

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa



Małgorzata Kowalczyk

Cholany jako układy samoorganizujące się w technikach rozdzielczych

Praca doktorska zrealizowana w ramach
Międzynarodowych Studiów Doktoranckich
w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych
Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk

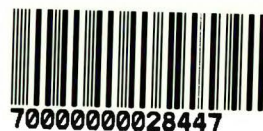
Handwritten signature of Janusz Lipkowski

Promotor: **prof. dr hab. Janusz Lipkowski**

Opiekun naukowy: **dr inż. Monika Asztemborska**

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.421/10



WARSZAWA 2009

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Projekt promotorki NR N N204 3702 33

B. 421/10



Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu promotorowi prof. dr hab. Januszowi Lipkowskiemu za przyjęcie mnie do Zakładu Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych, opiekę oraz udzielanie wskazówek podczas wykonywania i redagowania niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania składam dr inż. Monice Asztemborskiej za wybór tematu, opiekę, liczne dyskusje oraz całą wiedzę, którą mi przekazała.

Dziękuję także prof. dr hab. Helenie Dodziuk, dr hab. Robertowi Nowakowskiemu oraz dr inż. Annie Bielejewskiej za profesjonalne i cenne uwagi przy edycji niniejszej pracy. Dr inż. Andrzejowi Żywocińskiemu dziękuję za pomoc przy pomiarach napięcia powierzchniowego, liczne dyskusje oraz poświęcony czas.

Dziękuję również wszystkim Kolegom i Koleżankom z Zakładu Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych za stworzenie przyjaznej i twórczej atmosfery w Instytucie. Gorące podziękowania kieruję także dla pracowników Ogrodu Botanicznego Westfalskiego Uniwersytetu Wilhelma w Münster za podarowanie owoców gorzkiej pomarańczy.

Dziękuję również wszystkim znajomym, na których zawsze mogłam liczyć. Szczególnie dziękuję Iwonie Cymerman za zrozumienie, pomoc oraz przyjaźń.

Dziękuję również mojej Rodzinie, za troskę i wsparcie podczas wszystkich tych lat nauki. Szczególnie dziękuję mojej Mamie i Dziadkom, bez których nie byłabym tym, kim teraz jestem. Dziękuję.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	ii
STRESZCZENIE	v
CZĘŚĆ LITERATUROWA	1
1. Wstęp do chemii surfaktantów.....	2
1.1 Surfaktanty i micelle	2
1.2 Agregacja w roztworach wodnych.....	4
1.2.1 Termodynamika tworzenia miceli i mechanizm agregacji.....	6
1.3 Agregacja w polarnych rozpuszczalnikach organicznych.....	7
1.3.1 Formamid.....	8
1.4 Agregacja w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych	9
2. Sole sodowe kwasów cholowych.....	10
2.1 Cholany - budowa i zastosowanie	10
2.1.1 Otrzymywanie i rola w układach biologicznych.....	11
2.1.2 Budowa i właściwości fizykochemiczne cholanów	13
2.2 Agregacja cholanów w roztworach wodnych.....	14
2.2.1 Modele struktury miceli cholanów w roztworach wodnych.....	16
2.3 Pochodne kwasów cholowych jako cząsteczki funkcyjne	19
3. Izomeria cząsteczek-związeki badane	22
3.1 Izomeria.....	22
3.1.1 Izomeria konstytucyjna	23
3.1.2 Stereoizomeria	24
3.1.2.1 Chiralność	25
3.1.2.2 Izomeria geometryczna	28
3.2 Terpenoidy.....	29
3.2.1 Izomeria terpenoidów.....	30
3.3 Binaftyly	32
3.3.1 Izomeria pochodnych 1,1'-binaftyli.....	33
3.4 Flawonoidy	34
3.4.1 Izomeria flawanonów	35
4. Surfaktanty w technikach rozdzielczych	38
4.1 Techniki Chromatograficzne	39
4.1.1 Podstawowe pojęcia technik chromatograficznych	40
4.1.2 Micelarna podziałowa chromatografia gazowa (MGLC).....	43
4.1.3 Micelarna chromatografia cieczowa (MLC).....	45
4.1.3.1 Cholany w technice MLC	49
4.2 Elektroforeza kapilarna (CE).....	51
4.2.1 Micelarna Elektrokinetyczna Chromatografia Kapilarna (MECC)	56
4.2.1.1 Fazy pseudostacjonarne w układzie MECC.....	59

5. Cel pracy	61
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	63
6. Materiały i metody.....	64
6.1 Chromatografia gazowa (GC).....	64
6.1.1 Aparatura	64
6.1.2 Kolumny, wypełnienia i preparatyka	64
6.1.3 Charakterystyka odczynników i związków modelowych.....	65
6.1.4 Napięcie powierzchniowe.....	67
6.2 Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).....	67
6.2.1 Aparatura	67
6.2.2 Charakterystyka kolumny	68
6.2.3 Odczynniki i substancje badane	68
6.3 Micelarnej elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC)	69
6.3.1 Aparatura	69
6.3.2 Kondycjonowanie i mycie kapilary.....	70
6.3.3 Odczynniki i substancje badane	70
7. Charakterystyka faz stacjonarnych modyfikowanych cholanami w układzie	
podziałowej chromatografii gazowej	73
7.1 Wyznaczenie krytycznego stężenia micelnego metodą pomiaru napięcia	
powierzchniowego	73
7.2 Teoretyczny opis systemu z solami kwasów cholowych w układzie GLC ..	76
7.3 Wpływ cholanów na chromatograficzne zachowanie się cząsteczek	
modelowych.....	78
7.3.1 Wpływ rodzaju soli kwasu cholowego na elucje związków	
modelowych.....	78
7.3.2 Wpływ stężenia cholanu sodu i deoksycholanu sodu na podstawowe	
parametry chromatograficzne	81
7.3.2.1 Anomalne zachowanie węglowodorów aromatycznych	
i związków polarnych na fazach cholanowych	84
7.4 Badania temperaturowe.....	89
7.4.1 Opis termodynamiczny sorpcji analitu na fazach ciekłych	
modyfikowanych cząsteczkami surfaktantu	89
7.4.2 Wyznaczenie wartości entalpii oddziaływania dla analitu w układzie	
formamidowego roztworu surfaktantu	91
8. Sole sodowe kwasów cholowych jako chiralne modyfikatory fazy ruchomej w	
wysokosprawnej chromatografii cieczowej	96
8.1 Badanie adsorpcji cholanów na fazie stacjonarnej C18	96
8.2 Wpływ długości łańcucha alkilowego n-alkoholu na enancjoselektywność	
badanych układów cholanowych	102
8.2.1 Układ cholanu sodu	102
8.2.2 Układ deoksycholanu sodu	107
8.2.3 Sprawność układu cholanu i deoksycholanu sodu	111
8.3 Wpływ stężenia modyfikatora organicznego na proces rozróżnienia	
chiralnego w badanych układach soli kwasów cholowych.	114

8.4	Wpływ stężenia cholanu sodu i deoksycholanu sodu na chromatograficzne zachowanie się izomerów związków modelowych	120	
8.5	Wpływ temperatury na separację związków w badanych układach micelarnych	123	
9. Micele soli kwasów cholowych jako fazy pseudostacjonarne w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej.....			131
9.1	Wpływ składu buforu wodącego na proces separacji związków modelowych.....	131	
9.2	Wpływ dodatku organicznego na diastereo separację flawanonów	137	
9.3	Wyznaczenie krytycznego stężenia micelnego dla cholanu sodu i deoksycholanu sodu w badanych warunkach elektroforetycznych	139	
9.4	Wpływ stężenia surfaktantu na separację związków modelowych	141	
9.5	Weryfikacja eksperymentalna metody	150	
9.6	Praktyczne zastosowanie cholanowych faz pseudostacjonarnych. Analiza składu diastereoizomerycznego flawanonów w sokach z owoców cytrusowych.....	152	
10. Podsumowanie i wnioski.....			157
10.1	Dalszy kierunek badań	161	
WYKAZ LITERATURY			164

WYKAZ SKRÓTÓW

Materiały i oznaczenia

ACN	Acetonitryl
BN	1,1'-Binaftylo-2,2'-diol
BNDHP	Fosforan - 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu
n-BuOH	Butan-1-ol
CMC	Krytyczne stężenie micelarne
DID	Didymina
DMSO	Dimetylosulfotlenek
EOF	Przepływ elektroosmotyczny
ERI	Eriocytryna
FA	Formamid
n-Hep	Heptan-1-ol
HES	Hesperydyna
n-HexOH	Heksan-1-ol
MeOH	Metanol
NaC	Cholan sodu
NaDC	DeoksychoLAN sodu
NaDTC	TaurodeoksychoLAN sodu
NAR	Naryngina
NaTC	TaurochoLAN sodu
NEE	Neericytryna
NEH	Neohesperydyna
NUR	Narirutyna
SDS	Siarczan dodecyLU sodu
n-PeOH	Pentan-1-ol
PON	PonciryNA
2-PrOH	Propan-2-ol
PYR	Pyrakantozyd
n-OctOH	Oktan-1-ol
ODS	Oktadecylowa faza stacjonarna (C18)

Metody instrumentalne

CE	Elektroforeza kapilarna
CGE	Kapilarna elektroforeza żelowa
CITP	Izotachoforeza kapilarna
CZE	Kapilarna elektroforeza strefowa
GLC	Podziałowa chromatografia gazowa
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IR	Spektroskopia w podczerwieni
LS	Rozpraszanie światła
MECC	Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna
MGLC	Micelarna podziałowa chromatografia gazowa
MLC	Micelarna chromatografia cieczowa
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy
ST	Pomiar napięcia powierzchniowego

Symbole

A_s	Asymetryczność piku
α	Współczynnik rozdzielania
$\Delta\Delta H^0$	Różnica zmian entalpii pomiędzy izomerami
$\Delta\Delta S^0$	Różnica zmian entropii pomiędzy izomerami
$\Delta\Delta G^0$	Różnica zmian entalpii swobodnej pomiędzy izomerami
ΔH^0	Zmiana entalpii
ΔS^0	Zmiana entropii
K	Stała równowagi procesu
k	Współczynnik retencji
μ_{app}	Obserwowana ruchliwość elektroforetyczna
μ_e	Ruchliwość elektroforetyczna
μ_{eof}	Ruchliwość elektroforetyczna buforu
mM	Milimolalność [10^{-3} mol/kg]
mM	Milimolowość [10^{-3} mol/dm ³]

n	Liczba agregacji
N	Liczba pól teoretycznych
R_s	Rozdzielczość pików
t_{mc}	Czas migracji miceli
V	Szybkość przepływu
t_R	Czas retencji
t_R'	Zredukowany czas retencji

STRESZCZENIE

Sole sodowe kwasów cholowych należą do grupy naturalnych surfaktantów o nieliniowej budowie. W środowisku wodnym tworzą micelle, które uczestniczą w transporcie molekuł hydrofobowych o dużym znaczeniu biologicznym. Z uwagi na obecność licznych centrów asymetrii w molekułach surfaktantu, tworzone micelle charakteryzuje zdolność rozróżnienia chiralnego stereoizomerów.

Niniejsza rozprawa doktorska zawiera opis badań nad właściwościami separacyjnymi faz utworzonych na bazie miceli soli sodowej kwasu cholowego oraz soli sodowej kwasu deoksycholowego w wybranych technikach rozdzielczych. Badania przeprowadzono w układach podziałowej chromatografii gazowej (GLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz elektroforezy kapilarnej (CE). W zależności od wybranej techniki micelle cholanów modyfikowały fazę stacjonarną, ruchomą lub też tworzyły fazę pseudostacjonarną jak miało to miejsce w metodzie CE.

Część pierwsza rozprawy ma charakter opisowy i zawiera zarys teorii oraz informacje przydatne w lekturze części drugiej. Kolejne fragmenty obejmują opis podstawowych pojęć z chemii surfaktantów, charakterystykę badanych układów amfifilowych, zarys teorii izomerii oraz opis technik badawczych.

Część druga rozprawy jest właściwym opisem pracy doktorskiej. Rozpoczyna się od opisu metod i procedur, które zostały zastosowane w niniejszej rozprawie. W kolejnych rozdziałach przedstawiono wyniki przeprowadzanych eksperymentów w warunkach stosowanych technik rozdzielczych.

Uzyskane dane w układzie podziałowej chromatografii gazowej po raz pierwszy dostarczają dowodów, że agregacja cholanów może następować w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Wartość krytycznego stężenia micelnego (CMC) określona została metodą pomiaru napięcia powierzchniowego. Wykazano, że retencja związków chromatografowanych ściśle zależy od stężenia surfaktantu w fazie stacjonarnej. Przeprowadzone badania temperaturowe umożliwiły wyznaczenie entalpii oddziaływania analitu z formą wolną oraz zagregowaną surfaktantu. Na podstawie zebranych wyników sformułowano hipotezę objaśniającą mechanizm retencji w warunkach micelarnej chromatografii gazowej.

Własności enancjoseparacyjne cholanowych faz ruchomych zbadano w warunkach wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać bardziej szczegółowe informacje dotyczące wpływu rodzaju i stężenia dodatku modyfikatora organicznego na proces rozpoznania chiralnego przez micelle soli kwasów cholowych. Wyznaczone parametry termodynamiczne takie jak entalpia, entropia i energia swobodna Gibbsa wykorzystane zostały do opisu procesu separacji atropoizomerów molekuł modelowych. Zgromadzone wyniki pozwalają na poszerzenie stanu istniejącej wiedzy dotyczącej możliwości rozdzielczych miceli soli kwasów cholowych w warunkach chromatografii cieczowej.

W metodzie elektroforezy kapilarnej cholan i deoksychohan sodu wykorzystano jako fazy pseudostacjonarne do rozdzielania stereoizomerów związków pochodzenia naturalnego. Zbadano wpływ środowiska achiralnego (rodzaj buforu wiodącego, rozpuszczalnika organicznego) na proces separacji chiralnych flawonoidów. Uzyskane wyniki pokazują, że układy micelarne cholanu i deoksychohanu sodu wykazują dużą stereoselektywność w stosunku do diastereoizomerów flawanonów. Na podstawie zebranych wyników opracowano metodę rozdzielania mieszanin izomerów flawanonów. Zoptymalizowaną metodę praktycznie zastosowano do określenia składu diastereoizomerycznego soków wyciskanych owoców cytrusowych.

W ostatnim rozdziale pracy zamieszczone zostało podsumowanie i najważniejsze wnioski z przeprowadzanych eksperymentów.

CZEŚĆ LITERATUROWA

WPROWADZENIE

Praca dotyczy zastosowania soli sodowych kwasów cholowych w technikach rozdzielczych jako amfifilowych środowisk supramolekularnych. W związku z zakresem pracy opracowanie literaturowe składa się z czterech rozdziałów:

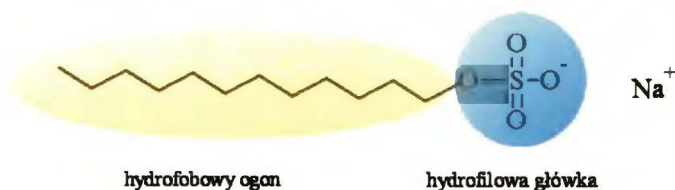
- rozdział 1 zawiera podstawowy opis wraz z metodami badawczymi procesu agregacji związków amfifilowych w różnych układach rozpuszczalników,
- w rozdziale 2 szczegółowo opisano obiekty badań - sole sodowe kwasów cholowych - ich występowanie, budowę oraz właściwości fizykochemiczne,
- rozdział 3 poświęcony jest klasyfikacji izomerów oraz przedstawia opis budowy i własności cząsteczek modelowych rozdzielanych w układach badanych amfifili,
- rozdział 4 zawiera podstawowe wiadomości z zakresu technik chromatograficznych oraz elektroforetycznych, jako technik rozdzielczych zastosowanych w niniejszej pracy.

1

WSTĘP DO CHEMII SURFAKTANTÓW

1.1 Surfaktanty i micelle

Na rozpuszczalność molekuł w roztworach ma wpływ zarówno natura cząsteczki rozpuszczanej jak również właściwości fizykochemiczne rozpuszczalnika. Powszechnie znana jest zasada: „*podobne rozpuszcza podobne*”. Polarne cząsteczki są zatem dobrze rozpuszczalne w polarnych rozpuszczalnikach, a nie przechodzą do niepolarniej fazy ciekłej. Własność ta staje się niezwykle interesująca w przypadku cząsteczek amfifilowych. Mianem cząsteczek amfifilowych, zwanych inaczej cząsteczkami powierzchniowo czynnymi lub krócej surfaktantami, określamy molekuly w których budowie wyróżnić można zarówno część polarną jak i niepolarną [1]. W klasycznym typie surfaktanta mamy do czynienia z hydrofobowym łańcuchem węglowodorowym i hydrofilową główką (Rys. 1.1). W zależności od chemicznej natury części hydrofilowej, surfaktanty mogą być m.in. kationowe, anionowe lub niejonowe [2].

