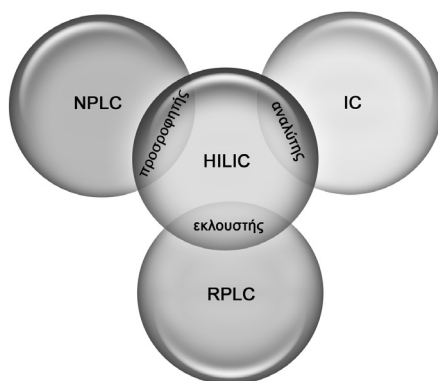




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΤΗ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC) ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ
ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ



Ανδρέας Ε. Καραταπάνης
Χημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καραταπάνη Ανδρέα: 11-09-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 647/5-10-2006

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αναπλ. Καθηγητής Κων/νος Σταλίκας

Μέλη:

Καθηγητής Τριαντάφυλλος Αλμπάνης

Επίκ. Καθηγήτρια Κων/να Κονιδάρη

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-04-2007

Θέμα: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC) ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 794/14-05-2010

1. Αναπλ. Καθηγητής Κων/νος Σταλίκας
2. Καθηγητής Τριαντάφυλλος Αλμπάνης
3. Επίκ. Καθηγήτρια Κων/να Κονιδάρη
4. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης
5. Καθηγητής Γεώργιος Πηλίδης
6. Επίκ. Καθηγητής Αθανάσιος Βλεσίδης
7. Λέκτορας Βασίλειος Σακκάς

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 08-06-2010

Προς την Γραμματεία του Τμήματος Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα 8 Ιουνίου 2010

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ κ. ΑΝΤΡΕΑ ΚΑΡΑΤΑΠΑΝΗ**

Σήμερα στις 8 Ιουνίου 2010 και ώρα 6:00 μ.μ. η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. Αναπλ. Καθηγητή **Κών/νο Σταλικά** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Επιβλέπων Καθηγητής
2. Καθηγητή **Τριαντάφυλλο Αλμπάνη** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της συμβουλευτικής και της εξεταστικής επιτροπής
3. Επίκ. Καθηγήτρια **Κων/να Κονιδάρη** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της συμβουλευτικής και της εξεταστικής επιτροπής
4. Καθηγητή **Βασίλειο Τσίκαρη** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
5. Καθηγητή **Γεώργιο Πηλίδη** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
6. Επίκ. Καθηγητή **Αθανάσιο Βλεσσίδη** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
7. Λέκτορα **Βασίλειο Σακκά** - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - Μέλος της εξεταστικής επιτροπής

που ορίστηκε με την απόφαση του Τμήματος Χημείας (Συνεδρίαση 794/14-5-2010), συνήλθε στην αίθουσα Χ2-097, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψήφιου διδάκτορα κ. Αντρέα Καραταπάνη με θέμα:
“ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC) ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ”

Πριν την έναρξη της συνεδρίας ο Επιβλέπων Καθηγητής ενημέρωσε τα μέλη για τη διαδικασία σύμφωνα με το άρθρο 12,13 του νόμου 2083/92. Ο κ. Αντρέας Καραταπάνης ανέπτυξε επί μία περίπου ώρα τα κυριότερα αποτελέσματα της διατριβής του, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στην συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής.

Στη συνέχεια αποχώρησε ο κ. Αντρέας Καραταπάνης μαζί με το ακροατήριο, ενώ η επταμελής εξεταστική επιτροπή μετά από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση έκρινε ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και συμβάλλει στην εξέλιξη της επιστήμης και έτσι αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει την απονομή του τίτλου του διδάκτορος στον κ. Αντρέα Καραταπάνη με βαθμό "άριστα" από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η Εξεταστική Επιτροπή

1. Αναπλ. Καθηγητή **Κών/νο Σταλικά**

2. Καθηγητή **Τριαντάφυλλο Αλμπάνη**

3. Επίκ. Καθηγήτρια **Κων/να Κονιδάρη**

4. Καθηγητή **Βασίλειο Τσίκαρη**

5. Καθηγητή **Γεώργιο Πηλίδη**

6. Επίκ. Καθηγητή **Αθανάσιο Βλεσσίδη**

7. Λέκτορα **Βασίλειο Σακκά**

«Ολόκληρη η επιστήμη δεν είναι κάτι περισσότερο από μια συστηματική εκλέπτυνση της καθημερινής μας σκέψης»

Albert Einstein

*Αφιερώνεται στην οικογένειά μου
Εμμανουήλ, Καλλιόπη, Στέλιο και Γιώργο*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σταλικά. Την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνουν ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης και η Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνα Κονιδάρη.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την ανεκτίμητη και συνεχή καθοδήγησή του, τις εύστοχες υποδείξεις, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κωνσταντίνα Κονιδάρη, για τις σημαντικές υποδείξεις τους, τα εύστοχα σχόλια, το συνεχές ενδιαφέρον και την άμεση συνεργασία κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στο συνάδελφό μου Δρ. Ιωάννη Φιαμέγκο για τις πολύτιμες συμβουλές του, την άριστη συνεργασία και τις πολυάριθμες και εποικοδομητικές συζητήσεις καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τη συνάδελφό μου Δρ. Αγγελική Φλώρου για την άριστη συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Δρ. Ηλία Κάζο, Δρ. Ελένη Γιώτη, Δρ. Δημήτρη Στεργίου, Παντελή Χαρισιάδη, Παρασκευή Μπέζα, Παναγιώτη Δημοβασίλη, Κική Καρδίμη και Μαρία Παναγοπούλου για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση και αποδοτική συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου Εμμανουήλ και Καλλιόπη για την ηθική, οικονομική και ψυχολογική συμπαράσταση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής.

Ανδρέας Ε. Καραταπάνης

Ιωάννινα, Μάιος 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	i
ΟΡΙΣΜΟΙ – ΤΥΠΟΙ.....	ii
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ.....	1
1.1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή.....	1
1.1.2 Ιστορικά στοιχεία της HILIC	5
1.1.3 Βασικά χαρακτηριστικά της HILIC – Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα	6
1.1.4 Μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC.....	10
1.1.4.1 Μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης.....	14
1.1.4.2 Ο ρόλος της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ύδωρ.....	16
1.1.4.3 Ο ρόλος του pH και των ιόντων των αλάτων.....	24
1.1.4.4 Ο ρόλος της φύσης του οργανικού διαλύτη	28
1.1.4.5 Ο ρόλος της θερμοκρασίας της στήλης.....	30
1.1.5 Υλικά στατικών φάσεων στην HILIC.....	35
1.1.5.1 Μη επικαλυμμένη πυριτία.....	36
1.1.5.2 Αμινο–πυριτία	39
1.1.5.3 Αμιδο–πυριτία	41
1.1.5.4 Διόλη–πυριτία	41
1.1.5.5 Κυανο–πυριτία	43
1.1.5.6 Σουλφοαλκυλοβεταΐνη–πυριτία	44
1.1.5.7 Πυριτία επικαλυμμένη με πολυ(σουκινιμίδιο) και τα παράγωγά του.....	45
1.1.5.8 Στατικές φάσεις από κυκλοδεξτρίνη	46
1.1.5.9 Σουλφονιωμένα συμπολυμερή στυρενίου–διβινυλοβενζολίου	47
1.1.5.10 Μονόλιθοι	47
1.1.6 Εφαρμογές της HILIC.....	49
1.1.6.1 Μόρια μικρού μεγέθους	49
1.1.6.2 Βιοανάλυση και φαρμακοκινητικές μελέτες.....	51
1.1.6.3 Αντιβιοτικά και κυτταροστατικά	52
1.1.6.4 Ανάπτυξη φαρμάκων	55
1.1.6.5 Εξαρτησιογόνες ουσίες	56
1.1.6.6 Γεωργική χημεία και χημεία τροφίμων.....	56

1.1.6.7 Τοξίνες.....	57
1.1.6.7 Συνθετικά πολυμερή.....	57
1.1.6.8 Υδατάνθρακες	58
1.1.6.9 Αμινοξέα και πεπτίδια.....	60
1.1.6.10 Πρωτεομική.....	61
1.1.6.11 Πρωτεΐνες	61
1.1.6.12 Μεταβολομική.....	62
1.1.7 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες.....	63
1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	69
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	71
2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ–ΔΙΑΛΥΤΕΣ–ΥΛΙΚΑ	71
2.1.1 Αντιδραστήρια–Διαλύτες	71
2.1.2 Υλικά	72
2.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ–ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ	73
2.2.1 Διαλύματα	73
2.2.2 Κινητές φάσεις	74
2.3 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	83
2.3.1 Φαρμακευτικό σκεύασμα	83
2.3.2 Εμπορικό βιταμινούχο αναψυκτικό	83
2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ	83
2.4.1 Στήλη διόλης–πυριτίας.....	83
2.4.2 Στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.....	84
2.4.3 Στήλη αμινο–πυριτίας	84
2.5 ΟΡΓΑΝΑ–ΣΥΣΚΕΥΕΣ	85
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
3.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΔΙΟΛΗΣ–ΠΥΡΙΤΙΑΣ.....	89
3.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης.....	89
3.1.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	93
3.1.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη	99
3.1.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος	104

3.1.5 Επίδραση της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος	109
3.1.6 Επίδραση της προσθήκη τριαιθυλαμίνης (TEA) στην κινητή φάση.....	113
3.1.7 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης	115
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΜΗ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΗΣ ΠΥΡΙΤΙΑΣ	121
3.2.1 Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης	121
3.2.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	124
3.2.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη.....	129
3.2.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος	133
3.2.5 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης	137
3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΑΜΙΝΟ-ΠΥΡΙΤΙΑΣ.....	141
3.3.1 Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης	141
3.3.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	145
3.3.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη.....	152
3.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος	155
3.3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης	160
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ.....	165
3.4.1 Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης της στατικής φάσης.....	165
3.4.2 Μοντελοποίηση της συμπεριφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών υπό συνθήκες HILIC	171
3.4.2.1 Στήλη διόλης-πυριτίας.....	172
3.4.2.2 Στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.....	178
3.4.2.3 Στήλη αμινο-πυριτίας	183
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	191
3.5.1 Επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης	191
3.5.2 Βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης στη στήλη διόλης- πυριτίας	192
3.5.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της TEA στη διαχωριστική ικανότητα	192
3.5.2.2 Χρωματογραφική απόδοση της στήλης διόλης-πυριτίας.....	194
3.5.2.3 Δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Test–SST) ...	197
3.5.2.4 Επίδραση της σύστασης του διαλύτη έγχυσης.....	198

3.5.2.5 Μελέτη της σταθερότητας του L–ασκορβικού οξέος	200
3.5.2.6 Συνθήκες ανίχνευσης.....	201
3.5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου	203
3.5.3.1 Καμπύλες αναφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών.....	203
3.5.3.2 Επαναληψιμότητα, όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης.....	204
3.5.3.3 Ανακτήσεις	205
3.5.4 Η ισοκρατική σε σχέση με τη βαθμιδωτή έκλουση των υδατοδιαλυτών βιταμινών στην HILIC.....	208
3.5.5 Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της κινητής φάσης.....	209
3.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	211
 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	 217
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	255
SUMMARY	259

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης
RPLC	Reversed phase liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης
NPLC	Normal phase liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης
HPLC	High performance liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
k'	Retention factor / Παράγοντας κατακράτησης
T_f	Tailing factor / Παράγοντας σχετικός με την εμφάνιση "ουράς" μιας κορυφής
ACN	Acetonitrile / Ακετονιτρίλιο
MeOH	Methanol / Μεθανόλη
IPA	Isopropanol / Ισοπροπανόλη (2-προπανόλη)
THF	Tetrahydrofuran / Τετραϋδροφουράνιο
EtOH	Ethanol / Αιθανόλη
R_s	Resolution / Διαχωριστική ικανότητα
TFA	Trifluoroacetic acid / Τριφθοροξικό οξύ
TEA	Triethylamine / Τριαιθυλαμίνη
RSD	Relative standard deviation / Σχετική τυπική απόκλιση
HETP	Height equivalent to one theoretical plate / Ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα
N	Theoretical plates / Αριθμός θεωρητικών πλακών
DDT	Dithiothreitol / Διθειοθρεϊτόλη
DAD	Diode array detector / Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
UV	Ultraviolet / Υπεριώδες
MS	Mass spectrometry / Φασματομετρία μαζών
ESI	electron spray ionization / Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
ELSD	Evaporative light scattering detector / Ανιχνευτής σκεδασμού φωτός
NMR	Nuclear magnetic resonance / Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
v/v	Volume per volume / Όγκος προς όγκο
w/w	Weight per weight / Βάρος κατά βάρος
C_{18}	Octadecane / Δεκαοκτάνιο

ΟΡΙΣΜΟΙ – ΤΥΠΟΙ

Παράγοντας
κατακράτησης: k'

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

t_R : χρόνος κατακράτησης

t_0 : νεκρός χρόνος

Διαχωριστική
ικανότητα: Rs

$$Rs = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$$

t_R : χρόνος κατακράτησης

t_{Rp} : χρόνος κατακράτησης της προηγούμενης ένωσης

W : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης

W_p : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης της προηγούμενης ένωσης

Παράγοντας
εμφάνισης ουράς: T_f

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2 \times a_{0,05}}$$

$W_{0,05}$: εύρος κορυφής μετρούμενο στο 5% του ύψους

$a_{0,05}$: εύρος του πρώτου μισού τμήματος της κορυφής στο 5% του ύψους

Παράγοντας
ασυμμετρίας: A_f

$$A_f = \frac{W_{0,1}}{a_{0,1}}$$

$W_{0,1}$: εύρος του δεύτερου μισού τμήματος της

κορυφής στο 10% του ύψους

$a_{0,1}$: εύρος του πρώτου μισού τμήματος της κορυφής στο 10% του ύψους

Αριθμός θεωρητικών
πλακών: N

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

t_R : χρόνος κατακράτησης

W : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης

Ύψος ισοδύναμο με
μια θεωρητική πλάκα:
 $HETP$

$$HETP = \frac{L \times 1000}{N} (\mu m)$$

L : μήκος στήλης

N : αριθμός θεωρητικών πλακών

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

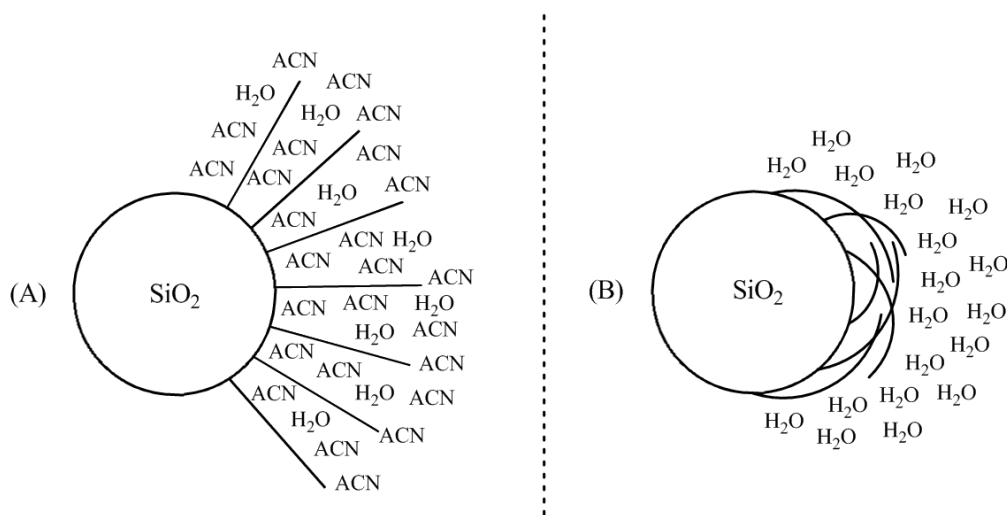
1.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

1.1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια τεχνική διαχωρισμού η οποία εφευρέθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από το Ρώσο βοτανολόγο *Mikhail Tswett*. Αυτός, χρησιμοποίησε την τεχνική για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές (όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες) με διαβίβαση διαλύματος αυτών μέσω υάλινου σωλήνα πληρωμένου με κονιοποιημένο ανθρακικό ασβέστιο. Με τη χρήση απολικών διαλυτών έκλουσης, οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως έγχρωμες ζώνες και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο *Tswett* επέλεξε το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική (από τις Ελληνικές λέξεις *χρώμα* και *γράφω*) [Ettre, 2003; Engelhardt, 2004; Abraham, 2004]. Αυτού του είδους η χρωματογραφία ήταν η γνωστή "υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης" (NPLC). Τα κύρια μειονεκτήματα της χρωματογραφίας κανονικής φάσης με στήλες από μη επικαλυμμένα ανόργανα οξείδια (SiO_2) ήταν οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης και η ανομοιογένεια της επιφάνειας της στατικής φάσης με αποτέλεσμα τη μη γραμμική ισόθερμο προσρόφησης των ενώσεων και την εμφάνιση μη συμμετρικών κορυφών. Με την εμφάνιση των προσδεσμένων στατικών φάσεων, στις αρχές του 1970, έγινε σύντομα κατανοητό ότι ένα σύστημα αντίθετης πολικότητας, δηλαδή η χρήση μιας υδρόφοβης στατικής φάσης με ένα μίγμα διαλυτών αποτελούμενο από ύδωρ και οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το ύδωρ, θα προσέφερε σημαντικά πλεονεκτήματα. Η χρωματογραφική αυτή τεχνική έγινε γνωστή με το όνομα "υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης" (RPLC). Μια άλλη παράμετρος που συνέβαλε σημαντικά στην ευρεία διάδοση της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης ήταν η εφαρμογή της τεχνικής στην ανάλυση ενός ευρέος φάσματος ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων και ενώσεων βιολογικού ενδιαφέροντος. Από τότε, η ανάπτυξη φαρμάκων περιελάμβανε την ταξινόμηση βιοδραστικών ενώσεων σχετικά με το συντελεστή κατανομής τους ως προς το σύστημα οκτανόλης/ύδατος [Hansch & Leo, 1995], το οποίο σχετίζεται με τη μεταφορά και την απορρόφηση των ενώσεων αυτών σε βιολογικά συστήματα [Bartalis & Halaweish, 2005]. Η ευρεία διάδοση της RPLC άφησε πίσω τη χρήση της NPLC, ενώ παράλληλα αναπτύχθηκε και η μικκυλιακή χρωματογραφία, για το

διαχωρισμό ενώσεων με πολύ ισχυρή κατακράτηση σε κοινές υδρόφοβες στατικές φάσεις [Berthod & Garcia-Alvarez-Coque, 2000].

Ένα πρόβλημα σχετικό με την RPLC, στο οποίο εστιάστηκε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, ήταν η έλλειψη κατακράτησης πολικών ενώσεων οι οποίες εμφανίζουν πολύ μικρή ή μηδαμινή κατανομή στις υδρόφοβες στατικές φάσεις [Olsen, 2001; Layne, 2002; Hanaí, 2003]. Μικρή κατακράτηση τέτοιων ενώσεων μπορούσε να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση κινητών φάσεων με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε ύδωρ (>90%, v/v). Η παρουσία ύδατος σε υψηλό ποσοστό στην κινητή φάση είχε ως αποτέλεσμα την "αδιαβροχοποίηση" (dewetting) της επιφάνειας της στήλης. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει διότι η υδατική κινητή φάση δεν μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό των πόρων μιας υδρόφοβης στατικής φάσης, λόγω της μεγάλης επιφανειακής τάσης των μορίων του ύδατος, με αποτέλεσμα τη σταδιακή "κατάρρευση" του υλικού πλήρωσης (phase collapse) της στήλης (Σχήμα 1.1.1). Απόρροια του παραπάνω φαινομένου είναι οι μη επαναλήψιμοι χρόνοι κατακράτησης και η σημαντική μείωση της απόδοσης της στήλης [Przybyciel & Majors, 2002; Walter *et al.*, 2005]. Επιπλέον, η χρήση κινητής φάσης με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ ελαττώνει δραστικά την ευαισθησία των ανιχνευτών φασματομετρίας μαζών (MS) λόγω της χαμηλής πτητικότητας και της δυσκολίας ιονισμού των μορίων του ύδατος [Voyksner, 1997; Naidong *et al.*, 2001].



Σχήμα 1.1.1: Σχηματική απεικόνιση: Α) των εκτεταμένων αλυσίδων C₁₈ παρουσία ACN και Β) της "κατάρρευσης" της στατικής φάσης C₁₈ παρουσία ύδατος σε ποσοστό 100%.

Η RPLC με ειδικά σχεδιασμένες στήλες, η ιοντική χρωματογραφία, η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων, αποτελούν κλασικές χρωματογραφικές τεχνικές οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατακράτηση πολικών ενώσεων [Bidlemeier *et al.*, 1979; Neue *et al.*, 2003]. Εντούτοις, κάθε μια από τις τεχνικές αυτές παρουσιάζει συγκεκριμένα μειονεκτήματα που τις καθιστούν αναποτελεσματικές.

Πολλές προσπάθειες γίνανε για να αντιμετωπιστεί η έλλειψη κατακράτησης των πολικών ενώσεων και αφορούσαν κυρίως την κατασκευή στατικών φάσεων με πολική ακροκάλυψη ή με ενσωμάτωση πολικών ομάδων έτσι ώστε να αποφευχθεί το φαινόμενο της "αδιαβροχοποίησης" και, κατά συνέπεια, της "κατάρρευσης" του υλικού C₁₈. Εντούτοις, οι στατικές αυτές φάσεις, αν και αντιστέκονται αποτελεσματικά στο φαινόμενο της "αδιαβροχοποίησης", αφενός δεν είναι αποτελεσματικές στην κατακράτηση πολικών ενώσεων [McCalley, 1999; O'Gara *et al.*, 1999; ^aSilva *et al.*, 2003; ^bSilva *et al.*, 2003] και αφετέρου επιδεικνύουν μικρότερη κατακράτηση σε μη πολικές ενώσεις σε σύγκριση με την κλασική στήλη C₁₈ [Layne, 2002].

Η έλλειψη κατακράτησης ενώσεων με υψηλή υδροφιλικότητα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα των πολικών ομάδων να δημιουργούν διπολικούς δεσμούς με τα μόρια του διαλύτη και να επιδιαλυτώνονται. Εφόσον οι απολικές στατικές φάσεις δεν μπορούν να προσφέρουν τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, οι ενώσεις παραμένουν στην κινητή φάση και εκλούνται πολύ κοντά στο "νεκρό" όγκο της στήλης. Οι δομικές ομάδες που προσδίδουν στις υδρόφιλες ενώσεις τις ιδιότητες αυτές είναι είτε ομάδες που ιονίζονται είτε ομάδες που έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε ισχυρούς δεσμούς διπόλου–διπόλου ή δεσμούς υδρογόνου [Hemström & Irgum, 2006].

Σε περιπτώσεις ύπαρξης ενός ή περισσότερων ομάδων που φέρουν φορτίο, η κατακράτηση επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η ιοντική χρωματογραφία (ion–exchange chromatography) αποτελεί στην περίπτωση αυτή μια καλή επιλογή η οποία πρακτικά μπορεί να εφαρμοστεί για όλες τις ενώσεις που ιονίζονται, όπως είναι τα ανόργανα ιόντα, οι πρωτεΐνες και άλλα βιολογικά μακρομόρια. Μια εναλλακτική τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας είναι η τεχνική σχηματισμού ζεύγους ιόντων (ion–pairing). Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη χρήση στηλών αντίστροφης φάσης οι οποίες έχουν χαμηλότερο κόστος και πολλές φορές επιδεικνύουν καλύτερη απόδοση από στατικές φάσεις αποτελούμενες από ιονανταλλακτικές ρητίνες. Η κατακράτηση επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός αντιδραστηρίου σχηματισμού ζεύγους ιόντων το οποίο έχει αντίθετο φορτίο από αυτό της προς ανάλυση ένωσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις στις

οποίες οι σταθερές διάστασης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μετατραπούν οι ενώσεις στην ουδέτερη μορφή τους, δεδομένου του περιορισμένου εύρους pH λειτουργίας των περισσότερων στατικών φάσεων. Ο μηχανισμός κατακράτησης περιλαμβάνει είτε την κατανομή των ουδέτερων ζευγών ιόντων στην υδρόφοβη στατική φάση, είτε τη δυναμική επικάλυψη της στατικής φάσης με το αντιδραστήριο σχηματισμού ζεύγους ιόντων και την ύπαρξη μιας μορφής ιονανταλλαγής με τις φορτισμένες ενώσεις [Garcia, 2005]. Τυπικά αντιδραστήρια για το σκοπό αυτό είναι το τριφθοροξικό οξύ, το επταφθοροβουτυρικό οξύ και το επτανοσουλφονικό νάτριο. Έχει αποδειχθεί όμως, ότι η χρήση τέτοιων αντιδραστηρίων προκαλεί σημαντική μείωση στην απόκριση του ανιχνευτή μαζών με ηλεκτροψεκασμό [Gustavsson *et al.*, 2001; Avery, 2003; Nguyen & Schug, 2008].

Οι ενώσεις που είναι πολύ υδρόφιλες και ταυτόχρονα ουδέτερες αποτελούν μια από τις πιο προβληματικές κατηγορίες ενώσεων τόσο στην υγρή όσο και στην αέρια χρωματογραφία. Όσον αφορά την υγρή χρωματογραφία, το γεγονός αυτό προκύπτει από την έλλειψη ιονιζόμενων ομάδων και κατά συνέπεια την απουσία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [Neue *et al.*, 2001]. Επιπλέον, η χαμηλή πτητικότητα ή ακόμα και η αστάθεια των ενώσεων αυτών καθιστά δύσκολη την ανάλυσή τους με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. Ένας συνήθης τρόπος αύξησης της κατακράτησης τέτοιων ενώσεων είναι η μετατροπή ενός ή περισσότερων πολικών ομάδων σε απολικές με τη χρήση χημικών αντιδράσεων, τεχνική η οποία είναι γνωστή ως παραγωγοποίηση [Lunn & Hellwig, 1998]. Πέραν της αύξησης του χρόνου κατακράτησης, η παραγωγοποίηση μπορεί να προσδώσει και άλλες χρήσιμες ιδιότητες στις ενώσεις, όπως για παράδειγμα τη δυνατότητα ανίχνευσης με ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού ή φθορισμού. Η τεχνική της παραγωγοποίησης είναι συνήθως αποτελεσματική όταν μια χαρακτηριστική ομάδα ενός μορίου είναι δραστική και αντιδρά σχηματίζοντας ένα προϊόν υπό ήπιες συνθήκες. Για ενώσεις που φέρουν πολλαπλές δραστικές ομάδες, οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης συχνά είναι μη ποσοτικές και οδηγούν στο σχηματισμό παραπροϊόντων. Ένα άλλο μειονέκτημα της παραγωγοποίησης είναι ο ατελής, συχνά, διαχωρισμός ενώσεων με μεγάλη χημική συγγένεια. Επιπλέον, η τεχνική αυτή απαιτεί επιπρόσθετο χρόνο κατεργασίας δείγματος και αυξάνει την αβεβαιότητα σε έναν ποσοτικό προσδιορισμό [Hemström & Irgum, 2006].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ένας ορθολογικός τρόπος αντιμετώπισης της έλλειψης κατακράτησης των υδρόφιλων και ταυτόχρονα ουδέτερων ενώσεων στην υγρή χρωματογραφία θα ήταν μια τεχνική "αντίστροφη" της RPLC, δηλαδή μια μέθοδος διαχωρισμού στην οποία μια πολική στατική φάση έλκει και εμπλουτίζεται από το

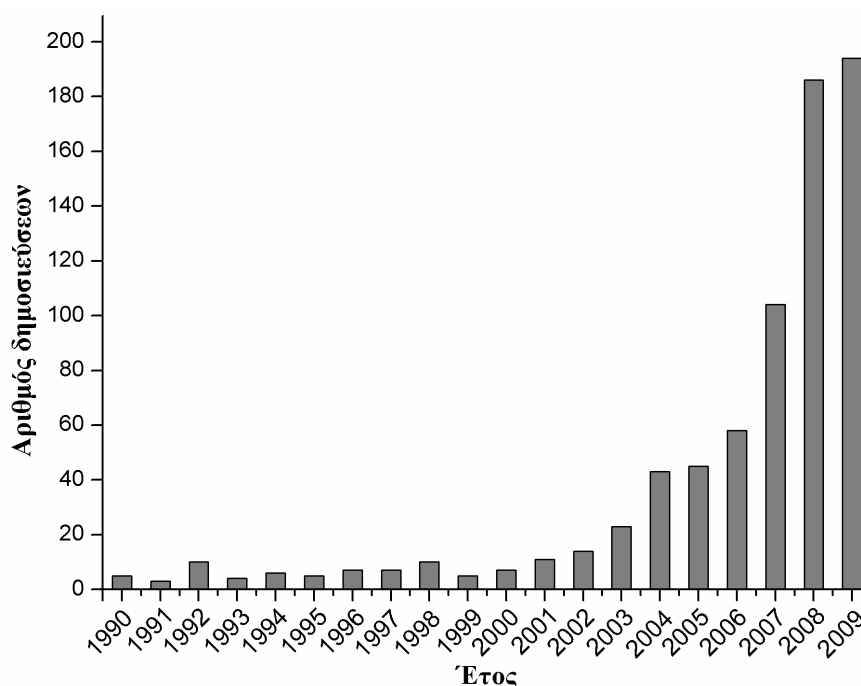
περισσότερο πολικό μέρος της κινητής φάσης, δρώντας ως το σημείο κατακράτησης, ενώ ταυτόχρονα η κινητή φάση προσφέρει τέτοιες ιδιότητες ώστε να επιτρέπει τη γρήγορη και γραμμική κατανομή μεταξύ αυτής και της στατικής φάσης. Η *υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης* (HILIC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού που πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις και με τη χρήση της επιτυγχάνεται η κατακράτηση εξαιρετικά πολικών μορίων, φορτισμένων ή ουδέτερων [Grumbach *et al.*, 2004; Hemström & Irgum, 2006].

1.1.2 Ιστορικά στοιχεία της HILIC

Το 1990, ο Alpert εισήγαγε μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης, με το ακρωνύμιο "*HILIC-hydrophilic interaction liquid chromatography*", για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεοτίδια και υδατάνθρακες χρησιμοποιώντας υδατο-οργανική κινητή φάση [Alpert, 1990]. Εντούτοις, η τεχνική της HILIC είχε χρησιμοποιηθεί ακόμα παλαιότερα. Το 1951 ο Gregor και οι συνεργάτες του ανέφεραν πρώτοι την ύπαρξη μιας στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια υδρόφιλων στατικών φάσεων, όπως είναι οι στήλες από ιονανταλλακτικές ρητίνες. Λίγο αργότερα, το 1952, οι Samuelson και Sjöström περιέγραψαν το διαχωρισμό μονοσακχαριτών με ιονανταλλακτική στήλη μέσω βαθμιδωτής έκλουσης, με αρχικές συνθήκες 99,5% αιθανόλη και τελικές συνθήκες έκλουσης 100% ύδωρ. Το 1954 οι Rückert και Samuelson πρότειναν ότι η υδατική στιβάδα σχετίζεται με τη συγκράτηση των μη ηλεκτρολυτικών ενώσεων σε ιονανταλλακτικές στήλες. Η ίδια τεχνική είχε χρησιμοποιηθεί επίσης και το 1975 για τη χρωματογραφική ανάλυση σακχάρων και ολιγοσακχαριτών [Linden & Lawhead, 1975; Palmer, 1975]. Οι διαχωρισμοί αυτοί όμως είχαν περιορισμένη εφαρμογή διότι μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μόνο υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης λόγω της χρήσης του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Επιπλέον, από τη μελέτη των Havlicek και Samuelson (1975) προέκυψαν πολύ καλοί διαχωρισμοί ολιγοσακχαριτών με τη χρήση στηλών αποτελούμενων από ιονανταλλακτικές ρητίνες τύπου πηκτής (gel-type). Η τεχνική της HILIC είχε επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κοκαΐνης σε δείγμα ορού αίματος [Lampert & Stewart, 1989], ενώ ο Rabel και οι συνεργάτες του παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι η τεχνική αυτή είναι μια παραλλαγή της NPLC [Rabel *et al.*, 1976].

Αν και η HILIC είχε χρησιμοποιηθεί αρκετά χρόνια νωρίτερα, η ραγδαία αύξηση της χρήσης της τεχνικής ξεκίνησε τα τελευταία πέντε περίπου χρόνια. Στο Σχήμα 1.1.2 φαίνεται ο αριθμός των δημοσιεύσεων από το έτος 1990 έως το 2009 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων

SciFinder, χρησιμοποιώντας ως λέξεις κλειδιά τους όρους "HILIC" ή "Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography" [Lämmerhofer, 2010]. Εντούτοις, ο πραγματικός αριθμός δημοσιεύσεων ενδέχεται να είναι μεγαλύτερος διότι στη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται και άλλες ορολογίες πέραν του όρου HILIC. Παρόλο που η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε έναν πολύ μεγάλο αριθμό εφαρμογών, είναι λίγες οι μελέτες που αφορούν τη λεπτομερή εξέταση των χρωματογραφικών συνθηκών που σχετίζονται με το μηχανισμό κατακράτησης [Hao *et al.*, 2008].



Σχήμα 1.1.2: Αριθμός δημοσιεύσεων στην HILIC από το 1990 έως το 2009 [Lämmerhofer, 2010].

1.1.3 Βασικά χαρακτηριστικά της HILIC – Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Η κινητή φάση στην HILIC αποτελείται από μίγμα διαλυτών το οποίο συνίσταται από ύδωρ και έναν οργανικό διαλύτη αναμίξιμο με το ύδωρ. Το ύδωρ αποτελεί τον ισχυρό διαλύτη έκλουσης και κυμαίνεται σε ποσοστά 5 έως και 40% (v/v). Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης είναι το ACN. Επιπλέον οργανικοί διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η MeOH, η EtOH, η IPA και το THF [Li & Huang, 2004; Ali *et al.*, 2007]. Τυπικές χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται στην HILIC είναι η μη επικαλυμμένη πυριτία (bare silica) και στατικές φάσεις με βάση την πυριτία η επιφάνεια

της οποίας είναι επικαλυμμένη με διάφορες πολικές ομάδες όπως είναι οι αμιδο-, αμινο-, κυανο-ομάδες, οι διόλες κ.α.

Αν και η σύσταση της κινητής φάσης στην HILIC είναι κατά βάση η ίδια με αυτή στην RPLC, η επίδραση αυτής στην κατακράτηση μιας ένωσης είναι πολύ διαφορετική. Η κατακράτηση στην HILIC πιστεύεται ότι περιλαμβάνει την κατανομή των ενώσεων μεταξύ μιας στιβάδας ύδατος, "μερικώς ακινητοποιημένης" στην επιφάνεια μιας πολικής στατικής φάσης, και του υπόλοιπου σχετικά υδρόφοβου μέρους της κινητής φάσης [Alpert, 1990]. Έτσι, οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιας ένωσης και της στατικής φάσης στην HILIC, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων ιονανταλλαγής και των δεσμών υδρογόνου, είναι πολύ πιο σημαντικές στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης σε σχέση με την RPLC, όπου κυριαρχούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [Hao *et al.*, 2008].

Στην HILIC, η παρουσία ύδατος στην κινητή φάση προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με την κλασική NPLC. Συγκεκριμένα, η προετοιμασία της κινητής φάσης είναι πιο απλή διότι απουσία απολικών διαλυτών δεν απαιτείται έλεγχος ως προς το περιεχόμενο ύδωρ και αποφεύγονται προβλήματα σχετικά με την ομοιογένεια της κινητής φάσης. Επιπλέον, η παρουσία απολικών διαλυτών στην NPLC (συχνά η κινητή φάση παρασκευάζεται με βάση το εξάνιο) δυσχεραίνει τη διαλυτότητα των πολικών ενώσεων. Επίσης, ο συνδυασμός της NPLC με τον ανιχνευτή μαζών είναι προβληματικός διότι ο ιονισμός δεν επιτυγχάνεται εύκολα παρουσία οργανικών και απολικών διαλυτών σε υψηλά ποσοστά στην κινητή φάση. Η σειρά έκλουσης στην HILIC είναι περίπου αντίθετη από αυτήν που ισχύει στην RPLC [Alpert, 1990], γεγονός που σημαίνει ότι η τεχνική της HILIC είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό ενώσεων που είναι προβληματικός στην RPLC. Από τη συμπληρωματική εκλεκτικότητα μεταξύ της HILIC και της RPLC προκύπτει ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που είναι η δυνατότητα συνδυασμού με τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού δειγμάτων. Όταν η HILIC χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (RP-SPE), ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης (οργανικός) που χρησιμοποιείται για την εκρόφηση των ενώσεων από τη συσκευή SPE, αποτελεί τον ασθενή διαλύτη έκλουσης στην HILIC. Επιπλέον, η εκχύλιση υγρού-υγρού ή ακόμα και η καταβύθιση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα γίνεται συνήθως με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη (π.χ. ACN, MeOH, EtOH). Κατά συνέπεια, είναι δυνατή η απευθείας έγχυση του εκλούσματος εκχύλισης στο σύστημα της HPLC, γεγονός το οποίο ελαττώνει σημαντικά το χρόνο κατεργασίας πριν την ανάλυση (π.χ. εξάτμιση και επαναδιαλυτοποίηση) καθώς και τις πιθανές απώλειες συστατικών κατά τη διάρκεια μιας πειραματικής πορείας [Wang *et al.*,

2005; Naidong *et al.*, 2002]. Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση είναι εφικτή σε περιπτώσεις που οι προς ανάλυση ενώσεις εμφανίζουν κατακράτηση σε στατικές φάσεις τόσο της RPLC όσο και της HILIC. Η συμπληρωματική εκλεκτικότητα της HILIC ως προς την RPLC καθιστά επίσης δυνατή την ανάπτυξη διαχωρισμών δυο διαστάσεων (2-D LC-LC) καθώς και στις δυο τεχνικές χρησιμοποιούνται υδατο-οργανικές κινητές φάσεις, γεγονός το οποίο λειτουργεί ευνοϊκά στη μεταφορά κλασμάτων κινητής φάσης μεταξύ των δυο στατικών φάσεων [Jandera, 2008; McCalley, 2007].

Η παρουσία οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (συνήθως 60–95%, v/v), στην HILIC, ελαττώνει σημαντικά το ιξώδες της κινητής φάσης με αποτέλεσμα η πίεση που αναπτύσσεται στη στήλη να είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή στην RPLC. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα αφού είναι δυνατή η εφαρμογή υψηλών ροών κινητής φάσης και κατά συνέπεια η ελάττωση του χρόνου ανάλυσης [Appelblad *et al.*, 2008; Pack & Risley, 2005; Shou *et al.*, 2002]. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η αύξηση της ροής της κινητής φάσης είναι ευνοϊκή μέχρι το σημείο όπου δεν λαμβάνει χώρα σημαντική μείωση της απόδοσης της χρωματογραφικής στήλης. [Appelblad *et al.*, 2008].

Ένα ακόμα πλεονέκτημα που προκύπτει από την υψηλή περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία κατά το συνδυασμό της HILIC με μεθόδους ανίχνευσης όπως είναι ο ανιχνευτής μαζών και ο ανιχνευτής σκεδασμού φωτός (ELSD). Όσον αφορά τον ανιχνευτή μαζών, η υψηλή πτητικότητα της κινητής φάσης είναι ιδανική για τη δημιουργία αερολύματος, την αποτελεσματική εξάτμιση του διαλύτη και τον ιονισμό των αναλυόμενων ενώσεων [Grumbach *et al.*, 2004; Naidong, 2003; Shou & Naidong, 2005]. Ομοίως, ένα από τα βασικά στάδια στη λειτουργία του ανιχνευτή σκεδασμού φωτός είναι η δημιουργία αερολύματος και στη συνέχεια η εξάτμιση του διαλύτη. Έτσι, και στην περίπτωση αυτή, η λειτουργία του ανιχνευτή ευνοείται σημαντικά από την παρουσία κινητής φάσης με υψηλή πτητικότητα [Appelblad *et al.*, 2008].

Επιπλέον, η HILIC αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική διαχωρισμού βασικών ενώσεων. Ως γνωστό, οι οργανικές βάσεις αποτελούν μια ιδιαίτερα προβληματική κατηγορία ενώσεων στην τεχνική της RPLC αφενός λόγω της μικρής κατακράτησης και αφετέρου λόγω της λήψης ασύμμετρων χρωματογραφικών κορυφών [McCalley, 2010].

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της HILIC συνοψίζονται παρακάτω:

- Κατακράτηση και διαχωρισμός πολικών ενώσεων, φορτισμένων ή ουδέτερων
- Συμπληρωματική εκλεκτικότητα της HILIC ως προς την RPLC
- Εξάλειψη χρονοβόρων σταδίων προκατεργασίας δείγματος
- Δυνατότητα εφαρμογής υψηλών ροών κινητής φάσης
- Συμβατότητα της κινητής φάσης με ανιχνευτές όπου απαιτείται εξάτμιση του διαλύτη, όπως ο ανιχνευτής μαζών και ο ανιχνευτής σκεδασμού φωτός
- Ικανοποιητικό σχήμα χρωματογραφικών κορυφών σε βασικές ενώσεις

Η τεχνική της HILIC, εκτός από πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών διαχωρισμού, παρουσιάζει επίσης περιορισμούς και μειονεκτήματα. Ένας σημαντικός περιορισμός της τεχνικής προκύπτει από τη μειωμένη διαλυτότητα των αλάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη (ACN) σε υψηλά ποσοστά. Για το λόγο αυτό, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα άλατα είναι το μυρμηκικό αμμώνιο και το οξικό αμμώνιο, καθώς αυτά εμφανίζουν καλή διαλυτότητα παρουσία οργανικού διαλύτη ακόμα και σε ποσοστό 90 ή 95% (v/v). Εντούτοις, τα άλατα αυτά καλύπτουν συμπληρωματικά ένα σημαντικό εύρος pH (από 3,0 έως 6,0). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος «περιορισμός» στη χρήση αλάτων αφορά κυρίως το μέρος της ανάπτυξης ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού. Από την άλλη μεριά, η χρήση μόνο πτητικών αλάτων στην κινητή φάση λειτουργεί ευνοϊκά για τους ανιχνευτές ESI-MS και ELSD. Επιπλέον άλατα και τροποποιητές που έχουν χρησιμοποιηθεί, με άλλες μεθόδους ανίχνευσης (UV, DAD), είναι το οξικό νάτριο, το ανθρακικό αμμώνιο, το φωσφορικό οξύ σε συνδυασμό με τριαιθυλαμίνη (TEAP), το χλωριούχο αμμώνιο, το μεθυλοφωσφορικό νάτριο (Na-MePO_4), το φωσφορικό αμμώνιο, το τριφθοροξικό οξύ (TFA), το μυρμηκικό οξύ και το οξικό οξύ [Boersema *et al.*, 2008; Grumbach *et al.*, 2004].

Στα μειονεκτήματα της HILIC συγκαταλέγονται και οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης της στήλης κυρίως στη βαθμιδωτή έκλουση. Σε σύγκριση με την RPLC, όπου ο χρόνος εξισορρόπησης της στήλης κυμαίνεται από 15 έως 30 min, ο χρόνος εξισορρόπησης στην HILIC συνήθως κυμαίνεται από 45 έως 60 min [Ali *et al.*, 2007]. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι χρόνοι εξισορρόπησης είναι μεγαλύτεροι της μιας ώρας, γεγονός το οποίο εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο άλας στην κινητή φάση και από τη φύση της ίδιας της στατικής φάσης. Μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης, συνήθως, απαιτούνται για στήλες που φέρουν φορτίο, όπου τα ιόντα αντίθετου φορτίου, προερχόμενα από το άλας του ρυθμιστικού

διαλύματος, έχουν την τάση να προσροφούνται ηλεκτροστατικά στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντισταθμιστεί, έως ένα βαθμό, με τη δυνατότητα εφαρμογής υψηλών ροών λόγω του χαμηλού ιξώδους της κινητής φάσης με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του χρόνου εξισορρόπησης [Pack & Risley, 2005]. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η πολύ ισχυρή κατακράτηση ή ακόμα και η μη αντιστρεπτή προσρόφηση ενώσεων που εμφανίζουν μεγάλη χημική συγγένεια με τη στατική φάση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο σε βασικές ενώσεις, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά από την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια μιας στατικής φάσης (π.χ. ομάδες σιλανόλης) μέσω ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όσο και σε όξινες ενώσεις με τη χρήση στηλών που φέρουν θετικά φορτισμένες ομάδες (π.χ. αμινομάδες). Μειονέκτημα επίσης αποτελεί η ευαισθησία ορισμένων στατικών φάσεων, με βάση την πυριτία, σε μεγάλες περιεκτικότητες ύδατος στην κινητή φάση. Συγκεκριμένα, υπάρχουν στατικές φάσεις με βάση την πυριτία, όπως η αμινο-πυριτία και σε μικρότερο βαθμό η διόλη-πυριτία στις οποίες παρατηρείται αποκόλληση υλικού (column bleeding) παρουσία ύδατος σε ποσοστό 30–50% (v/v) με αποτέλεσμα τη βαθμιαία μείωση της απόδοσης της στήλης. Το φαινόμενο αυτό αφενός μειώνει σημαντικά το χρόνο ζωής της στήλης και αφετέρου δυσχεραίνει τη χρήση γενικών ανιχνευτών (MS, ELSD) λόγω αυξημένου θορύβου ή εμφάνισης επιπλέον χρωματογραφικών κορυφών πέραν των αναλυόμενων συστατικών [Jandera, 2008]. Τέλος, η HILIC είναι μια τεχνική διαχωρισμού λιγότερο "φιλική" προς το περιβάλλον, σε σύγκριση με την RPLC, λόγω της κατανάλωσης μεγαλύτερων όγκων οργανικού διαλύτη [McCalley, 2010].

1.1.4 Μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC

Οι ενώσεις που μπορούν να διαχωριστούν εφαρμόζοντας την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης περιλαμβάνουν πολύ υδρόφοβα μόρια, όπως τα καροτενοειδή, και πολύ υδρόφιλα, όπως είναι οι υδατάνθρακες και τα αμινοξέα. Κατά παράδοση, οι υδρόφιλες ενώσεις διαχωρίζονται με την τεχνική της NPLC, ενώ οι περισσότεροι υδρόφοβες ενώσεις με την τεχνική της RPLC.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο Alpert (1990) ανέδειξε την τεχνική της HILIC για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων, σύμφωνα με τον οποίο, οι προς ανάλυση ενώσεις αλληλεπιδρούν με μια υδρόφιλη στατική φάση και εκλύονται με μια σχετικά υδρόφοβη κινητή φάση, αποτελούμενη από μίγμα ACN και H₂O.

Σύμφωνα με τον ίδιο συγγραφέα, ο όρος HILIC θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν:

- ❖ ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης είναι το ύδωρ και
- ❖ ο μηχανισμός κατακράτησης λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής

Η διάκριση μεταξύ της HILIC και της NPLC βρίσκεται κατά κάποιον τρόπο υπό συνεχή εξέταση στη διεθνή βιβλιογραφία. Αν και η κατακράτηση στην NPLC λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φαινομένων επιφανειακής προσρόφησης, ο Alpert πρότεινε ότι ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC περιλαμβάνει την κατανομή μια ένωσης μεταξύ του μεγαλύτερου όγκου της κινητής φάσης και μιας στιβάδας, αποτελούμενης στο μεγαλύτερο ποσοστό από ύδωρ και μερικώς ακινητοποιημένης στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Τα επιχειρήματα για την πρόταση ενός μηχανισμού κατανομής προέκυψαν από πειράματα κατακράτησης και διαχωρισμού υδατανθράκων που πραγματοποιήθηκαν από τους Verhaar και Kuster [Verhaar & Kuster, 1982], Orth και Engelhardt [Orth & Engelhardt, 1982] και Nikolov και Reilly [Nikolov & Reilly, 1985] παρουσία ύδατος στην κινητή φάση και με τη χρήση στηλών από μη επικαλυμμένη πυριτία και πυριτία επικαλυμμένη με διαφορετικές αμινομάδες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν τη συνεισφορά της κατανομής στο μηχανισμό κατακράτησης, αφού οι στατικές φάσεις έχουν τη δυνατότητα συγκράτησης μέρους της κινητής φάσης με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ, υπό τη μορφή στιβάδας. Στην ύπαρξη του μηχανισμού κατανομής στην HILIC συνηγόρησαν και οι χρωματογραφικές μελέτες των Müller και Kutemeier [Müller & Kutemeier, 1982; Müller, 1986] οι οποίες αφορούσαν το διαχωρισμό βιομορίων σε στατικές φάσεις από πολυ(αιθυλενογυκόλη) και δεξτράνη. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι: α) η αύξηση του χρόνου κατακράτησης της ομόλογης σειράς των ολιγονουκλεοτιδίων είναι ανάλογη με την αύξηση του μεγέθους των μορίων και β) οι χρόνοι κατακράτησης των μορίων επηρεάζονται σημαντικά με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος στην κινητή φάση. Εντούτοις, από τις παραπάνω μελέτες δεν προκύπτουν πειστικά στοιχεία όσον αφορά το μηχανισμό και ιδιαίτερα για το αν λαμβάνει χώρα άμεση επαφή/αλληλεπίδραση μεταξύ των ενώσεων και της επιφάνειας της στατικής φάσης.

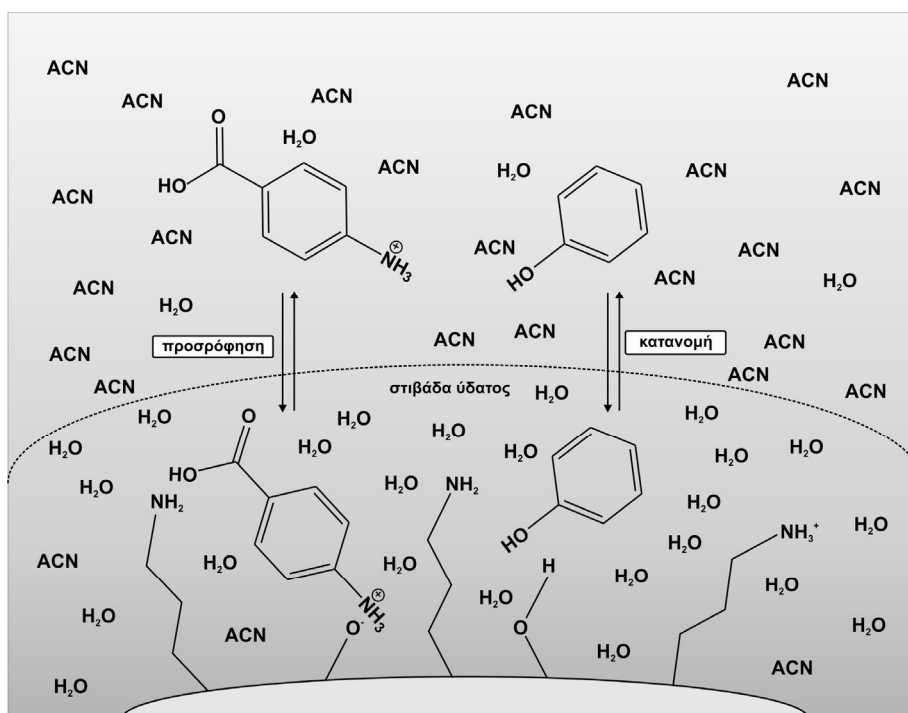
Η ύπαρξη μιας "ακινητοποιημένης" στιβάδας ύδατος έχει λάβει ευρεία αποδοχή με δεδομένο το μεγάλο αριθμό αναφορών στη μελέτη του Alpert (1990). Για το λόγο αυτό ο μηχανισμός κατανομής υγρού-υγρού αποκτά όλο και μεγαλύτερη αποδοχή. Η ύπαρξη μιας στιβάδας με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ (πιθανότατα μια στιβάδα με μεταβαλλόμενη σύσταση και δομή) στην επιφάνεια μιας πολικής στατικής φάσης, αναδεικνύει το ρόλο του ύδατος στο μηχανισμό κατακράτησης σε στατικές φάσεις με βάση την πυριτία [Verhaar & Kuster, 1982; Orth & Engelhardt, 1982; Nikolov & Reilly, 1985]. Μελετώντας με

μεγαλύτερη προσοχή τις παραπάνω αναφορές, προκύπτει το γεγονός ότι οι Verhaar και Kuster δεν πραγματοποίησαν πειράματα σχετικά με το μηχανισμό. Αντίθετα, οι δυο συγγραφείς αναφέρονται στη μελέτη του Samuelson, που πραγματοποιήθηκαν διαχωρισμοί σακχάρων σε στήλες αποτελούμενες από υλικά ιονανταλλαγής. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να υπάρξει μια διαφοροποίηση μεταξύ των υλικών ιονανταλλαγής και αυτού της πυριτίας. Τα υλικά ιονανταλλαγής είναι ξηροπηκτώματα (xerogels) με υψηλό φορτίο και μεγάλη υδροφιλικότητα και έχουν την ιδιότητα να διογκώνονται ομοιόμορφα και σε μεγάλο βαθμό παρουσία ύδατος. Αντίθετα, η πυριτία συγκρατεί μόρια ύδατος μόνο στην επιφάνειά της. Κατά συνέπεια, με την ύπαρξη του μηχανισμού κατανομής σε διαχωρισμούς με στήλες ιονανταλλαγής [Samuelson, 1969] δεν συνεπάγεται και η ύπαρξη του ίδιου μηχανισμού σε στήλες από πορώδη υλικά με βάση την πυριτία.

Εξετάζοντας το φαινόμενο από μια διαφορετική οπτική γωνία, μπορεί να ειπωθεί ότι η στιβάδα ύδατος είναι δυναμικά ακινητοποιημένη στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης, γεγονός το οποίο είναι πολύ διαφορετικό από τη μόνιμη πρόσδεση, μέσω χημικού δεσμού, όπως είναι για παράδειγμα οι ανθρακικές αλυσίδες σε μια στήλη αντίστροφης φάσης. Ο Alpert σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει χαρακτηριστικά ότι: *«ένα μοντέλο για το μηχανισμό κατακράτησης υποδεικνύει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ της κινητής φάσης και μιας αργά κινούμενης στιβάδας ύδατος με την οποία η στατική φάση είναι ενυδατωμένη»* [Alpert, 2008]. Από την άλλη μεριά, η υδατική στιβάδα δεν δημιουργείται σε μια αδρανή στατική φάση. Έτσι, τα μόρια του ύδατος δεν μπορούν να αποτρέψουν το σύνολο των δομικών ομάδων μιας πολικής στατικής φάσης, όπως οι σιλανομάδες, οι αμινομάδες κ.α., από το να αλληλεπιδράσουν με τους αναλύτες. Συνεπώς, πολικές ενώσεις σχετικά μικρού μοριακού βάρους θα μπορούσαν εύκολα να διεισδύσουν στην υδατική στιβάδα και να αλληλεπιδράσουν απευθείας με τις δομικές ομάδες της επιφάνειας της στήλης, αν και η υπόθεση αυτή δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί πειραματικά.

Ανεξάρτητα από την παραπάνω υπόθεση, η αποσαφήνιση του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC είναι υπό συνεχή εξέταση και οι απόψεις στην έως τώρα διεθνή βιβλιογραφία δίστανται σχετικά με το ζήτημα αυτό. Ένα μέρος της βιβλιογραφίας υποστηρίζει ότι ο κύριος μηχανισμός περιλαμβάνει την κατανομή των ενώσεων στην υδατική στιβάδα άνωθεν της επιφάνειας της στατικής φάσης και επίσης ότι οι ενώσεις δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με την ίδια τη στατική φάση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται συχνά ο όρος "υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις" χωρίς να διασαφηνίζεται περαιτέρω [Verhaar & Kuster, 1982; Alpert, 1990; Orth & Engelhardt, 1982; Nikolov & Reilly, 1985; Shou & Naidong, 2005;

Alpert *et al.*, 1994; Guo, 2005; Guo & Huang, 2003]. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός πολυτροπικού (multimodal) μηχανισμού στον οποίο, πιθανό να λαμβάνουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου –η ισχύς των οποίων εξαρτάται από την οξύτητα ή την βασικότητα των ενώσεων– ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις διπόλου–διπόλου ή ιόντος–διπόλου [Tanaka *et al.*, 2003; Li & Huang, 2004; Guo & Gaiki, 2005; Strege, 1998; Berthod *et al.*, 1998; Tolstikov & Fiehn, 2002; Kovalova *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2008; Quiming *et al.*, 2008; Pack & Risley, 2005; Olsen, 2001; Zhou & Lucy, 2008; Christopherson *et al.*, 2006; Vikingsson *et al.*, 2008; Boersema *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Quiming *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Xuan *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008]. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη διαφορετικών πολικών ομάδων σε μια ένωση επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο, το είδος των αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση [Yoshida, 2004; Guo *et al.*, 2007; Naidong, 2003]. Στο Σχήμα 1.1.3 απεικονίζεται ένας προτεινόμενος πολυτροπικός μηχανισμός κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα κατανομή και επιφανειακή προσρόφηση ανάλογα με τις ιδιότητες των ενώσεων και της στατικής φάσης [Nguyen & Schug, 2008].



Σχήμα 1.1.3: Απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC [Nguyen & Schug, 2008].

1.1.4.1 Μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης

Πριν την εξέταση του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC με περισσότερες λεπτομέρειες, θα πρέπει να αναφερθούν οι βασικές εξισώσεις που περιγράφουν την κατανομή και την επιφανειακή προσρόφηση. Η RPLC έχει τις αρχές της στη χρωματογραφία υγρού-υγρού και η κατακράτηση θεωρείται ότι βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο μηχανισμό κατανομής. Η εξίσωση που περιγράφει το μηχανισμό κατανομής στην RPLC είναι η ακόλουθη:

$$\log k' = \log k'_w - S\phi \quad (1)$$

όπου: k' είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης, k'_w είναι ο παράγοντας κατακράτησης του ασθενούς διαλύτη έκλουσης (H_2O), ϕ το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (% περιεκτικότητα) και S η κλίση της εξίσωσης $\log k' = f(\phi)$ [Poole, 2003].

Υπάρχουν διάφορα αποδεδειγμένα μοντέλα που περιγράφουν το μηχανισμό κατακράτησης στην NPLC. Το πρώτο μοντέλο που αφορά τη χρωματογραφία προσρόφησης προτάθηκε από τον Snyder [Snyder, 1968] και αργότερα συνδυάστηκε με το μοντέλο των Soczewinski και Wachtmeister [Soczewinski & Wachtmeister, 1962; Soczewinski, 1969] οπότε και προέκυψε το μοντέλο Snyder-Soczewinski [Snyder, 1974; Snyder & Poppe, 1980]. Σύμφωνα με το μοντέλο Snyder-Soczewinski, η έκλουση λαμβάνει χώρα μέσω αντικατάστασης μορίων μιας ένωσης από μόρια διαλύτη (και αντίστροφα) πάνω στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Για τα συμβατικά χρωματογραφικά συστήματα κανονικής φάσης, όπου η κατακράτηση βασίζεται στην επιφανειακή προσρόφηση, η σχέση που συνδέει τον παράγοντα κατακράτησης μιας ένωσης (k') με το γραμμομοριακό κλάσμα N_B του ισχυρού διαλύτη έκλουσης B της κινητής φάσης δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση [Snyder & Poppe, 1980; Nikitas *et al.*, 2002]:

$$\log k' = \log k'_B - \frac{As}{n_B} \log N_B \quad (2)$$

όπου: k'_B είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης παρουσία μόνο του διαλύτη B στην κινητή φάση, As και n_B είναι σταθερές που σχετίζονται με τις περιοχές της επιφάνειας της στήλης που είναι καλυμμένες από μόρια της ένωσης και του διαλύτη B αντίστοιχα.

Η κατασκευή διαγραμμάτων $\log k'$ συναρτήσει της % περιεκτικότητας του ύδατος (κατανομή) και του λογάριθμου της περιεκτικότητας του ύδατος (προσρόφηση) στην κινητή φάση μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για το αν η κατανομή ή η επιφανειακή προσρόφηση είναι ο επικρατέστερος μηχανισμός κατακράτησης. Στην περίπτωση προσαρμογής των δυο μοντέλων σε συνθήκες HILIC, οι δυο εξισώσεις που περιγράφηκαν παραπάνω παίρνουν την ακόλουθη μορφή:

$$\log k' = \log k'_{org} - S\varphi \quad (1)'$$

όπου: $\log k'_{org}$ είναι ο παράγοντας κατακράτησης του ασθενούς διαλύτη έκλουσης (δηλ. ACN), και φ το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (δηλ. H₂O) και

$$\log k' = \log k'_w - \frac{As}{n_w} \log \varphi \quad (2)'$$

όπου: k'_w είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης παρουσία μόνο υδατικού διαλύτη στην κινητή φάση, As και n_B είναι σταθερές που σχετίζονται με τις περιοχές της επιφάνειας της στήλης που είναι καλυμμένες από μόρια της ένωσης και μόρια ύδατος αντίστοιχα, και φ είναι το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (δηλ. H₂O) [Hemström & Irgum, 2006; Snyder *et al.*, 1997].

Πέρα από τα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης, προτάθηκε πρόσφατα από τον Jin και τους συνεργάτες του ένα μοντέλο το οποίο, σύμφωνα με τους συγγραφείς, περιγράφει ικανοποιητικά το μηχανισμό κατακράτησης στη HILIC και δίνεται από την εξίσωση:

$$\ln k' = a + b \ln \varphi + c\varphi \quad (3)$$

όπου: a είναι ο συντελεστής που σχετίζεται με την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των αναλυτών και της στατικής και κινητής φάσης, b είναι συντελεστής σχετιζόμενος με την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη–στατικής φάσης και c ο συντελεστής που σχετίζεται με την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων του αναλύτη και της κινητής φάσης. Το μοντέλο αυτό προέκυψε από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς οκτώ νουκλεοζιτών σε τέσσερις διαφορετικές στατικές φάσεις. Από τη σύγκριση διαφορετικών μοντέλων κατακράτησης, η εξίσωση (3) έδωσε την καλύτερη προσαρμογή στους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων, με το σχετικό σφάλμα των προβλεπόμενων τιμών των χρόνων κατακράτησης να είναι μικρότερο από 5% [Jin *et al.*, 2008].

1.1.4.2 Ο ρόλος της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ύδωρ

Ο μηχανισμός κατακράτησης και η χρωματογραφική συμπεριφορά των πολικών ενώσεων στην HILIC έχει μελετηθεί με τη χρήση διαφορετικών κινητών και στατικών φάσεων και σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Εκτός από τον περισσότερο αποδεκτό μηχανισμό κατανομής στην HILIC, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις ενδέχεται να λαμβάνουν μέρος στο συνολικό μηχανισμό. Ο κύριος μηχανισμός στην HILIC δεν είναι πάντα προβλέψιμος και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, καθώς και τις χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέγονται [Hao *et al.*, 2008].

Οι Orth και Engelhardt πραγματοποίησαν μια σειρά πειραμάτων, με σκοπό τη διασαφήνιση του μηχανισμού της HILIC, που περιελάμβαναν την ικανότητα των στατικών φάσεων αμινο–, αιθυλενοδιαμινο– και διαιθυλενοδιαμινο–πυριτίας να συγκρατούν μόρια ύδατος. Μετά από τη χρήση μίγματος ACN/H₂O διαβιβάστηκε 100% διχλωρομεθάνιο, ενώ εξετάστηκε η κατακράτηση ενός αριθμού από μονο–, δι– και τρισακχαρίτες πριν και μετά τη διαβίβαση διχλωρομεθάνιου. Τα πειράματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο χρόνος κατακράτησης ελαττώνεται καθώς η διαφορά στην πολικότητα μεταξύ των δυο φάσεων μειώνεται. Επιπλέον, υποστήριξαν ότι η κατακράτηση αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των αμινο– και ιμινο– ομάδων στη στατική φάση το οποίο συνοδεύεται με την αύξηση του όγκου της κινητής φάσης στο εσωτερικό των πόρων των στατικών φάσεων. Τέλος, διέκριναν ότι ο μηχανισμός κατακράτησης ήταν ο ίδιος για όλες τις στατικές φάσεις, χωρίς να μεταβάλλεται η εκλεκτικότητα, διότι οι λόγοι των παραγόντων κατακράτησης (k') των ενώσεων δεν μεταβλήθηκαν στις διάφορες στατικές φάσεις. Τα παραπάνω σχετίστηκαν με την ποσότητα του ύδατος που μπορεί να συγκρατήσει η κάθε στατική φάση παρουσία

διαφορετικών χαρακτηριστικών αμινο- και ιμινο- ομάδων και όχι με την άμεση αλληλεπίδραση των ομάδων αυτών (διαφορετικής βασικότητας) με τις ίδιες τις ενώσεις. Τελικά, η σειρά έκλουσης των σακχάρων με βάση την πολικότητά τους (σχετικά με τον αριθμό των ομάδων -OH) λήφθηκε ως ένδειξη για την ύπαρξη ενός μηχανισμού βασιζόμενου στην κατανομή [Orth & Engelhardt, 1982].

Τα δεδομένα της μελέτης των Orth και Engelhardt δείχνουν αναμφίβολα ότι το ύδωρ συγκρατείται ισχυρά στην επιφάνεια των τριών στατικών φάσεων που μελετήθηκαν. Η ποσότητα του ύδατος που συγκρατείται φάνηκε να αυξάνεται αναλογικά με το μήκος των αλυσίδων ολιγοαιθυλενοϊμίνης στη στατική φάση, ενώ ο χρόνος κατακράτησης ήταν ανάλογος της πολικότητας και του μεγέθους των σακχάρων. Σύμφωνα με τα διαγράμματα από την εφαρμογή των δεδομένων των χρόνων κατακράτησης στις εξισώσεις (1)' και (2)', προέκυψε ότι υπάρχει καλή συσχέτιση με το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης με το μέσο όρο του συντελεστή συσχέτισης να λαμβάνει την τιμή 0,9981. Επιπλέον, η αύξηση της απόλυτης τιμής των κλίσεων της εξίσωσης σε αναλογία με το μέγεθος των μορίων των σακχάρων (1,22 έως 1,74 για τους μονοσακχαρίτες, 2,05 έως 2,42 για τις πολυόλες, 2,58 έως 2,95 για τους δισακχαρίτες και 3,69 για τους τρισακχαρίτες) έδειξε ότι υπάρχουν περισσότερα σημεία αλληλεπίδρασης καθώς αυξάνει ο αριθμός των πολικών ομάδων στις ενώσεις. Το μοντέλο της επιφανειακής προσρόφησης είχε καλή συσχέτιση (γραμμικότητα) για εύρος περιεκτικότητας ύδατος 10–30% (v/v), ενώ για εύρος περιεκτικότητας 30–40% υπήρχε σημαντική απόκλιση από τη γραμμικότητα. Τα παραπάνω δεδομένα μπορούν να ληφθούν ως μια σοβαρή ένδειξη της ύπαρξης του μηχανισμού κατανομής. Εντούτοις, η μελέτη των Orth και Engelhardt δεν παρέχει εμπεριστατωμένα στοιχεία όσον αφορά το μηχανισμό κατανομής, διότι κατά βάση υποστηρίζεται ότι η ισχύς των πολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενώσεων και των στατικών φάσεων αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των πολικών υποκαταστατών στις ενώσεις. Επιπλέον, δεν διασαφηνίζεται το είδος των πολικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι οι Verhaar και Kuster παρατήρησαν ισχυρή καταλυτική δράση της στήλης αμινο-πυριτίας στο ρυθμό αλλαγής της στροφικής ικανότητας (mutarotation rate) των σακχάρων γεγονός το οποίο αποδόθηκε στις αμινομάδες της στατικής φάσης [Verhaar & Kuster, 1982]. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν να εξηγηθούν χωρίς να ληφθεί υπόψη η άμεση αλληλεπίδραση των μορίων των σακχάρων με τις αμινομάδες της στατικής φάσης.

Ο Alpert αναφέρει, χαρακτηριστικά, ότι τα φαινόμενα στα οποία οφείλεται η κατανομή μεταξύ των δυο φάσεων (η υδατική στιβάδα και το υπόλοιπο μέρος της κινητής φάσης) είναι ασαφή και ενδέχεται να περιλαμβάνουν κάποιο είδος αλληλεπιδράσεων διπόλου–διπόλου. Επίσης, πρότεινε ότι θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός κατακράτησης [Alpert, 1990]. Εντούτοις, οι επισημάνσεις του Alpert σχετικά με το μηχανισμό φαίνεται να έχουν παραβλεφτεί από μεταγενέστερες μελέτες στις οποίες οι συγγραφείς στηρίζονται στην υπόθεση ότι ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής.

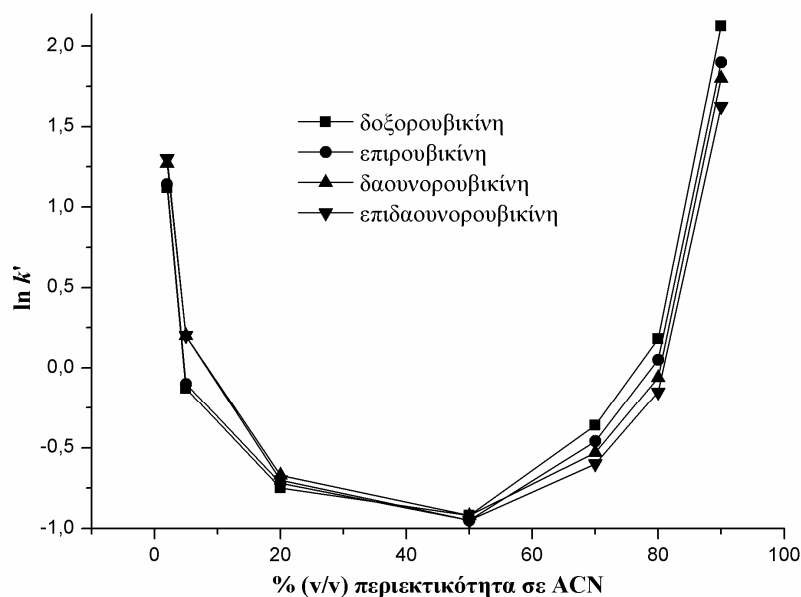
Σύμφωνα με τους Tolstikov και Fiehn, η χρωματογραφική συμπεριφορά ενώσεων με ίδιες ή παρόμοιες χαρακτηριστικές ομάδες, όπως η σακχαρόζη, η ραφινόζη και η σταχυόζη (τετρασακχαρίτης) σε πολική στήλη (αμιδο–πυριτία, TSK gel Amide–80) μπορεί να προβλεφτεί με βάση τη δομή τους (πολικότητα) και το μηχανισμό κατανομής [Tolstikov & Fiehn, 2002]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, προκύπτει η υπόθεση ότι η ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού υδροξυλομάδων στο μόριο της σταχυόζης προσδίδει στην ένωση περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης. Σε μια άλλη μελέτη που αφορά το διαχωρισμό των πολικών και ουδέτερων προανθοκυανιδινών με τη χρήση της ουδέτερης στήλης αμιδο–πυριτίας, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης, βρέθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ του λογάριθμου του k' και του αριθμού των υδροξυλομάδων στις δομές των ενώσεων. Επιπλέον, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του λογάριθμου του k' και των τιμών $\log P$ (λογάριθμος του συντελεστή κατανομής στο σύστημα οκτανόλη/ύδωρ) βρέθηκε πολύ μικρότερος από το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του $\log k'$ και του αριθμού των υδροξυλομάδων [Yanagida *et al.*, 2007]. Τα δεδομένα αυτά συγκλίνουν στο εξής συμπέρασμα: στην κατακράτηση των ενώσεων αυτών συμβάλουν τόσο η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καρβαμυλο–ομάδων ($-\text{CONH}_2$) της στατικής φάσης και των υδροξυλομάδων των ενώσεων όσο και η πολικότητα των ενώσεων υπολογισμένη με βάση το συντελεστή κατανομής στο σύστημα οκτανόλη/ύδωρ.

Σε μια άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές στατικές φάσεις για το διαχωρισμό του νικοτινικού οξέος και των μεταβολιτών του, η κατακράτηση των ενώσεων ήταν μικρότερη σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας σε σύγκριση με τη στήλη αμινο–πυριτίας παρόλο που στην τελευταία χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση με μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ (30% H_2O , v/v). Στην περίπτωση αυτή, η ιονανταλλαγή μεταξύ των όξινων ομάδων των μορίων και των αμινομάδων της στήλης καθίσταται ως ο κυρίαρχος μηχανισμός

με τον οποίο επιτυγχάνεται και ο διαχωρισμός του μίγματος [Hsieh & Chen, 2005; Christopherson *et al.*, 2006].

Οι Guo και Huang, έδειξαν ότι για τις ενώσεις 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλο-1,3-προπανοδιόλη (TRIS) και 2-αμινο-2-αιθυλο-1,3-προπανοδιόλη (AEPD) υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του λογάριθμου του k' και του % ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση, σε εύρος 10–30% (v/v) και σε στήλη αμινο-πυριτίας [Guo & Huang, 2004]. Ο Valette και οι συνεργάτες του [Valette *et al.*, 2004] κατέληξαν σε παρόμοια συσχέτιση για τρεις διαφορετικές τετρακυκλίνες σε στήλη αμινο-πυριτίας. Τα δεδομένα των Guo και Huang δείχνουν εξίσου καλή και κακή γραμμική συσχέτιση για συγκεκριμένα μόρια εφαρμόζοντας τα δεδομένα του χρόνου κατακράτησης στις εξισώσεις (1)' και (2)'. Συγκεκριμένα, η ένωση TRIS, η οποία είναι εξαιρετικά πολική, παρουσίασε γραμμική συσχέτιση στο μοντέλο κατανομής ενώ η λιγότερο υδρόφιλη ένωση AEPD στο μοντέλο προσρόφησης. Εάν δυο τόσο παρόμοιες χημικά ενώσεις διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μηχανισμό κατακράτησης, είναι δύσκολο να εξαχθεί κάποιο συγκεκριμένο συμπέρασμα για το ποιός από τους δυο μηχανισμούς επικρατεί. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι τα πειράματα των Guo και Huang έγιναν σε κινητή φάση η οποία δεν περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα. Η ίδια δυσκολία, ως προς την εξαγωγή κάποιου τελικού συμπεράσματος σχετικά με το μηχανισμό κατακράτησης προκύπτει και από τα δεδομένα του Valette και των συνεργατών, λόγω της ύπαρξης ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των ενώσεων της τετρακυκλίνης και της θετικά φορτισμένης επιφάνειας της στήλης αμινο-πυριτίας, σε pH 3,5 έως 5,0 [Valette *et al.*, 2004].

Στα διαγράμματα $\log k'$ συναρτήσει του κλάσματος του ύδατος (% ποσοστό) στην κινητή φάση, υπάρχει γραμμική συσχέτιση για μεσαίες τιμές περιεκτικότητας σε ύδωρ [Guo & Gaiki, 2005], ενώ για περιοχές υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας σε ύδωρ υπάρχει απόκλιση (το διάγραμμα εμφανίζει καμπυλότητα). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο μηχανισμός κατακράτησης υπό συνθήκες HILIC δεν είναι συνεχώς ο ίδιος αλλά μεταβάλλεται, ειδικά όταν αναλύονται ενώσεις με διαφορετικές ιδιότητες και επίσης όταν τροποποιούνται οι συνθήκες της κινητής φάσης. Έτσι, οι βασικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αλλάξουν από υδρόφιλες σε υδρόφοβες στην ίδια στατική φάση. Απόρροια αυτού είναι η εμφάνιση καμπυλών κατακράτησης με μορφή "U". Ένα τέτοιο διάγραμμα σχήματος "U" φαίνεται και στο Σχήμα 1.1.4, το οποίο βασίζεται στη μελέτη των Dong και Huang. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας και οι ενώσεις ήταν δομικά ανάλογα μόρια της επιρουβικής (ανθρακυκλίνη) [Dong & Huang, 2007].



Σχήμα 1.1.4: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον παράγοντα κατακράτησης της επιρουβικίνης και των αναλόγων αυτής [Dong & Huang, 2007].

Όταν η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε ύδωρ είναι μεγαλύτερη από 50% (v/v) η κατακράτηση των ενώσεων αυξάνεται αυξανόμενη της υδροφοβικότητας των μορίων. Η αύξηση του ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση προκαλεί αύξηση του χρόνου κατακράτησης, φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα στην RPLC, όπου και επικρατούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, όταν η περιεκτικότητα του ύδατος στην κινητή φάση είναι μικρότερη από 50% (v/v), η κατακράτηση των ενώσεων αυξάνεται ανάλογα με την υδροφιλικότητά τους. Στις συνθήκες αυτές ($H_2O < 50\%$, v/v), το ύδωρ καθίσταται ως ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης και η αύξηση του ποσοστού του ύδατος προκαλεί την ελάττωση της κατακράτησης των ενώσεων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη διαφοροποίηση στους χρόνους κατακράτησης λαμβάνει χώρα σε συνθήκες όπου επικρατούν οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις. Επίσης, σύμφωνα με τους ανωτέρω ερευνητές, η απόκλιση από το μηχανισμό κατανομής σε χαμηλή περιεκτικότητα σε ύδωρ οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης ("σιλανόφιλες" αλληλεπιδράσεις), ενώ σε υψηλή περιεκτικότητα σε ύδωρ λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η καμπύλη κατακράτησης με τη μορφή "U" έχει ληφθεί επίσης και σε στατική φάση αμινο-πυριτίας [Monaci *et al.*, 2002], αλλά και σε στήλες C_{18} , καλύπτοντας ένα μεγάλο εύρος εκλουστικής ισχύος της κινητής φάσης [Hearn, 1981; Bij *et al.*, 1981].

Στη μελέτη των Guo και Gaiki αξιολογήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά του ακετυλοσαλικυλικού οξέος και της κυτοσίνης σε τέσσερις διαφορετικές στατικές φάσεις [Guo

& Gaiki, 2005]. Από τα διαγράμματα της προσαρμογής των εξισώσεων (1)' και (2)' στα δεδομένα των χρόνων κατακράτησης, φάνηκε ότι το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης ταιριάζει περισσότερο στη χρωματογραφική συμπεριφορά των ενώσεων. Η απόκλιση από το μηχανισμό κατανομής σε χαμηλή και υψηλή περιεκτικότητα σε ύδωρ στην κινητή φάση μπορεί να αποδοθεί, τουλάχιστον ως ένα βαθμό, στην ύπαρξη αλληλεπιδράσεων προσρόφησης [Guo & Gaiki, 2005, ^aYoshida, 1998]. Οι συσχετίσεις που προκύπτουν από τα διαγράμματα $\log k' = f(\varphi)$ και $\log k' = f(\log \varphi)$ είναι αξιοσημείωτες για τις τέσσερις διαφορετικές στατικές φάσεις, οι οποίες είναι: η μη επικαλυμμένη πυριτία, η αμιδο–πυριτία, η αμινο–πυριτία και η σουλφοαλκυλοβεταΐνη–πυριτία (πολυμερική, διοντική). Οι στήλες αυτές διαφέρουν τόσο στη φύση των δομικών ομάδων (functional moieties), όσο και στον τρόπο που αυτές οι ομάδες είναι προσδεδεμένες στο υλικό στήριξης. Συγκεκριμένα, στην πολυμερική στατική φάση οι δομικές ομάδες παρεμβάλλονται ανάμεσα σε οργανικές πολυμερικές αλυσίδες, ενώ στις στήλες αμιδο– και αμινο–πυριτίας οι δομικές ομάδες βρίσκονται σε μικρότερη απόσταση μεταξύ τους. Δεδομένου ότι τα πολυμερή από σουλφοαλκυλοβεταΐνη συγκρατούν μόρια ύδατος ισχυρά, η επιφάνεια της πολυμερικής στατικής φάση καλύπτεται από μια σχετικά λεπτή υδατική στιβάδα [Hemström & Irgum, 2006]. Τελικά, το συμπέρασμα των Guo και Gaiki με βάση την εξάρτηση του k' από την ισχύ του διαλύτη έκλουσης και τη θερμοκρασία της στήλης, καθώς και το γεγονός ότι ο χρόνος κατακράτησης των ενώσεων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση, ήταν ότι η κατακράτηση στην HILIC δεν συνοδεύεται από ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια της στατικής φάσης, αλλά υπακούει στο μοντέλο κατανομής το οποίο έχει προτείνει ο Alpert (1990).

Από το γεγονός ότι οι παραπάνω στατικές φάσεις έχουν ως βάση την πυριτία, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η απόκλιση από το μηχανισμό κατανομής οφείλεται στην παρουσία ελεύθερων σιλανομάδων. Οι Chambers και Fritz μελέτησαν τη χρωματογραφική συμπεριφορά πολικών και ουδέτερων ενώσεων σε συνθήκες HILIC χρησιμοποιώντας στήλες από το πορώδες συμπολυμερικό υλικό στυρόλιο–διβινυλοβενζόλιο (S–DVB), το οποίο είναι ισχυρά κατιονανταλλακτικό, και με διαφορετικό βαθμό σουλφούρωσης [Chambers & Fritz, 1998]. Τα αποτελέσματα των χρόνων κατακράτησης αξιολογήθηκαν με βάση την εξίσωση:

$$\log k' = A\varphi_{H_2O}^2 + B\varphi_{H_2O} + C \quad (4)$$

και βρέθηκε ότι υπήρχε καλή προσαρμογή για περιεκτικότητα 5–30% (v/v) σε ύδωρ για τις ενώσεις αιθυλενογλυκόλη, προπυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, D–φρουκτόζη και δεξτρόζη, με το συντελεστή συσχέτισης να έχει τιμή 0,9990. Παρόλο που η παραπάνω εξίσωση δεν έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές στη σχετική βιβλιογραφία, ταιριάζει με την εμπειρική εξίσωση του Schoenmakers και των συνεργατών του και αφορά το μηχανισμό κατακράτησης μέσω κατανομής στην RPLC [Schoenmakers *et al.*, 1981]. Εντούτοις, τα δεδομένα των Champers και Fritz αποκλίνουν σημαντικά όταν προσαρμόστούν στις εξισώσεις (1)' και (2)' με τα διαγράμματα να έχουν μορφή καμπύλης. Όσον αφορά το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης, εξαίρεση αποτελεί το μόριο της δεξτρόζης το οποίο είχε πολύ καλή προσαρμογή ($R^2=0,9999$), ενώ για τις ενώσεις με μικρότερη κατακράτηση οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης ελαττώνονταν αναλογικά (0,9997 για τη D–φρουκτόζη, 0,9992 για τη γλυκερόλη, 0,9967 για την αιθυλενογλυκόλη και 0,9883 για την προπυλενογλυκόλη). Σημαντική απόκλιση υπήρχε και για το μοντέλο κατανομής με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να κυμαίνονται από 0,9720 έως 0,8760. Κατά συνέπεια, το μοντέλο Snyder-Soczewinski [Snyder, 1974, Snyder & Poppe, 1980] επαληθεύει πιο ικανοποιητικά τα δεδομένα κατακράτησης με τη χρήση της στήλης S–DVB υπό συνθήκες HILIC. Εντούτοις, λόγω της διαφορετικής φύσης του υλικού S–DVB σε σχέση με την πυριτία, η παραπάνω χρωματογραφική συμπεριφορά (επιφανειακή προσρόφηση) δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι ισχύει και για τα δυο υλικά. Αντί αυτού, η κατακράτηση των ενώσεων στο υλικό S–DVB στηρίζεται σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις (ιοντικές, ιόντος–διπόλου και δεσμοί υδρογόνου) και επαληθεύει το μοντέλο Snyder-Soczewinski. Αυτή η χρωματογραφική συμπεριφορά βρίσκεται επίσης σε συμφωνία με το μοντέλο μηχανισμού που αφορά ιοντικές αλληλεπιδράσεις [Jandera & Churáček, 1974].

Πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης από τον Yoshida σχετικό με την κατακράτηση ενός μεγάλου αριθμού πεπτιδίων υπό συνθήκες HILIC, αναφέρει ότι το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης ταιριάζει περισσότερο στη χρωματογραφική συμπεριφορά των μορίων. Συγκεκριμένα, τα διαγράμματα $\log k' = f(\log \varphi)$ των δεδομένων κατακράτησης πεπτιδίων σε στήλη αμιδο–πυριτίας, σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης, ήταν ευθείες γραμμές και με πολύ καλή γραμμικότητα. Συμπερασματικά αναφέρεται ότι η σειρά έκλουσης είναι ανάλογη με την NPLC γεγονός το οποίο υποδεικνύει ένα μηχανισμό κατακράτησης όμοιο με αυτόν της επιφανειακής προσρόφησης. Ο Yoshida πρότεινε επίσης ότι οι δεσμοί υδρογόνου αποτελούν μια από τις κύριες μορφές αλληλεπίδρασης στην HILIC [Yoshida, 2004].

