Köhler, J.J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 125.
27. B. Buszewski, J. Schmid, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 415.
28. B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, *J. Chromatogr. A*, 668 (1994) 293.
29. Ch.E. Bronniman, R.C. Zeigler, G.E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (7) (1988) 2023.
30. D.J. Angst, G.W. Simmons, *Langmuir*, 7 (1991) 2236.
31. C.J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 598.
32. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 169.
33. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 708 (1995) 185.
34. H.A. Claessens, E.A. Vermeer, C.A. Cramers, *LC-GC Int.*, 6 (11) (1993) 692.
35. J.J. Kirkland, M.A. Van Straten, H.A. Claessens, *J. Chromatogr. A*, 691 (1995) 3.
36. J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 29.
37. R.J.M. Vervoort, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, *J. Chromatogr. A*, 897 (2000) 1.
38. S.H. Hansen, *J. Chromatogr.*, 209 (1981) 203.
39. S.H. Hansen, P. Helboe, M. Thomsen, *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 53.
40. J.S. Kiel, S.L. Morgan, R.K. Abramson, *J. Chromatogr.*, 320 (1985) 313.
41. K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 65.
42. R. Kaliszan, Information Potential of Chromatographic Data for Pharmacological Classification and Drug Design, w P.R. Brown, R.A. Hartwick (red.) *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1989, rozdz. 4.
43. C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 1616.
44. J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 485.
45. N.El. Tayar, H. van de Waterbeemd, B. Testa, *J. Chromatogr.*, 320 (1985) 293.
46. D.L. Stadalius, J.S. Berus, L.R. Snyder, *LC-GC*, 6 (1988) 494.
47. T.W. Hermann, *Farmacja fizyczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999.
48. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 311.
49. A. Albert, E.P. Serjeant, *The Determination of Ionisation Constants*, 3rd ed., Chapman and Hall, London, 1984.
50. M.P. Marszałł, T. Bączek, R. Kaliszan, *Anal. Chim. Acta*, 547 (2005) 172.

51. M.P. Marszałł, T. Bączek, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.*, przyjęto do druku.
52. T. Bączek, M.P. Marszałł, R. Kaliszan, Ł. Walijewski, W. Makowiecka, B. Sparzak, Z. Grzonka, K. Wiśniewski, P. Juszczak, *Biomed. Chromatogr.*, 19 (2005) 1.
53. C.F. Poole, B.R. Kersten, S.S.J. Ho, M.E. Coddens, K.G. Furton, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 407.
54. W. Zhang, L. He, Y. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Letters*, 36(4) (2003) 827.
55. L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 1007 (2003) 39.
56. X. Xiaohua, Z. Liang, L. Xia, J. Shengxiang, *Anal. Chim. Acta*, 519 (2004) 207.
57. Y. Sun, B. Cabovska, C.E. Evans, T.H. Ridgway, A.M. Stalcup, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 728.
58. D.W. Armstrong, L. He, Y.-S. Liu, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3873.
59. A. Berthod, L. He, D.W. Armstrong, *Chromatographia*, 53 (2001) 63.
60. J.L. Andersen, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 4851.
61. J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2000) 14247.
62. P.G. Righetti, C. Gelfi, B. Verzola, L. Castelletti, *Electrophoresis*, 22 (2001) 603.
63. R. Sebastiano, C. Gelfi, P.G. Righetti, A. Citterio, *J. Chromatogr. A*, 894 (2000) 53.
64. M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *Chromatographia*, 53 (2001) 302.
65. M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *Electrophoresis*, 23 (2003) 426.
66. E.G. Yanes, S.R. Gratz, M.J. Baldwin, S.E. Robinson, A.M. Stalcup, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3838.
67. M.P. Marszałł, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, przyjęto do druku.
68. T.F. Jiang, Y.L. Gu, B. Liang, J.B. Li, Y.P. Shi, Q.Y. Ou, *Anal. Chim. Acta*, 479 (2003) 249.
69. S.M. Mwangela, A. Numan, N.L. Gill, R.A. Agbaria, I.M. Warner, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6089.
70. S. Qi, S. Cui, X. Chen, Z. Hu, *J. Chromatogr. A*, 1059 (2004) 191.
71. W. Qin, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, 23 (2002) 4110.
72. W. Qin, S.F.Y. Li, *Analyst*, 128 (2003) 37.

73. A.G. Avent, P.A. Chaoner, M.P. Day, K.R. Seddon, T. Welton, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1994) 3405.
74. A.K. Abdul-Sada, A.M. Greenway, K.R. Seddon, T. Welton, *Org. Mass Spectrom.*, 28 (1993) 759.
75. W. Qin, H. Wei, S F.Y. Li, *Analyst*, 127 (2002) 490.
76. P. Stepnowski, A. Müller, P. Behrend, J. Ranke, J. Hoffmann, B. Jastorff, *J. Chromatogr. A*, 993 (2003) 173.
77. P. Stepnowski, W. Mroziak, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 149.
78. Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnár, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.
79. A. Sokolowski, K.- G. Wahlund, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 299.
80. U.N. Neue, Ch.H. Phoebe, K. Tran, Y.-F. Cheng, Z. Lu, *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 49.
81. R. Kaliszan, H.-D Höltje, *J. Chromatogr. A*, 234 (1982) 303.
82. C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Exploring QSAR*, ACS Professional Society, Washington, 1995.
83. The Separation of Acids, Bases, and Neutral Compounds with Alltech Alltima™ HPLC Columns, www.alltechweb.com/productinfo/.
84. J.S. Wilkes, M.J. Zawarotko, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1992) 965.
85. A. Albert, E.P. Serjeant, *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, New York, 1962.