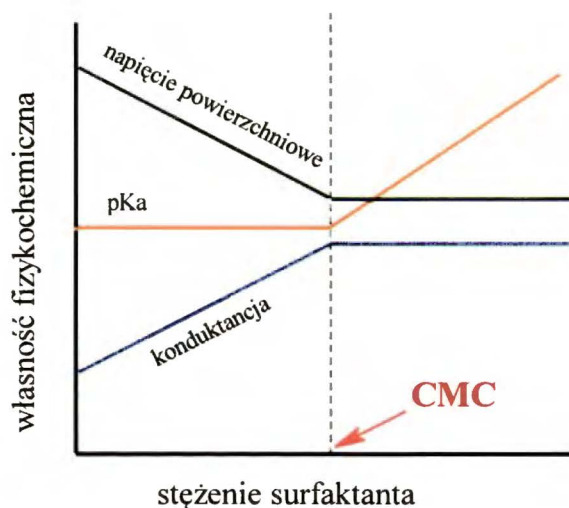


siarczan dodecyłu sodu (SDS)

Rys. 1.1 Budowa cząsteczki amfifilowej

Najbardziej korzystnym energetycznie jest stan, w którym każda z części surfaktanta znajduje się w sprzyjającym dla siebie środowisku, a to możliwe jest na granicy faz dwóch ośrodków. Kiedy powierzchnia międzyfazowa ulegnie całkowitemu nasyceniu amfifilem, cząsteczki powierzchniowo czynne wnikają do głębi roztworu i minimalizując niekorzystne oddziaływanie o charakterze hydrofobowym, organizują

się w dynamiczne układy typu micelarnego. Liczba agregacji (ang. *aggregation number*, n) określająca liczbę monomerów składających się na daną strukturę micelarną, ściśle zależy zarówno od typu surfaktanta jak też samego środowiska (m.in. natury rozpuszczalnika, temperatury, pH).



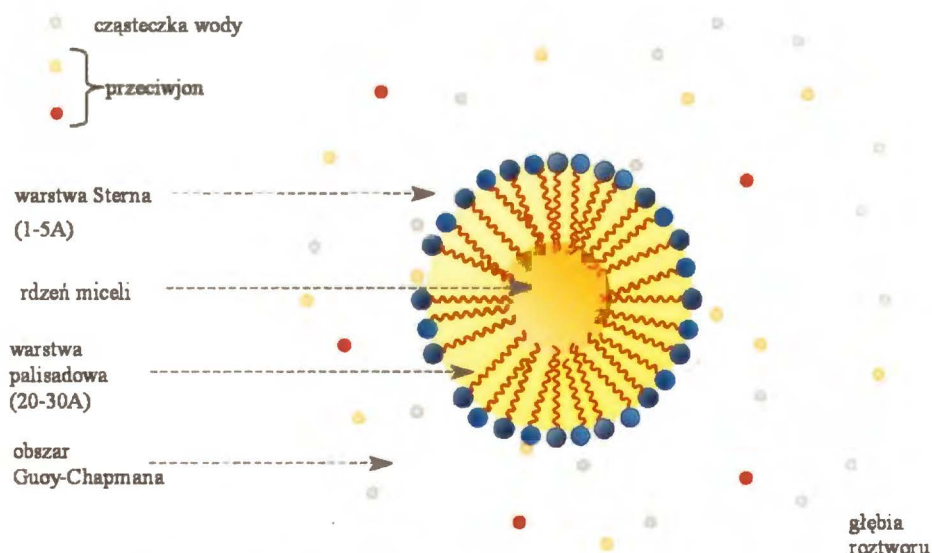
Rys. 1.2 Zależność wybranych właściwości fizykochemicznych od stężenia surfaktantu

Podstawowym pojęciem opisującym proces micelizacji jest *krytyczne stężenie micelarne* (ang. *Critical Micelle Concentration*, **CMC**) [2]. Określa ono wartość stężenia surfaktantu w roztworze, powyżej którego znajduje się on w formie zagregowanej, poniżej zaś w postaci monomerów. W celu wyznaczenia **CMC** stosuje się różne techniki eksperymentalne, między innymi pomiar napięcia powierzchniowego (ST), rozpraszanie światła (LS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) czy też pomiary fluorescencyjne. Wiadomo bowiem, że właściwości fizyczne (np. napięcie powierzchniowe, rozpuszczalność, lepkość) układu w punkcie **CMC** ulegają znaczącej zmianie. Mamy do czynienia z pewnego rodzaju nieciągłością właściwości fizycznych roztworu (Rys. 1.2). Wyżej wymienione techniki podzielić można na metody nieinwazyjne, bezpośrednio mierzące parametry fizykochemiczne układu, np. LS, NMR, jak również pośrednie, które opierają się na obserwacji innych molekuł w środowisku surfaktanta np. pomiary fluorescencji. W zależności od stosowanej techniki wartość **CMC** dla danego układu amfifila może znacząco się różnić [3, 4].

Istotną rolę w procesie agregacji odgrywa temperatura. Zbyt niska temperatura roztworu może prowadzić do zjawiska separacji faz, natomiast zbyt wysoka może powodować rozpad układu micelarnego. Ogólnie istnieje tendencja, że wraz ze wzrostem temperatury wartość CMC rośnie, a liczba agregacji maleje. Temperatura, w której rozpuszczalność monomeru jest taka sama jak układu zagregowanego, wyznacza tzw. punkt Kraffa (ang. *the Kraft Point*, T_K) [2].

1.2 Agregacja w roztworach wodnych

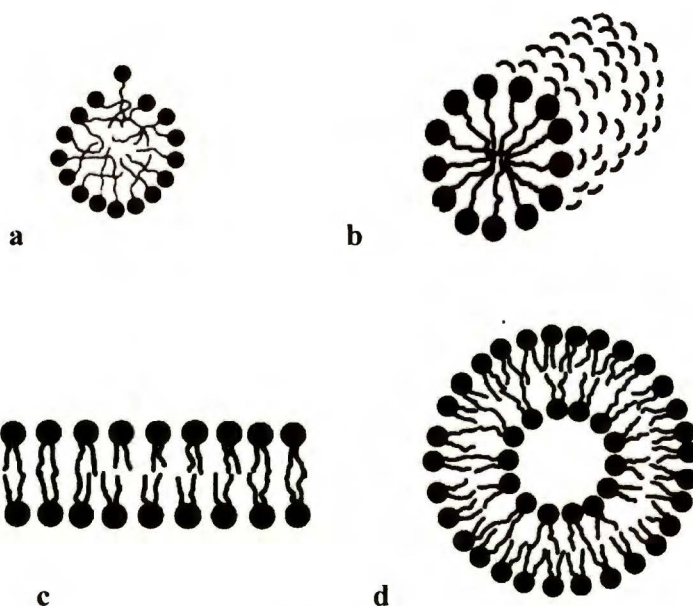
W zależności od budowy surfaktanta w roztworach tworzone są różnego rodzaju agregaty. Najlepiej poznanym typem struktur zagregowanych w roztworach wodnych są micelle. Jako układy dynamiczne zbudowane są ze zorganizowanych cząsteczek amfifilowych (monomerów), w których hydrofobowe łańcuchy skierowane są do środka miceli, tworząc lipofilowy rdzeń agregatu. Natomiast grupy hydrofilowe skierowane są na zewnątrz w kierunku otaczającej je fazy wodnej (Rys. 1.3).



Rys. 1.3 Schematyczna budowa miceli sferycznej

Biorąc pod uwagę budowę surfaktanta w roztworach wodnych tworzone są różnego typu micelle. Najprostszą i często występującą formą jest micela sferyczna o liczbie agregacji 40-100 i średnicy 5-10nm. Klasyczny model miceli sferycznej (Rys. 1.3) podany przez Hartleya [5] dobrze opisuje wiele układów surfaktantów w wodzie m.in. Brij 35, CTAB. Tak wysoce uporządkowany układ wydaje się być jednak wyidealizowany, na co wskazują badania kinetyki procesu samoorganizacji

przeprowadzone przez Mengera [6]. Niemniej jednak model Hartleya został przyjęty jako model rzeczywisty i powszechnie występuje w literaturze. W obecności silnie oddziałujących przeciwjonów w roztworze lub par jonowych surfaktantów (mieszanka kationowych i anionowych surfaktantów) micela może przybrać kształt cylindryczny. Takie wydłużone struktury może tworzyć m.in. siarczan dodecyłu sodu (SDS). Z punktu widzenia układów biologicznych ważną rolę odgrywają agregaty o strukturze lamelarniej (ang. *lamellar*) oraz pęcherzyków (ang. *vesicles*) (Rys. 1.4). Przykładem naturalnie występujących struktur lamelarnych są błony cytoplazmatyczne, których podstawowym składnikiem strukturalnym są fosfolipidy. Zamknięcie struktur lamelarnych prowadzi do powstania układów sferycznych nazywanych pęcherzykami. Do struktur samoistnie powstających z fosfolipidów tego typu należą lipoproteiny, będące naturalnymi liposomami o średnicy 20-100nm.



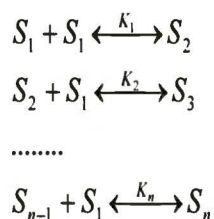
Rys. 1.4 Morfologia zagregowanych układów surfaktantów w środowisku wodnym: (a) micela sferyczna, (b) micela cylindryczna, (c) układ lamelarny, (d) pęcherzyk.

Wzrost stężenia jonowego surfaktantu w roztworach wodnych może prowadzić do zmiany morfologii miceli w kierunku struktur o wyższym uporządkowaniu: micelle sferyczne → cylindryczne → heksagonalne → lamelarne. Zjawisko to jest wynikiem spadku średniej odległości pomiędzy agregatami i tym samym wzrostem siły międzycząsteczkowego odpychania [7].

1.2.1 Termodynamika tworzenia miceli i mechanizm agregacji

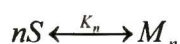
Tworzenie miceli ściśle wiąże się ze zmianami funkcji termodynamicznych układu agregującego. Agregacja jest procesem samorzutnym, dlatego też standardowa entalpia swobodna micelizacji przyjmuje wartość ujemną, $\Delta G_M^0 < 0$. Z pomiarów eksperymentalnych wiadomo również, że proces agregacji ma charakter endotermiczny ($\Delta H_M^0 > 0$), a to oznacza, że $\Delta S_M^0 > 0$. Dodatnia wartość entropii micelizacji wynika ze zjawiska określanego mianem efektu hydrofobowego. Niepolarna część surfaktantu w roztworze w istotny sposób wpływa na zmianę uporządkowania cząsteczek rozpuszczalnika w najbliższym otoczeniu. Prowadzi to do powstania luk w strukturze sieci rozpuszczalnika i spadku stopnia swobody molekuł wokół utworzonych obszarów (niska wartość entropii układu amfifil/roztwarzalnik). Samoorganizacja cząsteczek surfaktantu w układy micelarne, w których hydrofobowa część amfifila zwrócona jest do wnętrza miceli, prowadzi do zaniku luk [8]. W konsekwencji rośnie swoboda ruchu cząsteczek rozpuszczalnika, a tym samym entropia układu surfaktant/roztwarzalnik. Zjawisko przyciągania części hydrofobowych cząsteczek powierzchniowo czynnych połączone ze wzrostem entropii rozpuszczalnika nazywane jest właśnie efektem hydrofobowym [9, 10].

W literaturze proces micelizacji opisywany jest głównie za pomocą dwóch modeli: model działania mas (ang. *The Mass Action Model*) oraz model równowagi fazowej (ang. *The Pseudo-Phase Equilibrium Model*). Model działania mas nazywany również modelem asocjacyjnym [7], przyrównuje agregację do wieloetapowej reakcji chemicznej. W kolejnych etapach reakcji łączenia monomerów (S_1) tworzone są dimery (S_2), trimery (S_3), n-mery (S_n):



gdzie K_1, K_2, K_n są stałymi równowag. Jak widać teoria ta przewiduje ciągły charakter procesu, w którym wzrost stężenia surfaktantu przesuwają równowagę w kierunku tworzenia produktów, czyli układów zagregowanych. Opisany mechanizm agregacji zakłada szeroki zakres procesu, a tym samym brak jednoznacznie określonego punktu

CMC. W modelu równowagi fazowej proces micelizacji opisywany jest natomiast jako zjawisko separacji faz. Micela traktowana jest bowiem jako odrębna, ale rozpuszczalna faza w układzie rozpuszczalnika. Równowagę pomiędzy monomerami (S) i micelą (M) o liczbie agregacji n , można opisać równaniem:



w którym K_n jest stałą równowagi procesu:

$$K_n = \frac{[M_n]}{[S]^n}$$

Powyzsza równowaga ma charakter dynamiczny i znacząco wpływa na polidispersyjność układu. Powyżej krytycznego stężenia micelnego, stężenie monomerów w układzie nie zmienia się.

1.3 Agregacja w polarnych rozpuszczalnikach organicznych

Zjawisko agregacji w niewodnych polarnych rozpuszczalnikach organicznych jest niezwykle interesujące nie tylko ze względu na wartość poznawczą samego procesu czy roli, jaką pełni w nim rozpuszczalnik, ale również zastosowań technologicznych, w których obecność molekuł wody jest niepożądana.

Tab. 1.1 Porównanie wybranych własności fizykochemicznych polarnych rozpuszczalników organicznych oraz wody [11, 12].

Własność fizykochemiczna	H ₂ O	HY	FA	GLY	GE
Moment dipolowy [D]	1.84	1.85	3.37	2.56	2.31
Przenikalność względna, ϵ (25°C)	78.4	51.7	111.0	42.5	37.7
Parametr Gordona, G [J·m ⁻³]	2.75	2.10	1.70	1.52	1.25

Przyjęte oznaczenia: GE - glikol etylenowy, GLY - gliceryna, FA - formamid, HY - hydrazyna

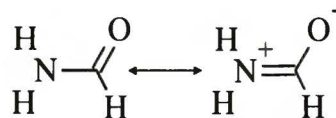
Proces micelizacji może zachodzić w polarnych rozpuszczalnikach o własnościach fizykochemicznych zbliżonych do wody. Trzy własności, z punktu widzenia rozpatrywanego procesu, wydają się być niezwykle ważne [13]: (i) możliwość tworzenia wiązań wodorowych, (ii) wysoka wartość stałej dielektrycznej oraz (iii) wysoka wartość *gęstości energii kohezji* [14], opisywanej przez parametr Gordona (G). Spośród całej gamy polarnych rozpuszczalników: glikol etylenowy, gliceryna,

hydrazyna oraz formamid, charakteryzują się parametrami najbardziej zbliżonymi się do wody (Tab. 1.1).

Z punktu widzenia pisanej pracy istotne znaczenie ma agregacja w roztworze formamidu, dlatego też zostanie ona oddzielnie omówiona.

1.3.1 Formamid

Formamid (FA) należy do klasy polarnych rozpuszczalników protycznych (Rys. 1.5). Badania NMR oraz IR dowodzą, iż w stanie ciekłym występuje w formie jonowej, w której wiązanie C-N posiada charakter wiązania podwójnego [15].



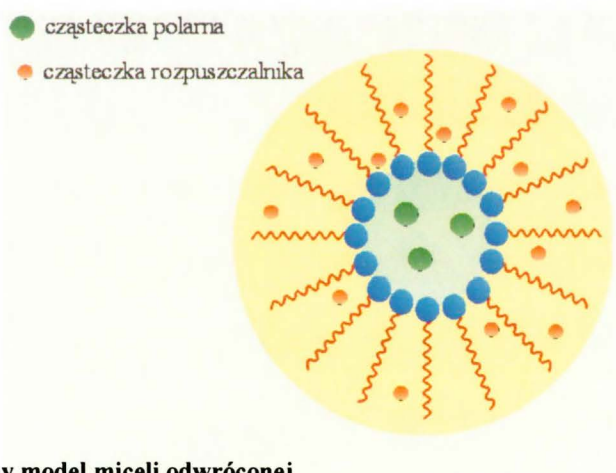
Rys. 1.5 Budowa chemiczna cząsteczki formamidu

W literaturze jest wiele informacji dotyczących agregacji zarówno jonowych jak i niejonowych surfaktantów w roztworze formamidu [15, 16, 17]. Należy on do grupy rozpuszczalników organicznych, które znajdują się w objętościowej fazie roztworu micelarnego i nie są wbudowywane w micelle. Mechanizm agregacji oparty jest na efekcie zmiany własności strukturalnych rozpuszczalnika w obszarze cząsteczek amfifila (ang. *Solvophobic Effect*) [18]. Tworzone agregaty w FA charakteryzują się niższą liczbą agregacji w porównaniu z roztworami wodnymi. Akther i Alawi [15], badając agregację soli sodowych kwasów tłuszczowych w formamidzie, wykazali, że krytyczne stężenie micelarne dla badanych układów przyjmuje wartości niższe niż dla wody. Zjawisko to tłumaczono wyższym stopniem zjonizowania amfifili w formamidzie, który charakteryzuje się wyższą wartością przenikalności względnej w stosunku do cząsteczek wody (Tab. 1.1). Powyżej stężenia krytycznego rozpuszczalność surfaktantów spadała - układ stawał się dwufazowy. Badając jednak układy złożone: woda-formamid/jonowy surfaktant, Wörnheim [13] zauważył wzrost CMC wraz ze wzrostem ułamka wagowego formamidu. Zwiększenie stężenia polarnego rozpuszczalnika zwiększało polarność układu a tym samym rozpuszczalność badanych surfaktantów rosła.