Χρησιμοποιώντας το συνδυασμό της HILIC με τη χρωματογραφία κατιονανταλλαγής, ο Mant και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη χρωματογραφική συμπεριφορά αμφίφιλων πεπτιδίων δομής α-έλικας. Η αντικατάσταση του υδρόφιλου τμήματος του πεπτιδίου είχε μεγάλη επίδραση στην κατακράτηση σε συνθήκες HILIC, ενώ αντίστοιχα η αντικατάσταση του υδρόφοβου τμήματος είχε μεγάλη επίδραση στην κατακράτηση σε συνθήκες RPLC και καμία επίδραση στην τεχνική της HILIC [^aMant *et al.*, 1998; ^bMant *et al.*, 1998]. Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα σχετικό με το μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC διότι τόσο η κατανομή όσο και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μπορούν εξίσου να προκαλέσουν τέτοιου είδους διαφοροποιήσεις στο χρόνο κατακράτησης στην HILIC. Ανεξάρτητα από το αν ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής, προσρόφησης ή μέσω ενός συνδυασμού αυτών, οι διαχωρισμοί που περιλαμβάνουν ένα μικτό μηχανισμό είναι πολύ χρήσιμοι και ιδιαίτερα όσον αφορά ενώσεις οι οποίες μπορούν να μεταβούν από ουδέτερη σε φορτισμένη μορφή και αντίστροφα, ανάλογα με τις χρωματογραφικές συνθήκες [Neue, 1997].

Παρόλο που χρησιμοποιείται συχνά ο όρος "δεσμός υδρογόνου" στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων και της στατικής φάσης, οι Scott και Traiman υποστήριξαν ότι δεν μπορεί να υπάρξει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αναλύτη και των ομάδων σιλανόλης μιας στήλης διότι θα υπάρχει πάντα μια μονοστιβάδα ύδατος, δεσμευμένη μέσω δεσμών υδρογόνου στην επιφάνεια της πυριτίας, η οποία δεν απομακρύνεται παρουσία οργανικών διαλυτών (σε ποσοστό 100%) [Scott & Traiman, 1980].

Μια ενδιάμεση θεωρία σχετική με το μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC προτάθηκε από τον Berthod και τους συνεργάτες του, οι οποίοι υποστήριξαν ότι ο μηχανισμός κατακράτησης της τεχνικής αυτής είναι ένας συνδυασμός που περιλαμβάνει την κατανομή και τους δεσμούς υδρογόνου [Berthod *et al.*, 1998]. Τα πειράματα της μελέτης αφορούσαν τη χρωματογραφική συμπεριφορά των ολιγοσακχαριτών σε στήλες με βάση την κυκλοδεξτρίνη (CD-bonded phases). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης βρέθηκε ότι δεν υπήρχε γραμμική συσχέτιση μεταξύ του $\log k'$ και του % ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση. Αντίθετα, υπήρξε πολύ καλή γραμμικότητα στα διαγράμματα του λογάριθμου $\Delta G^\circ/RT$ συναρτήσει του % ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση με σχεδόν την ίδια κλίση για το σύνολο των ολιγοσακχαριτών. Το πιο σημαντικό συμπέρασμα είναι ότι αφενός οι δεσμοί υδρογόνου πρέπει να κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης και αφετέρου ότι η διάκριση μεταξύ του φαινομένου κατανομής και των δεσμών υδρογόνου είναι πρακτικά αδύνατη διότι ο ακριβής λόγος των φάσεων (κινητή προς

στατική φάση) εξαρτάται από την ποσότητα του ύδατος που είναι προσροφημένη στην επιφάνεια της στατικής φάσης.

1.1.4.3 Ο ρόλος του pH και των ιόντων των αλάτων

Το pH της κινητής φάσης αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο στην τεχνική της HILIC, αλλά και σε άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, καθώς καθορίζει αφενός το βαθμό στον οποίο μια ένωση είναι φορτισμένη και αφετέρου την εμφάνιση φορτίου στη στατική φάση. Έτσι, η χρήση κινητών φάσεων παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων αποτελεί κοινή πρακτική στην HILIC, διότι με τον τρόπο αυτό ελέγχονται, έως ένα βαθμό, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιονιζόμενων ενώσεων και της φορτισμένης επιφάνειας της στατικής φάσης. Είναι σαφές ότι η πολικότητα μιας ένωσης διαφοροποιείται σημαντικά καθώς μεταβαίνει από την ουδέτερη στην ιονισμένη μορφή. Κατά συνέπεια, στην HILIC, η ύπαρξη φορτίου αυξάνει σημαντικά το βαθμό κατανομής μιας ένωσης στη στιβάδα ύδατος που βρίσκεται στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Επιπλέον, η ύπαρξη και η ισχύς των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μιας ένωσης και της στατικής φάσης επηρεάζεται άμεσα ή ελέγχεται από την παράμετρο αυτή [Aplert, 1990; Horie *et al.*, 2007; Guo & Gaiki, 2005].

Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι το pH της υδατικής κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά την ανάμιξη με οργανικό διαλύτη, όπως είναι το ACN και η MeOH. Συνήθως, το pH των όξινων ρυθμιστικών διαλυμάτων αυξάνεται με την προσθήκη οργανικού διαλύτη (ACN ή MeOH), ενώ το pH των βασικών ρυθμιστικών διαλυμάτων μειώνεται. Οι μεταβολές του pH του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος παρουσία οργανικού διαλύτη σχετίζεται με αντίστοιχες διαφοροποιήσεις των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη χρωματογραφική στήλη. Σε όξινα ρυθμιστικά διαλύματα, η αύξηση της περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη προκαλεί την ελάττωση του βαθμού διάστασης του οξέος και επομένως την αύξηση του pH του τελικού υδατο-οργανικού μίγματος. Η ελάττωση του βαθμού διάστασης οφείλεται στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του ύδατος παρουσία οργανικού διαλύτη με αποτέλεσμα την αντίστοιχη ελάττωση της σταθεροποίησης των ιόντων που προκύπτουν από τη διάσταση του οξέος [Kazakevich & LoBrutto, 2007]. Συγκεκριμένα, μετά από ανάμιξη υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος, με 10% (v/v) ACN προκαλείται αύξηση του pH κατά 0,2–0,3 μονάδες περίπου. Αντίστοιχες μεταβολές λαμβάνουν χώρα και στις σταθερές διάστασης των αναλυόμενων ενώσεων. Με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση κατά 10% (v/v), η σταθερά

διάστασης (pK_a) ενός ασθενούς οξέος αυξάνεται ($\sim 0,2-0,3$ μονάδες) ενώ αυτή μιας ασθενούς βάσης μειώνεται ($\sim 0,1-0,2$ μονάδες) [Kazakevich & LoBrutto, 2007; Gagliardi *et al.*, 2007].

Μια ανάλογη μεταβολή αναμένεται να λαμβάνει χώρα και στη σταθερά διάστασης των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης της χρωματογραφικής στήλης. Δεδομένης της σχεδόν ανάλογης μεταβολής τόσο του pH της κινητής φάσης όσο και των σταθερών διάστασης των ενώσεων, η μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς ασθενών οξέων και βάσεων συναρτήσει του pH στηρίζεται, εκ παραδοχής, στις σταθερές διάστασης των ενώσεων σε υδατικά διαλύματα. Στην παραδοχή αυτή συνηγορεί και το πλούσια υδατικό περιβάλλον της επιφάνειας της στήλης στο οποίο οι ενώσεις κατανέμονται συμπεριλαμβανομένου έτσι και του ιονισμού των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης [McCalley, 2007].

Η παρουσία ενός άλατος στην κινητή φάση επηρεάζει εξίσου σημαντικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά των ενώσεων στην τεχνική της HILIC. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα αισθητό όταν οι αναλύτες και η επιφάνεια της στατικής φάσης, σε ένα δεδομένο εύρος pH, φέρουν φορτίο. Οι ερμηνείες όσον αφορά τη μεταβολή των χρόνων κατακράτησης βασίζονται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ελκτικής ή απωστικής φύσης, μεταξύ των ενώσεων και της επιφάνειας της στατικής φάσης, όπου τα ιόντα του άλατος δρουν ανταγωνιστικά [Pack & Risley, 2005; Liu *et al.*, 2008; Christopherson *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 1997]. Οι Guo και Huang μελέτησαν την επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο χρόνο κατακράτησης της 2-αμινο-2-υδροξυαιθυλο-1,3-προπανοδιόλης και της 2-αμινο-2-αιθυλο-1,3-προπανοδιόλης σε στήλη αμινο-πυριτίας [Guo & Huang, 2003]. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των χρόνων κατακράτησης των βασικών αυτών ενώσεων. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στη μείωση της ηλεκτροστατικής άπωσης που δέχονται τα μόρια αυτά από τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι τα οξικά ανιόντα προσροφούνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και μειώνουν έτσι το διαθέσιμο θετικό φορτίο της στήλης. Ο Guo μελέτησε την επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο χρόνο κατακράτησης βασικών ενώσεων σε στήλη αμινο- και αμιδο-πυριτίας. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των χρόνων κατακράτησης στη στήλη αμινο-πυριτίας ενώ στη στήλη αμιδο-πυριτίας σημειώθηκε σημαντική ελάττωση της κατακράτησης. Τα αποτελέσματα εξηγήθηκαν επίσης με βάση τη διαφοροποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στις δυο στατικές φάσεις. Στην περίπτωση της αμινο-πυριτίας η παρουσία του άλατος ελαττώνει την ηλεκτροστατική άπωση που δέχονται οι ενώσεις από την επιφάνεια

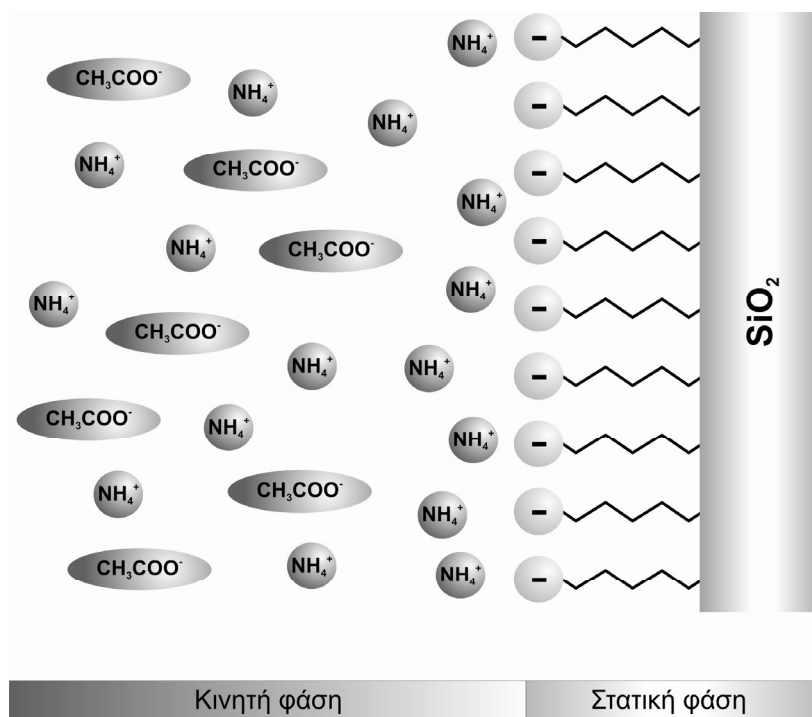
της στήλης, ενώ στη στήλη αμιδο-πυριτίας, μιας γενικά ουδέτερης στατικής φάσης, στην παρουσία ελεύθερων ομάδων σιλανόλης και τη μείωση της ηλεκτροστατικής έλξης [Guo, 2005].

Οι Li και Huang εξέτασαν την επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού νατρίου στην κατακράτηση της επιρουβικής και των αναλόγων της και απέδωσαν την ελάττωση των χρόνων κατακράτησης στον ανταγωνισμό των ιόντων νατρίου ως προς τα σημεία ιονανταλλαγής της επιφάνειας της στήλης από μη επικαλυμμένη πυριτία [Li & Huang, 2004]. Οι ίδιοι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η χρωματογραφική αυτή συμπεριφορά αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη της συμμετοχής του μηχανισμού ιονανταλλαγής στο συνολικό μηχανισμό της HILIC. Η αύξηση των χρόνων κατακράτησης οργανικών οξέων σε στήλη διόλης-πυριτίας με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου αποδόθηκε επίσης στην παρουσία ελεύθερων και αρνητικά φορτισμένων ομάδων σιλανόλης, όπου η παρουσία των αμμωνιακών ιόντων ελαττώνει την ηλεκτροστατική άπωση που υφίστανται οι ενώσεις [Quiming *et al.*, 2008].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παρουσία ιόντων (άλας ρυθμιστικού διαλύματος) στην κινητή φάση επηρεάζει σημαντικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά των ενώσεων στην HILIC. Τα ιόντα που φέρουν φορτίο αντίθετο από αυτό της στατικής φάσης έλκονται ηλεκτροστατικά και σχηματίζουν μια δεύτερη στιβάδα η οποία προκαλεί απόσβεση, έως ένα βαθμό, του συνολικού φορτίου της στήλης. Στο Σχήμα 1.1.5 απεικονίζεται το φαινόμενο της δημιουργίας "διπλοστιβάδας" από τα αμμωνιακά ιόντα στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της μη επικαλυμμένης πυριτίας. Ο βαθμός απόσβεσης του φορτίου στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση, αλλά και από την αναλογία του υδατικού ως προς τον οργανικό διαλύτη. Έχει αναφερθεί σχετικά ότι, σε αναλογία 80/20 σε ACN/H₂O (v/v), η δημιουργία μιας "διπλοστιβάδας" ηλεκτρικής φύσης που θα καλύπτει αποτελεσματικά την επιφάνεια της στατικής φάσης προϋποθέτει την παρουσία του άλατος σε συγκέντρωση ≥ 20 mM [Alpert, 2008; Guo *et al.*, 2007].

Μια άλλη εξήγηση που έχει δοθεί όσον αφορά την επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος στη χρωματογραφική συμπεριφορά πολικών και φορτισμένων ενώσεων είναι οι χαοτροπικές ιδιότητες των ιόντων των αλάτων [Wang *et al.*, 2005]. Ο Le Rouso και οι συνεργάτες του σε μια μελέτη σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην κατακράτηση ιοντικών υγρών σε στήλη διόλης-πυριτίας απέδωσαν την ελάττωση της κατακράτησης στο σχηματισμό ουδέτερων ζευγών ιόντων μεταξύ των θετικά φορτισμένων ενώσεων και των οξικών ανιόντων [Le Rouzo *et al.*, 2007]. Είναι πιθανό, τα

ιόντα ενός άλατος στην κινητή φάση να αλληλεπιδρούν τόσο με την επιφάνεια της στατικής φάσης όσο και με τις ενώσεις που φέρουν φορτίο κάτι το οποίο αναδεικνύει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι το οξικό και το μυρμηκικό αμμώνιο (τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα άλατα στην HILIC) εμφανίζουν ασθενείς χαοτροπικές ιδιότητες [Kazakevich & LoBrutto, 2007].



Σχήμα 1.1.5: Απεικόνιση της δημιουργία "διπλοστιβάδας" ιόντων αμμωνίου στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της πυριτίας.

Η επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση έχει επίσης σχετιστεί με το μηχανισμό κατανομής ο οποίος λαμβάνει χώρα στην HILIC. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, η παρουσία οργανικού διαλύτη σε υψηλό ποσοστό στην κινητή φάση συμβάλει στην ολοένα και μεγαλύτερη κατανομή των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού επιδιαλυτωμένων ιόντων στην υδατική στιβάδα με συνέπεια την αύξηση του όγκου ή της υδροφιλικότητας της στιβάδας και την ισχυρότερη κατακράτηση των ενώσεων [Guo & Gaiki, 2005]. Η εξήγηση αυτή αφορά κυρίως τη χρωματογραφική συμπεριφορά των πολικών και ουδέτερων ενώσεων σε διάφορες στατικές φάσεις ή των ενώσεων που φέρουν φορτίο σε ουδέτερες στατικές φάσεις με πλήρη ακροκάλυψη. Ωστόσο, η εξήγηση αυτή αποτελεί μια θεωρητική προσέγγιση χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί ακόμα πειραματικά.

1.1.4.4 Ο ρόλος της φύσης του οργανικού διαλύτη

Η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης είναι ουσιώδης όσον αφορά την εκλεκτικότητα, σε περιπτώσεις που οι δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν σημαντικά στο μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC. Το οργανικό μέρος της κινητής φάσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε πολικούς πρωτικούς και πολικούς απρωτικούς διαλύτες (παρουσία και απουσία ατόμων υδρογόνου ικανών να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η MeOH, η IPA και η EtOH, ενώ στη δεύτερη ανήκουν το ACN και το THF. Στην πρώτη περίπτωση, τα μόρια των διαλυτών μπορούν να δράσουν ισχυρά τόσο ως δότες όσο και ως δέκτες δεσμών υδρογόνου, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η δράση αυτή είναι πολύ ασθενέστερη [Turek *et al.*, 2008]. Λόγω της ισχυρής ικανότητας να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, οι πρωτικοί διαλύτες μπορούν να ανταγωνιστούν πιο αποτελεσματικά ως προς τα πολικά "ενεργά κέντρα" της επιφάνειας μιας στατικής φάσης. Αυτό έχει ως συνέπεια τη διατάραξη της σχηματιζόμενης υδατικής στιβάδας στην επιφάνεια της στήλης, μέσω αντικατάστασης μορίων ύδατος από μόρια διαλύτη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας περισσότερο υδρόφοβης στατικής φάσης [Scott, 1982]. Το φαινόμενο αυτό έχει ως συνέπεια τη μικρή κατακράτηση ενώσεων που αλληλεπιδρούν κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου.

Η παρουσία διαλυτών διαφορετικής φύσης, πέρα από το ACN και το ύδωρ, έχει εξεταστεί χωρίς όμως να υπάρχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την απόδοση της τεχνικής. Συγκεκριμένα η αντικατάσταση του ύδατος (ισχυρός διαλύτης έκλουσης) από MeOH έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διευρυμένων χρωματογραφικών κορυφών, ενώ η εκλεκτικότητα της τεχνικής δεν μεταβάλλεται ουσιαστικά [Valette *et al.*, 2004; Olsen, 2001]. Η χρήση μίγματος ACN/H₂O στις περισσότερες περιπτώσεις έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη πιο συμμετρικών κορυφών [Dell'Aversano *et al.*, 2005]. Επιπλέον, λόγω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της MeOH και των αναλυόμενων ενώσεων ενδέχεται να εμφανιστούν επιπλέον δομές συντονισμού με αποτέλεσμα την εμφάνιση μη συμμετρικών κορυφών ή κορυφών με μεγάλο εύρος [Valette *et al.*, 2004]. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι δεσμοί υδρογόνου καθίστανται πιο ασταθείς σε υψηλές θερμοκρασίες [Hao *et al.*, 2008]. Επομένως, η έλλειψη συμμετρίας στις χρωματογραφικές κορυφές, παρουσία MeOH στην κινητή φάση, μπορεί να αντιμετωπιστεί με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης [Guillarme & Heinisch, 2005].

Η αντικατάσταση του ACN με MeOH συνήθως δεν είναι αποτελεσματική ως προς τη βελτίωση της εκλεκτικότητας. Γενικά, το ACN είναι ασθενέστερος διαλύτης στην HILIC και προσφέρει μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης συγκριτικά με τη MeOH. Έτσι, το ACN

είναι συνήθως ο διαλύτης πρώτης επιλογής σε ένα διαχωρισμό διότι η MeOH θεωρείται ως διαλύτης με μεγάλη εκλουστική ισχύ με αποτέλεσμα ακόμα και την απουσία κατακράτησης [Tai & Gohda, 2007]. Οι Li και Huang σύγκριναν τη διαχωριστική ικανότητα της μη επικαλυμμένης πυριτίας ως προς την επιρουβική και τρία ανάλογα αυτής, χρησιμοποιώντας ACN, MeOH, IPA και THF, παρουσία ύδατος σε ποσοστό 10% (v/v) [Li & Huang, 2004]. Η αντικατάσταση του ACN με MeOH είχε ως αποτέλεσμα την απουσία κατακράτησης του μίγματος και την έκλυση των ενώσεων πολύ κοντά στο νεκρό όγκο της στήλης. Η μεγαλύτερη κατακράτηση των ενώσεων παρουσία IPA αποδόθηκε στο λιγότερο υδρόφιλο χαρακτήρα του διαλύτη λόγω μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας. Έτσι, τα μόρια της IPA ανταγωνίζονται λιγότερο ισχυρά σε σύγκριση με τη MeOH ως προς τα "ενεργά κέντρα" της στατικής φάσης με αποτέλεσμα οι ενώσεις να εμφανίζουν σχετικά μεγαλύτερη κατακράτηση. Σε αντίθεση με τη MeOH και την IPA, το ACN και το THF εμφανίζουν μέτρια έως μηδαμινή δράση, αντίστοιχα, ως δότες δεσμών υδρογόνου και οι ενώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη κατακράτηση. Συγκρίνοντας το ACN και το THF, οι ενώσεις κατακρατήθηκαν περισσότερο παρουσία ACN, διότι το THF δρα ως ισχυρότερος δέκτης δεσμών υδρογόνου. Ένα ενδιαφέρον σημείο της μελέτης αποτέλεσε η αλλαγή στην εκλεκτικότητα μεταξύ της επιρουβικής και ενός αναλόγου, με την αντικατάσταση του ACN με THF και IPA. Οι παραπάνω ενώσεις σύμφωνα με τους ερευνητές, διαφέρουν ως προς τον αριθμό πολικών ομάδων διαθέσιμων για δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Έτσι, παρουσία THF ή IPA, η ένωση με το μεγαλύτερο αριθμό τέτοιων ομάδων εμφανίζει μικρότερο χρόνο κατακράτησης.

Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από άλλες μελέτες, όπου η ελάττωση της κατακράτησης και η αλλαγή στην εκλεκτικότητα έχει αποδοθεί στον ανταγωνισμό των μορίων της MeOH σε σχέση με τις πολικές ομάδες της επιφάνειας της στατικής φάσης ως προς τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τις αναλυόμενες ενώσεις [Naidong *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2007].

Μεταπηδώντας από απρωτικούς σε πρωτικούς διαλύτες, μεταβάλλεται η εκλεκτικότητα όχι μόνο των ενώσεων με παρόμοια δομή αλλά και αυτών με πολύ διαφορετική δομή. Σε μια μελέτη για το διαχωρισμό της χολίνης και της αργινίνης σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, η αργινίνη εμφάνισε μεγαλύτερη κατακράτηση παρουσία ACN, ενώ παρουσία MeOH η εκλεκτικότητα ήταν αντίστροφη. Και σε αυτήν την περίπτωση η εξήγηση στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των ενώσεων και των μορίων του διαλύτη για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τη στατική φάση. Οι πρωτικές ομάδες στο μόριο της αργινίνης (όπως $-NH_{(1-2)}$ και $-OH$) δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανομάδες της

στατικής φάσης αλλά και με μόρια ύδατος της "ακίνητοποιημένης" στιβάδας. Κατά συνέπεια, παρουσία πρωτικών διαλυτών, αυξάνεται σημαντικά ο ανταγωνισμός των μορίων του διαλύτη ως προς την αλληλεπίδραση με τη στατική φάση με αποτέλεσμα την ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των παραπάνω ενώσεων [Hao *et al.*, 2008].

1.1.4.5 Ο ρόλος της θερμοκρασίας της στήλης

Η θερμοκρασία της στήλης έχει αναγνωριστεί ως μια σημαντική παράμετρος στους διαχωρισμούς της υγρής χρωματογραφίας, καθώς επηρεάζει σημαντικά το βαθμό διάχυσης του αναλύτη, το ιξώδες της κινητής φάσης και την ενθαλπία μεταφοράς του αναλύτη μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Πρόσφατα αναπτύχθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις αποτελούμενες από ανθεκτικά υλικά, όπως τα οξείδια μετάλλων (ζirkονία, τιτανία και αλουμίνη) [^aNawrocki *et al.*, 2004, ^bNawrocki *et al.*, 2004], ο πορώδης γραφίτικος άνθρακας [Marin *et al.*, 2004, Hazotte *et al.*, 2007] και τα οργανικά πολυμερή [Li *et al.*, 1997]. Η χρήση υψηλών θερμοκρασιών στοχεύει στη βελτίωση της απόδοσης των χρωματογραφικών στηλών. Έτσι, χρωματογραφικές αναλύσεις ταχύτερες κατά 5 έως 15 φορές μπορούν να επιτευχθούν σε θερμοκρασίες έως και 200 °C, χωρίς τη σημαντική μείωση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης [Guillarme & Heinisch, 2005].

Στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC), η σχέση που συνδέει τον παράγοντα κατακράτησης (k') μιας ένωσης με τη θερμοκρασία (T) της στήλης περιγράφεται από την εξίσωση van't Hoff:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (5)$$

όπου: ΔH° και ΔS° , η μεταβολή της ενθαλπίας και εντροπίας μιας ένωσης κατά τη μεταφορά της από την κινητή στη στατική φάση, R , η παγκόσμια σταθερά των αερίων και ϕ , ο λόγος φάσεων (ο λόγος του όγκου της στατικής φάσης προς τον όγκο της κινητής φάσης) [Scott, 2003; Chester & Coym, 2003].

Στην HILIC, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τόσο την κατακράτηση μιας ένωσης όσο και την εκλεκτικότητα σε περίπτωση διαχωρισμού μίγματος ενώσεων. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει στην RPLC ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο χρόνο κατακράτησης και στην πολικότητα της κινητής φάσης. Από τις μελέτες αυτές έχει προκύψει

η υπόθεση ότι η κινητή φάση καθίσταται λιγότερο πολική, γεγονός το οποίο εξηγεί την ελάττωση της κατακράτησης των ενώσεων [Guillarme & Heinisch, 2005; Chen & Horváth, 1997; Tran *et al.*, 2001].

Γενικά, η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το συντελεστή διάχυσης μιας ένωσης με αποτέλεσμα τη μείωση του εύρους της χρωματογραφικής κορυφής, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να μειωθεί ο συνολικός χρόνος ενός διαχωρισμού. Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στην εκλεκτικότητα, ο Dolan σε ένα πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης αναφέρει ότι: *"αν και είναι αναμφίβολες οι αλλαγές στους χρόνους κατακράτησης μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία της στήλης, οι αλλαγές στην εκλεκτικότητα είναι πιο έντονες σε μόρια που ιονίζονται και σε μόρια με τους περισσότερους πολικούς υποκαταστάτες"* [Dolan, 2002]. Σε μια μελέτη από τον Carr και τους συνεργάτες του σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην εκλεκτικότητα της στήλης με βάση το ZrO_2 (ζirkονία) επισημαίνεται ότι οι χαρακτηριστικές ομάδες των ενώσεων παίζουν σημαντικό ρόλο [^aLi & Carr, 1997; ^bLi & Carr, 1997; ^cLi & Carr, 1997]. Όλες οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι οι αλλαγές στην εκλεκτικότητα με τη θερμοκρασία εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τη φύση των αναλυόμενων ενώσεων καθώς και από το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενώσεων και της στατικής φάσης.

Με βάση τα παραπάνω, είναι ενδιαφέρουσα η εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών στην HILIC αφενός διότι οι ενώσεις είναι πολικές ή και ιοντικές και αφετέρου, διότι υπάρχει ένα μεγάλο εύρος εκλεκτικότητας στις στατικές φάσεις που δίνουν τη δυνατότητα αλληλεπιδράσεων ιονανταλλαγής τόσο με όξινες όσο και με βασικές ενώσεις. Η θερμοκρασία της στήλης μπορεί να αλλάξει όχι μόνο την ενθάλπια μεταφοράς των ενώσεων από την κινητή προς τη στατική φάση, αλλά και την ταχύτητα μετατροπής μιας ένωσης μεταξύ διαφορετικών (στερεοχημικών) διαμορφώσεων. Τυπικό παράδειγμα αποτελούν τα σάκχαρα και οι ενώσεις συγγενικές με τα σάκχαρα όπως οι ενώσεις Amadori, οι γλυκοζαμίνες και τα γλυκουρονικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές είναι εξαιρετικά πολικές και μπορούν να διαχωριστούν αποτελεσματικά με την HILIC, ενώ η χρωματογραφική τους συμπεριφορά μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από τη θερμοκρασία της στήλης. Στο διάλυμα της γλυκόζης για παράδειγμα λαμβάνει χώρα ταυτομέρεια, όπου υπάρχουν σε ισορροπία τουλάχιστον πέντε μορφές του μορίου της γλυκόζης (α - και β -πυρανόζη, α - και β -φουρανόζη και η αλδεϋδική μορφή της γλυκόζης) [Angyal, 1969]. Η ταχύτητα μετασχηματισμού από το ένα ισομερές στο άλλο εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία. Ο διαχωρισμός τέτοιων ισομερών μορφών μπορεί να είναι αποτελεσματικός ή μερικά αποτελεσματικός με την εμφάνιση διπλών

κορυφών [Nishikawa *et al.*, 1996; Karlsson *et al.*, 2005]. Σε περιπτώσεις όπου ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης, η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση διαφορετικών διαμορφώσεων σε ένα μόριο σακχάρου με αποτέλεσμα οι ευρείες και διπλές χρωματογραφικές κορυφές να μετατρέπονται σε μια απλή κορυφή [Karlsson *et al.*, 2005; Alpert *et al.*, 1994]. Άλλο ένα παράδειγμα ταυτομέρειας αποτελούν οι ενώσεις Amadori [Davidek *et al.*, 2005] όπου σε θερμοκρασία στήλης ίση προς 5 °C λαμβάνει χώρα μερικός διαχωρισμός, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα ισομερή εμφανίζονται ως μοναδικές κορυφές [Hao *et al.*, 2007].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η θερμοκρασία επηρεάζει την ενθαλπία μεταφοράς των ενώσεων από την κινητή προς τη στατική φάση, ιδιαίτερα όταν η κατακράτηση οφείλεται σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις [Dolan, 2002]. Οι Dong και Huang μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στο διαχωρισμό βασικών ενώσεων (τέσσερις ομόλογες ενώσεις της επιρουβικίνης) με τη χρήση στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας (τύπου-B) [Dong & Huang, 2007]. Η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων (αρνητικές κλίσεις της εξίσωσης van't Hoff), φαινόμενο αντίθετο με αυτό που αποκαλείται ως "φυσική χρωματογραφική συμπεριφορά" (ελάττωση της κατακράτησης με την αύξηση της θερμοκρασίας). Επιπλέον, έλαβε χώρα αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών (περίπου 70% αύξηση της απόδοσης της στήλης) με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25 στους 40 °C. Αύξηση του χρόνου κατακράτησης με την αύξηση της θερμοκρασίας συμβαίνει κυρίως σε περιπτώσεις ύπαρξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Αρνητικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff έχουν προκύψει και για έξι από τις ενώσεις Amadori σε στήλες μη επικαλυμμένης πυριτίας τύπου-A (Hypersil silica, Zorbax SIL) και ανεξάρτητα από την παρουσία ACN ή MeOH στην κινητή φάση [Hao *et al.*, 2008]. Σε αντίθεση όμως με τη μελέτη των Dong και Huang, οι παραπάνω ενώσεις εμφάνισαν θετικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff με τη χρήση μη επικαλυμμένης πυριτίας τύπου-B (Atlantis HILIC silica, Zorbax RX silica, Kromasil silica) και στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες [Hao *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2008]. Η βασική διαφορά ανάμεσα στους δυο τύπους πυριτίας είναι ότι στην πυριτία τύπου-A οι ομάδες σιλανόλης είναι περισσότερο όξινες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων ιονανταλλαγής με θετικά φορτισμένες ενώσεις.

Αρνητικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff έχουν βρεθεί επίσης και για όξινες ενώσεις με τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με βασικό χαρακτήρα. Οι Guo και Gaiki μελέτησαν το σαλικυλικό και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) σε διαφορετικές στατικές

φάσεις (αμινο–πυριτία, αμιδο–πυριτία, μη επικαλυμμένη πυριτία τύπου–B και διοντική με ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης) και μόνο στη στήλη αμινο–πυριτίας προέκυψαν αρνητικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff [Guo & Gaiki, 2005]. Η θετική τιμή της ενθαλπίας υποδεικνύει ότι η μεταφορά των ενώσεων από την κινητή προς τη στατική φάση είναι μια ενδόθερμη διεργασία. Περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι η τιμή της ενθαλπίας για το σαλικυλικό οξύ ελαττώθηκε (από 21 σε 11,1 KJ/mole) με την ελάττωση του ποσοστού του ACN από 90 σε 75%. Επίσης, η τιμή της ενθαλπίας μειώθηκε περαιτέρω με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση διατηρώντας σταθερή την αναλογία διαλυτών. Το φαινόμενο αυτό, σύμφωνα με τους μελετητές, αποδόθηκε στην πιθανή αλλαγή της συνεισφοράς δυο διαφορετικών μηχανισμών κατακράτησης.

Ο Guo και οι συνεργάτες του, μελέτησαν περαιτέρω τη χρωματογραφική συμπεριφορά έξι οργανικών οξέων σε πέντε διαφορετικές στατικές φάσεις (αμινο–πυριτία, αμιδο–πυριτία, πολυ(υδροξυαιθυλο–A) και διοντική με ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης) [Guo *et al.*, 2007]. Η δραστική μείωση του χρόνου κατακράτησης των οξέων στη στήλη αμινο–πυριτίας με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση αποδόθηκε στην ελάττωση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ των ενώσεων και της στατικής φάσης. Επιπλέον, με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης από τους 10 στους 60 °C επήλθε αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων. Εντούτοις, οι συγγραφείς δεν έδωσαν επιπρόσθετες εξηγήσεις όσον αφορά τις μεταβολές της ενθαλπίας.

Ο Christopherson και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στο διαχωρισμό του νικοτινικού και του πικολινικού οξέος με τη χρήση της στήλης αμινο–πυριτίας [Christopherson *et al.*, 2006]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η λήψη θετικών τιμών ενθαλπίας αποδόθηκε στο μηχανισμό ιονανταλλαγής μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ενώσεων και των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της στήλης. Η αύξηση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση από 60 σε 70% δεν επέφερε σημαντική μεταβολή των τιμών ενθαλπίας των ενώσεων. Με περαιτέρω αύξηση του ACN σε ποσοστό 80% υπήρξε σημαντική μείωση των τιμών ενθαλπίας. Επίσης, η αύξηση της κατακράτησης που παρατηρήθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας στους 15 °C αποδόθηκε στη μειωμένη αναμιξιμότητα μεταξύ του ρυθμιστικού διαλύματος και του οργανικού τμήματος της κινητής φάσης.

Η συμμετοχή του μηχανισμού ιονανταλλαγής στην κατακράτηση των ενώσεων στην HILIC δεν συνεπάγεται πάντα την εμφάνιση αρνητικών κλίσεων στην εξίσωση van't Hoff. Η ζιρκονία, για παράδειγμα, είναι ένα αμφολυτικό μεταλλικό οξείδιο το οποίο εμφανίζει

ταυτόχρονα ανιονανταλλακτικές και κατιονανταλλακτικές ιδιότητες, γεγονός το οποίο εξαρτάται από το pH της κινητής φάσης και από τη φύση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος [Blackwell & Carr, 1992]. Με χρήση κινητής φάσης αποτελούμενης από ACN σε ποσοστό 50% και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 50 mM και σε pH 2,0, για το διαχωρισμό πενταπεπτιδίων έλαβε χώρα ιονανταλλαγή μεταξύ των θετικά φορτισμένων ενώσεων και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ιόντων, τα οποία είναι προσροφημένα στην επιφάνεια της ζirkονίας, αλλά και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το υλικό στήριξης (πολυβουταδιένιο ή πολυστυρόλιο). Παρόλα αυτά, η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης προκάλεσε ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων και στις δυο στατικές φάσεις (PBD–ZrO₂ και PS–ZrO₂) [Soukupova *et al.*, 2005].

Οι χρωματογραφικές στήλες που φέρουν χημικά προσδεσμένες αμφολυτικές ομάδες (όπως η σουλφοβηταΐνη) επιδεικνύουν επίσης ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με όξινες και βασικές ενώσεις [Takegawa *et al.*, 2006]. Ο χρόνος κατακράτησης μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά ακόμα και με μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας της στήλης [Guo & Huang, 2003]. Από μελέτες σχετικές με την επίδραση της θερμοκρασίας στην κατακράτηση πολικών ενώσεων, όπως η κυτοσίνη (βασική ένωση) και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (όξινη ένωση) στις στατικές αυτές φάσεις έχουν προκύψει επίσης θετικές κλίσεις της εξίσωσης van't Hoff [Guo & Gaiki, 2005; Wade *et al.*, 2007].

Μια άλλη κατηγορία χρωματογραφικών στηλών είναι αυτές που διαθέτουν ουδέτερα ενεργά κέντρα όπως η διόλη–πυριτία, η κυανο–πυριτία και η αμιδο–πυριτία. Οι στατικές αυτές φάσεις, γενικά, δεν επιδεικνύουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Σε μελέτη σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο κατακράτησης της ουρίας, της σακχαρόζης (ουδέτερες ενώσεις) και της γλυκίνης (ιονική ένωση) σε στήλη διόλης–πυριτίας, η αύξηση της θερμοκρασίας είχε επίσης ως αποτέλεσμα την ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων [Tanaka *et al.*, 2003], ενώ θετικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff ήταν το αποτέλεσμα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην κατακράτηση της κυτοσίνης και του ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε στήλη αμιδο–πυριτίας [Guo & Gaiki, 2005]. Εντούτοις, είναι πιθανή η ύπαρξη ομάδων σιλανόλης που δεν έχουν επικαλυφτεί και μπορούν να συμμετέχουν σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με θετικά φορτισμένες ενώσεις. Η ύπαρξη ελεύθερων σιλανομάδων οφείλεται στον τρόπο χημικής πρόσδεσης των πολικών ομάδων στην πυριτία, ο οποίος είναι όμοιος με αυτόν που χρησιμοποιείται στις στήλες αντίστροφης φάσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρωματογραφική συμπεριφορά τοξινών με διαφορετικά φορτία (0, +1 και +2) σε στήλη αμιδο–πυριτίας, όπου ο χρόνος κατακράτησης

των μονο- (+1) και δι- κατιονικών (2+) τοξινών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας ενώ οι ουδέτερες τοξίνες δεν επηρεάστηκαν από μεταβολές της θερμοκρασίας [Dell'Aversano *et al.*, 2005].

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι και άλλες χρωματογραφικές παράμετροι, όπως το pH και η συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση, μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές ενθαλπίας των ιονιζόμενων ενώσεων στην HILIC. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει ιονανταλλαγή, οι ηλεκτροστατικές αυτές αλληλεπιδράσεις δεν συνεισφέρουν μόνο στο χρόνο κατακράτησης των αντίστοιχων ενώσεων, αλλά και στην εσωτερική (από την ίδια τη στατική φάση) ή εξωτερική (από τα ιόντα του άλατος) κάλυψη των "ανεπιθύμητων" ομάδων σιλανόλης της στατικής φάσης. Για παράδειγμα, η εμφάνιση συμμετρικών χρωματογραφικών κορυφών βασικών ενώσεων σε στήλη αμινο-πυριτίας πιστεύεται ότι οφείλεται σε μια εσωτερική κάλυψη των υπολειμματικών (ελεύθερων) σιλανομάδων από τις αμινομάδες της ίδιας της στατικής φάσης με αποτέλεσμα την αποφυγή φαινομένων ισχυρής προσρόφησης [Monaci *et al.*, 2002]. Ο τρόπος αυτός κάλυψης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε υλικά χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης [Nyström *et al.*, 1993]. Ωστόσο, η θερμοκρασία ως χρωματογραφική παράμετρος έχει μικρότερη επίδραση στην εκλεκτικότητα τέτοιων στατικών φάσεων λόγω της μειωμένης συνεισφοράς των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο συνολικό μηχανισμό.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η σταθερότητα των στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται στην HILIC έναντι υψηλών θερμοκρασιών δεν έχει ακόμα μελετηθεί συστηματικά. Ωστόσο, πιστεύεται ότι οι στήλες από μη επικαλυμμένη πυριτία είναι πολύ πιο σταθερές στη θερμοκρασία σε σύγκριση με τις στήλες από επικαλυμμένη πυριτία, λόγω της απουσίας χημικής πρόσδεσης [Hao *et al.*, 2008].

1.1.5 Υλικά στατικών φάσεων στην HILIC

Παράλληλα με το μεγάλο ενδιαφέρον στη διεθνή βιβλιογραφία για την τεχνική της HILIC, έχει αυξηθεί δραστικά και η ανάπτυξη χρωματογραφικών υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την τεχνική αυτή. Η επιφάνεια των στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται στην HILIC, μπορεί να εμφανίζει όξινες, βασικές ή ουδέτερες ιδιότητες, ενώ οι δομικές ομάδες μπορεί να είναι πρωτικές ή απρωτικές. Εκ φύσεως, ο μηχανισμός κατακράτησης θα είναι διαφορετικός εάν οι στατικές αυτές φάσεις χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό όξινων, βασικών ή ουδέτερων ενώσεων. Η διαθεσιμότητα διαφορετικών

στατικών φάσεων στην HILIC προσφέρει περισσότερες επιλογές για την πραγματοποίηση ενός διαχωρισμού. Ταυτόχρονα, αποτελεί πρόκληση η επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού διαχωρισμού. Ο βασικός μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC εξαρτάται από τη δομή των αναλυόμενων ενώσεων, τις συνθήκες της κινητής φάσης και τις ιδιότητες των δομικών ομάδων της στατικής φάσης. Για παράδειγμα, η ύπαρξη τόσο όξινων (RCOO^-) όσο και ουδέτερων ($-\text{OH}$, $-\text{CONH}-$, $-\text{SH}$) ομάδων συνεισφέρει στην πολικότητα των αναλυόμενων ενώσεων, αλλά ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης σε κάθε περίπτωση μπορεί να είναι τελείως διαφορετικός. Ισχυρές αλληλεπιδράσεις ιονανταλλαγής θα υπάρξουν μεταξύ θετικά φορτισμένων ενώσεων ($\text{R}-\text{NH}_3^+$) και μιας στατικής φάσης με όξινες ομάδες (μη επικαλυμμένη πυριτία), καθώς επίσης και μεταξύ αρνητικά φορτισμένων ενώσεων και μιας στατικής φάσης με βασικές ομάδες (αμινο-πυριτία). Όταν σε μια ένωση συνυπάρχουν πρωτικές ομάδες ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_{(1-2)}$, $-\text{SH}$), οι δεσμοί υδρογόνου πιστεύεται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στο μηχανισμό κατακράτησης σε όλες σχεδόν τις στατικές φάσεις [Tolstikov & Fiehn, 2002; Yanagida *et al.*, 2007].

Ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων χρωματογραφικών στηλών ειδικά σχεδιασμένων για την HILIC αυξάνεται συνεχώς με αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός σημαντικού αριθμού στατικών φάσεων με μεγάλη ποικιλία ως προς τη σύσταση των δομικών ομάδων. Δικαιωματικά, η περιγραφή των χρωματογραφικών στηλών ξεκινάει από τα ανόργανα μη χημικά τροποποιημένα υλικά, και συγκεκριμένα από τη μη επικαλυμμένη πυριτία, δεδομένου ότι στην NPLC, η οποία θεωρείται ως η τεχνική προέλευσης της HILIC, όλοι οι διαχωρισμοί έχουν πραγματοποιηθεί σε μη επικαλυμμένη πυριτία [Nikolov & Reilly, 1985] και πυριτία επικαλυμμένη με ομάδες προπυλαμίνης [Linden & Lawhead, 1975; Palmer, 1975; Verhaar & Kuster, 1982; Nikolov & Reilly, 1985].

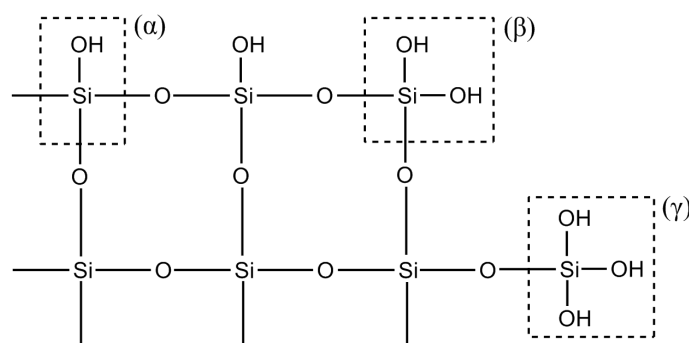
1.1.5.1 Μη επικαλυμμένη πυριτία

Η πυριτία με την οποία είναι πληρωμένη μια χρωματογραφική στήλη βρίσκεται υπό τη μορφή ξηροπηκτώματος (xerogel) αποτελούμενου από μικρούς κόκκους διαμέτρου μερικών μικρομέτρων. Το σύνολο των κόκκων αποτελούν με τη σειρά τους τα πρωτογενή σωματίδια της πυριτίας με διάμετρο λίγων Å. Τα σωματίδια αυτά συνενώνονται μέσω συμπύκνωσης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του ξηροπηκτώματος. Η επιφάνεια των πρωτογενών σωματιδίων της πυριτίας είναι αυτή στην οποία οφείλεται η αλληλεπίδραση και συνεπώς, η κατακράτηση των ενώσεων σε διάφορες τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας συμπεριλαμβανομένης και της HILIC. Το υλικό της πρωτογενούς πυριτίας αποτελείται από

έναν πυρήνα (core) ατόμων πυριτίου ενωμένων μεταξύ τους υπό τη μορφή σιλοξανίων (Σχήμα 1.1.6). Εντούτοις, στην επιφάνεια του υλικού αυτού υπάρχει ένας αριθμός υπολειμματικών (residual) υδροξυλομάδων, που δεν έχουν συμπυκνωθεί, και προέρχονται από υπολείμματα του πυριτικού οξέος ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Οι υπολειμματικές ή αλλιώς οι "ελεύθερες" υδροξυλομάδες προσδίδουν στην επιφάνεια της πυριτίας τον πολικό χαρακτήρα και είναι οι ομάδες που αντιδρούν με διάφορα αντιδραστήρια σιλιανοποίησης προς σχηματισμό προσδεδεμένων στατικών φάσεων. Η επιφάνεια της πυριτίας στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αρκετά πολύπλοκη διότι ενδέχεται να απαντούν διαφορετικοί τύποι υδροξυλομάδων [Scott, 2001].

Θεωρητικά, στην επιφάνεια της πυριτίας μπορεί να υπάρξουν τρεις διαφορετικοί τύποι υδροξυλομάδων οι οποίοι περιλαμβάνουν τις:

- α) απλές (single) (μια υδροξυλομάδα συνδεδεμένη σε ένα άτομο πυριτίου)
- β) διπλές (geminal) (δυο υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο πυριτίου)
- γ) τριπλές (triple) (τρεις υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο πυριτίου)



Σχήμα 1.1.6: Απεικόνιση της επιφάνειας της πυριτίας και των υδροξυλομάδων διαφορετικού τύπου.

Η πιθανότητα της παρουσίας των τριών διαφορετικών τύπων υδροξυλομάδων έχει εκτιμηθεί από τους Sindorf και Maciel με τη χρήση διαφόρων τεχνικών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) [¹Sindorf & Maciel, 1983; ²Sindorf & Maciel, 1983]. Από τις παραπάνω μελέτες έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι ο πιο πιθανός τύπος είναι αυτός των απλών υδροξυλομάδων, ενώ η παρουσία των διπλών και τριπλών υδροξυλομάδων είναι λιγότερο πιθανή.

Οι χρωματογραφικές στήλες από μη επικαλυμμένη πυριτία έχουν χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων [Shou & Naidong, 2005; Eerkes *et al.*, 2003; Naidong & Eerkes, 2004; Pan *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005; Qi & Naidong, 2006; Li *et al.*, 2005; Hsieh &

Chen, 2005; Li & Huang, 2004; Huang & Li, 2005, Grumbach *et al.*, 2004; Paek *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2005; Naidong, 2003]. Μια κοινή άποψη είναι ότι η στήλη από μη επικαλυμμένη πυριτία είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί σε βιοαναλυτικές μεθόδους διαχωρισμού και άλλες εφαρμογές όπου πολικές ενώσεις απαντούν σε πολύπλοκα μίγματα. Η άποψη αυτή πηγάζει από την τεχνική της NPLC στην οποία χρησιμοποιούνται αποκλειστικά οργανικοί διαλύτες με αποτέλεσμα η δραστηρότητα της επιφάνειας της στατικής φάσης να μην περιορίζεται αποτελεσματικά. Το ύδωρ είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς διαλύτες απενεργοποίησης της πυριτίας. Όταν το ύδωρ χρησιμοποιείται στην κινητή φάση σε ένα σημαντικό ποσοστό (10% ύδατος αντιστοιχεί σε 5,5 mol/L), η επιφάνεια της πυριτίας αδρανοποιείται σχεδόν αποτελεσματικά επιτρέποντας τη λήψη επαναλήψιμων χρόνων κατακράτησης για ένα μεγάλο αριθμό εγχύσεων. Εντούτοις, στις στήλες αυτές, σε συνθήκες HILIC, έχει σημειωθεί το φαινόμενο της μη αντιστρεπτής προσρόφησης. Αυτό συμβαίνει διότι αν και το ύδωρ καλύπτει αποτελεσματικά την επιφάνεια της πυριτίας δεν μπορεί να αποτρέψει τη διάσπαση των σιλανομάδων και κατ' επέκταση τις κατιονανταλλακτικές ιδιότητες της στήλης. Οι Li και Huang παρατήρησαν ότι χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν έξι εγχύσεις για τη λήψη σταθερού σήματος (ύψος κορυφής) στη μελέτη του διαχωρισμού της επιρουβικίνης και των αναλόγων της [Li & Huang, 2004].

Η επίδραση της υπερφόρτωσης (overloading) ενός δείγματος είναι περισσότερο εμφανής σε υλικά στηλών στα οποία τουλάχιστον μέρος του μηχανισμού κατακράτησης στηρίζεται στην επιφανειακή προσρόφηση. Η εισαγωγή ποσότητας δείγματος σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τις συνηθισμένες αναλυτικές συγκεντρώσεις μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην τεχνική της HILIC, αλλά και σε άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, τόσο στην επεξεργασία ενός δείγματος όσο και σε ένα διαχωρισμό. Η επίδραση της υπερφόρτωσης σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας σε συνθήκες HILIC μελετήθηκε από τους Li και Huang. Σε μια διεργασία προσρόφησης θα αναμενόταν μια ισόθερμος τύπου Langmuir. Αντίθετα, στην παραπάνω μελέτη προέκυψαν ισόθερμες τύπου *anti*-Langmuir, όπου η αρχική ρόφηση ήταν αργή (reluctant) φαινόμενο το οποίο ευνοεί την περαιτέρω προσρόφηση μιας ένωσης καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση [Cavazzini *et al.*, 2002].

Μια από τις ιδιότητες της πυριτίας που την καθιστά κατάλληλη σε εφαρμογές της HILIC σε συνδυασμό με ανιχνευτή μαζών είναι η απουσία χημικά προσδεδεμένων ομάδων που μπορούν να αποσπώνται και να εμφανίζονται ως "ψευδείς" κορυφές στο φάσμα μαζών. Εντούτοις, το φαινόμενο αυτό έχει πλέον αντιμετωπιστεί σε μεγάλο βαθμό και έχουν

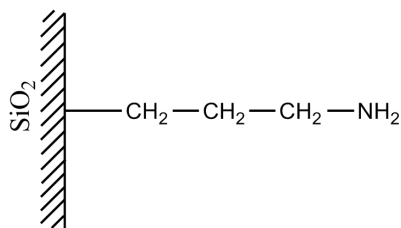
κατασκευαστεί στήλες προσδεδεμένης φάσης, με βάση την πυριτία, έχοντας μεγάλη σταθερότητα για εφαρμογές σε συνθήκες HILIC.

Οι ομάδες σιλανόλης στην επιφάνεια της πυριτίας κατέχουν σημαντικό ρόλο στην κατακράτηση υπό συνθήκες HILIC. Όταν για παράδειγμα σε μια χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιείται πυριτία διαφορετικού τύπου (πυριτία τύπου–Α και τύπου–Β), τόσο ο παράγοντας κατακράτησης όσο και η εκλεκτικότητα των ενώσεων μπορεί να είναι πολύ διαφορετική [Hao *et al.*, 2007]. Έχει δειχθεί ότι οι στήλες οι οποίες κατασκευάζονται από πυριτία υψηλής καθαρότητας επιδεικνύουν μικρότερους χρόνους κατακράτησης και μειωμένη εκλεκτικότητα σε σύγκριση με στήλες από πυριτία που περιέχει προσμίξεις από μέταλλα [Naidong *et al.*, 2004]. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη οξύτητα των σιλανομάδων όταν αυτές γειτνιάζουν με μέταλλα όπως είναι το αργίλιο και ο σίδηρος. Η αυξημένη οξύτητα των σιλανομάδων έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ισχυρότερων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [McKeown *et al.*, 2001; Nawrocki, 1997]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μελέτη σχετική με τη χρωματογραφική απόδοση των δυο διαφορετικών τύπων πυριτίας, σύμφωνα με την οποία, η πυριτία τύπου–Α επέδειξε ισχυρότερη κατακράτηση και καλύτερη εκλεκτικότητα σε πολικές ενώσεις, όπως οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες, σε σύγκριση με την πυριτία τύπου–Β [Olsen, 2001].

1.1.5.2 Αμινο–πυριτία

Η πυριτία με ομάδες προπυλαμίνης ως υλικό πρόσδεσης (Σχήμα 1.1.7) ήταν η πρώτη προσδεδεμένη στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό υδατανθράκων σε συνθήκες HILIC. Το πλεονέκτημα της στατικής αυτής φάσης σε σχέση με τη μη επικαλυμμένη πυριτία είναι ότι αυξάνει το ρυθμό πολυστροφισμού με αποτέλεσμα την αποφυγή εμφάνισης διπλών κορυφών [Alpert *et al.*, 1994]. Οι στήλες αμινο–πυριτίας, αλλά και αυτές από μη επικαλυμμένη πυριτία, είναι πολύ πιο δραστικές (reactive) σε σύγκριση με τις στήλες αντίστροφης φάσης με αποτέλεσμα το φαινόμενο της μη αντιστρεπτής προσρόφησης να είναι πολύ πιο έντονο [Olsen, 2001].

Ένα μειονέκτημα της αμινο–πυριτίας είναι οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης παρουσία συγκεκριμένων ιόντων ρυθμιστικού διαλύματος σε σύγκριση με στήλες που έχουν ως βάση πολυμερικά υλικά. Ο Valette και οι συνεργάτες του τόνισαν ότι χρειάστηκαν αρκετοί όγκοι στήλης (μερικές εκατοντάδες) για τη σταθεροποίηση της γραμμής βάσης (baseline) αντικαθιστώντας το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών με ρυθμιστικό διάλυμα οξικών και σε επίπεδα συγκέντρωσης άλατος της τάξης των 100 mM [Valette *et al.*, 2004].



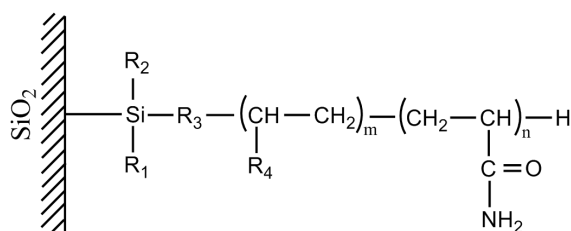
Σχήμα 1.1.7: Απεικόνιση της στατικής φάσης αμινο–πυριτίας.

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα των στατικών αυτών φάσεων είναι η περιορισμένη σταθερότητά τους παρουσία ύδατος στην κινητή φάση [Wonnacott & Patton, 1987; Björklund & Hearn, 1996] γεγονός το οποίο οδηγεί στην ταχεία αποκόλληση των αμινομάδων σε συνθήκες HILIC. Η αστάθεια αυτή φαίνεται να σχετίζεται με μια "αυτοκαταστροφική" (selfpredatory) καταλυτική δράση των πρωτοταγών αμινομάδων που οδηγεί στη σταδιακή απογύμνωση της επιφάνειας της στατικής φάσης [Lafosse *et al.*, 1989]. Μεταξύ των διαφόρων μορφών της, η πυριτία "τύπου–C" (υδρίδιο της πυριτίας) η οποία παρασκευάζεται με μια πορεία υδροπυριτιλίωσης (hydrosilylation) του *Pesek* αποτελεί μια ξεχωριστή κατηγορία υλικού [Sandoval & Pesek, 1989]. Το υλικό αυτό θα μπορούσε να υπαχθεί στην κατηγορία της μη επικαλυμμένης πυριτίας, καθώς η πλειονότητα των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης έχουν αντικατασταθεί με ομάδες υδριδίων του πυριτίου (Si–H).

Σε μια πρόσφατη μελέτη ο Matyska και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν διάφορες πειραματικές πορείες για την παρασκευή στατικών φάσεων τύπου–C προσδεδεμένων με αμινομάδες. Κατόπιν, σύγκριναν τις στήλες αυτές με μη επικαλυμμένες στήλες από πυριτία τύπου–C, παρουσία και απουσία ακροκάλυψης (endcapping) των υπολειμματικών σιλανομάδων, ως προς το διαχωρισμό μιγμάτων μονο– και δισακχαριτών σε συνθήκες HILIC. Από τη σύγκριση προέκυψε ότι η κατακράτηση των ενώσεων ήταν μεγαλύτερη στην πυριτία τύπου–C χωρίς ακροκάλυψη από ότι στην πυριτία τύπου–B, ενώ δεν υπήρξε καθόλου κατακράτηση στην πυριτία τύπου–C με ακροκάλυψη. Οι παραπάνω ερευνητές συμπέραναν ότι η κατακράτηση στη στήλη πυριτίας τύπου–C χωρίς ακροκάλυψη οφειλόταν στην παρουσία των υπολειμματικών ομάδων σιλανόλης και ότι η πυριτία τύπου–C δεν συνεισφέρει καθόλου στο διαχωρισμό. Στη μελέτη αυτή δεν αξιολογήθηκε η σταθερότητα της πυριτίας τύπου–C επικαλυμμένης με αμινομάδες. Εντούτοις, στατικές φάσεις τέτοιου τύπου, αλλά με διαφορετικές ομάδες πρόσδεσης, είναι γνωστό ότι επιδεικνύουν εξαιρετική σταθερότητα σε σύγκριση με αυτές από πυριτία τύπου–A και τύπου–B [Pesek & Matyska, 2005].

1.1.5.3 Αμιδο–πυριτία

Η αμιδο–πυριτία είναι μια υδρόφιλη στατική φάση η οποία περιέχει στην επιφάνειά της καρβαμυλο– ομάδες προσκολλημένες σε μικρές αλειφατικές αλυσίδες (Σχήμα 1.1.8) [Guo & Gaiki, 2005; Yoshida, 1997]. Οι αμιδο–ομάδες είναι λιγότερο δραστικές από τις αμινο–ομάδες, ενώ δεν εμφανίζουν βασικές ιδιότητες. Κατά συνέπεια, η κατακράτηση των ενώσεων σε αυτές τις χρωματογραφικές στήλες επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από μεταβολές του pH της κινητής φάσης. Επιπλέον, η στατική φάση της αμιδο–πυριτίας έχει πολύ μικρότερη τάση ως προς φαινόμενα χημειορρόφησης (chemisorption), ενώ η απουσία πρωτοταγών αμινομάδων αποτρέπει το σχηματισμό βάσεων Schiff ($R_1R_2C=N-R_3$) με ανάγοντα σάκχαρα και άλλες καρβονυλικές ενώσεις. Η χρωματογραφική στήλη αμιδο–πυριτίας επιδεικνύει πολύ καλή σταθερότητα ακόμα και μετά από μερικές εκατοντάδες εγχύσεων. Η στατική αυτή φάση έχει χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές μεταξύ των οποίων ο διαχωρισμός αμινοξέων [Yoshida, 1997], ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και αρκετά παλιότερα για δυσδιάστατη χαρτογράφηση (2–D mapping) ολιγοσακχαριτών με τη χρήση της HILIC [Tomiya *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1990; Takahashi, 1996].

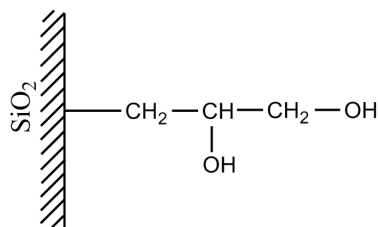


Σχήμα 1.1.8: Απεικόνιση της στατικής φάσης αμιδο–πυριτίας (TSK–Amido 80).

1.1.5.4 Διόλη–πυριτία

Η στήλη διόλης–πυριτίας είναι μια στατική φάση η οποία πλησιάζει σε μεγάλο βαθμό τη συνολική πολικότητα της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας [Neue, 1997; West & Lesellier, 2006]. Παρασκευάζεται με αντίδραση της πυριτίας με αλκοξυγλυκιδόξυπροπυλο–σιλάνιο ακολουθούμενη από υδρόλυση διάνοιξης δακτυλίου, καταλυόμενη από οξύ, της ομάδας αιθυλενοξειδίου. Έτσι σχηματίζεται ο υποκαταστάτης 2,3–διυδροξυπροπυλο– ο οποίος είναι χημικά συνδεδεμένος με σιλοξάνιο (Σχήμα 1.1.9). Οι στατικές φάσεις διόλης–πυριτίας ήταν οι πρώτες προσδεδεμένες φάσεις που αναπτύχθηκαν με σκοπό την αντιμετώπιση προβλημάτων προερχόμενων από τις προσροφητικές ιδιότητες της πυριτίας. Η μεγάλη πολικότητα και η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου των υδροξυλομάδων,

σε συνδυασμό με την απουσία ομάδων που διίστανται, καθιστά τη στήλη διόλης–πυριτίας σχεδόν ιδανική για τη χρήση της στην τεχνική της HILIC. Παρά το γεγονός αυτό, υπάρχουν λίγες εφαρμογές στην HILIC με τη χρήση της στήλης αυτής [Hemström & Irgum, 2006].



Σχήμα 1.1.9: Απεικόνιση της στατικής φάσης διόλης–πυριτίας.

Οι Brons και Olieman εξέτασαν τη στήλη διόλης–πυριτίας παράλληλα με στήλες πυριτίας επικαλυμμένες με διάφορες πρωτοταγείς αμίνες, καθώς και τη στήλη πυριτίας επικαλυμμένης με δευτεροταγείς διμεθυλοαμινο– ομάδες για το διαχωρισμό σακχάρων [Brons & Olieman, 1983]. Σημαντικές απώλειες της γλυκόζης και της γαλακτόζης ήταν το αποτέλεσμα της χρήσης των στηλών πυριτίας επικαλυμμένης με πρωτοταγείς αμίνες, φαινόμενο το οποίο εξαλειφόταν σταδιακά με την αύξηση του χρόνου χρήσης των στατικών αυτών φάσεων. Η στήλη πυριτίας επικαλυμμένη με διμεθυλοαμινο– ομάδες εμφάνισε μικρούς χρόνους κατακράτησης και ατελείς διαχωρισμούς, ενώ η στήλη διόλης–πυριτίας δεν εμφάνισε μη αντιστρεπτή κατακράτηση των αναγόντων σακχάρων που μελετήθηκαν. Εντούτοις, η απουσία αμινομάδων από τη στήλη είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διπλών κορυφών λόγω του μικρού ρυθμού πολυστροφισμού, φαινόμενο το οποίο επιλύθηκε με την προσθήκη δισοπροπυλοαιθυλαμίνης (σε ποσοστό 0,1%) στην κινητή φάση.

Ο Herbreteau και οι συνεργάτες του δοκίμασαν αρκετές στατικές φάσεις επικαλυμμένης πυριτίας για το διαχωρισμό υδατανθράκων και πολυολών και κατέληξαν ότι η στήλη διόλης–πυριτίας ήταν η καταλληλότερη διότι τα ανάγοντα σάκχαρα δεν σχηματίζουν βάσεις Schiff όπως συμβαίνει με τις στατικές φάσεις αμινο–πυριτίας [Herbreteau *et al.*, 1992].

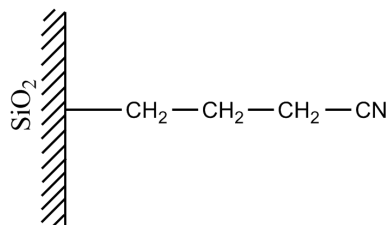
Ο Tanaka και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την ουρία, τη σακχαρόζη και έναν αριθμό αμινοξέων για να αξιολογήσουν τη χρησιμότητα της στήλης διόλης–πυριτίας σε συνθήκες HILIC. Η ιονανταλλακτική δράση της στήλης αποδόθηκε στην παρουσία υπολειμματικών ομάδων σιλανόλης. Μετά τη χρήση κινητής φάσης παρουσία τριφθοροξικού

οξέος σε περιεκτικότητα 0,1%, η στήλη χρειάστηκε να εκπλυθεί με καθαρό διαλύτη για 10 ώρες ώστε να επανακτήσει την αρχική της απόδοση [Tanaka *et al.*, 2003].

Ο Uutela και οι συνεργάτες του στήριξαν την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου διαχωρισμού της ακετυλοχολίνης και της χολίνης με τη χρήση ανιχνευτή μαζών και στήλη διόλης–πυριτίας, σε συνθήκες HILIC, και βρήκαν ότι οι ενώσεις εκλούνται χωρίς τη συνέκλωση ενδογενών ενώσεων οι οποίες προκαλούν καταστολή (suppression) της διαδικασίας ιονισμού [Uutela *et al.*, 2005].

1.1.5.5 Κυανο–πυριτία

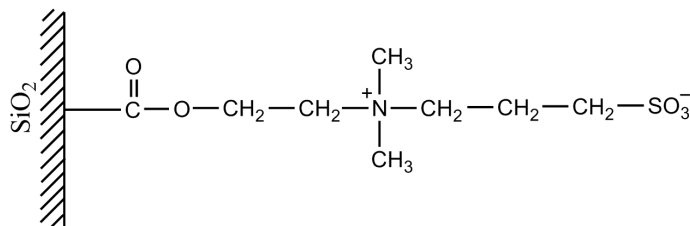
Η κυανο–πυριτία είναι επίσης μια στατική φάση η οποία προϋπήρχε ως στήλη της NPLC (Σχήμα 1.1.10). Ωστόσο υπάρχουν λίγες εφαρμογές με τη χρήση της στήλης αυτής στην τεχνική της HILIC [McClintic *et al.*, 2003]. Παρόλο που αναφέρεται ως μια πολική στατική φάση, η ανικανότητα των κυανοπροπυλο– ομάδων να δράσουν ως δότες δεσμών υδρογόνου [West & Lesellier, 2006] έχει ως συνέπεια την εμφάνιση μικρών χρόνων κατακράτησης σε πολικές ενώσεις, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και σε εφαρμογές στην RPLC. Οι Yoshida και Okada, μετά από σύγκριση διαφορετικών στατικών φάσεων σε συνθήκες HILIC για το διαχωρισμό πεπτιδίων αναφέρουν ότι η στήλη κυανο–πυριτίας δεν επέδειξε σημαντική κατακράτηση των ενώσεων. Έτσι, η στατική αυτή φάση φαίνεται να μην είναι αποτελεσματική σε συνθήκες HILIC. Ένα άλλο πρακτικό ζήτημα το οποίο δρα επίσης ανασταλτικά ως προς τη χρήση της κυανο–πυριτίας στην HILIC είναι η αστάθεια του υλικού αυτού με την εφαρμογή διαλυτών ενδιάμεσης πολικότητας. Η αστάθεια αυτή προκαλείται από τη μείωση της ισχύος των δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων στο εσωτερικό της στατικής φάσης, δυνάμεις οι οποίες διατηρούν τη συνοχή του υλικού στήριξης [Neue, 1997].



Σχήμα 1.1.10: Απεικόνιση της στατικής φάσης κυανο–πυριτίας.

1.1.5.6 Σουλφοαλκυλοβεταΐνη–πυριτία

Η στατική αυτή φάση αποτελείται από εμβολιασμένο (η κύρια μονάδα σχηματίζεται από μια δομική μονάδα ενώ οι κλάδοι από διαφορετική δομική μονάδα) πολυμερικό στρώμα με αμφολυτικές ομάδες 3–σουλφοπροπυλοδιμεθυλοαμμωνιακού άλατος, το οποίο είναι προσδεδεμένο σε πυριτία με ευρείς πόρους (wide-pore). Η ταυτόχρονη παρουσία των ομάδων του τεταρτοταγούς αζώτου και του σουλφονικού οξέος σε αναλογία 1:1 παρέχει στη στατική φάση μηδενικό συνολικό φορτίο (Σχήμα 1.1.11). Ωστόσο, οι ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης έχουν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης μορίων ύδατος [Kane *et al.*, 2003]. Επιπρόσθετα, η ικανότητα των δεσμευμένων μορίων ύδατος να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου διαταράσσεται ελάχιστα. [Kitano *et al.*, 2002; Kitano *et al.*, 2004; Kitano *et al.*, 2005]. Τα υλικά αυτά αναπτύχθηκαν αρχικά για το διαχωρισμό ανόργανων αλάτων, μικρών ιονικών ενώσεων και πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας υδατική κινητή φάση με χαμηλή συγκέντρωση άλατος ρυθμιστικού διαλύματος [Jiang & Irgum, 1999; Viklund & Irgum, 2000; Jiang & Irgum, 2001; Viklund *et al.*, 2001; Jiang & Irgum, 2002].

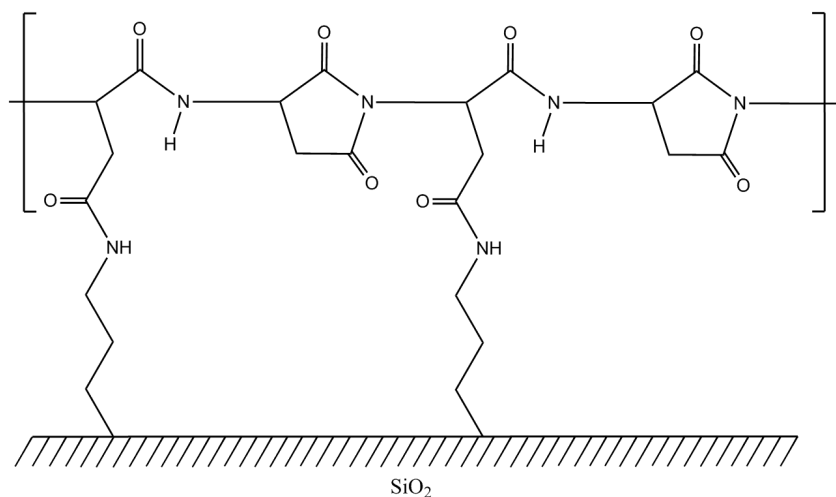


Σχήμα 1.1.11: Απεικόνιση της στατικής φάσης σουλφοαλκυλοβεταΐνης–πυριτίας.

Εντούτοις, οι στατικές αυτές φάσεις χρησιμοποιούνται επιτυχώς στην τεχνική της HILIC αφενός λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν μόρια ύδατος στην επιφάνεια και αφετέρου λόγω της απουσίας ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η εκλεκτικότητα της στήλης ακολουθεί τη γενική αρχή της HILIC, όπου η κατακράτηση αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας των ενώσεων, χωρίς όμως να συμβάλουν στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης οι "σιλανόφιλες" αλληλεπιδράσεις. Οι ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οφείλονται κατά κύριο λόγο στη σουλφονική ομάδα. Το αρνητικό φορτίο επηρεάζεται σε μικρό βαθμό από το pH της κινητής φάσης [Guo & Gaiki, 2005], αλλά η επίδρασή του μπορεί τροποποιηθεί παρουσία χαοτροπικών αλάτων ή δισθενών κατιόντων στην κινητή φάση [Viklund & Irgum, 2000; Jiang & Irgum, 2001; Viklund *et al.*, 2001; Jiang & Irgum, 2002].

1.1.5.7 Πυριτία επικαλυμμένη με πολυ(ηλεκτριμίδιο) και τα παράγωγά του

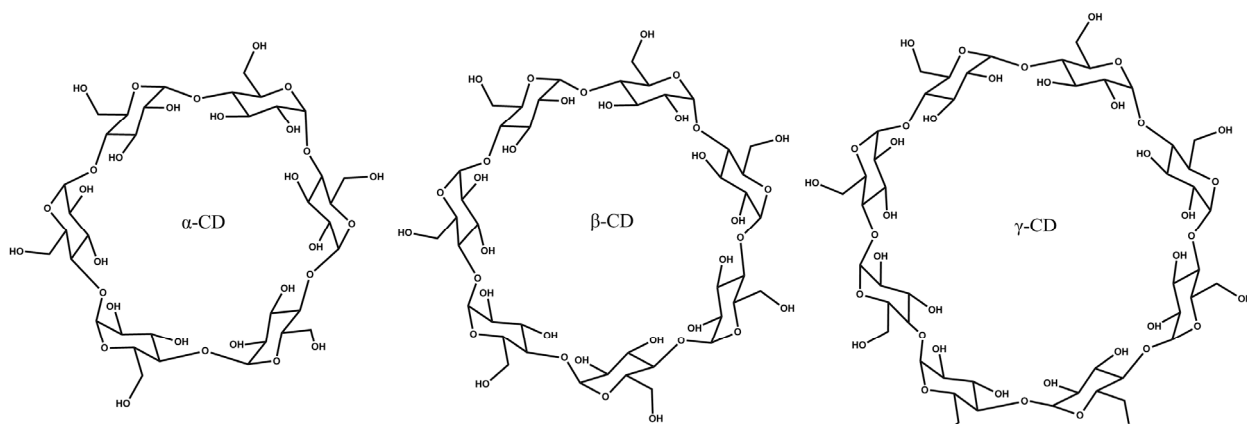
Υπάρχουν διάφορες στατικές φάσεις με βάση την πυριτία, όπως η αμινο-πυριτία, η επιφάνεια των οποίων τροποποιείται περαιτέρω μέσω αντίδρασης προς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του πολυ(ηλεκτριμιδίου) με μια αμινοπροπυλο- ομάδα (Σχήμα 1.1.12). Η πρωτογενής αντίδραση περιλαμβάνει το σχηματισμό του πολυ(αμιδίου/ιμιδίου) το οποίο κατόπιν δεσμεύεται στην επιφάνεια της πυριτίας με πολλαπλές συνδέσεις, ενώ μέρος των δακτυλίων του πολυ(ηλεκτριμιδίου) υφίστανται διάνοιξη και σχηματίζουν αμιδικούς δεσμούς με τις αμινοπροπυλο- ομάδες της πυριτίας. Οι υπόλοιποι δακτύλιοι παραμένουν ανέπαφοι και ταυτόχρονα επιδεκτικοί σε αντιδράσεις με πυρηνόφιλα μόρια. Για παράδειγμα οι δακτύλιοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό ποικίλων δομικών ομάδων όπως είναι τα ασθενή κατιονανταλλακτικά υλικά από πολυ(ασπαρτικό οξύ), τα ισχυρά κατιονανταλλακτικά υλικά από πολυ(2-σουλφοαιθυλοασπαρταμίδιο) και τα υλικά από πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο). Το πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) είναι το υλικό το οποίο συνέθεσε ο Alpert ειδικά για τη χρήση του στην τεχνική της HILIC [Alpert, 1990]. Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες στατικές φάσεις από πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) σε αρκετές εφαρμογές στην HILIC τη δεκαετία του '90, εντούτοις έπαψαν πλέον να χρησιμοποιούνται κυρίως λόγω της αστάθειας του υλικού και της περιορισμένης απόδοσης των αντίστοιχων χρωματογραφικών στηλών [Zywicki *et al.*, 2005; Mihailova *et al.*, 2006].



Σχήμα 1.1.12: Απεικόνιση της στατικής φάσης από πολυ(ηλεκτριμίδιο).

1.1.5.8 Στατικές φάσεις από κυκλοδεξτρίνη

Οι στατικές φάσεις κυκλοδεξτρίνης (CD) έχουν ως υλικό στήριξης την πυριτία, η επιφάνεια της οποίας αποτελείται από πέντε ή περισσότερες μονάδες α-D-γλυκοπυρανοζίτη. Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι δακτύλιοι αποτελούμενοι από έξι, επτά και οκτώ ομάδες γλυκόζης με την ονοματολογία α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα (Σχήμα 1.1.13). Η διαμόρφωση των μορίων αυτών μοιάζει με δακτύλιο (teroid). Στην εξωτερική και εσωτερική πλευρά των δακτυλίων υπάρχουν πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες, αντίστοιχα, οι οποίες έρχονται σε άμεση επαφή με το διαλύτη της κινητής φάσης. Η εσωτερική πλευρά των κυκλοδεξτρινών είναι λιγότερο υδρόφιλη σε σύγκριση με την εξωτερική, γεγονός το οποίο καθιστά δυνατή την κατακράτηση υδρόφοβων μορίων [Hemström & Irgum, 2006].



Σχήμα 1.1.13: Απεικόνιση των δομών της α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνης.

Λόγω του ότι τα μόρια των κυκλοδεξτρινών απαρτίζονται από οπτικά ενεργά σάκχαρα, οι στατικές φάσεις κυκλοδεξτρίνης έχουν επίσης την ικανότητα να "αναγνωρίζουν" χειρικές (chiral) ενώσεις και έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό σε πολλά πεδία εφαρμογών [Han, 1997]. Ο μεγάλος αριθμός υδροξυλομάδων είναι ένας από τους λόγους για τον οποίο οι στατικές αυτές φάσεις παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε συνθήκες HILIC. Οι στατικές φάσεις κυκλοδεξτρίνης είχαν χρησιμοποιηθεί αρκετά παλαιότερα (1989) στην NPLC για το διαχωρισμό μονο-, δι- και ολιγοσακχαριτών [Armstrong & Jin, 1989], ενώ είναι φανερό ότι παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για την επίτευξη διαχωρισμών χειρικών ενώσεων σε συνθήκες HILIC [Risley & Strege, 2000; Guisbert *et al.*, 2000]. Οι Risley και Strege έδειξαν ότι η τεχνική της HILIC είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για το διαχωρισμό πολικών και χειρικών ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να κατακρατηθούν με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές όπως είναι η NPLC [Risley & Strege, 2000].

1.1.5.9 Σουλφονιωμένα συμπολυμερή στυρολίου–διβινυλοβενζολίου

Τα σουλφονιωμένα συμπολυμερή στυρολίου–διβινυλοβενζολίου είναι υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαχωρισμούς υπό συνθήκες HILIC εφόσον ο βαθμός σουλφούρωσης είναι επαρκώς υψηλός. Τα υλικά αυτά (πηκτώματα) ήταν τα πρώτα με τη χρήση των οποίων καθιερώθηκε η NPLC [Samuelson & Sjöström, 1952; Rückert & Samuelson, 1954; Havlicek & Samuelson, 1975]. Οι Chambers και Fritz πρώτοι εισήγαγαν την ιδέα της χρήσης τέτοιων υλικών στην υγρή χρωματογραφία παρασκευάζοντας χρωματογραφικά υλικά με σουλφούρωση της επιφάνειας ρητινών από στυρόλιο–διβινυλοβενζόλιο. Χρησιμοποιώντας κινητή φάση αποτελούμενη από 5% ύδωρ και 95% ACN ο διαχωρισμός της αιθυλενογλυκόλης, της προπυλενογλυκόλης και της γλυκερόλης βρέθηκε να εξαρτάται άμεσα από το βαθμό σουλφούρωσης αλλά και από το αντισταθμιστικό ιόν της σουλφονικής ομάδας της στατικής φάσης. Η αύξηση του βαθμού σουλφούρωσης της στήλης είχε ως αποτέλεσμα τη σχεδόν γραμμική αύξηση της κατακράτησης, ενώ παρουσία Ca^{2+} ως αντισταθμιστικά ιόντα η κατακράτηση ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα ιόντα H^+ [Chambers & Fritz, 1998].

1.1.5.10 Μονόλιθοι

Η χρήση των μονολιθικών υλικών ως στατικές φάσεις στην υγρή χρωματογραφία έλαβε χώρα στις αρχές της δεκαετίας του '90 [Hjertén *et al.*, 1989; Tennikova *et al.*, 1990; Minakuchi *et al.*, 1996]. Οι μονόλιθοι μπορούν να περιγραφούν ως ένα μεγάλο "σωματίδιο" (σκελετός) από πορώδες υλικό που γεμίζει πλήρως τον όγκο της στήλης χωρίς την ύπαρξη διασωματιδιακού κενού χώρου (interparticular void), όπως είναι στην περίπτωση των τυπικών χρωματογραφικών στηλών. Για το λόγο αυτό, το σύνολο της κινητής φάσης θα πρέπει να διέρχεται διαμέσου του υλικού. Επιπλέον, οι μονόλιθοι δεν χρειάζεται να πληρωθούν στο εσωτερικό της στήλης διότι μπορούν να παρασκευαστούν επί τόπου (in situ) μέσω πολυμερισμού [Núñez *et al.*, 2008].

Τα μονολιθικά υλικά παρασκευάζονται είτε από οργανικά πολυμερή με επί τόπου πολυμερισμό κατάλληλων οργανικών μονομερών είτε από πυριτική πηκτή (silica gel) με την τεχνολογία "λύματος–πηκτώματος" (sol–gel) προς σχηματισμό συνεχόμενων αλυσίδων που καλύπτουν εσωτερικά όλο το μήκος της στήλης. Οι συνεχόμενες αλυσίδες σχηματίζονται από τη ζελατινοποίηση (gelation) ενός υγρού κολλοειδούς διαλύματος το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της στήλης [Svec & Fréchet, 1992; Hjertén *et al.*, 1989; Minakuchi *et al.*, 1996; Fields, 1996].

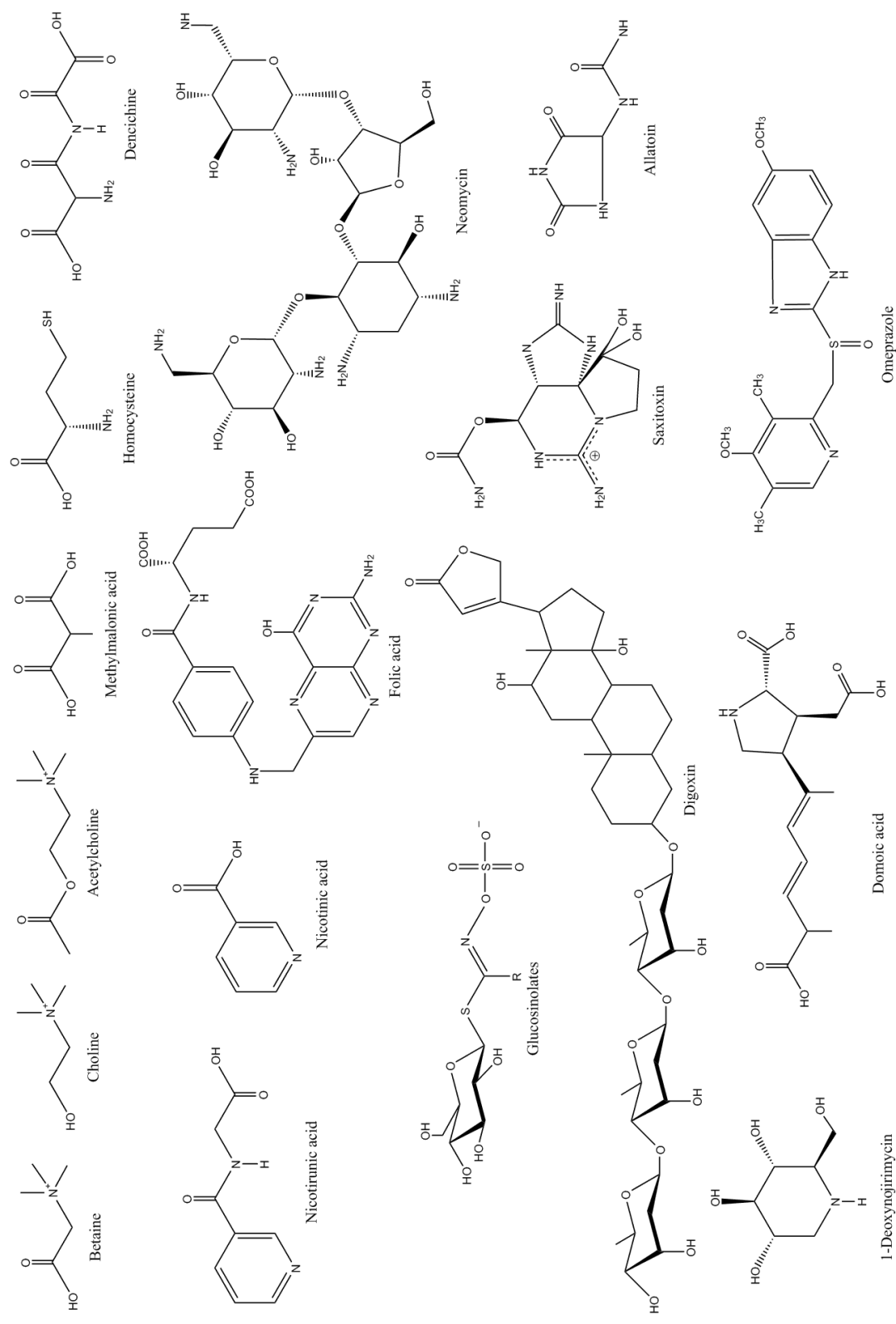
Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των μονολιθικών στηλών, ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι είναι δυνατός, έως ένα βαθμό, ο έλεγχος του μεγέθους του σκελετού της πυριτίας και των πόρων του μονόλιθου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σύστασης του αρχικού μίγματος ή της συγκέντρωσης των σιλανίων. Ο μονόλιθος πυριτίας, εφόσον σχηματιστεί, μπορεί επιπλέον να τροποποιηθεί χημικά ώστε να προκύψει η επιθυμητή στατική φάση. Η τροποποίηση αυτή πραγματοποιείται ακολουθώντας μια μονομερική ή πολυμερική διαδικασία. Στην πρώτη περίπτωση η τροποποίηση γίνεται με απευθείας αντίδραση μεταξύ της πυριτίας και ενός αντιδραστήριου με την επιθυμητή δομική μονάδα ή με την εισαγωγή αρχικά μιας ομάδας "αποστάτη" (spacer) και έπειτα αντίδραση με έναν υποκαταστάτη ώστε να προκύψει η επιθυμητή χαρακτηριστική ομάδα. Στην περίπτωση χημικής τροποποίησης με πολυμερισμό, εισάγεται αρχικά είτε ένας "αποστάτης" ή μια ομάδα πρόσδεσης (anchor) πριν από τη χημική τροποποίηση [Núñez *et al.*, 2008; Ikegami *et al.*, 2008].