Zarówno dla układu czystego rozpuszczalnika organicznego jak i układu binarnego z wodą, obserwowano liniowy wzrost liczby agregacji ze wzrostem stężenia amfifila. Sugeruje to asocjacyjny model agregacji.

1.4 Agregacja w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych

Proces spontanicznej agregacji cząsteczek amfifilowych może zachodzić również w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych [1,19] m.in. w benzenie, toluenie, izomerach ksylenów. Jak wiadomo natura rozpuszczalnika odgrywa istotną rolę w procesie micelizacji i bezpośrednio wpływa na spontanicznie tworzone struktury miceli. W przypadku niepolarnych rozpuszczalników organicznych tworzone są układy miceli odwróconych (ang. *reverse micelles*), w których hydrofobowe łańcuchy skierowane są na zewnątrz w kierunku otaczającej je fazy niepolarnego rozpuszczalnika (Rys. 1.6). Liczba agregacji dla układów odwróconych jest znacznie niższa w porównaniu do miceli typu normalnego.



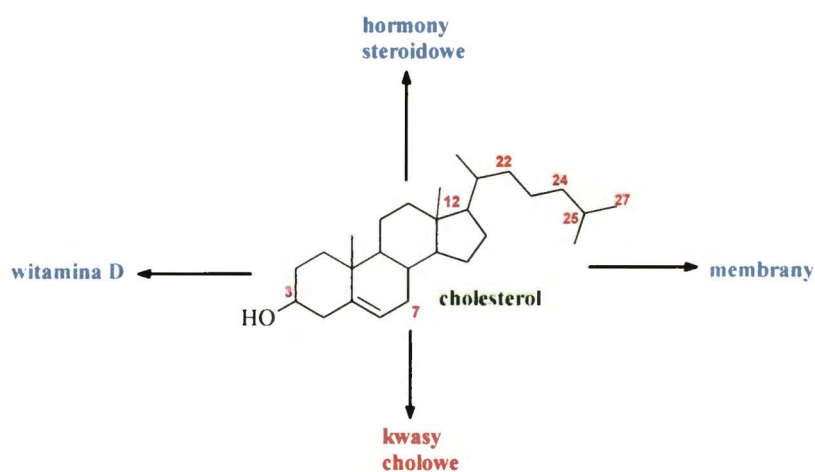
Rys. 1.6 Schematyczny model miceli odwróconej

2

SOLE SODOWE KWASÓW CHOLOWYCH

2.1 Cholany - budowa i zastosowanie

Kwasy żółciowe, nazywane również kwasami cholowymi, należą do klasy cząsteczek o istotnym znaczeniu biologicznym i medycznym. W układach biologicznych, w których znajdują się duże ilości kationów sodowych oraz potasowych, tworzą układy sprzężone w postaci soli. Sole sodowe kwasów cholowych (ang. *Bile Salts*) nazywane ogólnie **cholanami**, stanowią przykład naturalnych surfaktantów, które dzięki swojej unikalnej budowie, agregują w środowisku wodnym tworząc micelarne układy transportujące molekuly hydrofobowe.



Rys. 2.1 Produkty przemiany cząsteczki cholesterolu

2.1.1 Otrzymywanie i rola w układach biologicznych

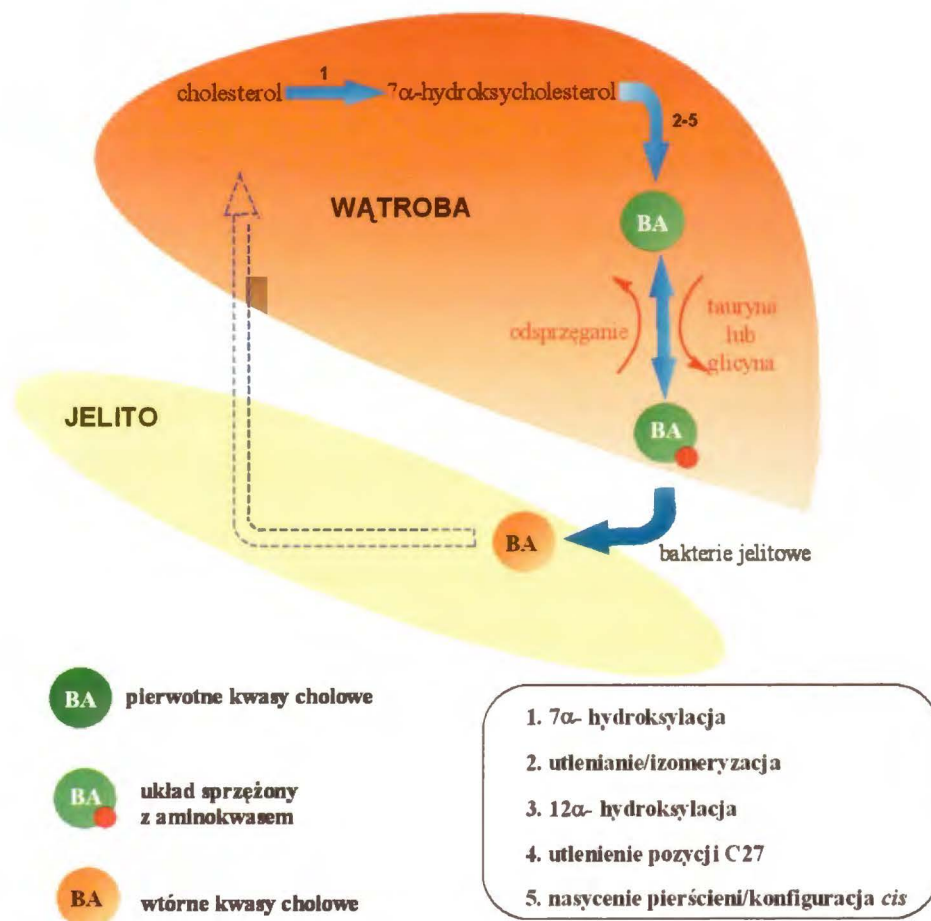
Proces biochemicznej syntezy cholanów interesował środowisko naukowe od dawna. W opublikowanej w 1943 roku pracy Konrada Blocha et.al. [20] po raz pierwszy przedstawiono biochemiczną ścieżkę syntezy cholanów, w której prekursorem reakcji była cząsteczka cholesterolu (Rys. 2.1). Na podstawie przeprowadzonych badań doświadczalnych wiadomo, że cholany powstają na drodze wieloetapowej i złożonej przemiany cholesterolu w wątrobie, regulowanej na poziomie ekspresji genów. Pierwszym etapem reakcji jest proces utlenienia prowadzący do powstania 7 α -hydroksycholesterolu. Hydroksylacja następuje na atomie węgla C7 α układu steroidowego (Rys. 2.1). Należy podkreślić, iż w cząsteczce cholesterolu w sumie jest pięć pozycji (C7 α , C22, C24, C25, C27), w których może następować enzymatyczne utlenienie, aczkolwiek pozycja C7 α jest wyraźnie preferowana [21,22]. Hydroksylacja bocznego łańcucha w pozycji C27 oraz całkowite wysycenie pierścienia prowadzi do powstania pierwotnych kwasów cholowych do których należą kwas cholowy oraz kwas chenodeoksycholowy (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Struktura wybranych kwasów cholowych

Nazwa kwasu	R ₂	R ₃	R ₄
Cholowy	OH	OH	OH
Chenodeoksycholowy	OH	H	OH
Litocholowy	H	H	OH
Deoksycholowy	H	OH	OH
Glikocholowy	OH	OH	NHCH ₂ CO ₂ H
Taurocholowy	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H

Istotnym etapem z punktu widzenia obiegu i roli biologicznej cholanów jest etap wiązania aminokwasów (tauryny lub glicyny) przez pierwotne kwasy cholowe. W wyniku sprzęgania powstają odpowiednio cząsteczki kwasu tauro- lub glikocholowego oraz tauro- lub glikochenodeoksycholowego (Tab. 2.1).

Dalsze przemiany pierwotnych kwasów cholowych (dehydroksylacja, dekoniugacja), które zachodzą w jelicie, prowadzą do powstania wtórnych kwasów takich jak kwas deoksycholowy oraz lithocholowy. Uproszczony schemat syntezy oraz obiegu kwasów przedstawiono na Rys. 2.2. W układach biologicznych syntetyzowane kwasy cholowe są magazynowane i zagęszczane w pęcherzyku żółciowym. W obecności licznych jonów zasadowych (Na^+ , K^+) tworzą formy sprzężone w postaci soli.



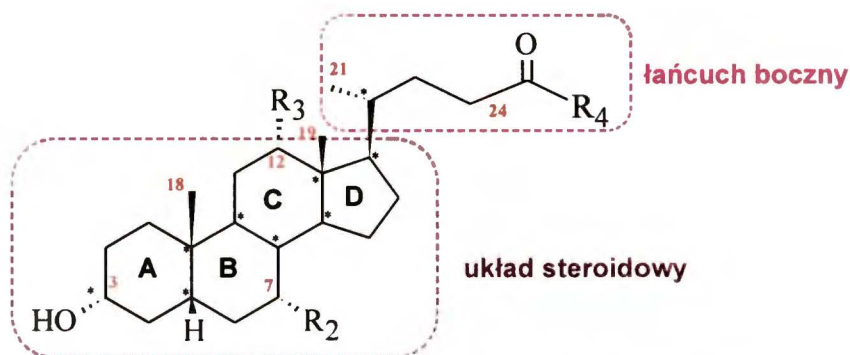
Rys. 2.2 Uproszczony schemat syntezy soli kwasów cholowych

Sole sodowe kwasów cholowych odgrywają istotną rolę w procesie przemiany i transportu tłuszczów w organizmach zwierzęcych. Działają bowiem emulgująco na tłuszcze pokarmowe, ułatwiają ich hydrolizę i wnikanie przez ściany jelita. Współuczestniczą również w procesie rozpuszczania i absorpcji ksenobiotyków oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach m.in. witaminy E. Ostatnie badania naukowe dowodzą również, że jako hormony oddziałują z receptorami (m.in. CPA, FRX,

LXR-alfa) i wpływają na ekspresję protein odgrywających istotną rolę w procesie homeostazy cholesterolu [23, 24].

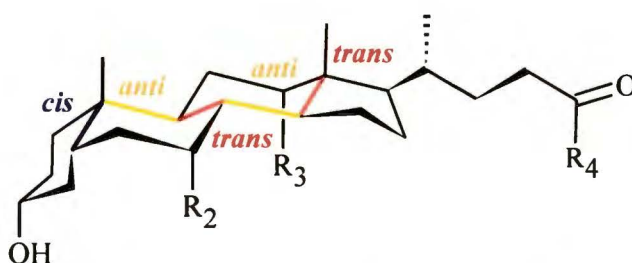
2.1.2 Budowa i właściwości fizykochemiczne cholanów

Cholany są związkami organicznymi, w których budowie wyróżnić możemy dwie podstawowe i charakterystyczne dla tej klasy związków części: sztywny układ steroidowy oraz alifatyczny łańcuch boczny (Rys. 2.3).



Rys. 2.3 Budowa kwasów cholowych z zaznaczonymi centrami asymetrii (*).

Szkielet steroidowy składa się z czterech nasyconych i sprzężonych pierścieni, w których trzy są sześciocząłowe (A, B, C) i jeden pięciocząłowy (D). Jest to typowy układ cyklopentanohydrofenantrenu.



Rys. 2.4 Schemat zespolenia pierścieni w cząsteczce cholanów: *cis- anti- trans- anti- trans*

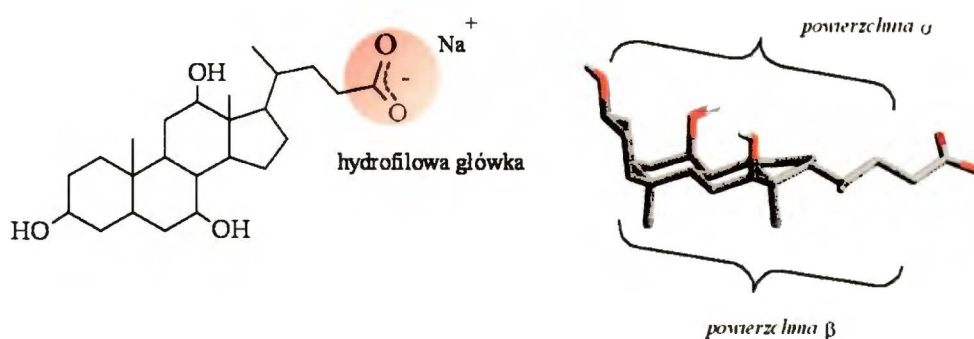
W przypadku soli kwasów cholowych pierścienie A i B są w stosunku do siebie w konformacji *cis* (5 β -stereoizomeria), natomiast B/C oraz C/D w konformacji *trans* (Rys. 2.4). Takie połączenie nadaje niepłaski kształt cząsteczce, w której węglowodorowe podstawniki (C18, C19 i C21) znajdują się na wypukłej stronie płaszczyzny molekuly (*powierzchnia* β), natomiast grupy hydroksylowe na stronie wklęsłej (*powierzchnia* α). Dzięki obecności licznych centrów asymetrii cząsteczki

cholanów należą do klasy chiralnych molekuł pochodzenia naturalnego. Na Rys. 2.3 zaznaczono asymetryczne atomy węgla. Warto podkreślić, iż w zależności od grupy R_2 oraz R_3 węgle C7 i C12 mogą również być chiralne, np. kwas cholowy zawiera aż 11 centrów chiralności, co teoretycznie umożliwia utworzenie 2048 izomerów konfiguracyjnych. Wiadomo jednak, że w przyrodzie występuje tylko jeden z wielu możliwych stereoizomerów tego kwasu.

Sole kwasów cholowych należą generalnie do grupy słabych kwasów. Dla cholanu i deoksycholanu sodu pK_a wynosi odpowiednio 6.4 i 6.58. W przypadku soli sprzężonych z cząsteczką aminokwasu pK_a przyjmuje niższą wartość, na przykład dla taurocholanu sodu wynosi 1.4. Cholany są związkami doskonale rozpuszczalnymi w wodzie jak również w polarnych rozpuszczalnikach organicznych m. in. metanolu. Nietypową, jak na tę klasę związków własnością fizykochemiczną jest możliwość tworzenia żeli w roztworach wodnych [22]. Proces żelowania zależy zarówno od pH jak i siły jonowej roztworu. Im niższe pH oraz wyższa siła jonowa roztworu, tym proces usieciowania zachodzi łatwiej. Dla cholanu, deoksycholanu i litocholanu sodu żelowanie zachodzi przy $pH < 7$, a tworzone żele mają charakter tiksotropowy.

2.2 Agregacja cholanów w roztworach wodnych

Sole kwasów cholowych należą do grupy naturalnych surfaktantów, jednak budową znacznie różnią się od klasycznych amfifili opisanych w rozdziale 1. Rolę hydrofilowej główki w tym przypadku spełnia grupa karboksylowa w alifatycznym łańcuchu bocznym, brak jest jednak jednoznacznie zdefiniowanego łańcucha hydrofobowego. W przypadku cząsteczek cholanów wyróżniamy powierzchnię hydrofobową, którą stanowi *powierzchnia* β z grupami metylowymi (C18, C19, C21) cząsteczki oraz *powierzchnię* α , hydrofilową, określoną za pomocą podstawników hydroksylowych szkieletu steroidowego [22]. Na Rys. 2.5 przedstawiono cząsteczkę cholanu sodu z zaznaczoną *powierzchnią* α i β .



Rys. 2.5 Struktura cholanu sodu z zaznaczoną stroną hydrofilową (powierzchnia α) i hydrofobową (powierzchnia β) cząsteczki.

Surfaktanty o takiej budowie należą do klasy płaszczyznowych amfifili (ang. *facial amphiphiles*). Cechuje je mniejsza liczba agregacji, co wpływa na rozmiar tworzonych miceli, który to jest mniejszy w porównaniu z klasycznymi ich odpowiednikami. Trudno jest również wskazać w sposób ścisły wartość krytycznego stężenia micelnarnego (CMC). W tym przypadku należy raczej mówić o pewnym zakresie niż pojedynczej jego wartości. Dla układów soli sodowych kwasów cholowych dwuhydroksylowych, CMC osiąga wartości poniżej 5mM¹, podczas gdy dla soli kwasów trójhydroksylowych CMC przyjmuje wartości wyższe: 10mM – 15mM (Tab. 2.2). Różnica w wartościach wynika głównie z polarności obu typów cholanów. Układy trójhydroksylowe są bardziej polarne, przez co ich rozpuszczalność w roztworach wodnych jest wyższa, a tworzone micelle są mniejsze i konformacyjnie mniej sztywne.

Liczba agregacji dla miceli cholanów mieści się w zakresie 2 - 9 i ściśle zależy zarówno od budowy surfaktantu, jak również od jego stężenia. Zaobserwowano bowiem, że dla cholanu i deoksycholanu sodu średnia liczba agregacji w roztworach o stężeniu 10mM - 50mM wynosi 2 - 5, natomiast już 20 dla stężeń ok. 100mM [25].

Tab. 2.2 Krytyczne stężenie micelarne (CMC) dla wybranych soli kwasów cholowych (25°C) [26]

Nazwa	Skrót	CMC (mM)
Cholan sodu	NaC	13 - 15
Deoksycholan sodu	NaDC	4 - 6
Taurocholan sodu	NaTC	10 - 15

¹ mM= milimolowe

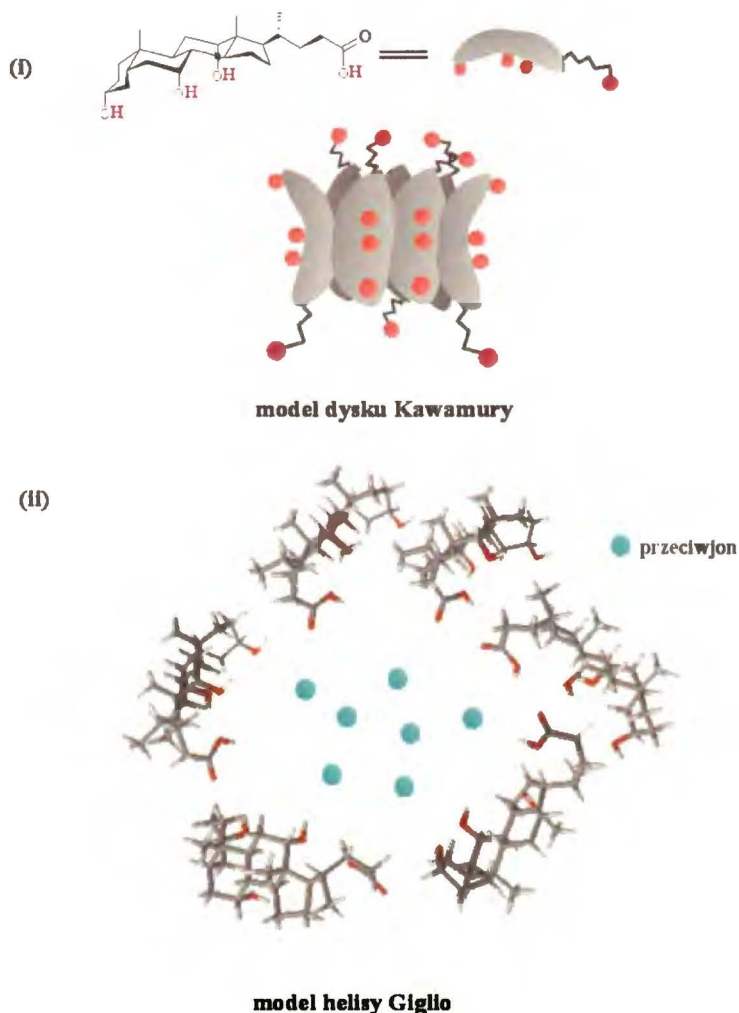
Modelowanie układów metodą LSER (ang. *Linear Solvation Energy Relationship*) wykazało, że w porównaniu z liniowym surfaktantem takim jak SDS, micelle cholanów są silniejszymi akceptorami wiązań wodorowych [27].

2.2.1 Modele struktury miceli cholanów w roztworach wodnych

Ze względu na nietypową jak na surfaktanty budowę soli kwasów cholowych oraz ich rolę w układach biologicznych, mechanizm agregacji tych związków interesował badaczy od dawna. W celu dokładnego zbadania mechanizmu agregacji zastosowano wiele metod zarówno tych bezpośrednich jak i pośrednich [28 29, 30, 31]. Badano nie tylko wpływ samej budowy chemicznej amfifila na micelizację, ale również wpływ otoczenia (pH, siła jonowa, temperatura). Na podstawie uzyskanych informacji w literaturze zaproponowane zostały trzy modele strukturalne miceli soli sodowych kwasów cholowych: (i) model dysku Kawamury, (ii) model pojedynczej helisy Giglio, (iii) model agregatów pierwszo- i drugorzędowych Careya i Smalla.

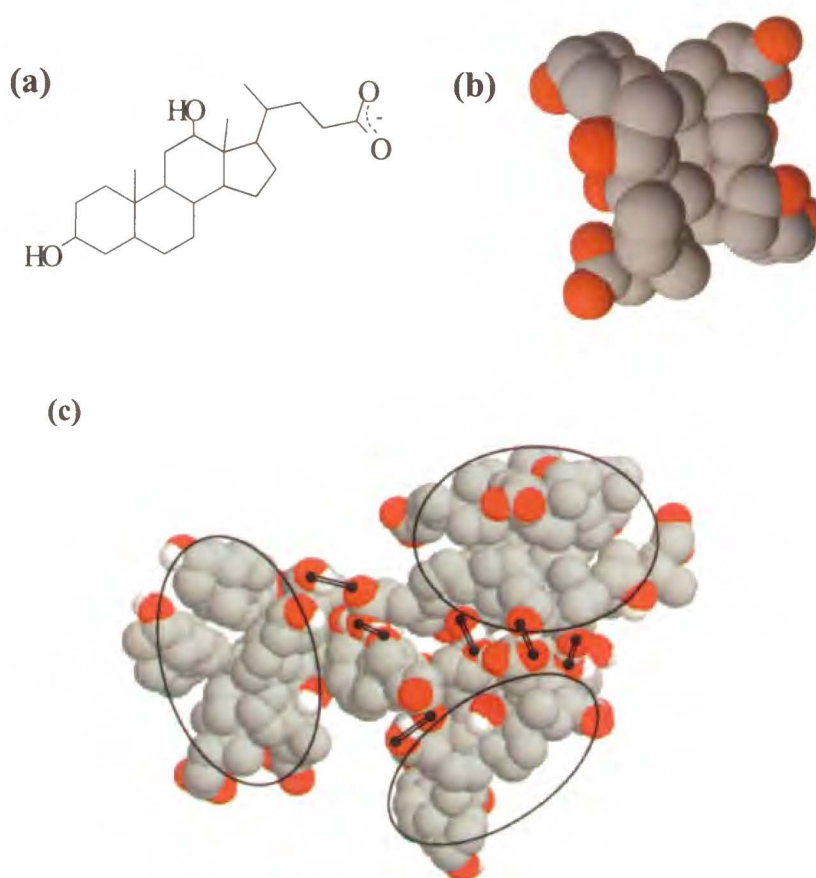
Model Kawamury [32] zakłada tworzenie pojedynczej warstwy agregujących cząsteczek zwróconych do siebie powierzchniami hydrofobowymi (Rys. 2.6 i). Powstały klaster kształtem przypomina układ dysku z grupami polarnymi zwróconymi w kierunku rozpuszczalnika (wody). Zaskakujący i jednocześnie najbardziej kontrowersyjny jest model helisy zaproponowany przez Giglio [33]. Model zakłada bowiem ekspozycję powierzchni hydrofobowych w kierunku fazy wodnej (Rys. 2.6 ii). Powstały układ przypomina strukturę miceli odwróconych, w których to rdzeń miceli jest hydrofilowy, zaś powierzchnia zewnętrzna ma charakter hydrofobowy. Badania dynamiki molekularnej agregujących układów cholanów przeprowadzone przez Warrena et al. [34], sugerują jednak, że model ten jest mało prawdopodobny. Takie ułożenie molekuł mogłoby mieć miejsce jedynie w przypadku bardzo wysokich stężeń cholanów, gdzie dochodzi do zjawiska odwrócenia faz w układzie. Według autorów artykułu idealistyczny jest również model zaproponowany przez Kawamurę. Symulacje wykazały bowiem, że cholany rzeczywiście minimalizując niekorzystny wpływ otoczenia organizują się powierzchniami hydrofobowymi do siebie, ale odległość pomiędzy sąsiadującymi molekułami wyznaczona jest przez długość łańcucha bocznego w molekule. Umożliwia to lepszą organizację molekuł rozpuszczalnika wokół

utworzonego agregatu. Zatem układ równoległe stykających się cząsteczek zaproponowany przez Kawamurę wydaje się być przypadkiem wyidealizowanym.



Rys. 2.6 Struktury miceli cholanu sodu: (i) model Kawamury, (ii) model Giglio

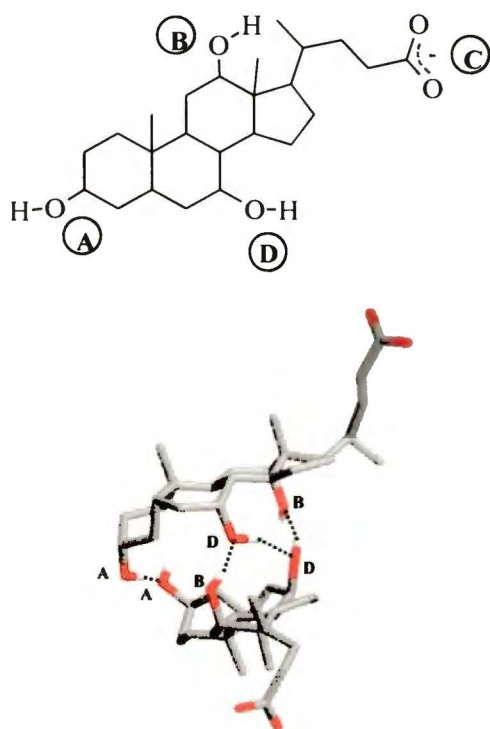
Najstarszym, ale na obecny stan wiedzy najlepiej opisującym proces micelizacji cholanów, jest model zaproponowany przez Smalla i Careya [35]. Model ten zakłada, że agregacja cząsteczek zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym dochodzi do powstania dimerów (agregaty pierwszorzędowe), w których cząsteczki ustawione są powierzchniami hydrofobowymi do siebie (oddziaływanie o charakterze hydrofobowym). Dzięki obecności grup hydroksylowych na powierzchni zewnętrznej istnieje możliwość tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy sąsiadującymi dimerami. W ten sposób dochodzi do utworzenia większych struktur drugorzędowych.



Rys. 2.7 Struktura miceli wg modelu Smalla dla cząsteczki deoksycholanu sodu (a): dimer (b), agregat drugorzędowy (c) (w kołach zaznaczono układ dimeru, zaś linią podwójną wiązanie wodorowe).

Przeprowadzone badania potwierdzają przedstawioną teorię dla cząsteczki deoksycholanu sodu [25] (Rys. 2.7). Odwrotnie przedstawia się mechanizm agregacji cholanu sodu. Obecność czterech grup hydroksylowych, sprzyja tworzeniu dimerów, ale o charakterze hydrofobowym [25]. Dwie cząsteczki cholanu połączone są bowiem wiązaniem wodorowym i tworzą symetryczny agregat pierwszorzędowy (Rys. 2.8). Ten z kolei poprzez oddziaływanie o charakterze hydrofobowym z sąsiadującymi dimerami tworzy większy agregat drugorzędowy.

Reasumując zatem, proces agregacji cholanów zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym powstają dimery, które następnie łącząc się tworzą struktury drugorzędowe. Natura tworzonych par ściśle zależy jednak od struktury molekularnej oraz właściwości amfifila i w konsekwencji określa charakter dalszego procesu micelizacji.

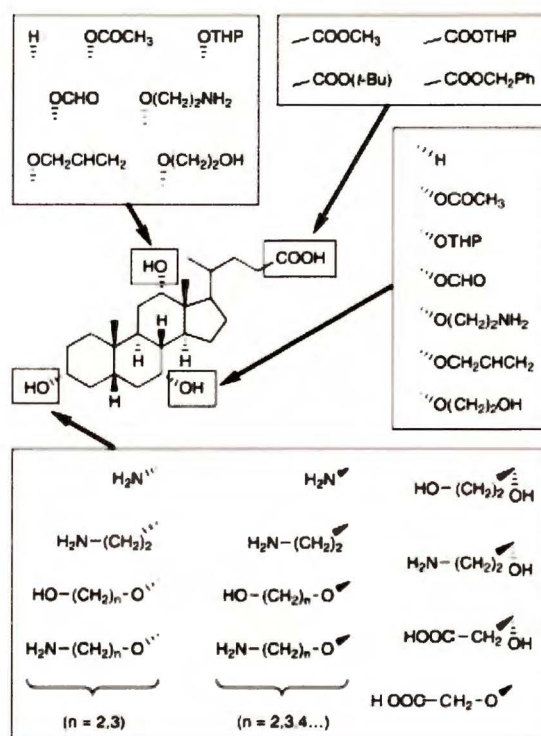


Rys. 2.8 Budowa dimeru cholanu sodu, literami zaznaczono miejsca tworzenia wiązań wodorowych w cząsteczce.

2.3 Pochodne kwasów cholowych jako cząsteczki funkcyjne

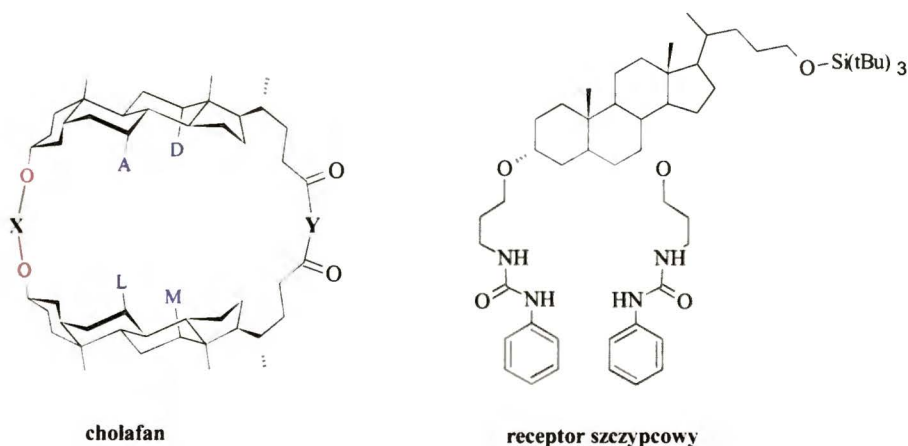
Kwasy cholowe oraz ich sole dzięki swojej unikalnej budowie i właściwościom fizykochemicznym, a przy tym stosunkowo niskiej cenie, znalazły zastosowanie jako bloki budujące dla nowych cząsteczek funkcyjnych [22, 36, 37, 38]. Ze względu na przeszkody steryczne można w łatwy i niezależny sposób modyfikować każdą grupę hydroksylową (Rys. 2.9). Łączenie nowych podjednostek może następować również poprzez łańcuch boczny szkieletu steroidowego.

Jedną z najlepiej poznanych struktur cyklicznych zsyntetyzowanych na bazie kwasów cholowych są *cholafany* [39]. Makrocykle te przeważnie zbudowane są z 2 lub 4 podjednostek steroidowych połączonych w układzie: 'głowa-głowa' lub 'głowa-ogon' (Rys. 2.10). Dzięki obecności luki makrocyklicznej związki te tworzą kompleksy inkluzyjne z mniejszymi molekułami i mogą służyć jako cząsteczki transportujące w układach biologicznych.