Μέχρι σήμερα υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά τη χρήση μονολιθικών στηλών στην τεχνική της HILIC. Οι Pack και Risley μελέτησαν τη χρήση μονολιθικής στήλης από πυριτία σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή σκεδασμού φωτός για τον προσδιορισμό των ιόντων λιθίου, νατρίου και καλίου. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η μονολιθική στήλη πυριτίας επέδειξε χρωματογραφική συμπεριφορά χαρακτηριστική της HILIC, καθώς με αύξηση του ποσοστού του ACN υπήρξε αύξηση του χρόνου κατακράτησης των κατιόντων [Pack & Risley, 2005]. Ο Ikegami και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν μονολιθική στατική φάση από πολυ(ακρυλαμίδιο) η οποία εμφάνισε επίσης χρωματογραφική συμπεριφορά τυπική της HILIC. Σε σύγκριση με την κλασική στήλη αμιδο-πυριτίας, η μονολιθική στήλη από πολυ(ακρυλαμίδιο) εμφάνισε τρεις φορές μεγαλύτερη διαπερατότητα (ως προς την κινητή φάση) και ελαφρώς υψηλότερη απόδοση ως προς το διαχωρισμό σακχάρων [Ikegami *et al.*, 2006]. Επίσης, ο Horie και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν μονολιθική στήλη από πολυ(ακρυλικό οξύ) η οποία εμφάνισε πολύ υψηλότερη απόδοση (αριθμός θεωρητικών πλακών) συγκριτικά με συμβατικές χρωματογραφικές στήλες (πληρωμένες με σωματίδια) όπως είναι η διοντική στήλη από σουλφοαλκυλοβεταΐνη-πυριτία. Ωστόσο, οι στατικές αυτές φάσεις βρίσκονται σε αρχικό στάδιο λόγω διαφόρων μειονεκτημάτων, όπως η μη ικανοποιητική ομοιογένεια των μονόλιθων μικρού μήκους (15–20 cm) και τα χρονοβόρα στάδια κατασκευής τους, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε μειωμένη επαναληψιμότητα ως προς την παρασκευή μονόλιθων με τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά.

1.1.6 Εφαρμογές της HILIC

1.1.6.1 Μόρια μικρού μεγέθους

Η τεχνική της HILIC υπερτερεί ως προς το διαχωρισμό μικρών και εξαιρετικά πολικών μορίων (Σχήμα 1.1.14). Ο Li και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μέθοδο για τον προσδιορισμό της ατενολόλης (φάρμακο της κατηγορίας των β-αναστολέων) με τη χρήση στατικής φάσης από μη επικαλυμμένη πυριτία [Li *et al.*, 2005]. Ο Grumbach και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν επίσης στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας για το διαχωρισμό μίγματος πολικών μορίων μεταξύ των οποίων η χολίνη και η ακετυλοχολίνη [Grumbach *et al.*, 2004]. Η βεταΐνη της γλυκίνης (τριμεθυλογλυκίνη) είναι επίσης ένα εξαιρετικά πολικό μόριο το οποίο έχει προσδιοριστεί με χρήση στήλης από μη επικαλυμμένη πυριτία [Su *et al.*, 2006]. Ο Guo, μετά από σύγκριση των στηλών αμινο- και αμιδο-πυριτίας, κατέληξε στο ότι τεταρτοταγείς αμμωνιακές ενώσεις όπως η χολίνη, το 2-χλωροαιθυλοτριμεθυλοαμμώνιο (chlormequat), το 1,1-διμεθυλοπιπεριδόνιο (meriquat), η ακετυλοχολίνη και βεταΐνη είχαν καλύτερη κατακράτηση στη στήλη αμιδο-πυριτίας [Guo, 2005]. Μεταξύ των λίγων εφαρμογών της στήλης κυανο-πυριτίας είναι ο προσδιορισμός της πιπεραζίνης σε φαρμακευτικά δείγματα [McClintic *et al.*, 2003]. Ο Dallet και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν στήλη πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) και ανιχνευτή UV για τον προσδιορισμό της ουρίας, της αλλατοΐνης και της πυρογλουταμικής γλυκίνης σε δείγματα καλλυντικών [Dallet *et al.*, 2000]. Η ουρία, η σακχαρόζη και η γλυκίνη χρησιμοποιήθηκαν από τον Tanaka και τους συνεργάτες του ως ενώσεις "δείκτες" για την αξιολόγηση της χρωματογραφικής απόδοσης της στήλης διόλης-πυριτίας σε συνθήκες HILIC [Tanaka *et al.*, 2003]. Ένας σχετικά μεγάλος αριθμός βασικών ενώσεων (πουρίνες και πυριμιδίνες) χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες από τον McKeown και τους συνεργάτες του για τη μελέτη της επίδρασης της καθαρότητας της πυριτίας στην κατακράτηση σε συνθήκες HILIC [McKeown *et al.*, 2001], ενώ οι ενώσεις ινδαπαμίδιο, μεθατόνη, σελιπρολόλη, ατενολόλη, τιμολόλη και ισοπρεναλίνη διαχωρίστηκαν με συνδυασμό της HILIC και της κατιονανταλλαγής σε στήλη πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-σουλφοαιθυλοασπαρταμίδιο) [Zhang *et al.*, 2003]. Ο διαχωρισμός της ομοκυστεΐνης, του μεθυλομαλονικού και του ηλεκτρικού οξέος επιτεύχθηκε με τη χρήση της στήλης σουλφοαλκυλοβεταΐνης-πυριτίας και ανιχνευτή MS [Appelblad & Abrahamsson, 2005]. Επίσης, ο προσδιορισμός της αλλατοΐνης σε βιολογικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας και ανιχνευτή MS [Iwasaki *et al.*, 2005].



Σχήμα 1.1.14: Κάποια αντιπροσωπευτικά πολικά μόρια που έχουν διαχωριστεί σε συνθήκες HILIC.

1.1.6.2 Βιοανάλυση και φαρμακοκινητικές μελέτες

Η τεχνική της HILIC κατέχει πλέον σημαντικό ρόλο στη φαρμακευτική ανάπτυξη. Ένας μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών ουσιών έχει αναλυθεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης σε βιοαναλυτικές εφαρμογές. Πολλά νεώτερα φάρμακα είναι εξαιρετικά πολικές ουσίες με συνέπεια η RPLC να μην είναι αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού. Ένα πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης από τον Naidong συνοψίζει τη χρήση του ανιχνευτή MS σε συνδυασμό με χρωματογραφικές στήλες με βάση την πυριτία, σε βιοαναλυτικές εφαρμογές [Naidong, 2003].

Από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές είναι ο προσδιορισμός των φολικών (φολικό οξύ, τετραϋδροφολικό οξύ, 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό οξύ και 5'-φορμυλοτετραϋδροφολικό οξύ) σε δείγμα αίματος, με τη χρήση στήλης πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) [Garbis *et al.*, 2001].

Η στήλη από πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο), σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της κιτρουλίνης (2-αμινο-5-καρβαμυλοαμινοπεντανοϊκό οξύ) σε δείγμα ξηρού αίματος με σκοπό την παρακολούθηση μοςχεύματος μετά από επέμβαση στο ανθρώπινο εντερικό σύστημα [Yu *et al.*, 2005]. Ο ανιχνευτής MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού της ομεπραζόλης και της 5-υδροξυομεπραζόλης σε δείγμα αίματος χρησιμοποιώντας στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας [Qi & Naidong, 2006]. Η στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του φαρμάκου acyclovir (αντικό φάρμακο ανάλογο της γουανοσίνης) σε δείγματα αίματος, αμνιακού υγρού, εμβρυικού ιστού και ιστού από πλακούντα σε ποντίκια [Brown *et al.*, 2002]. Ο προσδιορισμός του μυκητοκτόνου φαρμάκου flukonazole σε δείγμα αίματος έχει πραγματοποιηθεί με εκχύλιση υγρού-υγρού και χρωματογραφική ανάλυση με στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας [Eerkes *et al.*, 2003].

Η χρήση της στατικής φάσης από μη επικαλυμμένη πυριτία έχει επιπλέον χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου paroxetine. Ο συνδυασμός της HILIC με ανιχνευτή MS είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης κατά 2,5 φορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη μέθοδο βασισμένη στην τεχνική της RPLC [Naidong & Eerkes, 2004]. Ο παραπάνω συνδυασμός έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αντιψυχωσικών φαρμάκων levosulpiride και triapride μετά από εκχύλιση δείγματος αίματος με οξικό αιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο αντίστοιχα [Paek *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2004].

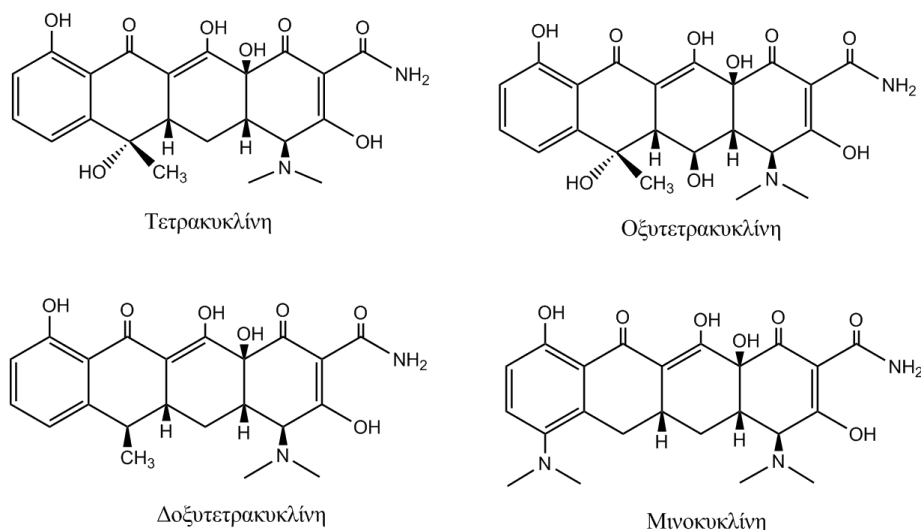
Η τεχνική της HILIC έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό των φαρμάκων isoniazid (αντικαρκινικό) και cetirizine (αντιισταμινικό) σε δείγμα αίματος, τα οποία είναι πολύ δύσκολο να αναλυθούν με την RPLC. Η χρήση στατικών φάσεων από μη επικαλυμμένη πυριτία και σε αυτές τις περιπτώσεις εμφάνισε ικανοποιητικό διαχωρισμό και σταθερή απόδοση για περισσότερες από 1200 εγχύσεις [Li *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005]. Ο Uutela και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν αναλυτική μέθοδο χρησιμοποιώντας τη στήλη διόλης–πυριτίας ως εναλλακτική των ήδη υπαρχουσών τεχνικών διαχωρισμού (χρωματογραφία σχηματισμού ζεύγους ιόντων, ιοντική χρωματογραφία) για το διαχωρισμό της χολίνης και της ακετυλοχολίνης από κατιονικά άλατα. Η χρήση του ανιχνευτή MS εμφάνισε 5 φορές υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τις προϋπάρχουσες μεθόδους [Uutela *et al.*, 2005]. Ο ανιχνευτής MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την HILIC για τον προσδιορισμό της 4–μεθυλονιτροζαμινό–1–(3–πυριδυλο)–1–βουτανόλης, ενός μεταβολίτη της νιτροζαμίνης προερχόμενης από καπνό [Pan *et al.*, 2004].

Η τεχνική της HILIC σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή MS έχει επιπλέον χρησιμοποιηθεί από τους Hsieh και Chen για το διαχωρισμό του νικοτινικού οξέος από τους μεταβολίτες νικοτιναμίδιο και νικοτινουρικό οξύ σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας με συνολικό χρόνο ανάλυσης λιγότερο από 2 λεπτά [Hsieh *et al.*, 2005].

1.1.6.3 Αντιβιοτικά και κυτταροστατικά

Τα περισσότερα αντιβιοτικά προέρχονται από εκκρίσεις μικροοργανισμών με σκοπό την προστασία από βιολογικούς κινδύνους προερχόμενους από το περιβάλλον. Επομένως οι ουσίες αυτές εμφανίζουν μεγάλη υδροφιλικότητα. Οι τετρακυκλίνες (Σχήμα 1.1.15) είναι μια γνωστή κατηγορία αντιβιοτικών που η πρόδρομη τετρακυκλίνη παράγεται από το μικροοργανισμό *Streptomyces*.

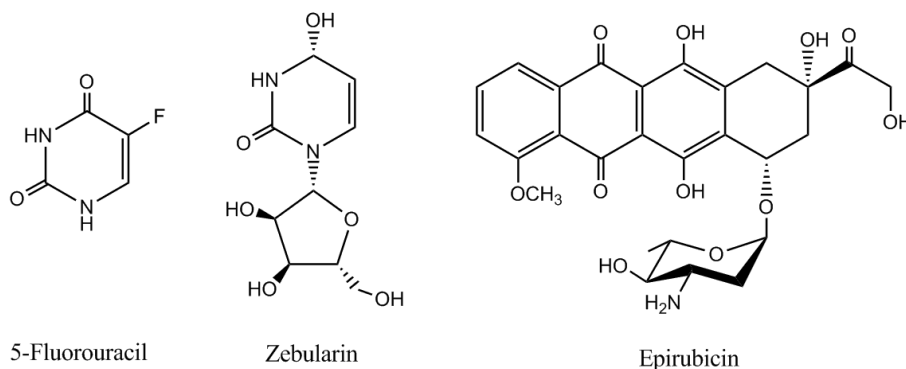
Ο Valette και οι συνεργάτες του μελέτησαν το διαχωρισμό τριών μορφών τετρακυκλίνης σε στατικές φάσεις από αμινο–πυριτία και μη επικαλυμμένη πυριτία [Valette *et al.*, 2004]. Η μη επικαλυμμένη πυριτία δεν ήταν αποτελεσματική λόγω της λήψης μη συμμετρικών κορυφών. Καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη στήλη αμινο–πυριτίας, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών.



Σχήμα 1.1.15: Μερικά από τα μέλη των αντιβιοτικών της τετρακυκλίνης.

Ο Oertel και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μέθοδο προσδιορισμού της νεομυκίνης σε δείγμα αίματος με τη χρήση της στήλης σουλφοακυλοβεταΐνης–πυριτίας και ανιχνευτή MS [Oertel *et al.*, 2004]. Συγκριτικά με την παρουσία μιας αμινομάδας στις ενώσεις της τετρακυκλίνης, η νεομυκίνη περιέχει έξι πρωτοταγείς αμινομάδες γεγονός που καθιστά το μόριο πολύ πιο επιδεκτικό σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις. Η νεομυκίνη επίσης εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία στον ανιχνευτή MS, γεγονός το οποίο απαιτεί τη χρήση των βέλτιστων δυνατών χρωματογραφικών συνθηκών κυρίως όσον αφορά τη σύσταση της κινητής φάσης. Με τη χρήση της προαναφερθείσας στατικής φάσης και με βαθμιδωτή έκλυση, παρουσία οξικού αμμωνίου, ήταν δυνατή η λήψη επαναλήψιμων χρόνων κατακράτησης και ικανοποιητικής ευαισθησίας ανίχνευσης. Η μέθοδος στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών παρόμοιας δομής (amikasin, gentamicin, kanamycin, neomycin, paromomycin and tobramycin) σε δείγματα ορού αίματος με σκοπό την παρακολούθηση των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων [Oertel *et al.*, 2004].

Διάφορα φάρμακα για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι επίσης πολύ υδρόφιλα μόρια (Σχήμα 1.1.16). Ο Pisano και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μέθοδο προσδιορισμού της 5–φθοροουρακίλης, ενός αναλόγου της πυριμιδίνης που χρησιμοποιείται κυρίως κατά του καρκίνου του εντέρου [Pisano *et al.*, 2005]. Η χρήση της στήλης αμινο–πυριτίας εμφάνισε προβλήματα στον προσδιορισμό όπως οι μη επαναλήψιμοι χρόνοι κατακράτησης και ο αυξημένος θόρυβος λόγω της σταδιακής αποκόλλησης υλικού της στατικής φάσης. Τα παραπάνω προβλήματα ξεπεράστηκαν χρησιμοποιώντας στήλη με υλικό στήριξης την πολυ(βινυλική αλκοόλη) και επικάλυψη με αμινοπροπυλο– ομάδες.



Σχήμα 1.1.16: Δομές φαρμάκων καταπολέμησης διαφόρων μορφών καρκίνου.

Η τεχνική της HILIC έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τη φαρμακοκινητική μελέτη του μορίου zebularine μέσω προσδιορισμού της ιχνηθετημένης με ^{14}C ένωσης και των κύριων προϊόντων μεταβολισμού ουριδίνη, ουρακίλη και διυδροξουρακίλη σε δείγμα αίματος [Beumer *et al.*, 2006]. Ο διαχωρισμός των ενώσεων αυτών πραγματοποιήθηκε με στήλη αμινο–πυριτίας, ενώ οι προσπάθειες διαχωρισμού με την τεχνική της RPLC ήταν ανεπιτυχείς.

Η επιρουβικίνη ανήκει σε μια άλλη κατηγορία ενώσεων που χρησιμοποιούνται για χημειοθεραπεία και ανήκει στην οικογένεια των φαρμάκων της ανθρακυκλίνης. Η παρουσία στη δομή της επιρουβικίνης μιας ομάδας σακχάρου σε συνδυασμό με άλλες πολικές ομάδες καθιστά δύσκολη την κατακράτηση του μορίου σε συνθήκες RPLC. Ο προσδιορισμός της επιρουβικίνης και τριών αναλόγων της έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της HILIC με στατική φάση από μη επικαλυμμένη πυριτία [Li & Huang, 2004].

Η χρήση της HILIC σε παρασκευαστικές εφαρμογές είναι πολύ περιορισμένη. Μια από τις λίγες εφαρμογές είναι η χρήση της στήλης από πολυ(2–υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) για τον καθαρισμό πεπτιδίων τα οποία λόγω του ισχυρά υδρόφιλου χαρακτήρα τους δεν μπορούν να διαχωριστούν σε στήλες C_{18} ή πολυμερικές στήλες (στυρόλιο–διβινυλοβενζόλιο) [Sage *et al.*, 1994]. Μια άλλη περίπτωση παρασκευαστικού διαχωρισμού έχει αναφερθεί από τους Li και Huang, οι οποίοι περιγράφουν τον καθαρισμό της επιρουβικίνης από πρωτογενές διάλυμα σε συνθήκες υπερφόρτωσης της στατικής φάσης [Huang & Li, 2005].

1.1.6.4 Ανάπτυξη φαρμάκων

Ο Oyler και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την τεχνική της HILIC σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS για το διαχωρισμό ενός αριθμού αμινοξέων (atosiban και εννέα διαστεreoμερή) χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις από αμινο–πυριτία και πυριτία επικαλυμμένη με πολυ(αμίνη) και πολυ(2–υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) [Oyler *et al.*, 1996]. Στη στήλη αμινο–πυριτίας ο διαχωρισμός των δέκα αμινοξέων πραγματοποιήθηκε παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος στην κινητή φάση (250 mM υπερχλωρικό νάτριο) για τη λήψη συμμετρικών χρωματογραφικών κορυφών, με αποτέλεσμα η μέθοδος να μην είναι συμβατή με τον ανιχνευτή MS. Αντίθετα, με τη στήλη από πολυ(αμίνη), η οποία αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από δευτεροταγείς και τριτοταγείς αμίνες, βελτιώθηκε σημαντικά η συμμετρία των κορυφών παρουσία οξικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 5 mM. Εντούτοις, η εκλεκτικότητα της στήλης δεν ήταν ικανοποιητική με αποτέλεσμα το διαχωρισμό μικρότερου αριθμού αμινοξέων. Την ίδια απόδοση ως προς το διαχωρισμό εμφάνισε και η στήλη από πολυ(2–υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο). Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι για τις δεδομένες ενώσεις, οι οποίες εμφανίζουν κατακράτηση και στην RPLC, η HILIC είναι μια συμπληρωματική τεχνική διαχωρισμού. Εντούτοις, δεν επιτεύχθηκε η ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου συμβατής με τον ανιχνευτή MS.

Ο Strege εξέτασε επτά διαφορετικές στατικές φάσεις (πυριτία επικαλυμμένη με πολυ(2–υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο), αμιδο–πυριτία, δυο στήλες αμινο–πυριτίας, δυο στήλες κυανο–πυριτίας και μια στήλη κυκλοδεξτρίνης) για τη μελέτη του διαχωρισμού όξινων και βασικών ενώσεων από φυσικά προϊόντα οι οποίες δεν εμφανίζουν κατακράτηση σε συνθήκες RPLC. Απουσία άλατος στην κινητή φάση οι στήλες αμιδο– και κυανο–πυριτίας και κυκλοδεξτρίνης εμφάνισαν σημαντική κατακράτηση σε αναλογία ACN/H₂O 75/25, ενώ στις συνθήκες αυτές η έκλουση των ενώσεων δεν ήταν εφικτή από τις στήλες αμινο–πυριτίας. Για τη λήψη επαναλήψιμων χρόνων κατακράτησης και για λόγους συμβατότητας της μεθόδου με τον ανιχνευτή MS χρησιμοποιήθηκε το άλας του οξικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 6,5 mM [Strege, 1998]. Αργότερα, ο Strege και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μεθοδολογία χρησιμοποιώντας την HILIC σε συνδυασμό με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής και κατιονανταλλαγής και με ανιχνευτή MS, τοποθετώντας σε σειρά δυο χρωματογραφικές στήλες αντίθετου φορτίου για την ανίχνευση ουσιών με φαρμακευτική δράση από φυσικά προϊόντα [Strege *et al.*, 2000].

Πρόσφατα, η HILIC χρησιμοποιήθηκε ως συμπληρωματική τεχνική της RPLC για την "αποτύπωση" (fingerprinting) μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα πειραματόζωων [Idborg *et*

al., 2005; ^bIdborg *et al.*, 2005]. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δυο χρωματογραφικών τεχνικών είναι εξαιρετικά χρήσιμος λόγω της παρουσίας πολλών ενώσεων "βιο-δεικτών" με υψηλή υδροφιλικότητα.

Η αναζήτηση βιοδραστικών μορίων σε φυσικά προϊόντα αποτελεί μια εναλλακτική διαδικασία για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η τεχνική της HILIC είναι και σε αυτήν την περίπτωση χρήσιμη τεχνική διότι παρέχει τη δυνατότητα κατακράτησης πολικών και ουδέτερων ενώσεων οι οποίες, με τη χρήση κλασικών χρωματογραφικών τεχνικών, συνήθως συνεκλύονται με άλλα συστατικά. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη του Kimura και των συνεργατών του για τον προσδιορισμό της ένωσης 1-deoxynojirimycin από φύλλα μουριάς σε στήλη αμιδο-πυριτίας [Kimura *et al.*, 2004].

1.1.6.5 Εξαρτησιογόνες ουσίες

Η HILIC ως τεχνική διαχωρισμού έχει επίσης εφαρμοστεί και σε εξαρτησιογόνες ουσίες, όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός της κοκαΐνης και επτά μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα [Giroud *et al.*, 2004]. Επίσης, η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή MS για το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό της μορφίνης και του 3- και 6-γλουκουρονιδίου σε δείγματα ορού αίματος [Bengtsson *et al.*, 2005].

1.1.6.6 Γεωργική χημεία και χημεία τροφίμων

Παρά την καταλληλότητα της HILIC για το διαχωρισμό πολικών μορίων, δεν υπάρχουν πολλές εφαρμογές σε δείγματα τροφίμων και ποτών. Ο Schlichtherle-Cerny και οι συνεργάτες του διαχώρισαν και ταυτοποίησαν έναν αριθμό αμινοξέων, γλουταμυλικών δι- και τριπεπτιδίων και ενώσεων Amadori αναλύοντας το κλάσμα του εκχυλίσματος γλουτένης που εκλύεται στο νεκρό όγκο σε συνθήκες RPLC [Schlichtherle-Cerny *et al.*, 2003]. Με τον ίδιο τρόπο προσδιορίστηκαν περισσότερες από 25 ενώσεις, με σχετικά ικανοποιητικό διαχωρισμό, σε εκχύλισμα κίτρινου τυριού (Parmesan cheese). Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται η αργινίνη, η λυσίνη, το γλουταμινικό οξύ και ένας αριθμός πολικών δι-πεπτιδίων. Με παρόμοια μεθοδολογία ο Rotzoll και οι συνεργάτες του απομόνωσαν και διαχώρισαν σε στήλη αμιδο-πυριτίας το γλυκοζίτη (S)-morelid από εκχύλισμα μανιταριού του γένους *morchella* [Rotzoll *et al.*, 2005]. Ο Zywicki και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τη στήλη πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο)

για το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό των δυο κυριότερων αλκαλοειδών α-χακονίνη και α-σολανίνη σε δείγματα πατάτας [Zywicki *et al.*, 2005].

Η ταυρίνη και η μεθειονίνη έχουν διαχωριστεί και προσδιοριστεί ποσοτικά σε δείγματα αναψυκτικών πλούσια σε υδατάνθρακες (energy drinks) χωρίς άλλη επεξεργασία πέραν της αραίωσης του δείγματος με οργανική κινητή φάση [de Person *et al.*, 2005]. Η μοναδική έως τώρα εφαρμογή της HILIC σε δείγματα πόσιμου ύδατος είναι ο προσδιορισμός του διχλωροξικού οξέος [Dixon *et al.*, 2004], μιας μεθόδου η οποία επεκτάθηκε και σε δείγματα αίματος και ιστού από πειραματόζωα [Delinsky *et al.*, 2005].

1.1.6.7 Τοξίνες

Πολλές φυσικά ενυπάρχουσες τοξίνες, ιδιαίτερα οι παραλυτικές τοξίνες που προέρχονται από οστρακοειδή, είναι μόρια με υψηλή υδροφιλικότητα [Negri *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2004; Fuguet *et al.*, 2004; Mitchell & The, 2005]. Η τεχνική της HILIC διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο τόσο σε παρασκευαστικό όσο και σε αναλυτικό επίπεδο για την απομόνωση, το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό τριών τοξινών προερχόμενων από τα οστρακοειδή του γένους *Gymnodinium catenatum* σε στήλη αμιδο-πυριτίας [Negri *et al.*, 2003]. Η στήλη αμιδο-πυριτίας χρησιμοποιήθηκε επίσης από τον Dell'Aversano και τους συνεργάτες του για το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού τοξινών από κυανοβακτήρια [Dell'Aversano *et al.*, 2004]. Παρόμοιες χρωματογραφικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό του δομοϊκού οξέος (νευροτοξίνη προερχόμενη από οστρακοειδή) [Ciminiello *et al.*, 2005], αλλά και σε μελέτες σχετικές με το προφίλ των τοξινών που παράγονται από τα οστρακοειδή του γένους *Mytilus galloprovincialis* [Ciminiello *et al.*, 2006].

1.1.6.7 Συνθετικά πολυμερή

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών και η χρωματογραφία διέλευσης μέσω πηκτής είναι δυο τεχνικές που έχουν καθιερωθεί για το διαχωρισμό πολυμερών και oligομερών. Εντούτοις, συνθήκες όμοιες με αυτές της HILIC χρησιμοποιήθηκαν από τον Svec και τους συνεργάτες του για το διαχωρισμό μορίων από πολυ(βινυλοπυρολιδινόνη) μοριακού βάρους έως και 360 kDa. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε πολυμερική στήλη διόλης και πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης από 0 έως 50% σε ύδωρ παρουσία ακετόνης. Επίσης, χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή έκλουση από 10 έως 40% σε ύδωρ παρουσία ακετόνης διαχωρίστηκαν oligομερή δεξτράνης (προϊόντα πολυμερισμού της γλυκόζης) με 3 έως 12

ομάδες γλυκόζης. Με περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας του ύδατος στην κινητή φάση, σε ποσοστό 60%, έλαβε χώρα έκλυση μορίων δεξτράνης με μοριακό βάρος έως και 147 kDa, ενώ με χρήση ηπιότερου προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης (8–20% σε ύδωρ) πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνης [Svec *et al.*, 2001]. Η τεχνική της HILIC με στήλη διόλης–πυριτίας έχει χρησιμοποιηθεί επίσης στα αρχικά στάδια καθαρισμού των δενδριμερών πολυ(αμιδοαμίνης) [Peterson *et al.*, 2003].

1.1.6.8 Υδατάνθρακες

Το πεδίο εφαρμογών στην κατηγορία των υδατανθράκων είναι ευρύ και περιλαμβάνει την ανάλυση σακχάρων [Panagiotopoulos & Sempere, 2005; Wang & Fang, 2004] και νουκλεοζιτών [Zheng *et al.*, 2005] σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων, το χαρακτηρισμό πολυσακχαριτών μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους και των παραγώγων αυτών σε τρόφιμα [Montero *et al.*, 2004], τη σύνθεση γλυκοπολυμερών [Ladmiral *et al.*, 2004], καθώς και την καταγραφή διαφορών σε πολύπλοκες δομές γλυκοπρωτεϊνών ("glycoproteomics" ή "glycomics") [Lee *et al.*, 2005, Raman *et al.*, 2005].

Ένα κοινό γνώρισμα των υδατανθράκων είναι ότι χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες ιδιότητες οι οποίες καθιστούν δύσκολο το χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Συγκεκριμένα, περιέχουν στο μόριό τους πολλαπλές υδροξυλομάδες και άλλες πολικές ομάδες, είναι θερμικά ασταθείς ενώσεις και ανιχνεύονται δύσκολα με οπτικά μέσα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ενώσεων αυτής της κατηγορίας είναι η χρωματογραφία ιονανταλλαγής [Rocklin *et al.*, 1983; Cataldi *et al.*, 2000] και πρόσφατα η HILIC [Linden & Lawhead, 1975; Palmer, 1975; Churms, 1996], ενώ για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται κυρίως ο ανιχνευτής σκεδασμού φωτός [Megoulas & Koupparis, 2005] και ο ανιχνευτής MS [Zaia, 2004]. Ένα άρθρο ανασκόπησης σχετικό με διαχωρισμούς υδατανθράκων με την τεχνική της HILIC έχει δημοσιευτεί μόλις το 1996 [Churms, 1996], ενώ παλαιότερα η NPLC ήταν η κύρια τεχνική διαχωρισμού [Verzele *et al.*, 1987; Churms, 1990; Herbreteau, 1992]. Υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές της HILIC για το διαχωρισμό υδατανθράκων μερικές από τις οποίες είναι οι υδατάνθρακες μικρού μοριακού βάρους σε τρόφιμα και αφεψήματα [Montero *et al.*, 2004], τα σάκχαρα σε δείγματα φαρμάκων [Wang & Fang, 2004] και θαλασσινά δείγματα [Panagiotopoulos & Sempere, 2005], τα γλυκοαλκαλοειδή και τα προϊόντα υδρόλυσής τους από φυτά του γένους *Solanaceae* [Friedman, 2004], οι γλυκοζαμινογλυκάνες (βλεννοπολυσακχαρίτες) [Vynios *et al.*, 2002], οι

γλυκοπρωτεΐνες [Novotny & Mechref, 2005] και η αξιολόγηση της γλυκοσυλίσωσης των πρωτεϊνών [Wuhrer *et al.*, 2005].

Οι Armstrong και Jin εισήγαγαν τις στατικές φάσεις κυκλοδεξτρίνης (CD) για το διαχωρισμό μονο-, δι-, τρι- και τετρασακχαριτών, δεοξυσακχαριτών και πολυολών με τη χρήση κινητών φάσεων αποτελούμενων από ύδωρ και ACN ή ακετόνη σε συνθήκες ισοκρατικής ή βαθμιδωτής έκλουσης [Armstrong & Jin, 1989]. Οι ίδιοι συγγραφείς ανέπτυξαν πρόσφατα μέθοδο προσδιορισμού μη παραγωγοποιημένων ολιγοσακχαριτών και προϊόντων υδρόλυσης πολυσακχαριτών σε στήλη από β-CD και με ανιχνευτή MS [Liu *et al.*, 2005]. Επιπλέον, οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση της χιτίνης έχουν χαρακτηριστεί ως προς το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους (ανωμέρια) αφού πρώτα διαχωρίστηκαν σε στήλη αμιδο-πυριτίας σε συνθήκες HILIC [Aronson *et al.*, 2003]. Η στήλη αμιδο-πυριτίας έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ολιγοσακχαριτών σε δείγμα ούρων από πειραματόζωα [Charlwood *et al.*, 2000].

Οι γλυκοσινόλες είναι μια ομάδα υδατοδιαλυτών γλυκοζιτών που περιέχουν στο μόριό τους χαρακτηριστικές πολικές ομάδες, όπως είναι η σουλφονιωμένη οξίμη και η γλυκόνη, ενώ διαφοροποιούνται από την πλευρική αλκυλομάδα που βρίσκεται προσδεδεμένη στο κεντρικό άτομο άνθρακα (Σχήμα 1.1.14). Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι εξαιρετικά υδρόφιλες, και φέρουν μόνιμο αρνητικό φορτίο λόγω της παρουσίας της σουλφονικής ομάδας [Song *et al.*, 2005]. Ο Troyer και οι συνεργάτες του εισήγαγαν μέθοδο ισοκρατικού διαχωρισμού των ενώσεων αυτών που στηρίζεται στη χρήση της στήλης από πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) [Troyer *et al.*, 2001].

Οι σαπωνίνες είναι μια κατηγορία αμφίφιλων ενώσεων που απαντούν κυρίως στο κηρώδες προστατευτικό κάλυμμα των φυτών. Στις ενώσεις αυτές ανήκουν οι στεροειδείς γλυκοζίτες, τα αλκαλοειδή στεροειδούς μορφής και τα τριτερπένια, ενώ πολλές από αυτές τις ενώσεις εμφανίζουν τοξικότητα. Λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους, οι ενώσεις αυτές μπορούν να διαχωριστούν τόσο με την RPLC [Wang *et al.*, 2006; Oleszek & Bialy, 2006] όσο και με την HILIC χρησιμοποιώντας στήλη αμινο-πυριτίας [Beutler, 1997].

Οι φωσφορυλιωμένοι υδατάνθρακες, λόγω της ύπαρξης φορτίου, διαχωρίζονται με τεχνικές όπως η χρωματογραφία ιονανταλλαγής [Debetto *et al.*, 1999] ή ο συνδυασμός χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων με μικκυλιακή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης [Brando *et al.*, 1990]. Ο Feurle και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η στήλη από β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό φωσφορυλιωμένων μονοσακχαριτών, με ένα μικτό μηχανισμό, συνδυάζοντας την HILIC και τη χρωματογραφία ανιονανταλλαγής. Οι

ανιονανταλλακτικές ιδιότητες της στατικής φάσης επιτυγχάνονται με τον εγκλεισμό ιόντων αμμωνίου (προερχόμενα από την παρουσία άλατος στην κινητή φάση) στις εσωτερικές κοιλότητες των δομών της κυκλοδεξτρίνης [Feurle *et al.*, 1998; Troyer *et al.*, 2001].

Κοινή πρακτική για τη χαρτογράφηση (mapping) των γλυκανών είναι αυτή μέσω της απελευθέρωσης των ενώσεων από τις γλυκοπρωτεΐνες με χημικά ή ενζυμικά μέσα. Οι διαχωρισμοί των ενώσεων αυτών με την τεχνική της HILIC έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας διάφορες στατικές φάσεις αμιδο–πυριτίας [Tomiya *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1996; Kuraya & Hase, 1996; Guile *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 2001; North *et al.*, 1998; Charlwood *et al.*, 2000; ^aCharlwood *et al.*, 2001]. Επίσης, ο συνδυασμός της HILIC με ανιχνευτή MS δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της γλυκοσιλίσωσης πρωτεϊνικών μορίων, σε συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης (site-specific) [Wuhrer *et al.*, 2005].

1.1.6.9 Αμινοξέα και πεπτίδια

Οι διαχωρισμοί πεπτιδίων είναι από τις πρώτες εφαρμογές της HILIC με τη χρήση των πιο κοινών στατικών φάσεων [Alpert, 1990; Zhu *et al.*, 1991; Yoshida, 1997; Oyler *et al.*, 1996]. Οι Mant και Hodges πρώτοι εφάρμοσαν την τεχνική της HILIC σε συνδυασμό με τη χρωματογραφία κατιονανταλλαγής, ως ένα μικτό μηχανισμό εναλλακτικό της RPLC, για το διαχωρισμό πεπτιδίων [Zhu *et al.*, 1992]. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον καθαρισμό συνθετικών αμφίφιλων αμινοξέων [Litowski *et al.*, 1999] και για τον προσδιορισμό της υδροφιλικότητας/υδροφοβικότητας διαφορετικών αμινοξέων ως υποκαταστάτες πεπτιδίων [Hodges *et al.*, 2004]. Ο διαχωρισμός πεπτιδίων σε στατικές φάσεις που φέρουν φορτίο καθιστά την HILIC ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική διότι με τον τρόπο αυτό συνδυάζεται η ύπαρξη τόσο υδρόφιλων όσο και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [^aMant *et al.*, 1998; ^bMant *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1992]. Ο Yoshida συνέβαλε στην κατανόηση της HILIC με την ανάπτυξη μιας σειράς σταθερών σχετικών με τον παράγοντα κατακράτησης 121 πεπτιδίων με βάση την υδροφιλικότητά τους. Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων έλαβε χώρα σε στήλη αμιδο–πυριτίας παρουσία τριφθοροξικού οξέος [^bYoshida, 1998]. Ο Boutin και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τη στατική φάση πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2–υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) τόσο για την προκατεργασία, μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης, όσο και για το διαχωρισμό φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων σε συνθήκες HILIC [Boutin *et al.*, 1992]. Οι διαχωρισμοί πεπτιδίων με την τεχνική της HILIC έχουν αναφερθεί σε σχετικό άρθρο ανασκόπησης από τον Yoshida [Yoshida, 2004].

1.1.6.10 Πρωτεομική

Η υγρή χρωματογραφία δυο διαστάσεων (2-D HPLC) αποτελεί το εργαλείο για το διαχωρισμό εξαιρετικά πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων. Η επιτυχία της χρωματογραφίας δυο διαστάσεων βασίζεται στην "ορθογωνικότητα" (orthogonality) της τεχνικής, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι η εκλεκτικότητα των δυο διαφορετικών στατικών φάσεων (διαστάσεων) θα πρέπει να είναι το αποτέλεσμα της ύπαρξης διαφορετικών μηχανισμών κατακράτησης [Hemström & Irgum, 2006].

Η RPLC αποτελεί αναμφίβολα μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία δυο διαστάσεων λόγω του μεγάλου εύρους εφαρμογών αλλά και της διαχωριστικής της ικανότητας. Η χρήση της χρωματογραφίας ισχυρής κατιονανταλλαγής σε σειρά με την RPLC αποτελεί έναν κοινό συνδυασμό στην πρωτεομική, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε διαχωρισμούς θετικά φορτισμένων πεπτιδίων [Wagner *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004]. Ένα άλλο μειονέκτημα που μπορεί να προκύψει με την εφαρμογή της ισχυρής κατιονανταλλαγής είναι η τάση των πεπτιδίων να δημιουργούν συσσωματώματα (clusters). Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει κυρίως στα πεπτίδια της θρυψίνης (tryptic peptides) τα οποία φέρουν φορτίο +2 ή +3. Σε περιπτώσεις διαχωρισμού ουδέτερων πεπτιδίων η τεχνική της HILIC αποτελεί την καλύτερη δυνατή λύση σε συνδυασμό με την RPLC [Poole, 2003]. Ο Gilar και οι συνεργάτες του ερεύνησαν αρκετούς διαφορετικούς συνδυασμούς χρωματογραφικών τεχνικών, μεταξύ των οποίων ο συνδυασμός της HILIC με την RPLC σε σειρά με ανιχνευτή MS [Gilar *et al.*, 2005]. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η καλύτερη ορθογωνικότητα επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας την τεχνική της HILIC στην πρώτη διάσταση και την RPLC υψηλού pH (high pH RP) στη δεύτερη διάσταση.

1.1.6.11 Πρωτεΐνες

Οι εφαρμογές που αφορούν το διαχωρισμό πρωτεϊνών με την τεχνική της HILIC δεν είναι πολλές δεδομένου ότι τα μόρια αυτά μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά με τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές διαχωρισμού. Επιπλέον, στην RPLC η χρήση σχετικά χαμηλών ποσοστών οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση λειτουργεί ευνοϊκά ως προς τη διαλυτότητα των πεπτιδίων [Mizzen *et al.*, 2000]. Μια από τις εφαρμογές της HILIC στην κατηγορία αυτή είναι η χρήση της στήλης πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) για το διαχωρισμό της ωολευκοματίνης, του κυτοχρώματος c και της αλβουμίνης του ορού του αίματος [Jeno *et al.*, 1993]. Επίσης το πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) έχει

χρησιμοποιηθεί ως υλικό για εκχύλιση στερεάς φάσης σε πρωτεϊνικά δείγματα [Jungbauer *et al.*, 2005].

Οι ιστόνες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών με ισχυρό βασικό χαρακτήρα, όπου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί η τεχνική της HILIC. Ο Linder και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μεθοδολογία βασισμένη στο συνδυασμό της ασθενούς κατιονανταλλαγής και της HILIC για το διαχωρισμό ακετυλιωμένων ιστονών και φωσφορυλιωμένων H1 ιστονών [Lindner *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1997]. Οι διαχωρισμοί αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της μικροετερογένειας [Lindner *et al.*, 1998], της χρονικά εξαρτώμενης απαμίδωσης [Lindner *et al.*, 1999; Sarg *et al.*, 1999; Sarg *et al.*, 2004] και τριμεθυλίωσης [Sarg *et al.*, 2002; Sarg *et al.*, 2004], καθώς και για την παρακολούθηση μεταβολών σε αλληλουχίες πρωτεϊνών [Sarg *et al.*, 2005]. Οι παραπάνω διαχωρισμοί έχουν βασιστεί στη χρήση χρωματογραφικών στηλών από πυριτία, με μεγάλο μέγεθος πόρων, επικαλυμμένες είτε με καρβοξυμεθυλο-ομάδες [Lindner *et al.*, 1996; Sarg *et al.*, 2002; Sarg *et al.*, 2004] ή με πολυ(ασπαρτικό οξύ) [Lindner *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 1999; Sarg *et al.*, 1999; Sarg *et al.*, 2005].

1.1.6.12 Μεταβολομική

Ο πρωταρχικός στόχος των μεταβολομικών αναλύσεων είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του συνόλου των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό σύστημα. Κατά συνέπεια, οι απαιτήσεις για διαχωριστική ικανότητα της εφαρμοζόμενης τεχνικής είναι πολύ υψηλές [Dunn *et al.*, 2005]. Η HILIC έχει αναγνωριστεί ως ένα βασικό εργαλείο για την επίτευξη τέτοιων διαχωρισμών δεδομένου ότι οι μεταβολίτες είναι στις περισσότερες περιπτώσεις πολικά μόρια. Οι Tolstikov και Fiehn χρησιμοποίησαν την τεχνική της HILIC σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS για τη μελέτη ολιγοσακχαριτών και νουκλεοτιδίων με ομάδες σακχάρων σε φυτά. Η καλύτερη χρωματογραφική απόδοση επιτεύχθηκε με τη χρήση της αμιδο-πυριτίας και πυριτίας επικαλυμμένης με πολυ(2-υδροξυαιθυλοασπαρταμίδιο) [Tolstikov *et al.*, 2002]. Η στήλη αμιδο-πυριτίας έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του προφίλ των θειούχων μεταβολιτών κυστεΐνη, ομοκυστεΐνη, μεθειονίνη, κυσταθειονίνη, γ-γλουταμυλοκυστεΐνη, γλουταθειονίνη και S-αδενοσυλομοκυστεΐνη σε ζυμομύκητες [Lafaye *et al.*, 2005].

1.1.7 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

Οι βιταμίνες αντιπροσωπεύουν μια από τις τέσσερις βασικές κατηγορίες θρεπτικών συστατικών που απαντούν στα τρόφιμα. Πρόκειται για οργανικές ενώσεις από τις οποίες τέσσερις (A, D, E, K) είναι λιποδιαλυτές και εννέα είναι υδατοδιαλυτές. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες, αν και απαντούν συνήθως σε μικρά ποσά στα τρόφιμα, είναι ενώσεις με υψηλή βιολογική αξία διότι δρουν ως ρυθμιστές σε διάφορες αντιδράσεις κατά το μεταβολισμό. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη βιολογική τους δράση και όχι με τη χημική τους δομή. Έτσι, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες διακρίνονται στο ασκορβικό οξύ (C) και σε οκτώ βιταμίνες του συμπλέγματος B. Οι κύριες βιταμίνες του συμπλέγματος B είναι η θειαμίνη (B₁), η ριβοφλαβίνη (B₂), η νιασίνη (B₃), το παντοθενικό οξύ (B₅), η πυριδοξίνη (B₆), η βιοτίνη (B₇), το φολικό οξύ (B₉) και η κυανοκοβαλαμίνη (B₁₂). Κάθε μια υποκατηγορία των βιταμινών αυτών περιλαμβάνει επιπλέον μια ή περισσότερες μορφές [Bates, 2005]. Γενικά, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες συμμετέχουν στη μεταφορά ενέργειας και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών. Η λήψη τους από τις τροφές κρίνεται αναγκαία διότι οι ενώσεις αυτές δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό σε σημαντικές ποσότητες.

Η θειαμίνη (ανευρίνη) είναι απαραίτητο συστατικό για τη βιοσύνθεση του συνενζύμου πυροφωσφορική θειαμίνη, το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Επιπλέον, η ένωση αυτή συμβάλλει ουσιαστικά σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι η σωστή λειτουργία του εντερικού, του νευρικού και του καρδιαγγειακού συστήματος. Έλλειψη της βιταμίνης B₁ από την τροφή μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της ασθένειας beri-beri (πολυνευρίτις) η οποία χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις των νεύρων, ατονία και δυσκαμψία των μελών και, στη συνέχεια, μυϊκή ατροφία και καρδιακή ανεπάρκεια. Πηγές της θειαμίνης είναι η μαγιά, τα σιτηρά, το χοιρινό κρέας, οι ξηροί καρποί, το γάλα, τα λαχανικά και τα όσπρια [Belitz *et al.*, 2009].

Η ριβοφλαβίνη δρα στον οργανισμό είτε ως ελεύθερη βιταμίνη είτε ως συνένζυμο και λειτουργεί ως τμήμα των διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που έχουν ως ρόλο την οξειδωση των αμινοξέων και των υδατανθράκων. Έλλειψη της βιταμίνης B₂ προκαλεί κοκκίνισμα και σκάσιμο των χειλιών, φλεγμονή της γλώσσας, οφθαλμικές διαταραχές καθώς και απολεπιστική φλεγμονή του δέρματος. Η ριβοφλαβίνη είναι ευρέως διαδεδομένη σε τρόφιμα όπως το συκώτι, το γάλα, τα αυγά και τα λαχανικά.

Η νιασίνη απαντά σε δυο μορφές που είναι το νικοτινικό οξύ και το νικοτιναμίδιο. Οι δυο αυτές μορφές υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό ως δομικές μονάδες δυο

συνενζύμων, του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD) και του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADP), τα οποία συμμετέχουν σε πολλές αντιδράσεις οξείδωσης απαραίτητες για τη χρησιμοποίηση των υδατανθράκων, του λίπους και των πρωτεϊνών από τα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Η έλλειψη του νικοτινικού οξέος έχει ως συνέπεια την εμφάνιση της ασθένειας "πελλάγρα". Η ασθένεια αυτή εκδηλώνεται με δερματίτιδες και φυσαλίδες στο σώμα, διάρροιες, ναυτίες, εμετούς και, σε βαριές περιπτώσεις, οδηγεί στο θάνατο. Η νιασίνη απαντά σε ζωικά τρόφιμα, όπως το κρέας, το γάλα και τα αυγά, κυρίως ως νικοτιναμίδιο. Σε φυτικά τρόφιμα, όπως τα δημητριακά και τα λαχανικά, απαντά τόσο ως νικοτιναμίδιο όσο και ως νικοτινικό οξύ [Zempleni *et al.*, 2007].

Στην υποομάδα B₆ ανήκουν, εκτός από την πυριδοξίνη (αδερίνη), η πυριδοξαμίνη και η πυριδοξάλη. Και οι τρεις ενώσεις συνδέονται με φωσφόρο στον ανθρώπινο οργανισμό προς σχηματισμό του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη, η οποία είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό των αμινοξέων, της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων. Στα συμπτώματα της έλλειψης της B₆ περιλαμβάνονται η απώλεια βάρους και γενικά οι δυσκολίες στην ανάπτυξη του ανθρώπινου σώματος καθώς και η εμφάνιση αναιμίας. Άλλα συμπτώματα που προκαλεί η έλλειψη της B₆ είναι οι νευρολογικές διαταραχές, η δερματίτιδα και η γαστρεντερίτιδα. Οι καλύτερες πηγές των βιταμινών B₆ είναι το κρέας, το συκώτι, το καλαμπόκι και τα δημητριακά [Belitz *et al.*, 2009].

Το παντοθενικό οξύ απαντά, ίσως, σε όλους του φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Είναι ουσιώδες συστατικό του συνενζύμου A, το οποίο είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, των στεροειδών, των φωσφολιπιδίων, των αμινοξέων και των υδατανθράκων. Καλές πηγές του παντοθενικού οξέος είναι το συκώτι, τα αυγά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Λόγω της παρουσίας της βιταμίνης αυτής σε πολλά τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης, αλλά και του σχηματισμού της από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου δεν έχει σημειωθεί έως τώρα έλλειψη στον ανθρώπινο οργανισμό [Zempleni *et al.*, 2007].

Η βιοτίνη δρα επίσης ως συνένζυμο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, των αμινοξέων και των υδατανθράκων. Παρά το γεγονός ότι είναι μια ένωση ζωτικής σημασίας για τον ανθρώπινο οργανισμό, απαιτείται η λήψη μόνο μικρών ποσοτήτων μέσω των τροφών. Λόγω της σύνθεσης της βιοτίνης από βακτήρια του εντερικού συστήματος, η έλλειψη της βιταμίνης αυτής δεν έχει σημειωθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Εντούτοις, έλλειψη μπορεί να εκδηλωθεί από την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων του λευκού του αυγού, όπου

περιέχεται η αβιντίνη, ανταγωνιστής της βιοτίνης. Πολύ καλές πηγές της βιοτίνης είναι ο κρόκος του αυγού, το συκώτι, το γάλα και οι ντομάτες [Zempleni *et al.*, 2007].

Το φολικό οξύ (πτεροϋλογλουταμικό οξύ) και τα παράγωγά του συνδέονται άμεσα με τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα που υπόκεινται σε ταχεία σύνθεση και καταστροφή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην έλλειψη φολικού οξέος. Για παράδειγμα, η βραδεία σύνθεση των αιμοσφαιρίων, λόγω έλλειψης της βιταμίνης B₉, συντελεί στην εμφάνιση διαφόρων μορφών αναιμίας. Το φολικό οξύ απαντά σε αφθονία στα πράσινα λαχανικά, στα φρούτα, στο αβοκάντο, στα ξηρά φασόλια, στους ηλιόσπορους και στα φύτρα του σιταριού [Griffith, 1988; Zempleni *et al.*, 2007].

Η κυανοκοβαλαμίνη και οι ομόλογες ενώσεις της είναι απαραίτητες για την εκπλήρωση του ρόλου του φολικού οξέος, διότι συμμετέχει εξίσου στη σύνθεση πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η κακοήθης αναιμία και ο εκφυλισμός του νευρικού συστήματος στον άνθρωπο είναι επιπτώσεις που δεν προκαλούνται από την έλλειψη της βιταμίνης B₁₂, αλλά από την έλλειψη μιας ουσίας που ονομάζεται "ενδογενής παράγοντας" η οποία εκκρίνεται στο στομάχι και είναι υπεύθυνη για την αφομοίωση της κυανοκοβαλαμίνης από το έντερο. Η βιταμίνη B₁₂ απαντά σε σημαντικά ποσά στο γάλα και στο κρέας, ενώ καλή πηγή αποτελούν τα οστρακοειδή (μύδια, στρείδια) [Griffith, 1988].

Το ασκορβικό οξύ απαντά σε δυο ισομερείς μορφές, το L(+) (δεξιόστροφο) και το L(-) (αριστερόστροφο) ασκορβικό οξύ. Η υψηλή βιολογική αξία του ασκορβικού οξέος οφείλεται στο δεξιόστροφο ισομερές, ενώ το αριστερόστροφο ισομερές εμφανίζει περίπου το 1/10 της δραστηριότητας. Η βιταμίνη C έχει τεράστια σημασία για τον ανθρώπινο οργανισμό και είναι αναγκαία για διάφορες μεταβολικές λειτουργίες, όπως είναι η σύνθεση του κολλαγόνου, η διατήρηση της σταθερότητας των αιμοφόρων αγγείων και ο μεταβολισμός των αμινοξέων. Επίσης, συμβάλει σημαντικά στη θωράκιση του οργανισμού έναντι μολυσματικών ασθενειών, ενώ δρα και ως αντιοξειδωτικό. Η έλλειψη της βιταμίνης C από τον οργανισμό προκαλεί την ασθένεια "σχορβούτο", η οποία προκαλεί πρήξιμο και μάτωμα στα ούλα, βλάβες στα δόντια, υποδόρια αιματώματα, αιμορραγίες των ιστών και αναιμία. Σπουδαιότερες πηγές βιταμίνης C είναι τα εσπεριδοειδή, οι ντομάτες και τα ωμά λαχανικά [Belitz *et al.*, 2009; Griffith, 1988; Zempleni *et al.*, 2007].

Από άποψη χημικής δομής, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες εμφανίζουν μέτρια έως μεγάλη πολυπλοκότητα. Η πολικότητα των μορίων αυτών ποικίλει λόγω της παρουσίας διαφορετικών, σε αριθμό και είδος, πολικών ομάδων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν το L-ασκορβικό οξύ, η θειαμίνη και το νικοτινικό οξύ. Η πολικότητα του

ασκορβικού, του νικοτινικού και του φολικού οξέος οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία όξινων ομάδων με αποτέλεσμα την εμφάνιση αρνητικού φορτίου, ενώ η θειαμίνη σε διάλυμα φέρει μόνιμο θετικό φορτίο λόγω της παρουσίας στο μόριο του θειαζολικού δακτυλίου. Επίσης, η παρουσία υδροξυλομάδων και ετεροκυκλικών δακτυλίων προσδίδει σημαντική πολικότητα σε υδατοδιαλυτές βιταμίνες, όπως είναι η ριβοφλαβίνη και η πυριδοξίνη.

Ιδιαίτερη αστάθεια σε υδατικά διαλύματα εμφανίζουν το L-ασκορβικό οξύ και η ριβοφλαβίνη. Συγκεκριμένα, L-ασκορβικό οξύ υπόκειται ταχέως σε οξείδωση παρουσία οξυγόνου, μετάλλων, ενζύμων, καθώς και σε υψηλές θερμοκρασίες [Nováková *et al.*, 2008; Golubitskii *et al.*, 2007; Tai & Gohda, 2007]. Το προϊόν της οξείδωσης του L-ασκορβικού οξέος, το δεϋδροασκορβικό οξύ είναι επίσης πολύ ασταθές και υπόκειται περαιτέρω σε αποδόμηση προς σχηματισμό διαφόρων ενώσεων όπως το 2-φουροϊκό οξύ, η 3-υδροξυ-2-πυρόνη, η φουρφουράλη κ.α., ανάλογα με τις συνθήκες της αντίδρασης αποδόμησης [Yuan & Chen, 1998; Kimoto *et al.*, 1993]. Όσον αφορά τη ριβοφλαβίνη, η έκθεση υδατικού διαλύματος σε φως, και ιδιαίτερα στην περιοχή του ορατού (420–560 nm), υπόκειται ταχέως σε οξείδωση προς σχηματισμό της λουμιφλαβίνης [Belitz *et al.*, 2009].

Στο Σχήμα 3.1.3 απεικονίζονται οι δομές και οι σταθερές διάστασης μερικών από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Ο διαφορετικός πολικός χαρακτήρας καθιστά τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες μια ομάδα ενώσεων που θα μπορούσαν να διαχωριστούν και να αναλυθούν με την τεχνική της HILIC. Επιπλέον, η ταυτόχρονη παρουσία ποικίλων πολικών ομάδων σε κάθε μόριο δίνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά τη μελέτη της χρωματογραφικής τους συμπεριφοράς.



1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι διττός και περιλαμβάνει:

1. τη μελέτη του μηχανισμού κατακράτησης στη χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης μέσω της χρωματογραφικής συμπεριφοράς υδατοδιαλυτών βιταμινών,
2. την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υδατοδιαλυτών βιταμινών με HILIC.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικές στατικές φάσεις: η διόλη–πυριτία, η μη επικαλυμμένη πυριτία και η αμινο–πυριτία. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες μέσω των οποίων μελετήθηκε ο μηχανισμός και αναπτύχθηκε ακολούθως η αναλυτική μέθοδος είναι οι ακόλουθες: νικοτιναμίδιο, νικοτινικό οξύ, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη, L–ασκορβικό οξύ και θειαμίνη.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε κάθε στατική φάση ξεχωριστά για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων όσον αφορά τον τρόπο αλληλεπίδρασης του συστήματος αναλύτης/κινητή φάση/στατική φάση. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, μεταβάλλονται κρίσιμες χρωματογραφικές παράμετροι, όπως είναι η ισχύς του διαλύτη έκλουσης, το pH της κινητής φάσης, η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, η φύση του άλατος και των οξέων, η φύση του οργανικού διαλύτη και η θερμοκρασία της στήλης. Επίσης, μελετάται η συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων, που αφορούν τον παράγοντα κατακράτησης, με τρεις εξισώσεις–μοντέλα πρόβλεψης του μηχανισμού.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αναπτύσσεται αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού υδατοδιαλυτών βιταμινών. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα του πρώτου μέρους γίνεται η επιλογή της καταλληλότερης στατικής φάσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης και επικύρωση της μεθόδου.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο μέρος αυτό παρατίθενται αναλυτικά τα αντιδραστήρια, η προετοιμασία των κινητών φάσεων και των διαλυμάτων παρακαταθήκης, τα σκεύη και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Επίσης, περιγράφονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών στατικών φάσεων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η προκατεργασία των δειγμάτων.

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ–ΔΙΑΛΥΤΕΣ–ΥΛΙΚΑ

Τα αντιδραστήρια, οι διαλύτες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι τα ακόλουθα:

2.1.1 Αντιδραστήρια–Διαλύτες

- Νικοτιναμίδιο ($\geq 99,5\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Πυριδοξίνη ($\geq 99,5\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Ριβοφλαβίνη ($\geq 98\%$, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Νικοτινικό οξύ ($\geq 99,5\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Ασκορβικό οξύ L(+)- ($99,7\%$, w/w) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- Θειαμίνη ($\geq 99,0\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Φολικό οξύ (98% , w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Κυανοκοβαλαμίνη ($98,5\%$, w/w) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Διθειοθρεϊτόλη DL- ($\geq 99,0\%$, w/w) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- ο-φωσφορικό οξύ (85% , w/w, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- Οξικό αμμώνιο ($\geq 99,0\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Μυρμηκικό αμμώνιο (97% , w/w) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- Οξικό νάτριο (99% , w/w) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- Χλωριούχο αμμώνιο ($99,5\%$, w/w, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- Οξικό οξύ ($>99,8\%$, w/w, p.a.) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Μυρμηκικό οξύ ($98-100\%$, w/w, p.a.) (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Τριφθοροξικό οξύ ($\geq 98,0\%$, v/v) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)

- Τολουόλιο (99,7%, v/v, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- *m*-ξυλόλιο (99,7%, v/v, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- Βενζόλιο (99,7%, v/v, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- 1,2,4-τριμεθυλοβενζόλιο (99,7%, v/v, p.a.) (Riedel-de-Haen, Seelze, Germany)
- Βενζαμίδιο ($\geq 98\%$ w/w) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Πυριμιδίνη (99%, v/v) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- Πυριδίνη (99,7%, v/v, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ανιλίνη (99%, v/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Βενζυλική αλκοόλη ($\geq 98\%$, v/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Φαινόλη (99%, w/w, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Βενζαλδεΐδη ($\geq 98\%$, v/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Τριαιθυλαμίνη (TEA) ($\geq 99,5\%$, v/v) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Αμμωνία (25%, v/v, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ακετονιτρίλιο (HPLC-grade, 99,9%) (Labscan Ltd., Dublin, Ireland)
- Μεθανόλη (HPLC-grade, 99,9%) (Merck, Darmstadt, Germany)
- 2-προπανόλη (HPLC-grade, 99,8%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Τετραϋδροφουράνιο (HPLC-grade, 99,9%) (Labscan Ltd., Dublin, Ireland)
- Δις απεσταγμένο ύδωρ

2.1.2 Υλικά

- Ήλιο, καθαρότητας 99,999 %, για την απαέρωση της κινητής φάσης της HPLC
- Μικροσύριγγα όγκου 100 μL με επίπεδα κομμένη βελόνα (VICI, LA, USA)
- Φίλτρα νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA)
- Μικροφίλτρα με μεμβράνη κυτταρίνης (0,45 μm) για φιλτράρισμα δείγματος πριν την έγχυση στην HPLC (Spartan[®], Schleicher & MicroScience, Dassel, Germany)

2.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ–ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

2.2.1 Διαλύματα

- Διαλύματα παρακαταθήκης των υδατοδιαλυτών βιταμινών: νικοτιναμίδιο (B_3), πυριδοξίνη (B_6), ριβοφλαβίνη (B_2), νικοτινικό οξύ (B_3), L-ασκορβικό οξύ (C), θειαμίνη (B_1), κυανοκοβαλαμίνη (B_{12}) και φολικό οξύ (B_9) συγκέντρωσης 500 mg/L. Παρασκευάζονται με ζύγιση 5,0 mg στερεής ουσίας και διαλυτοποίηση σε 10 mL μίγματος ACN/ H_2O 50/50 (v/v) εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL. Για την πλήρη διαλυτοποίηση των στερεών ουσιών της ριβοφλαβίνης και του φολικού οξέος, έγινε προσθήκη 40 μ L και 2 μ L αμμωνίας 25% (w/w) υπό ανάδευση, αντίστοιχα.
- Πρότυπο διάλυμα διθειοθρεϊτόλης συγκέντρωσης 400 mg/L. Παρασκευάζεται με ζύγιση 4,0 mg στερεής ουσίας και διαλυτοποίηση σε 10 mL μίγματος ACN/ H_2O 50/50 (v/v) εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL. Για τη μελέτη σταθερότητας του διαλύματος του ασκορβικού οξέος, οι δυο στερεές ουσίες διαλυτοποιούνται εντός κοινής ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL.
- Πρότυπα διαλύματα βενζολίου, τολουολίου, *m*-ξυλολίου και 1,2,4-τριμεθυλοβενζολίου συγκέντρωσης 1000 mg/L. Παρασκευάζονται με ανάμιξη ~12 μ L κάθε ένωσης με ACN σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 10 mL.
- Πρότυπα διαλύματα φαινόλης και βενζαμίδιου συγκέντρωσης 1000 mg/L. Παρασκευάζονται με διαλυτοποίηση 10 mg κάθε ένωσης με ACN σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 10 mL.
- Πρότυπα διαλύματα βενζυλικής αλκοόλης, βενζαλδεϋδης, ανιλίνης, πυριδίνης και πυριμιδίνης συγκέντρωσης 1000 mg/L. Παρασκευάζονται με ανάμιξη 10 μ L κάθε ένωσης με ACN σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 10 mL.
- Διάλυμα *o*-φωσφορικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με αραιώση 0,118 mL πυκνού *o*-φωσφορικού οξέος 85% (w/w) με δις απεσταγμένο ύδωρ σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL.
- Διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 1,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 1,430 mL πυκνού οξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.

- Διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 5,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 7,150 mL πυκνού οξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.
- Διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 1,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 0,943 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.
- Διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 5,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 4,713 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.

2.2.2 Κινητές φάσεις

➤ Οξέα

- Υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH 2,5 περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού τριφθοροξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Οργανικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού τριφθοροξικού οξέος με ACN εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH 3,8 περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού οξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Οργανικό διάλυμα οξικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού οξικού οξέος με ACN εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος pH 2,9 περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού οξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Οργανικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με ACN εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

➤ **Οξικό αμμώνιο / οξικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 6,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,120 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,120 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,200 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=1,200 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0964 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,440 mL) διαλύματος

CH_3COOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0964 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,440 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3854 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,430 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3854 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,430 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 4,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,500 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να

επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=2,500$ mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

➤ **Μυρμηκικό αμμώνιο / μυρμηκικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,140 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε $25-x$ mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=0,140$ mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 4,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,200 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε $25-x$ mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=1,200$ mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 4,0 συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου

υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,620 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,620 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 4,0 συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,400 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,400 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 3,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,600 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε

θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=2,600$ mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 3,0 συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,350 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε 25-x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=1,350$ mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 3,0 συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (4,400 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε 25-x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=4,400$ mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

➤ **Οξικό νάτριο / οξικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,2050 g CH_3COONa σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,000 mL) διαλύματος CH_3COOH

1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,2050 g CH_3COONa σε 50-x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=1,000$ mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

➤ **Χλωριούχο αμμώνιο / υδροχλωρικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HCl}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1337 g NH_4Cl σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,020 mL) διαλύματος HCl 0,1 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HCl}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1337 g NH_4Cl σε 50-x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=0,020$ mL) διαλύματος HCl 0,1 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

➤ **Οξικό αμμώνιο / οξικό οξύ / τριαιθυλαμίνη**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 10 mM pH 5,0. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 0,350 mL TEA. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,900 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN και 0,350 mL TEA. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=2,900 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 20 mM pH 5,0. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 0,700 mL TEA. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,400 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN και 0,700 mL TEA. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=1,400 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 30 mM pH 5,0. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 1,050 mL TEA. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,300 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο–οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 30 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25–x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN και 1,050 mL TEA. Το μίγμα αναδεύεται

και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=2,300$ mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 50 mM pH 5,0. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 1,750 mL TEA. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (3,700 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
 - Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 50 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε 25-x mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN και 1,750 mL TEA. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($x=3,700$ mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- ➔ Τα διαλύματα εργασίας των υδατοδιαλυτών βιταμινών παρασκευάζονται καθημερινά με κατάλληλη αραίωση των διαλυμάτων παρακαταθήκης με κινητή φάση και με κατάλληλη αναλογία ACN/ H_2O , ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες έκλυσης
- ➔ Τα διαλύματα των υδατοδιαλυτών βιταμινών φυλάσσονται στους +4 °C απουσία φωτός.
- ➔ Τα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, πριν τη μεταφορά τους στις φιάλες HPLC όπου τοποθετούνται οι κινητές φάσεις, διηθούνται μέσω της συσκευής διήθησης Millipore εφοδιασμένη με φίλτρο νιτροκυτταρίνης 0,45 μm .

2.3 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.3.1 Φαρμακευτικό σκεύασμα

Ποσότητα υγρού φαρμακευτικού σκευάσματος (βιταμινούχο σιρόπι) ίση προς 0,5000 g ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και αραιώθηκε με δις απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 10 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min προς επίτευξη πλήρους διαλυτοποίησης των συστατικών. Κατόπιν λήφθηκε ποσότητα ίση προς 1,000 mL και αραιώθηκε με κινητή φάση και σε τελικό όγκο 10 mL, σε ογκομετρική φιάλη. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του L-ασκορβικού οξέος η αντίστοιχη ποσότητα δείγματος που ζυγίστηκε ήταν ίση με 0,0500 g και διαλυτοποιήθηκε με δις απεσταγμένο ύδωρ το οποίο περιείχε DTT σε συγκέντρωση 200 mg/L. Η τελική σύσταση του διαλύτη έγχυσης ήταν ACN/H₂O 80/20 (v/v), ενώ εγχύθηκαν 20 μ L δείγματος. Πριν την έγχυση το δείγμα διαβιβάστηκε από φίλτρο μεμβράνης κελουλόζης (cellulose).

2.3.2 Εμπορικό βιταμινούχο αναψυκτικό

Για την ανάλυση του βιταμινούχου αναψυκτικού, λήφθηκε 1,000 mL δείγματος το οποίο αραιώθηκε σε τελικό όγκο 10 mL με κινητή φάση. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του L-ασκορβικού οξέος λήφθηκαν 0,500 mL δείγματος τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 10 mL με κινητή φάση η οποία περιείχε DTT σε συγκέντρωση 200 mg/L. Η τελική σύσταση του διαλύτη έγχυσης και στις δυο περιπτώσεις ήταν ACN/H₂O 80/20 (v/v). Κατόπιν, το δείγμα διαβιβάστηκε από φίλτρο μεμβράνης κελουλόζης (cellulose) και 20 μ L αυτού λήφθηκαν και αναλύθηκαν υγροχρωματογραφικά.

2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

2.4.1 Στήλη διόλης-πυριτίας

Η χρωματογραφική στήλη διόλης-πυριτίας (HILIC-Diol column) φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία (SiO₂), η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με διυδροξυπροπυλο- ομάδες (dihydroxy-propyl). Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μ m. Συνολικά η στήλη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη και χημικά σταθερή σε

εύρος pH από 2,5 έως 7,0. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.1.

2.4.2 Στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας

Η χρωματογραφική στήλη από μη επικαλυμμένη πυριτία (unbonded silica) φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία (SiO_2) η επιφάνεια της οποίας δεν έχει επικαλυφθεί από άλλο υλικό–υποκαταστάτη. Το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της στήλης είναι καλυμμένο με απλές ομάδες σιλανόλης. Η κάθε ομάδα σιλανόλης αποτελείται από ένα άτομο πυριτίου το οποίο συνδέεται με το κυρίως μέρος του χρωματογραφικού υλικού μέσω τριών ατόμων οξυγόνου, ενώ στον τέταρτο δεσμό βρίσκεται μια υδροξυλομάδα. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μm . Η στήλη είναι χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0, ενώ σε $\text{pH} > 4,0$ φέρει πλήρες αρνητικό φορτίο [Nawrocki, 1997]. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.1.

2.4.3 Στήλη αμινο–πυριτίας

Η χρωματογραφική στήλη αμινο–πυριτίας φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία (SiO_2) η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με αμινοπροπυλο– ομάδες (aminopropyl). Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μm . Η στήλη είναι χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0, ενώ στο εύρος αυτό του pH φέρει πλήρες θετικό φορτίο ($\text{pK}_a \approx 10,9$). Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.1.

Πίνακας 2.4.1: Λεπτομερή χαρακτηριστικά των χρωματογραφικών στηλών (GL Sciences).

Χαρακτηριστικό	Διόλη–πυριτία	Πυριτία	Αμινο–πυριτία
Μέγεθος σωματιδίων	5 μm	5 μm	5 μm
Σχήμα σωματιδίων	σφαιρικό	σφαιρικό	σφαιρικό
Εμβαδόν επιφάνειας	450 m^2/g	450 m^2/g	450 m^2/g
Μέγεθος πόρων	100 Å	100 Å	100 Å
Όγκος πόρων	1,05 mL/g	1,05 mL/g	1,05 mL/g
Καθαρότητα πυριτίας	99,999%	99,999%	99,999%

Πίνακας 2.4.1: Συνέχεια.

Χαρακτηριστικό	Διόλη–πυριτία	Πυριτία	Αμινο–πυριτία
Προσδεδεμένη φάση	διωδροξυπροπυλο–	όχι	αμινοπροπυλο–
Ακροκάλυψη (end–capping)	ναι	όχι	όχι
Ποσοστό άνθρακα	20%	0%	8%
Εύρος pH χρήσης	2,0–7,5	2,0–7,5	2,0–7,5

2.5 ΟΡΓΑΝΑ–ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα περιλαμβάνει αντλία LC–20ADvp (UFLC) με ενσωματωμένο μίκτη διαλυτών χαμηλής πίεσης, βρόχο δείγματος όγκου 20 μL και χειροκίνητο Rheodyne σύστημα εισαγωγής δείγματος (7725i, Coati, CA, USA) και σύστημα θερμοστάτησης (oven) CTO–10ASvp. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιείται η συσκευή DGU–2A (Degasser) με παροχή αζώτου από οβίδα. Για την ανίχνευση των υδατοδιαλυτών βιταμινών, χρησιμοποιείται ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD) SPD–M20A. Τα δεδομένα συλλέγονται και επεξεργάζονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solution, version 1.21. Όλες οι μονάδες της υγρής χρωματογραφίας και το πρόγραμμα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων είναι της Shimadzu (Tokyo, Japan).
- Πεχάμετρο. Αποτελείται από ηλεκτρόδιο υάλου Ag–AgCl (Hamilton, Bonaduz AG, Switzerland), εφοδιασμένο με ηλεκτρονική συσκευή μέτρησης του pH (pH PHM83 AUTOCAL pH METER) (Radiometer, Copenhagen, Denmark).
- Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd., UK).
- Συσκευή διήθησης όγκου 1L (Millipore Corporation, Billerica, USA).
- Υδραντλία δημιουργίας κενού (Büchi B–169, Switzerland).
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου (Shimadzu, Tokyo, Japan).
- Λουτρό υπερήχων (TRANSSONIC 420, Elma, Germany).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν μέρος μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών: νικοτιναμίδιο, νικοτινικό οξύ, πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη και L-ασκορβικό οξύ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι στατικές φάσεις διόλης–πυριτίας, μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο–πυριτίας. Οι χρωματογραφικές παράμετροι που εξετάζονται για κάθε στατική φάση ξεχωριστά είναι οι ακόλουθες:

- Η ισχύς του διαλύτη έκλουσης μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN από 50–90% (v/v)
- Το pH της κινητής φάσης στο εύρος τιμών 3,0–6,0
- Η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στο εύρος 5–20 mM
- Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος (χρήση διαφορετικών αλάτων και οξέων)
- Η φύση διαφορετικών οργανικών διαλυτών (ACN, MeOH, IPA, THF)
- Η θερμοκρασία της στήλης σε εύρος τιμών 15–45 °C

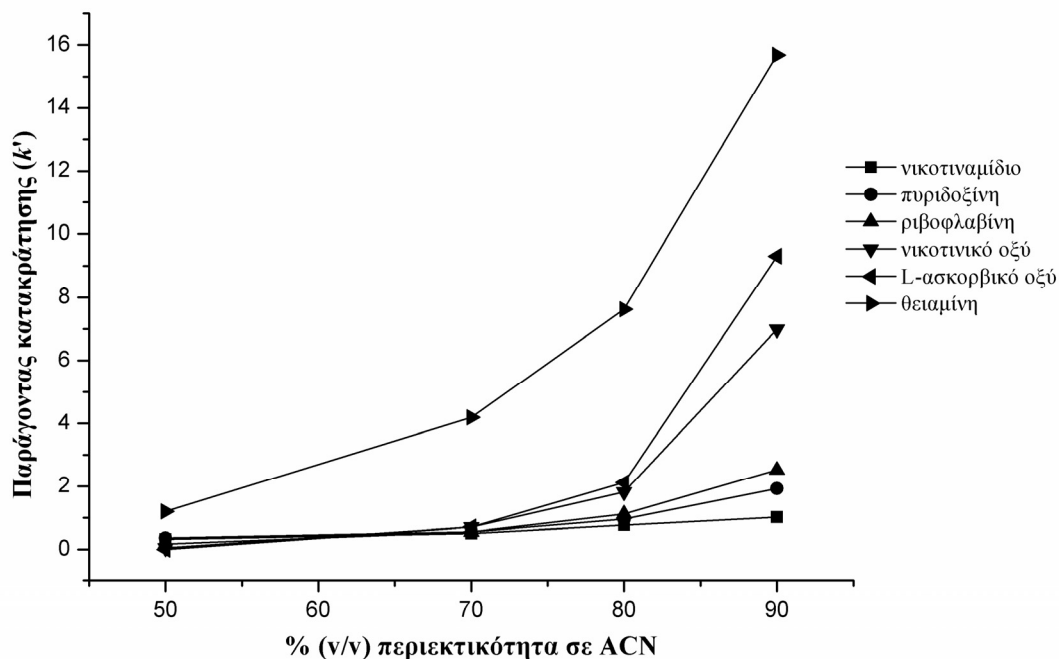
Στόχος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των ανωτέρω χρωματογραφικών συνθηκών στο χρόνο κατακράτησης ουδέτερων και φορτισμένων ενώσεων (βιταμινών) και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το είδος και την ισχύ των αλληλεπιδράσεων που απαρτίζουν το μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC.

3.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΔΙΟΛΗΣ-ΠΥΡΙΤΙΑΣ

3.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση από 50 έως 90% (v/v) και χρωματογράφηση ισοκρατικά με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 5,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση.

Στο Σχήμα 3.1.1 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στις τιμές του k' των υδατοδιαλυτών βιταμινών, ενώ στον Πίνακα 3.1.1 παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές του παράγοντα συμμετρίας (παράγοντας εμφάνισης "ουράς", T_f) της κάθε κορυφής. Σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 50/50 έως και 70/30 (v/v), η πλειονότητα των ενώσεων εμφανίζει μικρή κατακράτηση ($0,00 < k' < 0,71$) από τη στήλη. Εξαιρέση αποτελεί η θειαμίνη η οποία εμφανίζει σχετικά υψηλή κατακράτηση ($k'=1,20$) δεδομένης της μεγάλης ισχύος του διαλύτη έκλουσης. Σε ποσοστό ACN μεγαλύτερο από 70% (v/v) γίνεται εμφανής η αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων ($0,77 < k' < 15,68$), η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση και ανάλογη της πολικότητας των ενώσεων [Alpert, 1990; Li & Huang, 2004; Guo & Huang, 2003; Guo, 2005; Vikingsson *et al.*, 2008]. Από το Σχήμα 3.1.1 παρατηρείται ότι η σημαντική διαφοροποίηση στην κατακράτηση των ενώσεων λαμβάνει χώρα στο εύρος περιεκτικότητας 70–90% σε ACN. Συγκεκριμένα, η τιμή του k' για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη αυξάνεται κατά 0,52, 1,38 και 1,97 μονάδες αντίστοιχα. Η αύξηση της κατακράτησης είναι κατά πολύ μεγαλύτερη στο νικοτινικό οξύ, στο L-ασκορβικό οξύ και στη θειαμίνη με τις τιμές του k' να αυξάνονται κατά 6,28, 8,60 και 11,49 μονάδες αντίστοιχα.



Σχήμα 3.1.1: Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης A: [H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM, pH 5,0]

Διαλύτης B: [90% ACN / 10% H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 25 °C; Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

Ανιχνευτής: DAD, σε μήκη κύματος 254 και 272 nm.

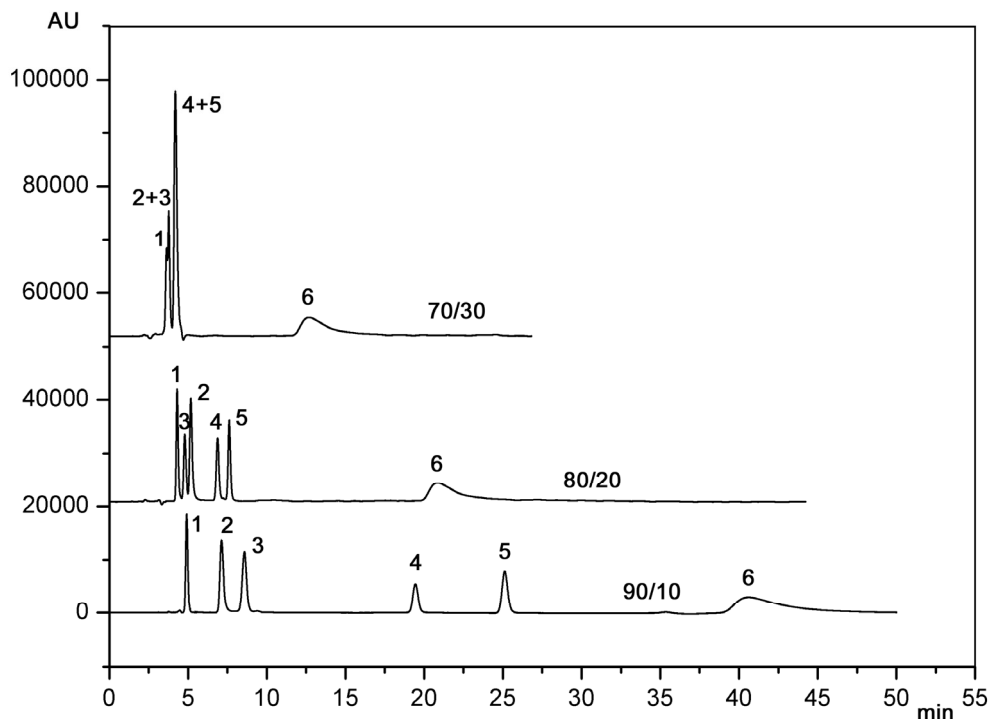
Το ποσοστό του οργανικού διαλύτη (ACN), αποτελεί ίσως την παράμετρο με την μεγαλύτερη επίδραση στο χρόνο κατακράτησης [Guo & Gaiki, 2005]. Σε υψηλά ποσοστά ύδατος στην κινητή φάση (>30%), η διαφορά πολικότητας μεταξύ του διαλύτη έκλουσης και της στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στήλης ελαττώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα μια πολική ένωση να εμφανίζει μικρό χρόνο κατακράτησης. Καθώς το ποσοστό του οργανικού διαλύτη αυξάνεται (>70%) η μεγάλη διαφορά στην πολικότητα μεταξύ της ενυδατωμένης επιφάνειας της στήλης και του διαλύτη έκλουσης επιτρέπει την κατανομή της ένωσης στην υδατική στιβάδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης [McCalley & Neue, 2008].

Πίνακας 3.1.1: Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 50/50	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο	1,3	1,2	1,3	1,3
πυριδοξίνη	1,4	1,3	1,2	1,3
ριβοφλαβίνη	1,3	1,2	1,1	1,1
νικοτινικό οξύ	1,3	1,2	1,1	1,1
L-ασκορβικό οξύ	1,3	1,2	1,2	1,1
θειαμίνη	1,9	2,0	2,1	2,3

Η ασυμμετρία μιας κορυφής και πιο συγκεκριμένα η εμφάνιση "ουράς" (tailing) ή "μετώπου" (fronting) αποτελεί μια σημαντική παράμετρο καθότι επηρεάζει αρνητικά τόσο την επαναληψιμότητα του χρόνου έκλουσης μιας κορυφής όσο και το διαχωρισμό ενός ζεύγους ενώσεων [Skoog *et al.*, 2002]. Ο παράγοντας T_f για τις κορυφές του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης, της ριβοφλαβίνης, του νικοτινικού οξέος και του L-ασκορβικού οξέος κυμαίνονται από 1,1 έως 1,4 έχοντας ικανοποιητική συμμετρία. Αντίθετα, η κορυφή της θειαμίνης εμφανίζει ουρά σε μεγάλο βαθμό με τον παράγοντα T_f να έχει τιμές από 1,9 έως 2,3. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του θετικά φορτισμένου μορίου της θειαμίνης και των αρνητικά φορτισμένων ομάδων σιλανόλης του υλικού πλήρωσης της στήλης. Οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης, γνωστές και ως υπολειμματικές σιλανομάδες (residual silanols), λόγω της αυξημένης οξύτητας που έχουν, φέρουν αρνητικό φορτίο σε pH 5,0 [Kazakevich & LoBrutto, 2007].

Στο Σχήμα 3.1.2 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε αναλογίες ACN/H₂O 70/30, 80/20 και 90/10 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας (R_s) της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.2.