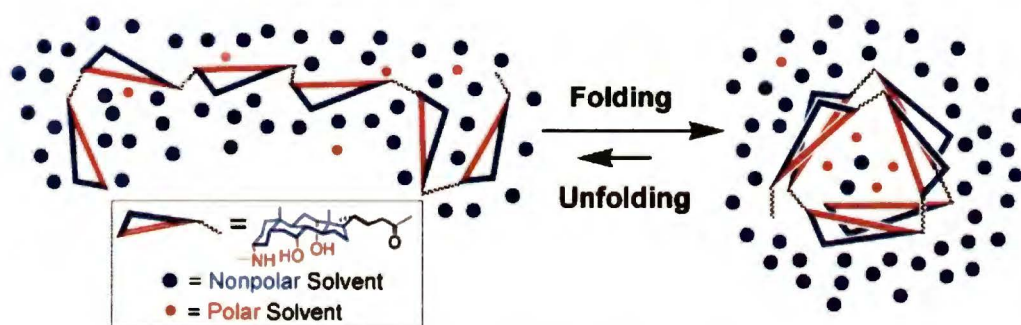
Rys. 2.9 Pochodne kwasu cholowego jako jednostki budulcowe dla sprzężonych układów funkcyjnych [38]

Zdolność rozpoznawania biomolekuł przez cholany wykorzystana również została przy projektowaniu receptorów typu kleszczowego (ang. *molecular tweezers*) [37, 38, 40]. Znalazły one już swoje komercyjne zastosowanie w terapii wirusowego zapalenia wątroby w postaci leku (*Hepaconda*) produkowanego przez firmę *Giaconda*, Australia (Rys. 2.10).



Rys. 2.10 Struktura cholafanu (A, D, L, M – grupy wiążące, X, Y- grupy łączące) oraz receptora typu szczypcowego.

Opisując cykliczne układy supramolekularne pochodnych cholanów, należy wspomnieć także o acyklicznych ich analogach. Zaprojektowane na wzór łańcuchów polipeptydowych, oligomery cholanów wykazują ciekawe właściwości w roztworach. W zależności od polarności otoczenia zmiana ulega konformacja łańcucha (Rys. 2.11). Dochodzi do procesu zwijania i tworzenia układów helikalnych. Układy takie, nazywane foldamerami [41, 42], są niezwykle interesujące zarówno z punktu widzenia poznania procesu przemiany układu jednowymiarowego w złożony układ trójwymiarowy, naśladujący proces zwijania łańcuchów peptydowych, jak również projektowania złożonych molekuł o znaczeniu biologicznym.



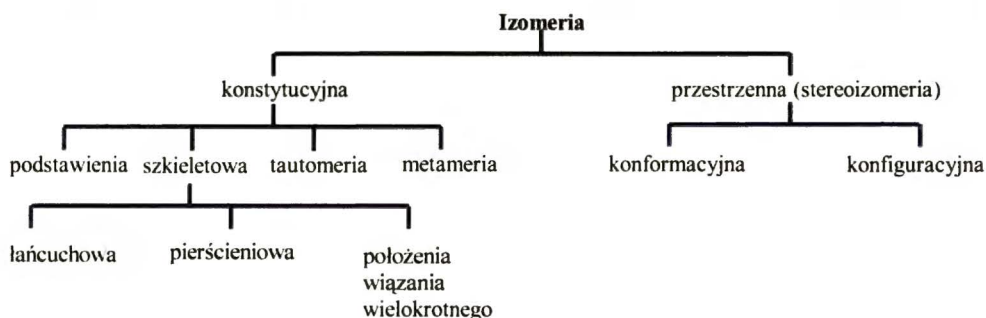
Rys. 2.11 Model zwijania heksamerów cholanu w środowisku rozpuszczalnika niepolarnego [42]

3

IZOMERIA CZĄSTECZEK – ZWIĄZKI BADANE

3.1 Izomeria

Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją, izomerią nazywamy zjawisko występowania dwóch lub więcej związków o różnej budowie oraz odmiennych właściwościach fizykochemicznych, ale takim samym składzie pierwiastkowym i masie cząsteczkowej. W zależności od przyjętych kryteriów w literaturze pojawia się kilka schematów podziału izomerii. Praca Dodziuk [43] przedstawia złożoność tematu. Problem z jednoznaczną klasyfikacją wynika przede wszystkim z faktu, że cząsteczki chemiczne nie są zbiorami sztywno połączonych punktów o zadanej masie, ale układami dynamicznymi, na które istotny wpływ ma również otoczenie cząsteczki np. molekuly rozpuszczalnika. Dlatego też sztywny podział izomerii wydaje się być tworem sztucznym, ale na potrzeby logicznego zrozumienia natury izomerii – istotnym.



Rys. 3.1 Klasyczny podział izomerii w chemii organicznej

W klasycznym, najczęściej spotykanym podziale rozróżniamy dwa główne typy izomerów: konstytucyjne i przestrzenne (Rys. 3.1). Jeżeli różnica między cząsteczkami

istnieje na poziomie schematu połączeń atomów, mamy wówczas do czynienia z izomerami konstytucyjnymi. Jeżeli natomiast różnica występuje w przestrzennym rozmieszczeniu poszczególnych atomów molekuly, wówczas mówimy o stereoisomerii i odpowiednio stereoisomerach.

3.1.1 Izomeria konstytucyjna

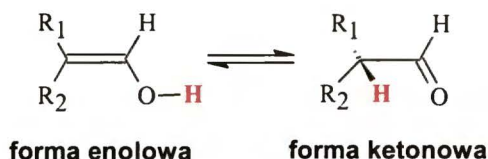
Izomerami konstytucyjnymi nazywamy molekuly, które mają identyczny skład chemiczny, ale różnią się rodzajem albo kolejnością wiązań łączących atomy w cząsteczce. Jednym z rodzajów izomerii konstytucyjnej jest *izomeria szkieletowa* [44]. Ten typ izomerii związany jest z budową szkieletu węglowego cząsteczki. I tak w przypadku układów alifatycznych, w których szkielet węglowy może występować zarówno w formie łańcucha prostego lub rozgałęzionego, jak również w formie cyklicznej, mamy odpowiednio do czynienia z izomerią łańcuchową oraz pierścieniową. Izomerami łańcuchowymi są zatem cząsteczki pentanu, 2-metylobutanu oraz 2,2-dimetylopropanu, zaś izomerami pierścieniowymi cząsteczki cyklobutanu oraz metylocyklopropanu. W szeregu nienasyconych alkanów, oprócz izomerii łańcuchowej, może występować również izomeria położenia wiązania wielokrotnego. Przykładem tego typu izomerów są cząsteczki but-1-en oraz but-2-en .

Drugim ważnym typem izomerii konstytucyjnej jest *izomeria podstawienia*, która dotyczy położenia podstawnika np. grupy hydroksylowej lub chloru w łańcuchu węglowym cząsteczki. Izomeria tego typu występuje zarówno w grupie związków alifatycznych jak i aromatycznych. Wśród licznych izomerów tego typu przykładowo wymienić można pentan-1-ol, pentan-2-ol oraz pentan-3-ol. Rozpatrując izomery konstytucyjne należy również wspomnieć o *metamerii*, czyli izomerii funkcyjnej. Wiąże się ona z występowaniem w cząsteczkach izomerów różnych grup funkcyjnych np. grupy aldehydowej oraz karbonylowej:



Metamery w związku z tak różną budową, wykazują znaczne różnice we właściwościach chemicznych.

Szczególnym przypadkiem izomerii konstytucyjnej jest *tautomeria*, polegająca na występowaniu w stanie równowagi dwóch form danego związku w skutek przemieszczenia się pojedynczego atomu w obrębie danej cząsteczki. Najbardziej rozpowszechniony rodzaj tautomerii obejmuje układy, które różnią się miejscem przyłączenia atomu wodoru. Przykładem tego typu izomerii jest tautomeria keto-enolowa:



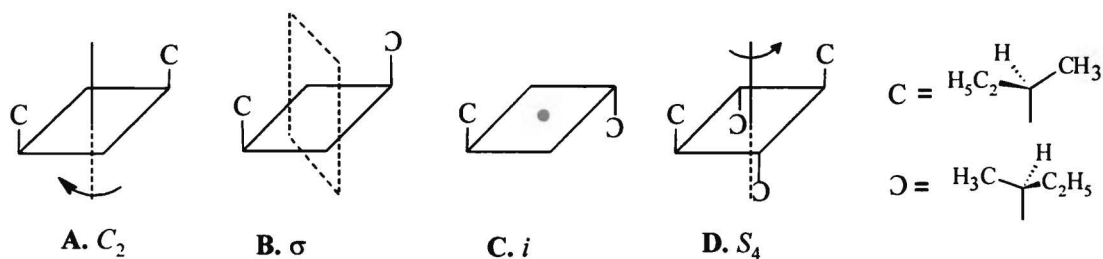
gdzie R₁ oraz R₂ są dowolnymi podstawnikami.

3.1.2 Stereoizomeria

Jak wspomniano powyżej, cząsteczki o tym samym schemacie powtórzeń atomów, ale różnej budowie przestrzennej nazywamy stereoizomerami. Różnica w budowie przestrzennej może być wynikiem wzajemnej konfiguracji orbitali elektronowych poszczególnych atomów w cząsteczce. W tym przypadku dochodzi do ukierunkowania łączących atomy wiązań chemicznych [45]. Zjawisko to nazywany *izomerią konfiguracyjną*, a cząsteczki *izomerami konfiguracyjnymi*. Konwersja pomiędzy takimi izomerami, ze względu na wysoką barierę przejścia, jest niezwykle trudna i zazwyczaj możliwa jedynie w przypadku procesu prowadzącego do zerwania wiązania chemicznego łączącego dane atomy. Kształt cząsteczki o określonej konfiguracji może również ulec zmianie na skutek rotacji podstawników wokół wiązania pojedynczego. Takie układy przestrzenne molekuł noszą nazwę *izomerów konformacyjnych*. Cząsteczka może posiadać wiele konformerów, będących w temperaturze pokojowej w stanie równowagi konformacyjnej. Wynika to z niewielkiej wartości bariery energetycznej rozdzielającej poszczególne izomery. Istotne jest również otoczenie cząsteczki (np. rozpuszczalnik), które może stabilizować jeden z izomerów.

Wyrazem osobliwości budowy przestrzennej cząsteczki jest jej symetria, którą opisujemy posługując się takimi elementami jak płaszczyzna (σ), oś symetrii (C_n), oś przemienna (S_n) i centrum symetrii (C_i) (Rys. 3.2) [46]. Zgodnie z definicją

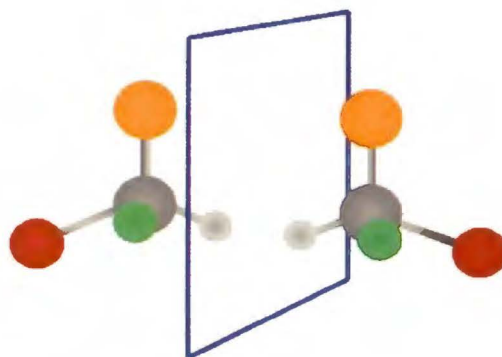
płaszczyzna symetrii dzieli dany obiekt na równe części będące w relacji lustrzanej. W przypadku n -krotnej osi symetrii (C_n) dokonuje się natomiast operacji obrotu o kąt równy $360^\circ/n$. Operacja symetrii wykonana względem osi przemiennnej (S_n) jest niczym innym jak złożeniem obrotu o kąt $360^\circ/n$ oraz odbicia w płaszczyźnie prostopadłej do osi S_n . Szczególnym przypadkiem osi przemiennnej jest oś S_2 , nazywana centrum symetrii (C_i). Operacja związana z C_i umożliwia odtworzenie cząsteczki poprzez inwersję względem punktu będącego środkiem symetrii.



Rys. 3.2 Przykłady cząsteczek z zaznaczonymi elementami symetrii. A. oś symetrii, B. płaszczyzna symetrii, C. centrum inwersji, D. oś przemienna. [46]

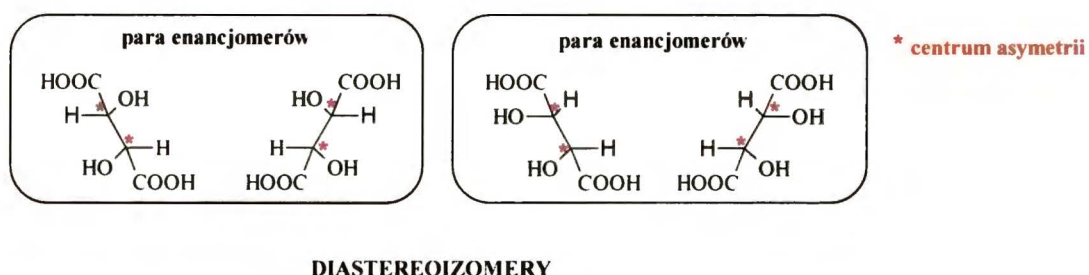
3.1.2.1 Chiralność

Z punktu widzenia symetrii wszystkie cząsteczki możemy podzielić na chiralne i achiralne [47]. Molekuła achiralna to taka, która posiada co najmniej jedną oś przemienną S_n , natomiast cząsteczka chiralna to taka, która nie daje nałożyć się na swoje odbicie lustrzane, a zatem jej jedynymi elementami symetrii są osie C_n . Stereoizomery będące względem siebie w relacji przedmiot-odbicie lustrzane nazywamy *enancjomerami*. Chiralność jest zatem koniecznym i wystarczającym warunkiem istnienia enancjomerów. W środowisku achiralnym pary enancjomerów posiadają takie same właściwości fizyczne i chemiczne. Jako cząsteczki czynne optycznie oddziałują jednak odmiennie ze światłem spolaryzowanym, skręcając płaszczyznę polaryzacji światła w prawą (+) lub w lewą (-) stronę. Również w układzie z optycznie czynnym reagentem tworzą kompleksy o niejednakowej energii potencjalnej, a tym samym różnych stałych fizykochemicznych. Własność ta wykorzystywana jest w metodach separacyjnych związków chiralnych.



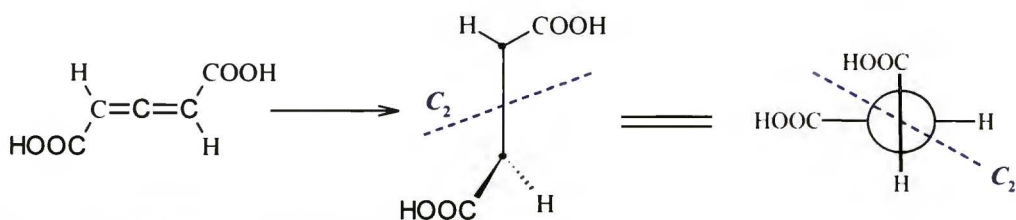
Rys. 3.3 Chiralność typu centrycznego

W zależności od geometrycznego elementu odniesienia cząsteczki chiralne mogą posiadać chiralność typu *centrycznego*, *aksjalnego*, *planarnego* lub *helisowego*. W przypadku chiralności centrycznej elementem odniesienia jest punkt definiujący centrum chiralności. Przykładem może być atom w cząsteczce, który połączony jest z czterema różnymi ligandami (Rys. 3.3). Atom taki określamy mianem asymetrycznego, gdyż jedynym jego elementem symetrii jest oś C_1 . Cząsteczki zawierające więcej niż jedno centrum asymetrii, mogą, ale nie muszą być symetryczne. W przypadku zamiany położenia tylko jednego ligandu wokół tetraedrycznego centrum asymetrii możemy otrzymać stereoizomery niebędące swoimi odbiciami lustrzanymi. Izomery takie określamy mianem *diastereoizomerów* (Rys. 3.4). Cząsteczki te wykazują różne właściwości fizyczne i chemiczne.



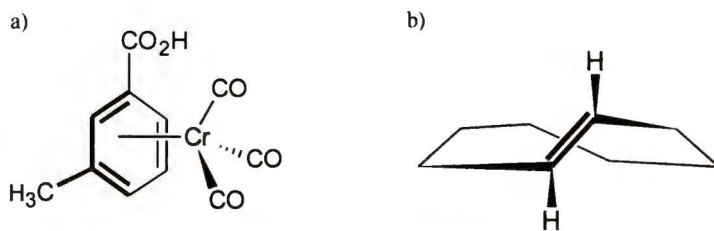
Rys. 3.4 Diastereoizomery kwasu winowego

Cząsteczki o typie chiralności centrycznej to najliczniejsza grupa wśród wszystkich molekuł chiralnych. Inną grupę stanowią molekuły o chiralności aksjalnej. W klasie tej elementem odniesienia jest hipotetyczna oś symetrii C_2 lub C_1 w zależności od typu podstawienia ligandów. Cząsteczką modelową dla tego typu chiralności jest 1,3- dwupodstawiony allen (Rys. 3.5).

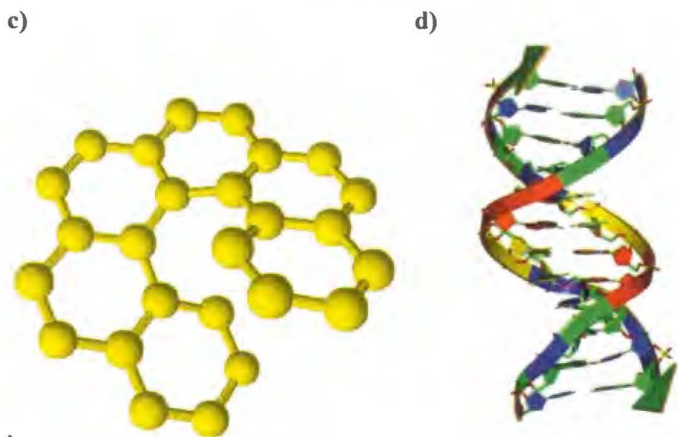


Rys. 3.5 Oś chiralna w 1,3-dwupodstawionym allenie

Obok punktu oraz osi, elementem odniesienia może być również płaszczyzna (Rys. 3.6). W tym przypadku mówimy o chiralności planarnej. Położenie punktu po jednej lub drugiej stronie płaszczyzny (prawa/lewa) tworzy bowiem odbicia lustrzane, których nie można nałożyć na siebie. Przykłady chiralności tego typu odnajdujemy wśród kompleksów związków metaloorganicznych oraz cyklicznych układów pierścieniowych z wiązaniem podwójnym np. (*E*)-cyklooktenie (Rys. 3.6a,b).



płaszczyzna chiralna



helisy

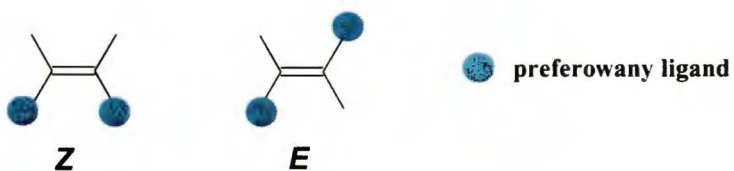
Rys. 3.6 Przykłady cząsteczek o chiralność typu planarnego i helisowego: a) kompleks metaloorganiczny, b) *E*-cyklookten, c) heksahelicen, d) podwójna helisa DNA

Ostatnią klasę stanowią helisy, które są z natury chiralne (Rys. 3.6c,d). Helisy prawoskrętnej nie da się bowiem nałożyć na helisę lewoskrętną. Chiralność tego typu odgrywa znaczącą rolę w układach biologicznych. Większość biopolimerów np. kwasy

nukleinowe, polipeptydy ma budowę naturalnych asymetrycznych helis prawoskrętnych.

3.1.2.2 Izomeria geometryczna

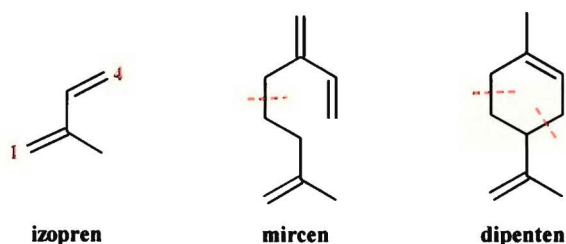
Szczególnym przypadkiem diastereoizomerów są izomery geometryczne układów z wiązaniem podwójnym. Zgodnie z przyjętą konwencją izomery te dzielimy na typu **Z**, w którym wyżej preferowane ligandy połączone z atomami przy wiązaniu podwójnym znajdują się po tej samej stronie wiązania, oraz **E**, w którym znajdują się po jego przeciwnych stronach:



W odróżnieniu od izomerów optycznych, izomery geometryczne nie wykazują różnic w skręcalności światła spolaryzowanego. Charakteryzują się one zwykle różnymi temperaturami topnienia i wrzenia. Samorzutne przekształcenie jednej formy w drugą jest praktycznie niemożliwe. Jedynie reakcja chemiczna prowadząca do zerwania wiązania łączącego dwa atomy umożliwia taka transformację.

3.2 Terpenoidy

Terpenoidy należą do związków pochodzenia naturalnego [48]. Zbudowane są z pięciowęglowych jednostek izopentylowych wywodzących się z 2-metylobuta-1,3-dieniu (izopren) (Rys. 3.7). Pięciowęglowe jednostki strukturalne (C₅) najczęściej łączą się poprzez końce 1 i 4. Pomimo podobieństwa pomiędzy strukturą izoprenu a terpenoidami, prekursorem ich syntezy jest jednak kwas mewalonowy powstały z trzech cząsteczek acetylo-koenzymu A [49].

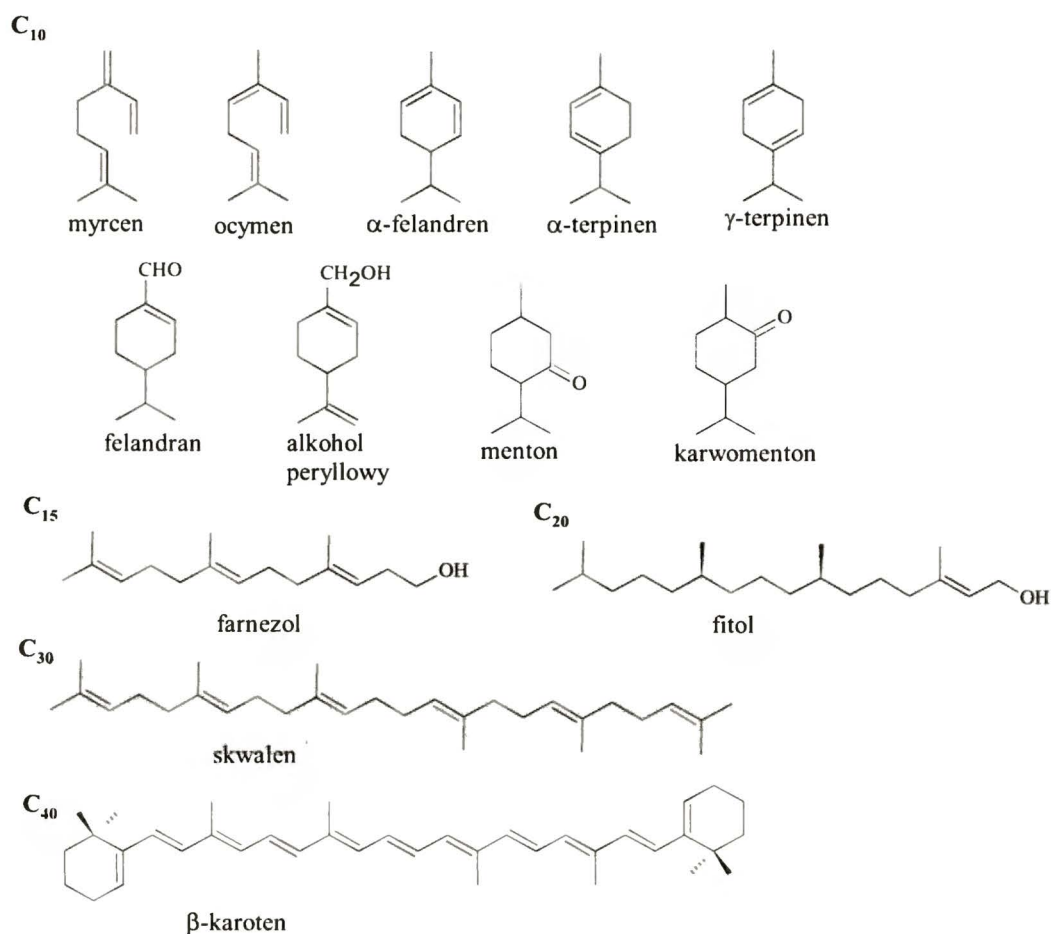


Rys. 3.7 Schemat budowy terpenoidów

Obecność wiązań podwójnych w budowie terpenoidów wpływa na ich aktywność chemiczną. Łatwo ulegają procesowi polimeryzacji, jak również reakcjom charakterystycznym dla alkenów. W przypadku układów o budowie cyklicznej, sześciowęglowy pierścień nigdy nie wykazuje charakteru aromatycznego.

Terpenoidy stanowią szeroką klasę cząsteczek. W zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce, wyróżniamy układy typu C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₃₀ oraz C₄₀ (Rys. 3.8). Najliczniejszą i najczęściej spotykaną w przyrodzie grupą terpenoidów są monoterpeny, będące dimerami izoprenu (C₁₀). Dzięki małowemu ciężarowi cząsteczkowemu należą do grupy związków lotnych, które nadają charakterystyczny zapach roślinom. Są głównymi składnikami olejków eterycznych. Monoterpeny znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym oraz kosmetycznym m.in. do wyrobu środków zapachowych. Odgrywają również znaczącą rolę jako chemiczne cząsteczki sygnałowe umożliwiające porozumiewanie międzysobnicze [50].

Spośród pozostałych terpenoidów na szczególną uwagę zasługuje skwalen (C₃₀), który jest produktem wyjściowym w biosyntezie steroli, oraz karotenoidy (C₄₀) będące naturalnymi barwnikami roślinnymi występującymi w komórkach roślinnych w stężeniu znacznie mniejszym niż chlorofil [51].



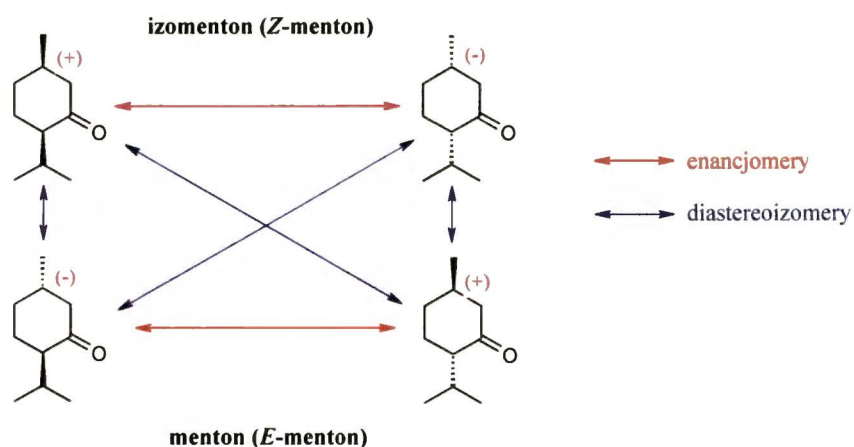
Rys. 3.8 Budowa chemiczna wybranych terpenoidów

3.2.1 Izomeria terpenoidów

Różnorodność budowy układów terpenoidowych, jak również różnorodność grup funkcyjnych obecnych w cząsteczkach, wpływa na bogactwo struktur izomerycznych w tej klasie związków. Wśród naturalnie występujących terpenoidów widoczne są niemal wszystkie typy izomerów konstytucyjnych. *Myrcen* (β -*myrcen*), obecny m.in. w olejku chmielowym oraz rumiankowym, oraz *ocymen*, występujący w olejku eterycznym ziela bazylii, to przykłady izomerów łańcuchowych. Izomerami szkieletowymi są również cząsteczki α -*felandrenu*, α -*terpinenu* oraz γ -*terpinenu*, które różnią się między sobą położeniem wiązania podwójnego w pierścieniu sześciocząłowym. Biorąc natomiast pod uwagę położenie podstawnika w pierścieniu, izomerami podstawienia są cząsteczki *mentonu*, otrzymywany z olejku sosnowego, i *karwomentonu*, obecny w olejku karamboli. Z kolei *felandran*, główny składnik olejku

koprowego, oraz *alkohol perryłowy*, jeden ze składników olejku lawendowego, to przykłady metamerów. Wzory strukturalne wyżej wymienionych terpenoidów przedstawiono na Rys. 3.8.

Różnica w budowie przestrzennej terpenoidów jest niezwykle istotna z punktu widzenia układów biologicznych. Monoterpeny należą do klasy związków o chiralności centrycznej i w porównaniu z innymi związkami pochodzenia naturalnego (np. aminokwasy, węglowodany) wykazują dużą większą różnorodność konfiguracyjną. Formy enancjomeryczne (+) i (-) są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin, a ich wzajemne proporcje mogą znacznie różnić się w zależności od gatunku i pochodzenia rośliny [52]. I tak na przykład (+)-*limonen* jest głównym składnikiem olejków eterycznych owoców cytrusowych, podczas gdy izomer (-) występuje w oleju sosnowym i jodłowym. Podobnie jest w przypadku (+)-*mentonu* oraz (-)-*izomentonu*. Związki te są podstawowymi składnikami olejków otrzymanych z różnych odmian mięty, zaś ich antypody optyczne obecne są w oleju z geranium. Wspomniany powyżej *menton* i *izomenton* (*Z-menton*) to przykłady diastereoizomerów. Obecność dwóch centrów chiralnych w strukturze cząsteczki mentonu, prowadzi do powstania czterech par diastereoizomerów (Rys. 3.9). Ciekawiej jeszcze przedstawia się przypadek zredukowanych pochodnych tych związków. W wyniku redukcji grupy karbonylowej do grupy hydroksylowej powstają w sumie trzy centra chiralności, a zatem obecnych jest aż 8 stereoisomerów *mentolu*.



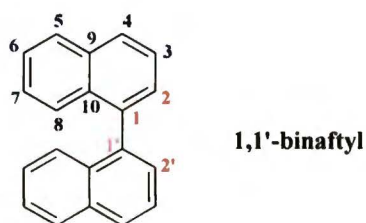
Rys. 3.9 Stereoizomeria cząsteczki mentonu

Izomery terpenoidów odgrywają znaczącą rolę jako substancje obronne zwierząt. Monoterpeny takie jak (+/-)-*citronellal*, (+/-)-*citral* czy (+/-)- α -*pinen*, (+/-)-*limonen*

działają jako niespecyficzne toksyny u wielu owadów [50]. Wzajemny stosunek enacjomeryczny w istotny sposób wpływa na efektywność odstraszania napastnika [53]. Enancjomery monoterpenu odgrywają również istotną rolę jako feromony. Na skutek różnego oddziaływania z chiralną cząsteczką receptora, dany enancjomer może wywołać oczekiwaną reakcję międzysobniczą. Przykładem może być cząsteczka (-)-terpinen-4-ol (>99%), która jest feromonem kornika [54]. Racemiczny terpinen-4-ol nie działa natomiast jako atraktant insektów.

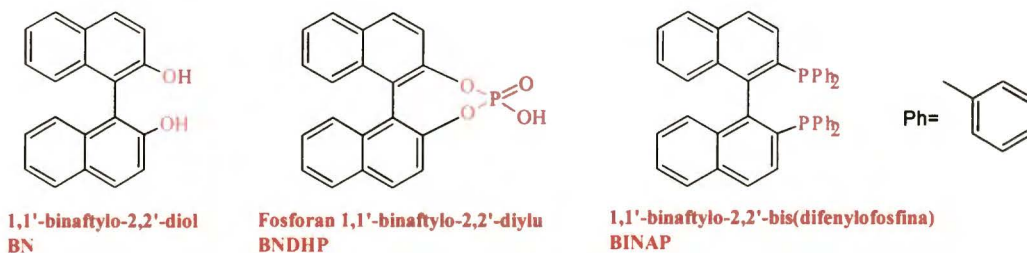
3.3 Binafityle

Binafityle (1,1'-binafityle) należą do klasy związków otrzymywanych drogą syntetyczną. Pod względem strukturalnym zbudowane są z dwóch grup naftylowych połączonych pojedynczym wiązaniem typu C-C (1 – 1'), wokół którego może następować swobodna rotacja (Rys. 3.10).



Rys. 3.10 Struktura chemiczna binafitylu

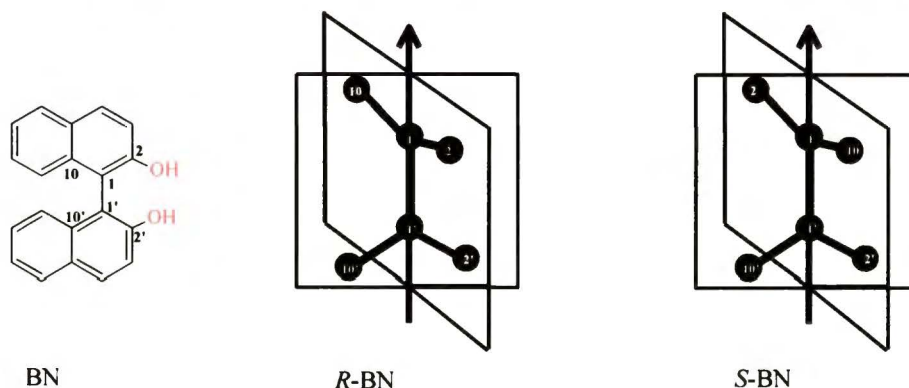
Modyfikacja grupami funkcyjnymi pierścieni naftylowych w pozycjach 2 i 2', prowadzi do powstania cząsteczek (m.in. BN, BINAP Rys. 3.11) o dużym znaczeniu syntetycznym. Są one bowiem molekułami wyjściowymi w katalizie asymetrycznej, prowadzącej do otrzymania czystych enancjomerycznie związków o znaczeniu biologicznym oraz chiralnych sensorów [55, 56, 57].