Σχήμα 3.1.2: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Σε ποσοστό ACN 70% (v/v), το νικοτιναμίδιο, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ, η ριβοφλαβίνη και η πυριδοξίνη εμφανίζουν σχεδόν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να είναι ανέφικτος. Αυξάνοντας το ACN σε ποσοστό 80% (v/v) επέρχεται αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων, οι οποίες αρχίζουν πλέον να διαχωρίζονται. Εντούτοις, το ζεύγος ενώσεων πυριδοξίνη/ριβοφλαβίνη εμφανίζει ατελή διαχωρισμό έχοντας R_s μικρότερο από την τιμή 1,50 (Πίνακας 3.1.2). Σε ποσοστό ACN 90% (v/v) επέρχεται περαιτέρω αύξηση των χρόνων κατακράτησης με αποτέλεσμα τον πλήρη διαχωρισμό των συστατικών με τις τιμές διαχωριστικής ικανότητας να κυμαίνονται από 2,82 έως 15,1.

Πίνακας 3.1.2: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.2).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)		
	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	συνέκλωση	1,72 ¹⁻³	4,18
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	συνέκλωση	1,19 ³⁻²	2,82
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	συνέκλωση	5,01 ²⁻⁴	15,1
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	συνέκλωση	2,21	6,67
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	5,37	4,81	5,14

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

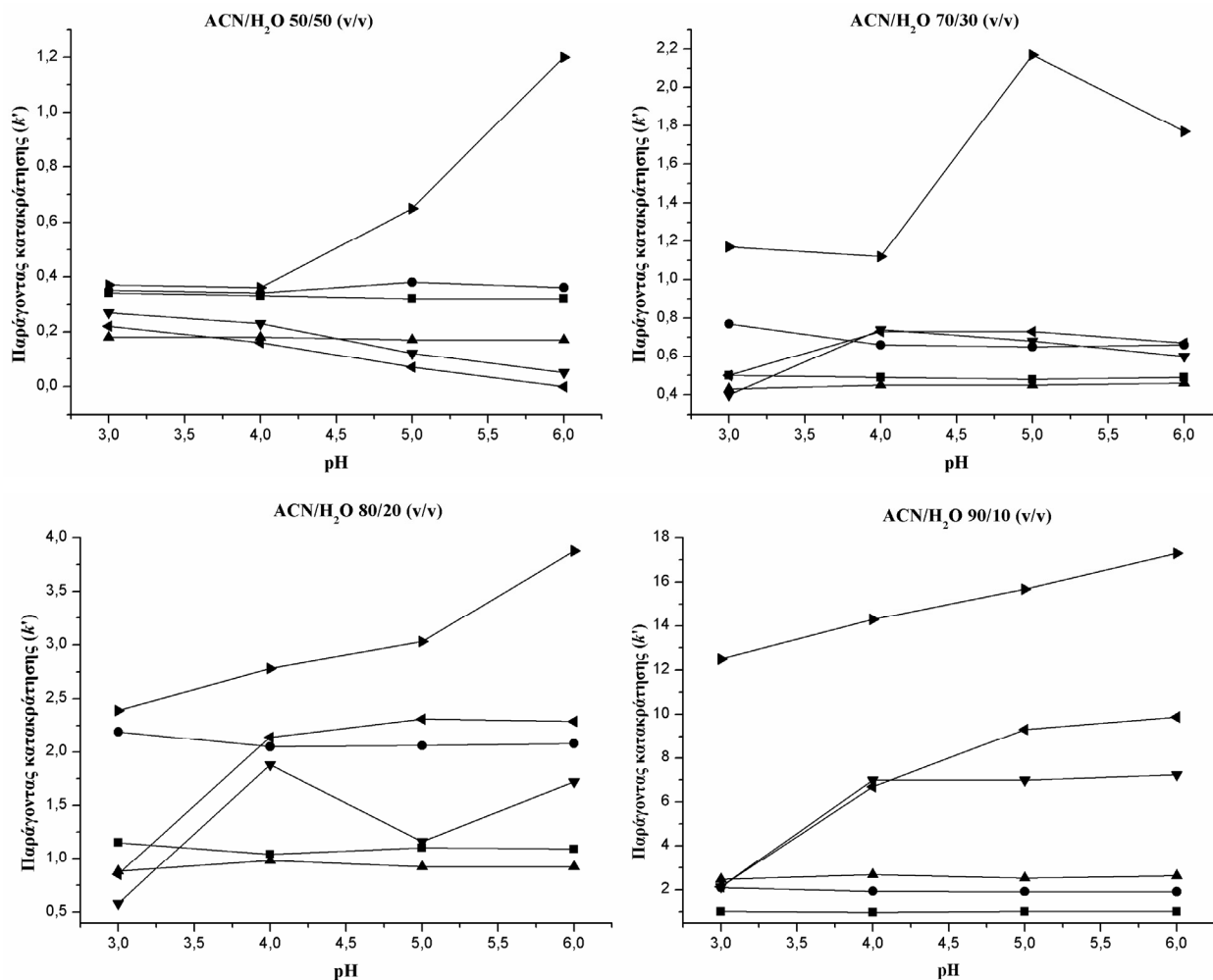
3.1.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Όπως έχει αναφερθεί και στη θεωρία (§ 1.1.4.3), το pH της υδατικής κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά την ανάμιξη με οργανικό διαλύτη. Συγκεκριμένα, η αύξηση του pH της υδατικής κινητής φάσης που προκύπτει κατά την ανάμιξη με ACN σε ποσοστό 10% (v/v) αντιστοιχεί σε 0,2–0,3 μονάδες περίπου. Αντίστοιχες μεταβολές λαμβάνουν χώρα και στις σταθερές διάστασης οργανικών ενώσεων που ιονίζονται. Με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση κατά 10% (v/v), η σταθερά διάστασης (pK_a) ενός ασθενούς οξέος αυξάνεται (~0,2–0,3 μονάδες) ενώ η αντίστοιχη μιας ασθενούς βάσης ελαττώνεται (~0,1–0,2 μονάδες) [Kazakevich & LoBrutto, 2007; Gagliardi *et al.*, 2007]. Δεδομένης της σχεδόν ανάλογης μεταβολής τόσο του pH της κινητής φάσης όσο και των σταθερών διάστασης των ενώσεων, η μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει του pH της κινητής φάσης, στηρίζεται στις σταθερές διάστασης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε υδατικά διαλύματα.

Για τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε σχέση με το pH της κινητής φάσης, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος για την περιοχή pH 4,0–6,0. Για τη ρύθμιση του pH της κινητής φάσης στην τιμή 3,0, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος, διότι η τιμή αυτή βρίσκεται εκτός της περιοχής της ρυθμιστικής ικανότητας του πρώτου ρυθμιστικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των αλάτων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 10 mM.

Στο Σχήμα 3.1.3 φαίνεται η επίδραση του pH της κινητής φάσης στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση. Οι παράγοντες κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης παραμένουν πρακτικά ανεπηρέαστοι στο εξεταζόμενο εύρος pH. Σημαντικό ρόλο στην αύξηση του χρόνου κατακράτησης διαδραματίζει η ισχύς του διαλύτη έκλουσης και, όπως είναι αναμενόμενο, οι χρόνοι κατακράτησης των ενώσεων αυτών είναι μεγαλύτεροι σε ποσοστό ACN 90% (v/v). Η ριβοφλαβίνη έχει δύο σταθερές διάστασης που αντιστοιχούν α) στην αμιδο- ομάδα ($pK_{a1} \approx 10,2$), η οποία εμφανίζει όξινες ιδιότητες (αποπρωτονίωση) και β) στο άζωτο του πυριμιδινικού δακτυλίου ($pK_{a2} \approx 1,9$), με αποτέλεσμα να μη φέρει φορτίο στο εξεταζόμενο εύρος pH. Το νικοτιναμίδιο έχει δύο σταθερές διάστασης: την $pK_{a1} \approx 3,3$, που αντιστοιχεί στο άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου και την $pK_{a2} \approx 9,2$, που αντιστοιχεί στην αμιδο- ομάδα του μορίου με όξινες ιδιότητες. Η πυριδοξίνη έχει επίσης δυο σταθερές διάστασης με τιμές $pK_{a1} \approx 5,0$ και $pK_{a2} \approx 8,9$, οι οποίες αφορούν το άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου και το υδροξύλιο φαινολικού τύπου αντίστοιχα. Παρόλο που η πυριδοξίνη και σε μικρότερο βαθμό το νικοτιναμίδιο φέρουν μερικό θετικό φορτίο σε pH χαμηλότερο του 4,0, οι χρόνοι κατακράτησής τους δεν μεταβάλλονται στο εύρος pH 3,0–4,0. Η απουσία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ελκτικής φύσης μεταξύ των δυο ενώσεων και της στήλης, οφείλεται κατά κύριο λόγο στο μικρό βαθμό διάστασης των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης της στήλης ($pK_a \approx 4,0$) σε όξινο περιβάλλον.

Σε ποσοστό ACN 90% (v/v), ο χρόνος κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος αυξάνεται ραγδαία με την αύξηση του pH της κινητής φάσης από 3,0 σε 5,0. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και για το νικοτινικό οξύ με την αύξηση του pH από 3,0 σε 4,0. Το L-ασκορβικό οξύ έχει δυο σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 4,0$ και $pK_{a2} \approx 11,7$. Το νικοτινικό οξύ έχει επίσης δυο σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 2,2$ και $pK_{a2} \approx 4,7$ οι οποίες αφορούν την καρβοξυλομάδα και το άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου αντίστοιχα (Σχήμα 1.1.17). Με την αύξηση του pH της κινητής φάσης από 3,0 σε 4,0, το νικοτινικό οξύ αποπρωτονιώνεται πλήρως ενώ το L-ασκορβικό οξύ φέρει μερικό αρνητικό φορτίο. Η πολικότητα που προσδίδει η ύπαρξη φορτίου στα δύο αυτά οξέα σε σχέση με τις ουδέτερες βιταμίνες, στο εύρος pH της μελέτης, έχει ως αποτέλεσμα να κατανέμονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην υδατική στιβάδα, που βρίσκεται στην επιφάνεια της στατικής φάσης, και να αυξάνεται σημαντικά η κατακράτησή τους.



Σχήμα 3.1.3: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.

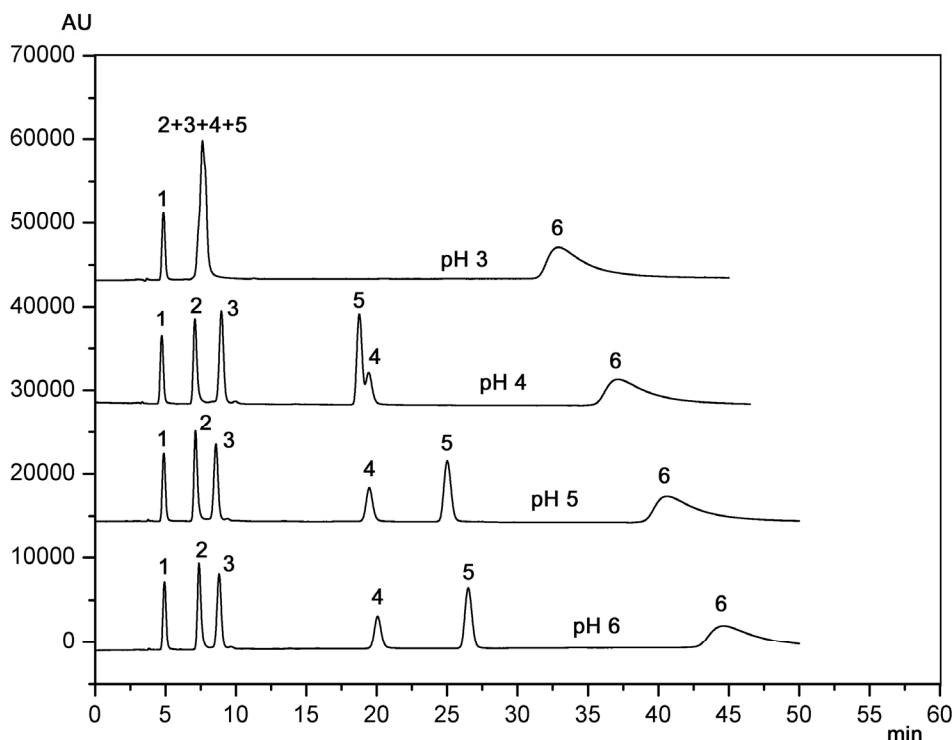
Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◄) L-ασκορβικό οξύ, (►) θειαμίνη.

Η επιπλέον αύξηση του χρόνου κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος μεταβαίνοντας από pH 4,0 σε 5,0 οφείλεται στην εμφάνιση πλήρους αρνητικού φορτίου στο μόριο. Τέλος, μεταβάλλοντας το pH της κινητής φάσης από 5,0 σε 6,0 επέρχεται μικρή αύξηση της κατακράτησης του L-ασκορβικού και του νικοτινικού οξέος. Ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τις υπόλοιπες βιταμίνες στο εύρος pH από 3,0 έως 6,0. Το μόριο της θειαμίνης έχει μια σταθερά διάστασης, $pK_a \approx 4,8$, που αντιστοιχεί στο άζωτο του πυριμιδινικού δακτυλίου. Σε αντίθεση όμως με τις υπόλοιπες ενώσεις, η θειαμίνη φέρει μόνιμο θετικό φορτίο στο άζωτο του θειαζολικού δακτυλίου,

γεγονός που την καθιστά εξαιρετικά πολική. Η αύξηση της κατακράτησης της ένωσης με την αύξηση του pH της κινητής φάσης οφείλεται στην πιο αποτελεσματική αποπρωτονίωση των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης της στήλης και επομένως στη μεγαλύτερη πυκνότητα αρνητικά φορτισμένων θέσεων στη στήλη για την πραγματοποίηση ηλεκτροστατικής έλξης [Li & Huang, 2004; Nawrocki, 1997; Pack & Risley, 2005].

Σε ποσοστό ACN 50–70% (v/v), παρατηρούνται μικρές μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης του νικοτινικού και του L–ασκορβικού οξέος ($0,00 < k' < 0,74$), γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο λόγω της μεγάλης ισχύος του διαλύτη έκλουσης. Αύξηση της κατακράτησης σημειώνεται για τη θειαμίνη στην περιοχή pH 4,0–6,0, λόγω της ύπαρξης ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης από τα αρνητικά φορτισμένα κέντρα της στήλης, ακόμα και σε υψηλά ποσοστά ύδατος στην κινητή φάση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε τιμές pH > 4,0 και σε ποσοστό ACN 70–80% (v/v) το νικοτινικό και L–ασκορβικό οξύ, αν και είναι αρνητικά φορτισμένα και επομένως περισσότερο πολικά, εμφανίζουν χρόνους κατακράτησης ίδιους ή ακόμα και μικρότερους από τους αντίστοιχους χρόνους ουδέτερων βιταμινών όπως η πυριδοξίνη και η ριβοφλαβίνη. Η ύπαρξη αρνητικού φορτίου στα δυο οξέα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ηλεκτροστατικής άπωσης από τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες σιλανόλης, φαινόμενο το οποίο εξασθενεί σε υψηλά ποσοστά οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση [Li & Huang, 2004].

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1.4, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης δίνονται στον Πίνακα 3.1.3. Σε pH 3,0 το νικοτινικό και το L–ασκορβικό οξύ εμφανίζουν την ίδια κατακράτηση με την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη με αποτέλεσμα τη συνέκλουση των ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το L–ασκορβικό οξύ βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή με αποτέλεσμα να παρουσιάζει την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη. Το νικοτινικό οξύ, παρόλο που φέρει θετικό φορτίο στο άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου, δεν διαφοροποιείται ως προς το χρόνο κατακράτησης σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις και εκλύεται στον ίδιο χρόνο. Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί στο ότι το φορτίο του δακτυλίου δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην πολικότητα του μορίου και κατ' επέκταση στο βαθμό κατανομής της ένωσης στην υδατική στιβάδα στην επιφάνεια της στήλης. Αντιθέτως, η θειαμίνη εμφανίζει ισχυρή κατακράτηση λόγω του μόνιμου θετικού αλλά και εντοπισμένου φορτίου του μορίου καθιστώντας το εξαιρετικά πολικό.



Σχήμα 3.1.4: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v).

Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Σε pH 4,0, η κατακράτηση του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος διαφοροποιείται σημαντικά σε σχέση με την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη λόγω της εμφάνισης φορτίου (σε διαφορετικό βαθμό) και της αύξησης της πολικότητας των μορίων. Στην τιμή αυτή του pH, η καρβοξυλομάδα του νικοτινικού οξέος είναι πλήρως αποπρωτονιωμένη και φέρει ταυτόχρονα θετικό φορτίο στον πυριδινικό δακτύλιο (αμφολυτικό ιόν), ενώ το L-ασκορβικό οξύ είναι αρνητικά φορτισμένο σε μικρότερο βαθμό ($\text{pH} \approx \text{pK}_a$). Ο διαχωρισμός όμως των δυο αυτών ενώσεων στις συνθήκες αυτές είναι ατελής ($R_s=0,78$).

Πίνακας 3.1.3: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του pH της κινητής φάσης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.4).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	–	5,28	4,18	4,54
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	συνέκλωση	3,58	2,82	2,71
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	συνέκλωση	15,2	15,1	15,3
νικοτινικό οξύ ⁴ / L–ασκορβικό οξύ ⁵	συνέκλωση	0,78	6,67	6,93
L–ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	–	2,37	5,14	5,98

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $Rs \approx 1,50$

Σε pH 5,0, επέρχεται πλήρης διαχωρισμός του συνόλου των ενώσεων στο μίγμα (Πίνακας 3.1.3), με την ταυτόχρονη αντιστροφή στην εκλεκτικότητα του L–ασκορβικού και του νικοτινικού οξέος. Σε αυτήν την τιμή του pH, το L–ασκορβικό οξύ βρίσκεται πλήρως φορτισμένο ενώ το θετικό φορτίο του πυριδινικού δακτυλίου στο μόριο του νικοτινικού οξέος έχει ελαττωθεί σημαντικά. Η διαφοροποίηση του φορτίου καθώς επίσης και η παρουσία στο μόριο του L–ασκορβικού οξέος τριών υδροξυλομάδων ικανών να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τη στατική φάση φαίνεται να εξηγεί ικανοποιητικά την αλλαγή στην εκλεκτικότητα μεταξύ των δυο αυτών ενώσεων. Όσον αφορά τις ουδέτερες, στο εξεταζόμενο pH, ενώσεις η σειρά έκλουσης είναι η εξής: $t_R^{\text{νικοτιναμίδιο}} < t_R^{\text{πυριδοξίνη}} < t_R^{\text{ριβοφλαβίνη}}$. Όπως έχει προαναφερθεί, οι δεσμοί υδρογόνου αποτελούν σημαντικό μέρος των υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων και συμβάλλουν σημαντικά στο μηχανισμό κατακράτησης πολικών ενώσεων που δεν φέρουν φορτίο. Από τη χημική δομή των ενώσεων αυτών (Σχήμα 1.1.17) η ριβοφλαβίνη φέρει μεγαλύτερο αριθμό ομάδων (υδροξυλομάδες, ετεροκυκλικοί δακτύλιοι) ικανών να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου [Maréchal, 2007] με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να κατακρατείται περισσότερο.

Τέλος, με την αύξηση του pH της κινητής φάσης από 5,0 σε 6,0, λαμβάνει χώρα μικρή αύξηση των χρόνων κατακράτησης του νικοτινικού οξέος, του L–ασκορβικού οξέος και της θειαμίνης με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή αύξηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας, ενώ η κατακράτηση του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης παραμένει αμετάβλητη.

Πίνακας 3.1.4: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο	1,1	1,2	1,3	1,3
πυριδοξίνη	1,5	1,3	1,4	1,3
ριβοφλαβίνη	1,1	1,1	1,1	1,2
νικοτινικό οξύ	1,3	1,1	1,1	1,2
L-ασκορβικό οξύ	1,2	1,2	1,1	1,2
θειαμίνη	1,9	2,1	2,3	2,4

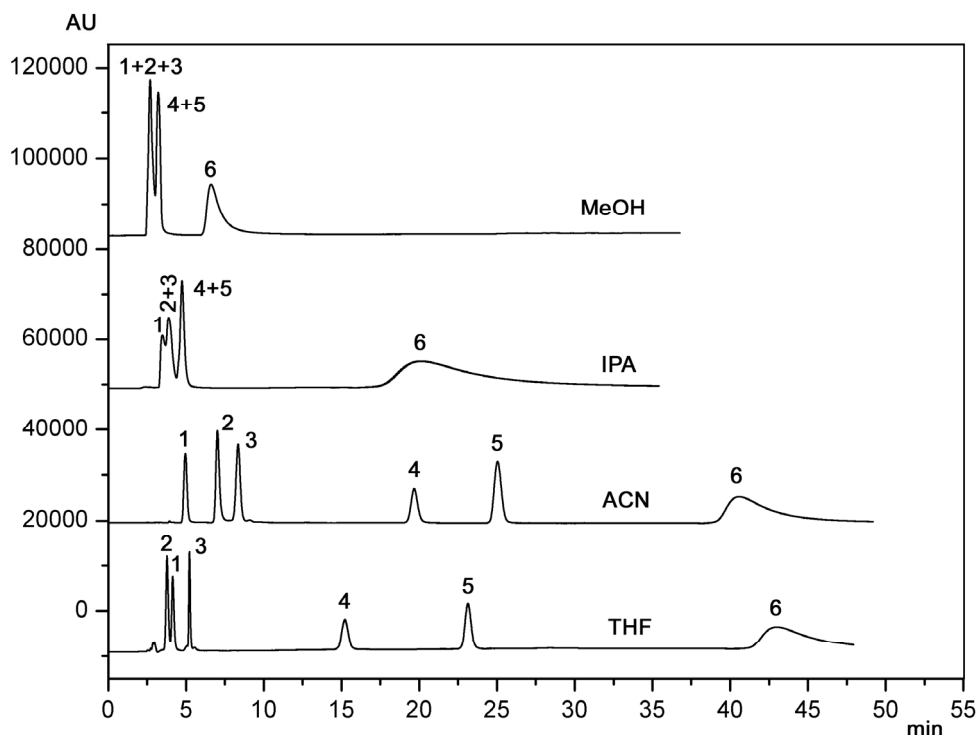
Η συμμετρία των κορυφών είναι πολύ καλή για τις περισσότερες ενώσεις στο εξεταζόμενο εύρος pH (Πίνακας 3.1.4). Οι αντίστοιχες τιμές T_f για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη, τη ριβοφλαβίνη, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ κυμαίνονται από 1,1 έως 1,3. Με την ελάττωση του pH της κινητής φάσης επέρχεται ταυτόχρονη ελάττωση του παράγοντα T_f στην κορυφή της θειαμίνης από την τιμή 2,3 σε 1,9. Καθώς το pH της κινητής φάσης λαμβάνει όξινες τιμές, όλο και μεγαλύτερος αριθμός ελεύθερων σιλανομάδων βρίσκονται στην πρωτονιωμένη τους μορφή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ελκτικών δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσης μεταξύ του μορίου της θειαμίνης και της στατικής φάσης με την ταυτόχρονη βελτίωση της συμμετρίας της κορυφής.

3.1.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών ως προς την κατακράτηση και το διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το ACN, η MeOH, η IPA και το THF. Κάθε οργανικός διαλύτης συνδυάστηκε ξεχωριστά με το υδατικό τμήμα της κινητής φάσης, παρουσία οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM και σε pH 5,0. Η έκλουση των υδατοδιαλυτών βιταμινών έλαβε χώρα σε αναλογία οργανικού/υδατικού διαλύτη 90/10 (v/v). Αυτή η αναλογία είναι η βέλτιστη για το διαχωρισμό του μίγματος στην περίπτωση της χρήσης του ACN.

Στο Σχήμα 3.1.5 παρατίθενται συγκριτικά χρωματογραφήματα της επίδρασης των διαφορετικών οργανικών διαλυτών στο διαχωρισμό. Στις περιπτώσεις αντικατάστασης του ACN με MeOH και IPA, ο διαχωρισμός του μίγματος των ενώσεων είναι ανεπιτυχής. Συγκεκριμένα, το νικοτιναμίδιο, η πυριδοξίνη, η ριβοφλαβίνη, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ εμφανίζουν μικρή κατακράτηση με αποτέλεσμα τη συνέκλυσή τους. Ικανοποιητικό χρόνο κατακράτησης εμφανίζει η θειαμίνη στην περίπτωση της MeOH και ακόμη μεγαλύτερο χρόνο στην IPA. Το THF εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς την κατακράτηση και το διαχωρισμό του μίγματος σε σύγκριση με το ACN χωρίς όμως να λαμβάνει χώρα πλήρης διαχωρισμός. Οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτιναμιδίου, της πυριδοξίνης, της ριβοφλαβίνης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος ελαττώνονται, ενώ ο διαχωρισμός του ζεύγους νικοτιναμίδιο/πυριδοξίνη είναι ατελής ($R_s=1,22$) με ταυτόχρονη αντιστροφή της εκλεκτικότητας.

Η εκλουστική ισχύς των υπό μελέτη διαλυτών στην κατακράτηση των βιταμινών έχει την εξής σειρά: $ACN < THF < IPA < MeOH$, η οποία δεν βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τις τιμές εκλουστικής ισχύος (ϵ^0) των παραπάνω διαλυτών αναφορικά με το οξείδιο του πυριτίου (silica) ως υλικό προσρόφησης ($THF < ACN < IPA < MeOH$) [Meyer, 2004]. Από την άλλη μεριά, δεχόμενοι ότι ο κύριος μηχανισμός στην HILIC είναι η κατανομή, η παραπάνω σειρά κατάταξης δεν βρίσκεται σε συμφωνία με τη σειρά κατάταξης των διαλυτών αυτών με βάση την πολικότητά τους η οποία είναι: $IPA < THF < MeOH < ACN$ (σειρά αυξανόμενης πολικότητας). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η χρωματογραφική συμπεριφορά των υπό μελέτη ενώσεων δεν μπορεί να προβλεφτεί ή να εξηγηθεί ικανοποιητικά χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την εκλουστική ισχύ ή την πολικότητα των διαλυτών, διότι οι τιμές των κριτηρίων αυτών εξαρτώνται τόσο από το υλικό πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης όσο και από τη δομή των ενώσεων [Li & Huang, 2004].



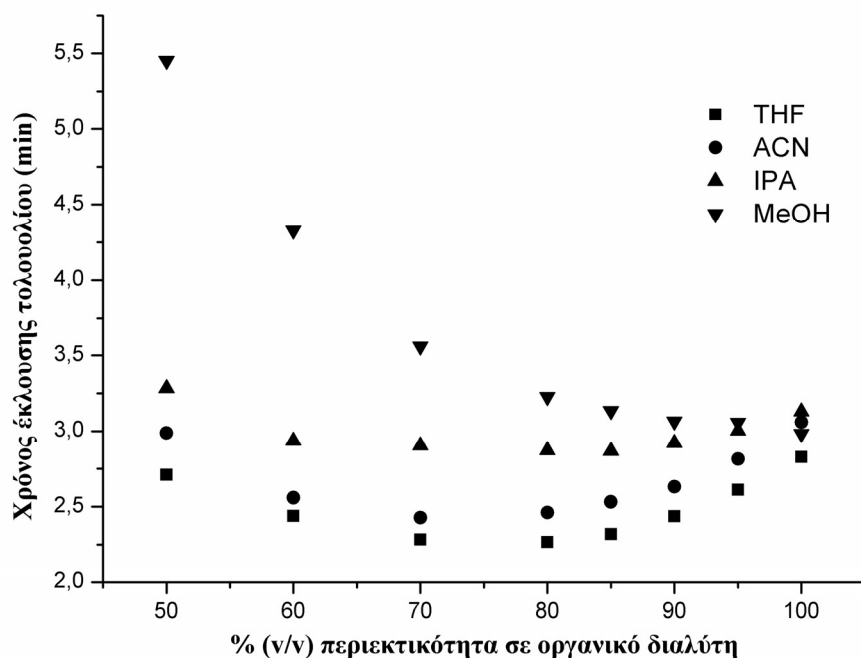
Σχήμα 3.1.5: Επίδραση του ACN, της MeOH, της IPA και του THF στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε αναλογία διαλυτών: Οργανικός/ H_2O 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Μια διαφορετική προσέγγιση που μπορεί να δώσει ικανοποιητική ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι η διαφορετική ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου του κάθε οργανικός διαλύτης σε σύγκριση με αυτήν του ύδατος. Η MeOH χαρακτηρίζεται από την ιδιότητά της να δρα τόσο ως ισχυρός δότης δεσμών υδρογόνου (δότης πρωτονίων ή δέκτης ζεύγους ηλεκτρονίων) ($\alpha_2^H=0,93$) όσο και ως ισχυρός δέκτης δεσμών υδρογόνου (δέκτης πρωτονίων ή δότης ζεύγους ηλεκτρονίων) ($\beta_2^H=0,62$). Αντίθετα, το ACN δρα ως ασθενής δέκτης πρωτονίων ($\beta_2^H=0,31$) και ακόμη ασθενέστερα ως δότης πρωτονίων ($\alpha_2^H=0,19$) [Turek *et al.*, 2008]. Λόγω της ισχυρής ικανότητας δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, η MeOH δρα ανταγωνιστικά ως προς το μηχανισμό κατανομής στην υδατική στιβάδα [Li & Huang, 2004]. Κατά συνέπεια, μόρια τα οποία φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες με δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, όπως οι προς μελέτη ενώσεις, εμφανίζουν πολύ μικρούς χρόνους κατακράτησης. Εξάιρεση αποτελεί η θειαμίνη, της οποίας η κατακράτηση οφείλεται στις

προαναφερθείσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ελκτικής φύσης, οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στο μηχανισμό.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η MeOH διαταράσσει το σχηματισμό της στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στήλης, αντικαθιστώντας μόρια ύδατος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας περισσότερο υδρόφοβης στατικής φάσης [Scott, 1982; Li & Huang, 2004]. Στο Σχήμα 3.1.6 απεικονίζεται γραφικά η μεταβολή του χρόνου έκλουσης του τολουολίου, μιας αμιγώς υδρόφοβης ένωσης, παρουσία ACN, MeOH, IPA και THF, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί στην τεχνική της HILIC ως "δείκτης" του νεκρού χρόνου (dead time) της χρωματογραφικής στήλης [McCalley & Neue, 2008].



Σχήμα 3.1.6: Επίδραση της παρουσίας των οργανικών διαλυτών ACN, MeOH, IPA και THF στο χρόνο έκλουσης του τολουολίου σε στήλη διόλης-πυριτίας. Διαλύτης A: [100% H₂O], Διαλύτης B: [100% Οργανικός διαλύτης]. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Για περιεκτικότητα οργανικού διαλύτη 50–95% (v/v) στην κινητή φάση, ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παρουσία MeOH είναι σχεδόν διπλάσιος από το χρόνο έκλουσης στο ACN. Η αντικατάσταση μορίων ύδατος από μόρια MeOH, καθιστά την υδατική στιβάδα λιγότερο υδρόφιλη, έως ένα βαθμό, με αποτέλεσμα το τολουόλιο να δύναται να κατανεμηθεί σε αυτήν και να αυξάνεται σημαντικά ο χρόνος έκλουσης από τη στήλη. Όσον αφορά την IPA και το THF, το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα σε μικρότερο βαθμό. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παρουσία ACN είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με

αυτόν παρουσία THF. Η σειρά έκλουσης του τολουολίου ως προς τους τέσσερις οργανικούς διαλύτες, η οποία είναι $t_R^{\text{MeOH}} > t_R^{\text{IPA}} > t_R^{\text{ACN}} > t_R^{\text{THF}}$, ακολουθεί τη σειρά κατάταξης των διαλυτών αυτών ως προς την ικανότητά τους να δουν ως δότες δεσμών υδρογόνου. Επομένως, ο ανταγωνισμός μεταξύ των μορίων ενός οργανικού διαλύτη με τα μόρια του ύδατος για τις πολικές ομάδες της επιφάνειας της στήλης διόλης-πυριτίας συνδέεται άμεσα με την ικανότητα των διαλυτών να δρουν ως δότες δεσμών υδρογόνου. Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά με τη χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών προκύπτει ότι οι μεταβολές στο χρόνο κατακράτησης των ενώσεων παρουσία IPA και THF βασίζεται περισσότερο στην ικανότητα των διαλυτών αυτών να δρουν ως δότες-δέκτες δεσμών υδρογόνου και λιγότερο στη διατάραξη της υδατικής στιβάδας, φαινόμενο το οποίο είναι ιδιαίτερα αισθητό παρουσία MeOH.

Μικροί χρόνοι κατακράτησης και απουσία διαχωρισμού είναι επίσης το αποτέλεσμα της αντικατάστασης του ACN με την IPA, καθώς η τελευταία δρα επίσης ως ισχυρός δότης και δέκτης δεσμών υδρογόνου ($\alpha_2^H=0,76$, $\beta_2^H=0,95$). Συγκριτικά με τη MeOH, οι σχετικά μεγαλύτεροι χρόνοι κατακράτησης των ενώσεων οφείλονται στον περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα της IPA λόγω της μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας των μορίων της. Έτσι η IPA ανταγωνίζεται σε μικρότερο βαθμό ως προς το μηχανισμό κατανομής δίνοντας τη δυνατότητα στις ενώσεις να κατανεμηθούν για μεγαλύτερο χρόνο στην υδατική στιβάδα [Li & Huang, 2004].

Η εκλουστική ισχύς του THF είναι παρόμοια με αυτήν του ACN και σαφώς πολύ χαμηλότερη από την εκλουστική ισχύ των αλκοολών. Εντούτοις, οι περισσότερες ενώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη κατακράτηση στο ACN. Το THF δεν δρα ως δότης πρωτονίων ($\alpha_2^H=0,00$), αλλά μπορεί να δεχθεί πρωτόνια πιο ισχυρά ($\beta_2^H=0,55$) σε σύγκριση με το ACN ($\alpha_2^H=0,19$, $\beta_2^H=0,31$). Σύμφωνα με τις τιμές α_2^H και β_2^H του THF και του ACN, αναμένεται ότι οι ενώσεις που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες που δρουν ως δότες πρωτονίων θα έχουν μικρότερους χρόνους κατακράτησης στο THF σε σύγκριση με το ACN [Turek *et al.*, 2008; Sadek, 2002]. Στο φαινόμενο αυτό είναι σαφές ότι παίζει σημαντικό ρόλο και ο αριθμός των ομάδων αυτών. Κατά συνέπεια, η μείωση του χρόνου κατακράτησης της πυριδοξίνης, η οποία φέρει τρεις υδροξυλομάδες (δότες πρωτονίων), είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το νικοτιναμίδιο (μια αμιδο- ομάδα δότης δεσμών υδρογόνου) με ταυτόχρονη αλλαγή στην εκλεκτικότητα. Για τον ίδιο λόγο, λαμβάνει χώρα μείωση του χρόνου κατακράτησης της ριβοφλαβίνης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος. Αντίθετα ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης είναι λίγο μεγαλύτερος σε σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης

παρουσία ACN. Αυτό πιθανό να οφείλεται στην παρουσία στο μόριο της θειαμίνης περισσότερων ομάδων δεκτών δεσμών υδρογόνου σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Έτσι, ο σχετικά μικρότερος χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης παρουσία ACN μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα του διαλύτη να δρα ως ασθενής δότης δεσμών υδρογόνου.

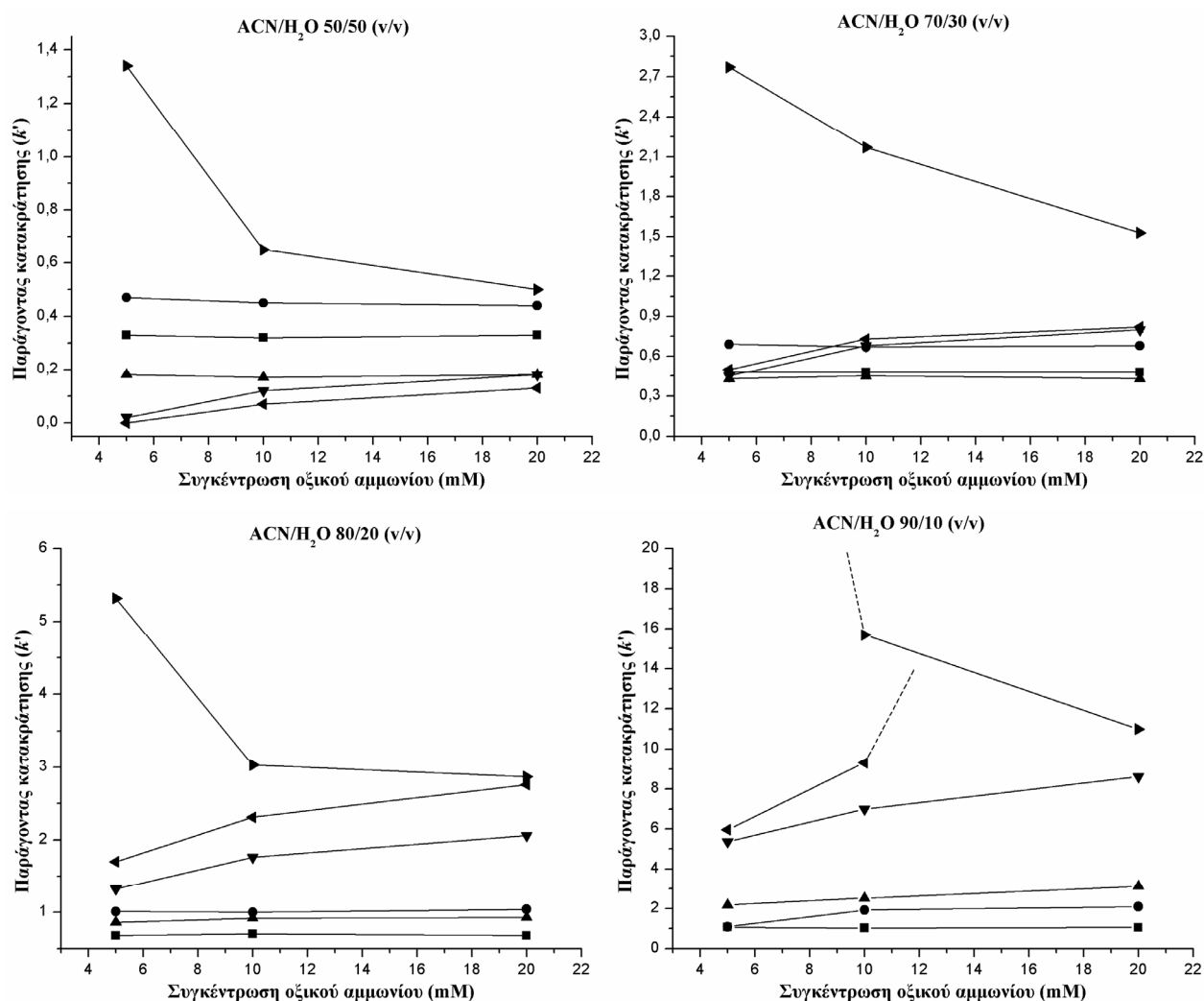
Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν τη σημασία των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μιας πολικής ένωσης και των μορίων των διαλυτών έκλουσης και ενισχύουν σημαντικά την προσέγγιση της συμμετοχής των δεσμών υδρογόνου στο συνολικό μηχανισμό της HILIC.

3.1.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος

Η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου πραγματοποιήθηκε σε pH 5,0, όπου έλαβε χώρα βέλτιστος διαχωρισμός του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών λαμβάνοντας υπόψη και το συνολικό χρόνο ανάλυσης. Το εύρος συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην κινητή φάση ήταν 5–20 mM. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου δεν ήταν εφικτή λόγω του περιορισμού της διαλυτότητας του άλατος στην οργανική φάση.

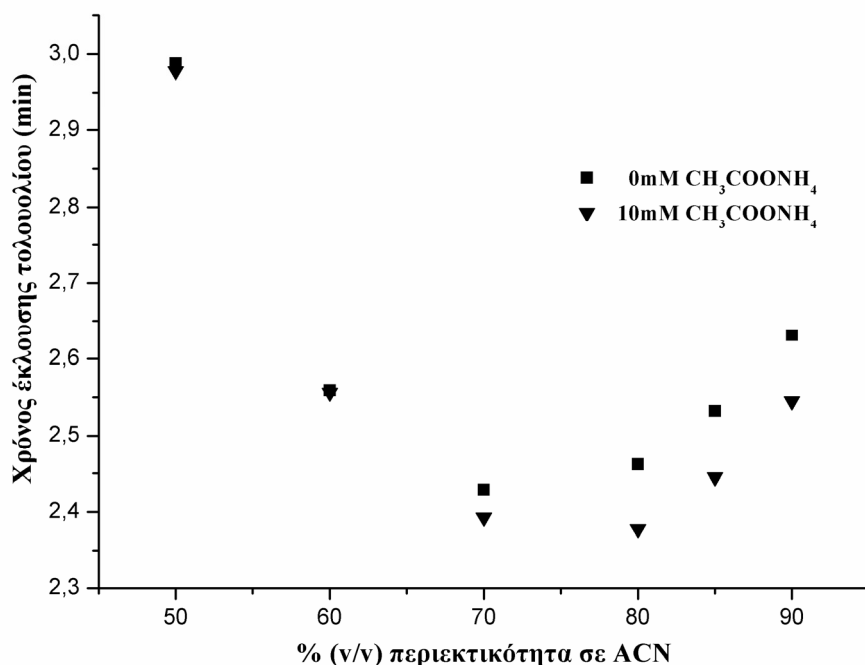
Στο Σχήμα 3.1.7 απεικονίζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ACN. Ο παράγοντας κατακράτησης του νικοτιναμίδιου παραμένει αμετάβλητος στο εύρος συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου και σε όλες τις αναλογίες ACN/H₂O στην κινητή φάση. Οι παράγοντες κατακράτησης της πυριδοξίνης, της ριβοφλαβίνης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος δεν μεταβάλλονται σημαντικά στο εύρος συγκέντρωσης του άλατος και σε ποσοστό ACN 50–70% (v/v). Με περαιτέρω αύξηση του ACN σε ποσοστό 80 και 90%, η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατακράτησης της πυριδοξίνης ($1,08 < k' < 2,10$) και της ριβοφλαβίνης ($2,18 < k' < 3,12$). Στην ίδια αναλογία διαλυτών, η κατακράτηση του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος αυξάνεται πολύ περισσότερο με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου. Σε αντίθεση με τις παραπάνω ενώσεις, ο παράγοντας κατακράτησης της θειαμίνης είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του παράγοντα κατακράτησης.

Σύμφωνα με το μηχανισμό της HILIC, σε υψηλά ποσοστά ACN στην κινητή φάση τα ιόντα του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος "προτιμούν" να κατανέμονται (στο μεγαλύτερο ποσοστό τους) στη στιβάδα ύδατος που βρίσκεται στην επιφάνεια της στήλης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση, όλο και περισσότερα επιδιαλυτωμένα ιόντα κατανέμονται στην υδατική στιβάδα με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφιλικότητάς της και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων μέσω του μηχανισμού κατανομής [Guo & Gaiki, 2005].



Σχήμα 3.1.7: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1. Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◀) L-ασκορβικό οξύ, (►) θειαμίνη.

Στο Σχήμα 3.1.8 απεικονίζεται γραφικά ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου απουσία και παρουσία οξικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 10 mM στην κινητή φάση. Σε ποσοστό ACN 50 και 60% (v/v), το τολουόλιο εκλύεται στον ίδιο χρόνο ανεξάρτητα από την απουσία ή παρουσία του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος. Διαφοροποίηση μεταξύ των δυο περιπτώσεων γίνεται εμφανής σε ποσοστό ACN $\geq 70\%$ (v/v), όπου ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου μειώνεται παρουσία οξικού αμμωνίου. Η χρωματογραφική αυτή συμπεριφορά επιβεβαιώνει την αύξηση της υδροφιλικότητας της υδατικής στιβάδας, μέσω της προτιμώμενης κατανομής των οξικών και αμμωνιακών ιόντων σε αυτήν, με αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού κατανομής του τολουολίου.

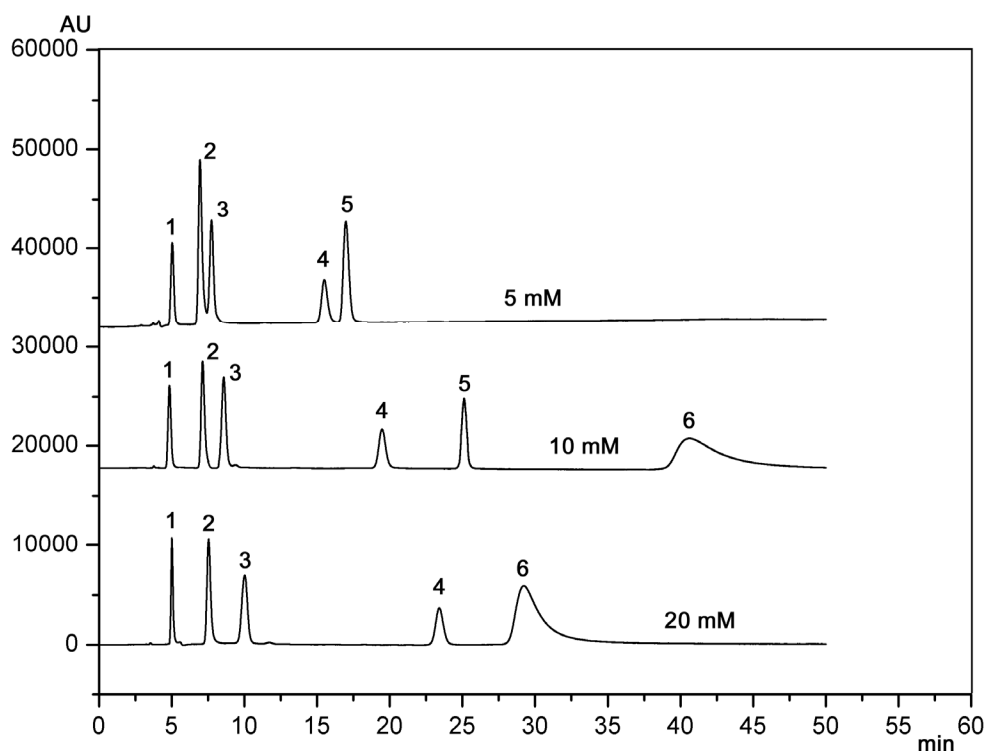


Σχήμα 3.1.8: Επίδραση της συγκέντρωσης του CH₃COONH₄ (0 και 10 mM) στο χρόνο έκλουσης του τολουολίου σε στήλη διόλης-πυριτίας. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1. Σύμβολα: (■) CH₃COONH₄ 0 mM, (▼) CH₃COONH₄ 10 mM.

Πέρα από το μηχανισμό κατανομής, είναι φανερός ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ελκτικής ή απωστικής φύσης, στο χρόνο κατακράτησης των μορίων που φέρουν φορτίο. Όπως αναφέρθηκε και στην § 3.1.2, σε pH 5,0 το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ είναι αρνητικά φορτισμένα, ενώ η θειαμίνη φέρει μόνιμο θετικό φορτίο ανεξαρτήτως του pH της κινητής φάσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων αμμωνίου στην κινητή φάση προκαλεί ελάττωση της ηλεκτροστατικής άπωσης που δέχονται

τα μόρια του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέως από τις αρνητικά φορτισμένες σιλανομάδες της στήλης με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου κατακράτησης. Κατ' αντίστοιχο τρόπο, η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης οφείλεται στη μείωση του αριθμού των διαθέσιμων σημείων της στήλης που συμμετέχουν στο μηχανισμό ιονανταλλαγής και επομένως τη μείωση της ηλεκτροστατικής έλξης του μορίου από τη στήλη [Guo & Gaiki, 2005; Li & Huang, 2004; Quiming *et al.*, 2008; Takegawa *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007].

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών απεικονίζονται στο Σχήμα 3.1.9, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.5.



Σχήμα 3.1.9: Επίδραση της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε αναλογία $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Σε συγκέντρωση οξικού αμμωνίου 5 mM, η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης της ριβοφλαβίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας για το ζεύγους ενώσεων: πυριδοξίνη/ριβοφλαβίνη, με αποτέλεσμα τον ατελή διαχωρισμό τους ($R_s=1,42$).

Αντίστοιχα, η ακόμα μεγαλύτερη μείωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος επιφέρει τη δραστική μείωση του διαχωρισμού με την τιμή Rs να ελαττώνεται από 6,67 σε 1,95. Όσον αφορά τη θειαμίνη, η ύπαρξη ισχυρότερων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τη μείωση της συγκέντρωσης των κατιόντων αμμωνίου έχει ως αποτέλεσμα η ένωση να μην εκλύεται σε χρόνο μικρότερο των 50 min.

Με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου από τα 10 στα 20 mM, αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα των ζευγών νικοτιναμίδιο/πυριδοξίνη και πυριδοξίνη/ριβοφλαβίνη (Πίνακας 3.1.5). Το L-ασκορβικό οξύ όμως εμφανίζει ισχυρή κατακράτηση με αποτέλεσμα να μην εκλύεται σε χρόνο μικρότερο των 50 min.

Πίνακας 3.1.5: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της συγκέντρωσης του CH₃COONH₄ (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.9).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)		
	CH ₃ COONH ₄ 5 mM	CH ₃ COONH ₄ 10 mM	CH ₃ COONH ₄ 20 mM
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	4,44	4,18	6,99
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	1,42	2,82	4,08
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	8,43	15,1	15,5
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	1,95	6,67	2,96
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	—	5,14	—

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

Η επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στη συμμετρία των κορυφών φαίνεται στον Πίνακα 3.1.6. Το νικοτιναμίδιο, η ριβοφλαβίνη το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ εμφανίζουν ικανοποιητική συμμετρία κορυφών ($1,0 < T_f < 1,3$). Η αύξηση του T_f κατά 0,2 μονάδες στην κορυφή της πυριδοξίνης σε συγκέντρωση οξικού αμμωνίου 5 mM, οφείλεται στην εμφάνιση ασθενών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων λόγω της ύπαρξης μερικού θετικού φορτίου στον πυριδινικό δακτύλιο του μορίου. Τέλος, με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος από 10 σε 20 mM βελτιώνεται η συμμετρία της κορυφής της θειαμίνης με τον παράγοντα T_f να μειώνεται κατά 0,3 μονάδες, γεγονός που οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στη μείωση της ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια της στήλης.

Πίνακας 3.1.6: Επίδραση της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f		
	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM
νικοτιναμίδιο	1,2	1,3	1,3
πυριδοξίνη	1,5	1,3	1,2
ριβοφλαβίνη	1,2	1,1	1,0
νικοτινικό οξύ	1,2	1,1	1,1
L-ασκορβικό οξύ	1,2	1,1	–
θειαμίνη	–	2,3	2,0

3.1.5 Επίδραση της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος

Η επίδραση διαφορετικών αλάτων στη χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών μελετήθηκε διατηρώντας το pH της κινητής φάσης σταθερό στην τιμή 5,0 και τη συγκέντρωση του κάθε άλατος στα 10 mM. Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το οξικό αμμώνιο, το μυρμηκικό αμμώνιο, το χλωριούχο αμμώνιο και το οξικό νάτριο. Για την επίτευξη πλήρους διαλυτοποίησης των ρυθμιστικών αλάτων, η σύσταση του διαλύτη έκλουσης ρυθμίστηκε στην αναλογία $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 (v/v) και υπό ισοκρατικές συνθήκες διαβίβασης της κινητής φάσης. Επιπλέον, μελετήθηκε και η προσθήκη διαφόρων οξέων όπως το οξικό, το μυρμηκικό και το τριφθοροξικό οξύ διατηρώντας την ίδια αναλογία διαλυτών έκλουσης. Οι χρόνοι κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών και η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών ως συνάρτηση της παρουσίας διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων στην κινητή φάση, παρατίθενται στους Πίνακες 3.1.7 και 3.1.8 αντίστοιχα.

Το νικοτιναμίδιο, η πυριδοξίνη και η ριβοφλαβίνη δεν εμφανίζουν διαφορές στους χρόνους κατακράτησης παρουσία διαφορετικών αλάτων στην κινητή φάση. Όπως αναφέρθηκε και στην § 3.1.2, οι ενώσεις αυτές δεν φέρουν φορτίο σε pH 5,0, με αποτέλεσμα να μην συμμετέχουν σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις τόσο με τα ιόντα των αλάτων, όσο και με τα αρνητικά φορτισμένα κέντρα της στήλης.

Αντίθετα, οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού οξέος, του L-ασκορβικού οξέος και της θειαμίνης, ενώσεις που φέρουν φορτίο σε pH 5,0 (§ 1.2.2), διαφοροποιούνται σημαντικά με την παρουσία διαφορετικών αλάτων στην κινητή φάση, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και τη συμμετοχή αυτών στο

συνολικό μηχανισμό της HILIC. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος (αρνητικά φορτισμένα μόρια) είναι μεγαλύτεροι στο μυρμηκικό αμμώνιο σε σχέση με το άλας του οξικού αμμωνίου. Η διαφορά στην κατακράτηση είναι αξιοσημείωτα μεγαλύτερη σε ποσοστό ACN 90% (v/v). Ο διαφορετικός "ανταγωνισμός" των μυρμηκικών και οξικών ανιόντων ως προς τα κατιόντα αμμωνίου πιθανόν να συμβάλει στη διαφοροποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Σύμφωνα με τη θεωρία (§ 1.1.4.3), η κάλυψη του αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια της στήλης λαμβάνει χώρα με τη μορφή μιας ηλεκτρικής στιβάδας άνωθεν των αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων. Έτσι, στην περίπτωση του μυρμηκικού αμμωνίου, το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ δέχονται σε μικρότερο βαθμό ηλεκτροστατική άπωση από τη στήλη και κατακρατούνται πιο ισχυρά [Alpert, 2008; Takegawa *et al.*, 2006; Pack & Risley, 2005]. Ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης είναι μικρότερος παρουσία οξικού αμμωνίου σε σχέση με το μυρμηκικό αμμώνιο. Ο μεγαλύτερος βαθμός ιοντικής σύζευξης (ion association) των οξικών ανιόντων, σε σύγκριση με τα μυρμηκικά ανιόντα, με τα θετικά φορτισμένα μόρια της θειαμίνης έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της υδροφιλικότητας του μορίου και τη μείωση του χρόνου κατακράτησης. [Wang *et al.*, 2005; Le Rouzo *et al.*, 2007; Strege, 1998; Yoshida, 1997].

Στην περίπτωση της προσθήκης χλωριούχου αμμωνίου στην κινητή φάση, προκαλείται μεγαλύτερη μείωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος. Τα ιόντα χλωρίου, λόγω της μεγαλύτερης υδροφιλικότητας και του φορτίου σε σχέση με τα οξικά και μυρμηκικά ανιόντα, ανταγωνίζονται ισχυρότερα ως προς τα ιόντα αμμωνίου σε σχέση με τις ομάδες σιλανόλης με αποτέλεσμα την ύπαρξη ισχυρότερης ηλεκτροστατικής άπωσης από την επιφάνεια της στήλης [Snyder & Kirkland, 1979]. Ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης επίσης ελαττώνεται παρουσία χλωριούχων ιόντων, λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας για δημιουργία ουδέτερων ιοντικών ζευγών με τα μόρια της θειαμίνης. Η μείωση της έντασης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της θειαμίνης και της στήλης συμβάλει και στην αύξηση της συμμετρίας της κορυφής με την ελάττωση του T_f από την τιμή 2,3 στην τιμή 2,1 (Πίνακας 3.1.8).

Η παρουσία οξικού νατρίου στην κινητή φάση, συμβάλλει στη σημαντική αύξηση των χρόνων κατακράτησης των νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος σε σχέση με το αμμωνιακό άλας του οξικού οξέος. Η παραπάνω συμπεριφορά των ενώσεων αντικατοπτρίζει τη μεγαλύτερη δυνατότητα των κατιόντων νατρίου να καλύπτουν τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες σιλανόλης μειώνοντας ταυτόχρονα τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ελκτικές ή απωστικές [Li & Huang, 2004]. Η μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις

αρνητικές σιλανομάδες προκαλεί, αντίστοιχα, τη μείωση του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης βελτιώνοντας σημαντικά τη συμμετρία της κορυφής ($T_f=1,8$).

Πίνακας 3.1.7: Επίδραση διαφορετικών αλάτων στο χρόνο κατακράτησης (t_R) και τη συμμετρία (T_f) των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Ένωση	${}^a\text{NH}_4\text{Cl}$		${}^a\text{CH}_3\text{COONH}_4$		${}^a\text{HCOONH}_4$		${}^a\text{CH}_3\text{COONa}$	
	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f
θειαμίνη	7,74	2,1	9,81	2,2	11,50	2,3	7,75	1,8
ριβοφλαβίνη	4,55	1,2	4,67	1,2	4,82	1,2	4,84	1,1
νικοτινικό οξύ	6,33	1,3	6,72	1,1	7,20	1,1	7,73	1,1
νικοτιναμίδιο	4,14	1,3	4,15	1,2	4,23	1,2	4,14	1,2
πυριδοξίνη	5,01	1,6	4,84	1,4	5,13	1,4	4,91	1,3
L-ασκορβικό οξύ	5,69	1,2	8,07	1,3	8,64	1,3	10,32	1,2

a : 10 mM, pH 5,0

Το τριφθοροξικό οξύ (TFA) έχει τρεις βασικούς ρόλους στο μηχανισμό ιονανταλλαγής: α) τα πρωτόνια που προκύπτουν από τη διάσταση του οξέος λειτουργούν ως κατιόντα ανταλλαγής ως προς τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες της στήλης ανταγωνιζόμενα βασικές ενώσεις, β) ελέγχει το pH της κινητής φάσης και επομένως το φορτίο των προς ανάλυση ενώσεων και των ιονιζόμενων ομάδων της στήλης και γ) το ανιόν του τριφθοροξικού οξέος δρα ως παράγοντας σχηματισμού ζεύγους ιόντων [Dai & Carr, 2005; Dai *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2002; LoBrutto *et al.*, 2001]. Η προσθήκη του τριφθοροξικού οξέος στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση των χρόνων κατακράτησης της θειαμίνης, του νικοτινικού οξέος και του L-ασκορβικού οξέος. Επιπλέον, λαμβάνει χώρα μικρή μείωση του χρόνου κατακράτησης της πυριδοξίνης, του νικοτιναμίδιου και της ριβοφλαβίνης. Στην περίπτωση της θειαμίνης, το αποτέλεσμα οφείλεται στην ικανότητα που έχει το τριφθοροξικό οξύ να σχηματίζει ζεύγη ιόντων (ion pairs) με θετικά φορτισμένες ενώσεις. Σύμφωνα με τη θεωρία της χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων [Kazakevich & LoBrutto, 2007], μια φορτισμένη ένωση σε μίγμα υδατικού/οργανικού διαλύτη περιβάλλεται από μόρια ύδατος υπό τη μορφή μιας σφαίρας ενυδατώσεως (solvation shell). Η παρουσία ενός αντιδραστηρίου με την ικανότητα να σχηματίζει ζεύγη ιόντων (χαοτροπικό αντιδραστήριο) προκαλεί τη διάρρηξη της σφαίρας ενυδατώσεως (απομάκρυνση μορίων ύδατος) και ταυτόχρονα τη δημιουργία ενός ιοντικού ζεύγους με την ένωση. Η διεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του υδρόφιλου χαρακτήρα της ένωσης γεγονός το

οποίο στην HILIC συνεπάγεται με μείωση του χρόνου κατακράτησης [Strege, 1998]. Όσον αφορά το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ, η δραστική ελάττωση της κατακράτησης οφείλεται στη μείωση της υδροφιλικότητας των ενώσεων αυτών λόγω της πρωτονιωμένης τους μορφής σε όξινο pH. Η μικρή ελάττωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της ριβοφλαβίνης και σε μεγαλύτερο βαθμό της πυριδοξίνης (Πίνακας 3.1.7) μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: Το όξινο pH της κινητής φάσης (~2,5) έχει ως συνέπεια την εμφάνιση θετικού φορτίου στις ενώσεις (§ 3.1.2). Ταυτόχρονα, η παρουσία των τριφθοροξικών ανιόντων ελαττώνει την υδροφιλικότητα των ενώσεων, όπως περιγράφηκε παραπάνω και επομένως το χρόνο κατακράτησής τους. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να λαμβάνει χώρα σε μικρότερο βαθμό σε μόρια που το φορτίο τους εμφανίζεται σε αρωματικό δακτύλιο πιθανώς εξαιτίας αφενός του μερικού (λόγω pH) και αφετέρου του μη εντοπισμένου (λόγω συντονισμού) φορτίου. Αξίζει να αναφερθεί ότι με την παρουσία του TFA στην κινητή φάση, όλες οι ενώσεις εμφανίζουν πολύ καλή συμμετρία συμπεριλαμβανομένης και της θειαμίνης ($1,1 < T_f < 1,3$) [Paglia *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2007]. Εντούτοις, ο διαχωρισμός του μίγματος δεν είναι εφικτός, λόγω της μικρής κατακράτησης των ενώσεων ακόμα και σε κινητή φάση με υψηλό ποσοστό σε οργανικό διαλύτη (80–90%) [Strege, 1998; Daunoravičiusl *et al.*, 2006].

Πίνακας 3.1.8: Επίδραση διαφορετικών οξέων στο χρόνο κατακράτησης (t_R) και τη συμμετρία (T_f) των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Ένωση	^α TFA		^β HCOOH		^γ CH ₃ COOH	
	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f
θειαμίνη	3,33	1,3	10,18	3,2	37,43	3,5
ριβοφλαβίνη	4,40	1,1	4,42	1,2	4,44	1,2
νικοτινικό οξύ	3,32	1,2	3,67	1,4	3,65	1,3
νικοτιναμίδιο	3,79	1,3	4,21	1,3	4,22	1,3
πυριδοξίνη	3,32	1,3	5,95	0,8	13,15	0,7
L-ασκορβικό οξύ	4,24	1,1	4,18	1,3	4,21	1,2

α: 0,1%, pH 2,5

β: 10 mM, pH 2,9

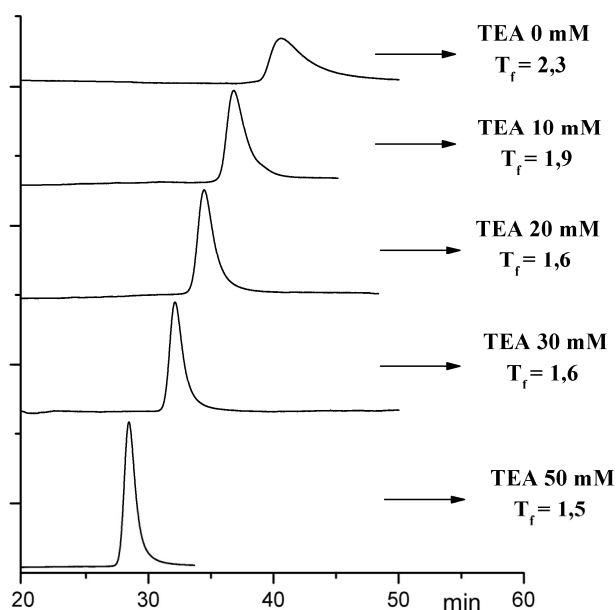
γ: 10 mM, pH 3,8

Η χρωματογραφική συμπεριφορά του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος παρουσία μυρμηκικού και οξικού οξέος είναι ανάλογη με εκείνη παρουσία TFA. Στην περίπτωση της προσθήκης οξικού οξέος, το pH της κινητής φάσης (3,8) ευνοεί την πλήρη αποπρωτονίωση του νικοτινικού οξέος. Εντούτοις, ο χρόνος κατακράτησης του νικοτινικού οξέος δεν αυξάνεται, όπως θα αναμενόταν. Επιπλέον, ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης αυξάνεται ραγδαία παρουσία οξικού και μυρμηκικού οξέος, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται και η ασυμμετρία της κορυφής (Πίνακας 3.1.8). Σημαντική είναι επίσης και η αύξηση του χρόνου κατακράτησης της πυριδοξίνης παρουσία οξικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό στο μυρμηκικό οξύ με την ταυτόχρονη εμφάνιση "μετώπου" ($T_r=0,7-0,8$) στην κορυφή. Η χρήση του οξικού και του μυρμηκικού οξέος, τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης για τη ρύθμιση του pH, δεν είναι ικανοποιητική όσον αφορά την κατακράτηση και τη συμμετρία των κορυφών στην HILIC, γεγονός το οποίο αναδεικνύει τη σημαντικότητα της παρουσίας και του ρόλου των αντισταθμιστικών ιόντων (π.χ. κατιόντα αμμωνίου). Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στο ότι τα κατιόντα υδρογόνου που προκύπτουν από τη διάσταση του οξικού ή του μυρμηκικού οξέος δεν ανταγωνίζονται ισχυρά ως προς τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες σιλανόλης της στήλης. Επιπλέον, η ιοντική ισχύς που προκύπτει από τη μερική διάσταση (~10–20%) του οξικού και του μυρμηκικού οξέος στην κινητή φάση είναι μικρή συγκριτικά με την ιοντική ισχύ που προκύπτει από τη χρήση των αμμωνιακών αλάτων των οξέων αυτών σε υψηλότερες τιμές pH. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις ιονανταλλαγής για τις βασικές ενώσεις, όπως η θειαμίνη και η πυριδοξίνη, συνεισφέρουν σημαντικά στο συνολικό μηχανισμό. Κατά ανάλογο τρόπο, οι όξινες ενώσεις, όπως το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ, υφίστανται ηλεκτροστατική άπωση από τη στήλη με αποτέλεσμα την ελάττωση του χρόνου κατακράτησης [Sanchez & Kansal, 2008].

3.1.6 Επίδραση της προσθήκη τριαιθυλαμίνης (TEA) στην κινητή φάση

Η ύπαρξη ελεύθερων ομάδων σιλανόλης στο υλικό πλήρωσης μιας χρωματογραφικής στήλης αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες εμφάνισης μη συμμετρικών κορυφών σε ενώσεις που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες που δρουν ως δέκτες πρωτονίων (συνήθως βασικοί αναλύτες). Η TEA χρησιμοποιείται συχνά ως τροποποιητής (modifier) στην HPLC με σκοπό την αδρανοποίηση των ελεύθερων σιλανομάδων του υλικού πλήρωσης και τη βελτίωση του σχήματος των χρωματογραφικών κορυφών [Dolan & Snyder, 1989].

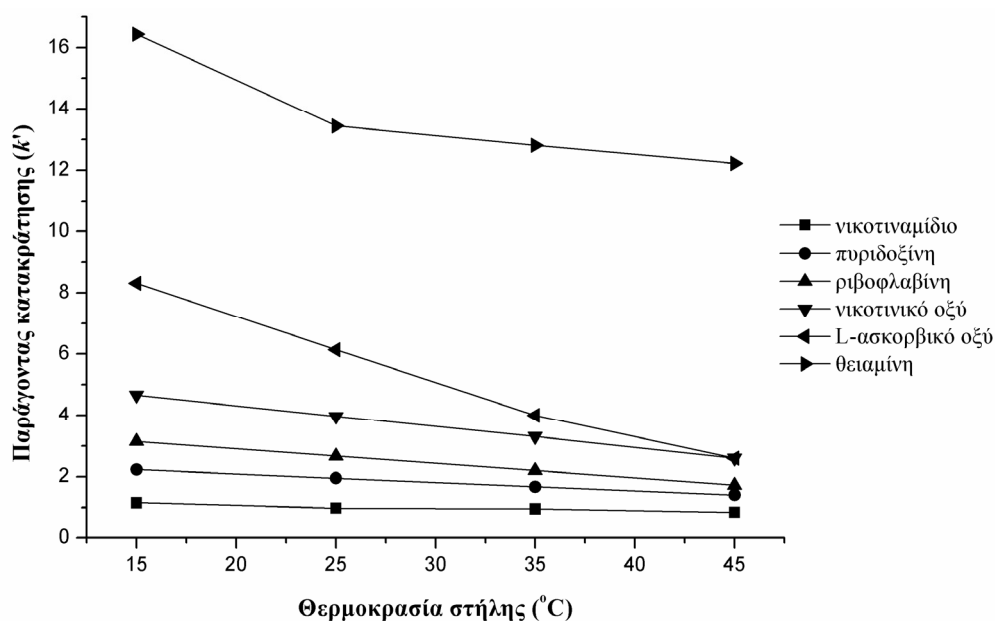
Για τη μελέτη της επίδρασης της TEA στη συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής της θειαμίνης, πραγματοποιήθηκε προσθήκη TEA στην κινητή φάση σε εύρος συγκέντρωσης 10 έως 50 mM. Η προσθήκη αυτή έλαβε χώρα παρουσία οξικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 10 mM και σε pH 5,0. Στο Σχήμα 3.1.10 παρατίθεται γραφικά το αποτέλεσμα της προσθήκης TEA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στη συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής της θειαμίνης. Η προσθήκη TEA σε συγκέντρωση 10 και 20 mM έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του παράγοντα T_f από την αρχική τιμή 2,3 (απουσία TEA) στην τιμή 1,9 και 1,6 αντίστοιχα. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης σε TEA δεν επιφέρει επιπρόσθετη βελτίωση στο σχήμα της κορυφής με τον παράγοντα T_f να λαμβάνει την τιμή 1,5 (50 mM). Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τη σχετική θεωρία, όπου οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις TEA για τη βελτίωση της συμμετρίας χρωματογραφικών κορυφών κυμαίνονται από 10 έως 50 mM [Dolan & Snyder, 1989]. Επίσης, η χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης παρουσία TEA αποτελεί μια επιπρόσθετη ένδειξη της συμμετοχής της επιφανειακής προσρόφησης στο συνολικό μηχανισμό της HILIC [Karatapanis *et al.*, 2010].



Σχήμα 3.1.10: Απεικόνιση της επίδρασης της TEA στη συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής της θειαμίνης.

3.1.7 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο χρόνο κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία από τους 15 έως τους 45 °C. Η σύσταση της κινητής φάσης, αποτελούμενη από ACN/H₂O 90/10 (v/v) παρουσία οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM, TEA 20 mM και σε pH 5,0, διατηρήθηκε σταθερή στο εξεταζόμενο εύρος θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Δραστική είναι η μείωση στο χρόνο κατακράτησης του νικοτινικού ($13,79 < k' < 8,77$) και L-ασκορβικού οξέος ($22,66 < k' < 8,77$), ενώ το φαινόμενο είναι λιγότερο αισθητό στις υπόλοιπες ενώσεις (Σχήμα 3.1.11). Με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης, η αύξηση των τιμών των σταθερών διάστασης των όξινων ενώσεων με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του υδρόφιλου χαρακτήρα τους εξηγεί ικανοποιητικά τα παραπάνω αποτελέσματα [Kazakevich & LoBrutto, 2007; Tanaka *et al.*, 2003]. Μια άλλη παράμετρος που συμβάλει στην ελάττωση της κατακράτησης είναι οι δεσμοί υδρογόνου, η ισχύς των οποίων μειώνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας [Modig *et al.*, 2003].



Σχήμα 3.1.11: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας της στήλης διόλης-πυριτίας στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM και σε pH 5,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία TEA η μείωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτινικού ($9,97 < k' < 6,88$) και L-ασκορβικού οξέος ($16,28 < k' < 7,46$) είναι μικρότερη αυξανόμενης της θερμοκρασίας της στήλης, λόγω της απουσίας του φαινομένου της ιοντικής ζεύξης και επομένως της συγκριτικά μεγαλύτερης υδροφιλικότητας των ενώσεων.

Έχει υποστηριχθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας λαμβάνει χώρα μείωση της διαφοράς στην πολικότητα μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου διαλύτη έκλουσης, λόγω της ελάττωσης της πολικότητας του ύδατος [Hao *et al.*, 2008]. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο χρόνο έκλουσης του τολουολίου σε σταθερή αναλογία ACN/H₂O 80/20 (v/v). Για το εύρος θερμοκρασίας 15–55 °C, ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παραμένει πρακτικά σταθερός ($2,652 < t_R < 2,686$). Η μελέτη αυτή αποδεικνύει έμμεσα ότι στο συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας δεν μειώνεται η πολικότητα της υδατικής στιβάδας, διότι στην αντίθετη περίπτωση θα λάμβανε χώρα αύξηση του βαθμού κατανομής και επομένως αύξηση του χρόνου έκλουσης του τολουολίου.

Η μείωση της κατακράτησης των ενώσεων με την αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί, αντίστοιχα, μείωση και στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης (Πίνακας 3.1.9). Η επίδραση είναι ιδιαίτερα εμφανής στο ζεύγος ενώσεων νικοτινικό οξύ/L-ασκορβικό οξύ, όπου σε θερμοκρασία 45 °C λαμβάνει χώρα συνέκλωση των δυο κορυφών.

Πίνακας 3.1.9: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της θερμοκρασίας της στήλης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.11).

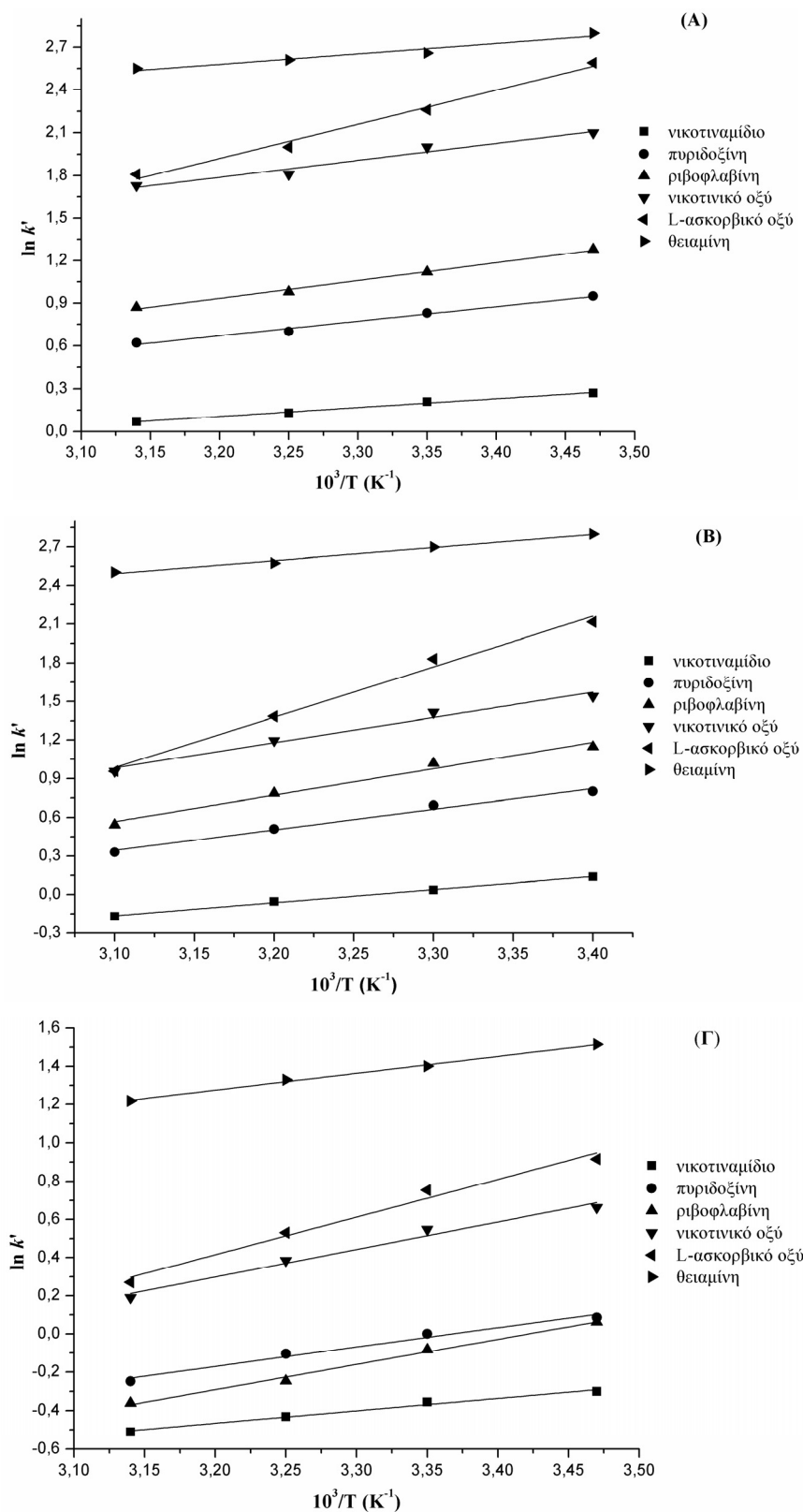
Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	T=15 °C	T=25 °C	T=35 °C	T=45 °C
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	7,54	5,88	4,93	4,25
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	4,29	2,90	3,17	2,25
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	5,95	4,99	5,93	6,26
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	13,15	9,70	3,83	συνέκλωση
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	11,18	12,6	17,14	20,66

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $Rs \approx 1,50$

Η θερμοκρασία της στήλης είναι μια από τις σημαντικές παραμέτρους στην HPLC διότι επηρεάζει φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως είναι το ιξώδες της κινητής φάσης, ο συντελεστή διάχυσης, η ενθαλπία μεταφοράς των μορίων ενός αναλύτη μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και η μεταβολή της εντροπίας των μορίων κατά την αλληλεπίδραση τους με τη στατική φάση, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το χρόνο κατακράτησης μιας ένωσης. Στην RPLC η σχέση που συνδέει τον παράγοντα κατακράτησης (k') μιας ένωσης με τη θερμοκρασία (T) περιγράφεται από την εξίσωση van't Hoff (§ 1.1.4.5) [Scott, 2003; Chester & Coym, 2003].

Υποθέτοντας ότι ο μηχανισμός στην HILIC λαμβάνει μέσω κατανομής η εξίσωση van't Hoff θα πρέπει να έχει γραμμική απόκριση [Poole, 2003]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης της εξίσωσης van't Hoff (Σχήμα 3.1.12(A), Πίνακας 3.1.10) υπάρχει γραμμική συσχέτιση για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη ($0,9900 < R^2 < 0,9966$). Η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης είναι κάτι το οποίο ισχύει συνήθως και στην RPLC, υποδεικνύοντας ότι η κατανομή είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων αυτών [Philipsen *et al.*, 1997; Kayillo *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2001]. Απόκλιση από τη γραμμικότητα εμφανίζεται για το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ, ενώ μη γραμμική συσχέτιση είναι το αποτέλεσμα για τη θειαμίνη ($R^2=0,9524$). Η απόκλιση από τη γραμμικότητα για τις ενώσεις που φέρουν φορτίο είναι ένα επιπρόσθετο πειστήριο για την ύπαρξη ενός μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τόσο την κατανομή όσο και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [Quiming *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2007].

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα παρουσία TEA στην κινητή φάση (Σχήμα 3.1.12(B), Πίνακας 3.1.10) όπου λαμβάνει χώρα αύξηση της γραμμικότητας για όλες τις ενώσεις με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να κυμαίνονται από 0,9848 έως 0,9983. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη και συνεισφορά των ιοντικών αλληλεπιδράσεων –των φορτισμένων ενώσεων τόσο με την κινητή όσο και με τη στατική φάση– στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης.



Σχήμα 3.1.12: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης van't Hoff για το εύρος θερμοκρασίας 15–45 °C. (A) ACN/H₂O 90/10 (v/v), TEA 0 mM. (B) ACN/H₂O 90/10 (v/v), TEA 20 mM. (Γ) ACN/H₂O 80/20 (v/v), TEA 0 mM. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.11.

Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση στη γραμμικότητα της εξίσωσης van't Hoff με τη μείωση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση από 90 σε 80% (v/v) (Σχήμα 3.1.12(Γ), Πίνακας 3.1.10). Στην περίπτωση αυτή οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης κυμαίνονται από 0,9924 έως 0,9975. Το αποτέλεσμα αυτό αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο του ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση, ως προς το ποιές δυνάμεις (υδρόφιλες ή ηλεκτροστατικές) κυριαρχούν στο μηχανισμό κατακράτησης. Στην HILIC, η απόκλιση από τη γραμμικότητα στην εξίσωση van't Hoff μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη ενός "μικτού" μηχανισμού με τη συμμετοχή πολλών παραμέτρων [Guo & Huang, 2003; Quiming *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2007; Scott, 2003; Wu *et al.*, 2008]. Η εξήγηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τον Alpert (1990) σύμφωνα με τον οποίο η κατακράτηση των πολικών ενώσεων, πέραν της κατανομής, καθορίζεται από ένα συνδυασμό αλληλεπιδράσεων με τη μορφή επιμέρους μηχανισμών όπως είναι η ανταλλαγή ιόντων, και οι δεσμοί υδρογόνου.

Οι τιμές ενθαλπίας για το σύνολο των ενώσεων έχουν αρνητική τιμή και κυμαίνονται από -5,65 σε -19,93 kJ/mol, το οποίο σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων είναι μια εξώθερμη διεργασία (ενεργειακά αυθόρμητη) και μειώνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία της στήλης [Guo, 2005; Guo & Gaiki, 2005; Luo *et al.*, 2008].

Πίνακας 3.1.10: Τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης και της ενθαλπίας της εξίσωσης van't Hoff.

Ένωση	^α ACN/H ₂ O 80/20		^α ACN/H ₂ O 90/10		^β ACN/H ₂ O 90/10	
	R ²	ΔH° (kJ/mol)	R ²	ΔH° (kJ/mol)	R ²	ΔH° (kJ/mol)
νικοτιναμίδιο	0,9975	-6,67	0,9966	-5,65	0,9983	-8,47
πυριδοξίνη	0,9939	-9,04	0,9900	-8,53	0,9937	-13,0
ριβοφλαβίνη	0,9957	-11,9	0,9951	-10,4	0,9932	-16,9
νικοτινικό οξύ	0,9926	-13,6	0,9847	-9,53	0,9929	-16,4
L-ασκορβικό οξύ	0,9934	-21,9	0,9870	-19,9	0,9973	-32,6
θειαμίνη	0,9924	-8,00	0,9524	-6,14	0,9848	-8,44

α: CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 0 mM, pH 5,0

β: CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM, pH 5,0

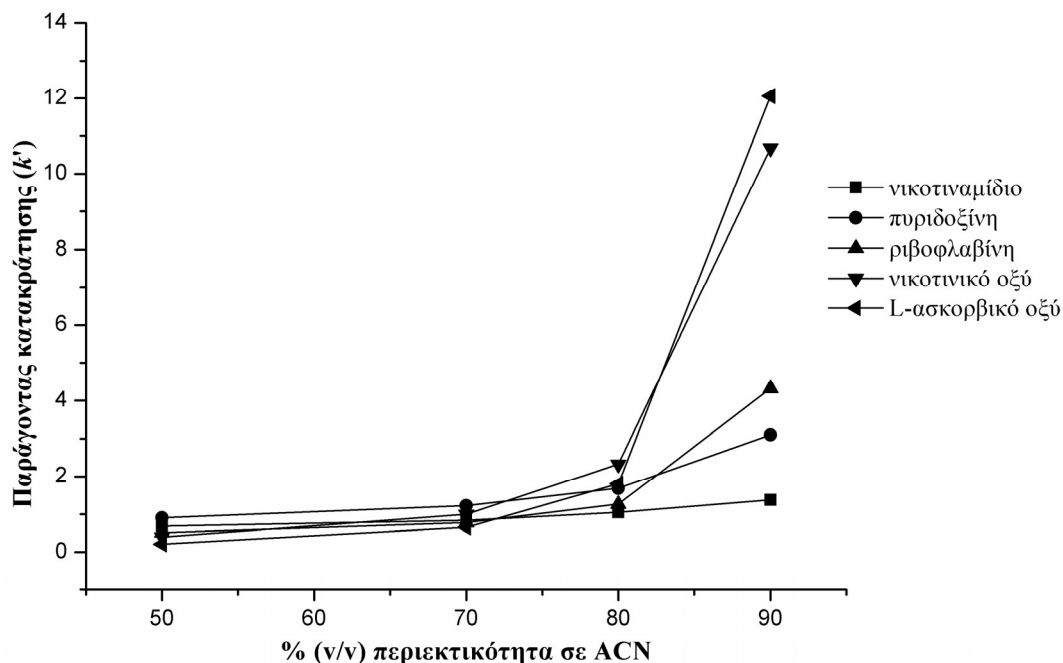
Η παρουσία TEA στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση της απόλυτης τιμής της ενθαλπίας στο νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ. Το γεγονός αυτό δείχνει μια περισσότερο αυθόρμητη μεταφορά από την κινητή προς τη στατική φάση λόγω της μείωσης της ηλεκτροστατικής άπωσης από το αρνητικό φορτίο της στήλης. Αυξάνοντας το ποσοστό του ύδατος στην κινητή φάση από 10 σε 20% (v/v), απουσία TEA, η απόλυτη τιμή ενθαλπίας της θειαμίνης αυξάνεται, που σημαίνει ότι μια πιο αυθόρμητη μεταφορά των μορίων από την κινητή προς τη στατική φάση εξελίσσεται. Η ελάττωση της συγκέντρωσης των ιόντων του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην υδατική στήλη συνεπάγεται αύξηση του διαθέσιμου αρνητικού φορτίου των σιλανομάδων. Μικρή αύξηση των απόλυτων τιμών ΔH λαμβάνει χώρα, επίσης και για τις υπόλοιπες ενώσεις γεγονός το οποίο πιθανό να οφείλεται στην αλλαγή του βαθμού συνεισφοράς των διαφορετικών μηχανισμών κατακράτησης [Christopherson *et al.*, 2006; Guo & Gaiki, 2005; Wu *et al.*, 2008] τείνοντας περισσότερο προς αυτόν της κατανομής.