Rys. 3.11 Przykłady binafityli

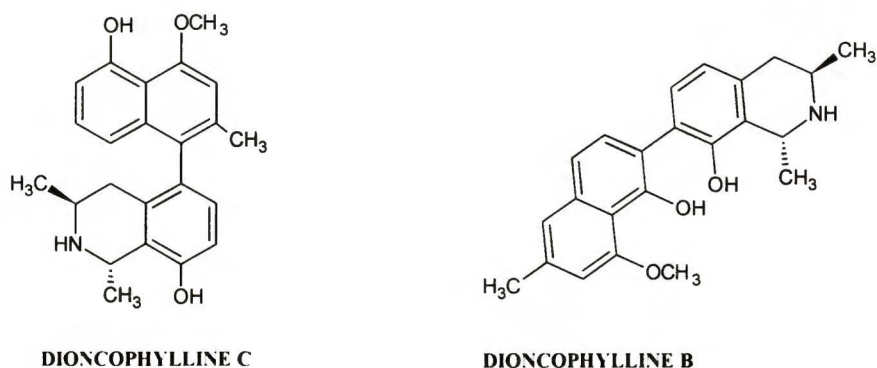
3.3.1 Izomeria pochodnych 1,1'-binaftyli

Pochodne 1,1'-binaftyli podstawione w pozycjach 2 i 2', podobnie jak alleny, należą do grupy chiralnych molekuł typu aksjalnego. Zahamowana rotacja wokół wiązania pojedynczego 1-1', będąca efektem zatłoczenia sterycznego, prowadzi do powstania chiralnych konformerów określanych mianem atropoizomerów. Bariera energetyczna przejścia konformacyjnego wynosi od 23.8 kcal/mol dla 1,1'-binaftyli do ponad 46 kcal/mol dla cząsteczki 2,2'-dijodo-1,1'-binaftyli [56]. Enancjomery 2,2'-podstawionych pochodnych 1,1'-binaftyli są zatem dość trwałe i mogą istnieć jako odrębne indywidua chemiczne nawet w wysokich temperaturach. Pod względem energetycznym uprzywilejowana jest ortogonalna orientacja przestrzenna obydwu pierścieni naftyłowych. Jedną z najważniejszych cząsteczek tej klasy jest 1,1'-binaftylo-2,2'-diol (Rys. 3.11). Szkielet węglowy tego związku można w przystępny sposób modyfikować otrzymując sfunkcjonalizowane pochodne takie jak np. fosforan 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu [58] (Rys. 3.11). Na Rys. 3.12 przedstawiono atropoizomery BN.



Rys. 3.12 Schemat budowy atropoizomerów 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BINOL)

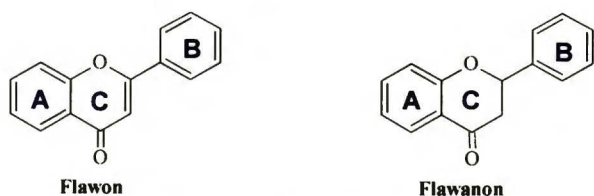
Chiralne połączenia szeregu biaryli spotyka się wśród produktów naturalnych [59]. Na przykład alkaloidy z grupy naftyloizochinoliny, izolowane m.in. z rośliny *Triphyophyllum peltatum* zawierają ten właśnie element strukturalny (Rys. 3.13). Warto dodać, że związki te oprócz chiralności typu aksjalnego posiadają również dodatkowe centra stereogeniczne i wykazują bardzo ciekawe właściwości terapeutyczne [59, 60].



Rys. 3.13 Struktura naturalnych naftyloizochinolin

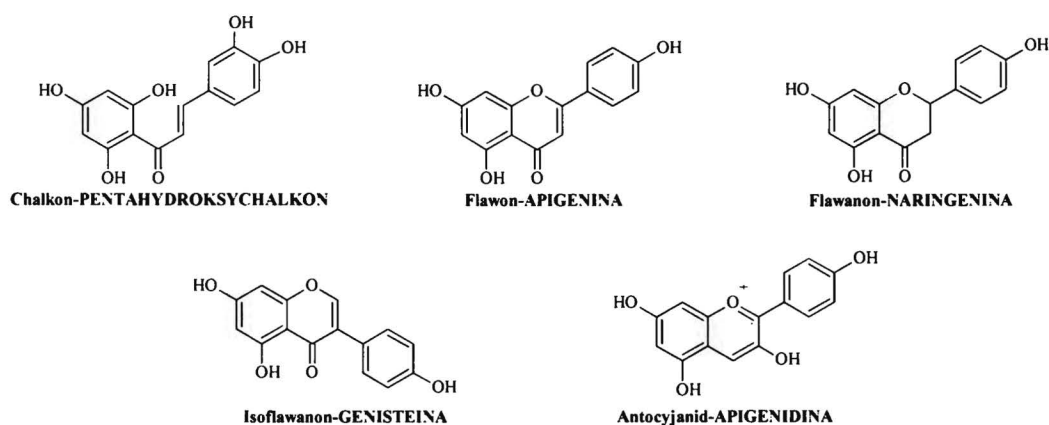
3.4 Flawonoidy

Flawonoidy [61] stanowią jedną z największych klas związków pochodzenia naturalnego. Obecnie wyizolowano i zidentyfikowano ponad 4000 związków należących do tej grupy [62]. Głównym źródłem pochodzenia są owoce w szczególności owoce cytrusowe [63], a także warzywa oraz płatki zbożowe [64]. Pod względem strukturalnym są one pochodnymi układów polifenolowych o niskich masach cząsteczkowych. Szkielet cząsteczki flawonoidu składa się dwóch pierścieni aromatycznych (A i B) połączonych za pomocą cząsteczki pironu (układ flawonu) lub dihydropironu (układ flawanonu) (Rys. 3.15). Ogólnie schemat takiej molekuly można przedstawić jako układ typu $C_6 - C_3 - C_6$.



Rys. 3.14 Układ flawonu i flawanonu

W zależności od chemicznej struktury pierścienia C wyróżnić możemy m.in. następujące grupy flawonoidów: chalkony, flawony, flawanony, izoflawanony, antocyjanidy (Rys. 3.15). Należy jednak podkreślić, że w obrębie każdej z nich wymienić można dodatkowe podgrupy np. pod względem strukturalnym katechiny są pochodnymi flawanonów (3-hydroksyflawanony).

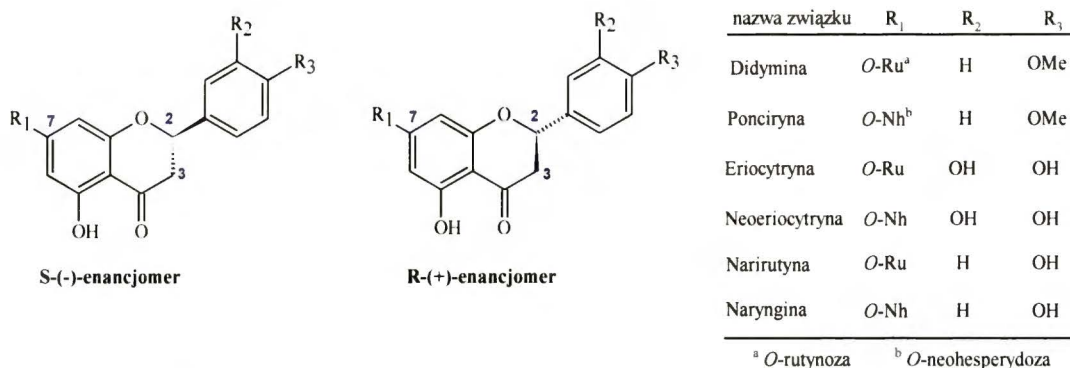


Rys. 3.15 Przykłady flawonoidów

Flawonoidy należą do grupy aromatycznych metabolitów wtórnych, które odgrywają istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych [65, 66, 67] jak i farmakologicznych [68, 69, 70]. Flawonoidy wykazują silne właściwości przeciwutleniające. Wynika to zarówno ze zdolności chelatowania jonów żelaza, jak również zdolności hamowania aktywności enzymów z grupy oksygenaz. Ponadto wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne [63]. Dzięki hamowaniu aktywności enzymów proteolitycznych m.in. elastazy, wzmacniają i uszczelniają tkankę łączną w śródbłonku naczyń krwionośnych. Pozytywne efekty działania na organizm zwierzęcy są niezwykle duże i nie sposób je wszystkie opisać. Warto podkreślić, że dzięki nim właśnie zainteresowanie tą klasą związków nie słabnie, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji.

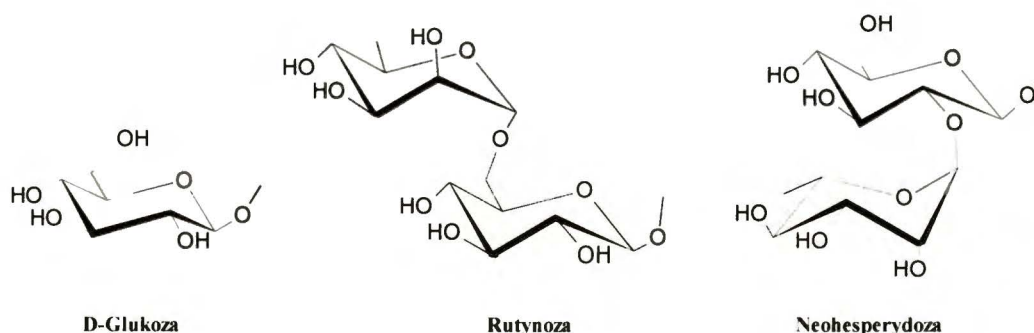
3.4.1 Izomeria flawanonów

Flawanony charakteryzuje bardzo ciekawa budowa chemiczna. W porównaniu do flawononów posiadają bowiem chiralny atom węgla w pozycji C2 szkieletu węglowego, co sprawia, że występują w dwóch formach enancjomerycznych (Rys. 3.16). W przypadku 3-hydroksyflawanonów asymetryczny atom węgla znajduje się dodatkowo na węglu C3. Flawanony, które obecne są w owocach cytrusowych, występują najczęściej jako pochodne *O*-glikozydowe. Ze względu na lipofilowy charakter, a tym samym słabą rozpuszczalność w wodzie, wolny aglikon (związek bez cząsteczki cukru) występuje znacznie rzadziej.



Rys. 3.16 Budowa chemiczna wybranych chiralnych flawanonów

O-glikozydy flawanonów zbudowane są z pochodnych D-(+)-glukozy, głównie rutynozy lub neohesperydozy (Rys. 3.17), połączonych poprzez hydroksylową grupę C7 aglikonu [62,63]. Pomimo takiej budowy stereogenicznej, związki te posiadają przeciwną konfigurację tylko na jednym z dwóch centrów chiralności, a mianowicie atomie C2. Należą zatem do grupy diastereoizomerów określanych mianem epimerów.



Rys. 3.17 Pochodne D-glukozy

Naturalnie syntetyzowane flawanony występują w jednej formie stereoizomerycznej, w której to chiralny atom C2 posiada konfigurację *S*. W zależności od warunków środowiska (m.in. pH, temperatura, rozpuszczalnik) Miles i Main [71] zauważyli, że niektóre pochodne glikozydowe flawanonów mogą być stereochemicznie niestabilne. W sprzyjających warunkach może dojść do procesu epimeryzacji, czyli konwersji konfiguracji na pojedynczym centrum stereogenicznym (*S*→*R*). Przeprowadzone badania pokazały, że proces ten zachodzi dużo łatwiej dla flawanonów posiadających grupę hydroksylową w pozycji R₃ aglikonu. Wartość bariery aktywacji procesu epimeryzacji wyznaczonej przez Shuriga et al.[72] dla narynginy wynosi 20.7 kcal/mol

(298K), zaś dla neohesperydyny ($R_2=OH$, $R_3=OMe$) 23.2 kcal/mol. Również badania wykonane przez Asztemborską i Żukowskiego podają obliczone wartości energii aktywacji dla wybranych epimerów flawonoidów [73].

Pomimo, że glikozydy flawanonów występują w formie diastereoizomerów, różnice energii potencjalnej pomiędzy izomerami są jednak niewielkie. Galensa wraz ze współpracownikami [74, 75, 76] badając separację tych związków, postawił tezę, w której zasugerował, że rozdzielania form diastereoizomerycznych glikozydów flawanonów jest niemożliwe w środowisku achiralnym. Jedynie tworzony kompleks z optycznie czynnym reagentem może umożliwić diastereoseparację tych związków. Zgodnie z wiedzą autora niniejszej rozprawy, pomimo dużego zainteresowania oraz rosnącej liczby publikacji w temacie, powyższa teza nadal jest prawdziwa.

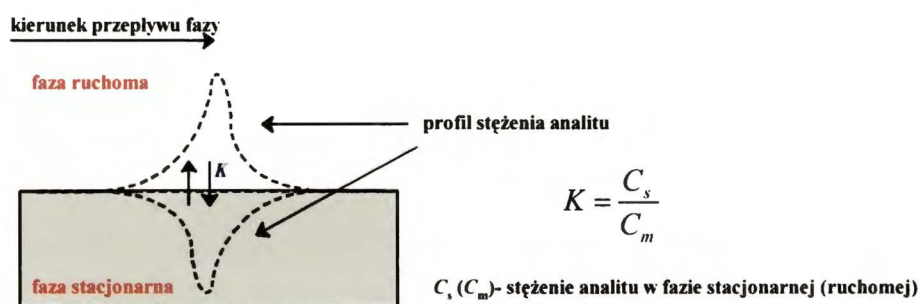
SURFAKTANTY W TECHNIKACH ROZDZIELCZYCH

Pod pojęciem technik rozdzielczych należy rozumieć grupę technik separacyjnych umożliwiających rozdzielanie mieszanin wieloskładnikowych. Rozdzielania następuje na skutek wzajemnej konkurencji co najmniej dwóch sił, z których jedna powoduje ruch cząsteczek substancji rozdzielanej w określonym kierunku, druga natomiast go hamuje. Wzajemne zróżnicowanie wartości ich oddziaływania na dany składnik mieszaniny jest warunkiem koniecznym procesu rozdzielania. W zależności od natury procesu, analityczne techniki rozdzielcze można podzielić na trzy główne grupy. Pierwszą stanowią techniki chromatograficzne, w których podstawą procesu rozdzielania jest wzajemna konkurencja dwóch niemieszających się faz: stacjonarnej i ruchomej, w stosunku do rozdzielanego analitu. Druga grupa technik rozdzielczych oparta jest na metodach elektroforetycznych, które wykorzystują zjawisko ruchu cząsteczek naładowanych w polu elektrycznym. W zależności od wartości przyłożonego pola elektrycznego oraz wielkości ładunku związku rozdzielanego, następuje zróżnicowanie prędkości migracji molekuł. Trzecią grupę stanowią techniki ekstrakcyjne, w których wykorzystuje się różną rozpuszczalność substancji w niemieszających się ze sobą rozpuszczalnikach. Zarówno techniki elektroforetyczne jak i chromatograficzne należą do grupy technik analitycznych charakteryzujących się wysokim potencjałem rozdzielczym. Krótki czas analizy, niewielkie zużycie próbki, wysoka efektywność i dokładność przeprowadzanych analiz to tylko niektóre ich zalety.

Ze względu na temat prezentowanej rozprawy doktorskiej poniżej przedstawiono zwięzły opis nomenklatury oraz podstaw teoretycznych stosowanych analitycznych technik rozdzielczych [77, 78, 79, 80, 81, 82, 83].

4.1 Techniki Chromatograficzne

Chromatografia jest fizykochemiczną metodą rozdzielania, w której rozdzielane składniki ulegają podziałowi między dwie fazy: fazę nieruchomą (stacjonarną), którą stanowi odpowiednio przygotowane złożo, oraz fazę ruchomą poruszającą się w określonym kierunku [77]. Rozdzielania wynika z różnych wartości stałych podziału (K) dla separowanych substancji (Rys. 4.1). Im większe powinowactwo analitu do fazy stacjonarnej, tym mniejsza jego prędkość przepływu. Różnica prędkości eluowanych związków determinuje rozdzielanie substancji w mieszaninie.