Όταν μια ένωση έλκεται ηλεκτροστατικά από τη στατική φάση, λόγω του ότι οι δυνάμεις αυτές είναι πολύ πιο ισχυρές από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης και της κινητής φάσης, τα μόρια της ένωσης κρατούνται πιο ισχυρά και επομένως είναι πιο περιορισμένα στην κίνηση. Ο περιορισμός αυτός της κίνησης (motion restriction) των μορίων ή αλλιώς η μείωση της ελευθερίας κίνησης (reduced freedom of movement) ή η απώλεια της τυχαίας κίνησης (loss of randomness) μεταφράζεται ως μεταβολή της εντροπίας [Scott, 2003]. Έτσι, ο μηχανισμός κατιονανταλλαγής ο οποίος συμβάλλει σημαντικά στην κατακράτηση της θειαμίνης έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη θετικής τιμής εντροπίας ($\Delta S^\circ/R=+0,22$) σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ενώσεις όπου η εντροπία λαμβάνει αρνητικές τιμές ($-1,69 < \Delta S^\circ/R < -5,55$). Η παρουσία TEA στην κινητή φάση και ακόμα περισσότερο η αύξηση του ποσοστού του ύδατος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αρνητικών τιμών του λόγου $\Delta S^\circ/R$ για τη θειαμίνη, λαμβάνοντας τιμές $-0,70$ και $-1,76$ αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι το ποσοστό του ύδατος στην κινητή φάση επηρεάζει σημαντικά την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΜΗ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΗΣ ΠΥΡΙΤΙΑΣ

3.2.1 Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη με επικαλυμμένης πυριτίας, ως συνάρτηση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης, πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN από 50 έως και 90% (v/v) και με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 5,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση. Στο Σχήμα 3.2.1 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στους παράγοντες κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών.



Σχήμα 3.2.1: Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης A: [H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM, pH 5,0]

Διαλύτης B: [90% ACN / 10% H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 25 °C; Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

Ανιχνευτής: DAD, σε μήκη κύματος 254 και 272 nm.

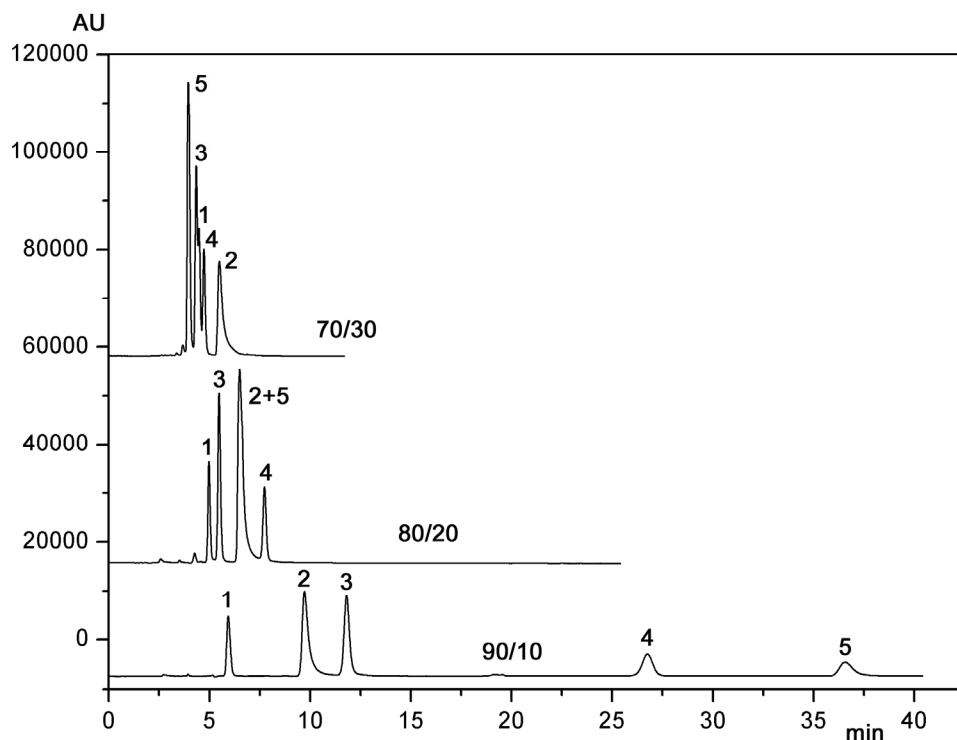
Σε αναλογία ACN/H₂O 50/50 έως και 70/30 (v/v) η πλειονότητα των ενώσεων εμφανίζει μικρή κατακράτηση ($0,21 < k' < 1,00$) στη στήλη. Αντίθετα, η θειαμίνη κατακρατείται πολύ ισχυρά ($k'=8,73$) σε αναλογία διαλυτών 50/50 ενώ με περεταίρω αύξηση του ποσοστού του ACN η έκλυση της ένωσης δεν είναι εφικτή. Σε pH 5,0 οι σιλανομάδες της στήλης είναι πλήρως αποπροτονιομένες και η επιφάνεια της πυριτίας δρα ως υλικό κατιονανταλλαγής ως προς τις θετικά φορτισμένες ενώσεις (βασικές) [Nawrocki, 1997; Grumbach *et al.*, 2004; Li & Huang, 2004; Ali *et al.*, 2007]. Ο μηχανισμός ιονανταλλαγής στην περίπτωση της θειαμίνης φαίνεται να κυριαρχεί και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύ πιο ισχυρές σε σχέση με τη στήλη διόλης–πυριτίας. Όσον αφορά τις υπόλοιπες ενώσεις, η κατακράτηση αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού σε ACN στην κινητή φάση (>70%, v/v), μια τυπική χρωματογραφική συμπεριφορά στην τεχνική της HILIC.

Η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών σε ποσοστό ACN μεγαλύτερο από 70% (v/v) είναι ικανοποιητική με το συντελεστή T_f να κυμαίνεται από 1,0 έως 1,5 (Πίνακας 3.2.1). Ο παράγοντας T_f για τη θειαμίνη σε αναλογία διαλυτών 50/50 είναι ίσος με 1,7, ενώ επιπλέον τιμές δεν ήταν δυνατό να ληφθούν λόγω της ισχυρής κατακράτησης της ένωσης από τη στήλη.

Πίνακας 3.2.1: Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 50/50	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο	1,3	1,2	1,2	1,3
πυριδοξίνη	1,5	1,4	1,3	1,3
ριβοφλαβίνη	1,2	1,2	1,2	1,2
νικοτινικό οξύ	1,3	1,2	1,1	1,0
L–ασκορβικό οξύ	1,2	1,3	1,2	1,2

Στο Σχήμα 3.2.2 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε αναλογίες ACN/H₂O 70/30, 80/20 και 90/10 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.2.



Σχήμα 3.2.2: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1. **Χρωματογραφικές κορυφές:** (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ.

Σε ποσοστό ACN 70% (v/v) ο διαχωρισμός των πέντε βιταμινών είναι ατελής ($0,37 < R_s < 2,27$), ενώ σε ποσοστό 80% (v/v) υπάρχει συνέκλουση του L-ασκορβικού οξέος με την πυριδοξίνη. Ο πλήρης διαχωρισμός του μίγματος επιτυγχάνεται σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v) (Πίνακας 3.2.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ποσοστό 70% (v/v) σε ACN το L-ασκορβικό οξύ, αν και είναι πολικό λόγω φορτίου, είναι η πρώτη ένωση που εκλύεται στο χρωματογράφημα. Επίσης, στο εύρος 70–80% σε ACN (v/v), το νικοτινικό οξύ εκλύεται πριν από την πυριδοξίνη. Λόγω του πλήρους αρνητικού φορτίου της επιφάνειας της στήλης, το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ δέχονται σε μεγάλο βαθμό ηλεκτροστατική άπωση. Εντούτοις, σε ποσοστό 90% (v/v) σε ACN, φαίνεται η ραγδαία αύξηση του χρόνου

κατακράτησης των δυο αυτών ενώσεων σε σχέση με το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη.

Πίνακας 3.2.2. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.2).

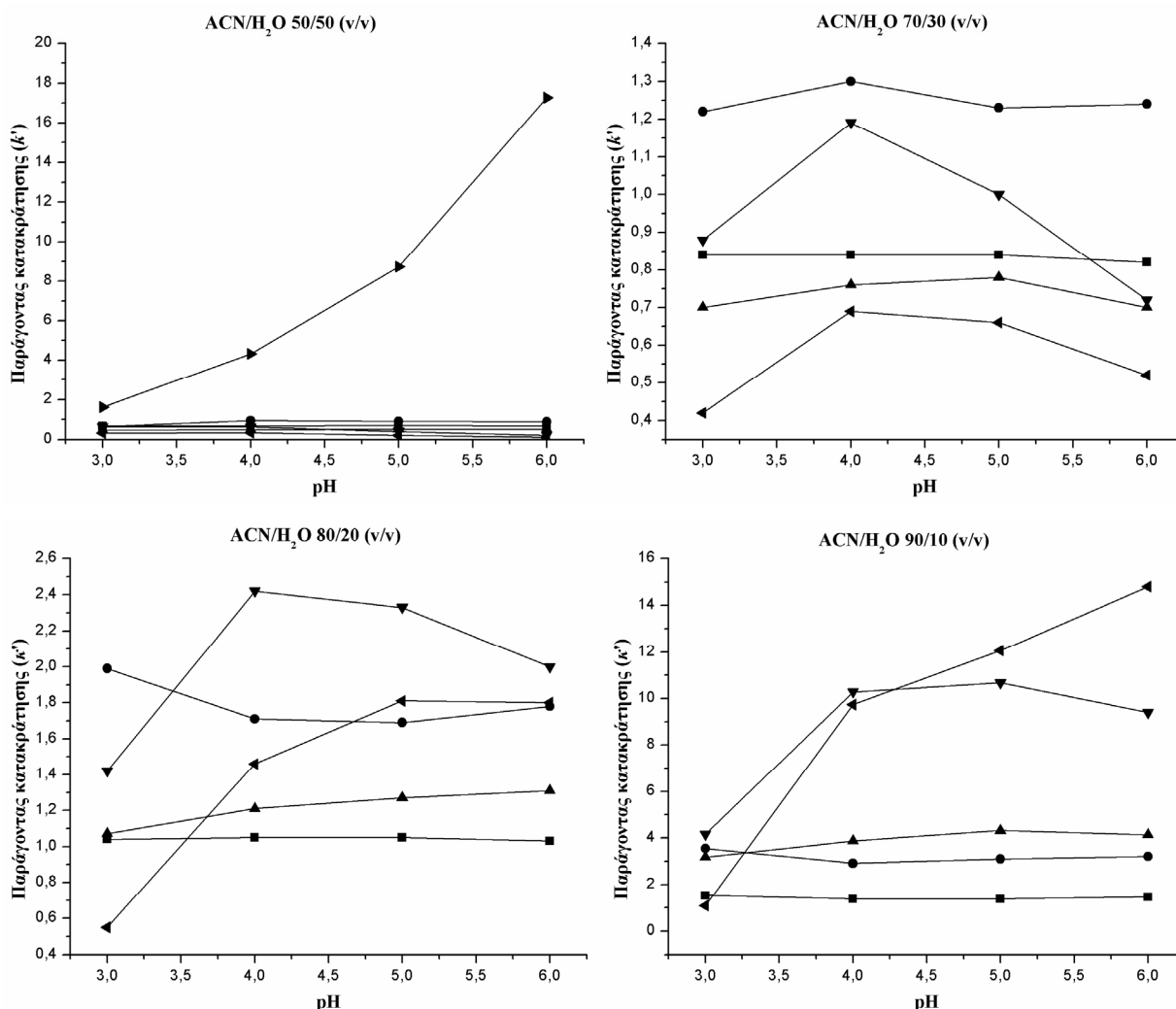
Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)		
	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	1,46 ⁵⁻³	2,11 ¹⁻³	8,54
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	0,37 ³⁻¹	–	4,03
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	0,69 ¹⁻⁴	συνέκλουση ²⁻⁵	20,32
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	2,27 ⁴⁻²	–	8,88

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

Στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, το φαινόμενο της ηλεκτροστατικής άπωσης είναι πολύ πιο αισθητό σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας στην οποία υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων. Καθώς αυξάνεται το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση, η ηλεκτροστατικές απώσεις που δέχονται οι αρνητικά φορτισμένες ενώσεις εξασθενούν και υπερισχύει η υδρόφιλη κατανομή των ενώσεων και οι δεσμοί υδρογόνου [Alpert, 2008]. Στο φαινόμενο αυτό, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα ιόντα του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος τα οποία σε υψηλά ποσοστά ACN τείνουν να κατανέμονται όλο και περισσότερο στην υδατική στιβάδα καλύπτοντας πιο αποτελεσματικά τα φορτισμένα κέντρα της επιφάνειας της πυριτίας. Έτσι σε ποσοστό 90% (v/v) σε ACN, η εκλεκτικότητα της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας είναι η ίδια με αυτή στη στήλη διόλης-πυριτίας.

3.2.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών ως προς το pH της κινητής φάσης, πραγματοποιήθηκε σε εύρος pH από 3,0 έως και 6,0, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτήν την περίπτωση ήταν το οξικό αμμώνιο/οξικό οξύ (4,0≤pH≤6,0) και το μυρμηκικό αμμώνιο/μυρμηκικό οξύ (pH 3,0) σε σταθερή συγκέντρωση 10 mM. Στο Σχήμα 3.2.3 φαίνεται η επίδραση του pH στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση.



Σχήμα 3.2.3: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένη πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1. Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◄) L-ασκορβικό οξύ.

Σε αναλογία ACN/H₂O 50/50 (v/v) η μεταβολή του pH της κινητής φάσης δεν επηρεάζει το χρόνο κατακράτησης των περισσότερων ενώσεων. Εξάιρεση αποτελεί το μόριο της θειαμίνης όπου είναι απόλυτα εμφανής ο κυρίαρχος ρόλος του μηχανισμού ιονανταλλαγής, ακόμα και σε συνθήκες μεγάλης εκλουστικής ισχύος. Η συγκεκριμένη χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης αποτελεί μειονέκτημα όσον αφορά την επίτευξη διαχωρισμού στο μίγμα. Τα μόρια της υδατικής στιβάδας, παρόλο που καλύπτουν την επιφάνεια της στήλης είναι προφανές ότι δεν μπορούν να εμποδίσουν τη δράση των φορτισμένων σιλανομάδων ως σημεία ιονανταλλαγής [Nguyen & Schug, 2008]. Η παρουσία

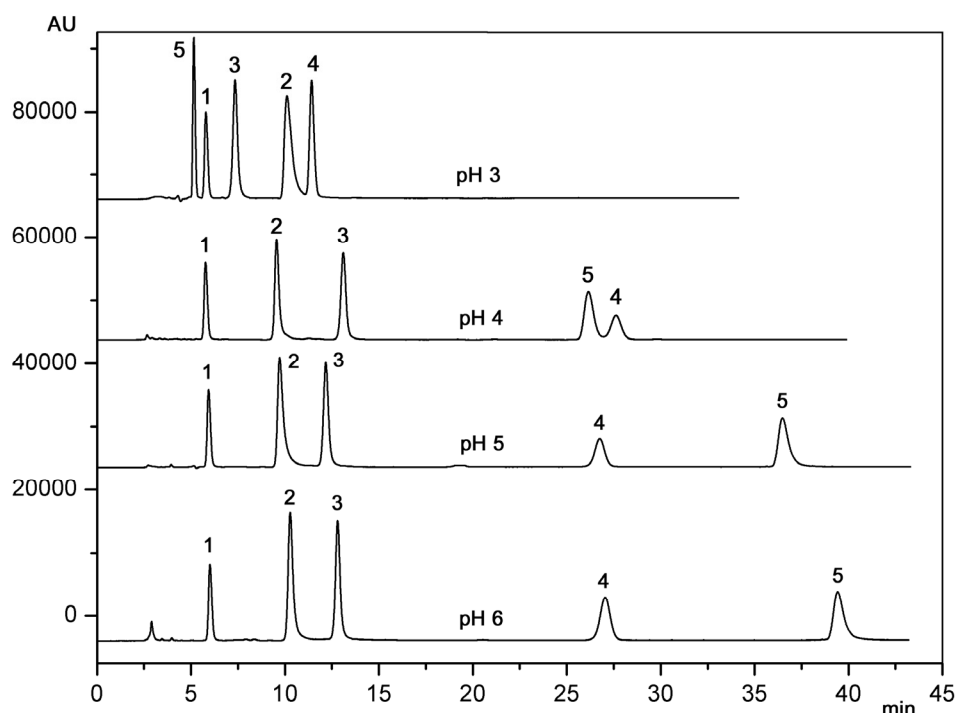
των ιόντων του άλατος (οξικά, αμμωνιακά), αν και αποτρέπει φαινόμενα όπως η μη αντιστρεπτή προσρόφηση βασικών ενώσεων στη στήλη [Li & Huang, 2004], πολλές φορές δεν είναι ικανή να ελέγξει αποτελεσματικά το μηχανισμό κατακράτησης σε περιπτώσεις ύπαρξης ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης. Επιπλέον, η χρήση αντιδραστηρίων ιοντικής ζεύξης (όπως το TFA) καθιστά δύσκολο το διαχωρισμό ενός μίγματος ενώσεων με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες (§ 3.1.5).

Η κατακράτηση του νικοτιναμίδιου και της ριβοφλαβίνης δεν επηρεάζεται από τη μεταβολή του pH της κινητής φάσης παρουσία ύδατος σε υψηλές αναλογίες. Έτσι, όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας, η μεταβολή του χρόνου κατακράτησης εξαρτάται από το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση ή αλλιώς από την υδρόφιλη κατανομή των ενώσεων και την ισχύ του διαλύτη έκλουσης. Διαφοροποίηση στο χρόνο κατακράτησης παρατηρείται για την πυριδοξίνη, σε ποσοστό $ACN \geq 70\%$ (v/v), κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στη στήλη διόλης-πυριτίας. Από το Σχήμα 3.2.3 φαίνεται ότι ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης μειώνεται με την αύξηση του pH από 3,0 σε 4,0, ενώ περαιτέρω αύξηση του pH δεν επιφέρει καμία μεταβολή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (§ 3.1.2), η πυριδοξίνη σε pH 3,0 φέρει θετικό φορτίο στον πυριδινικό δακτύλιο. Αν και στο pH αυτό ένα μικρό ποσοστό των σιλανομάδων της πυριτίας φέρει αρνητικό φορτίο, η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού τέτοιων ομάδων σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας ευνοεί ως ένα βαθμό την ύπαρξη ηλεκτροστατικής έλξης. Με την αύξηση του pH σε τιμές μεγαλύτερες του 4,0 το μόριο της πυριδοξίνης καθίσταται πρακτικά ουδέτερο και ο χρόνος κατακράτησης δεν μεταβάλλεται.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρωματογραφική συμπεριφορά του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τη φορτισμένη επιφάνεια της μη επικαλυμμένης πυριτίας και το πως αυτές οι δυνάμεις εξαρτώνται από το ποσοστό του ACN. Σε αναλογία διαλυτών 70/30 και 80/20 ACN/H₂O (v/v) η κατακράτηση του νικοτινικού οξέος αυξάνεται από pH 3,0 σε 4,0 και έπειτα ελαττώνεται σε pH 5,0 και 6,0. Επίσης, στις αναλογίες αυτές εμφανίζει συστηματικά μεγαλύτερη κατακράτηση από το L-ασκορβικό οξύ. Το μόριο του νικοτινικού οξέος σε pH 3,0 και 4,0 βρίσκεται υπό τη μορφή διπολικού ιόντος. Επιπλέον, σε pH > 3,0 η επιφάνεια της πυριτίας διαθέτει ένα σημαντικό αρνητικό φορτίο. Στην περίπτωση του νικοτινικού οξέος φαίνεται να υπερισχύει η ηλεκτροστατική έλξη έναντι της άπωσης [Takegawa *et al.*, 2006]. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, σε χρωματογραφικές τεχνικές που ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης είναι η κατανομή (όπως στην RPLC), μια ένωση κατά τη διέλευσή της από τη στήλη μπορεί να "προσανατολιστεί" με τέτοιο τρόπο ώστε μια συγκεκριμένη περιοχή του

μορίου, λόγω δομής, να ευνοεί την αλληλεπίδραση με την επιφάνεια της στατικής φάσης [Fausnaugh-Pollitt *et al.*, 1988; Alpert *et al.*, 1994; Alpert, 2008]. Σε $\text{pH} \geq 5,0$ επικρατεί το αρνητικό φορτίο της καρβοξυλομάδας στο μόριο με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η κατακράτησή του λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης. Το αρνητικό φορτίο του L-ασκορβικού οξέος σε $\text{pH} \geq 4,0$ είναι αυτό στο οποίο οφείλεται ο σύντομος χρόνος έκλουσης της ένωσης όπου σε αναλογία διαλυτών 70/30 ACN/H₂O εκλύεται σε μικρότερο χρόνο από το ουδέτερο νικοτιναμίδιο. Σε αναλογία διαλυτών 90/10 ACN/H₂O οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις απωστικής φύσεως μεταξύ των δυο οξέων και της στατικής φάσης δείχνουν να μη συμμετέχουν σημαντικά στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης με αποτέλεσμα το L-ασκορβικό οξύ να καθίσταται ξανά η ένωση που κατακρατείται περισσότερο και η σειρά έκλουσης του συνόλου των ενώσεων να είναι ίδια με αυτή στη στήλη διόλης-πυριτίας.

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2.4, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στον Πίνακα 3.2.3. Σε pH 3,0 το L-ασκορβικό οξύ εκλύεται πρώτο και ακολουθούν το νικοτιναμίδιο, η ριβοφλαβίνη, η πυριδοξίνη και το νικοτινικό οξύ. Αν και στις συνθήκες αυτές επέρχεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των πέντε βιταμινών (Πίνακας 3.2.3), οι χρόνοι κατακράτησης των ενώσεων είναι σχετικά μικροί. Το γεγονός αυτό δεν είναι ευνοϊκό στην περίπτωση ανάλυσης ενός δείγματος, στο οποίο συνήθως συνυπάρχουν μη πολικά ή μετρίως πολικά συστατικά. Σε pH 4,0 επέρχεται σημαντική διαφοροποίηση της εικόνας του χρωματογραφήματος, όπου οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος αυξάνονται ραγδαία, ενώ λαμβάνει χώρα αλλαγή στη σειρά έκλουσης της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης. Σε pH 5,0 ο χρόνος κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε σχέση με το νικοτινικό οξύ με ταυτόχρονη αλλαγή στην εκλεκτικότητα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η αλλαγή στην εκλεκτικότητα ως προς τα δυο οξέα οφείλεται στον εξής συνδυασμό φαινομένων: α) στην αντικατάσταση της ηλεκτροστατικής έλξης από την ηλεκτροστατική άπωση στο νικοτινικό οξύ, β) στην εμφάνιση αρνητικού φορτίου (πολικότητα) στο μόριο του L-ασκορβικού οξέος και γ) στην εξασθένιση της ηλεκτροστατικής άπωσης που δέχονται οι δυο ενώσεις σε υψηλά ποσοστά ACN στην κινητή φάση.



Σχήμα 3.2.4: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v).

Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ.

Τέλος, σε pH 6,0 δεν λαμβάνει χώρα σημαντική μεταβολή στους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων του μίγματος. Μικρές διαφοροποιήσεις στη διαχωριστική ικανότητα οφείλονται σε μικρές μεταβολές του εύρους των κορυφών.

Πίνακας 3.2.3: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του pH της κινητής φάσης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.4).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	2,51 ⁵⁻¹	10,31	8,54	10,72
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	10,58 ¹⁻³	7,19	5,10	4,91
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	1,93 ³⁻²	17,74	19,50	18,82
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	2,19 ²⁻⁴	1,49	8,91	10,29

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

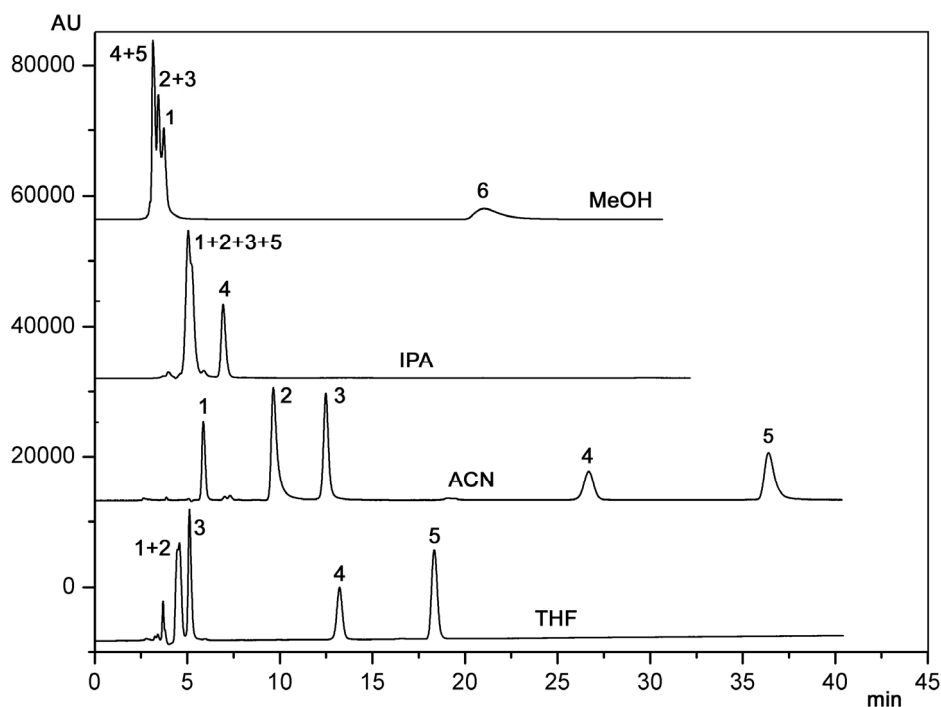
Η συμμετρία των κορυφών στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας είναι πολύ ικανοποιητική για το σύνολο των πέντε βιταμινών (Πίνακας 3.2.4). Ασυμμετρία εμφανίζεται στην κορυφή της πυριδοξίνης σε pH 3,0 ($T_f=1,6$). Η απουσία ηλεκτροστατικής έλξης, λόγω έλλειψης φορτίου σε τιμές $pH \geq 4,0$, στον πυριδινικό δακτύλιο του μορίου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της συμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής.

Πίνακας 3.2.4: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο	1,2	1,3	1,3	1,3
πυριδοξίνη	1,6	1,3	1,3	1,1
ριβοφλαβίνη	1,3	1,1	1,2	1,2
νικοτινικό οξύ	1,2	1,1	1,0	1,0
L-ασκορβικό οξύ	1,1	1,2	1,2	1,2

3.2.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη

Και στην περίπτωση της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας, μελετήθηκε η επίδραση του ACN, της MeOH, της IPA και του THF ως προς την κατακράτηση και το διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας, κάθε οργανικός διαλύτης συνδυάστηκε ξεχωριστά με υδατική κινητή φάση παρουσία οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM και σε pH 5,0. Επίσης, η έκλουση του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών έλαβε χώρα σε αναλογία οργανικού/υδατικού διαλύτη 90/10 (v/v), συνθήκες βέλτιστες ως προς το διαχωρισμό του μίγματος παρουσία ACN. Στο Σχήμα 3.2.5 παρατίθενται συγκριτικά χρωματογραφήματα της επίδρασης των διαφορετικών οργανικών διαλυτών στο διαχωρισμό.



Σχήμα 3.2.5: Επίδραση του ACN, της MeOH, της IPA και του THF στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας και σε αναλογία διαλυτών: Οργανικός/H₂O 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

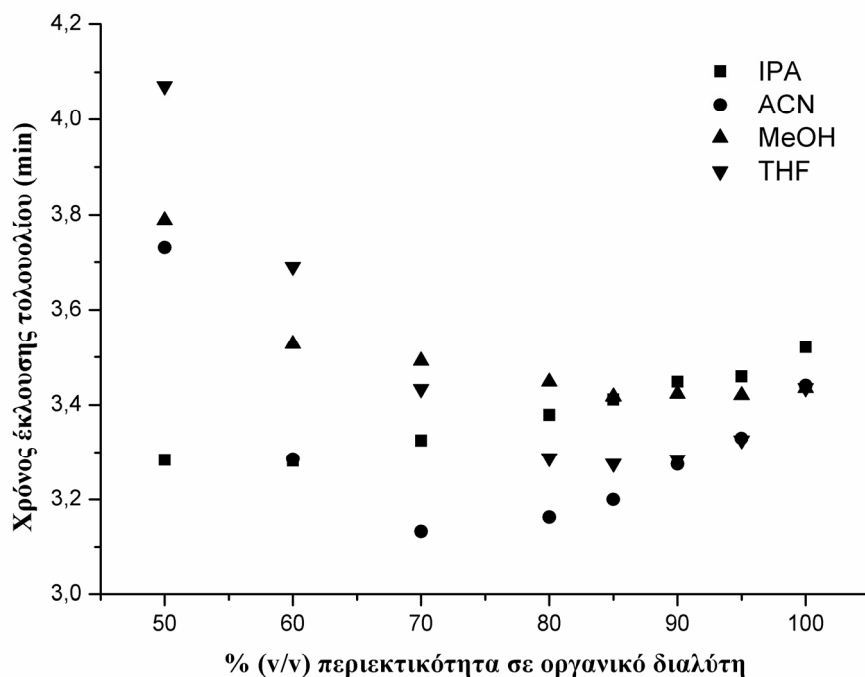
Η αντικατάσταση του ACN με MeOH στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη συνέκλωση των κορυφών στα πρώτα πέντε λεπτά του χρωματογραφήματος. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και η IPA στο μίγμα με τη διαφοροποίηση στο νικοτινικό οξύ το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης σε σχέση με τη MeOH (~7,4 min). Το THF εμφανίζει καλύτερη χρωματογραφική συμπεριφορά ως προς το διαχωρισμό του μίγματος σε σχέση με τη MeOH και την IPA. Εντούτοις, λαμβάνει χώρα σημαντική μείωση της κατακράτησης όλων των ενώσεων και συνέκλωση του ζεύγους νικοτιναμίδιο/πυριδοξίνη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η έκλυση της θειαμίνης είναι εφικτή μόνο παρουσία MeOH στην κινητή φάση και σε χρόνο ~21 min.

Η εκλουστική ισχύς των υπό μελέτη διαλυτών με βάση το διαχωρισμό των βιταμινών στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας έχει την εξής σειρά: ACN < THF < IPA < MeOH. Όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας, η εκλουστική ισχύς των υπό μελέτη διαλυτών δεν βρίσκεται σε συμφωνία με τη σειρά έκλυσης βασιζόμενη τόσο στην πολικότητά τους όσο και στην εκλουστική ισχύ (ϵ°).

Σύμφωνα με την § 3.1.3, οι δυο κύριοι λόγοι στους οποίους οφείλεται η απουσία κατακράτησης και διαχωρισμού είναι: α) η διατάραξη της υδατικής στιβάδας στην επιφάνεια της στήλης λόγω αντικατάστασης μορίων ύδατος από οργανικό διαλύτη και β) η αυξημένη ικανότητα των διαλυτών MeOH, IPA και THF σε σύγκριση με το ACN να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αποτέλεσμα τη μείωση της υδροφιλικότητας των ενώσεων.

Στο Σχήμα 3.2.6 απεικονίζεται γραφικά η μεταβολή του χρόνου έκλουσης του τολουολίου στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, παρουσία ACN, MeOH, IPA και THF χωρίς την προσθήκη άλατος στην κινητή φάση. Για το εξεταζόμενο εύρος περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη, ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παρουσία MeOH είναι μεγαλύτερος από το χρόνο έκλουσης στο ACN. Εντούτοις, παρουσία MeOH η διαφοροποίηση του χρόνου έκλουσης του τολουολίου στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας είναι μικρότερη σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με τη διαφοροποίηση της επιφάνειας των δυο στατικών φάσεων ως προς τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με μόρια ύδατος και οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί περεταίρω ως εξής: Γενικά, οι ομάδες σιλανόλης εμφανίζουν μεγαλύτερη οξύτητα σε σύγκριση με τις αλκοόλες (διόλη) και έχουν την ικανότητα να δημιουργούν ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου [West & Baney, 1959]. Έτσι, η επιφάνεια της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας δημιουργεί ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου με μόρια ύδατος με αποτέλεσμα η διατάραξη της υδατικής στιβάδας παρουσία MeOH να λαμβάνει χώρα σε μικρότερο βαθμό. Κατά συνέπεια, η επιφάνεια της μη επικαλυμμένης πυριτίας καθίσταται λιγότερο υδρόφοβη συγκριτικά με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παρουσία IPA είναι όμοιος με αυτόν στη στήλη διόλης-πυριτίας με εξαίρεση το εύρος περιεκτικότητας 50–60% (v/v). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι σε εύρος περιεκτικότητας 50–70% (v/v) το τολουόλιο εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης παρουσία THF.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα τόσο στη στήλη διόλης-πυριτίας όσο και στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, φαίνεται ότι αν και λαμβάνει χώρα διατάραξη της υδατικής στιβάδας σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, η χρωματογραφική συμπεριφορά των ενώσεων δείχνει να εξαρτάται εξίσου σημαντικά από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλύτη-κινητής φάσης (επιδιαλύτωση). Αυτό με τη σειρά του επηρεάζει το βαθμό κατανομής μιας ένωσης στη στιβάδα ύδατος, το χρόνο παραμονής σε αυτήν και το είδος και την ισχύ των αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια της στατικής φάσης.



Σχήμα 3.2.6: Επίδραση της παρουσίας των οργανικών διαλυτών ACN, MeOH, IPA, και THF στο χρόνο έκλουσης του τολουολίου σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας. Διαλύτης A: [100% H₂O], Διαλύτης B: [100% Οργανικός διαλύτης]. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1.

Στην HILIC, η χρησιμοποίηση διαλυτών με ισχυρή ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου (MeOH, IPA) είναι επιζήμια σε περιπτώσεις στις οποίες η κατακράτηση λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο μέσω υδρόφιλης κατανομής και δεσμών υδρογόνου (ουδέτερες ενώσεις). Αντίθετα, για ενώσεις που αλληλεπιδρούν με τη στήλη επιπλέον μέσω του μηχανισμού ιονανταλλαγής (φορτισμένες ενώσεις), η χρήση τέτοιων οργανικών διαλυτών φαίνεται να είναι ευνοϊκή ως προς φαινόμενα πολύ ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων τα οποία επιφέρουν δυσκολίες σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης, όπου σε υψηλές περιεκτικότητες οργανικού διαλύτη καθίσταται δυνατή η έκλουσή της μόνο παρουσία MeOH. Στην HILIC, η υδρόφιλη κατανομή και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι δυο βασικοί μηχανισμοί οι οποίοι δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους, αλλά συνεργιστικά ως προς την κατακράτηση μιας ένωσης [Alpert, 2008] με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγάλων χρόνων κατακράτησης. Όπως έχει προαναφερθεί (§ 3.1.3), η MeOH είναι πολύ πιο ισχυρός δότης-δέκτης δεσμών υδρογόνου σε σύγκριση με το ACN με αποτέλεσμα την ύπαρξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με τα μόρια της θειαμίνης και την ελάττωση του υδρόφιλου χαρακτήρα. Ταυτόχρονα όμως, διατηρείται σε σημαντικό βαθμό η δυνατότητα της

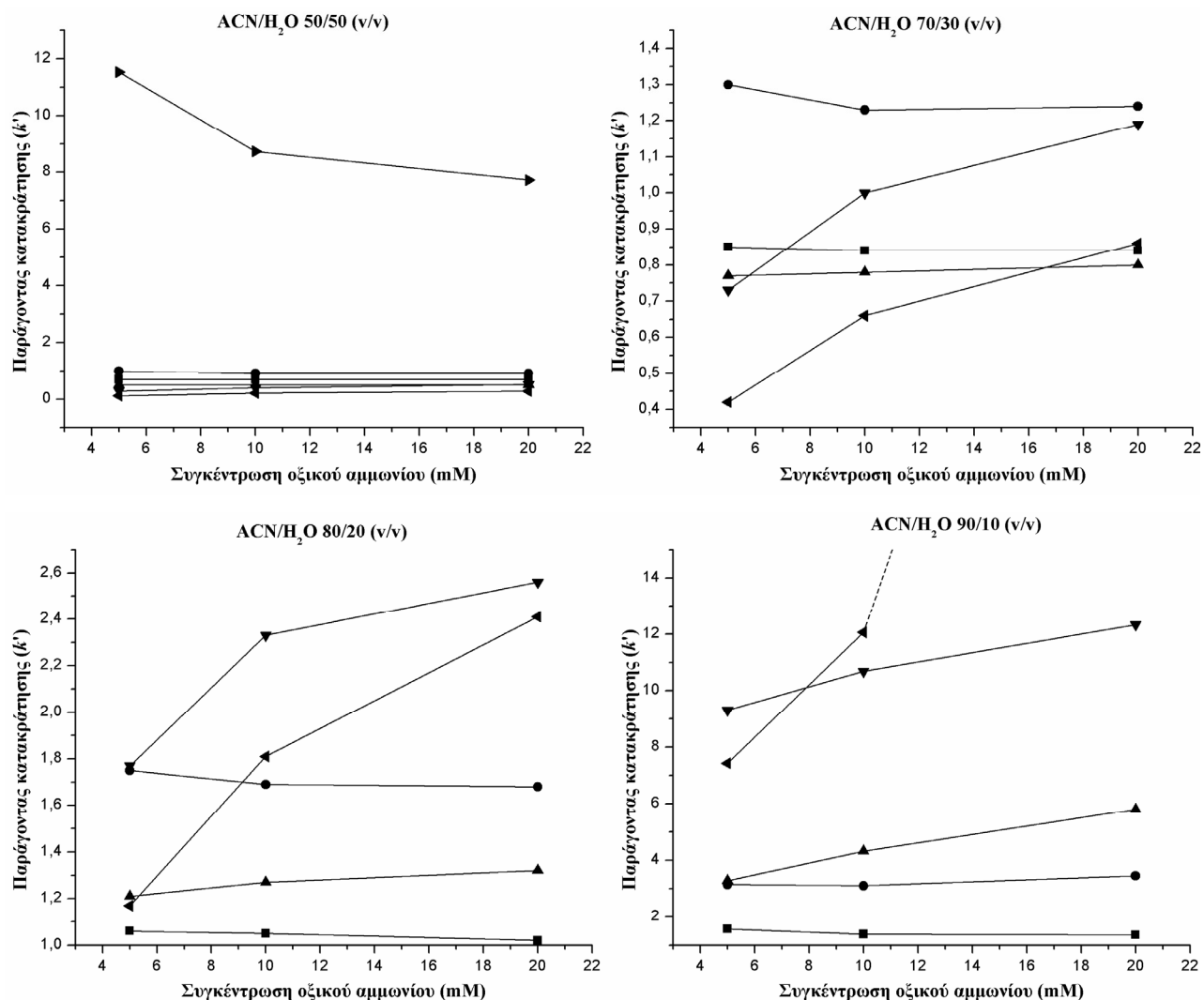
θειαμίνη να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την επιφάνεια της στήλης. Έτσι, σε περιπτώσεις ύπαρξης ανεπιθύμητα μεγάλων χρόνων κατακράτησης, η μείωση του υδρόφιλου χαρακτήρα της ένωσης μπορεί να λειτουργήσει θετικά [Liu *et al.*, 2009].

3.2.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου πραγματοποιήθηκε διατηρώντας σταθερό το pH της κινητής φάσης στην τιμή 5,0, όπου έλαβε χώρα ο διαχωρισμός των περισσότερων ενώσεων. Και σε αυτήν την περίπτωση, η συγκέντρωση του άλατος μεταβλήθηκε από 5 έως 20 mM.

Στο Σχήμα 3.2.7 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ACN. Όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας, ο παράγοντας κατακράτησης του νικοτιναμίδιου παραμένει αμετάβλητος στο εξεταζόμενο εύρος συγκέντρωσης του άλατος και σε κάθε αναλογία ACN/H₂O στην κινητή φάση. Η χρωματογραφική συμπεριφορά της πυριδοξίνης είναι διαφορετική σε σχέση με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Συγκεκριμένα, σε ποσοστό ACN 70–80% (v/v) η κατακράτηση της πυριδοξίνης ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου από 5 σε 10 mM, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν επιφέρει καμία επίδραση. Σε ποσοστό 90% σε ACN, η μεταβολή της κατακράτησης της πυριδοξίνης είναι μικρότερη. Η ύπαρξη μερικού θετικού φορτίου στον πυριδινικό δακτύλιο και ο μεγάλος αριθμός αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων στην επιφάνεια της πυριτίας δικαιολογεί την ύπαρξη ασθενούς ηλεκτροστατικής έλξης, η οποία εξαλείφεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου. Όσον αφορά τη ριβοφλαβίνη, σε ποσοστό 80–90% σε ACN, αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του παράγοντα κατακράτησης. Εφόσον η ριβοφλαβίνη δεν συμμετέχει σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η αύξηση της υδροφιλικότητας της υδατικής στιβάδας με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου [Guo & Gaiki, 2005] δικαιολογεί ικανοποιητικά αυτήν τη χρωματογραφική συμπεριφορά. Οι παράγοντες κατακράτησης του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος αυξάνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου λόγω της μείωσης της ηλεκτροστατικής άπωσης [Guo *et al.*, 2007]. Μια επιπλέον διαφοροποίηση σε σχέση με τη στήλη διόλης-πυριτίας είναι ότι, σε ποσοστό ACN 70–80% (v/v), το L-ασκορβικό οξύ δέχεται μεγαλύτερη ηλεκτροστατική άπωση από την επιφάνεια της πυριτίας σε σύγκριση με

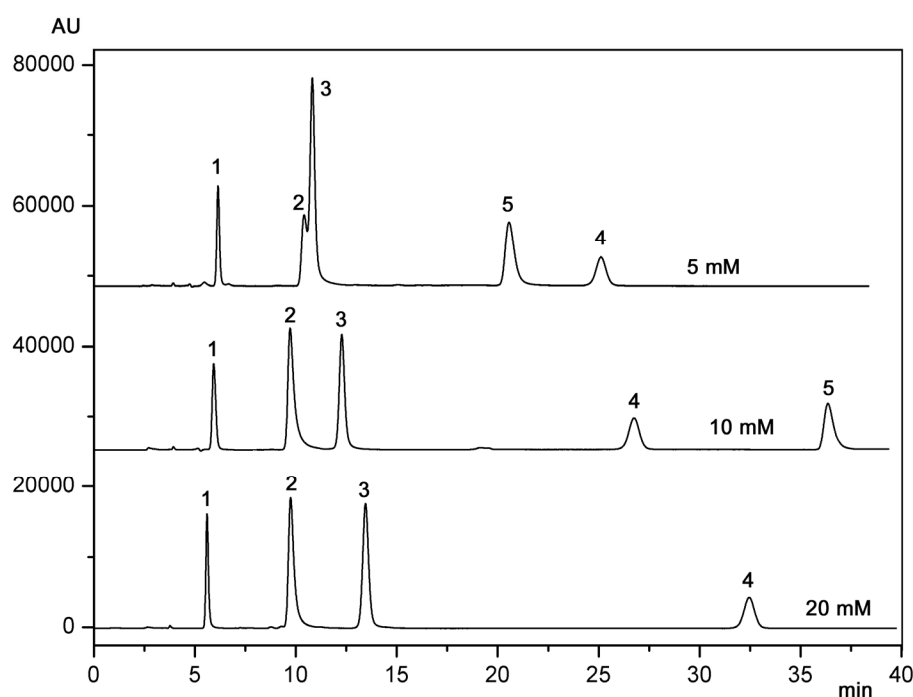
το νικοτινικό οξύ με αποτέλεσμα να εκλύεται συστηματικά σε μικρότερο χρόνο. Η μικρότερη ηλεκτροστατική άπωση που δέχεται το νικοτινικό οξύ είναι πιθανό να οφείλεται στο δραστικό φορτίο του μορίου το οποίο ελαττώνεται έως ένα βαθμό λόγω της δυνατότητας ευκινησίας μέσω συντονισμού [Christopherson *et al.*, 2006].



Σχήμα 3.2.7: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1. Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◄) L-ασκορβικό οξύ, (►) θειαμίνη.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου καταγράφεται μόνο σε αναλογία 50/50 ACN/H₂O (v/v), δεδομένης της ισχυρής κατακράτησης του μορίου από τη στήλη πυριτίας. Αν και το ποσοστό του ύδατος στην κινητή φάση είναι πολύ υψηλό, ο μηχανισμός επιφανειακής προσρόφησης είναι εμφανής. Έτσι, η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου επιφέρει μείωση του παράγοντα κατακράτησης της θειαμίνης, μια τυπική χρωματογραφική συμπεριφορά του μηχανισμού ιονανταλλαγής. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων αμμωνίου συμβάλουν στη μείωση της ηλεκτροστατικής έλξης με αποτέλεσμα τη μείωση της κατακράτησης της θειαμίνης [Li & Huang, 2004; Pack & Risley, 2005; Olsen, 2001; Dell'Aversano *et al.*, 2006; Strege, 1998; Liu *et al.*, 2008].

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.8, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.5.



Σχήμα 3.2.8: Επίδραση της συγκέντρωσης του CH₃COONH₄ στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ.

Σε συγκέντρωση οξικού αμμωνίου 5 mM, η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης της ριβοφλαβίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας για το ζεύγος πυριδοξίνη/ριβοφλαβίνη, με αποτέλεσμα τον ατελή διαχωρισμό τους ($R_s=0,70$). Η μείωση του χρόνου κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος, λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης από την επιφάνεια της στήλης, είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το νικοτινικό οξύ γεγονός το οποίο συντελεί στην αντιστροφή της εκλεκτικότητας της στήλης (Σχήμα 3.2.8).

Πίνακας 3.2.5. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.8).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (R_s)		
	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	7,72	8,54	11,10
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	0,67	5,10	7,00
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	15,54 ³⁻⁵	19,50	20,70
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	5,16 ⁵⁻⁴	8,91	—

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

Η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου από τα 10 στα 20 mM, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης ως προς τα ζεύγη νικοτιναμίδιο/πυριδοξίνη και πυριδοξίνη/ριβοφλαβίνη (Πίνακας 3.2.5). Η χρωματογραφική συμπεριφορά του L-ασκορβικού οξέος είναι αντίστοιχη με αυτή στη στήλη διόλης-πυριτίας. Συγκεκριμένα, εμφανίζει ισχυρή κατακράτηση με αποτέλεσμα να μην εκλούεται από τη στήλη σε χρόνο μικρότερο των 50 min.

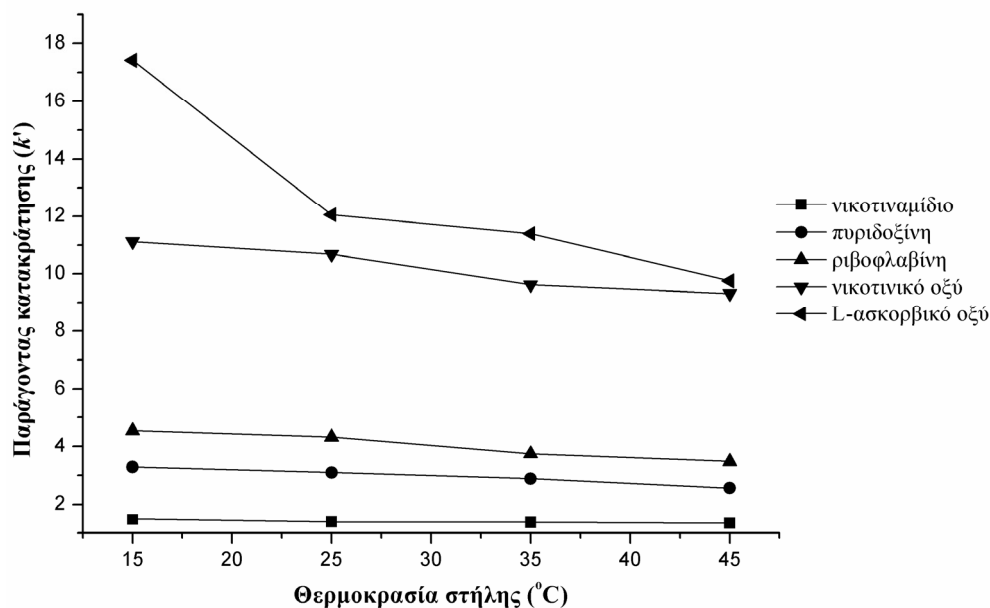
Η συμμετρία των κορυφών είναι ικανοποιητική σε συγκέντρωση οξικού αμμωνίου 10 και 20 mM (Πίνακας 3.2.6). Λόγω του ατελούς διαχωρισμού, οι τιμές T_f για την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη σε συγκέντρωση 5 mM λήφθηκαν με έγχυση της κάθε ένωσης ξεχωριστά. Η εμφάνιση ασυμμετρίας της κορυφής της πυριδοξίνης ($T_f=1,7$) επιβεβαιώνει την ύπαρξη ηλεκτροστατικής έλξης από την επιφάνεια της στήλης, η οποία πρακτικά εξαλείφεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση.

Πίνακας 3.2.6: Επίδραση της συγκέντρωσης του $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f		
	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM
νικοτιναμίδιο	1,2	1,3	1,2
πυριδοξίνη	1,7	1,4	1,3
ριβοφλαβίνη	1,1	1,2	1,1
νικοτινικό οξύ	1,3	1,0	1,0
L-ασκορβικό οξύ	1,1	1,2	—

3.2.5 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία της στήλης από τους 15 έως τους 45 °C. Η σύσταση της κινητής φάσης παρέμεινε σταθερή αποτελούμενη από μίγμα ACN/H₂O 90/10 (v/v) παρουσία οξικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 10 mM και pH 5,0. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης όλων των υπό εξέταση ενώσεων (Σχήμα 3.2.9) με το φαινόμενο να είναι πιο αισθητό στο μόριο του L-ασκορβικού οξέος ($17,42 < k' < 9,75$). Σε αντίθεση με τη στήλη διόλης-πυριτίας (§ 3.1.7), η μείωση του παράγοντα κατακράτησης του νικοτινικού οξέος ($11,12 < k' < 9,31$) είναι μικρότερη κατά ~1,3 μονάδες. Η ύπαρξη μερικού θετικού φορτίου στον πυριδινικό δακτύλιο του μορίου σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη πυκνότητα αρνητικού φορτίου στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας είναι πιθανό να δικαιολογεί την ύπαρξη ασθενούς ηλεκτροστατικής έλξης με αποτέλεσμα η μείωση της κατακράτησης του μορίου να λαμβάνει χώρα σε μικρότερο βαθμό.



Σχήμα 3.2.9. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1.

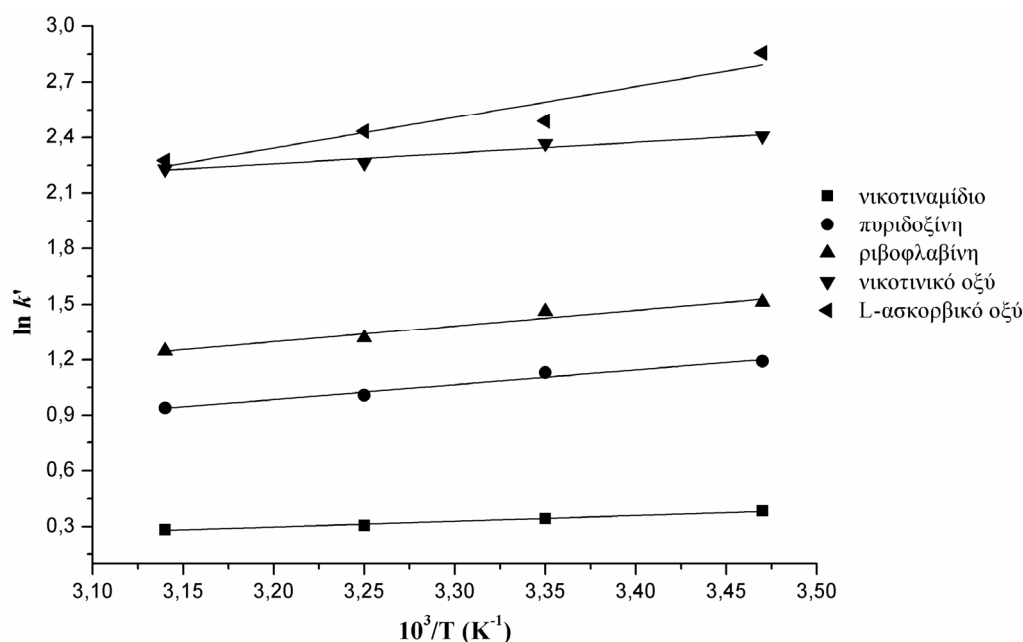
Κατά αντιστοιχία, με την αύξηση της θερμοκρασίας επέρχεται μείωση και στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης (Πίνακας 3.2.7) ως προς το μίγμα των βιταμινών. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μείωση της κατακράτησης είναι μεγαλύτερη στο νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα τον ατελή διαχωρισμό τους ($R_s=1,19$) σε θερμοκρασία 45 °C.

Πίνακας 3.2.7: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της θερμοκρασίας της στήλης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.9).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (R_s)			
	T=15 °C	T=25 °C	T=35 °C	T=45 °C
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	11,41	8,54	8,48	8,26
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	5,75	5,10	5,10	5,03
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	20,18	19,50	20,45	21,12
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	10,43	8,91	4,41	1,19
Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$				

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης της εξίσωσης van't Hoff (Σχήμα 3.2.10, Πίνακας 3.2.8) υπάρχει γραμμική συσχέτιση για το νικοτιναμίδιο και τη ριβοφλαβίνη ($0,9915 < R^2 < 0,9944$) γεγονός το οποίο συνηγορεί στην ύπαρξη ενός μηχανισμού κατακράτησης στον οποίο κυριαρχεί η κατανομή. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§ 3.2.4), η ύπαρξη ασθενούς ηλεκτροστατικής έλξης της πυριδοξίνης και του νικοτινικού οξέος (λόγω μερικού θετικού φορτίου στον πυριδινικό δακτύλιο) από την επιφάνεια της πυριτίας δικαιολογεί την απόκλιση από τη γραμμικότητα της εξίσωσης van't Hoff. Απόκλιση από τη γραμμικότητα εμφανίζει και το L-ασκορβικό οξύ γεγονός το οποίο οφείλεται στις προαναφερθείσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλλά και στη μείωση της ισχύος των δεσμών υδρογόνου.

Όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας, οι τιμές ενθαλπίας για το σύνολο των ενώσεων έχουν αρνητική τιμή και κυμαίνονται από $-2,55$ έως $-13,84$ kJ/mol, το οποίο σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων είναι μια εξώθερμη διεργασία (ενεργειακά αυθόρμητη) και μειώνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία [Guo, 2005; Guo & Gaiki, 2005; Luo *et al.*, 2008].



Σχήμα 3.2.10: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης van't Hoff για το εύρος θερμοκρασίας 15–45 °C. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.9.

Οι τιμές εντροπίας των περισσότερων ενώσεων έχουν αρνητικές τιμές. Εξαίρεση αποτελεί το νικοτινικό οξύ για το οποίο η τιμή της εντροπίας είναι θετική (Πίνακας 3.2.8). Η διαφοροποίηση αυτή, όσον αφορά το νικοτινικό οξύ, αποτελεί επιπρόσθετη επιβεβαίωση της ύπαρξης τόσο ελκτικών όσο και απωστικών δυνάμεων με την επιφάνεια της πυριτίας γεγονός το οποίο αναδεικνύει και την πολυπλοκότητα του μηχανισμού στην HILIC.

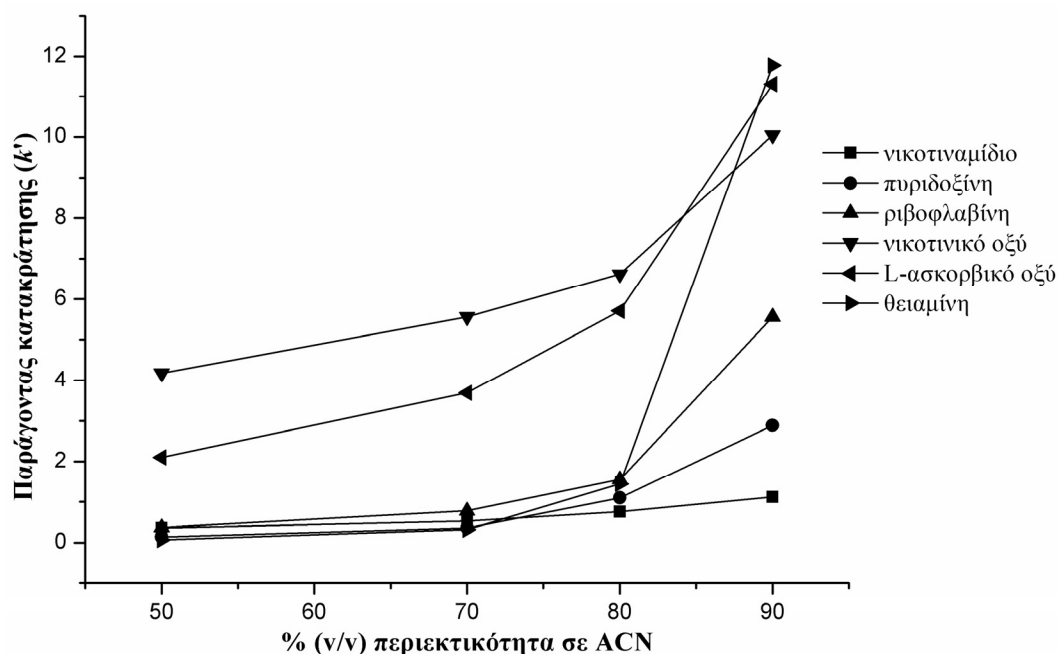
Πίνακας 3.2.8: Τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης, της ενθαλπίας και του λόγου $\Delta S^\circ/R$ της εξίσωσης van't Hoff.

Ένωση	R^2	ΔH° (kJ/mol)	$\Delta S^\circ/R$
νικοτιναμίδιο	0,9915	-2,55	-0,68
πυριδοξίνη	0,9725	-6,65	-1,57
ριβοφλαβίνη	0,9944	-7,14	-1,46
νικοτινικό οξύ	0,9460	-4,84	+0,39
L-ασκορβικό οξύ	0,9120	-13,84	-2,98

3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΑΜΙΝΟ-ΠΥΡΙΤΙΑΣ

3.3.1 Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών, στη στήλη αμινο-πυριτίας, ως συνάρτηση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN από 50 έως και 90% (v/v) και με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και σε pH 3,0, τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση. Στο Σχήμα 3.3.1 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στους παράγοντες κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών.



Σχήμα 3.3.1: Επίδραση του ποσοστού του ACN στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης Α: [H₂O + HCOONH₄ 10 mM, pH 3,0]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% H₂O + HCOONH₄ 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 25 °C; Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

Ανιχνευτής: DAD, σε μήκη κύματος 254 και 272 nm.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των ιονιζόμενων υδατοδιαλυτών βιταμινών στη στήλη αμινο-πυριτίας επιδεικνύει μεγάλες διαφορές σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας. Σε αναλογία διαλυτών 50/50 έως και 70/30 (v/v) ACN/H₂O το νικοτιναμίδιο, η πυριδοξίνη, η ριβοφλαβίνη και η θειαμίνη εμφανίζουν μικρή κατακράτηση ($0,07 < k' < 0,78$) στη στήλη. Αντίθετα, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ εμφανίζουν σχετικά μεγάλη κατακράτηση στις παραπάνω συνθήκες δεδομένης της μεγάλης ισχύος του διαλύτη έκλουσης [Guo *et al.*, 2007]. Η συμπεριφορά των ενώσεων στις συνθήκες αυτές επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός μικτού μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC. Το μόριο της θειαμίνης εκλούεται νωρίτερα από τις υπόλοιπες ενώσεις λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης που δέχεται το μόριο από τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης. Το νικοτινικό οξύ σε pH 3,0 φέρει τόσο θετικό όσο και αρνητικό φορτίο (§ 3.1.2). Εντούτοις, φαίνεται να υπερισχύει η ηλεκτροστατική έλξη έναντι της άπωσης και να κατακρατείται ισχυρά. Όπως προαναφέρθηκε στην § 3.2.2, το νικοτινικό οξύ, κατά τη διέλευσή του από τη στήλη, φαίνεται να "προσανατολίζεται" κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να λαμβάνει χώρα ηλεκτροστατική έλξη από την επιφάνεια της στήλης [Fausnaugh-Pollitt *et al.*, 1988; Alpert *et al.*, 1994]. Η χρωματογραφική συμπεριφορά του L-ασκορβικού οξέος μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: α) στην ύπαρξη μερικού φορτίου που ευνοεί έως ένα βαθμό την ηλεκτροστατική έλξη από την επιφάνεια της στήλης, β) στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου τόσο με μόρια ύδατος όσο και με τη στατική φάση και γ) στον περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα από άποψη δομής του μορίου. Σε ποσοστό 90% (v/v) σε ACN, ο χρόνος κατακράτησης του συνόλου των ενώσεων αυξάνεται και, όπως και στήλη διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας, το φαινόμενο είναι πιο αισθητό στις ενώσεις που φέρουν φορτίο.

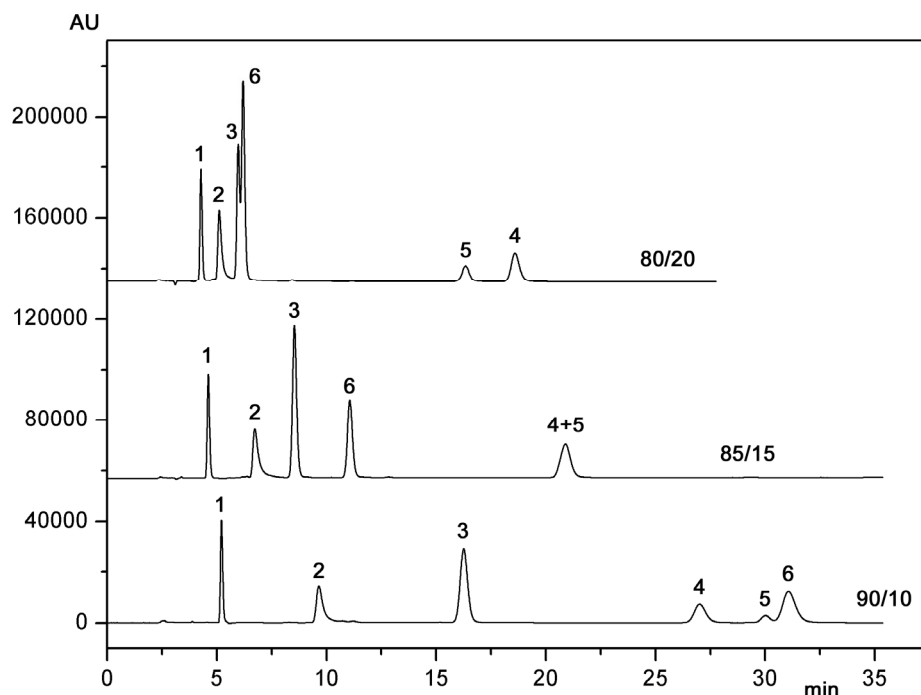
Συνολικά οι ενώσεις έχουν πολύ ικανοποιητική συμμετρία, συμπεριλαμβανομένης και της θειαμίνης, με τον παράγοντα T_f να κυμαίνεται από 1,1 έως 1,3 σε ποσοστό ACN $\geq 70\%$ (v/v) (Πίνακας 3.3.1). Όσον αφορά το μόριο της θειαμίνης, οι ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ελκτικής φύσης που λαμβάνουν χώρα στη στήλη διόλης-πυριτίας, και σε μεγαλύτερο βαθμό στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, έχουν αντικατασταθεί με την ηλεκτροστατική άπωση από την στήλη αμινο-πυριτίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ένωση να εκλούεται σε μικρότερο χρόνο και να λαμβάνεται συμμετρική χρωματογραφική κορυφή [Fornstedt *et al.*, 1996].

Πίνακας 3.3.1: Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 50/50	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο	1,3	1,2	1,2	1,2
πυριδοξίνη	1,4	1,4	1,3	1,3
ριβοφλαβίνη	1,3	1,2	1,2	1,1
νικοτινικό οξύ	1,2	1,2	1,2	1,1
L-ασκορβικό οξύ	1,2	1,1	1,1	1,1
θειαμίνη	1,3	1,3	1,2	1,1

Στο Σχήμα 3.3.2 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε αναλογίες ACN/H₂O 80/20, 85/15 και 90/10 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης για το μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.3.2. Σε σχέση με τις δυο προηγούμενες στατικές φάσεις, η σειρά έκλουσης στη στήλη αμινο-πυριτίας είναι η ίδια για το νικοτιναμίδιο την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη, ενώ πολύ διαφορετική όσον αφορά τη θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ και το L-ασκορβικό οξύ. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ύπαρξη και σημαντική συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων ιονανταλλαγής στο συνολικό μηχανισμό της HILIC [Guo & Gaiki, 2005; Liu *et al.*, 2008].

Σε ποσοστό ACN 80% (v/v), η θειαμίνη είναι η τέταρτη ένωση στη σειρά έκλουσης και ο διαχωρισμός της είναι ατελής με το μόριο της ριβοφλαβίνης ($R_s=0,68$). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η θειαμίνη δέχεται ηλεκτροστατική άπωση από τη στήλη με αποτέλεσμα να εκλούεται σε μικρότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τις προηγούμενες στατικές φάσεις. Το νικοτινικό οξύ εμφανίζει τη μεγαλύτερη κατακράτηση λόγω του αμφολυτικού χαρακτήρα του μορίου και της ύπαρξης ηλεκτροστατικής έλξης από τη στήλη. Σε ποσοστό ACN 85% (v/v) λαμβάνει χώρα πλήρης διαχωρισμός μεταξύ της ριβοφλαβίνης και της θειαμίνης, ενώ το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ εκλούνται στον ίδιο χρόνο (Πίνακας 3.3.2). Αξιοσημείωτη είναι η εικόνα του χρωματογραφήματος σε ποσοστό ACN 90% (v/v), όπου η σειρά έκλουσης είναι η ίδια με αυτήν των στηλών διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας. Εντούτοις, ο διαχωρισμός του ζεύγους ενώσεων L-ασκορβικό οξύ/θειαμίνη είναι ατελής ($R_s=1,10$).



Σχήμα 3.3.2: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Με την αύξηση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση, η ηλεκτροστατική άπωση που δέχεται η θειαμίνη από τη στήλη, λόγω ομώνυμου φορτίου, εξασθενεί λόγω της προτιμώμενης κατανομής των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα. Το φαινόμενο αυτό, και σε συνδυασμό με τη μεγάλη διαφορά πολικότητας μεταξύ της στιβάδας ύδατος και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης, έχει ως αποτέλεσμα η κατακράτηση να οφείλεται κατά κύριο λόγο στον υδρόφιλο χαρακτήρα της ένωσης και στην τάση που έχει να κατανέμεται στην υδατική στιβάδα. Επίσης, υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου, τόσο με τα μόρια ύδατος της "ακίνητοποιημένης" στιβάδας όσο και με τη στατική φάση συμβάλλουν σημαντικά στο συνολικό μηχανισμό [Alpert, 2008]. Σημειωτέο, ότι η θειαμίνη σε pH 3,0 φέρει θετικό φορτίο τόσο στο θειαζολικό όσο και στον πυριμιδινικό δακτύλιο. Οι δεσμοί υδρογόνου φαίνεται επίσης να κρίνουν και την αντιστροφή της εκλεκτικότητας ως προς το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ.

Πίνακας 3.3.2. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.2).

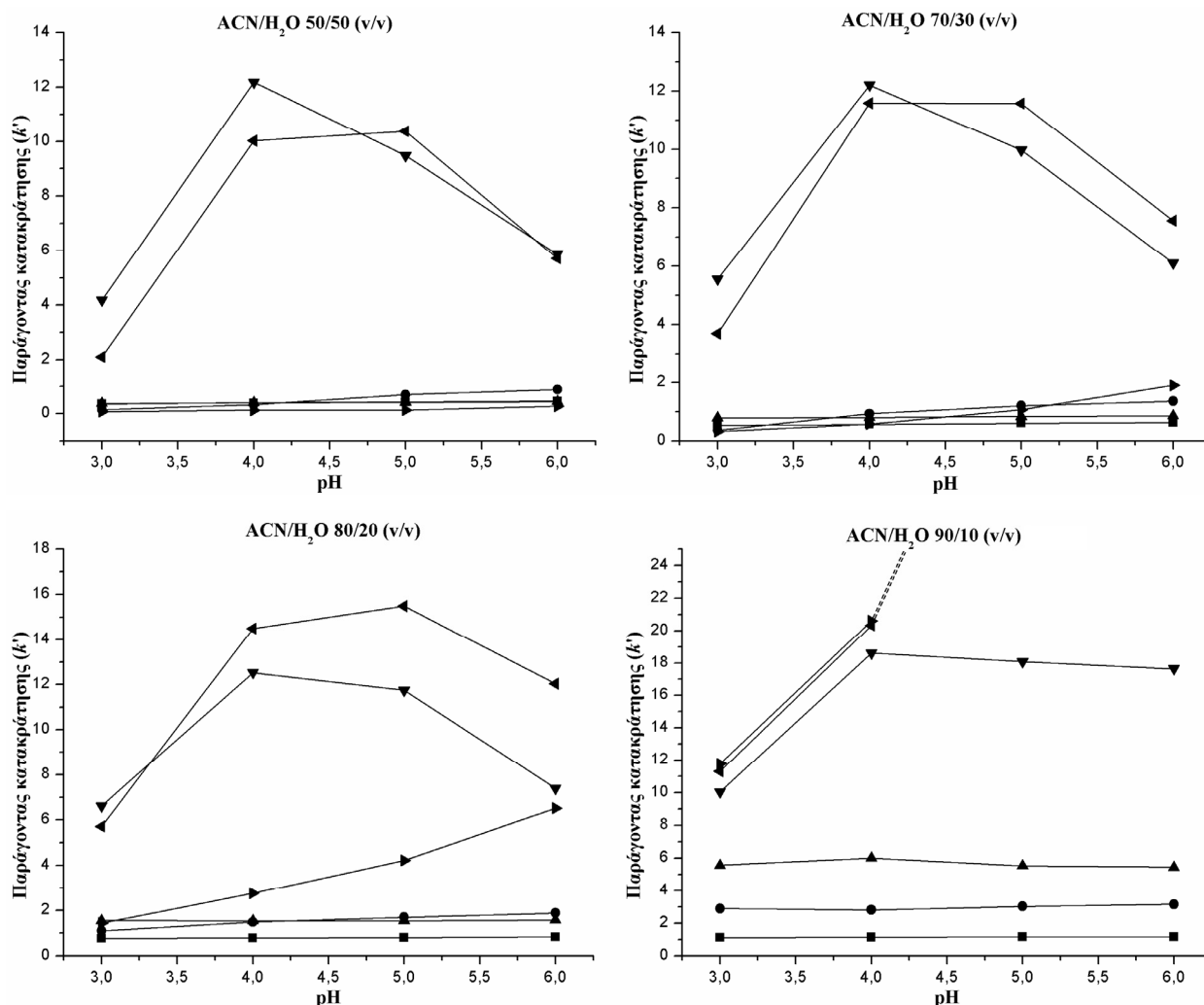
Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)		
	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 85/15	ACN/H ₂ O 90/10
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	3,18	6,44	11,97
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	2,65	4,48	11,22
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	0,68 ³⁻⁶	6,36 ³⁻⁶	13,17
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	27,16 ⁶⁻⁵	συνέκλωση	3,37
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	3,90 ⁵⁻⁴	–	1,10

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

3.3.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών ως προς το pH της κινητής φάσης, πραγματοποιήθηκε σε εύρος pH από 3,0 έως και 6,0, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλωσης. Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το οξικό αμμώνιο/οξικό οξύ ($4,0 \leq \text{pH} \leq 6,0$) και το μυρμηκικό αμμώνιο/μυρμηκικό οξύ (pH 3,0) σε σταθερή συγκέντρωση άλατος και ίση προς 10 mM. Στο Σχήμα 3.3.3 φαίνεται η επίδραση του pH στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση.

Μεταβάλλοντας το pH της κινητής φάσης οι παράγοντες κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης παραμένουν πρακτικά ανεπηρέαστοι. Κυρίαρχο ρόλο στην αύξηση του χρόνου κατακράτησης διαδραματίζει η ισχύς του διαλύτη έκλωσης και, όπως στη στήλη διόλης–πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας, οι χρόνοι κατακράτησης των ενώσεων αυτών αυξάνονται με την αύξηση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση. Η χρωματογραφική συμπεριφορά του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος στη στήλη αμινο–πυριτίας είναι πολύ διαφορετική σε σύγκριση με τις άλλες δυο στατικές φάσεις. Συγκεκριμένα, παρουσία ACN σε ποσοστό 50–80% (v/v) λαμβάνει χώρα αύξηση του χρόνου κατακράτησης με την αύξηση του pH από την τιμή 3,0 σε 4,0, ενώ σε pH 5,0 και 6,0 λαμβάνει χώρα σημαντική ελάττωση.



Σχήμα 3.3.3: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο-πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.1.

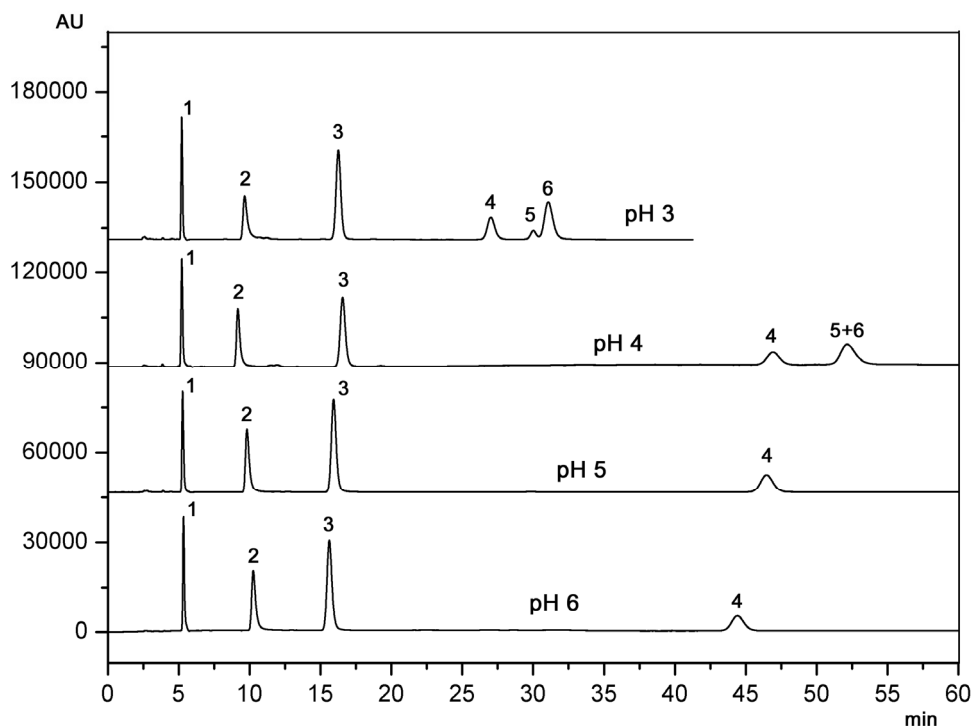
Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◄) L-ασκορβικό οξύ, (►) θειαμίνη.

Σε ποσοστό ACN 90% (v/v) η κατακράτηση του L-ασκορβικού οξέος είναι πολύ μεγάλη με αποτέλεσμα σε pH 5,0 και 6,0 να μην εκλούεται υπό ισοκρατικές συνθήκες σε χρόνο μικρότερο των 50 min. Το νικοτινικό οξύ επιδεικνύει την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με το L-ασκορβικό οξύ σε χαμηλότερες περιεκτικότητες σε ACN με τη διαφορά ότι η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτινικού οξέος σε pH 5,0 και 6,0 είναι μικρότερη. Σε pH 3,0 και 4,0 αντίστοιχα, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ φέρουν σημαντικό αρνητικό φορτίο με συνέπεια την κατακράτηση των ενώσεων, μέσω του μηχανισμού ανιονανταλλαγής. Επιπλέον, το μυρμηκικό και το οξικό οξύ βρίσκονται κυρίως

στην πρωτονιωμένη τους μορφή, σε pH 3,0 και 4,0 αντίστοιχα. Σε pH 5,0 και 6,0 το οξικό οξύ βρίσκεται κατά κύριο λόγο υπό τη μορφή ανιόντος. Κατά συνέπεια τα οξικά ανιόντα ανταγωνίζονται με τις αρνητικά φορτισμένες ενώσεις ως προς τις θέσεις ιονανταλλαγής στην επιφάνεια της στήλης και ελαττώνουν την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [Vikingsson *et al.*, 2008; Guo & Gaiki, 2005].

Ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης σε ποσοστό ACN 50–70% (v/v) δεν μεταβάλλεται σημαντικά σε διαφορετικές τιμές pH της κινητής φάσης. Αντίθετα, σε ποσοστό 80% ACN (v/v) λαμβάνει χώρα απότομη αύξηση της κατακράτησης σε $\text{pH} \geq 4,0$, ενώ παρουσία ACN σε ποσοστό 90% (v/v) η κατακράτηση της θειαμίνης είναι πολύ μεγαλύτερη. Σε $\text{pH} \geq 5,0$ η έκλουση της θειαμίνης δεν είναι εφικτή υπό ισοκρατικές συνθήκες σε χρόνο μικρότερο των 50 min. Σε χαμηλά ποσοστά ACN η θειαμίνη, λόγω του μόνιμου θετικού φορτίου, δέχεται ηλεκτροστατική άπωση από τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης. Επίσης, σε pH 3,0 και 4,0 το μόριο της θειαμίνης φέρει θετικό φορτίο και στον πυριμιδινικό δακτύλιο (§ 3.1.2). Συνεπώς, η αύξηση του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης με την αύξηση του pH της κινητής φάσης και παρουσία ACN σε υψηλά ποσοστά, οφείλεται στην ελάττωση της ηλεκτροστατικής άπωσης που προκύπτει αφενός από την μείωση του θετικού φορτίου στο μόριο και αφετέρου από τον αυξημένο ανταγωνισμό των οξικών ανιόντων ως προς τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στατικής φάσης.

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης του pH της κινητής φάσης, παρουσία ACN σε ποσοστό 90% (v/v), στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.4. Οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης δίνονται στον Πίνακα 3.3.3. Σε pH 3,0 η εκλεκτικότητα της στήλης αμινο–πυριτίας είναι η ίδια με αυτήν των στηλών διόλης–πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας. Στις συνθήκες αυτές υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των περισσότερων ενώσεων του μίγματος, ενώ για το ζεύγος ενώσεων L–ασκορβικό οξύ/θειαμίνη ο διαχωρισμός είναι ατελής ($R_s=1,10$). Σε pH 4,0, 5,0 και 6,0 δεν υπάρχει ουσιαστική μεταβολή της κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης με αποτέλεσμα η στήλη να παρουσιάζει την ίδια εκλεκτικότητα σε σύγκριση με τις άλλες στατικές φάσεις. Σε pH 4,0, οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού οξέος, του L–ασκορβικού οξέος και της θειαμίνης αυξάνονται χωρίς όμως να υπάρχει βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας (Σχήμα 3.3.4).



Σχήμα 3.3.4: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο–πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v).

Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L–ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

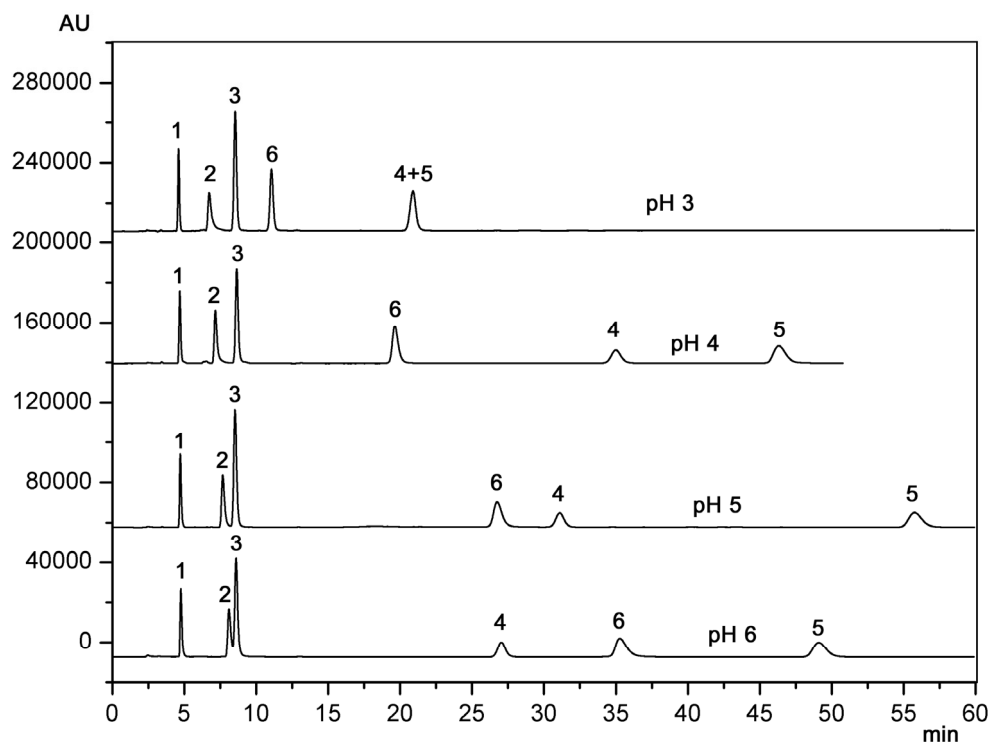
Τέλος, σε pH 5,0 και 6,0 το L–ασκορβικό οξύ και η θειαμίνη κατακρατούνται ισχυρά από τη στήλη με αποτέλεσμα να μην εκλύονται υπό ισοκρατικές συνθήκες σε χρόνο μικρότερο των 60 min.

Πίνακας 3.3.3: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του pH της κινητής φάσης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.4).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	11,97	11,76	12,50	13,52
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	11,22	13,12	10,66	9,14
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	13,17	25,60	26,53	25,41
νικοτινικό οξύ ⁴ / L–ασκορβικό οξύ ⁵	3,37	2,86	–	–
L–ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	1,10	συνέκλουση	–	–

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

Η εκλεκτικότητα της στήλης αμινο-πυριτίας συναρτήσει του pH είναι διαφορετική σε ποσοστό ACN 85% (v/v) όσον αφορά τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες που φέρουν φορτίο. Από τα συγκριτικά χρωματογραφήματα του Σχήματος 3.3.5 φαίνεται ότι σε ποσοστό 85% (v/v) σε ACN οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές που καθορίζουν το χρόνο κατακράτησης των ενώσεων που φέρουν φορτίο και κατ' επέκταση την εκλεκτικότητα της στήλης. Σε pH 3,0 το μόριο της θειαμίνης λόγω του θετικού φορτίου δέχεται μεγαλύτερη ηλεκτροστατική άπωση από τη στατική φάση με αποτέλεσμα να εκλούεται νωρίτερα από το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ. Στις συνθήκες αυτές όμως λαμβάνει χώρα συνέκλωση των δυο οξέων (Σχήμα 3.3.5). Στο εύρος pH 4,0–6,0, αυξανόμενου του pH της κινητής φάσης αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την αύξηση του pH ελαττώνεται το φορτίο του πυριμιδινικού δακτυλίου με αποτέλεσμα το μόριο της θειαμίνης να δέχεται μικρότερη ηλεκτροστατική άπωση από τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης. Στο φαινόμενο αυτό συμβάλλει και ο μεγαλύτερος ανταγωνισμός των οξικών ανιόντων ως προς τα θετικά φορτισμένα σημεία της επιφάνειας της στήλης [Vikingsson *et al.*, 2008], όπου σε pH 6,0 η εκλεκτικότητα της στήλης αντιστρέφεται ως προς τη θειαμίνη και το νικοτινικό οξύ. Η ίδια εξήγηση (μείωση της ηλεκτροστατικής άπωσης) ισχύει και για τη μικρή αύξηση του χρόνου κατακράτησης της πυριδοξίνης με την αύξηση του pH, όπου σε pH 6,0 δεν διαχωρίζεται πλήρως με τη ριβοφλαβίνη ($R_s=1,23$). Από το Σχήμα 3.3.5 φαίνεται επίσης και η αυξομείωση των χρόνων κατακράτησης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος συναρτήσει του pH. Συγκεκριμένα, στο εύρος pH 3,0–4,0 ο χρόνος κατακράτησης του νικοτινικού οξέος αυξάνεται και ακολούθως μειώνεται με περεταίρω αύξηση του pH. Η κατακράτηση του L-ασκορβικού οξέος αυξάνεται στο εύρος pH 3,0–5,0 ενώ σε pH 6,0 μειώνεται.



Σχήμα 3.3.5: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο–πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 85/15 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Η παραπάνω χρωματογραφική συμπεριφορά των δυο οξέων αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αφενός του πολυτροπικού μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC και αφετέρου της σημασίας της αναλογίας διαλυτών ως προς το είδος και την ισχύ των αλληλεπιδράσεων. Αν και σε pH>5,0 το νικοτινικό οξύ αποκτά μόνο αρνητικό φορτίο και θα αναμενόταν η αύξηση του χρόνου κατακράτησης, εντούτοις μειώνεται λόγω της παρουσίας των οξικών ανιόντων. Ομοίως το L–ασκορβικό οξύ αν και σε pH 5,0 αποκτά πλήρες αρνητικό φορτίο, ο χρόνος κατακράτησής του μειώνεται λόγω της ανταγωνιστικής δράσης των οξικών ανιόντων ως προς τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης.

Πίνακας 3.3.4: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει του pH της κινητής φάσης (λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	6,44	8,40	9,46	10,22
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	4,48	4,09	2,20	1,23
ριβοφλαβίνη ³ / θειαμίνη ⁶	3,36	19,54	24,80	26,38 ³⁻⁴
θειαμίνη ⁶ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	14,98	15,28	4,01	6,73 ⁴⁻⁶
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / νικοτινικό οξύ ⁴	συνέκλωση	8,05	17,31	8,83 ⁶⁻⁵

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $Rs \approx 1,50$

Από τις τιμές του Πίνακα 3.3.5, φαίνεται η πολύ καλή συμμετρία του συνόλου των κορυφών των υδατοδιαλυτών βιταμινών, στο εξεταζόμενο εύρος pH, με τις τιμές T_f να κυμαίνονται από 1,1 έως 1,4.

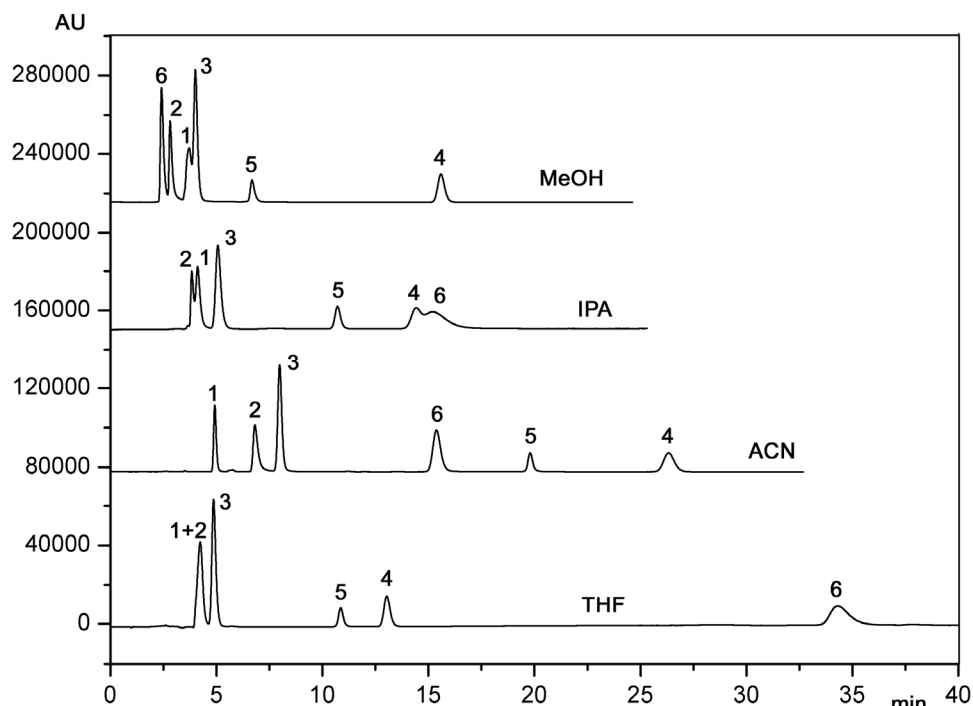
Πίνακας 3.3.5: Επίδραση του pH της κινητής φάσης στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
νικοτιναμίδιο	1,3	1,2	1,3	1,3
πυριδοξίνη	1,4	1,4	1,3	1,3
ριβοφλαβίνη	1,2	1,2	1,2	1,2
νικοτινικό οξύ	1,2	1,1	1,1	1,1
L-ασκορβικό οξύ	1,1	1,2	1,2	1,3
θειαμίνη	1,2	1,2	1,3	1,3

3.3.3 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη

Η επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών ως προς την κατακράτηση και το διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών μελετήθηκε και στη στήλη αμινο-πυριτίας. Οι διαλύτες που εξετάστηκαν και σε αυτήν την περίπτωση ήταν το ACN, η MeOH, η IPA και το THF. Ο κάθε οργανικός διαλύτης συνδυάστηκε ξεχωριστά με υδατικό διαλύτη παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 5 mM και σε pH 3,0. Η έκλουση των συστατικών του μίγματος έλαβε χώρα σε αναλογία οργανικού/υδατικού διαλύτη 85/15 (v/v).

Στο Σχήμα 3.3.6 παρατίθενται συγκριτικά χρωματογραφήματα της επίδρασης των διαφορετικών οργανικών διαλυτών στην κατακράτηση και το διαχωρισμό του μίγματος. Όπως και στις στήλες διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας, η εκλουστική ισχύς των υπό μελέτη διαλυτών ακολουθεί την εξής σειρά: ACN < THF < IPA < MeOH. Στην περίπτωση αντικατάστασης του ACN με MeOH ο διαχωρισμός του μίγματος δεν είναι εφικτός. Σε αντίθεση με τις δυο προηγούμενες στατικές φάσεις, η θειαμίνη δεν έλκεται αλλά απωθείται ηλεκτροστατικά από τη στήλη και η κατακράτηση του μορίου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υδρόφιλη κατανομή και σε δεσμούς υδρογόνου (τόσο με μόρια ύδατος όσο και με την επιφάνεια της στατικής φάσης). Η παραπάνω εξήγηση επιβεβαιώνεται από τη μείωση της κατακράτησης της ένωσης παρουσία MeOH, ενός διαλύτη με πολύ πιο ισχυρή ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου (ισχυρός δότης και δέκτης δεσμών υδρογόνου) σε σύγκριση με το ACN (§ 3.2.3) [Li & Huang, 2004]. Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης, οι οποίες εκλούνται μέχρι τα πρώτα πέντε λεπτά στο χρωματογράφημα. Ικανοποιητική κατακράτηση παρουσία MeOH εμφανίζουν το L-ασκορβικό και το νικοτινικό οξύ. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη της ιονανταλλαγής ως τον κύριο μηχανισμό κατακράτησης των μορίων αυτών σε ποσοστό οργανικού διαλύτη $\leq 85\%$ (v/v). Η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης σε σύγκριση με το ACN οφείλεται στην επιδιαλύτωση των ενώσεων με μόρια MeOH με αποτέλεσμα τη μείωση της ισχύος των υδρόφιλων αλλά και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [Chung *et al.*, 2007; Vikingsson *et al.*, 2008].



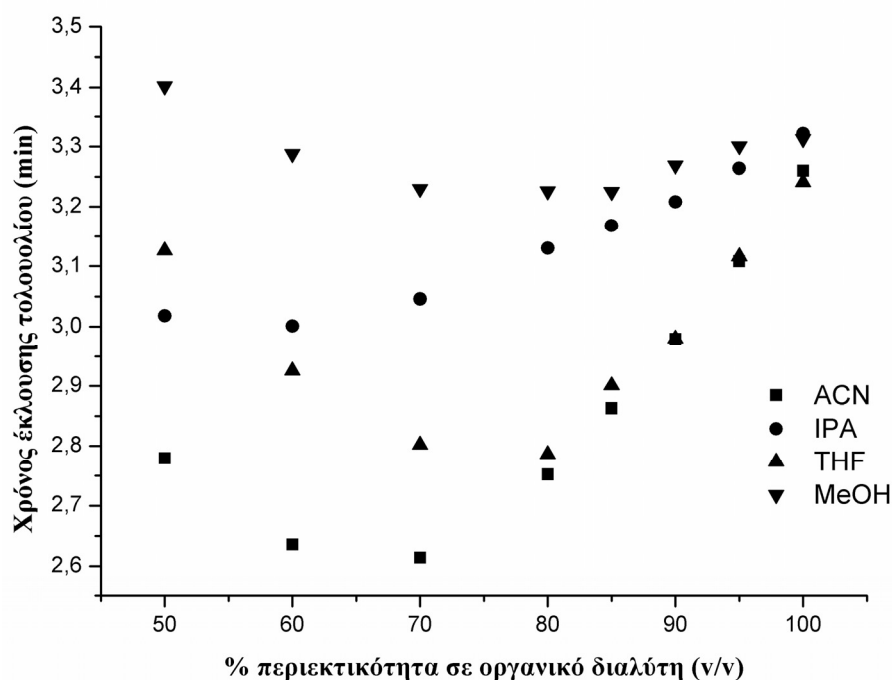
Σχήμα 3.3.6: Επίδραση του ACN, της MeOH, της IPA και του THF στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο–πυριτίας και σε αναλογία διαλυτών: Οργανικός/H₂O 85/15 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L–ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά του μίγματος των βιταμινών είναι παρόμοια παρουσία IPA. Η συνολικά μεγαλύτερη κατακράτηση σε σύγκριση με τη MeOH, κυρίως όσον αφορά τη ριβοφλαβίνη, το L–ασκορβικό οξύ και τη θειαμίνη, οφείλεται στον περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα της IPA συγκριτικά με τη MeOH. Επιπλέον, η IPA εμφανίζει μικρότερη δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου σε σχέση με τη MeOH. Έτσι, η IPA ανταγωνίζεται σε μικρότερο βαθμό ως προς τη διείσδυση στη στιβάδα ύδατος και την κάλυψη των ενεργών θέσεων της στατικής φάσης δίνοντας περισσότερο χρόνο στις ενώσεις να κατανεμηθούν και να αλληλεπιδράσουν με την επιφάνεια της στήλης [Li & Huang, 2004; Liu *et al.*, 2009].

Στο Σχήμα 3.3.6 απεικονίζεται γραφικά η μεταβολή του χρόνου έκλουσης του τολουολίου παρουσία ACN, MeOH, IPA και THF στην κινητή φάση, απουσία ρυθμιστικού διαλύματος. Για περιεκτικότητα σε οργανικό διαλύτη 50–95% (v/v), ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου παρουσία MeOH είναι και σε αυτήν την περίπτωση μεγαλύτερος από το χρόνο έκλουσης στους υπόλοιπους οργανικούς διαλύτες. Με εξαίρεση την τιμή περιεκτικότητας

50% (v/v), η σειρά έκλουσης του τολουολίου ακολουθεί τη σειρά: $t_R^{\text{MeOH}} > t_R^{\text{IPA}} > t_R^{\text{THF}} > t_R^{\text{ACN}}$. Ο ανταγωνισμός των μορίων του κάθε οργανικού διαλύτη ως προς το ύδωρ για την επιφάνεια της στατικής φάσης αμινο–πυριτίας είναι και σε αυτήν την περίπτωση πολύπλοκη λόγω της παρουσίας φορτίου στη στήλη. Εφόσον οι ομάδες R-NH_3^+ δρουν κυρίως ως δότες δεσμών υδρογόνου [Kamlet *et al.*, 1983] θα αναμενόταν ότι η αντικατάσταση μορίων ύδατος από μόρια οργανικού διαλύτη εξαρτάται από το συντελεστή β_2^{H} λαμβάνοντας έτσι τη σειρά έκλουσης: $t_R^{\text{IPA}} > t_R^{\text{MeOH}} > t_R^{\text{THF}} > t_R^{\text{ACN}}$. Παρόλα αυτά, ο αυξημένος υδρόφοβος χαρακτήρας της IPA, σε σχέση με την MeOH, φαίνεται να δυσχεραίνει την προσέγγιση μορίων IPA στη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στατικής φάσης. Όπως και στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας, η διαφοροποίηση του χρόνου έκλουσης του τολουολίου μεταξύ των διαφορετικών οργανικών διαλυτών είναι μικρότερη σε σύγκριση με τη στήλη διόλης–πυριτίας. Έτσι, η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ικανότητα των μορίων MeOH να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις ενώσεις και σε μικρότερο βαθμό στη διατάραξη της υδατικής στιβάδας.



Σχήμα 3.3.6: Επίδραση της παρουσίας των οργανικών διαλυτών ACN, MeOH, IPA, και THF στο χρόνο έκλουσης του τολουολίου σε στήλη αμινο–πυριτίας. Διαλύτης A: [100% H_2O], Διαλύτης B: [100% Οργανικός διαλύτης]. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.1.

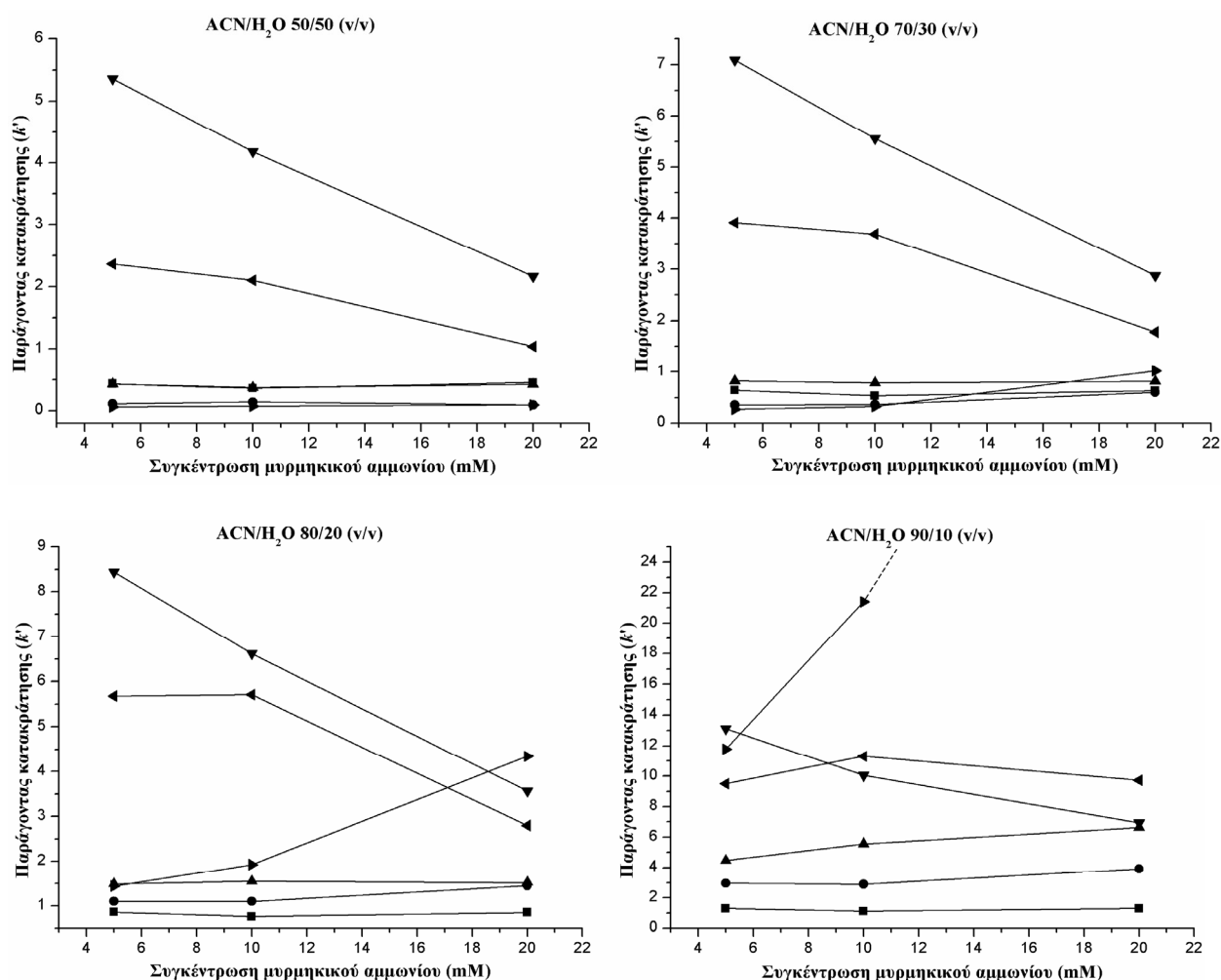
Ο διαχωρισμός του μίγματος είναι ατελής και στην περίπτωση αντικατάστασης του ACN με THF. Οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος ελαττώνονται, ενώ ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης αυξάνεται σημαντικά με αποτέλεσμα την αλλαγή της εκλεκτικότητας της στατικής φάσης. Το THF, λόγω της ικανότητας που έχει να δρα ως δέκτης πρωτονίων [Turek *et al.*, 2008] σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με ενώσεις που φέρουν υποκαταστάτες-δότες πρωτονίων (R-OH, R-COOH) με αποτέλεσμα τη μείωση της υδροφιλικότητας και την ελάττωση του χρόνου κατακράτησης. Στην περίπτωση της θειαμίνης, παρόλο που το μόριο φέρει μια "ελεύθερη" (unshielded) ομάδα-δότη πρωτονίου (R-OH), η χρωματογραφική συμπεριφορά του μορίου φαίνεται να εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα ενός διαλύτη να δρα ως δότης δεσμών υδρογόνου. Έτσι το THF δεν δρα ως δότης δεσμών υδρογόνου ($a_2^H=0,00$), σε αντίθεση με το ACN ($a_2^H=0,19$), με αποτέλεσμα ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης να είναι μεγαλύτερος παρουσία THF. Η παραπάνω χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης παρουσία THF είναι η ίδια και στην περίπτωση της στήλης διόλης-πυριτίας. Εντούτοις, η αύξηση του χρόνου κατακράτησης είναι πολύ μικρότερη λόγω της ύπαρξης ηλεκτροστατικής έλξης, η οποία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το χρόνο κατακράτησης της ένωσης.

3.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών ως προς τη συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση πραγματοποιήθηκε διατηρώντας σταθερό το pH της κινητής φάσης στην τιμή 3,0. Όπως και στις προηγούμενες δυο στατικές φάσεις, η συγκέντρωση του άλατος μεταβλήθηκε από 5 έως 20 mM.

Στο Σχήμα 3.3.7 απεικονίζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ACN. Η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του άλατος στους παράγοντες κατακράτησης του νικοτιναμίδιου και της ριβοφλαβίνης είναι μικρή σε όλες τις αναλογίες ACN/H₂O. Αντίθετα, με την αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου σημειώνεται αύξηση της κατακράτησης για την πυριδοξίνη σε ποσοστό ACN 70–90% (v/v). Το μόριο της πυριδοξίνης φέρει θετικό φορτίο στον πυριδινικό δακτύλιο (§ 3.1.2). Κατά συνέπεια, η ηλεκτροστατική άπωση που δέχεται η ένωση από την επιφάνεια της στήλης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου [Guo & Gaiki, 2005; Guo, 2005; Wu *et al.*, 2008]. Το ρόλο των κατιόντων αμμωνίου στις στήλες διόλης-πυριτίας

και μη επικαλυμμένης πυριτίας διαδραματίζουν τώρα τα μυρμηκικά ανιόντα στη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της αμινο-πυριτίας. Κατά ανάλογο τρόπο, αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης [Takegawa *et al.*, 2006]. Σε ποσοστό ACN 90% (v/v), η αύξηση του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης είναι πολύ δραστική με αποτέλεσμα, σε συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου 20 mM να μην εκλούεται υπό ισοκρατικές συνθήκες, σε χρόνο μικρότερο των 60 min.



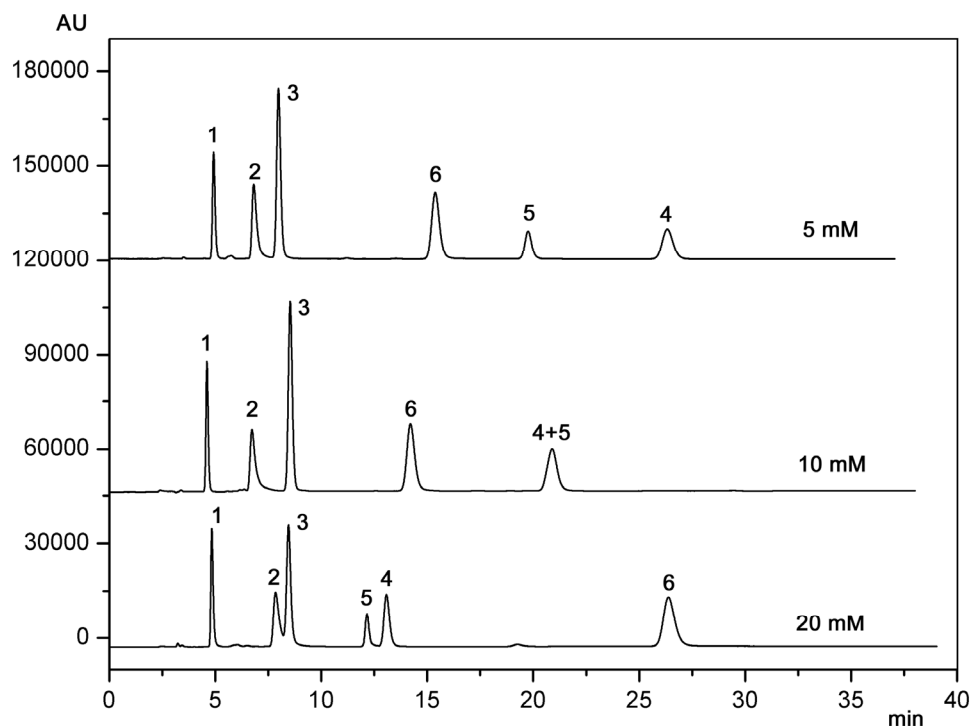
Σχήμα 3.3.7: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης του HCOONH_4 στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο-πυριτίας και σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Σύμβολα: (■) νικοτιναμίδιο, (●) πυριδοξίνη, (▲) ριβοφλαβίνη, (▼) νικοτινικό οξύ, (◄) L-ασκορβικό οξύ, (►) θειαμίνη.

Η σύγκριση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς της πυριδοξίνης και της θειαμίνης, δυο ενώσεων θετικά φορτισμένων, δείχνει τη σημαντική επίδραση όχι μόνο της ύπαρξης αλλά και του "είδους" του φορτίου σε μια ένωση. Η μεταβολή του χρόνου κατακράτησης της θειαμίνης συναρτější της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου, η οποία φέρει μόνιμο θετικό φορτίο και εντοπισμένο στο θειαζολικό δακτύλιο, είναι πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με την πυριδοξίνη η οποία φέρει θετικό φορτίο στον πυριδινικό δακτύλιο, το οποίο μπορεί να απεντοπιστεί μέσω συντονισμού.

Η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου είναι διαφορετική όσον αφορά το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ. Συγκεκριμένα, σε ποσοστό ACN 50–90% (v/v), η αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κατακράτησης των δυο οξέων, μια συμπεριφορά τυπική του μηχανισμού ιονανταλλαγής [Li & Huang, 2004; Olsen, 2001; Guo & Gaiki, 2005; Guo *et al.*, 2007; Valette *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Vikingsson *et al.*, 2008].

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών απεικονίζονται στο Σχήμα 3.3.8, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας παρατίθενται στον Πίνακα 3.3.6. Σε συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM, λαμβάνει χώρα πλήρης διαχωρισμός του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Πίνακας 3.3.6). Η σειρά έκλουσης για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη παραμένει η ίδια σε σύγκριση με τις δυο προηγούμενες στατικές φάσεις όπου ο κύριος μηχανισμός είναι η κατανομή. Επίσης, οι ενώσεις που φέρουν φορτίο κατακρατούνται περισσότερο λόγω μεγαλύτερης πολικότητας και η σειρά που εκλούνται εξαρτάται τόσο από το φορτίο της κάθε ένωσης όσο και από το φορτίο της επιφάνειας της στατικής φάσης. Έτσι, η θειαμίνη λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης εκλούεται πρώτη ακολουθούμενη από το L-ασκορβικό οξύ και το νικοτινικό οξύ. Η διαφορά στο χρόνο έκλουσης μεταξύ των δυο οξέων οφείλεται στην πλήρη αποπρωτονίωση του νικοτινικού οξέος και επομένως στην ύπαρξη ισχυρότερης ηλεκτροστατικής έλξης από τη στήλη.



Σχήμα 3.3.8: Επίδραση της συγκέντρωσης του HCOONH_4 στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη αμινο-πυριτίας και σε αναλογία $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 85/15 (v/v).

Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου από 5 σε 10 mM δεν έχει καμία επίδραση στην κατακράτηση του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης. Επίσης ο χρόνος κατακράτησης της θειαμίνης δεν μεταβάλλεται σημαντικά, ενώ η κατακράτηση του νικοτινικού οξέος μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα τη συνέκλυσή του με το L-ασκορβικό οξύ. Αυξάνοντας περαιτέρω τη συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου στα 20 mM λαμβάνει χώρα σημαντική μείωση του χρόνου κατακράτησης του L-ασκορβικού και του νικοτινικού οξέος. Αντίθετα, η κατακράτηση της θειαμίνης αυξάνεται ραγδαία με ταυτόχρονη αλλαγή της εκλεκτικότητας της στήλης. Μικρή αύξηση του χρόνου κατακράτησης σημειώνεται επίσης και για την πυριδοξίνη με αποτέλεσμα τον ατελή διαχωρισμό της ένωσης αυτής με τη ριβοφλαβίνη ($R_s=1,36$).

Πίνακας 3.3.6: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της συγκέντρωσης του HCOONH_4 (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.8).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)		
	HCOONH_4 5 mM	HCOONH_4 10 mM	HCOONH_4 20 mM
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	5,73	6,44	8,21
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	3,01	4,48	1,36
ριβοφλαβίνη ³ / θειαμίνη ⁶	14,05	3,36	10,38 ³⁻⁵
θειαμίνη ⁶ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	7,03	14,98	2,09 ⁵⁻⁴
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / νικοτινικό οξύ ⁴	8,60	συνέκλωση	17,68 ⁴⁻⁶

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

Από τη σειρά έκλωσης των ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μυρμηκικού αμμωνίου φαίνεται ότι η εκλεκτικότητα της στήλης αμινο-πυριτίας είναι τελείως διαφορετική σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας όσον αφορά τις ενώσεις που φέρουν φορτίο. Η διαφορά αυτή στην εκλεκτικότητα όμως εξαρτάται από τις συνθήκες της κινητής φάσης και κυρίως από το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος. Έχει προταθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ότι, σε αναλογία ACN/H₂O 80/20, για τη δημιουργία μιας "στιβάδας ηλεκτροστατικής φύσης" από ιόντα άνωθεν της επιφάνειας της στήλης που να περιορίζει αποτελεσματικά κάθε είδους ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση (ελκτική ή απωστική) απαιτείται η παρουσία άλατος σε συγκέντρωση ≥ 20 mM [Alpert, 2008; Guo *et al.*, 2007]. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται εν μέρει σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα. Εντούτοις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρουσία ACN σε ποσοστό >85% (v/v) φαίνεται ότι η συγκέντρωση των 10 mM είναι ικανή για τη δραστική μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύγκριση των Σχημάτων 3.3.4 και 3.3.5 στην § 3.3.2.

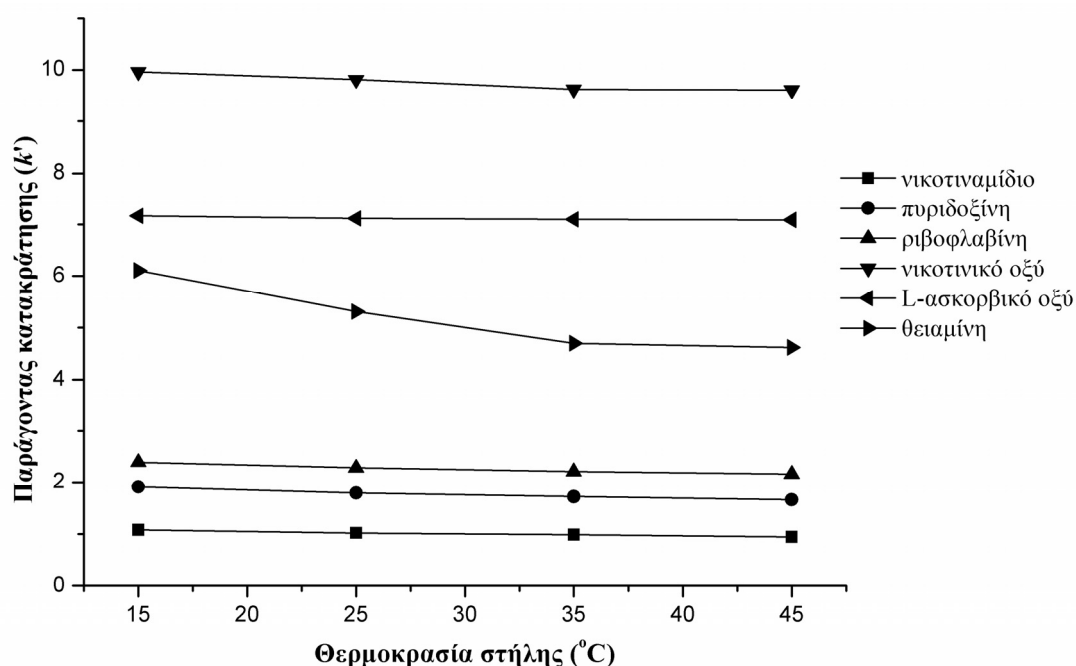
Οι χρωματογραφικές κορυφές των ενώσεων εμφανίζουν πολύ καλή συμμετρία στο εξεταζόμενο εύρος συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου (Πίνακας 3.3.7), ενώ η μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος δεν έχει σημαντική επίδραση στις τιμές του παράγοντα T_f .

Πίνακας 3.3.7: Επίδραση της συγκέντρωσης του HCOONH_4 στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f		
	HCOONH_4 5 mM	HCOONH_4 10 mM	HCOONH_4 20 mM
νικοτιναμίδιο	1,3	1,3	1,2
πυριδοξίνη	1,5	1,4	1,4
ριβοφλαβίνη	1,1	1,2	1,2
νικοτινικό οξύ	1,1	1,2	1,1
L-ασκορβικό οξύ	1,1	1,1	1,1
θειαμίνη	1,3	1,2	1,2

3.3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία της στήλης από τους 15 έως τους 45 °C. Η σύσταση της κινητής φάσης διατηρήθηκε σταθερή αποτελούμενη από μίγμα ACN/ H_2O 85/15 (v/v) παρουσία μυρμηκικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 5 mM και σε pH 3,0. Η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης έχει ως αποτέλεσμα τη μικρή ελάττωση του χρόνου κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης. Σε αντίθεση με τις στήλες διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας, μεγαλύτερη είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στο μόριο της θειαμίνης, ενώ οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος μεταβάλλονται ελάχιστα (Σχήμα 3.3.9). Η παραπάνω χρωματογραφική συμπεριφορά σχετίζεται άμεσα με τον κύριο μηχανισμό κατακράτησης των ενώσεων που φέρουν φορτίο [Dong & Huang, 2007]. Συγκεκριμένα, η θειαμίνη κατακρατείται στη στήλη αμινο-πυριτίας κατά κύριο λόγο μέσω του μηχανισμού κατανομής και των δεσμών υδρογόνου, ενώ το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ κυρίως μέσω του μηχανισμού ιονανταλλαγής [Guo & Gaiki, 2005; Christopherson *et al.*, 2006].



Σχήμα 3.3.9: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας της στήλης αμινο-πυριτίας στον παράγοντα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών και σε αναλογία ACN/H₂O 85/15 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.1.

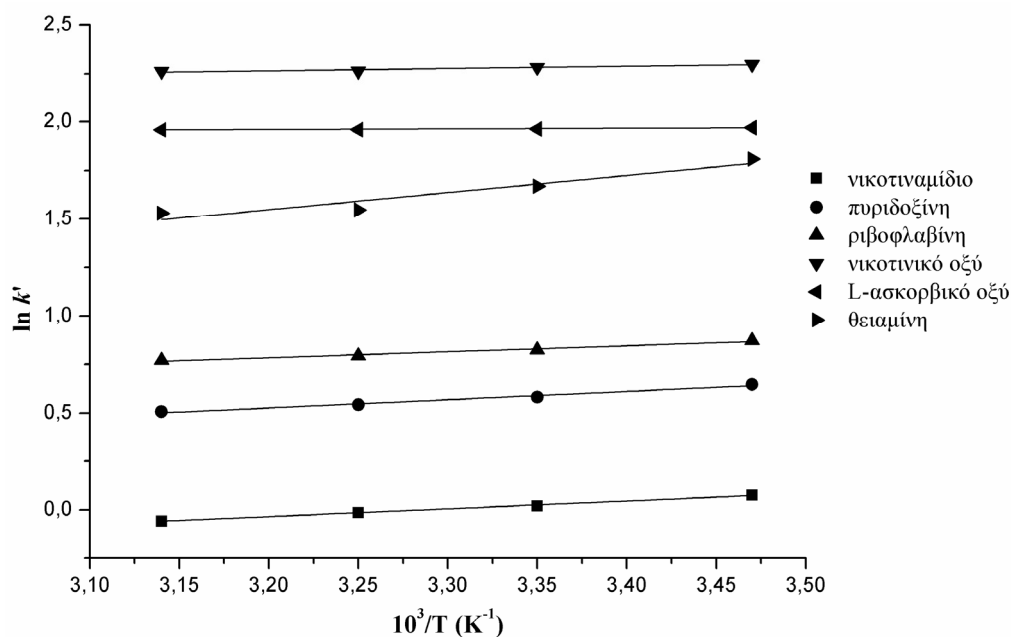
Όπως είναι αναμενόμενο, με την αύξηση της θερμοκρασίας λαμβάνει χώρα μείωση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης ως προς το μίγμα των έξι βιταμινών. Συγκεκριμένα, η διαχωριστική ικανότητα της στήλης ελαττώνεται για το ζεύγος ενώσεων ριβοφλαβίνη/θειαμίνη (Πίνακας 3.3.8), ενώ μεταβάλλεται σε μικρό βαθμό ως προς τα υπόλοιπα ζεύγη ενώσεων. Εξαίρεση αποτελεί η τιμή της διαχωριστικής ικανότητας για το ζεύγος θειαμίνη/L-ασκορβικό οξύ, η οποία αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Πίνακας 3.3.8: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της θερμοκρασίας της στήλης (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.3.9).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)			
	T=15 °C	T=25 °C	T=35 °C	T=45 °C
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	6,14	5,73	5,42	5,30
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	3,10	3,01	2,97	2,95
ριβοφλαβίνη ³ / θειαμίνη ⁶	17,20	14,05	11,52	11,39
θειαμίνη ⁶ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	4,15	7,03	9,31	9,60
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / νικοτινικό οξύ ⁴	8,91	8,60	8,08	8,07

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): Rs≈1,50

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης της εξίσωσης van't Hoff (Σχήμα 3.3.10, Πίνακας 3.3.9), υπάρχει γραμμική συσχέτιση για το νικοτιναμίδιο και τη ριβοφλαβίνη ($0,9899 < R^2 < 0,9955$) γεγονός το οποίο συνηγορεί στην ύπαρξη ενός μηχανισμού κατακράτησης στον οποίο κυριαρχεί η κατανομή. Η ύπαρξη ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ του θετικά φορτισμένου πυριδινικού δακτυλίου της πυριδοξίνης και της επιφάνειας της αμινο-πυριτίας δικαιολογεί τη μικρή απόκλιση από τη γραμμικότητα. Απόκλιση από τη γραμμικότητα της εξίσωσης van't Hoff εμφανίζουν επίσης η θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ και το L-ασκορβικό οξύ. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται με την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες, πέρα από το μηχανισμό κατανομής, συνεισφέρουν σημαντικά στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης [Guo & Huang, 2003; Guo, 2005; Quiming *et al.*, 2008; Dong & Huang, 2007; Christopherson *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2007; Guo & Gaiki, 2005; Wu *et al.*, 2008].



Σχήμα 3.3.10: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης van't Hoff για το εύρος θερμοκρασίας 15–45 °C. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.3.9.

Όπως και στις στήλες διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας, οι τιμές ενθαλπίας για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη, τη ριβοφλαβίνη και τη θειαμίνη έχουν αρνητική τιμή και κυμαίνονται από $-2,56$ έως $-7,34$ kJ/mol, το οποίο σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων είναι μια εξώθερμη διεργασία (ενεργειακά αυθόρμητη) και μειώνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία [Guo, 2005; Guo & Gaiki, 2005; Luo *et al.*, 2008]. Οι τιμές ενθαλπίας για το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ είναι πολύ κοντά στην τιμή μηδέν, γεγονός το οποίο σχετίζεται άμεσα με την πολύ μικρή ελάττωση της κατακράτησης των ενώσεων με την αύξηση της θερμοκρασίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη της ύπαρξης ιονανταλλαγής στην επιφάνεια της στήλης αμινο-πυριτίας [Guo & Gaiki, 2005].

Πίνακας 3.3.9: Τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης, της ενθαλπίας και του λόγου $\Delta S^\circ/R$ της εξίσωσης van't Hoff.

Ένωση	R^2	ΔH° (kJ/mol)	$\Delta S^\circ/R$
νικοτιναμίδιο	0,9951	-3,34	-1,32
πυριδοξίνη	0,9851	-3,52	-0,83
ριβοφλαβίνη	0,9899	-2,56	-0,21
νικοτινικό οξύ	0,9121	-0,69	+2,00
L-ασκορβικό οξύ	0,9048	-0,28	+1,85
θειαμίνη	0,9222	-7,34	-1,28

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθούν τα εξής. Η ύπαρξη μη γραμμικής συσχέτισης στην εξίσωση van't Hoff, αποδίδεται σε μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας με τη θερμοκρασία. Στην RPLC η απόκλιση από τη γραμμικότητα στην εξίσωση αποδίδεται επίσης και στην αλλαγή της μορφής της αλυσίδας C_{18} της στήλης σε μια πιο διατεταγμένη και εκτεταμένη μορφή [Sentel & Henderson, 1991]. Στην HILIC, χρησιμοποιώντας δεσμευμένες στατικές φάσεις, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο το αν η μη γραμμική απόκριση της εξίσωσης van't Hoff σχετίζεται και με τη μεταβολή του λόγου των φάσεων (όρος ϕ στην εξίσωση) ή και με τη μεταβολή της διάταξης (phase transition) της δεσμευμένης φάσης. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται στήλη από μη επικαλυμμένη πυριτία, η παράμετρος ϕ δεν μεταβάλλεται και η απόκλιση από τη γραμμικότητα μπορεί να αποδοθεί με μεγαλύτερη αξιοπιστία στην ύπαρξη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων, επιπλέον της υδρόφιλης κατανομής, που καθορίζουν το συνολικό μηχανισμό κατακράτησης [Quiming *et al.*, 2008]. Μια επιπλέον προσέγγιση προκύπτει από το γεγονός ότι τα μόρια του ύδατος

βρίσκονται προσροφημένα στην επιφάνεια της στήλης υπό τη μορφή στιβάδας η οποία λειτουργεί ως "προέκταση" της στατικής φάσης. Στην περίπτωση που το ποσό του ύδατος που βρίσκεται προσροφημένο λειτουργεί ως μια "ψευδο-φάση" και μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία, ταυτόχρονα μεταβάλλεται και ο παράγοντας ϕ της εξίσωσης [Bidlingmeyer & Henderson, 2004; Dong & Huang, 2007].

Δεδομένης της πολυπλοκότητας του μηχανισμού της HILIC και λαμβάνοντας ως παραδοχή το ότι ο όρος ϕ της εξίσωσης δεν μεταβάλλεται στο εύρος θερμοκρασίας από 15 έως 45 °C, η τομή επί της αρχής (intercept) μπορεί να σχετιστεί με την παράμετρο ΔS^0 [Luo *et al.*, 2008]. Έτσι, η επιφανειακή προσρόφηση του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος στη στατική φάση, μέσω ανιονανταλλαγής, έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη υψηλών και θετικών τιμών του λόγου $\Delta S^0/R$.

3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ

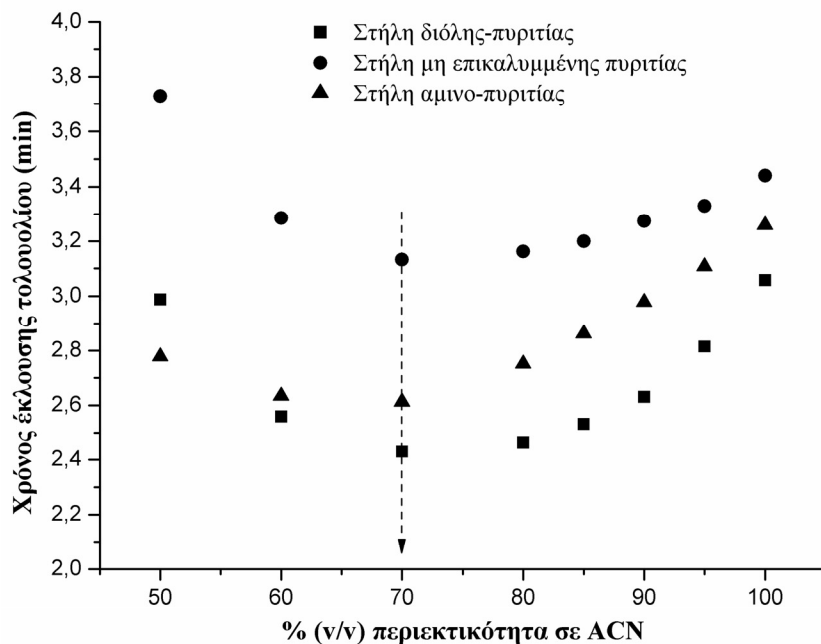
3.4.1 Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης της στατικής φάσης

Ο πρωτεύων μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC περιλαμβάνει την κατανομή των πολικών ενώσεων μεταξύ μιας στιβάδας ύδατος ισχυρά προσροφημένης στην επιφάνεια της στατικής φάσης και του υδρόφοβου μέρους της κινητής φάσης. Έτσι, η ύπαρξη της υδατικής στιβάδας, ακόμα και σε υψηλά ποσοστά ACN στην κινητή φάση, αποτελεί δεδομένο στο μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC [Hemström & Irgum, 2006; McCalley & Neue, 2008]. Τα μόρια της στιβάδας ύδατος είναι δυναμικά ακινητοποιημένα στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης γεγονός το οποίο διαφέρει από τη μόνιμη χημική σύνδεση [Hao *et al.*, 2008]. Κάθε στατική φάση έχει ένα συγκεκριμένο βαθμό ενυδάτωσης (hydration) [Hemström & Irgum, 2006]. Κατά συνέπεια, ο αριθμός των μορίων ύδατος που ακινητοποιούνται θα είναι διαφορετικός μεταξύ διαφορετικών στατικών φάσεων.

Στο Σχήμα 3.4.1 απεικονίζεται η χρωματογραφική συμπεριφορά του μη πολικού τολουολίου, στις τρεις στατικές φάσεις. Σύμφωνα με το γράφημα, ο χρόνος έκλουσης του τολουολίου σε ποσοστό ACN $\geq 60\%$ (v/v) ακολουθεί την εξής σειρά: $t_R^{\text{πυριτία}} > t_R^{\text{αμινο}} > t_R^{\text{διόλη}}$. Η διαφοροποίηση στους χρόνους έκλουσης μπορεί να αποδοθεί στο βαθμό ενυδάτωσης της επιφάνειας σε κάθε στήλη και επομένως στον όγκο της σχηματιζόμενης στιβάδας ύδατος. Η στήλη από μη επικαλυμμένη πυριτία φαίνεται να σχηματίζει μια πιο λεπτή στιβάδα στην επιφάνειά της και ακολουθούν η στήλη αμινο-πυριτίας και διόλης-πυριτίας. Αυτό σχετίζεται με δύο επιμέρους φαινόμενα, ως ακολούθως:

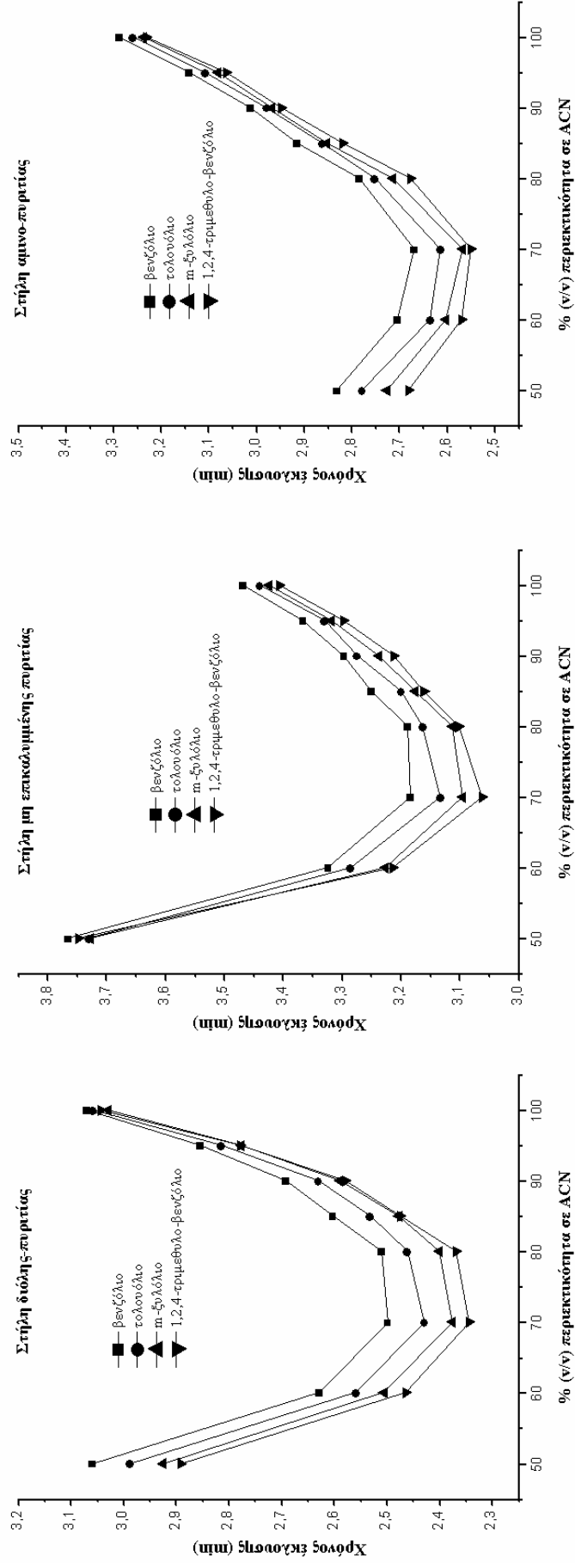
(1) Όσο πιο λεπτή είναι η στιβάδα ύδατος, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα το μόριο του τολουολίου να προσεγγίσει την επιφάνεια της στατικής φάσης και να αλληλεπιδράσει με το υδρόφοβο μέρος αυτής. Στην περίπτωση αυτή λαμβάνει χώρα ένα είδος επιφανειακής προσρόφησης.

(2) Τα μόρια ύδατος είναι δυναμικά ακινητοποιημένα στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η υδατική στιβάδα αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από μόρια ύδατος ενώ συνυπάρχουν και μόρια οργανικού διαλύτη. Αντίστοιχα, το υπόλοιπο μέρος της κινητής φάσης αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από μόρια οργανικού διαλύτη με ταυτόχρονη την παρουσία μορίων ύδατος. Στην περίπτωση αυτή, η χρωματογραφική συμπεριφορά του τολουολίου οφείλεται αποκλειστικά στο βαθμό κατανομής του, ο οποίος εξαρτάται από τη μεταβολή της υδροφιλικότητας της υδατικής στιβάδας.



Σχήμα 3.4.1: Χρόνοι έκλουσης του τολουολίου συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ACN και σε διαφορετικές στατικές φάσεις.

Η «κατακράτηση» του τολουολίου παρουσιάζει ένα ελάχιστο σε ποσοστό ACN 70% (v/v), και στις τρεις στατικές φάσεις, ενώ σε οποιεσδήποτε άλλες αναλογίες ACN ο χρόνος έκλουσης αυξάνει. Παρουσία ACN σε ποσοστό <70% (v/v), η διαφορά της πολικότητας μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης ελαττώνεται στο βαθμό που το τολουόλιο μπορεί να κατανεμηθεί και να αλληλεπιδράσει με το υδρόφοβο μέρος της στατικής φάσης [McCalley & Neue, 2008; Bidlingmeyer *et al.*, 1982]. Η εξήγηση αυτή φαίνεται λογική δεδομένου ότι το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση είναι τέτοιο που μπορούν, έως ένα βαθμό, να λάβουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Εντούτοις, η χρωματογραφική συμπεριφορά του τολουολίου δείχνει να εξαρτάται πρωτίστως από το μηχανισμό κατανομής. Αυτό επιβεβαιώνεται από το Σχήμα 3.4.2, όπου απεικονίζονται επιπλέον, οι χρόνοι έκλουσης για το βενζόλιο, το *m*-ξυλόλιο και το 1,2,4-τριμεθυλοβενζόλιο. Και οι τρεις ενώσεις εμφανίζουν την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με το τολουόλιο, ωστόσο, με την αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα των ενώσεων μειώνεται ο βαθμός κατανομής με συνέπεια τη μείωση της κατακράτησης.



Σχήμα 3.4.2: Χρόνοι έκλουσης για το βενζόλιο, τολουόλιο, *m*-ξυλόλιο και 1,2,4-τριμεθυλοβενζόλιο, συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε ACN και σε διαφορετικές στατικές φάσεις.

Για περιεκτικότητα ACN >70% (v/v) ο όγκος της υδατικής στιβάδας μειώνεται, ενώ αυξάνει σημαντικά η διαφορά πολικότητας μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης. Όσον αφορά την επιπλέον αύξηση του χρόνου έκλουσης του τολουολίου και των υπολοίπων υδρόφοβων ενώσεων, μια εξήγηση που θα βασιζόταν στην ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων θα ήταν εσφαλμένη, με δεδομένη τη μεγάλη περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη. Επομένως, η χρωματογραφική αυτή συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στη μεταβολή της υδροφιλικότητας της υδατικής στιβάδας. Καθώς αυξάνει το ποσοστό σε ACN (δηλ. >70%), ουσιαστικά λαμβάνει χώρα αντικατάσταση μορίων ύδατος από μόρια οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση ενός αριθμού μορίων ACN στην υδατική στιβάδα μέχρι αποκατάστασης μιας δυναμικής ισορροπίας. Έτσι, λαμβάνει χώρα μικρή μείωση του υδρόφιλου χαρακτήρα της υδατικής στιβάδας με συνέπεια να αυξάνεται ο βαθμός κατανομής του τολουολίου. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι συνολικά η διαφορά της πολικότητας μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης είναι δεδομένη και αξιοσημείωτα μεγαλύτερη για περιεκτικότητα ACN >70%. Η εξήγηση αυτή δικαιολογεί ικανοποιητικά και τη μικρή αύξηση του χρόνου έκλουσης του τολουολίου σε ποσοστό ACN $\geq 80\%$ (v/v), συγκριτικά με την αύξηση σε ποσοστό ACN <70%.

Λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορετική ενυδάτωση των τριών στατικών φάσεων, και θεωρώντας ότι δεν λαμβάνει χώρα άμεση αλληλεπίδραση των συστατικών του δείγματος με τη στατική φάση, θα αναμενόταν ότι για μεγαλύτερο όγκο ύδατος άνωθεν της επιφάνειας μιας στατικής φάσης θα λάμβανε χώρα και μεγαλύτερη κατακράτηση των βιταμινών που δεν φέρουν φορτίο. Εντούτοις, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης σε pH 6,0 στις τρεις διαφορετικές στήλες (Πίνακας 3.4.1), προκύπτει η εξής σειρά έκλουσης:

- α) νικοτιναμίδιο: $t_R^{\text{πυριτία}} > t_R^{\text{αμινο}} > t_R^{\text{διόλη}}$
 β) πυριδοξίνη: $t_R^{\text{πυριτία}} > t_R^{\text{αμινο}} > t_R^{\text{διόλη}}$
 γ) ριβοφλαβίνη: $t_R^{\text{αμινο}} > t_R^{\text{πυριτία}} > t_R^{\text{διόλη}}$

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι ουδέτερες ενώσεις, πέρα από την υδρόφιλη κατανομή, αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση μέσω άλλου μηχανισμού που πιθανότατα είναι οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι είναι πιο ισχυροί στις στήλες μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο-πυριτίας. Επιπλέον, ο σχηματισμός μιας πιο λεπτής στιβάδας ύδατος έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη προσέγγιση της επιφάνειας της στατικής φάσης από τις ενώσεις

αυτές. Στο συμπέρασμα αυτό συγκλίνει και η μη γραμμική αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων αυτών για εύρος περιεκτικότητας ACN 70–90% (v/v).

Πίνακας 3.4.1: Χρόνοι κατακράτησης (min) των ουδέτερων βιταμινών σε διαφορετικές στατικές φάσεις. Χρωματογραφικές συνθήκες: CH₃COONH₄ 10 mM, pH 6,0, ροή 0,6 mL/min, 25 °C.

Ένωση	Διόλη–πυριτία			Πυριτία			Αμινο–πυριτία		
	ACN (v/v)			ACN (v/v)			ACN (v/v)		
	70%	80%	90%	70%	80%	90%	70%	80%	90%
νικοτιναμίδιο	3,63	4,13	5,10	4,43	4,94	5,99	3,95	4,45	5,27
πυριδοξίνη	4,04	4,94	7,51	5,45	6,77	10,26	5,76	7,03	10,10
ριβοφλαβίνη	3,56	4,68	9,02	4,14	5,63	12,50	4,52	6,25	15,69

Για την περαιτέρω διερεύνηση της ύπαρξης άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ ουδέτερων ενώσεων και της επιφάνειας της στατικής φάσης, μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά απλών από άποψη δομής μορίων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο χρόνος κατακράτησης και η σειρά έκλουσης για το βενζαμίδιο, τη φαινόλη, τη βενζυλική αλκοόλη, τη βενζαλδεΰδη, την ανιλίνη, την πυριδίνη και την πυριμιδίνη στις τρεις στατικές φάσεις. Η κινητή φάση περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος 10 mM, pH 6,5. Το pH της κινητής φάσης επιλέχθηκε έτσι ώστε το σύνολο των ενώσεων να είναι στην ουδέτερη μορφή. Επιπλέον, η ροή της κινητής φάσης ήταν ίση προς 0,6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης 25 °C. Οι συντελεστές κατανομής ($\log P$) και η ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.2 [Kamlet *et al.*, 1983; Abraham, 1993; Abraham & Rosés, 1994].

Η σειρά έκλουσης των ενώσεων και στις τρεις στατικές φάσεις είναι η ακόλουθη:

$$t_{R \text{ πυριμιδίνη}} > t_{R \text{ βενζαμίδιο}} > t_{R \text{ πυριδίνη}} > t_{R \text{ βενζυλική αλκοόλη}} > t_{R \text{ ανιλίνη}} > t_{R \text{ φαινόλη}} > t_{R \text{ βενζαλδεΰδη}}.$$

Σύμφωνα με τις τιμές $\log P$ του Πίνακα 3.4.2, η σειρά έκλουσης δεν βρίσκεται σε συμφωνία με την πολικότητα των ενώσεων. Κατά συνέπεια, η κατακράτηση των ενώσεων δεν καθορίζεται αποκλειστικά από το βαθμό κατανομής, αλλά είναι ένας συνδυασμός μεταξύ της κατανομής και της ικανότητας των ενώσεων να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη στατική φάση.

Πίνακας 3.4.2: Τιμές του συντελεστή κατανομής και της ικανότητας δότη–δέκτη δεσμών υδρογόνου των απλών δομικά ενώσεων.

Ένωση	Log P	a_2^H	β_2^H
Βενζαμίδιο	0,64	0,49	0,67
Φαινόλη	1,48	0,60	0,30
Βενζαλδεΐδη	1,48	0,00	0,39
Βενζυλική αλκοόλη	1,05	0,33	0,56
Ανιλίνη	0,90	0,26	0,41
Πυριδίνη	0,65	0,00	0,52
Πυριμιδίνη	-0,40	0,00	0,48

a_2^H : δότης δεσμών υδρογόνου

β_2^H : δέκτης δεσμών υδρογόνου

Για μια ένωση, όπως η πυριμιδίνη που έχει πολύ χαμηλή τιμή $\log P$ (δηλ. είναι πολύ υδρόφιλη) είναι σαφές ότι θα εμφανίζει μεγαλύτερη κατακράτηση ακόμα και αν εμφανίζει χαμηλότερες τιμές των συντελεστών a_2^H και β_2^H . Η αυξημένη πολικότητα προσφέρει μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στην υδατική στιβάδα. Για ενώσεις που έχουν παρόμοιες τιμές $\log P$, ο χρόνος κατακράτησης καθορίζεται από τους συντελεστές a_2^H και β_2^H . Έτσι, το βενζαμίδιο κατακρατείται ισχυρότερα σε σχέση με την πυριδίνη διότι δρα ως ισχυρότερος δότης–δέκτης δεσμών υδρογόνου. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση της ανιλίνης και της βενζυλικής αλκοόλης, όπου η τιμή $\log P$ της πρώτης είναι ελαφρώς μικρότερη από αυτήν της δεύτερης. Εντούτοις, η σειρά έκλουσης καθορίζεται από τις τιμές a_2^H και β_2^H με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη κατακράτηση της βενζυλικής αλκοόλης. Τέλος, η φαινόλη και η βενζαλδεΐδη έχουν τον ίδιο συντελεστή $\log P$, αλλά η φαινόλη κατακρατείται περισσότερο διότι δρα ως ισχυρότερος δότης δεσμών υδρογόνου.

Όσον αφορά τη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης μεταξύ των τριών στατικών φάσεων, για τις παραπάνω ενώσεις ισχύει η εξής σειρά: $t_R^{\text{πυριτία}} > t_R^{\text{αμινο}} > t_R^{\text{διόλη}}$, η οποία βρίσκεται σε συμφωνία με τη σειρά έκλουσης των ουδέτερων βιταμινών στις στατικές αυτές φάσεις. Από τη σειρά έκλουσης των ενώσεων αυτών επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι η στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας έχει την ικανότητα να δημιουργεί ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου σε σχέση με τις άλλες δυο. Σχετικά με τη στήλη αμινο–πυριτίας, έχει βρεθεί ότι οι αμινοπροπυλο–ομαδες δρουν ως σχετικά ισχυρότεροι δότες δεσμών υδρογόνου σε σχέση με τη διόλη–πυριτία [Ryu *et al.*, 2000]. Εντούτοις, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο

αυτό εξαρτάται άμεσα από τον αριθμό των ελεύθερων σιλανομάδων (ύπαρξη μερικής ή ολικής ακροκάλυψης) γεγονός το οποίο επηρεάζει σημαντικά τη συνολική ικανότητα της επιφάνειας της στατικής φάσης στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου [Helburn *et al.*, 1994].

3.4.2 Μοντελοποίηση της συμπεριφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών υπό συνθήκες HILIC

Για τη λεπτομερή διερεύνηση του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC και την αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες κατακρατούνται και διαχωρίζονται στις τρεις διαφορετικές στατικές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξισώσεις-μοντέλα:

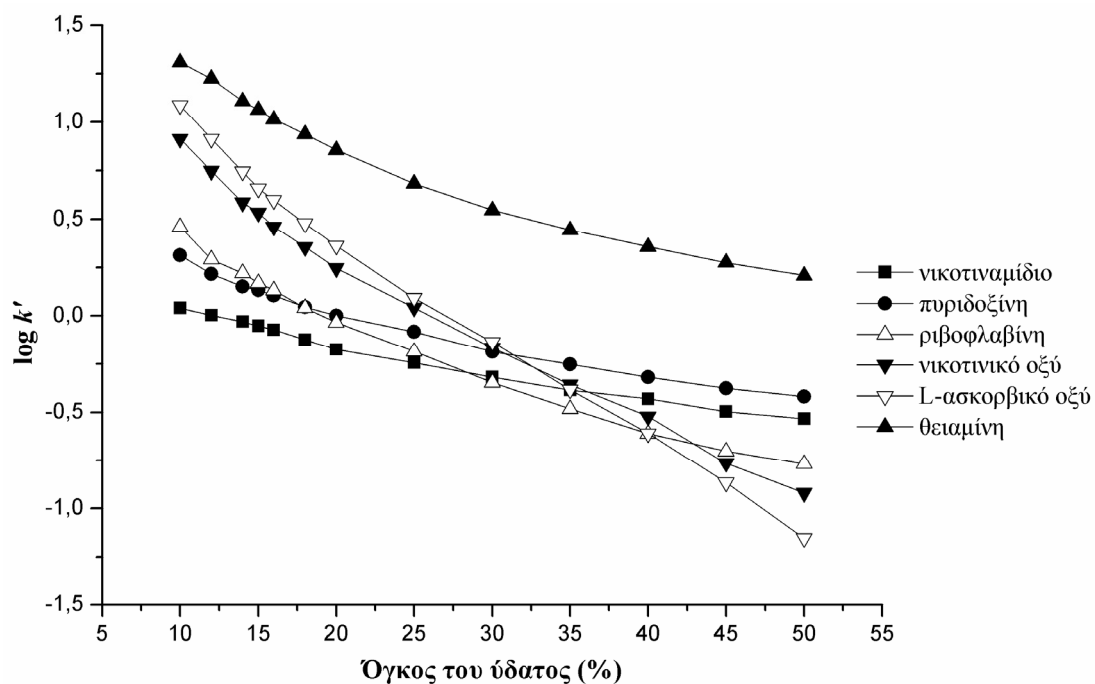
1. $\log k' = \log k'_{org} - S\phi$ (μοντέλο κατανομής)
2. $\log k' = \log k'_w - \frac{A_s}{n_w} \log \phi$ (μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης)
3. $\ln k' = a + b \ln \phi + c\phi$ (προτεινόμενο μοντέλο στην HILIC από τον Jin και τους συν.)

Για τη μελέτη της προσαρμογής των παραπάνω μοντέλων στις τρεις διαφορετικές στατικές φάσεις, χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλά σημεία του k' των υδατοδιαλυτών βιταμινών ως προς το περιεχόμενο της κινητής φάσης σε ύδωρ. Συγκεκριμένα, οι αναλογίες ACN/H₂O (v/v) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των διαγραμμάτων είναι οι ακόλουθες: 50/50, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 82/18, 84/16, 85/15, 86/14, 88/12 και 90/10. Για το σύνολο των στατικών φάσεων, χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος pH 5,0 με συγκέντρωση οξικού αμμωνίου ίση προς 10 mM.

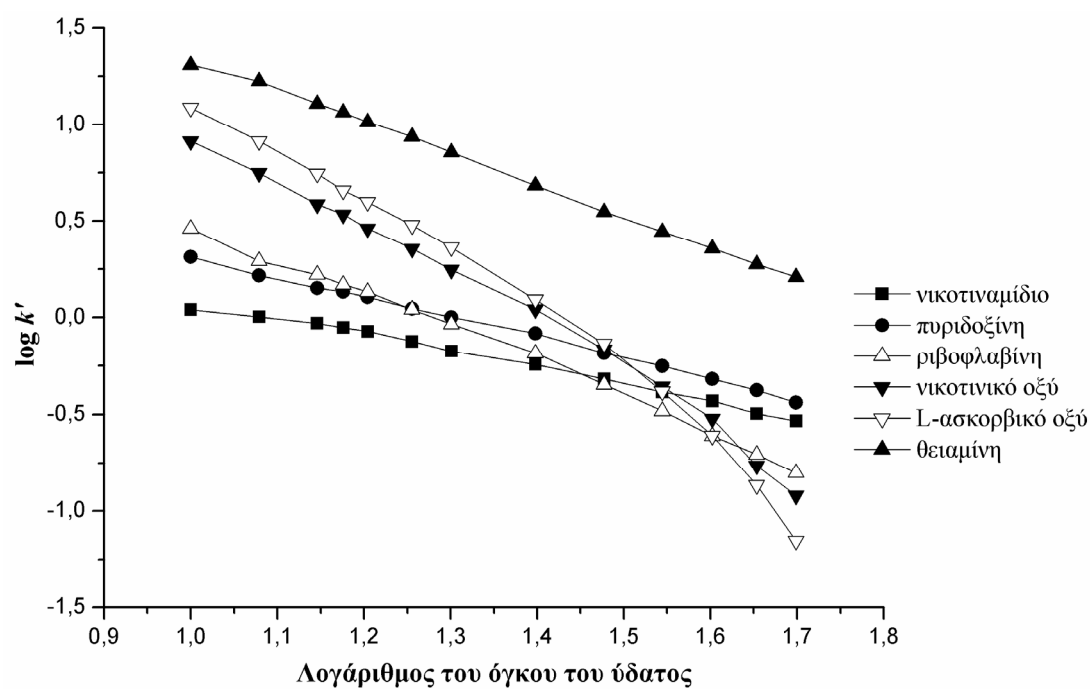
3.4.2.1 Στήλη διόλης-πυριτίας

Όσον αφορά τα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης, τα αντίστοιχα διαγράμματα του λογάριθμου του k' συναρτήσει του όγκου [$\log k' = f(\varphi)$] και του λογάριθμου του όγκου του ύδατος [$\log k' = f(\log \varphi)$] στην κινητή φάση παρατίθενται στα Σχήματα 3.4.3 και 3.4.4, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης που προκύπτουν (Πίνακας 3.4.3) κανένα από τα δυο μοντέλα δεν περιγράφει ικανοποιητικά το μηχανισμό κατακράτησης για το σύνολο των υπό μελέτη ενώσεων, αν και το μοντέλο προσρόφησης φαίνεται να προσαρμόζεται στα δεδομένα σε μεγαλύτερο βαθμό. Αυτό σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων στην HILIC δεν περιγράφεται καθαρά από κατανομή ή επιφανειακή προσρόφηση. Ανακατασκευάζοντας τα διαγράμματα $\log k' = f(\varphi)$ για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη (ουδέτερες ενώσεις στις συνθήκες μελέτης) για περιεκτικότητα ύδατος 50–20% (v/v) βελτιώνεται αισθητά η γραμμική απόκριση με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να λαμβάνουν τιμές: $0,9900 < R^2 < 0,9929$. Αντίστοιχα, σημαντική είναι η βελτίωση της γραμμικότητας στο μοντέλο κατανομής για το νικοτινικό οξύ, το L-ασκορβικό οξύ και τη θειαμίνη (φορτισμένες ενώσεις) ($0,9905 < R^2 < 0,9991$) για περιεκτικότητα ύδατος 50–16% (v/v). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι καθώς μεταβάλλεται το ποσοστό του ύδατος στην κινητή φάση διαφοροποιείται η συνεισφορά των μηχανισμών κατανομής και προσρόφησης με τον τελευταίο να είναι πιο αισθητός σε υψηλά ποσοστά ACN. Εντούτοις, είναι δύσκολο να καθοριστεί ένα συγκεκριμένο σημείο στο οποίο να λαμβάνει χώρα μετάβαση από τον ένα μηχανισμό κατακράτησης στον άλλο και να ισχύει για το σύνολο των ενώσεων, λόγω της ύπαρξης δευτερευόντων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενώσεων, της κινητής φάσης και της επιφάνειας της στατικής φάσης [Kovalova *et al.*, 2009; Karatapanis *et al.*, 2010].



Σχήμα 3.4.3: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου κατανομής για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη διόλης-πυριτίας.



Σχήμα 3.4.4: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου επιφανειακής προσρόφησης για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη διόλης-πυριτίας.

Πίνακας 3.4.3: Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης.

Ένωση	Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R^2)	
	Μοντέλο κατανομής	Μοντέλο προσρόφησης
νικοτιναμίδιο	0,9812	0,9920
πυριδοξίνη	0,9708	0,9988
ριβοφλαβίνη	0,9785	0,9960
νικοτινικό οξύ	0,9875	0,9900
L-ασκορβικό οξύ	0,9938	0,9817
θειαμίνη	0,9587	0,9979

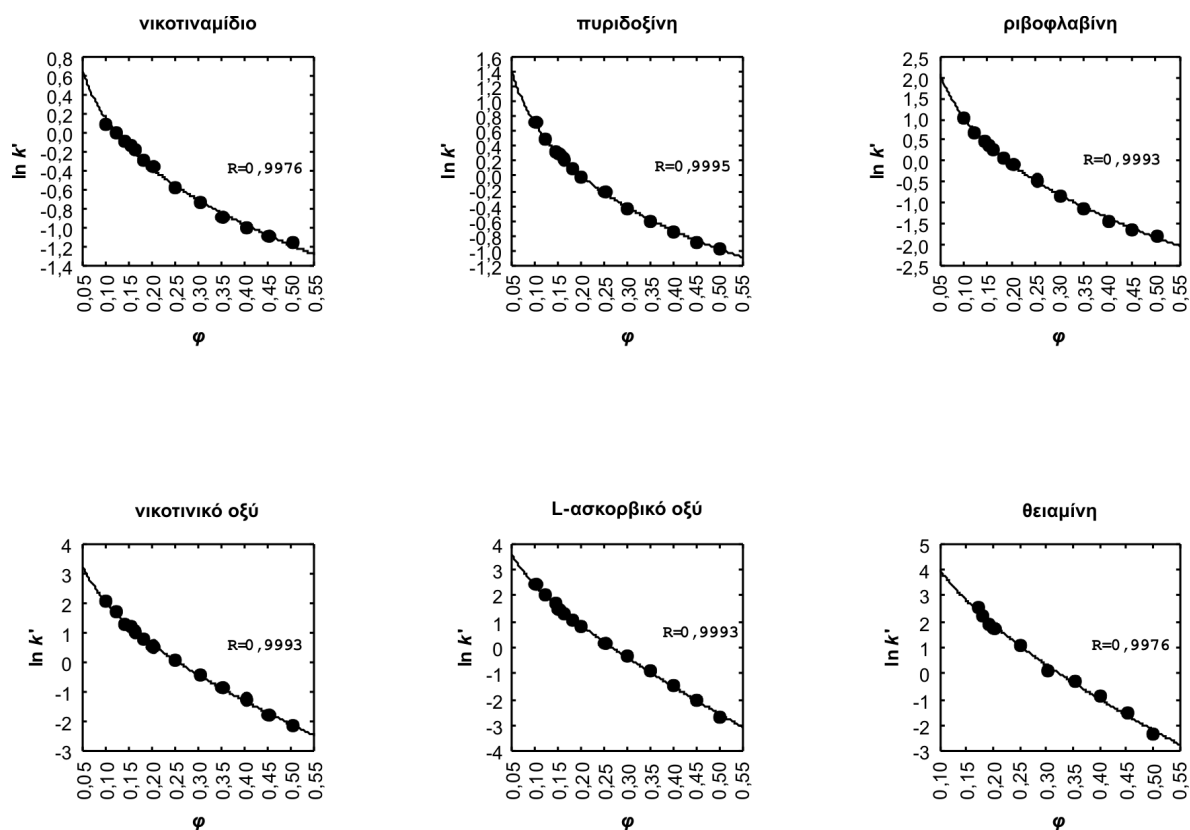
Μια πρώτη προσέγγιση για την εξήγηση του μηχανισμού είναι το γεγονός ότι καθώς αυξάνεται το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση, μικραίνει και ο όγκος της υδατικής στιβάδας στην επιφάνεια της στήλης (§ 3.4.1). Επιπλέον, με την αύξηση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση, ελαττώνεται ο αριθμός των μορίων του ύδατος στον κύριο όγκο της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να αυξάνει σημαντικά η διαφορά στην πολικότητα μεταξύ του μεγαλύτερου μέρους της κινητής φάσης και της υδατικής στιβάδας. Κατά συνέπεια, οι ενώσεις κατανέμονται στην υδατική στιβάδα και παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα γεγονός το οποίο ευνοεί την άμεση αλληλεπίδραση με την επιφάνεια της στατικής φάσης.

Η διαφοροποίηση (με βάση την περιεκτικότητα σε ύδωρ) της συνεισφοράς των μηχανισμών κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης μεταξύ των ουδέτερων και των φορτισμένων ενώσεων μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ελκτικών ή απωστικών, με τις αρνητικά φορτισμένες σιλανομάδες της στήλης. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες που δεν φέρουν φορτίο αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση σε ποσοστό ύδατος $\leq 20\%$ (v/v) μέσω δεσμών υδρογόνου. Καθώς το ποσοστό του ύδατος στην κινητή φάση ελαττώνεται περισσότερο ($\leq 16\%$ v/v), τα ιόντα του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος έχουν μεγαλύτερη τάση να κατανεμηθούν στην υδατική στιβάδα (§ 3.1.4). Κατά συνέπεια, η παρουσία περισσότερων ιόντων αμμωνίου έχει ως συνέπεια την αποτελεσματικότερη κάλυψη των φορτισμένων σιλανομάδων και τη μείωση της ηλεκτροστατικής άπωσης. Έτσι, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ μπορούν πλέον να προσεγγίσουν την επιφάνεια της στήλης και να αλληλεπιδράσουν μέσω δεσμών υδρογόνου. Από την άλλη μεριά, η χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης συνηγορεί στο ότι η

επιφανειακή προσρόφηση (μέσω του μηχανισμού ιονανταλλαγής) συνεισφέρει σημαντικά στο συνολικό μηχανισμό κατακράτησης για μεγαλύτερο εύρος περιεκτικότητας ύδατος, συμπεράσμα το οποίο ενισχύεται από τη μεγάλη διαφοροποίηση των συντελεστών συσχέτισης (Πίνακας 3.4.3) στους μηχανισμούς κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης [Karatapanis *et al.*, 2010].

Όσον αφορά το τρίτο μοντέλο, του Jin και των συνεργατών του, φαίνεται ότι τα δεδομένα προσαρμόζονται ικανοποιητικά για το σύνολο των υπό μελέτη ενώσεων και για όλο το εύρος της περιεκτικότητας σε ύδωρ στην κινητή φάση [Guo *et al.*, 2009]. Συγκεκριμένα, οι συντελεστές συσχέτισης κυμαίνονται από 0,9951 έως 0,9991 (Πίνακας 3.4.4). Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων του διαδραστικού συστήματος: αναλύτης↔κινητή φάση↔στατική φάση στο συνολικό μηχανισμό της HILIC. Αν και η στατιστική ανάλυση των υπολοίπων (residuals) παρέχει την πιο αξιόπιστη δοκιμή του βαθμού προσαρμογής, πιο απλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν η μέση τιμή των υπολοίπων και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων που θα πρέπει να είναι κοντά στην τυπική απόκλιση των τιμών $\ln k'$. Ο Πίνακας 3.4.4 παρέχει τις τιμές των σταθερών a , b και c για τις υπό μελέτη ενώσεις μαζί με δεδομένα που αφορούν την ύπαρξη προσαρμογής του μοντέλου, ενώ στο Σχήμα 3.4.5 απεικονίζονται τα αντίστοιχα γραφήματα. Όσον αφορά το συντελεστή b , υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών του ($P < 0,05$) και αυξητική τάση, κατά απόλυτη τιμή, μεταβαίνοντας από τις ουδέτερες στις φορτισμένες βιταμίνες. Η τάση αυτή συμβαδίζει με τη σειρά έκλυσης των ενώσεων. Τη μεγαλύτερη απόλυτη τιμή εμφανίζει η θειαμίνη λόγω της ύπαρξης ελκτικών δυνάμεων με τη στατική φάση. Το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με το νικοτιναμίδιο και την πυριδοξίνη λόγω της ύπαρξης ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου. Οι τιμές του b για τη ριβοφλαβίνη το νικοτινικό και L-ασκορβικό οξύ στατιστικά δεν διαφέρουν σημαντικά και η σειρά έκλυσης φαίνεται να καθορίζεται από την πολικότητα των ενώσεων και επομένως από το μηχανισμό κατανομής.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι μια πολική ένωση κατανέμεται μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του περισσότερο υδρόφοβου μέρους της κινητής φάσης αποτελούμενου κυρίως από οργανικό διαλύτη [Alpert, 1990] καθώς και τη δυνατότητα της ένωσης να προσροφάται στην επιφάνεια της στήλης (δεσμοί υδρογόνου, ιοντικές αλληλεπιδράσεις) σε υψηλά ποσοστά οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση [Quiming *et al.*, 2007], είναι δυνατή η πιο λεπτομερής εξήγηση του μηχανισμού κατακράτησης και της σειράς έκλυσης των ενώσεων.



Σχήμα 3.4.5: Γραφική απεικόνιση του τρίτου μοντέλου για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη διόλης-πυριτίας.

Πίνακας 3.4.4: Υπολογισμός των συντελεστών παλινδρόμησης και προσαρμογή των δεδομένων κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στο τρίτο μοντέλο, σε στήλη διόλης-πυριτίας.

Παράμετρος	α^*	b^*	c^*	R^2	RES_{mean}	RES_{SD}
Ένωση						
νικοτιναμίδιο	$-1,29 \pm 0,23$	$-0,655 \pm 0,093$	$-0,69 \pm 0,37$	0,9951	0,024674	0,017
πυριδοξίνη	$-1,46 \pm 0,12$	$-0,954 \pm 0,050$	$-0,362 \pm 0,19$	0,9991	0,012975	0,009
ριβοφλαβίνη	$-2,03 \pm 0,26$	$-1,39 \pm 0,11$	$-1,52 \pm 0,42$	0,9985	0,025509	0,023
νικοτινικό οξύ	$-0,64 \pm 0,28$	$-1,37 \pm 0,15$	$-4,78 \pm 0,61$	0,9986	0,035012	0,019
L-ασκορβικό οξύ	$0,74 \pm 0,28$	$-1,08 \pm 0,19$	$-8,07 \pm 0,76$	0,9986	0,043962	0,029
θειαμίνη	$0,34 \pm 0,23$	$-1,91 \pm 0,29$	$-7,66 \pm 0,91$	0,9952	0,041138	0,034

* $\pm$ Συνστηματικό σφάλμα, για επίπεδο αξιοπιστίας 95%

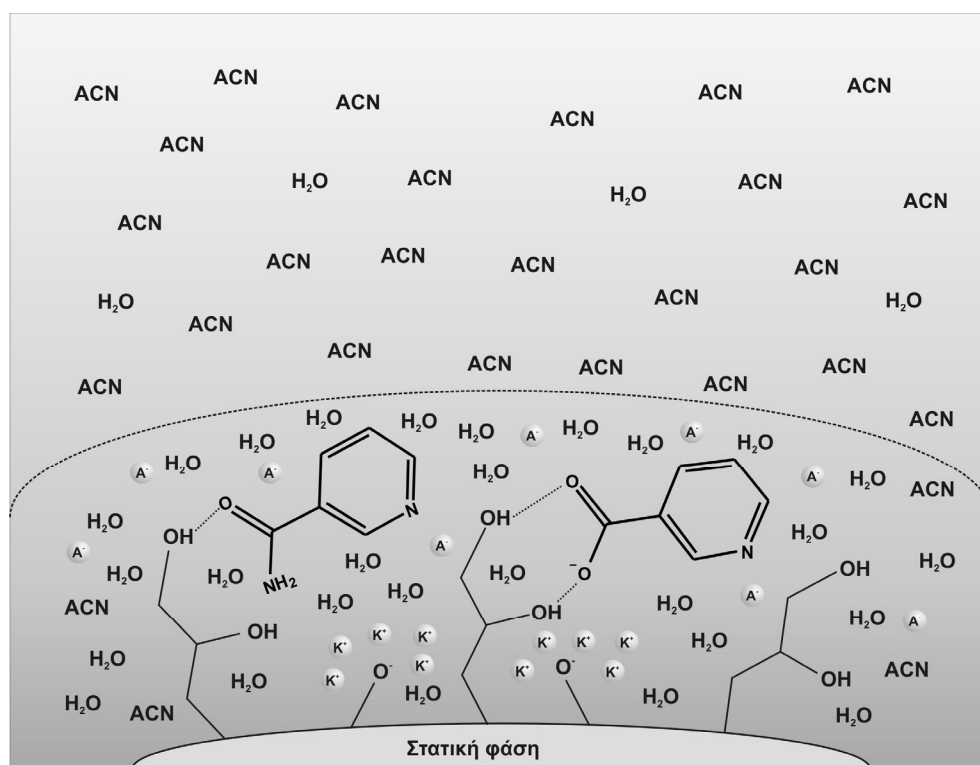
RES_{mean} : μέση τιμή των υπολοίπων

RES_{SD} : τυπική απόκλιση των υπολοίπων

Οι τιμές της τυπικής απόκλισης του $\ln k'$ κυμαίνονται από 0,0095 έως 0,016

Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη κατακράτηση της ριβοφλαβίνης σε σχέση με την πυριδοξίνη και το νικοτιναμίδιο σχετίζεται με το μεγαλύτερο αριθμό ομάδων στο μόριο οι οποίες μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις υδροξυλομάδες της επιφάνειας της στήλης [Tolstikov & Fiehn, 2002]. Η ηλεκτροστατική άπωση που υφίσταται το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ εξασθενούν με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενώσεων αυτών και της στήλης. Η ύπαρξη στο μόριο του L-ασκορβικού οξέος τριών επιπλέον υδροξυλομάδων ικανών να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου εξηγεί τη μεγαλύτερη κατακράτηση του μορίου σε σύγκριση με το νικοτινικό οξύ. Τέλος, οι προαναφερθείσες ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις ελκτικής φύσης [Karatapanis *et al.*, 2009] καθιστούν τη θειαμίνη ως την ένωση με το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης.

Στο Σχήμα 3.4.6 απεικονίζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός κατακράτησης στη στήλη διόλης-πυριτίας με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

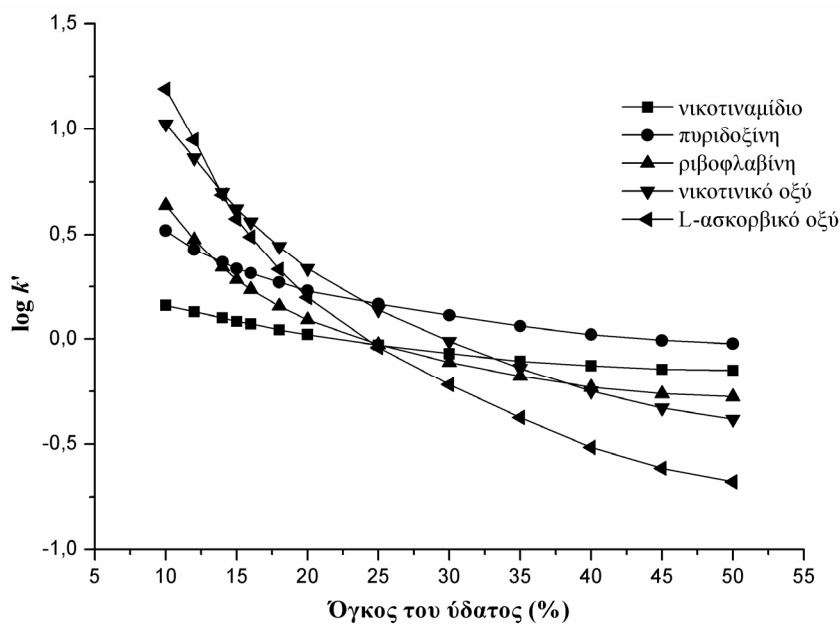


Σχήμα 3.4.6: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού κατακράτησης στη στήλη διόλης-πυριτίας. Τα σύμβολα K^+ και A^- αντιστοιχούν στα κατιόντα και στα ανιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος.

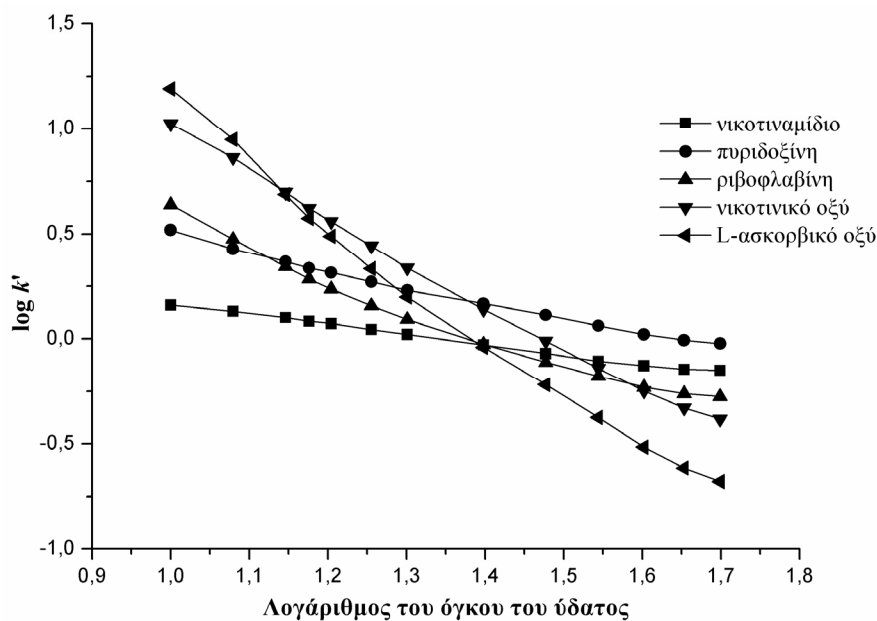
3.4.2.2 Στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας

Τα διαγράμματα των μοντέλων κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης στην περίπτωση της στήλης από μη επικαλυμμένη πυριτία απεικονίζονται στα Σχήματα 3.4.7 και 3.4.8, αντίστοιχα, ενώ οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης που προκύπτουν από τα δυο μοντέλα παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.5. Η θειαμίνη δεν συμπεριλήφθηκε στη μελέτη αυτή λόγω της πολύ ισχυρής κατακράτησης της ένωσης και της δεδομένης ύπαρξης επιφανειακής προσρόφησης του μορίου από την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης.

Όπως και στη στήλη διόλης-πυριτίας έτσι και στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας τα δυο μοντέλα δεν αρκούν για να περιγράψουν με σαφήνεια το μηχανισμό κατακράτησης για το σύνολο των υπό μελέτη ενώσεων στην HILIC. Από τις τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης (Πίνακας 3.4.5) φαίνεται το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης να ταιριάζει περισσότερο κυρίως όσον αφορά το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και το νικοτινικό οξύ ($0,9905 < R^2 < 0,9961$). Με ανακατασκευή των διαγραμμάτων $\log k' = f(\varphi)$ βελτιώνεται σημαντικά η γραμμική συσχέτιση για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη για περιεκτικότητα ύδατος 50–25% (v/v). Οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης στην περίπτωση αυτή κυμαίνονται στο εύρος τιμών: $0,9907 < R^2 < 0,9915$. Για το νικοτινικό οξύ προκύπτει επίσης σημαντική βελτίωση του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης ($R^2=0,9919$) στο μοντέλο κατανομής για περιεκτικότητα ύδατος 50–25% (v/v), ενώ ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του L-ασκορβικού οξέος λαμβάνει την τιμή 0,9912 για περιεκτικότητα ύδατος 50–20% (v/v).



Σχήμα 3.4.7: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου κατανομής για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.



Σχήμα 3.4.8: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου επιφανειακής προσρόφησης για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.

Πίνακας 3.4.5: Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης.

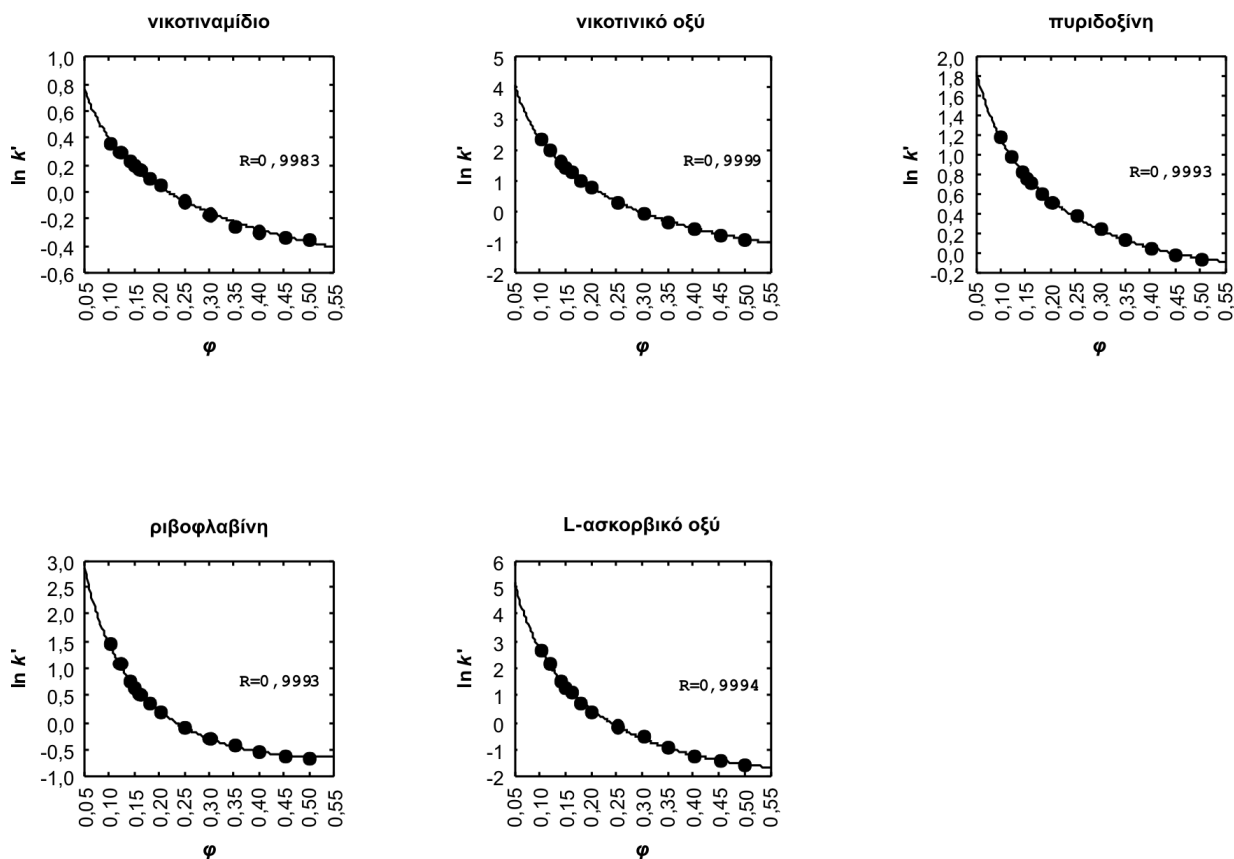
Ένωση	Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R^2)	
	Μοντέλο κατανομής	Μοντέλο προσρόφησης
νικοτιναμίδιο	0,9691	0,9955
πυριδοξίνη	0,9266	0,9905
ριβοφλαβίνη	0,8729	0,9688
νικοτινικό οξύ	0,9383	0,9961
L-ασκορβικό οξύ	0,9208	0,9889

Συγκριτικά με τη στήλη διόλης-πυριτίας, το νικοτιναμίδιο, η πυριδοξίνη και η ριβοφλαβίνη αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της μη επικαλυμμένης πυριτίας σε σχετικά μεγαλύτερο ποσοστό ύδατος στην κινητή φάση. Η διαφοροποίηση αυτή πολύ πιθανό να οφείλεται στο διαφορετικό τρόπο ενυδάτωσης της επιφάνειας της στήλης. Όπως αναφέρθηκε και στην § 3.4.1, όσο πιο λεπτή είναι η σχηματιζόμενη υδατική στιβάδα τόσο πιο εύκολα τα μόρια μιας ένωσης προσεγγίζουν την επιφάνεια της στήλης. Επιπλέον, η καλύτερη συσχέτιση ως προς το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης για τις ενώσεις αυτές οφείλεται και στη μεγαλύτερη ισχύ των δεσμών υδρογόνου με τη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας (§ 3.2.3). Η συνεισφορά του μηχανισμού επιφανειακής προσρόφησης για το L-ασκορβικό οξύ σε ποσοστό ύδατος $\leq 20\%$ (v/v) οφείλεται στην αποτελεσματικότερη ελάττωση της ηλεκτροστατικής άπωσης από τα αμμωνιακά ιόντα σε σχέση με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Αν και υπάρχει πλήρες αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια της στήλης πυριτίας, η λεπτότερη στιβάδα ύδατος που σχηματίζεται βοηθάει στην "απόσβεση" του φορτίου αυτού σε σημαντικό βαθμό. Η προσρόφηση του νικοτινικού οξέος στην επιφάνεια της στήλης σε ποσοστό ύδατος $\leq 25\%$ (v/v) φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη μερικού θετικού φορτίου στον πυριδινικό δακτύλιο του μορίου. Όπως αναφέρθηκε ήδη στην § 3.2.2, το νικοτινικό οξύ φαίνεται να υφίσταται τόσο απωστικές όσο και ελκτικές δυνάμεις από την επιφάνεια της στήλης λόγω ενός είδους "προσανατολισμού" του μορίου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοείται θερμοδυναμικά η μετακίνηση από την κινητή προς τη στατική φάση. Τα παραπάνω βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της § 3.2.5, όπου ο λόγος $\Delta S^\circ/R$ για το νικοτινικό οξύ έχει θετική τιμή.

Η εκλεκτικότητα της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας είναι όμοια με αυτήν της στήλης διόλης-πυριτίας στο μεγαλύτερο εύρος pH της κινητής φάσης. Οι κυριότερες

διαφορές στους χρόνους κατακράτησης σημειώνονται στις ενώσεις που φέρουν φορτίο. Συγκεκριμένα, το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ δέχονται ισχυρότερες ηλεκτροστατικές απώσεις από την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της πυριτίας, σε ποσοστό ύδατος 50–20% (v/v), ενώ σε ποσοστό ύδατος $\leq 20\%$ (v/v) οι δυο αυτές ενώσεις κατακρατούνται πιο ισχυρά. Επίσης, η χρωματογραφική συμπεριφορά της θειαμίνης αποδεικνύει την ύπαρξη του μηχανισμού επιφανειακής προσρόφησης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ελκτικής φύσης.

Η γραφική απεικόνιση του τρίτου μοντέλου, για το μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC, φαίνεται στο Σχήμα 3.4.9, ενώ οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης και τα αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας δίνονται στον Πίνακα 3.4.6. Όπως και στη στήλη διόλης–πυριτίας, το μοντέλο του Jin και των συνεργατών του προσαρμόζεται για το σύνολο των πέντε υδατοδιαλυτών βιταμινών και για όλο το εύρος περιεκτικότητας σε ύδωρ στην κινητή φάση. Οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των ενώσεων κυμαίνονται από 0,9966 έως 0,9997, ενώ ο μέσος όρος των τιμών των υπολοίπων και οι τιμές της τυπικής απόκλισης των υπολοίπων βρίσκονται κοντά στις τιμές της τυπικής απόκλισης των τιμών $\ln k'$. Οι τιμές του συντελεστή b στατιστικά διαφέρουν σημαντικά. Οι τιμές του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος έχουν μεγαλύτερες απόλυτες τιμές σε σχέση με το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη. Και σε αυτήν την περίπτωση η αυξητική τάση των τιμών του συντελεστή b σχετίζεται άμεσα με τη σειρά έκλουσης των ενώσεων. Συγκριτικά με τη στήλη διόλης–πυριτίας, οι τιμές του συντελεστή b εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της πυριδοξίνης, της ριβοφλαβίνης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος. Οι απόλυτες τιμές του b είναι μεγαλύτερες στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας γεγονός το οποίο πιθανό να οφείλεται στην ύπαρξη ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου λόγω της αυξημένης οξύτητας των σιλανομάδων.



Σχήμα 3.4.9: Γραφική απεικόνιση του τρίτου μοντέλου για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.

Πίνακας 3.4.6: Υπολογισμός των συντελεστών παλινδρόμησης και προσαρμογή των δεδομένων κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στο τρίτο μοντέλο, σε στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας.

Παράμετρος						
Ένωση	a^*	b^*	c^*	R^2	RES_{mean}	RES_{SD}
νικοτιναμίδιο	$-0,92 \pm 0,11$	$-0,556 \pm 0,044$	$0,32 \pm 0,17$	0,9966	0,012	0,001
πυριδοξίνη	$-1,50 \pm 0,11$	$-1,098 \pm 0,044$	$1,37 \pm 0,17$	0,9986	0,012	0,007
ριβοφλαβίνη	$-4,51 \pm 0,19$	$-2,385 \pm 0,078$	$4,48 \pm 0,31$	0,9986	0,022	0,012
νικοτινικό οξύ	$-3,98 \pm 0,13$	$-2,659 \pm 0,052$	$2,48 \pm 0,21$	0,9997	0,013	0,011
L-ασκορβικό οξύ	$-6,96 \pm 0,36$	$-3,97 \pm 0,14$	$5,34 \pm 0,57$	0,9988	0,040	0,023

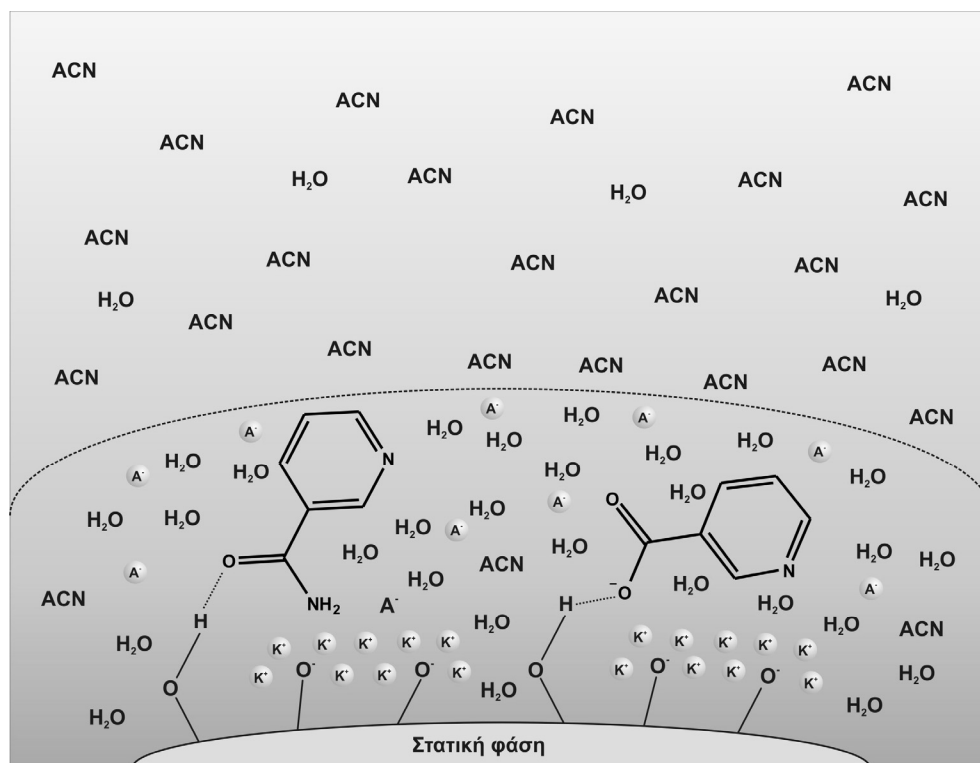
* $\pm$ Συστηματικό σφάλμα, για επίπεδο αξιοπιστίας 95%

RES_{mean} : μέση τιμή των υπολοίπων

RES_{SD} : τυπική απόκλιση των υπολοίπων

Οι τιμές της τυπικής απόκλισης του $\ln k'$ κυμαίνονται από 0,0095 έως 0,016

Στο Σχήμα 3.4.10 απεικονίζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός κατακράτησης στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 3.4.10: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού κατακράτησης στη στήλη μη επικαλυμμένης πυριτίας. Τα σύμβολα K^+ και A^- αντιστοιχούν στα κατιόντα και στα ανιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος.

3.4.2.3 Στήλη αμινο-πυριτίας

Τα διαγράμματα των μοντέλων κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης για κάθε ένωση για τη στήλη αμινο-πυριτίας απεικονίζονται στα Σχήματα 3.4.11 και 3.4.12 αντίστοιχα, ενώ οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης που προκύπτουν από τα δυο μοντέλα παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.7. Όπως και στις άλλες δυο στατικές φάσεις, υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την προσαρμογή των μοντέλων στα δεδομένα των χρόνων κατακράτησης των υπό μελέτη ενώσεων. Συγκεκριμένα, και σύμφωνα με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης, υπάρχει καλύτερη εφαρμογή του μοντέλου κατανομής για τη θειαμίνη ($R^2=0,9917$) έναντι του μοντέλου επιφανειακής προσρόφησης ($R^2=0,9849$). Αντίθετα, για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη υπάρχει καλή εφαρμογή του μοντέλου επιφανειακής προσρόφησης ($0,9902 < R^2 < 0,9943$), έναντι του μοντέλου κατανομής ($0,9139 < R^2 < 0,9736$). Με ανακατασκευή των διαγραμμάτων του μοντέλου

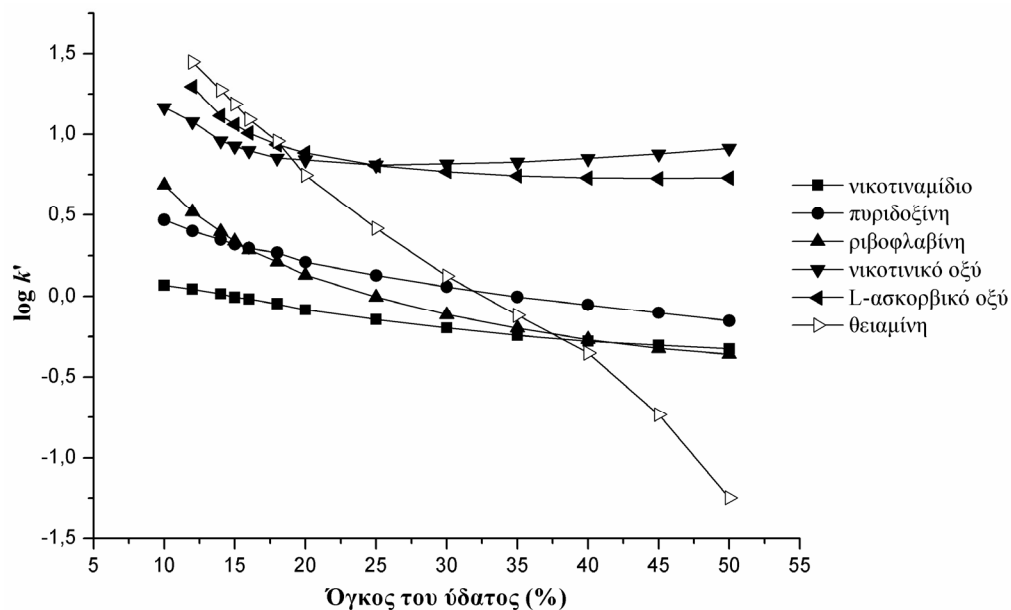
κατανομής προκύπτει σημαντική βελτίωση της γραμμικής συσχέτισης για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη για περιεκτικότητα ύδατος 50–25% (v/v) με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να κυμαίνονται στο εύρος τιμών: $0,9924 < R^2 < 0,9943$. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για το νικοτινικό και το L–ασκορβικό οξύ υπάρχει σημαντική απόκλιση τόσο από το μοντέλο κατανομής όσο και από το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης (Πίνακας 3.4.7). Επιπλέον, με την ανακατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων δεν προέκυψε γραμμική απόκριση σε κάποιο εύρος περιεκτικότητας ύδατος για το μοντέλο κατανομής. Η χρωματογραφική συμπεριφορά των δυο αυτών ενώσεων εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση στη στήλη αμινο–πυριτίας σε σχέση με τις άλλες δυο στατικές φάσεις. Αρχικά, οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν μεγάλη κατακράτηση σε ποσοστό ACN 50% (v/v), ενώ με περαιτέρω αύξηση του ποσοστού του ACN ($50\% < \text{ACN} \leq 70\%$) λαμβάνει χώρα σταδιακή μείωση της κατακράτησης. Μικρή αύξηση του χρόνου κατακράτησης σημειώνεται σε ποσοστό ACN $> 70\%$ (v/v), ενώ ραγδαία αύξηση λαμβάνει χώρα σε ποσοστό ACN $> 16\%$ (v/v). Η παραπάνω χρωματογραφική συμπεριφορά αναδεικνύει την πολυπλοκότητα του συνολικού μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC.

Όπως αναφέρθηκε στην § 3.4.2.2, η απόκλιση από το μηχανισμό κατανομής για περιεκτικότητα ACN 75–90% (v/v) των ενώσεων που δεν φέρουν φορτίο σε pH 5,0 (νικοτιναμίδιο, πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη) οφείλεται στην πιο λεπτή στιβάδα ύδατος που καλύπτει την επιφάνεια της στατικής φάσης. Θα πρέπει να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι η μετάβαση από το μηχανισμό κατανομής σε αυτόν της επιφανειακής προσρόφησης μπορεί να περιγραφεί μόνο για κάποιο εύρος περιεκτικότητας σε ύδωρ (ή ACN) δεδομένης της πολυπλοκότητας του ίδιου του μηχανισμού κατακράτησης. Από την άλλη μεριά, αν και το μοντέλο επιφανειακής προσρόφησης αποκλίνει σημαντικά από τη γραμμικότητα για το νικοτινικό και το L–ασκορβικό οξύ, εντούτοις είναι εμφανής η ισχυρή ηλεκτροστατική έλξη των δυο αυτών ενώσεων με τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στατικής φάσης. Στο συμπέρασμα αυτό συγκλίνουν και τα αντίστοιχα θερμοδυναμικά δεδομένα (§ 3.3.5), όπου ο λόγος $\Delta S^\circ/R$ λαμβάνει θετικές τιμές και η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων αυξανόμενης της θερμοκρασίας της στήλης είναι πολύ μικρή.

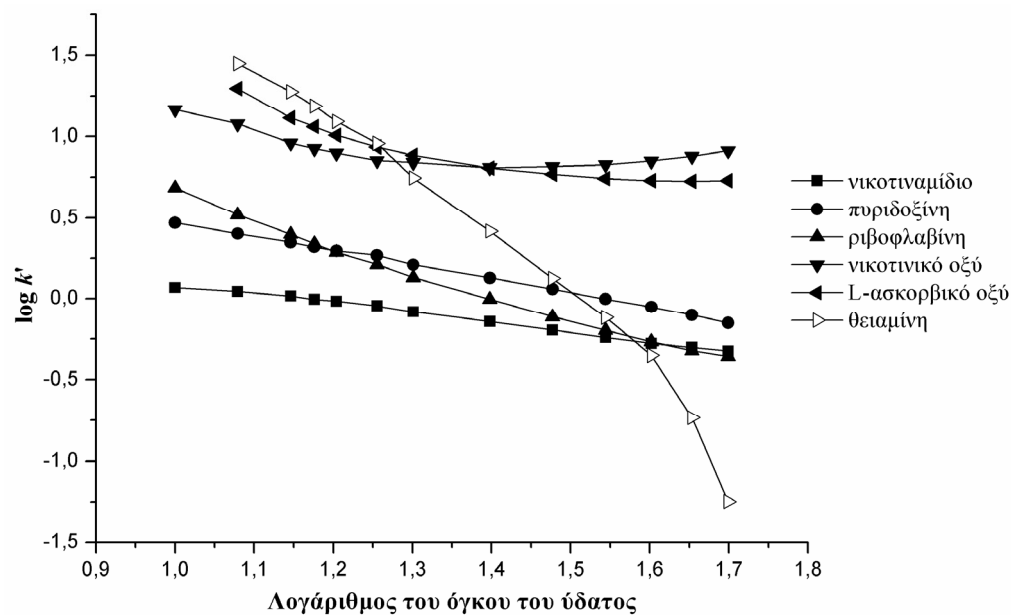
Στην περίπτωση της θειαμίνης, ανακατασκευάζοντας το διάγραμμα $\log k' = f(\varphi)$ προκύπτει βελτίωση της γραμμικής συσχέτισης για εύρος περιεκτικότητας ύδατος 50–16% (v/v) με το συντελεστή R^2 να λαμβάνει την τιμή 0,9954. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα της § 3.4.1, αναφορικά με το βαθμό ενυδάτωσης των στατικών φάσεων, θα αναμενόταν ότι η συνεισφορά του μηχανισμού επιφανειακής προσρόφησης πρέπει να λαμβάνει χώρα σε

υψηλότερο ποσοστό σε ύδωρ. Εντούτοις, τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν με τη χρωματογραφική συμπεριφορά του μορίου με βάση την ισχύ του διαλύτη έκλουσης (Σχήματα 3.3.4 και 3.3.5). Η εξήγηση στηρίζεται στην ύπαρξη μόνιμου θετικού φορτίου στο μόριο. Όπως έχει αναφερθεί και στη θεωρία (§ 1.1.4.3), η παρουσία οργανικού διαλύτη προκαλεί μείωση της σταθεράς διάστασης μιας βασικής ένωσης. Το φαινόμενο αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση της θειαμίνης με αποτέλεσμα να υφίσταται ηλεκτροστατική άπωση ακόμα και σε ποσοστό ACN >85% (v/v). Έτσι, στην περίπτωση αυτή η προσέγγιση της επιφάνειας της στατικής φάσης από τα μόρια της θειαμίνης είναι εφικτή σε ποσοστό ACN $\geq$ 85% (v/v), όπου και λαμβάνει χώρα αποτελεσματικότερη απόσβεση της ηλεκτροστατικής άπωσης.

Όσον αφορά τη σειρά έκλουσης στη στήλη αμινο-πυριτίας, αυτή διαφέρει σημαντικά από τη στήλη διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας για τις ενώσεις που φέρουν φορτίο, όταν το ποσοστό του ACN κυμαίνεται στο εύρος 70–85% (v/v). Συγκεκριμένα, η ηλεκτροστατική έλξη που δέχεται το μόριο της θειαμίνης στη στήλη διόλης-πυριτίας και μη επικαλυμμένης πυριτίας έχει αντικατασταθεί από την ηλεκτροστατική άπωση στη στήλη αμινο-πυριτίας και το μοντέλο κατανομής στην περίπτωση αυτή εμφανίζει καλύτερη προσαρμογή. Αντίθετα, η ηλεκτροστατική έλξη που δέχονται τα μόρια του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος στη στήλη αμινο-πυριτίας προκαλούν την πολύ πιο ισχυρή κατακράτηση των ενώσεων αυτών ακόμα και σε κινητή φάση με μεγάλη εκλουστική ισχύ. Σε αυτού του είδους τις αλληλεπιδράσεις οφείλονται και οι μεγάλες αποκλίσεις από το μηχανισμό κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης, δεδομένης της μεγαλύτερης ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έναντι των δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 3.4.11: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου κατανομής για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη αμινο-πυριτίας.

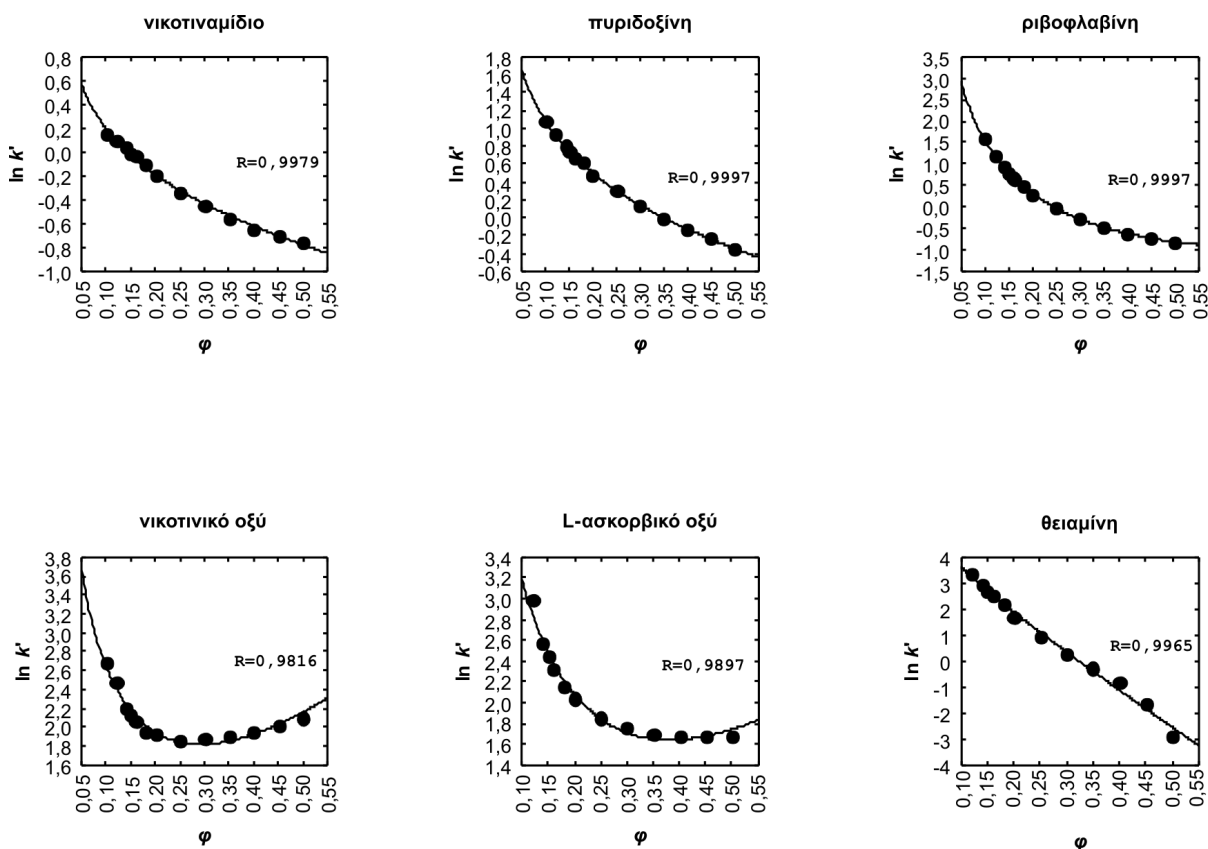


Σχήμα 3.4.12: Γραφική απεικόνιση του μοντέλου επιφανειακής προσρόφησης για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη αμινο-πυριτίας.

Πίνακας 3.4.7: Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης.

Ένωση	Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R^2)	
	Μοντέλο κατανομής	Μοντέλο προσρόφησης
νικοτιναμίδιο	0,9736	0,9943
πυριδοξίνη	0,9690	0,9989
ριβοφλαβίνη	0,9139	0,9902
νικοτινικό οξύ	0,6731	0,8258
L–ασκορβικό οξύ	0,7219	0,8544
θειαμίνη	0,9917	0,9849

Στο Σχήμα 3.4.13 απεικονίζεται γραφικά το τρίτο μοντέλο μηχανισμού για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες στη στήλη αμινο–πυριτίας, ενώ στον Πίνακα 3.4.8 δίνονται οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης της εξίσωσης και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας. Στην παρούσα περίπτωση, υπάρχει καλή συσχέτιση του μοντέλου για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη, τη ριβοφλαβίνη και τη θειαμίνη, με τους αντίστοιχους συντελεστές συσχέτισης να κυμαίνονται από 0,9930 έως 0,9995. Αντίθετα, τα δεδομένα για το νικοτινικό και το L–ασκορβικό οξύ δεν εμφανίζουν καλή προσαρμογή με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να λαμβάνουν τις τιμές 0,9636 και 0,9796 αντίστοιχα. Οι τιμές του συντελεστή b εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και είναι μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή στο νικοτινικό και L–ασκορβικό οξύ, όπου λαμβάνει χώρα ισχυρή ηλεκτροστατική έλξη. Σε σχέση με τις προηγούμενες στατικές φάσεις, η απόλυτη τιμή της θειαμίνης είναι πολύ μικρότερη λόγω της ύπαρξης απωστικών δυνάμεων από τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της στήλης. Έτσι, η ισχυρή κατακράτηση της ένωσης οφείλεται στον εξαιρετικά υδρόφιλο χαρακτήρα και στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 3.4.13: Γραφική απεικόνιση του τρίτου μοντέλου για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε στήλη αμινο-πυριτίας.

Πίνακας 3.4.8: Υπολογισμός των συντελεστών παλινδρόμησης και προσαρμογή των δεδομένων κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών στο τρίτο μοντέλο, σε στήλη αμινο-πυριτίας.

Ένωση	Παράμετρος			R^2	RES_{mean}	RES_{SD}
	a^*	b^*	c^*			
νικοτιναμίδιο	$-0,88 \pm 0,15$	$-0,489 \pm 0,063$	$-0,47 \pm 0,25$	0,9957	0,017	0,011
πυριδοξίνη	$-0,678 \pm 0,081$	$-0,781 \pm 0,032$	$-0,41 \pm 0,13$	0,9995	0,007	0,007
ριβοφλαβίνη	$-3,82 \pm 0,14$	$-2,199 \pm 0,056$	$2,96 \pm 0,22$	0,9994	0,015	0,009
νικοτινικό οξύ	$-2,55 \pm 0,35$	$-1,96 \pm 0,14$	$6,70 \pm 0,55$	0,9636	0,041	0,018
L-ασκορβικό οξύ	$-3,39 \pm 0,58$	$-2,57 \pm 0,24$	$6,72 \pm 0,90$	0,9796	0,050	0,032
θειαμίνη	$3,4 \pm 1,5$	$-0,66 \pm 0,65$	$-12,7 \pm 2,4$	0,9930	0,123	0,106

* $\pm$ Συστηματικό σφάλμα, για επίπεδο αξιοπιστίας 95%

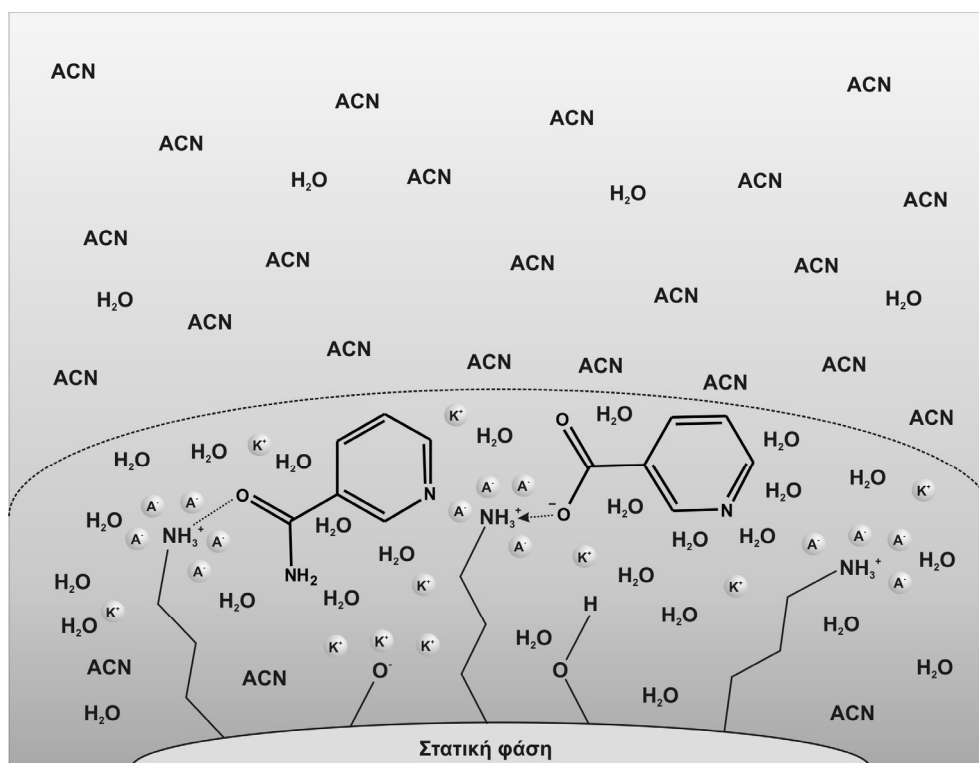
RES_{mean} : μέση τιμή των υπολοίπων

RES_{SD} : τυπική απόκλιση των υπολοίπων

Οι τιμές της τυπικής απόκλισης του $\ln k'$ κυμαίνονται από 0,0095 έως 0,016

Η ασυνήθιστη χρωματογραφική συμπεριφορά του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: Σε περιεκτικότητα ACN <70% (v/v) η διαφορά πολικότητας μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του οργανικού μέρους της κινητής φάσης είναι μικρή. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι ο σχηματισμός της στιβάδας ύδατος στην HILIC λαμβάνει χώρα σε ποσοστό ACN $\geq 70\%$ [McCalley & Neue, 2008]. Ουσιαστικά αυτό μεταφράζεται ως την ύπαρξη ικανής διαφοράς πολικότητας μεταξύ της στιβάδας ύδατος και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης ώστε να λάβει χώρα κατανομή και να προκύψει ικανός χρόνος κατακράτησης. Έτσι, σε συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας σε ύδωρ, τα ιόντα του άλατος της κινητής φάσης βρίσκονται διεσπαρμένα σε όλο τον όγκο της κινητής φάσης με αποτέλεσμα οι θέσεις ιονανταλλαγής στην επιφάνεια της στήλης να είναι σε μεγάλο βαθμό διαθέσιμες. Καθώς αυξάνεται το ποσοστό του ACN ($50\% < \text{ACN} < 70\%$, v/v) ένας αριθμός ιόντων κατευθύνεται προς τη "σχηματιζόμενη" στιβάδα ύδατος και κατά συνέπεια προς την επιφάνεια της φορτισμένης στατικής φάσης. Στην περίπτωση της στήλης αμινο-πυριτίας (θετικό φορτίο), τα οξικά ανιόντα είναι αυτά τα οποία τείνουν να σχηματίσουν μια "ηλεκτρική στιβάδα" άνωθεν της επιφάνειας της στατικής φάσης ελαττώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Δεδομένου του γεγονότος ότι το νικοτινικό και το L-ασκορβικό οξύ αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με την επιφάνεια της στήλης ακόμα και παρουσία ύδατος σε υψηλό ποσοστό (50%) στην κινητή φάση, η κίνηση των οξικών ανιόντων προς την επιφάνεια της στατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή ελάττωση της ηλεκτροστατικής έλξης και κατά συνέπεια την ελάττωση της κατακράτησης. Σε ποσοστό ACN $\geq 70\%$ (v/v), λόγω της διείσδυσης μορίων οργανικού διαλύτη στην υδατική στιβάδα (§ 3.4.1), επέρχεται σχετική αύξηση της pK_a του οξικού οξέος με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των διαθέσιμων ανιόντων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού διαθέσιμων περιοχών ιονανταλλαγής στην επιφάνεια της στήλης και την εκ νέου αύξηση της κατακράτησης του νικοτινικού και του L-ασκορβικού οξέος.

Στο Σχήμα 3.4.14 απεικονίζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός κατακράτησης στη στήλη αμινο-πυριτίας με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 3.4.14: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού κατακράτησης στη στήλη αμινο-πυριτίας. Τα σύμβολα K^+ και A^- αντιστοιχούν στα κατιόντα και στα ανιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος.

3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.5.1 Επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης

Η επιλογή της στατικής φάσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών έγινε με βάση τα εξής κριτήρια:

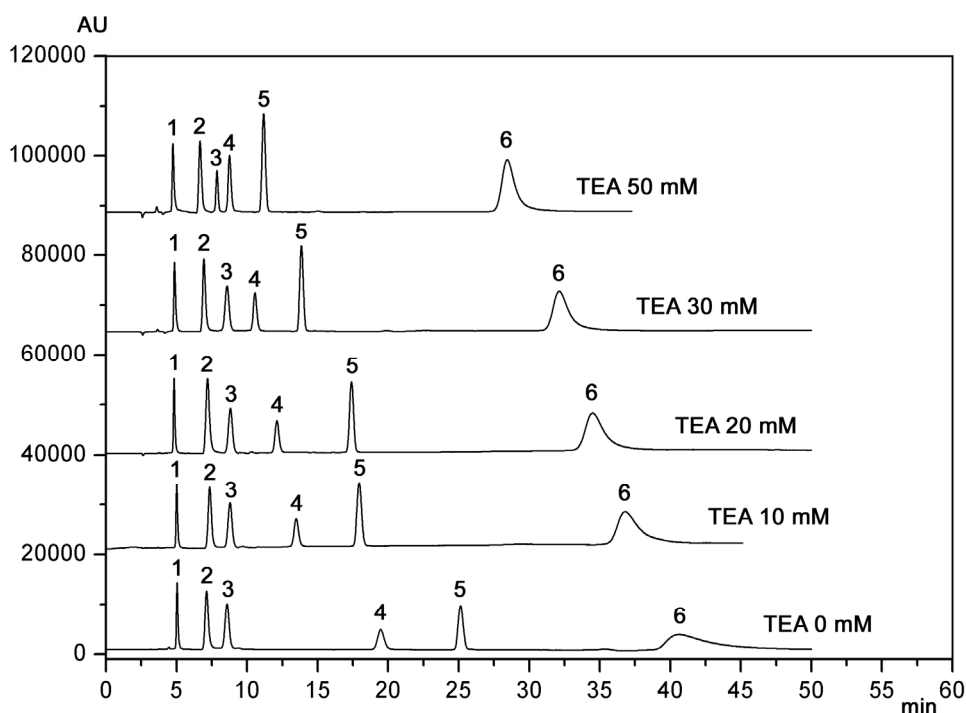
- α) διαχωριστική ικανότητα
- β) συμμετρία κορυφών
- γ) συνολικός χρόνος ανάλυσης
- δ) ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης / αναλογία διαλυτών

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Η συγκεκριμένη στατική φάση επιδεικνύει πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα για το μίγμα των έξι υδατοδιαλυτών βιταμινών υπό ισοκρατικές συνθήκες έναντι της στήλης μη επικαλυμμένης πυριτίας στην οποία η θειαμίνη παρουσιάζει ισχυρή κατακράτηση και δεν εκλύεται σε ποσοστό $ACN \geq 70\%$ (v/v). Η στήλη αμινο-πυριτίας, επιδεικνύει επίσης πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα των υδατοδιαλυτών βιταμινών υπό ισοκρατικές συνθήκες και σε αναλογία διαλυτών ACN/H_2O 85/15 (v/v). Εντούτοις, στην περίπτωση της στήλης διόλης-πυριτίας, η παρουσία του ACN σε ποσοστό 90% (v/v) διασφαλίζει την ταχύτερη έκλυση των μη πολικών συστατικών, στα πρώτα λεπτά του χρωματογραφήματος, αποφεύγοντας έτσι πιθανές παρεμποδίσεις από την παρουσία τέτοιων συστατικών σε ένα δείγμα.

3.5.2 Βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης στη στήλη διόλης-πυριτίας

3.5.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της TEA στη διαχωριστική ικανότητα

Στο Σχήμα 3.5.2.1 απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της TEA στον ισοκρατικό διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης δίνονται στον Πίνακα 3.5.2.1. Οι χρόνοι κατακράτησης για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη παραμένουν πρακτικά σταθεροί παρουσία TEA στην κινητή φάση. Εντούτοις, βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης, περίπου κατά 1 μονάδα, σχετίζεται με τη μικρή βελτίωση στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης κατά 0,1 μονάδες.



Σχήμα 3.5.2.1: Επίδραση της συγκέντρωσης της TEA στον ισοκρατικό διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Σημαντική είναι η επίδραση της TEA στη χρωματογραφική συμπεριφορά του νικοτινικού και L-ασκορβικού οξέος, όπου οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης μειώνονται αισθητά. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ιδιότητα της TEA να δρα και ως αντιδραστήριο σχηματισμού ζεύγους ιόντων (ion-pairing agent) μειώνοντας έτσι τον υδρόφιλο χαρακτήρα των αρνητικά φορτισμένων ενώσεων. Κατ' αντιστοιχία, η διαχωριστική ικανότητα του ζεύγους νικοτινικό οξύ/L-ασκορβικό οξύ (Πίνακας 3.5.2.1) μειώνεται αισθητά.

Πίνακας 3.5.2.1: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα βιταμινών συναρτήσει της συγκέντρωσης της TEA (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.5.2.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)				
	TEA 0 mM	TEA 10 mM	TEA 20 mM	TEA 30 mM	TEA 50 mM
νικοτιναμίδιο ¹ / πυριδοξίνη ²	4,18	4,39	5,88	4,74	5,20
πυριδοξίνη ² / ριβοφλαβίνη ³	2,82	2,38	2,90	3,30	3,38
ριβοφλαβίνη ³ / νικοτινικό οξύ ⁴	15,1	7,80	4,99	4,38	2,27
νικοτινικό οξύ ⁴ / L-ασκορβικό οξύ ⁵	6,67	7,18	9,70	4,56	5,91
L-ασκορβικό οξύ ⁵ / θειαμίνη ⁶	5,14	10,1	12,6	14,2	16,4

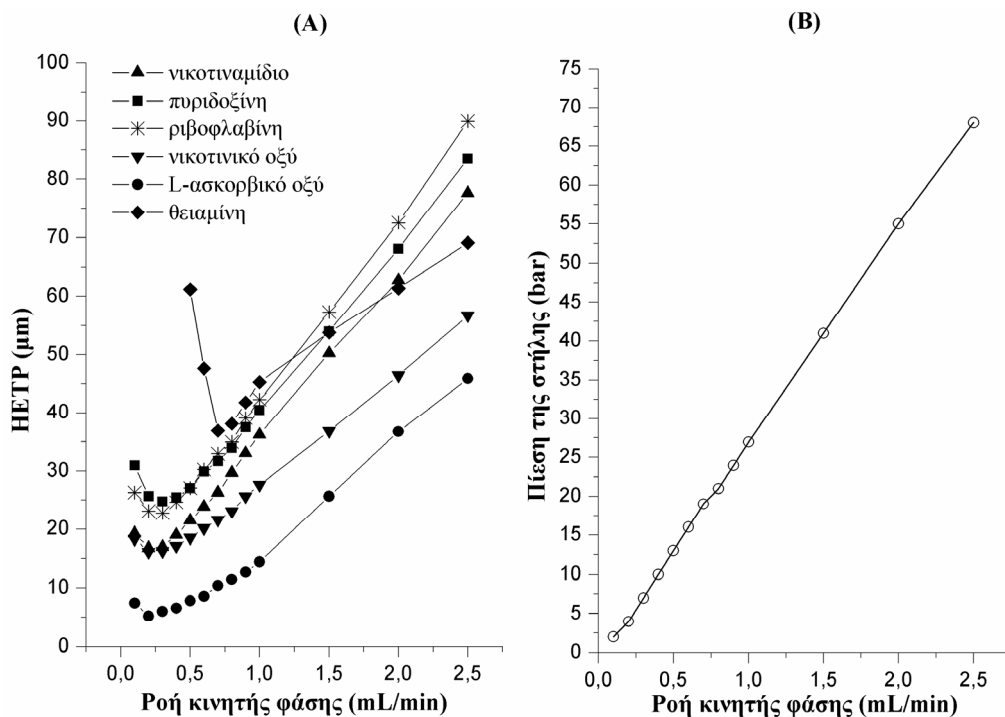
Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $Rs \approx 1,50$

Μείωση του χρόνου κατακράτησης λαμβάνει χώρα και στην περίπτωση της θειαμίνης, σε μικρότερο όμως βαθμό λόγω της διατήρησης της πολικότητας του μορίου. Η σημαντική μείωση του χρόνου κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος σε σύγκριση με τη θειαμίνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας των δύο αυτών ενώσεων. Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση τόσο στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών όσο και στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης διόλης-πυριτίας, η συγκέντρωση των 20 mM σε TEA φαίνεται να αποτελεί βέλτιστο συμβιβασμό μεταξύ των δυο αυτών παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται άμεσα μεταξύ τους [Karatapanis *et al.*, 2009].

3.5.2.2 Χρωματογραφική απόδοση της στήλης διόλης-πυριτίας

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της HILIC είναι το χαμηλό ιξώδες της κινητής φάσης, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (>70%, v/v), το οποίο επιτρέπει την εφαρμογή υψηλών ροών [McCalley, 2007]. Εντούτοις, η αύξηση της ροής της κινητής φάσης πάνω από ένα όριο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των θεωρητικών πλακών N (ή την αύξηση του ύψους ισοδύναμου με μια θεωρητική πλάκα) και κατά συνέπεια τη σταδιακή απώλεια της απόδοσης της στήλης [Pack & Risley, 2005]. Επομένως, η βελτιστοποίηση ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι μια "ισορροπία" μεταξύ της εκλεκτικότητας, της ταχύτητας, αλλά και της διαχωριστικής ικανότητας για μια δεδομένη ανάλυση [Appelblad *et al.*, 2008].

Στο Σχήμα 3.5.2.2Α απεικονίζεται γραφικά η μεταβολή του ύψους ισοδύναμου με μια θεωρητική πλάκα ($HETP$) των ενώσεων συναρτήσει της ροής της κινητής φάσης, ενώ στον Πίνακα 3.5.2.2 δίνονται οι αντίστοιχες τιμές του $HETP$ και της πίεσης που αναπτύσσεται στη στήλη για κάθε τιμή της ροής. Ο μέγιστος αριθμός θεωρητικών πλακών της στήλης διόλης-πυριτίας για το νικοτιναμίδιο, το νικοτινικό οξύ και το L-ασκορβικό οξύ επιτυγχάνεται με ροή κινητής φάσης ίση προς 0,2 mL/min. Για την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη ο μέγιστος αριθμός N αντιστοιχεί σε ροή κινητής φάσης ίση προς 0,3 mL/min, ενώ για τη θειαμίνη σε ροή 0,7 mL/min. Στην πράξη όμως, η εφαρμογή χαμηλής ροής κινητής φάσης (0,2–0,3 mL/min), αν και επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση της στήλης, αφενός απαιτείται πολύ μεγάλος χρόνος ανάλυσης (>60 min) και αφετέρου η ευαισθησία της ανάλυσης είναι χαμηλή λόγω της διεύρυνσης των χρωματογραφικών κορυφών. Επιπλέον, στο δεδομένο μίγμα ενώσεων οι χαμηλές ροές δεν ευνοούν την έκλουση της θειαμίνης υπό ισοκρατικές συνθήκες. Όπως φαίνεται από τη γραφική απεικόνιση της εξίσωσης Van Deemter (Σχήμα 3.5.2.2Α) η αύξηση της ροής της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της διαχωριστικής δύναμης της στήλης. Εντούτοις, είναι εφικτή η εφαρμογή ροής κινητής φάσης ίση με 2,0 mL/min με τους αριθμούς των θεωρητικών πλακών για το σύνολο των ενώσεων να παραμένει σε ικανοποιητικά επίπεδα ($N > 2000$). Συγκεκριμένα, ο αριθμός N κυμαίνεται από 2068 έως 4083. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε ροή κινητής φάσης ίση με 2,0 και 2,5 mL/min η πίεση που αναπτύσσεται στη στήλη είναι ίση προς 55 και 68 bar αντίστοιχα (Σχήμα 3.5.2.2Β).

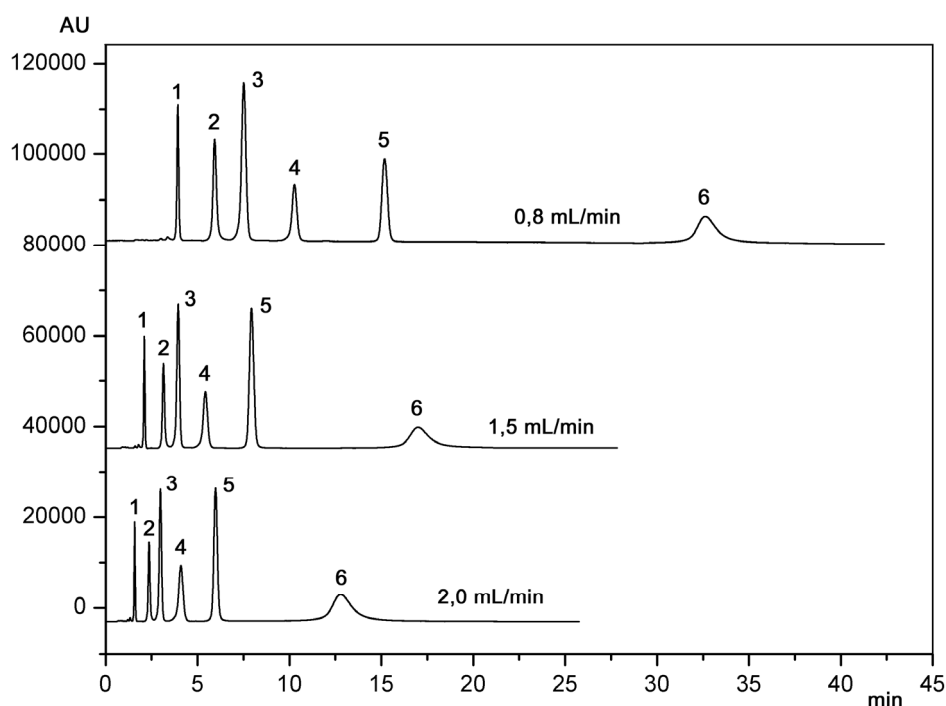


Σχήμα 3.5.2.2: Γραφική απεικόνιση: (A) της εξίσωσης Van Deemter και (B) της πίεσης της στήλης συναρτήσει της ροής της κινητής φάσης. Σύσταση κινητής φάσης: ACN/H₂O 90/10 (v/v), CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM, pH 5,0. Στήλη διόλης-πυριτίας.

Πίνακας 3.5.2.2: Αναπτυσσόμενη πίεση στη χρωματογραφική στήλη και τιμές του *HETP* των χρωματογραφικών κορυφών των βιταμινών συναρτήσει της ροής της κινητής φάσης.

Ροή (mL/min)	Πίεση (bar)	Ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα (<i>HETP</i>) (μm)					
		Νικοτιναμίδιο	Πυριδοξίνη	Ριβοφλαβίνη	Νικοτινικό οξύ	L-ασκορβικό οξύ	Θειαμίνη
0,1	2	19,29	30,95	26,34	18,30	7,46	—
0,2	4	16,75	25,66	23,15	16,12	5,20	—
0,3	7	16,97	24,73	22,76	16,26	6,01	—
0,4	10	19,04	25,47	24,66	17,11	6,60	—
0,5	13	21,49	27,09	27,09	18,53	7,85	61,21
0,6	16	28,87	29,93	30,26	20,15	11,61	47,62
0,7	19	26,32	31,66	32,94	21,59	12,43	36,87
0,8	21	29,70	33,91	34,99	23,10	11,43	38,09
0,9	24	33,03	37,48	39,07	25,65	12,71	41,79
1,0	27	36,25	40,45	42,26	27,63	14,40	45,31
1,5	41	50,24	54,00	57,30	36,87	25,66	53,81
2,0	55	62,77	68,05	72,53	46,47	36,73	61,38
2,5	68	77,65	83,52	89,92	56,75	45,90	69,07

Στο Σχήμα 3.5.2.3 παρατίθενται τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της ροής της κινητής φάσης στο διαχωρισμό του μίγματος και στο συνολικό χρόνο ανάλυσης. Όπως είναι αναμενόμενο, η μείωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων είναι ανάλογη με την αύξηση της ροής της κινητής φάσης [Pack & Risley, 2005]. Η αύξηση της ροής της κινητής φάσης στα 1,5 και 2,0 mL/min έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης του μίγματος από τα 32 min στα 17,5 και 12,6 min αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, λόγω της ελάττωσης του *HETP* της στήλης, λαμβάνει χώρα μείωση της διαχωριστικής ικανότητας στο μίγμα (Πίνακας 3.5.2.3). Παρά το γεγονός αυτό, σε ροή κινητής φάσης ίση προς 2,0 mL/min οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας (R_s) της στήλης για το σύνολο των ενώσεων κυμαίνεται από 2,5 έως 9,8.



Σχήμα 3.5.2.3: Επίδραση της ροής της κινητής φάσης στο διαχωρισμό του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε στήλη διόλης-πυριτίας (χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.5.2.2). **Χρωματογραφικές κορυφές:** (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Επιπλέον, η επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης των ενώσεων (injection precision), εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD), σε διαδοχικές εγχύσεις με ροή ίση προς 2,0 mL/min κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 0,7%. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη δυνατότητα της HILIC για γρήγορη ανάλυση πολικών ενώσεων, όπως οι υδατοδιαλυτές

βιταμίνες, με ικανοποιητικό διαχωρισμό και με χαμηλές πιέσεις, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης.

Πίνακας 3.5.2.3: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης συναρτήσει της ροής της κινητής φάσης.

Ροή κινητής φάσης (mL/min)	Διαχωριστική ικανότητα (Rs)				
	νικοτιναμίδιο/ πυριδοξίνη	πυριδοξίνη/ ριβοφλαβίνη	ριβοφλαβίνη/ νικοτινικό οξύ	νικοτινικό οξύ/ L-ασκορβικό οξύ	L-ασκορβικό οξύ/ θειαμίνη
0,1	7,6	4,2	6,5	10,9	—
0,2	7,9	4,4	6,7	11,1	—
0,3	8,0	4,5	6,7	11,1	—
0,4	7,7	4,4	6,5	10,7	—
0,5	7,4	4,2	6,2	10,0	—
0,6	6,8	3,9	5,9	8,9	13,1
0,7	6,7	3,8	5,7	8,8	12,6
0,8	6,4	3,7	5,5	8,8	12,1
0,9	6,2	3,6	5,3	8,6	11,6
1,0	5,9	3,5	5,1	8,3	11,2
1,5	5,0	2,9	4,4	6,4	10,5
2,0	4,4	2,5	3,9	5,3	9,8
2,5	3,9	2,2	3,5	4,7	9,1

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $Rs \approx 1,50$

3.5.2.3 Δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Test–SST)

Παρά τη δυνατότητα εφαρμογής υψηλών ροών της κινητής φάσης, η επιλογή της κατάλληλης ροής για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να διασφαλίζεται ικανοποιητική απόδοση της στήλης και με το συντομότερο δυνατό χρόνο ανάλυσης. Για το λόγο αυτό επιλέγεται ροή κινητής φάσης ίση προς 0,8 mL/min, τιμή στην οποία διατηρείται υψηλή απόδοση της στήλης και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 32 min. Από τις τιμές του Πίνακα 3.5.2.4, αποδεικνύεται η καταλληλότητα των επιλεγμένων συνθηκών για ανάλυση. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) για το σύνολο των ενώσεων είναι μεγαλύτερος από 2000. Η επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης και του εμβαδού των ενώσεων, εκφρασμένη ως % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης, κυμαίνονται από 0,18 έως 0,26 και από 0,17 έως 0,90 αντίστοιχα. Όσον αφορά τη συμμετρία των κορυφών, οι τιμές T_f είναι σε αποδεκτές τιμές (σύμφωνα με το SST) και κυμαίνονται από 1,0 έως 1,6. Τέλος, οι παράγοντες κατακράτησης (k') είναι μεγαλύτεροι του 1,0, ενώ η διαχωριστική ικανότητα της στήλης για όλα τα ζεύγη ενώσεων είναι μεγαλύτερη του 2,7 [ICH, 2005].

Πίνακας 3.5.2.4: Αποτελέσματα της δοκιμής καταλληλότητας συστήματος για τις χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης του μίγματος των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Ένωση	<i>N</i>	<i>T_f</i>	<i>k'</i>	Επαναληψιμότητα <i>t_R</i> (%RSD)	Επαναληψιμότητα Area (%RSD)
νικοτιναμίδιο	5136	1,3	1,05	0,18	0,30
πυριδοξίνη	5012	1,2	1,95	0,19	0,26
ριβοφλαβίνη	4956	1,0	2,67	0,14	0,30
νικοτινικό οξύ	7443	1,1	3,97	0,21	0,17
L-ασκορβικό οξύ	12925	1,1	6,15	0,15	0,60
θειαμίνη	3608	1,6	13,43	0,26	0,90
Κριτήρια SST	>2000	≤2,0	>1,0	≤1,0	≤1,5

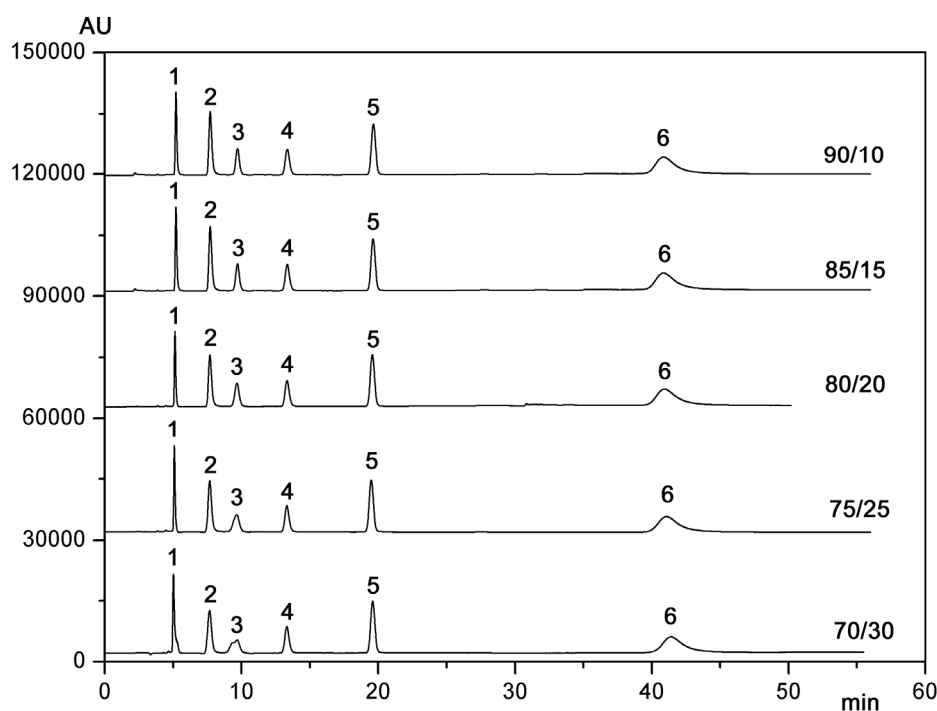
Νεκρός χρόνος (*t₀*): 2,45±0,02 min

3.5.2.4 Επίδραση της σύστασης του διαλύτη έγχυσης

Η σύσταση του διαλύτη έγχυσης αποτελεί μια εξίσου σημαντική παράμετρο στην HPLC καθώς μπορεί να επηρεάσει δραματικά το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών. Η κακή συμβατότητα (mismatch) μεταξύ της σύστασης του διαλύτη έγχυσης και της αρχικής σύστασης της κινητής φάσης μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως η εμφάνιση "μετώπου", "ουράς" ή ακόμα και η "διάσπαση" (splitting) μιας χρωματογραφικής κορυφής. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται κυρίως σε περιπτώσεις όπου η «εκλουστική ισχύς» του διαλύτη έγχυσης είναι μεγαλύτερη από την εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης και εμφανίζεται συνήθως στις ενώσεις με σχετικά σύντομο χρόνο κατακράτησης [Kazakevich & LoBrutto, 2007; Castells *et al.*, 1997]. Έτσι, η σύσταση του διαλύτη έγχυσης θα πρέπει να είναι κατά το δυνατόν όμοια με την αρχική σύσταση της κινητής φάσης [Grumbach *et al.*, 2004]. Επιπλέον, στην HILIC οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης περιέχουν υψηλό ποσοστό σε οργανικό διαλύτη γεγονός το οποίο μερικές φορές δεν ευνοεί τη διαλυτότητα των πολικών ενώσεων. Επομένως η σύσταση του διαλύτη έγχυσης θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να υπάρξει ένας συμβιβασμός μεταξύ της συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών, η οποία επηρεάζει άμεσα την ευαισθησία της ανάλυσης, και της διαλυτότητας των προς ανάλυση ενώσεων [Karatapanis *et al.*, 2009].

Στο Σχήμα 3.5.2.4 παρατίθενται χρωματογραφήματα σχετικά με την επίδραση της σύστασης του διαλύτη έγχυσης στο σχήμα των κορυφών. Σε σύσταση διαλύτη έγχυσης 90/10, 85/15 και 80/20 ACN/H₂O (v/v) δεν παρατηρείται καμία αλλοίωση στο σχήμα των κορυφών του μίγματος. Αντίθετα, με περαιτέρω αύξηση του ποσοστού του ύδατος στο διαλύτη

έγχυσης από 20 σε 25% (v/v) λαμβάνει χώρα σημαντική αύξηση του εύρους της χρωματογραφικής κορυφής της ριβοφλαβίνης και σε μικρότερο βαθμό στην κορυφή της πυριδοξίνης. Παρουσία ύδατος σε ποσοστό 30% (v/v) στο διαλύτη έγχυσης, η κορυφή της ριβοφλαβίνης διασπάται. Επιπλέον, η κορυφή του νικοτιναμίδιου εμφανίζει "ώμο", ενώ λαμβάνει χώρα μεγαλύτερη διεύρυνση της κορυφής της πυριδοξίνης.



Σχήμα 3.5.2.4: Επίδραση της σύστασης του διαλύτη έγχυσης στο σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών σε στήλη διόλης-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

ACN/H₂O 90/10 (v/v); CH₃COONH₄ 10 mM; TEA 20 mM; pH 5,0; ροή κινητής φάσης 0,6 mL/min; θερμοκρασία στήλης 25 °C.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μελέτη της διαλυτότητας των ενώσεων ξεχωριστά, αλλά και σε μίγμα αυτών, σε διάφορες συγκεντρώσεις ενδεικτικές της παρουσίας τους σε δείγματα. Η παρουσία ύδατος σε ποσοστό 20% (v/v) στο διαλύτη έγχυσης είναι επαρκής για την πλήρη διαλυτοποίηση κάθε ένωσης ξεχωριστά σε συγκέντρωση 100 mg/L. Κατά συνέπεια, η σύσταση του διαλύτη έγχυσης ίση προς 80/20 ACN/H₂O επιλέγεται ως ο τελικός διαλύτης έγχυσης για τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων.

3.5.2.5 Μελέτη της σταθερότητας του L-ασκορβικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε και στη θεωρία (§ 1.1.7), το L-ασκορβικό οξύ σε υδατικό διάλυμα είναι ασταθές και υπόκειται ταχέως σε οξείδωση παρουσία οξυγόνου, μετάλλων, ενζύμων, καθώς και σε υψηλές θερμοκρασίες. Επομένως, για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού θα πρέπει να επιλέγονται συνθήκες που να διασφαλίζουν τη σταθερότητα τέτοιων ενώσεων.

Η σταθερότητα του L-ασκορβικού οξέος σε διάλυμα αποτελούμενο από ACN/H₂O 50/50 (v/v) μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως σταθεροποιητές το ο-φωσφορικό οξύ και τη διθειοθρεϊτόλη (DTT). Η σύγκριση της σταθερότητας πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα L-ασκορβικού οξέος απουσία σταθεροποιητή. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε σειρά υδατικών διαλυμάτων L-ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 400 mg/L στα οποία προστέθηκε ξεχωριστά ο-φωσφορικό οξύ 0,1% (v/v) και DDT σε συγκεντρώσεις 200 και 400 mg/L. Η ανάλυση των διαλυμάτων για κάθε χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας κατάλληλο όγκο από το πυκνό διάλυμα και αραιώνοντας με κινητή φάση σε τελική συγκέντρωση 10 mg/L. Για τη διευκόλυνση της μελέτης, η σύσταση της κινητής φάσης επιλέχτηκε έτσι ώστε το L-ασκορβικό οξύ να εκλούεται σε χρόνο 5 min.

Στον Πίνακα 3.5.2.5 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας του L-ασκορβικού οξέος εκφρασμένα ως % ανάκτηση της ένωσης σε σχέση με το εμβαδό της ένωσης που προκύπτει από έγχυση πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος και σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 15 min. Η διθειοθρεϊτόλη είναι πιο αποτελεσματικός σταθεροποιητής του L-ασκορβικού οξέος σε σύγκριση με το ο-φωσφορικό οξύ. Συγκεκριμένα, το διάλυμα του L-ασκορβικού οξέος παρουσία DTT σε συγκέντρωση 200 mg/L είναι σταθερό για 10 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για 24 ώρες στους +4 °C, ενώ παρουσία DTT σε συγκέντρωση 400 mg/L το διάλυμα είναι σταθερό για 10 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για 48 ώρες στους +4 °C. Αντίθετα, παρουσία ο-φωσφορικού οξέος το διάλυμα είναι σταθερό για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ στους +4 °C και για 24 ώρες υπάρχει μικρή μείωση της συγκέντρωσης του διαλύματος.

Πίνακας 3.5.2.5: Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας διαλύματος L-ασκορβικού οξέος συναρτήσει του χρόνου και παρουσία διαφορετικών σταθεροποιητών.

Χρόνος (min)	Ανάκτηση (%)					
	Μάρτυρας	H ₃ PO ₄ 0,1% (v/v)	DDT 1 (φως)	DDT 1 (απουσία φωτός)	DDT 2 (φως)	DDT 2 (απουσία φωτός)
15	100	100	100	100	100	100
60 (1h)	101,2±0,6	102,5±0,7	100,7±0,5	101,4±0,6	101,3±0,5	101,8±0,5
120 (2h)	102,3±0,6	103,9±0,8	102,7±0,6	102,6±0,5	102,6±0,6	102,4±0,6
180 (3h)	101,2±0,4	104,5±0,6	102,6±0,5	102,4±0,6	102,5±0,5	102,3±0,7
240 (4h)	99,1 ±0,5	101,2±0,6	102,5±0,6	102,3±0,5	102,1±0,5	102,5±0,5
300 (5h)	96,2±0,5	98,8 ±0,5	101,1±0,4	101,6±0,4	101,7±0,6	101,8±0,6
360 (6h)	91,9±0,4	97,6±0,4	101,2±0,5	101,4±0,5	101,6±0,6	101,5±0,5
420 (7h)	90,7±0,6	94,6±0,5	101,2±0,6	101,1±0,4	101,3±0,5	101,2±0,6
480 (8h)	88,8±0,5	92,1±0,4	100,6±0,5	100,2±0,5	100,8±0,6	100,7±0,5
540 (9h)	80,4±0,4	86,9±0,5	100,3±0,4	100,4±0,4	100,5±0,5	100,4±0,6
600 (10h)	76,8±0,5	78,7±0,4	100,2±0,5	100,3±0,4	100,3±0,4	100,2±0,4
1440 (24h)	15,6±0,3	71,2±0,3	83,9 ±0,3	84,9 ±0,4	89,6 ±0,2	94,8 ±0,3
24h (4 °C)	—	99,5±0,6	100,4±0,2		100,9±0,5	
48h (4 °C)	—	98,3±0,4	99,2 ±0,4		99,8±0,3	
72h (4 °C)	—	83,1±0,5	96,8±0,5		98,5 ±0,4	

DDT 1: διθειοθρεϊτόλη σε συγκέντρωση 200 mg/L

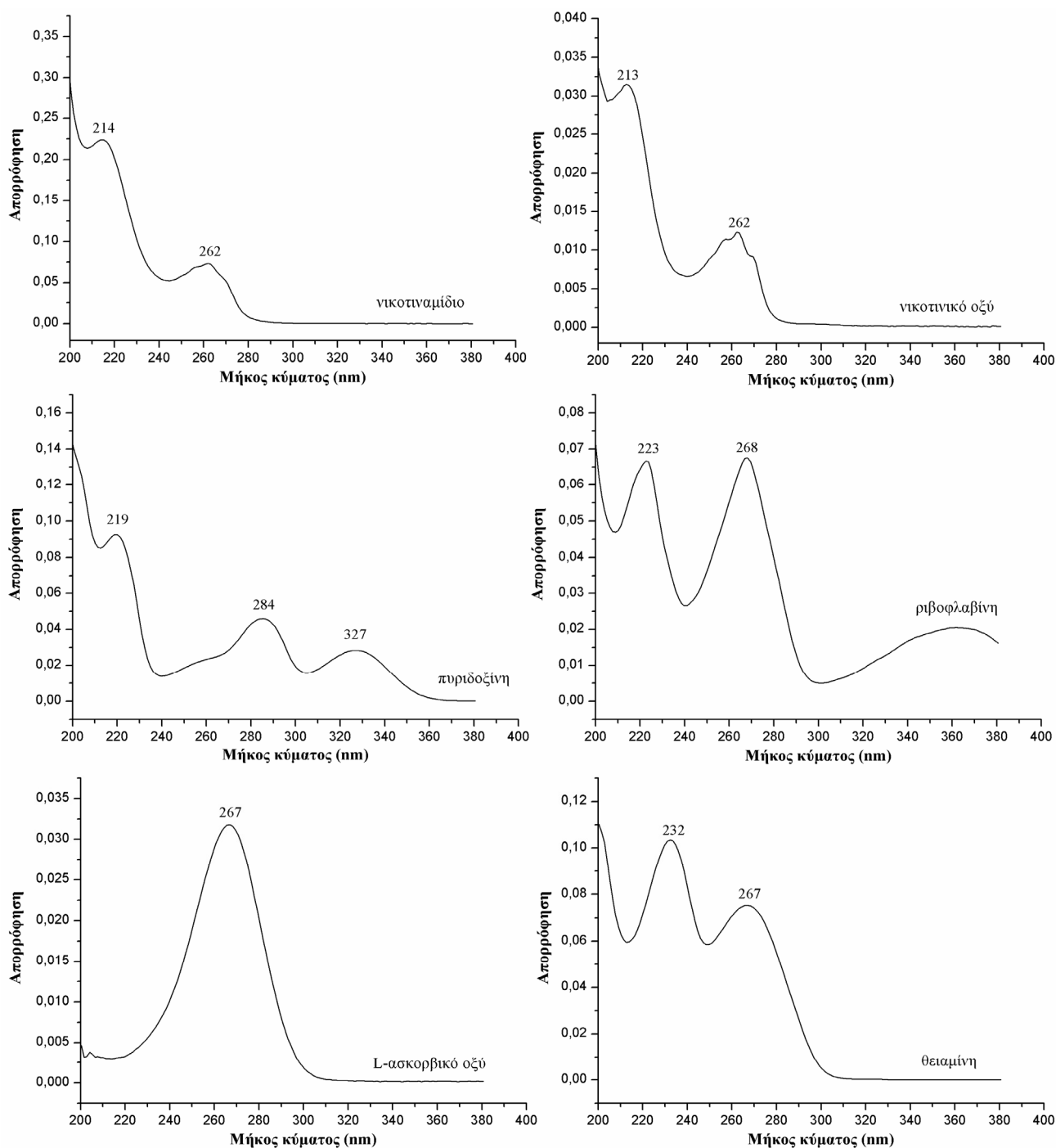
DDT 2: διθειοθρεϊτόλη σε συγκέντρωση 400 mg/L

Έτσι, για τον ποσοτικό προσδιορισμό επιλέγεται η χρήση της DTT σε συγκέντρωση ίση με τη συγκέντρωση του διαλύματος L-ασκορβικού οξέος. Επιπλέον, σε θερμοκρασία ψύξης (+4 °C) και απουσία φωτός, τα διαλύματα του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης, της θειαμίνης και του νικοτινικού οξέος είναι σταθερά για τουλάχιστον 1 μήνα. Τέλος, το διάλυμα της ριβοφλαβίνης, απουσία φωτός, είναι σταθερό για τουλάχιστον μια εβδομάδα.

3.5.2.6 Συνθήκες ανίχνευσης

Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector–DAD) ρυθμίζεται έτσι ώστε να σαρώνεται η περιοχή μηκών κύματος από 200 έως 380 nm. Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κάθε ένωσης είναι τα εξής: νικοτιναμίδιο στα 262 nm, πυριδοξίνη στα 284 nm, ριβοφλαβίνη στα 268 nm, νικοτινικό οξύ

στα 262 nm, L-ασκορβικό οξύ στα 267 nm και θειαμίνη στα 232 nm. Τα αντίστοιχα φάσματα υπεριώδους (UV) που προκύπτουν από τον ανιχνευτή παρατίθενται στο ακόλουθο Σχήμα.



Σχήμα 3.5.2.5: Φάσματα υπεριώδους (UV) των υδατοδιαλυτών βιταμινών με τις αντίστοιχες χαρακτηριστικές απορροφήσεις.

3.5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

3.5.3.1 Καμπύλες αναφοράς των υδατοδιαλυτών βιταμινών

Για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς παρασκευάζονται έξι πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 500 mg/L σε ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 10 mL. Κατόπιν, με κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται επτά επίπεδα συγκέντρωσης για κάθε υδατοδιαλυτή βιταμίνη τα οποία αναλύονται επί τρεις φορές το κάθε ένα. Το εύρος συγκεντρώσεων των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: νικοτιναμίδιο από 0,05 έως 10,0 mg/L, πυριδοξίνη από 0,1 έως 10,0 mg/L, ριβοφλαβίνη από 0,1 έως 10,0 mg/L, νικοτινικό οξύ από 0,1 έως 10,0 mg/L, L-ασκορβικό οξύ από 1,0 έως 20,0 mg/L και θειαμίνη από 0,1 έως 10,0 mg/L. Στον Πίνακα 3.5.3.1 παρουσιάζονται οι εξισώσεις ευθείας, οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης αυτών, καθώς επίσης και το εύρος γραμμικότητας των καμπυλών αναφοράς.

Πίνακας 3.5.3.1: Εξισώσεις ευθείας, συντελεστές γραμμικής συσχέτισης και εύρος γραμμικότητας για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Ένωση	Στοιχεία καμπύλης αναφοράς			
	Κλίση ευθείας	Τομή επί της αρχής	R ²	Εύρος γραμμικότητας (mg/L)
νικοτιναμίδιο	$(3,61 \pm 0,09) \times 10^4$	$+2843 \pm 165$	0,9995	0,05–10,0
πυριδοξίνη	$(4,55 \pm 0,12) \times 10^4$	$+2106 \pm 140$	0,9999	0,10–10,0
ριβοφλαβίνη	$(1,31 \pm 0,18) \times 10^5$	-3872 ± 380	0,9996	0,10–10,0
νικοτινικό οξύ	$(3,54 \pm 0,09) \times 10^4$	$+183 \pm 76$	0,9998	0,10–10,0
L-ασκορβικό οξύ	$(2,44 \pm 0,13) \times 10^4$	-3514 ± 180	0,9933	1,0–20,0
θειαμίνη	$(3,04 \pm 0,10) \times 10^4$	-2427 ± 215	0,9998	0,70–10,0

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.5.3.1, η μέθοδος έχει πολύ καλή γραμμικότητα για το σύνολο των υδατοδιαλυτών βιταμινών με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να κυμαίνονται από 0,9933 έως 0,9999.

3.5.3.2 Επαναληψιμότητα, όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου την ίδια ημέρα πραγματοποιήθηκε με ανάλυση έξι δειγμάτων (τρεις αναλύσεις για κάθε δείγμα). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου μεταξύ διαφορετικών ημερών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση δυο δειγμάτων και για τρεις συνεχόμενες ημέρες (τρεις αναλύσεις για κάθε ημέρα). Στον Πίνακα 3.5.3.2 παρουσιάζονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στα πειράματα της ίδιας ημέρας και μεταξύ διαφορετικών ημερών. Οι ενώσεις που δεν περιέχονται στα δείγματα εμβολιάζονται σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στις χαμηλές συγκεντρώσεις των υπόλοιπων βιταμινών.

Πίνακας 3.5.3.2: Επαναληψιμότητα της μεθόδου την ίδια ημέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών.

Ένωση	^a Επαναληψιμότητα (% RSD)		^b Επαναληψιμότητα (% RSD)	
	Ίδια ημέρα	Διαφορετικές ημέρες	Ίδια ημέρα	Διαφορετικές ημέρες
νικοτιναμίδιο	0,38	0,98	0,54	1,4
πυριδοξίνη	1,2	2,2	1,2	2,0
ριβοφλαβίνη	0,58	1,8	1,1	2,1
νικοτινικό οξύ	0,80	1,9	0,90	2,3
L-ασκορβικό οξύ	0,20	1,2	0,55	1,4
θειαμίνη	1,5	2,9	1,6	3,0

α: φαρμακευτικό σκεύασμα

β: εμπορικό βιταμινούχο αναψυκτικό

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.5.3.2, η σχετική τυπική απόκλιση, στο πείραμα της ίδιας ημέρας κυμαίνεται από 0,20 έως 1,6% και στο πείραμα μεταξύ διαφορετικών ημερών από 0,98 έως 3,0% για το σύνολο των ενώσεων και των δειγμάτων που μελετούνται. Σε κάθε περίπτωση, η επαναληψιμότητα της μεθόδου κρίνεται ικανοποιητική.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης υπολογίζονται ως η τιμή της συγκέντρωσης για την οποία το σήμα του ανιχνευτή είναι αντίστοιχα τριπλάσιο και δεκαπλάσιο του θορύβου. Στον Πίνακα 3.5.3.3 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Πίνακας 3.5.3.3: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Ένωση	Όριο ανίχνευσης (mg/L)	Όριο ποσοτικοποίησης (mg/L)
νικοτιναμίδιο	0,008	0,030
πυριδοξίνη	0,020	0,070
ριβοφλαβίνη	0,005	0,016
νικοτινικό οξύ	0,030	0,100
L-ασκορβικό οξύ	0,300	1,000
θειαμίνη	0,200	0,600

3.5.3.3 Ανακτήσεις

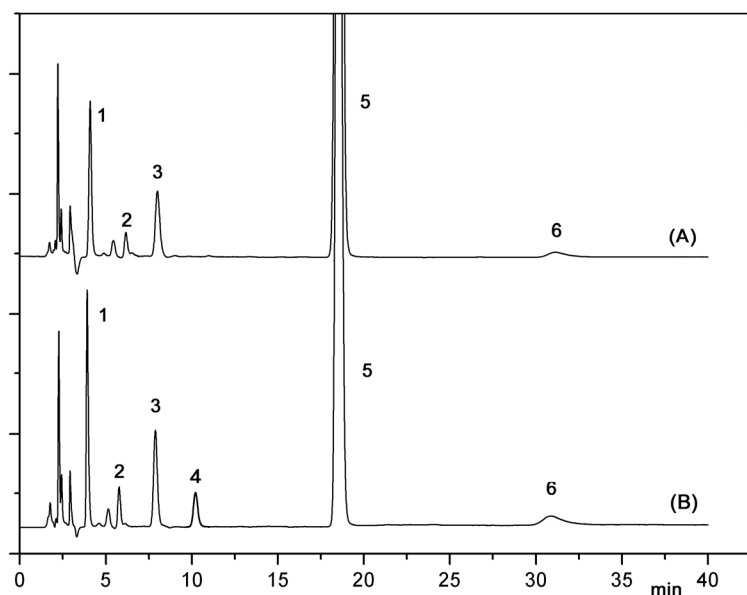
Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε με μετρήσεις δειγμάτων εμβολιασμένων με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε εμβολιασμένο δείγμα αναλύθηκε επί τρεις φορές. Τα αποτελέσματα των ανακτήσεων για κάθε ένωση παρατίθενται στον Πίνακα 3.5.8.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.5.3.4, οι ανακτήσεις των υδατοδιαλυτών βιταμινών που μελετούνται στα δείγματα κυμαίνονται από 97,3% έως 104,5% για το φαρμακευτικό σκεύασμα και από 97,2% έως 100,8% για το βιταμινούχο αναψυκτικό και κρίνονται ιδιαίτερα ικανοποιητικές.

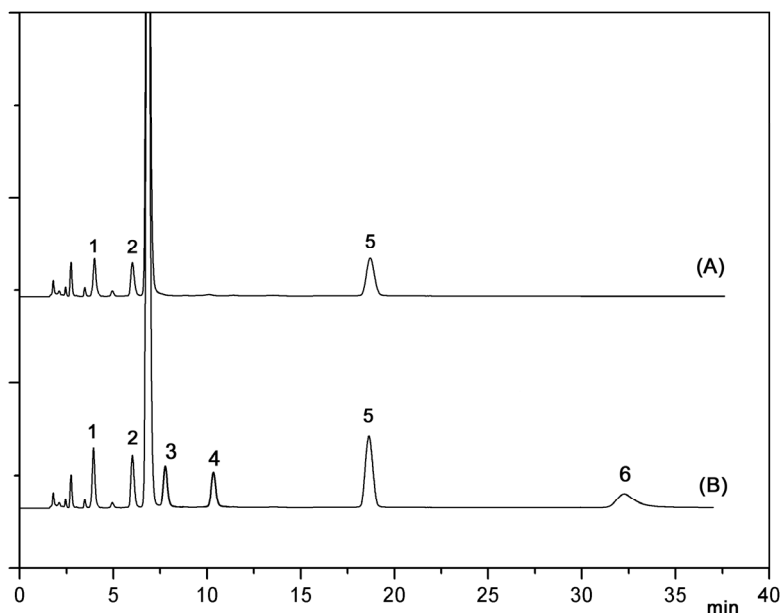
Πίνακας 3.5.3.4: Ανακτήσεις των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Ένωση	Ανάκτηση							
	Φαρμακευτικό σκεύασμα				Βιταμινούχο αναφυκτικό			
	Εμβολιασμός (mg/mL)	Εύρος ανάκτησης (%)	Μέση ανάκτηση ±RSD (%)	Εμβολιασμός (μg/mL)	Εύρος ανάκτησης (%)	Μέση ανάκτηση ±RSD (%)	Εμβολιασμός (μg/mL)	Εύρος ανάκτησης (%)
νικοτιναμίδιο	1,0–3,0	93,7–100,1	97,3±3,2	7,5–22,0	94,6–101,3	97,2±3,6		
πυριδοξίνη	0,1–0,3	96,8–99,9	98,3±1,6	2,8–9,5	97,6–98,2	99,5±2,7		
ριβοφλαβίνη	0,12–0,36	96,7–98,0	97,3±0,7	2,8–9,5	98,4–102,2	100,7±2,0		
νικοτινικό οξύ	0,1–0,3	100,8–109,4	104,5±4,4	2,8–9,5	96,4–104,2	100,2±3,9		
L-ασκορβικό οξύ	5,0–15,0	97,3–103,2	99,2±3,5	70–240	96,1–105,7	99,7±5,2		
θειαμίνη	0,15–0,45	96,8–103,2	100,1±3,2	2,8–9,5	97,8–103,2	100,8±2,7		

Στα παρακάτω Σχήματα δίνονται τυπικά χρωματογράφημα των δειγμάτων.



Σχήμα 3.5.3.1: Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος φαρμακευτικού σκευάσματος (A) χωρίς εμβολιασμό, (B) εμβολιασμένου με τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες: νικοτιναμίδιο 4 mg/L, πυριδοξίνη 2 mg/L, ριβοφλαβίνη 2 mg/L, νικοτινικό οξύ 4 mg/L, L-ασκορβικό οξύ 10 mg/L, θειαμίνη 2 mg/L. Αρίθμηση χρωματογραφικών κορυφών, όπως στο Σχήμα 3.5.2.4.

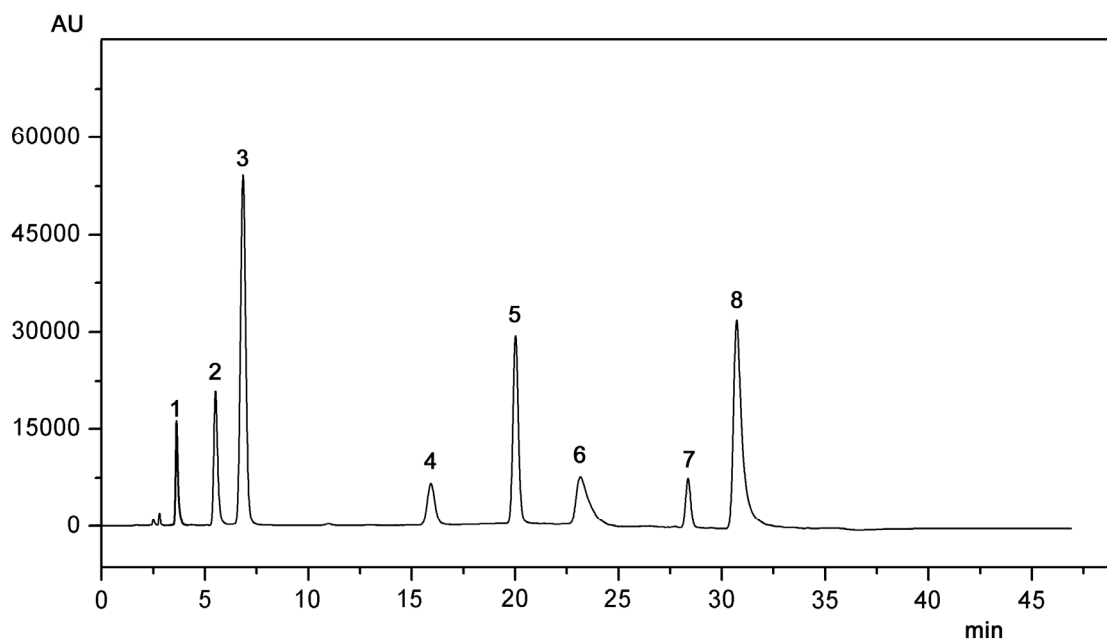


Σχήμα 3.5.3.2: Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος βιταμινούχου αναψυκτικού (A) χωρίς εμβολιασμό, (B) εμβολιασμένου με τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες: νικοτιναμίδιο 2 mg/L, πυριδοξίνη 2 mg/L, ριβοφλαβίνη 2 mg/L, νικοτινικό οξύ 4 mg/L, L-ασκορβικό οξύ 4 mg/L, θειαμίνη 4 mg/L. Αρίθμηση χρωματογραφικών κορυφών, όπως στο Σχήμα 3.5.2.4.

3.5.4 Η ισοκρατική σε σχέση με τη βαθμιδωτή έκλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών στην HILIC

Ο διαχωρισμός υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλυσης θεωρείται ως πιο επαναλήψιμος σε σύγκριση με την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης. Η σταθερή σύσταση του διαλύτη έκλυσης εφασφαλίζει συνθήκες εξισορρόπησης μεταξύ του διαλύτη και της στατικής φάσης. Επιπλέον, η ταχύτητα μεταφοράς των ενώσεων κατά μήκος της στήλης είναι σταθερή, όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλύτη-κινητής φάσης και αναλύτη-στατικής φάσης. Εντούτοις, η διαχωριστική ικανότητα της στατικής φάσης (ο αριθμός των ενώσεων που μπορούν να διαχωριστούν) υπό ισοκρατικές συνθήκες δεν είναι πολύ υψηλή σε σύγκριση με τη βαθμιδωτή έκλυση [Kazakevich & LoBrutto, 2007].

Μέχρι το σημείο αυτό, μελετάται ο διαχωρισμός του μίγματος των έξι υδατοδιαλυτών βιταμινών στη στήλη διόλης-πυριτίας (αλλά και στις άλλες δυο στατικές φάσεις) υπό ισοκρατικές συνθήκες διότι η εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά το μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC είναι εφικτή διατηρώντας σταθερές κάθε είδους αλληλεπιδράσεις. Λόγω της μεγάλης διαφοράς πολικότητας μεταξύ των υδατοδιαλυτών βιταμινών και ταυτόχρονα της ύπαρξης ποικίλων χαρακτηριστικών ομάδων, ένας ισοκρατικός διαχωρισμός που θα συμπεριλαμβάνει περισσότερες από έξι ενώσεις, σε ένα εύλογο συνολικό χρόνο ανάλυσης είναι δύσκολος. Εναλλακτικά, χρησιμοποιώντας τη βαθμιδωτή έκλυση είναι δυνατός ο διαχωρισμός δύο επιπλέον υδατοδιαλυτών βιταμινών και συγκεκριμένα της κυανοκοβαλαμίνης και του φολικού οξέος (Σχήμα 3.5.4.1). Οι δυο αυτές ενώσεις αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα της ταυτόχρονης ύπαρξης όξινων και βασικών ομάδων στη δομή των μορίων. Η έκλυση των δυο αυτών ενώσεων υπό ισοκρατικές συνθήκες είναι εφικτή σε ποσοστό ACN $\leq 80\%$ (v/v), όπου όμως ο διαχωρισμός των υπόλοιπων βιταμινών είναι ατελής. Επιπλέον, σε ποσοστό ACN 90% (v/v) η έκλυση της κυανοκοβαλαμίνης και του φολικού οξέος λαμβάνει χώρα σε χρονικά διαστήματα πέραν της μιας ώρας με τις αντίστοιχες κορυφές να εμφανίζουν μεγάλο εύρος και επομένως πολύ χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης. Η μεγάλη κατακράτηση των ενώσεων αυτών οφείλεται στις πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις (ιοντικές και υδρόφιλες) λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού πολικών ομάδων. Με τη χρήση της βαθμιδωτής έκλυσης επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος διαχωρισμός του μίγματος των οκτώ βιταμινών, με συνολικό χρόνο ανάλυσης ~ 31 min με τη λήψη χρωματογραφικών κορυφών και με ικανοποιητική συμμετρία.



Σχήμα 3.5.4.1: Τυπικό χρωματογράφημα διαχωρισμού μίγματος 8 υδατοδιαλυτών βιταμινών με την εφαρμογή βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης.

Χρωματογραφικές συνθήκες:

Στήλη: διόλη-πυριτία

Διαλύτης A: [H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM, pH 5,0]

Διαλύτης B: [90% ACN / 10% H₂O + CH₃COONH₄ 10 mM]

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης: T=0 min, 100% διαλύτης B; T=10 min, 100% διαλύτης B; T=30 min, 77,8% διαλύτης B και 22,2% διαλύτης A και παραμονή για 5 min

Θερμοκρασία στήλης: 25 °C; Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

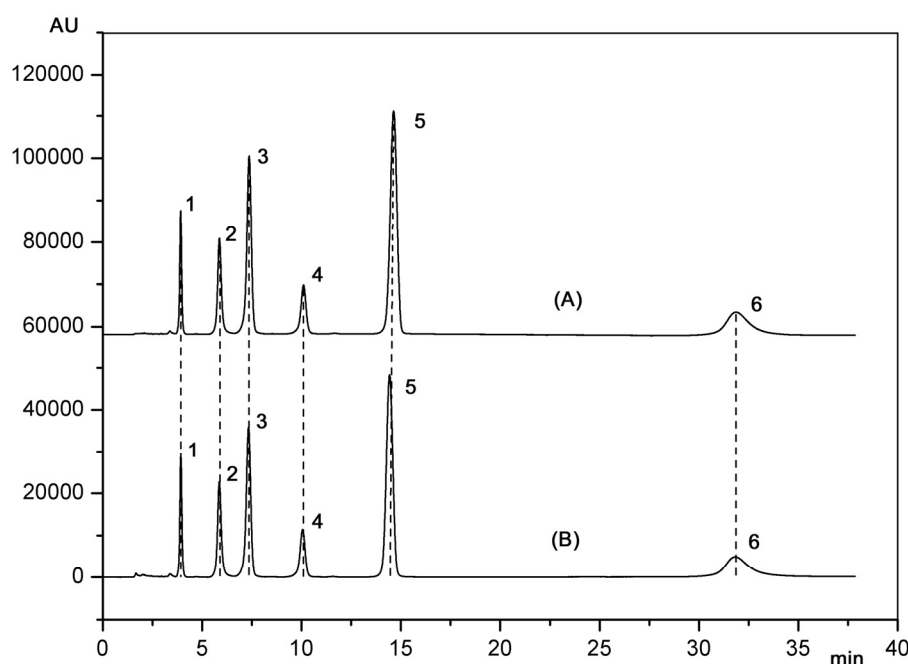
Ανιχνευτής: συστοιχίας διόδων (μήκη κύματος 254 και 272 nm)

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη, (7) κυανοκοβαλαμίνη, (8) φολικό οξύ.

3.5.5 Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της κινητής φάσης

Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της κινητής φάσης, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης, μελετήθηκε κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας. Κινητή φάση όγκου 250 mL αποτελούμενη από ACN/H₂O 90/10 (v/v) παρουσία οξικού αμμωνίου και TEA σε συγκεντρώσεις 10 και 20 mM αντίστοιχα διαβιβάζεται από τη στήλη με ροή 0,6 mL/min, ενώ πραγματοποιούνται συνεχείς εγχύσεις μίγματος των έξι υδατοδιαλυτών βιταμινών. Η έξοδος των απόβλητων μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL, όπου και γίνεται η συλλογή της κινητής φάσης. Μετά από έντεκα συνεχόμενες εγχύσεις συλλέγεται όγκος κινητής φάσης

~240 mL, επανατοποθετείται σε περιέκτη κινητής φάσης και διαβιβάζεται ξανά από τη στήλη. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πέντε συνεχόμενες εγχύσεις από το ίδιο μίγμα ενώσεων. Συγκριτικά χρωματογραφήματα πριν και μετά τη συλλογή της κινητής φάσης παρατίθενται στο Σχήμα 3.5.5.1. Οι χρόνοι κατακράτησης του νικοτιναμίδιου, της πυριδοξίνης και της ριβοφλαβίνης παραμένουν πρακτικά αμετάβλητοι, ενώ μικρές μεταβολές παρατηρούνται στους χρόνους κατακράτησης του νικοτινικού οξέος, του L-ασκορβικού οξέος και της θειαμίνης. Η εκτίμηση των δεδομένων με τη δοκιμασία t (t -test) δείχνει ότι οι μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($P=0,05$). Στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επικύρωση όσον αφορά τη διασφάλιση της ακρίβειας και της ορθότητας των αποτελεσμάτων σε μια ποσοτική ανάλυση. Εντούτοις, η επαναχρησιμοποίηση της κινητής φάσης υπό ισοκρατικές συνθήκες είναι τουλάχιστον εφικτή για μια ποιοτική ανάλυση, ελαττώνοντας έτσι σημαντικά την κατανάλωση σε οργανικό διαλύτη.



Σχήμα 3.5.5.1: Συγκριτικά χρωματογραφήματα μίγματος βιταμινών με: (A) καθαρή κινητή φάση, (B) κινητή φάση μετά από συλλογή και επαναχρησιμοποίηση.

Χρωματογραφικές κορυφές: (1) νικοτιναμίδιο, (2) πυριδοξίνη, (3) ριβοφλαβίνη, (4) νικοτινικό οξύ, (5) L-ασκορβικό οξύ, (6) θειαμίνη.

3.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο μηχανισμός κατακράτησης στη χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) μέσω επιλεγμένων υδατοδιαλυτών βιταμινών και αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού τους με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Η HILIC είναι αναμφίβολα μια τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται κατακράτηση πολικών ενώσεων, ουδέτερων ή φορτισμένων. Από τα αποτελέσματα της διατριβής προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

A. Σχετικά με το μηχανισμό της HILIC

✓ Ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC απαρτίζεται από δυο επιμέρους μηχανισμούς:

Αρχικά μια ένωση κατανέμεται μεταξύ της υδατικής στιβάδας, που βρίσκεται μερικώς ακινητοποιημένη στην επιφάνεια της στατικής φάσης και του υπόλοιπου και περισσότερο υδρόφοβου μέρους της κινητής φάσης. Στη συνέχεια τα μόρια της ένωσης διεισδύουν εντός της υδατικής στιβάδας και αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της στατικής φάσης.

Έτσι, ο μηχανισμός κατακράτησης μιας πολικής ένωσης μπορεί να περιλαμβάνει τόσο την *κατανομή* όσο και την *επιφανειακή προσρόφηση*.

✓ Από τα αποτελέσματα της εφαρμογής των εξισώσεων-μοντέλων κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης στα δεδομένα κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών επιβεβαιώνεται ότι ο μηχανισμός στην HILIC είναι μικτός με τους δυο επιμέρους μηχανισμούς να δρουν συνεργιστικά. Στο συμπέρασμα αυτό συγκλίνουν τόσο τα θερμοδυναμικά δεδομένα, όσο και η καλή συσχέτιση των δεδομένων κατακράτησης στο μοντέλο που συμπεριλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ:

"αναλύτη↔κινητής φάσης↔στατικής φάσης".

✓ Με την ανακατασκευή του μοντέλου κατανομής στις τρεις στατικές φάσεις προκύπτουν τα εξής:

(1) Η μετάβαση από το μηχανισμό κατανομής στο μηχανισμό επιφανειακής προσρόφησης στις ουδέτερες ενώσεις λαμβάνει χώρα σε ποσοστό $ACN \geq 80\%$ για τη στήλη διόλης-πυριτίας και σε ποσοστό $ACN \geq 75\%$ για τις στήλες μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο-πυριτίας.

(2) Η μετάβαση από το μηχανισμό κατανομής στο μηχανισμό επιφανειακής προσρόφησης σε ενώσεις που φέρουν ομώνυμο φορτίο με τη στήλη λαμβάνει χώρα σε ποσοστά $ACN \geq 85\%$, όπου μειώνεται αισθητά η ηλεκτροστατική άπωση λόγω της προτιμώμενης κατανομής των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα.

(3) Στις ενώσεις που έλκονται ηλεκτροστατικά από την επιφάνεια της στατικής φάσης κυριαρχεί ο μηχανισμός της επιφανειακής προσρόφησης μέσω ιονανταλλαγής.

✓ Από τη μελέτη της κατακράτησης απλών δομικά ενώσεων (βενζαμίδιο, φαινόλη, βενζυλική αλκοόλη, βενζαλδεΐδη, ανιλίνη, πυριδίνη, πυριμιδίνη) προκύπτει ότι η σειρά έκλουσης για ενώσεις με ίση ή παρόμοια τιμή του συντελεστή $\log P$ καθορίζεται από την ικανότητά τους να δρουν ως δότες ή/και δέκτες δεσμών υδρογόνου (α_2^H και β_2^H). Κατά συνέπεια, η κατακράτηση ουδέτερων ενώσεων δεν καθορίζεται αποκλειστικά από το βαθμό κατανομής, αλλά είναι ένας συνδυασμός μεταξύ της κατανομής και της ικανότητας των ενώσεων να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη στατική φάση.

✓ Η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε H_2O αποτελεί την πιο σημαντική παράμετρο στην HILIC λαμβάνοντας υπόψη τα παρακάτω φαινόμενα:

(1) Η στιβάδα ύδατος που δημιουργείται στη στατική φάση φέρει συγκεκριμένο όγκο και εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε H_2O και την παρουσία διαφορετικών χαρακτηριστικών ομάδων πρόσδεσης στην επιφάνεια της στατικής φάσης (βαθμός ενυδάτωσης). Η παράμετρος αυτή καθορίζει και το σημείο μετάβασης από το μηχανισμό κατανομής σε αυτόν της επιφανειακής προσρόφησης.

(2) Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα σε ACN τόσο περισσότερο αυξάνει η διαφορά στην πολικότητα μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης. Το γεγονός αυτό καθορίζει το βαθμό κατανομής της ένωσης ή αλλιώς το χρόνο παραμονής στην υδατική στιβάδα.

✓ Η μεταβολή του pH της κινητής φάσης δεν επιφέρει καμία επίδραση στο χρόνο κατακράτησης των ουδέτερων βιταμινών. Αντίθετα, επηρεάζει σημαντικά την πολικότητα των ιονιζόμενων βιταμινών (L-ασκορβικό οξύ, νικοτινικό οξύ, θειαμίνη) και καθορίζει την εμφάνιση και την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενώσεων αυτών και της επιφάνειας της στατικής φάσης.

- ✓ Από τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών οργανικών διαλυτών (ACN, MeOH, IPA, THF) στο χρόνο κατακράτησης των υδατοδιαλυτών βιταμινών προκύπτει ότι οι δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν σημαντικά στο μηχανισμό κατακράτησης στην HILIC.
- ✓ Η εκλουστική ισχύς των οργανικών διαλυτών στην HILIC ακολουθεί της εξής σειρά: $ACN < THF < IPA < MeOH$. Διαλύτες που έχουν την ικανότητα να δρουν ως ισχυροί δότες-δέκτες δεσμών υδρογόνου (MeOH, IPA, THF) σε σύγκριση με το ACN προκαλούν σημαντική ελάττωση της κατακράτησης τόσο στις ουδέτερες όσο και στις φορτισμένες ενώσεις. Η ελάττωση αυτή είναι μικρότερη σε ενώσεις των οποίων ο μηχανισμός κατακράτησης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από ηλεκτροστατικές δυνάμεις ελκτικής φύσης.
- ✓ Από τη χρωματογραφική συμπεριφορά του τολουολίου προκύπτει ότι η διατάραξη της σύστασης της υδατικής στιβάδας, μέσω αντικατάστασης μορίων ύδατος από μόρια οργανικού διαλύτη, είναι μεγαλύτερη παρουσία MeOH. Το φαινόμενο αυτό επιφέρει μείωση της πολικότητας της υδατικής στιβάδας και συντελεί στη δραστική ελάττωση της κατακράτησης των βιταμινών. Ο βαθμός διατάραξης της υδατικής στιβάδας εξαρτάται επίσης από τη φύση της επιφάνειας της στήλης. Οι στατικές φάσεις μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο-πυριτίας σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου με μόρια ύδατος σε σύγκριση με τη διόλη-πυριτία με αποτέλεσμα η σχηματιζόμενη υδατική στιβάδα να καθίσταται λιγότερο υδρόφοβη παρουσία πολικών και πρωτικών διαλυτών (MeOH, IPA). Αυτό με τη σειρά του αναδεικνύει τη σημασία της επιδιалύτωσης των πολικών ενώσεων στην κατακράτησή τους.
- ✓ Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση αυξάνει τον υδρόφιλο χαρακτήρα της υδατικής στιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση της κατακράτησης των ουδέτερων βιταμινών. Η αύξηση της υδροφιλικότητας οφείλεται στην προτιμώμενη κατανομή των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα και σύμφωνα με τη χρωματογραφική συμπεριφορά του τολουολίου το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα σε ποσοστό $ACN \geq 70\%$.
- ✓ Η μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, αλλά και η παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων στην κινητή φάση επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του μηχανισμού ιονανταλλαγής. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ιόντων του άλατος και των ιονιζόμενων ενώσεων ως προς τις φορτισμένες θέσεις της επιφάνειας της στατικής φάσης επηρεάζει την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ελκτικής ή απωστικής φύσης.

B. Σχετικά με την επίτευξη διαχωρισμού σε συνθήκες HILIC

Τα συμπεράσματα που προηγήθηκαν αποτελούν οδηγό για την επιλογή των κύριων χρωματογραφικών παραμέτρων και τελικά την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Με βάση την επίδραση των παραμέτρων της HILIC στο διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

✓ Η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε ACN κατέχει το σημαντικότερο ρόλο στο διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Ο παράγοντας κατακράτησης (k') των βιταμινών και κατ' επέκταση η διαχωριστική ικανότητα (R_s) της στήλης διόλης-πυριτίας αυξάνονται σημαντικά σε ποσοστό ACN $\geq 70\%$, όπου υπάρχει σημαντική διαφορά στην πολικότητα μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης.

✓ Το pH της κινητής φάσης δεν επηρεάζει την κατακράτηση των ουδέτερων βιταμινών. Αντίθετα, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την επίτευξη διαχωρισμού στις βιταμίνες που φέρουν φορτίο διότι μεταβάλλει δραστικά την πολικότητά τους και καθορίζει την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

✓ Η συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση επηρεάζει τον παράγοντα κατακράτησης τόσο των ουδέτερων όσο και των φορτισμένων βιταμινών ως εξής:

(α) ουδέτερες βιταμίνες: αύξηση της υδροφιλικότητας της υδατικής στιβάδας

(β) βιταμίνες που φέρουν φορτίο: έλεγχος της ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

✓ Το ACN κρίνεται ως ο καταλληλότερος οργανικός διαλύτης για την επίτευξη του διαχωρισμού των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Η χρησιμοποίηση διαλυτών με ισχυρή ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου (MeOH, IPA, THF) είναι αρνητικός παράγοντας λόγω της αποδεδειγμένης συνεισφοράς των αλληλεπιδράσεων αυτών στο μηχανισμό κατακράτησης.

✓ Το χαμηλό ιξώδες της κινητής φάσης επιτρέπει την εφαρμογή υψηλών τιμών ροής της κινητής φάσης διατηρώντας την πίεση του συστήματος HPLC σε χαμηλά επίπεδα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων van Deemter και των τιμών διαχωριστικής ικανότητας της στήλης διόλης-πυριτίας για το μίγμα των έξι βιταμινών, προκύπτει ότι είναι δυνατή η εφαρμογή ροής μέχρι και 2,0 mL/min, ελαττώνοντας σημαντικά το συνολικό χρόνο ανάλυσης στα 12,6 min.

✓ Η σύσταση του διαλύτη έγχυσης είναι μια εξίσου κρίσιμη παράμετρος διότι επηρεάζει τόσο την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου, όσο και τη διαλυτότητα των συστατικών ενός δείγματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκύπτει ότι με αρχικές συνθήκες έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v) η σύσταση του διαλύτη έγχυσης μπορεί να διαφέρει έως και 10% προς όφελος του ισχυρού διαλύτη έκλουσης.

✓ Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για το χρωματογραφικό διαχωρισμό ήταν οι 25 °C, διότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες λαμβάνει χώρα μείωση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης. Η μείωση της κατακράτησης είναι περισσότερο αισθητή στις βιταμίνες με φορτίο ομώνυμο με αυτό της στατικής φάσης και σε μικρότερο βαθμό στις ουδέτερες. Η κατακράτηση των βιταμινών που έλκονται ηλεκτροστατικά δεν επηρεάζεται σημαντικά από την αύξηση της θερμοκρασίας.

Γ. Σχετικά με τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

✓ Η στήλη διόλης-πυριτίας επιδεικνύει ικανοποιητικό διαχωρισμό των επιλεγμένων υδατοδιαλυτών βιταμινών, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε ACN διασφαλίζει την ταχεία έκλουση μη πολικών συστατικών σε ένα δείγμα.

✓ Η επίτευξη ενός ικανοποιητικού διαχωρισμού στην HILIC περιλαμβάνει ένα συμβιβασμό μεταξύ της χρωματογραφικής απόδοσης της στήλης (k' , T_f , R_s , N) και του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών επιλέχθηκε κινητή φάση αποτελούμενη από: CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM, pH 5,0, και σε αναλογία ACN/H₂O 90/10 (v/v). Επιπλέον, η θερμοκρασία της στήλης ήταν 25 °C, και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ίση προς 0,8 mL/min.

✓ Η καταλληλότητα των χρωματογραφικών συνθηκών επικυρώθηκε με βάση τη δοκιμή καταλληλότητας συστήματος (SST) με τα εξής αποτελέσματα:

Αριθμός θεωρητικών πλακών: $N > 2000$

Συμμετρία χρωματογραφικών κορυφών: $1,0 < T_f < 1,6$

Παράγοντας κατακράτησης: $k' > 1,0$

Επαναληψιμότητα χρόνου κατακράτησης: $0,14 < \%RSD < 0,26$

Επαναληψιμότητα εμβαδού κορυφής: $0,17 < \%RSD < 0,90$

Διαχωριστική ικανότητα: $R_s > 2,7$

✓ Η επαναληψιμότητα της μεθόδου την ίδια ημέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών ήταν ικανοποιητική και κυμάνθηκε στο εύρος τιμών:

Ίδια ημέρα: $0,20 < \%RSD < 1,6$ και

Διαφορετικές ημέρες: $0,98 < \%RSD < 3,0$

✓ Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κρίθηκαν πολύ ικανοποιητικά για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών και κυμάνθηκαν στο εύρος τιμών:

Όρια ανίχνευσης: 0,008–0,300 mg/L

Όρια ποσοτικοποίησης: 0,03–1,00 mg/L

✓ Οι ανακτήσεις στα δείγματα ήταν πολύ ικανοποιητικές και κυμάνθηκαν από 97,3 έως 104,5% για το φαρμακευτικό σκεύασμα και από 97,2 έως 100,8% για το βιταμινούχο αναψυκτικό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham M.H., 100 years of chromatography—or is it 171? *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1061, 113–114.

Abraham M.H., Hydrogen Bonding. 31. Construction of a scale of solute effective or summation hydrogen bonding basicity. *J. Phys. Org. Chem.*, **1993**, 6, 660–684.

Abraham M.H., Rosés M., Hydrogen Bonding. 38. Effect of solute structure and mobile phase composition on reversed–phase high performance liquid chromatographic capacity factors. *J. Phys. Org. Chem.*, **1994**, 7, 672–684.

Alpert A.J., Hydrophilic–interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.*, **1990**, 499, 177–196.

Alpert A.J., Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (1), 62–76.

Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R., Yuen S.W., Ferguson M.A.J., Mehlert A., Pauly M., Orlando R., Hydrophilic interaction chromatography of complex carbohydrates. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 676, 191–202.

Ali M.S., Ghorri M., Rafiuddin S., Khatri A.R., A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough–cold formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43, 158–167.

Angyal S.J., The Composition and Conformation of Sugars in Solution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1969**, 8, 157–166.

Appelblad P., Abrahamsson P., MS Detection of Homocysteine, Methylmalonic Acid, and Succinic Acid using HILIC Liquid Chromatographic Separation on a Covalently Bonded Zwitterionic Stationary Phase. *LC GC North America* **2005**, September: Suppl. S, 24–25.

Appelblad P., Jonsson T., Jiang W., Irgum K., Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase. *J Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1529–1536.

Armstrong D., Jin H., Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *J. Chromatogr.*, **1989**, 462, 219–232.

Aronson N.N., Halloran B.A., Alexyev M.F., Amable L., Madura J.D., Pasupulati L., Worth C., Van Roey P., Family 18 chitinase–oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochem. J.*, **2003**, 376, 87–95.

Avery M.J., Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17, 197–201.

Bartalis J., Halaweish F.T., Relationship between cucurbitacins reversed–phase high–performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 818, 159–166.

Bates C.J., Vitamins and Their Properties. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. Worsfold P., Townshend A., Poole C. (Eds), Academic Press, Elsevier Ltd., UK, **2005**, pp. 172–180.

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (Eds), *Food Chemistry*. Springer, Germany, 4th ed., **2009**, pp. 411–420.

Bengtsson J., Jansson B., Hammarlund-Udenaes M., On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 2116–2122.

Berthod A., Chang S.S.C., Kullman J.P.S., Armstrong D.W., Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase. *Talanta*, **1998**, 47, 1001–1012.

Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque C. (Eds), *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker Inc., New York, **2000**.

Beumer J.H., Joseph E., Egorin M.J., Covey J.M., Eiseman J.L., Quantitative determination of zebularine (NSC 309132), a DNA methyltransferase inhibitor, and three metabolites in murine plasma by high-performance liquid chromatography coupled with on-line radioactivity detection. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 831, 147–155.

Beutler J.A., Separation of High Molecular Weight Saponins of *Archidendron Ellipticum* by Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **1997**, 20, 2415–2426.

Bidlingmeyer B.A., Del Rios J.K., Korpi J., Separation of organic amine compounds on silica gel with reversed-phase eluents. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 442–447.

Bidlingmeyer B.A., Deming S.N., Jr. Price W.P., Sachok B., Petrusek M., High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids. *J. Chromatogr.*, **1979**, 186, 419–434.

Bidlingmeyer B.A., Henderson J., Investigation of retention on bare silica using reversed-phase mobile phases at elevated temperatures. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1060, 187–193.

Bij K.E., Horváth C., Melander W.R., Nahum, A., Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, 65–84.

Björklund M., Hearn M.T.W., Synthesis of silica-based heparin-affinity adsorbents. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 728, 149–169.

Blackwell J.A., Carr P.W., Development of an eluotropic series for the chromatography of Lewis bases on zirconium oxide. *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 863–873.

Boersema P.J., Mohammed S., Heck A.J.R., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 151–159.

Boutin J.A., Ernould A.P., Ferry G., Genton A., Alpert A.J., Use of hydrophilic interaction chromatography for the study of tyrosine protein kinase specificity. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1992**, 583, 137–143.

Brando C., Hoffman T., Bonvini E., High-performance liquid chromatographic separation of inositol phosphate isomers employing a reversed-phase column and a micellar mobile phase. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1990**, 529, 65–80.

Brons C., Olieman C., Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk. *J. Chromatogr.*, **1983**, 259, 79–86.

Brown S.D., White C.A., Bartlett M.G., Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **2002**, 16, 1871–1876.

Castells R.C., Castells C.B., Castillo M.A., Influence of differences between sample and mobile phase viscosities on the shape of chromatographic elution profiles. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 775, 73–79.

Cataldi T.R.I., Campa C., De Benedetto G.E., Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 368, 739–758.

Cavazzini A., Bardin G., Kaczmariski K., Szabelski P., Szabelski P., Al-Bokari M., Guiochon G., Adsorption equilibria of butyl- and amylbenzene on monolithic silica-based columns. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 957, 111–126.

Chambers T.K., Fritz J.S., Effect of polystyrene-divinylbenzene resin sulfonation on solute retention in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 797, 139–147.

Charlwood J., Birrell H., Bouvier E.S.P., Langridge J., Camilleri P., Analysis of Oligosaccharides by Microbore High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1469–1474.

Charlwood J., Birrell H., Tolson D., Connelly J., Camilleri P., Early Indication of Effects of Puromycin Aminonucleoside Using a Fluorimetric Assay of 2-Aminoacridone-Derivatized Carbohydrates in Urine. *Anal. Biochem.*, **2000**, 283, 250–257.

^a**Charlwood** J., Skehel J.M., Camilleri P., Immobilisation of antibodies in gels allows the improved release and identification of glycans. *Proteomics*, **2001**, 1, 275–284.

Chen M.H., Horváth C., Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 788, 51–61.

Chester T.L., Coym J.W., Effect of phase ratio on Van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1003, 101–111.

Christopherson M.J., Yoder K.J., Hill J.T., Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic (HILIC)/Ion Exchange Separation of Picolinic and Nicotinic Acids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2006**, 29, 2545–2558.

Chung W.C., Tso S.C., Sze S.T., Separation of Polar Mushroom Toxins by Mixed-Mode Hydrophilic and Ionic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **2007**, 45, 104–113.

Churms S.C., Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. *J. Chromatogr.*, **1990**, 500, 555–583.

Churms S.C., Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 75–91.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., et al., Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 2030–2038.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Santelia F., Tsoukatou M., Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon*, **2006**, 47, 174–181.

Dai J., Carr P.W., Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1072, 169–184.

Dai J., Mendonsa S.D., Bowser M.T., Lucy C.A., Carr P.W., Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1069, 225–234.

Dallet P., Labat L., Kummer E., Dubost J.P., Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 742, 447–452.

Daunoravičius Ž., Juknaite I., Naujalis E., Padarauskas A., Simple and rapid determination of denaturants in alcohol formulations by hydrophilic interaction chromatography. *Chromatographia*, **2006**, 63, 373–377.

Davidek T., Kraehenbuehl K., Devaud S., Robert F., Blank I., Analysis of Amadori Compounds by High-Performance Cation Exchange Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 140–147.

Debetto P., Cargnelli G., Antolini M., Bova S., Trevisi L., Varotto R., Luciani S., α_1 -adrenoceptor-mediated formation of glycerophosphoinositol 4-phosphate in rat heart: possible role in the positive inotropic response. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 58, 1437–1446.

Delinsky A.D., Delinsky D.C., Muralidhara S., Fisher J.W., Bruckner J.V., Bartlett M.G., Analysis of dichloroacetic acid in rat blood and tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 1075–1083.

Dell'Aversano C., Eaglesham G.K., Quilliam M.A., Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 155–164.

Dell'Aversano C., Hess P., Quilliam M.A., Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1081, 190–201.

de Person M., Hazotte A., Elfakir C., Lafosse M., Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1081, 174–181.

Dixon A.M., Delinsky D.C., Bruckner J.V., Fisher J.W., Bartlett M.G., Analysis of Dichloroacetic Acid in Drinking Water by Ion Exchange HILIC–LC/MS/MS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2004**, 27, 2343–2355.

Dolan J.W., Snyder L.R. (Eds), *Troubleshooting LC Systems: A Comprehensive Approach to Troubleshooting LC Equipment and Separations*. Humana Press, Totowa, New Jersey, **1989**, pp. 401–411.

Dolan J.W., Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965, 195–205.

Dong L., Huang J., Effect of Temperature on the Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High Purity Silica Using Reversed–Phase Solvents. *Chromatographia*, **2007**, 65, 519–526.

Dunn W.B., Bailey N.J.C., Johnson H.E., Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, **2005**, 130, 606–625.

Eerkes A., Shou W. Z., Naidong W., Liquid/liquid extraction using 96–well plate format in conjunction with hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of fluconazole in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 917–928.

Engelhardt H., One century of liquid chromatography: From Tswett’s columns to modern high speed and high performance separations. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 800, 3–6.

Ettre L.S., M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. *LC GC*, **2003**, 31, 458–467.

Fausnaugh-Pollitt J., Thevenon G., Janis L., Regnier F.E., Chromatographic resolution of lysozyme variants. *J. Chromatogr.*, **1988**, 443, 221–228.

Fields M.S., Silica Xerogel as a Continuous Column Support for High–Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2709–2710.

Fornstedt T., Zhong G., Guiochon G., Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 741, 1–12.

Friedman M., Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054, 143–155.

Feurle J., Jomaa H., Wilhelm M., Gutsche B., Herderich M., Analysis of phosphorylated carbohydrates by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry utilising a β -cyclodextrin bonded stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 803, 111–119.

Fuguet R., Theraud M., Vey A., Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase–like protein secreted by a melanizing isolate. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **2004**, 138, 149–161.

Gagliardi L.G., Castells C.B., Ráfols C., Rosés M., Bosch E., δ Conversion Parameter between pH Scales ($^s_w pH$ and $^s_s pH$) in Acetonitrile/Water Mixtures at Various Compositions and Temperatures. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3180–3187.

Garbis S.D., Melse-Boonstra A., West C.E., van Breemen R.B., Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5358–5364.

Garcia M.C., The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high–performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 111–123.

Gilar M., Olivova P., Daly A.E., Gebler J.C., Orthogonality of Separation in Two–Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 6426–6434.

Giroud C., Michaud K., Sporkert F., Eap C., Augsburger M., Cardinal P., Mangin P., A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluids and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry (HILIC–MS). *J. Anal. Toxicol.*, **2004**, 28, 464–474.

Gokel G.W. (Ed.), *Dean's handbook of organic chemistry*, 2nd edition, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, USA, **2004**.

Golubitskii G.B., Budko E.V., Basova E.M., Kostarnoi A.V., Ivanov V.M., Stability of Ascorbic Acid in Aqueous and Aqueous–Organic Solutions for Quantitative Determination. *J. Anal. Chem.*, **2007**, 62, 742–747.

Gregor H.P., Collins F.C., Pope M., Studies on ion–exchange resins. III. Diffusion of neutral molecules in a sulfonic acid cation–exchange resin. *J. Colloid Sci.*, **1951**, 6, 304–322.

Griffith H.W. (Ed.), *Vitamins, Minerals, and Supplements: The Complete Guide*. Fisher Books, **1988**.

Grumbach E.S., Wagrowski-Diehl D.M., Mazzeo J.R., Alden B., Iraneta P.C., Hydrophilic Interaction Chromatography Using Silica Columns for the Retention of Polar Analytes and Enhanced ESI–MS Sensitivity. *LC GC*, **2004**, Vol. 22 Num. 10, 1010–1023.

Guile G.R., Rudd P.M., Wing D.R., Prime S.B., Dwek R.A., A Rapid High–Resolution High–Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles. *Anal. Biochem.*, **1996**, 240, 210–226.

Guillarme D., Heinisch S., Detection modes with high temperature liquid chromatography–review. *Sep. Purif. Rev.*, **2005**, 34, 181–216.

Guisbert A.L., Sharp V.S., Peterson J.A., Risley D.S., Enantiomeric Separation of an Ampa Antagonist Using a Chirobiotic tTM Column with HPLC and Evaporative Light–Scattering Detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2000**, 23, 1019–1028.

Guo Y., Huang A., A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 1191–1201.

Guo Y., Analysis of Quaternary Amine Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography/Mass Spectrometry (HILIC/MS). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, 28, 497–512.

Guo Y., Gaiki S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074, 71–80.

Guo Z., Jin Y., Liang T., Liu Y., Xu Q., Liang X., Lei A., Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click β -cyclodextrin” stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 257–263.

Guo Y., Srinivasan S., Gaiki S., Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment. *Chromatographia*, **2007**, 66, 223–229.

Gustavsson S.Å., Samskog J., Markides K., Långström B., Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 937, 41–47.

Han S.M., Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. *Biomed. Chromatogr.*, **1997**, 11, 259–271.

Hanai T., Separation of polar compounds using carbon columns. *J. Chromatogr., A*, **2003**, 989, 183–196.

Hansch C., Leo A. (Eds), *Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. American Chemical Society, Washington D.C., **1995**.

Hao Z., Lu C.Y., Xiao B., Weng N., Parker B., Knapp M., Ho C.T., Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1147, 165–171.

Hao Z., Xiao B., Weng N., Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1449–1464.

Havlicek J., Samuelson O., Separation of oligosaccharides chromatography on ion by partition. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1854–1857.

Hazotte A., Libong D., Chaminade P., High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1140, 131–139.

Hearn M.T.W., High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins: XXXVI. Organic solvent modifier effects in the separation of unprotected peptides by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **1981**, 218, 497–507.

Helburn R.S., Rutan S.C., Pompano J., Mltchem D., Patterso W.T., Solvatochromic Studies of Solvated Chromatographic Stationary Phases. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 610–618.

Hemström P., Irgum K., Hydrophilic interaction chromatography (review). *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1784–1821.

Herbreteau B., Review and state of sugar analysis by high performance liquid chromatography. *Analisis*, **1992**, 20, 355–374.

Herbreteau B., Lafosse M., Morinallory L., Dreux M., High performance liquid chromatography of raw sugars and polyols using bonded silica gels. *Chromatographia*, **1992**, 33, 325–330.

Higashi H., Ito M., Fukaya N., Yamagata S., Yamagata T., Two-dimensional mapping by the high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released from glycosphingolipids by endoglycoceramidase. *Anal. Biochem.*, **1990**, 186, 355–362.

Hjertén S., Liao J.L., Zhang R., High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *J. Chromatogr.*, **1989**, 473, 273–275.

Hodges R.S., Chen Y., Kopecky E., Mant C.T., Monitoring the hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side-chains in the non-polar and polar faces of amphipathic α -helices by reversed-phase and hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1053, 161–172.

Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N., Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1164, 198–205.

Hsieh Y.S., Chen J.W., Simultaneous determination of nicotinic acid and its metabolites using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 3031–3036.

Huang J.X., Li R.P., Isolation and Purification of Epirubicin from Raw Product by Preparative Chromatography on a Silica Column with Aqueous-Rich Mobile Phase. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, 28, 2737–2751.

ICH (HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE) Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1). November, **2005**.

^a**Idborg** H., Zamani L., Edlund P.O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S.P., Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 828, 9–13.

^b**Idborg** H., Zamani L., Edlund P.O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S.P., Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 2. Data pretreatment methods for handling of complex data. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 828, 14–20.

Ikegami T., Fujita H., Horie K., Hosoya K., Tanaka N., HILIC mode separation of polar compounds by monolithic silica capillary columns coated with polyacrylamide. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386, 578–585.

Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., Tanaka N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184, 474–503.

Iwasaki Y., Inoue K., Ito R., Yoshimura Y., Saito K., Nakazawa H., Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Allantoin in Human Biological Samples. *Bunseki Kagaku*, **2005**, 54, 135–142.

Jandera P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1421–1437.

Jandera P., Churáček J., Gradient elution in liquid chromatography: I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution—theoretical considerations. *J. Chromatogr.*, **1974**, 91, 207–221.

Jeno P., Scherer P.E., Manningkrieg U., Horst M., Desalting Electroeluted Proteins with Hydrophilic Interaction Chromatography. *Anal. Biochem.*, **1993**, 215, 292–298.

Jiang W., Irgum K., Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 333–344.

Jiang W., Irgum K., Synthesis and Evaluation of Polymer–Based Zwitterionic Stationary Phases for Separation of Ionic Species. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1993–2003.

Jiang W., Irgum K., Tentacle–Type Zwitterionic Stationary Phase Prepared by Surface–Initiated Graft Polymerization of 3–[N,N–Dimethyl–N–(Methacryloyloxyethyl)–ammonium] Propanesulfonate through Peroxide Groups Tethered on Porous Silica. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 4682–4687.

Jin G., Guo Z., Zhang F., Xue X., Jin Y., Liang X., Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, **2008**, 76, 522–527.

Jones A., LoBrutto R., Kazakevich Y., Effect of the counter-anion type and concentration on the liquid chromatography retention of β -blockers. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 964, 179–187.

Jungbauer A., Machold C., Hahn R., Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1079, 221–228.

Kamlet M.J., Abboud José-Luis M., Abraham M.H., Taft R.W., Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, π^* , α , and β , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2877–2887.

Kane R.S., Deschatelets P., Whitesides G.M., Kosmotropes Form the Basis of Protein-Resistant Surfaces. *Langmuir*, **2003**, 19, 2388–2391.

Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D., HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32, 909–917.

Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D., Study of the Behavior of Water-Soluble Vitamins in HILIC on a Diol Column. *Chromatographia*, Accepted: 19 February 2010.

Karlsson G., Winge S., Sandberg H., Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092, 246–249.

Kayillo S., Dennis G.R., Wormell P., Shalliker R.A., Retention behaviour of polystyrene oligomers in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 967, 173–181.

Kazakevich Y., LoBrutto R. (Eds), *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, **2007**, pp. 171–191, 206–217, 381, 804–806.

Kimoto E., Tanaka H, Ohmoto T, Choami M., Analysis of the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1993**, 214, 38–44.

Kimura T., Nakagawa K., Saito Y., Yamagishi K., Suzuki M., Yamaki K., Shinmoto H., Miyazawa T., Determination of 1-Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1415–1418.

Kitano H., Imai M., Sudo K., Ide M., Hydrogen-Bonded Network Structure of Water in Aqueous Solution of Sulfobetaine Polymers. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 11391–11396.

Kitano H., Imai M., Gemmei-Ide M., Takaha K., Raman spectroscopic study on the structure of water in aqueous solution of zwitterionic surfactants. *J. Colloid Interfac. Sci.*, **2004**, 269, 459–465.

Kitano H., Mori T., Takeuchi Y., Tada S., Gemmei-Ide M., Yokoyama Y., Tanaka M., Structure of Water Incorporated in Sulfobetaine Polymer Films as Studied by ATR-FTIR. *Macromol. Biosci.*, **2005**, 5, 314–321.

Koh H.L., Lau A.J., Chan E.C.Y., Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of underivatized dencichine (β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid) in *Panax* medicinal plant species. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 1237–1244.

Kovalova L., McArdeall C.S., Hollender J., Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 1100–1108.

Kratky C., Kräutler B., X-ray Crystallography of B₁₂. In: *Chemistry and biochemistry of B₁₂*. Banerjee R. (Ed), John Wiley & Sons, Inc., New York, **1999**, pp 9–41.

Kubo T., Hosoya K., Watabe Y., Tanaka N., Takagi H., Sano T., Kaya K., Interval immobilization technique for recognition toward a highly hydrophilic cyanobacterium toxin. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 806, 229–235.

Kuraya N., Hase S., Analysis of Pyridylaminated O-Linked Sugar Chains by Two-Dimensional Sugar Mapping. *Anal. Biochem.*, **1996**, 233, 205–211.

Ladmiral V., Melia E., Haddleton D.M., Synthetic glycopolymers: an overview. *Eur. Polym. J.*, **2004**, 40, 431–449.

Lafaye A., Junot C., Pereira Y., Lagniel G., Tabet J.-C., Ezan E., Labarre J., Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 24723–24730.

Lafosse M., Herbreteau B., Dreux M., Morinallorym L., Control of some high-performance liquid chromatographic systems by using an evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr.*, **1989**, 472, 209–218.

Lämmerhofer M., HILIC and mixed-mode chromatography: The rising stars in separation science. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 679–680.

Lampert B., Stewart J., Determination of cocaine and selected metabolites in canine and human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography on coupled cyanopropyl and silica columns. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1989**, 495, 153–165.

Layne J., Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 957, 149–164.

Lee R.T., Lauc G., Lee Y.C., Glycoproteomics: protein modifications for versatile functions. *EMBO Reports*, **2005**, 6, 1018–1022.

Le Rouzo G., Lamouroux C., Bresson C., Guichard A., Moisy P., Moutiers G., Hydrophilic interaction liquid chromatography for separation and quantification of selected room-temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1164, 139–144.

^aLi J., Carr P.W., Effect of Temperature on the Thermodynamic Properties, Kinetic Performance, and Stability of Polybutadiene-Coated Zirconia. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 837–843.

^bLi J., Carr P.W., A Study of the Efficiency of Polybutadiene-Coated Zirconia as a Reversed-Phase Chromatographic Support. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2193–2201.

^cLi J., Carr P.W., Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene-Coated Zirconia. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2202–2206.

Li J., Hu Y., Carr P.W., Fast Separations at Elevated Temperatures on Polybutadiene-Coated Zirconia Reversed-Phase Material. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3884–3888.

Li R., Huang J., Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1041, 163–169.

Li A.C., Junga H., Shou W.Z., Bryant M.S., Jiang X., Naidong W., Direct injection of solid-phase extraction eluents onto silica columns for the analysis of polar compounds isoniazid and cetirizine in plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18, 2343–2350.

Li W.K., Li Y.H., Francisco D.T., Naidong W., Hydrophilic interaction liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of atenolol in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, **2005**, 19, 385–393.

Lin X., Wang J., Li L., Wang X., Lü H., Xie Z., Separation and determination of five major opium alkaloids with mixed mode of hydrophilic/cation-exchange monolith by pressurized capillary electrochromatography. *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, 3011–3017.

Linden J.C., Lawhead C.L., Liquid chromatography of saccharides. *J. Chromatogr.*, **1975**, 105, 125–133.

Lindner H., Sarg B., Meraner C., Helliger W., Separation of acetylated core histones by hydrophilic–interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 743, 137–144.

Lindner H., Sarg B., Helliger W., Application of hydrophilic–interaction liquid chromatography to the separation of phosphorylated H1 histones. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 782, 55–62.

Lindner H., Sarg B., Hoertnagl B., Helliger W., The Microheterogeneity of the Mammalian H1^o Histone: Evidence for an Age–dependent deamidation. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 13324–13330.

Lindner H., Sarg B., Grunicke H., Helliger W., Age–dependent deamidation of H1^o histones in chromatin of mammalian tissues. *J. Canc. Res. Clin. Oncol.*, **1999**, 125, 182–186.

Litowski J.R., Semchuk P.D., Mant C.T., Hodges R.S., Hydrophilic interaction/cation–exchange chromatography for the purification of synthetic peptides from closely related impurities: serine side–chain acetylated peptides. *J. Peptide Res.*, **1999**, 54, 1–11.

Liu M., Chen E.X., Ji R., Semin D., Stability–indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1188, 255–263.

Liu Y., Urgaonkar S., Verkade J.G., Armstrong D.W., Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1079, 146–152.

Liu M., Ostovic J., Chen E.X., Cauchon N., Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 2362–2370.

LoBrutto R., Jones A., Kazakevich Y.V., Effect of counter–ion concentration in high–performance liquid chromatography of protonated basic analytes. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 913, 189–196.

Lunn G., Hellwig L.C. (Eds), *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley–Interscience, New York, **1998**.

Luo H., Ma L., Paek C., Carr P.W., Application of silica–based hyper–crosslinked sulfonate–modified reversed stationary phases for separating highly hydrophilic basic compounds. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1202, 8–18.

^a**Mant** C.T., Kondejewski L.H., Hodges R.S., Hydrophilic interaction/cation–exchange chromatography for separation of cyclic peptides. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 816, 79–88.

^b**Mant** C.T., Litowski J.R., Hodges R.S., Hydrophilic interaction/cation–exchange chromatography for separation of amphipathic α –helical peptides. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 816, 65–78.

Maréchal Y. (Ed), *The Hydrogen Bond and the Water Molecule. The Physics and Chemistry of Water, Aqueous and Bio Media*, 1st ed., Elsevier, UK, **2007**, pp. 16–19.

Marin S.J., Jones B.A., Felix W.D., Clark J., Effect of high-temperature on high-performance liquid chromatography column stability and performance under temperature-programmed conditions. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1030, 255–262.

Matyska M.T., Pesek J.J., Suryadevara R., Synthesis and Characterization of Amino-Based Columns for HPLC Made by Silanization/Hydrosilation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, 28, 2111–2139.

McCalley D.V., Comparison of the performance of conventional C₁₈ phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed–phase high–performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A*, **1999**, 844, 23–38.

McCalley D.V., Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed–phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1171, 46–55.

McCalley D.V., Neue U.D., Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1192, 225–29.

McCalley D.V., The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 858–880.

McClintic C., Remick D.M., Peterson J.A., Risley D.S., Novel Method for the Determination of Piperazine in Pharmaceutical Drug Substances Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, 26, 3093–3104.

McKeown A.P., Euerby M.R., Lomax H., Johnson C.M., Ritchie H.J., Woodruff M., The use of silica for liquid chromatographic mass spectrometric analysis of basic analytes. *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 835–842.

Megoulas N.C., Koupparis M.A., Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2005**, 35, 301–316.

Meyer V.R., (Ed), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed., John Wiley & Sons, Ltd, UK, **2004**, pp. 73–75.

Mihailova A., Lundanes E., Greibrokk T., Determination and removal of impurities in 2-D LC-MS of peptides. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 576–581.

Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N., Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3498–3501.

Mitchell R.E., The K.L., Antibacterial iminopyrrolidines from *Burkholderia plantarii*, a bacterial pathogen of rice. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3540–3543.

Mizzen C.A., Alpert A.J., Levesque L., Kruck T.P.A., McLachlan D.R., Resolution of allelic and non-allelic variants of histone H1 by cation-exchange-hydrophilic-interaction chromatography. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744, 33–46.

Modig K., Pfrommer B.G., Halle B, Temperature dependent hydrogen bond geometry in liquid water. *Physical Review Letters*, **2003**, 90, 075502.

Monaci L., Aresta A., Palmisano F., Visconti A., Zambonin C.G., Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 955, 79–86.

Montero C.M., Dodero M.C.R., Sanchez D.A.G., Barroso C.G., Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review. *Chromatographia*, **2004**, 59, 15–30.

Moon Y., Paek I.B., Kim H.H., Ji H.Y., Lee W.H., Park H.G., Lee H.S., Determination of tiapride in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.*, **2004**, 27, 901–905.

Mora L., Sentandreu M.A., Toldrá F., Hydrophilic Chromatographic Determination of Carnosine, Anserine, Balenine, Creatine, and Creatinine. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 4664–4669.

Müller W., Kutemeier G., Size Fractionation of DNA Fragments Ranging from 20 to 30000 Base Pairs by Liquid/Liquid Chromatography. *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 128, 231–238.

Müller W., New phase supports for liquid–liquid partition chromatography of biopolymers in aqueous poly(ethyleneglycol)–dextran systems: Synthesis and application for the fractionation of DNA restriction fragments. *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 155, 213–222.

Naidong W., Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 796, 209–224.

Naidong W., Lee J.W., Jiang X., Wehling M., Hulse J.D., Lin P.P., Simultaneous assay of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma using normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a silica column and an aqueous organic mobile phase. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 735, 255–269.

Naidong W., Eerkes A., Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, **2004**, 18, 28–36.

Naidong W., Shou W., Chen Y.L., Jiang X., Novel liquid chromatographic–tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous–organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **2001**, 754, 387–399.

Naidong W., Shou W., Addison T., Maleki S., Jiang X., Liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalysis using normal–phase columns with aqueous/organic mobile phases—a novel approach of eliminating evaporation and reconstitution steps in 96–well SPE. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16, 1965–1975.

Naidong W., Wei Z., Qi S., Zhou S.L., Direct injection of 96–well organic extracts onto a hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry system using a silica stationary phase and an aqueous/organic mobile phase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18, 2963–2968.

Nawrocki J., The silanol group and its role in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779, 29–71.

Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P.W., Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. Part I. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 1–30.

Nawrocki J., Dunlap C., Li J., Zhao J., McNeff C.V., McCormick A., Carr P.W., Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. Part II. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 31–62.

Negri A., Stirling D., Quilliam M., Blackburn S., et al., Three Novel Hydroxybenzoate Saxitoxin Analogues Isolated from the Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16, 1029–1033.

Neue U. (Ed), *HPLC Columns—Theory, Technology and Practice*, Wiley–VCH, New York **1997**, pp. 176–177, 217–223.

Neue U.D., Grumbach E.S., Mazzeo J.R., Tran K., Wagrowski-Diehl D.M., in *Bioanalytical Separations Handbook of Analytical Separations*, Wilson I.D. (Ed.), Elsevier Science B.V., New York, **2003**, pp. 185–214.

Neue U.D., Pheobe C.H., Tran K., Cheng Y.F., Lu Z., Dependence of reversed–phase retention of ionisable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 925, 49–67.

Nguyen H.P., Schug K.A., The advantages of ESI–MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1465–1480.

Nikitas P., Pappa-Louisi A., Agrafiotou P., Effect of the organic modifier concentration on the retention in reversed–phase liquid chromatography: II. Tests using various simplified models. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 946, 33–45.

Nikolov Z.L., Reilly P.J., Retention of carbohydrates on silica and amine–bonded silica stationary phases: application of the hydration model. *J. Chromatogr.*, **1985**, 325, 287–293.

Nishikawa T., Suzuki S., Kubo H., Ohtani H., On-column isomerization of sugars during high-performance liquid chromatography: analysis of the elution profile. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 167–172.

North S., Birrell H., Camilleri P., Positive and negative ion matrix–assisted laser desorption/ionization time–of–flight mass spectrometric analysis of complex glycans released from hen ovalbumin and derivatized with 2–aminoacridone. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 349–356.

Nováková L., Solichová D., Pavlovičová S., Solich P., Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1634–1644.

Novotny M.V., Mechref Y., New hyphenated methodologies in high-sensitivity glycoprotein analysis. *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 1956–1968.

Núñez O., Nakanishi K., Tanaka N., Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1191, 231–252.

Nystrom M.K., Herrmann W.G., Larson B.B.B., Method for preparation of silica particles. *United States Patent*, **1993**, 5256386.

Oertel R., Renner U., Kirch W., Determination of neomycin by LC–tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, 35, 633–638.

Oertel R., Neumeister V., Kirch W., Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1058, 197–201.

O’Gara J.E., Walsh D.P., Alden B.A., Casellini P., Walter T.H., Systematic Study of Chromatographic Behavior vs. Alkyl Chain Length for HPLC Bonded Phases Containing an Embedded Carbamate Group. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2992–2997.

Oleszek W., Bialy Z., Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, 78–91.

Olsen B.A., Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 913, 113–122.

Orth P., Engelhardt H., Separation of sugars on chemically modified silica gel. *Chromatographia*, **1982**, 15, 91–96.

Oyler A.R., Armstrong B.L., Cha J.Y., Zhou M.X., Yang Q., Robinson R.I., Dunphy R., Burinsky D.J., Hydrophilic interaction chromatography on amino–silica phases complements reversed–phase high–performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 724, 378–383.

Pack B.W., Risley D.S., Evaluation of a monolithic silica column operated in the hydrophilic interaction chromatography mode with evaporative light scattering detection for the separation and detection of counter–ions. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, 269–275.

Paek I.B., Moon Y., Ji H.Y., Kim H.H., Lee W.H., Lee B.Y., Lee S.H., Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of levosulpiride in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 809, 345–350.

Paglia G., D'Apolito O., Tricarico F., Garofalo D., Corso G., Evaluation of mobile phase, ion pairing, and temperature influence on an HILIC–MS/MS method for L–arginine and its dimethylated derivatives detection. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 2424–2429.

Palmer J.K., A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography. *Anal. Lett.*, **1975**, 8, 215–224.

Pan J.W., Song Q., Shi H.H., King M., Junga H., Zhou S., Naidong W., Development validation and transfer of a hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the analysis of the tobacco–specific nitrosamine metabolite NNAL in human plasma at low picogram per milliliter concentrations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18, 2549–2557.

Panagiotopoulos C., Sempere R., Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **2005**, 3, 419–454.

Peng J.M., Elias J.E., Thoreen C.C., Licklider L.J., Gygi S.P., Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC–MS/MS) for Large–Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. *J. Proteome Res.*, **2003**, 2, 43–50.

Pesek J.J., Matyska M.T., Hydride–based silica stationary phases for HPLC: Fundamental properties and applications. *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 1845–1854.

Peterson J., Allikmaa V., Subbi J., Pehk T., Lopp M., Structural deviations in poly(amidoamine) dendrimers: a MALDI–TOF MS analysis. *Eur. Polym. J.*, **2003**, 39, 33–42.

Philipsen H.J.A., Claessens H.A., Lind H., Klumperman B., German A.L., Study on the retention behaviour of low–molar–mass polystyrenes and polyesters in reversed–phase liquid chromatography by evaluation of thermodynamic parameters. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 790, 101–116.

Pisano R., Breda M., Grassi S., James C.A., Hydrophilic interaction liquid chromatography–APCI–mass spectrometry determination of 5–fluorouracil in plasma and tissues. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 38, 738–745.

Poole C.F. (Ed), *The essence of chromatography*. Elsevier, Amsterdam, **2003**, p. 19–23, 349–359.

Przybyciel M., Majors R.E., Phase Collapse in Reversed–Phase LC. *LC GC*, October, **2002**.

Qi S., Junga H., Yong T., Li A.C., Addison T., McCort–Tipton M., Beato B., Naidong W., Automated 96–well solid phase extraction and hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the analysis of cetirizine (ZYRTEC®) in human plasma—with emphasis on method ruggedness. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 814, 105–114.

Qi S., Naidong W., Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). Eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 830, 135–142.

Quiming N.S., Denola N.L., Ueta I., Saito Y., Tatematsu S., Jinno K., Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 598, 41–50.

Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Catabay A.P., Jinno K., Chromatographic Behavior of Uric Acid and Methyl Uric Acids on a Diol Column in HILIC. *Chromatographia*, **2008**, 67, 507–515.

Rabel F.M., Caputo A.G., Butts E.T., Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase material. *J. Chromatogr.*, **1976**, 126, 731–740.

Raman R., Raguram S., Venkataraman G., Paulson J.C., Sasisekharan R., Glycomics: an integrated systems approach to structure–function relationships of glycans. *Nat. Methods*, **2005**, 2, 817–824.

Risley D.S., Strege M.A., Chiral Separations of Polar Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1736–1739.

Rocklin R.D., Pohl C.A., Determination of Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **1983**, 6, 1577–1590.

Rotzoll N., Dunkel A., Hofmann T., Activity–Guided Identification of (S)–Malic Acid 1–O–d–Glucopyranoside (Morelid) and γ –Aminobutyric Acid as Contributors to Umami Taste and Mouth–Drying Oral Sensation of Morel Mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4149–4156.

Rückert H., Samuelson O., Adsorption of sugars on ion exchangers from ethyl alcohol–water solutions. *Sven. Kem. Tidskr.*, **1954**, 66, 337–344.

Ryu Y.K., Park J.K., Lim H.J., Park J.H., Solvatochromic Characterization of Silica-Based Stationary Phases for Liquid Chromatography. *Chromatographia*, **2000**, 51, 567–576.

Sadek P.C., (Ed), *The HPLC Solvent Guide*, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, **2002**, pp. 46.

Sage H., Vernon R.B., Iruela–Arispe L., Lane T.F., SPARC is a source of copper–binding peptides that stimulate angiogenesis. *J. Cell Biol.*, **1994**, 125, 929–943.

Samuelson O., Sjöström E., Utilization of Ion Exchangers in Analytical Chemistry. XXIV. Isolation of Monosaccharides. *Sven. Kem. Tidskr.*, **1952**, 64, 305–314.

Samuelson O., *Ion Exchange*. Marcel Dekker, New York, **1969**, Vol. 2, Chapter 5.

Sanchez A.C., Kansal M., Deleterious Effects of Formic Acid without Salt Additives on the HILIC Analysis of Basic Compounds. *LC GC*, **2008**, Feb 29, TN–1040.

Sandoval J.E., Pesek J.J., Synthesis and characterization of a hydride–modified porous silica material as an intermediate in the preparation of chemically bonded chromatographic stationary phases. *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 2067–2075.

Sarg B., Helliger W., Hoertnagl B., Puschendorf B., Lindner H., The N–Terminally Acetylated Form of Mammalian Histone H1^o, But Not That of Avian Histone H5, Increases with Age. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, 372, 333–339.

Sarg B., Koutzamani E., Helliger W., Rundquist I., Lindner H.H., Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 39195–39201.

Sarg B., Helliger W., Talasz H., Koutzamani E., Lindner H.H., Histone H4 Hyperacetylation Precludes Histone H4 Lysine 20 Trimethylation. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 53458–53464.

Sarg B., Gréen A., Söderkvist P., Helliger W., Rundquist I., Lindner H.H., Characterization of sequence variations in human histone H1.2 and H1.4 subtypes. *FEBS J.*, **2005**, 272, 3673–3683.

Schlichtherle-Cerny H., Affolter M., Cerny C., Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 2349–2354.

Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., De Galan L., Systematic study of ternary solvent behaviour in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **1981**, 218, 261–284.

Scott R.P.W., *Adv. Chromatogr.*, **1982**, 20, 169.

Scott P.R.W. (Ed), *Silica Gel in Liquid Chromatography*. Chrom-Ed Book Series, LIBRARY4SCIENCE, LLC, **2001**, 55–59.

Scott P.R.W. (Ed), *The Thermodynamics of Chromatography*. Chrom-Ed Book Series, LIBRARY4SCIENCE, LLC, **2003**, pp. 1–12.

Scott R.P.W., Traiman S., Solute-solvent interactions on the surface of silica gel: III. Multilayer adsorption of water on the surface of silica gel. *J. Chromatogr.*, **1980**, 196, 193–205.

Sentel K.B., Henderson A.N., Entropy dominated subambient temperature separations in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 246, 139–149.

Shen Y., Jacobs J.M., Camp II, D.G., Fang R., Moore R.J., Smith R.D., Ultra-High-Efficiency Strong Cation Exchange LC/RPLC/MS/MS for High Dynamic Range Characterization of the Human Plasma Proteome. *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 1134–1144.

Shou W., Chen Y., Eerkes A., Tang Y., Magis L., Jiang X., Naidong W., Ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis of polar analytes using packed silica columns. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 1613–1621.

Shou W.Z., Naidong W., Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 186–192.

^a**Silva C.R.**, Jardim I., Airoidi C., New generation of sterically protected C₁₈ stationary phases containing embedded urea groups for use in high–performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 127–138.

^b**Silva C.R.**, Jardim I., Airoidi C., Evaluation of the applicability and the stability of a C₁₈ stationary phase containing embedded urea groups. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 139–146.

¹**Sindorf D.W.**, Maciel G. E., Silicon–29 NMR study of dehydrated/rehydrated silica gel using cross polarization and magic–angle spinning. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 1487–1493.

²**Sindorf D.W.**, Maciel G.E., Silicon–29 nuclear magnetic resonance study of hydroxyl sites on dehydrated silica gel surfaces, using silylation as a probe. *J. Phys. Chem.*, **1983**, 87, 5516–5521.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., (Eds), *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, 5^η έκδοση, Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα, **2002**, pp. 793.

Snyder L.R. (Ed), *Principles of Adsorption Chromatography*. Marcel Dekker, New York, **1968**.

Snyder L.R., Role of the solvent in liquid–solid chromatography. Review. *Anal. Chem.*, **1974**, 46, 1384–1393.

Snyder L.R., Kirkland J.J. (Eds), *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., Canada, **1979**, pp. 419–426.

Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. (Eds), *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, **1997**, pp. 233–349.

Snyder L.R., Poppe H., Mechanism of solute retention in liquid–solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation: Competition *versus* “sorption”. *J. Chromatogr.*, **1980**, 184, 363–413.

Soczewinski E., Solvent composition effects in thin–layer chromatography systems of the type silica gel–electron donor solvent. *Anal. Chem.*, **1969**, 41, 179–182.

Soczewinski E., Wachtmeister C.A., The relation between the composition of certain ternary two–phase solvent systems and R_M values. *J. Chromatogr.*, **1962**, 7, 311–320.

Song L.J., Morrison J.J., Botting N.P., Thornalley P.J., Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC–MS/MS. *Anal. Biochem.*, **2005**, 347, 234–243.

Soukupova K., Krafkova E., Suchankova J., Tesarova E., Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1087, 104–111.

Strege M.A., Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2439–2445.

Strege M.A., Stevenson S., Lawrence S.M., Mixed–Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4629–4633.

Su J., Hirji R., Zhang L., He C., Selvaraj G., Wu R., Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in transgenic rice as a strategy for producing the stress-protectant glycine betaine. *J. Exp. Bot.*, **2006**, 57, 1129–1135.

Svec F. Fréchet J.M.J., Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 820–822.

Svec F., Petro M., Fréchet J.M.J., Separation of Hydrophilic Oligomers and Polymers Using Monodisperse Poly(2,3-dihydroxypropyl Methacrylate-co-Ethylene Dimethacrylate) Beads via Normal-Phase and Hydrophilic-Interaction HPLC. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **2001**, 66, 1047–1061.

Tai A., Gohda E., Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 853, 214–220.

Takahashi N., Three-dimensional mapping of N-linked oligosaccharides using anion-exchange, hydrophobic and hydrophilic interaction modes of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 217–225.

Takegawa Y., Deguchi K., Ito H., Keira T., Nakagawa H., Nishimura S.I., Simple separation of isomeric sialylated Nglycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 2533–2540.

Tanaka H., Zhou X., Masayoshi O., Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 119–125.

Tennikova T.B., Svec F., Belenkii B.G., High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.*, **1990**, 13, 63–70.

Tolstikov V.V., Fiehn O., Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, **2002**, 301, 298–307.

Tomiya N., Awaya J., Kurono M., Endo S. Arata Y., Takahashi N., Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique. *Anal. Biochem.*, **1988**, 171, 73–90.

Tran N.T., Daali Y., Cherkaoui S., Taverna M., Neeser J.R., Veuthey J.-L., Routine o-glycan characterization in nutritional supplements – a comparison of analytical methods for the monitoring of the bovine kappa-casein macropeptide glycosylation. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 929, 151–163.

Tran J.V., Molander P., Greibrokk T., Lundanes E., Temperature effects on retention in reversed phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 930–940.

Troyer J.K., Stephenson K.K., Fahey J.W., Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 919, 299–304.

Turek A.K., Dzido T.H., Engelhardt H., The effect of modifier on selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *LC GC Europe*, Jan 1, **2008**.

Uutela P., Reinila R., Piepponen P., Ketola R.A., Kostianen R., Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 2950–2956.

Valette J.C., Demesmay C., Rocca J.L., Verdon E., Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase. *Chromatographia*, **2004**, 59, 55–60.

Verhaar L.A.T., Kuster B.F.M., Contribution to the elucidation of the mechanism of sugar retention on amine-modified silica in liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **1982**, 234, 57–64.

Verzele M., Simoens G., Vandamme F., A critical review of some liquid chromatography systems for the separation of sugars. *Chromatographia*, **1987**, 23, 292–300.

Vikingsson S., Kronstrand R., Josefsson M., Retention of opioids and their glucuronides on a combined zwitterion and hydrophilic interaction stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1187, 46–52.

Viklund C., Irgum K., Synthesis of Porous Zwitterionic Sulfobetaine Monoliths and Characterization of Their Interaction with Proteins. *Macromolecules*, **2000**, 33, 2539–2544.

Viklund C., Sjögren A., Irgum K., Nes I., Chromatographic Interactions between Proteins and Sulfoalkylbetaine-Based Zwitterionic Copolymers in Fully Aqueous Low-Salt Buffers. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 444–452.

Voyksner R.D., Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. In: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry-Fundamentals Instrumentation & Applications*, Cole R.B. (Ed), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **1997**, p. 323–342.

Vynios D.H., Karamanos N.K., Tsiganos C.P., Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *J. Chromatogr. B*, **2002**, 781, 21–38.

Wade K.L., Garrard I.J., Fahey J.W., Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1154, 469–472.

Wagner K., Miliotis T., Marko-Varga G., Bischoff R., Unger K.K., An Automated On-Line Multidimensional HPLC System for Protein and Peptide Mapping with Integrated Sample Preparation. *Anal. Chem.*, **2003**, 74, 809–820.

Walter T.H., Iraneta P., Capparella P., Mechanism of retention loss when C₈ and C₁₈ HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1075, 177–183.

Wang Q.J., Fang Y.Z., Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 812, 309–324.

Wang X.D., Li W.Y., Rasmussen H.T., Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083, 58–62.

Wang Y., Wang T., Shi X., Wan D., Zhang P., He X., Gao P., Yang S., Gu J., Xu G., Analysis of acetylcholine, choline and butyrobetaine in human liver tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 47, 870–875.

Wang C.-Z., Wu J.A., McEntee E., Yuan C.-S., Saponins Composition in American Ginseng Leaf and Berry Assayed by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 2261–2266.

West C., Lesellier E., Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1110, 200–213.

West R., Baney R.H., Hydrogen Bonding Studies. II.¹ The Acidity and Basicity of Silanols Compared to Alcohols². *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 6145–6148.

Wonnacott D.M., Patton E.V., Hydrolytic stability of aminopropyl stationary phases used in the size-exclusion chromatography of cationic polymers. *J. Chromatogr.*, **1987**, 389, 103–113.

Wu J.Y., Bicker W., Lindner W., Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1492–1503.

Wuhrer M., Deelder A.M., Hokke C.H., Protein glycosylation analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 124–133.

Wuhrer M., Koeleman C.A.M., Hokke C.H., Deelder A.M., Protein Glycosylation Analyzed by Normal–Phase Nano–Liquid Chromatography–Mass Spectrometry of Glycopeptides. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 886–894.

Xuan Y., Scheuermann E.B., Meda A.R., Hayen H., von Wirén N., Weber G., Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1136, 73–81.

Yanagida A., Murao H., Ohnishi-Kameyama M., Yamakawa Y., Shoji A., Tagashira M., Kanda T., Shindo H., Shibusawa Y., Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1143, 153 – 161.

Yoshida T., Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3038–3043.

^a**Yoshida T.**, Prediction of peptide retention time in normal–phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 811, 61–67.

^b**Yoshida T.**, Calculation of peptide retention coefficients in normal–phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 808, 105–112.

Yoshida T., Peptide separation by Hydrophilic–Interaction Chromatography: a review. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2004**, 60, 265–280.

Yu H.C., Tuteja S., Moon J.I., Kleiner G.I., et al., Utilization of Dried Blood Spot Citrulline Level as a Noninvasive Method for Monitoring Graft Function Following Intestinal Transplantation. *Transplantation*, **2005**, 80, 1729–1733.

Yu Y.Q., Gilar M., Kaska J., Gebler J.C., A rapid sample preparation method for mass spectrometric characterization of N–linked glycans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 2331–2336.

Yuan J.P., Chen F., Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 5078–5082.

Zaia J., Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom. Rev.*, **2004**, 23, 161–227.

Zempleni J., Rucker R.B., McCormick D.B., Suttie J.W. (Eds), *Handbook of Vitamins*. CRC press, Taylor & Francis, **2007**, pp. 191–489.

Zhang K., Yan C., Zhang Z.C., Wang Q.S., Gao R.Y., Mixed Mode of Hydrophilic and Ionic Interaction Pressurized Capillary Electrochromatography for Separation of Basic Compounds. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, 26, 2119–2131.

Zheng Y.F., Xu G.W., Yang J., Zhao X.J., Pang T., Kong H., Determination of urinary nucleosides by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 819, 85–90.

Zhou T., Lucy C.A., Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1187, 87–93.

Zhu B.Y., Mant C.T., Hodges R.S., Hydrophilic–interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation–exchange columns. *J. Chromatogr.*, **1991**, 548, 13–24.

Zhu B.Y., Mant C.T., Hodges R.S., Mixed-mode hydrophilic and ionic interaction chromatography rivals reversed-phase liquid chromatography for the separation of peptides. *J. Chromatogr.*, **1992**, 594, 75–86.

Zywicki B., Catchpole G., Draper J., Fiehn O., Comparison of rapid liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes. *Anal. Biochem.*, **2005**, 336, 178–186.

GL Sciences: http://www.glsciences.com/products/inertsil_hplc_columns/index.html

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι μια τεχνική εναλλακτική της RPLC η οποία αναδείχθηκε από τον Alpert (1990) για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων. Ο μηχανισμός κατακράτησης στηρίζεται στην κατανομή των πολικών ενώσεων μεταξύ μιας στιβάδας ύδατος, μερικώς "ακίνητοποιημένης" στην επιφάνεια της πολικής στατικής φάσης, και του υπόλοιπου μέρους της κινητής φάσης. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι μια κατηγορία ενώσεων με υψηλή βιολογική αξία, ενώ από άποψη δομής φέρουν χαρακτηριστικές πολικές ομάδες που τις καθιστούν υδρόφιλες σε διαφορετικό βαθμό.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο μηχανισμός κατακράτησης της HILIC με βάση τη χρωματογραφική συμπεριφορά των υδατοδιαλυτών βιταμινών: νικοτιναμίδιο, νικοτινικό οξύ, πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη και L-ασκορβικό οξύ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι στατικές φάσεις διόλης-πυριτίας, μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο-πυριτίας. Οι χρωματογραφικές παράμετροι που μελετήθηκαν για κάθε στατική φάση ήταν η ισχύς του διαλύτη έκλουσης, το pH της κινητής φάσης, η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, η παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, η φύση του οργανικού διαλύτη και η θερμοκρασία της στήλης. Για τη λεπτομερή διερεύνηση του μηχανισμού κατακράτησης αξιολογήθηκε η προσαρμογή των δεδομένων κατακράτησης σε τρεις εξισώσεις-μοντέλα που αφορούν το μηχανισμό κατανομής, το μηχανισμό επιφανειακής προσρόφησης και ένα τρίτο μοντέλο που συμπεριλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις του συστήματος αναλύτης-κινητή φάση-στατική φάση. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε δείγμα φαρμακευτικού σκευάσματος και βιταμινούχου αναψυκτικού.

Με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των τριών εξισώσεων-μοντέλων, σε συνδυασμό με τα θερμοδυναμικά δεδομένα της διατριβής, επιβεβαιώνεται ότι ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC είναι μικτός με τους επιμέρους μηχανισμούς κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης να δρουν συνεργιστικά. Το εύρος της περιεκτικότητας σε ύδωρ στο οποίο λαμβάνει χώρα επιφανειακή προσρόφηση εξαρτάται από τον όγκο της σχηματιζόμενης στιβάδας ύδατος, το φορτίο της στατικής φάσης και των ενώσεων και την παρουσία ιόντων του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος. Για τις ουδέτερες βιταμίνες, η μετάβαση από το μηχανισμό κατανομής στο μηχανισμό επιφανειακής

προσρόφησης λαμβάνει χώρα σε ποσοστό $ACN \geq 80\%$ για τη στήλη διόλης–πυριτίας και σε ποσοστό $ACN \geq 75\%$ για τις στήλες μη επικαλυμμένης πυριτίας και αμινο–πυριτίας. Η μετάβαση από το μηχανισμό κατανομής στο μηχανισμό επιφανειακής προσρόφησης για ενώσεις που φέρουν ομώνυμο φορτίο με τη στήλη λαμβάνει χώρα σε ποσοστά $ACN \geq 85\%$, όπου μειώνεται αισθητά η ηλεκτροστατική απώση λόγω της προτιμώμενης κατανομής των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα. Στις ενώσεις που έλκονται ηλεκτροστατικά από την επιφάνεια της στατικής φάσης κυριαρχεί ο μηχανισμός της επιφανειακής προσρόφησης μέσω ιονανταλλαγής. Η μεταβολή του pH της κινητής φάσης επηρεάζει σημαντικά την κατακράτηση των βιταμινών που φέρουν φορτίο διότι καθορίζει τη φύση και την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Από τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών οργανικών διαλυτών στην κατακράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών αναδεικνύεται η σημαντική συνεισφορά των δεσμών υδρογόνου στο μηχανισμό κατακράτησης. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση αυξάνει τον υδρόφιλο χαρακτήρα της υδατικής στιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση της κατακράτησης των ουδέτερων βιταμινών. Η αύξηση της υδροφιλικότητας οφείλεται στην προτιμώμενη κατανομή των ιόντων του άλατος στην υδατική στιβάδα και το φαινόμενο λαμβάνει χώρα σε ποσοστό $ACN \geq 70\%$. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, αλλά και η παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του μηχανισμού ιονανταλλαγής. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ιόντων του άλατος και των βιταμινών που φέρουν φορτίο, ως προς τις φορτισμένες θέσεις της επιφάνειας της στατικής φάσης, επηρεάζει την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ελκτικής ή απωστικής φύσης.

Για την επίτευξη διαχωρισμού των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε συνθήκες HILIC οι κυριότερες παράμετροι που επηρεάζουν τον παράγοντα κατακράτησης και κατ' επέκταση τη διαχωριστική ικανότητα της στατικής φάσης είναι η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε ACN , το pH της κινητής φάσης και η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος. Η θερμοκρασία της στήλης επηρεάζει σημαντικά την κατακράτηση των φορτισμένων βιταμινών με φορτίο ομώνυμο με αυτό της στατικής φάσης και σε μικρότερο βαθμό τις ουδέτερες βιταμίνες. Επιπλέον, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης επηρεάζει άμεσα τη χρωματογραφική απόδοση της στήλης.

Με κριτήρια τη διαχωριστική ικανότητα, τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών, τις ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης και το συνολικό χρόνο ανάλυσης, επιλέχθηκε η στήλη διόλης–πυριτίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες ήταν οι εξής: ACN/H₂O 90/10 (v/v), CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM, pH 5,0. Επιπλέον, η θερμοκρασία της στήλης ήταν 25 °C, και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ίση προς 0,8 mL/min. Η καταλληλότητα των χρωματογραφικών συνθηκών, με κριτήρια τις παραμέτρους k' , T_f , R_s , N επιβεβαιώθηκε με βάση τη δοκιμή καταλληλότητας συστήματος (SST). Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την επαναληψιμότητα της μεθόδου την ίδια ημέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών και τις ανακτήσεις των βιταμινών από τα δείγματα.

Με την εφαρμογή προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης αυξάνεται σημαντικά η διαχωριστική δύναμη της HILIC με αποτέλεσμα τον ικανοποιητικό διαχωρισμό μίγματος οκτώ υδατοδιαλυτών βιταμινών συμπεριλαμβανομένης της κυανοκοβαλαμίνης και του φολικού οξέος, με συνολικό χρόνο 31 min.

Επιπλέον μελετήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της κινητής φάσης την ίδια ημέρα, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης. Οι χρόνοι κατακράτησης για το νικοτιναμίδιο, την πυριδοξίνη και τη ριβοφλαβίνη παρέμειναν πρακτικά σταθεροί, ενώ μικρές μεταβολές στους χρόνους σημειώθηκαν για το νικοτινικό οξύ, το L-ασκορβικό οξύ και τη θειαμίνη. Η αξιολόγηση των δεδομένων κατακράτησης για το σύνολο των ενώσεων με βάση τη δοκιμή t επιβεβαίωσε ότι οι μεταβολές στους χρόνους δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($P=0,05$).

SUMMARY

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is a chromatographic mode first coined by Alpert (1990) for the separation of polar compounds. The retention mechanism primarily involves partitioning of polar analytes between a water-enriched layer partially immobilized on the stationary phase and the bulk eluent. Water-soluble vitamins constitute a group of organic compounds of great biological importance, while the presence of different polar moieties on their structures renders them hydrophilic in a varied degree.

In the present study, the retention mechanism in HILIC was investigated based on the chromatographic behaviour of the water-soluble vitamins, namely nicotinamide, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin, thiamine and L-ascorbic acid. For this purpose, diol-silica, bare silica and amino-silica were utilized, as stationary phases. The chromatographic parameters evaluated for each stationary phase were the eluent strength, the mobile phase pH, the presence of different buffer salts, the buffer salt concentration, the nature of the organic solvent and the column temperature. For detailed investigation of the retention mechanism, two models of partitioning and surface adsorption and a third model, which considers the solute-solvent-stationary phase interactions were examined for the degree-of-fitness on retention data. Moreover, a method was developed and validated for the analysis of water-soluble vitamins in a pharmaceutical preparation and a vitamin fortified drink.

Based on the results derived from the fitness of the model equations on retention, and the thermodynamic data, it is confirmed that the retention mechanism in HILIC is a mixed mode with partitioning and surface adsorption operating synergistically. The amplitude of the water content at which surface adsorption becomes apparent is depended on the water layer thickness and the charge of the stationary phase, the charge of the analytes and the presence of buffer salt ions. For the neutral vitamins, the adsorption mechanism becomes apparent at ACN content $\geq 80\%$ for the diol-silica column and at ACN content $\geq 75\%$ for the bare silica and amino-silica columns. For analytes carrying the same charge with the stationary phase, the switching from partition to surface adsorption mechanism becomes evident at ACN content $\geq 85\%$, where electrostatic repulsion is weakened due to the preferable distribution of the salt ions into the aqueous layer. Finally, the surface adsorption mechanism is predominant for compounds being electrostatically attracted by the stationary phase. The alteration of the mobile phase pH influences drastically the retention of charged vitamins as it determines the nature and the strength of electrostatic interactions. The investigation on the effect of different

organic solvents on the retention behavior of water-soluble vitamins brings forward the conclusive evidence that hydrogen bonds contribute greatly to the retention mechanism. Increasing the concentration of the buffer salt in the mobile phase the aqueous layer becomes more hydrophilic and as a result, neutral vitamins are stronger retained. The increase in hydrophilicity of the aqueous layer is the result of the preferable distribution of the buffer salt ions into this layer, a phenomenon which occurs at ACN content $\geq 70\%$. The alteration of buffer salt concentration along with the presence of different buffer salts in the mobile phase reveals the existence of the ion-exchange mechanism. The competition between the salt ions and the charged vitamins for the charged sites of the stationary phase affects the strength of the electrostatic interactions being attractive or repulsive in nature.

The main factors that influence the separation of the water-soluble vitamins under HILIC conditions include the percentage of ACN, the mobile phase pH and the buffer salt concentration. The column temperature significantly influences the retention of vitamins carrying the same charge with the stationary phase and, to a lesser degree, the neutral ones. Moreover, the mobile phase flow rate directly influences the column performance.

Following the criteria of resolution, peak symmetry, isocratic eluting conditions and the total analysis time, the diol-column was chosen for the quantitative determination of the water-soluble vitamins. The chromatographic conditions were as follows: ACN/H₂O 90/10 (v/v), CH₃COONH₄ 10 mM, TEA 20 mM, pH 5.0. In addition, the column temperature was set at 25 °C and the mobile phase flow rate at the value of 0.8 mL/min. The suitability of the chromatographic conditions based on the parameters of k' , T_f , R_s , N was established according to the system suitability test (SST). Validation was verified by method detection and quantitation limits, accuracy, inter- and intra-day precisions and vitamin recoveries from samples.

With the application of a gradient elution program the separation power of HILIC mode is significantly enhanced resulting to satisfactory separation of a mixture of eight water-soluble vitamins including cyanocobalamin and folic acid, within a time window of 31 min.

The potential of mobile phase re-use under isocratic mobile phase conditions within a day was also investigated. The retention times of nicotinamide, pyridoxine and riboflavin remained practically unaffected while small shifts on retention were noticed for nicotinic acid, L-ascorbic acid and thiamine. Evaluation of retention data with t-test revealed that the shift of retention times of all analytes were not statistically significant ($P=0.05$).