Rys. 4.1 Schemat procesu rozdzielania w technikach chromatograficznych

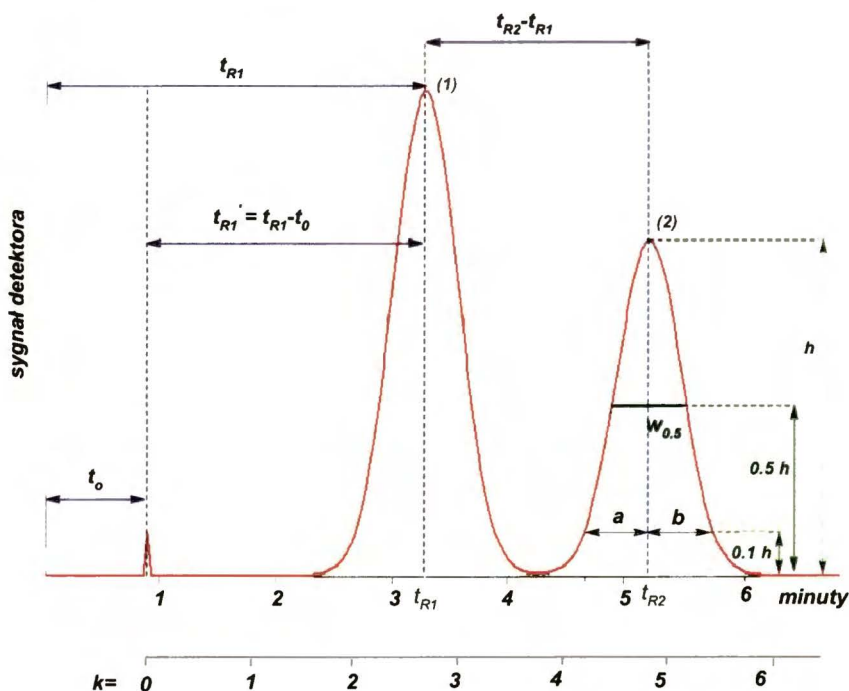
Podstawą podziału metod chromatograficznych jest przede wszystkim stan skupienia fazy ruchomej oraz fazy stacjonarnej. Do najbardziej rozpowszechnionych technik chromatograficznych należą chromatografia gazowa oraz chromatografia cieczowa, w których odpowiednio fazą ruchomą jest gaz oraz ciecz. Fazą stacjonarną może być zarówno ciecz osadzona na nośniku lub ciało stałe o różnym charakterze np. wymiennicz jonowy, sita molekularne. Charakter fazy nieruchomej w istotny sposób wpływa na naturę zjawisk będących podstawą procesu rozdzielania i stanowi kryterium klasyfikacji metod chromatograficznych w zależności od mechanizmu separacji (chromatografia adsorpcyjna, podziałowa, jonowymienna)

Analizy chromatograficzne wykonuje się przy użyciu chromatografów, w których budowie wyróżnić można trzy główne elementy: miejsce nastrzyku próbki (dozownik), kolumnę, na której następuje właściwy proces rozdzielania oraz detektor. Dobór kolumny chromatograficznej oraz rodzaju detekcji w istotny sposób zależą od natury chemicznej analitu. Pojemność dozownika determinowana jest z kolei pojemnością sorpcyjną kolumny. Szczegółowy opis aparatury chromatograficznej można odnaleźć w monografiach [79,81,82].

Sprawność rozdzielania mieszaniny wieloskładnikowej zależy od wielu czynników m.in. wyboru fazy stacjonarnej, temperatury analizy, szybkości przepływu, długości kolumny. Najbardziej istotnym wydaje się być jednak właściwy dobór fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Bogactwo struktur chemicznych analitów narzuca ciągłą potrzebę poszerzania spektrum istniejących już faz, zwłaszcza w obszarze umożliwiającym rozdzielania chiralne. Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia wielu gałęzi przemysłu m.in. farmaceutycznego, dla którego dbałość o czystość enancjomeryczną jest niezwykle istotna. Nie bez znaczenia są również koszty przeprowadzanych analiz i aspekty środowiskowe. Rozwój metod chromatograficznych dąży w kierunku minimalizacji kosztów, przy osiągnięciu jak największych sprawności układów rozdzielczych.

4.1.1 Podstawowe pojęcia technik chromatograficznych

Do opisu procesu rozdzielania, jak również opisu sprawności i rozdzielczości układu w technikach chromatograficznych służą parametry retencyjne.



Rys. 4.2 Chromatogram kolumnowy mieszaniny dwuskładnikowej: t_R –całkowity czas retencji, t_R' –zredukowany czas retencji, t_0 – czas retencji substancji niezatrzymywanej, h –wysokość piku, $w_{0.5}$ –szerokość w połowie piku, k –współczynnik retencji; indeks dolny 1 odnosi się do pierwszego eluowanego składnika.

Fundamentalnym parametrem chromatograficznym jest *czas retencji* (t_R). Jest to czas jaki upłynął od momentu wstrzyknięcia próbki do osiągnięcia maksymalnego stężenia wymywanego składnika w detektorze (Rys. 4.2). Jest to zatem całkowity czas przebywania składnika w procesie chromatograficznym. Z punktu widzenia oddziaływania substancji z fazą stacjonarną istotny jest *zredukowany czas retencji* (t'_R). Odpowiada on różnicy pomiędzy całkowitym czasem retencji analizowanej substancji a czasem elucji substancji nie zatrzymywanej przez fazę stacjonarną, t_o (ang. *hold-up time*). Zredukowany czas retencji jest proporcjonalny do wartości stałej podziału K i jest charakterystyczny dla danej substancji.

Ważnym parametrem retencji jest *współczynnik retencji* (k), który jest miarą czasu w jakim dany składnik próbki przebywa w fazie stacjonarnej, w stosunku do czasu przebywania w fazie ruchomej. Matematycznie zdefiniować go można równaniem:

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o} = \frac{t'_R}{t_o} \quad \text{Równ. 4.1}$$

W przypadku gdy stała podziału K jest niezależna od stężenia składnika próbki, *współczynnik retencji* (k) równy będzie stosunkowi liczby moli składnika w fazie stacjonarnej (n_s) i ruchomej (n_m), w stanie równowagi:

$$k = \frac{n_s}{n_m} = K \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad \text{Równ. 4.2}$$

gdzie V_s i V_m to objętość odpowiednio fazy stacjonarnej i ruchomej.

O jakości rozdziału chromatograficznego decyduje wiele czynników. Szczególnie istotnym jest sprawność kolumny chromatograficznej, której miarę określamy za pomocą *liczby pólk teoretycznych* (N). Zgodnie z definicją poprzez półkę teoretyczną rozumiemy objętość kolumny w której zostaje osiągnięty stan równowagi pomiędzy stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i w fazie stacjonarnej. Wartość N wylicza się z chromatogramu wg wzoru:

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad \text{Równ. 4.3}$$

gdzie $w_{0.5}$ oznacza szerokość piku w połowie jego wysokości (Rys. 4.2). Im większa jest liczba N , tym kolumna charakteryzuje się większą sprawnością. Przekłada się to bezpośrednio na kształt piku. Im większa wartość N , tym piki są węższe. Kształt piku chromatograficznego opisuje symetryczna krzywa dzwonowa Gaussa. W zależności

jednak od charakteru oddziaływań analitu z fazą stacjonarną, a przez to i kinetyki procesu rozdzielania, mogą następować odstępstwa od symetryczności. Asymetryczność piku określana jest za pomocą *współczynnika asymetryczności* (A_s) liczonego wg wzoru:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

Równ. 4.4

gdzie b (a) jest to odległość od linii środkowej piku do punktu końcowego (początkowego) zbocza piku, leżącego na 0.1 całkowitej wysokości piku h (Rys. 4.2).

Ilościowo sprawność rozdzielania mieszaniny wieloskładnikowej opisać możemy poprzez dwa parametry chromatograficzne: *współczynnik rozdzielania* (α) oraz *zdolność rozdzielczą pików* (R_s). Przez *współczynnik rozdzielania* (α) rozumiemy względną wartość retencji dla dwóch sąsiadujących pików:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_o}{t_{R1} - t_o} = \frac{K_2}{K_1}$$

Równ. 4.5

W stanie równowagi α równa się stosunkowi współczynników podziału obu składników i jest miarą termodynamicznych różnic w ich podziałach. *Rozdzielczość pików* R_s jest natomiast miarą skuteczności rozdzielania składników mieszaniny. R_s zależy zarówno od sprawności fazy stacjonarnej jak i selektywności. Wartość tego parametru określić można za pomocą zależności:

$$R_s = 1,177 \cdot \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{0.5(2)} + w_{0.5(1)}} \right)$$

Równ. 4.6

gdzie indeks 1 (2) odnosi się do składnika mieszaniny eluowanego jako pierwszy (drugi) (Rys. 4.2). Przy wartości $R_s = 1$ stopień pokrycia dwóch sąsiadujących pików wynosi ok. 2%. Pełne rozdzielania zostaje osiągnięte przy wartości $R_s = 1.5$.

Wzajemną zależność pomiędzy wyżej wymienionymi parametrami chromatograficznymi opisuje wzór Purnella:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1}$$

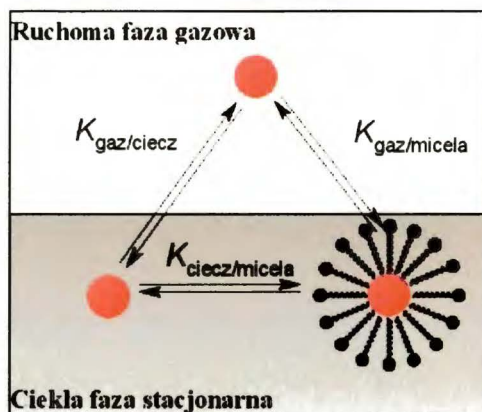
Równ. 4.7

Powyższy wzór odnosi się do drugiego wmywanego składnika mieszaniny. Z zależności wynika, iż zmiana wartości *współczynnika retencji* (k), ma ograniczony wpływ na zdolność rozdzielczą układu. Najistotniejszym parametrem jest natomiast *współczynnik rozdzielania* (α). Nawet niewielkie jego zmiany powodują znaczący

wzrost wartości R_s , np. zwiększenie α z 1.1 do 1.2 powoduje w przybliżeniu podwojenie zdolności rozdzielczej układu.

4.1.2 Micelarna podziałowa chromatografia gazowa (MGLC)

W podziałowej chromatografii gazowej (ang. *Gas-Liquid Chromatography*, **GLC**) fazę stacjonarną stanowi osadzona na nośniku niewodna, organiczna ciecz, zaś fazą ruchomą jest gaz inertny. Mechanizm separacji oparty jest na podziale pomiędzy dwie fazy opisanym poprzez prawo podziału Nersta (rozdział 4.1.1). W zależności od własności fizykochemicznych cieczy możliwe jest rozpuszczenie makrocząsteczek o właściwościach inkluzyjnych i tym samym wzbogacenie fazy stacjonarnej w dodatkowy czynnik poprawiający jej własności separacyjne. Jest to niezwykle istotne zwłaszcza w obszarze tworzenia nowych faz chiralnych. Jak do tej pory przetestowano wiele makrocyklicznych układów modyfikujących m.in. cyklodekstryny [84], kaliksareny [85, 86], etery koronowe [87, 88]. Spośród przebadanych molekuł największą stabilnością termiczną oraz selektywnością, w tym również enancjoselektywnością, charakteryzowały się cyklodekstryny. Uzyskane wyniki umożliwiły w krótkim czasie opracowanie kapilarnych chiralnych kolumn cyklodekstrynowych, które do dnia dzisiejszego cieszą się ogromną popularnością. Nową koncepcją jest próba zastosowania spontanicznie agregujących cząsteczek amfifilowych w środowisku rozpuszczalnika organicznego jako nowego typu faz w układzie GLC. Jak opisano w rozdziale 2 samoorganizacja może występować w rozpuszczalnikach o własnościach fizykochemicznych zbliżonych do wody. Należą do nich m.in.: gliceryna, formamid, glikol etylenowy. W technice GLC te polarne rozpuszczalniki organiczne pełnią rolę ciekłych faz stacjonarnych. Koncepcja zatem wydaje się być jasna i obiecująca, szczególnie w obszarze uzyskania na bazie chiralnych molekuł surfaktantu nowych faz chiralnych. Przedstawiony układ nie jest jednak wolny od pewnych ograniczeń wynikających m.in. z własności fizykochemicznych amfifila jak również temperatury pracy badanego układu. Po raz pierwszy z powodzeniem fazę stacjonarną opartą na samoorganizujących się cząsteczkach w układzie GLC uzyskał i opisał Armstrong [89, 90]. Jego prace dotyczą agregacji niechiralnych surfaktantów m.in. SDS, Brij 35, Brij 700 w roztworach cieczy jonowych typu RTILs (ang. *room-temperature ionic liquids*).



Rys. 4.3 Schemat modelu trzyfazowego z zaznaczonymi stałymi podziału w układzie GLC.

Zastosowany model trzech faz (Rys. 4.3) utworzony w analogii do układów cyklodekstrynowych dokładnie opisanych w literaturze, umożliwił wyznaczenie stałych podziału dla rozpatrywanego procesu chromatograficznego. Należy podkreślić jednak, iż model ten jest niezwykle uproszczony i nie uwzględnia oddziaływania z monomerami, a jedynie z układami zagregowanymi. Uzyskane wyniki dla zbioru cząsteczek modelowych wykazały wzajemne oddziaływanie pomiędzy analitem a układem zagregowanym. Ponadto w porównaniu do układu niemodyfikowanego surfaktantem, zaobserwowano zmianę selektywności w stosunku do badanych związków modelowych. Opisana metoda została nazwana micelarną podziałową chromatografią gazową (ang. *Micellar Gas-Liquid Chromatography*, **MGLC**), zaś ciekła faza stacjonarna- pseudofazą micelarną (ang. *micellar pseudophase*).

Jak do tej pory zgodnie z wiedzą autora niniejszej rozprawy, brak jest informacji dotyczących zastosowania chiralnych amfifili, do których należą badane cząsteczki soli kwasów cholowych, jako modyfikatorów ciekłych faz stacjonarnych w układzie GLC. Niniejsza rozprawa doktorska w tym ujęciu jest zatem pracą pionierską. Agregacja cholanów w rozpuszczalnikach organicznych jest mało opisana w literaturze. Robenson [91] badając micelizację kwasu cholowego i jego metylowych pochodnych m.in. w chloroformie, wykazał obecność dimerów i trimerów w badanych rozpuszczalnikach organicznych. Badania Diaza [92] potwierdziły agregacje kwasu cholowego w tetrahydrofuranie (THF) i wykazały, iż proces micelizacji zachodzi dwuetapowo, a wyznaczone wartości **CMC** są dużo niższe niż dla wody (1-5 mM/THF, 13 - 15 mM/H₂O).

4.1.3 Micelarna chromatografia cieczowa (MLC)

Micelarna chromatografia cieczowa (ang. *Micellar Liquid Chromatography*, **MLC**) stanowi alternatywną technikę w stosunku do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC). W przeciwieństwie do klasycznej techniki RP-HPLC wodno-organiczna faza ruchoma zastąpiona jest wodnym roztworem surfaktantu o stężeniu powyżej krytycznego punktu micelnego (**CMC**). Fazę stacjonarną stanowią, podobnie jak w układzie RP-HPLC, chemicznie związane z mikroporowatą krzemionką łańcuchy węglowe o różnej długości np. C2, C8, C18. Zastosowanie miceli jako modyfikatorów fazy ruchomej po raz pierwszy zostało opisane w 1980 roku przez Armstronga i Henryego [93]. Autorzy wykorzystali z powodzeniem wodny roztwór surfaktantu do rozdzielania mieszaniny fenoli i węglowodorów aromatycznych. Od tamtej pory nastąpił rozwój techniki, co uwidacznia się we wzroście liczby publikacji oraz artykułów przeglądowych [wydanie specjalne *Journal of Chromatography A* 1997, vol.780], w tym również pozycji książkowych [94, 95]. Obecnie w technice MLC wykorzystuje się wiele surfaktantów m.in. CTAB, Brij 35, Titron X-100, SDS (Tab. 4.1). Zgodnie z założeniem metody stosowane stężenia surfaktantu są powyżej ich punktu **CMC**. W celu uniknięcia niepożądanego efektu wynikającego ze wzrostu lepkości fazy ruchomej, w metodzie MLC stosowane są jedynie surfaktanty o niskich wartościach **CMC**.

Tab. 4.1 Charakterystyka najczęściej używanych surfaktantów w MLC [94]

Wzór chemiczny	Skrót	CMC [mM]	Punkt Krafta [°C]	l. agregacji, <i>n</i>
C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na	SDS	8.1	16	62
C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Br	CTAB	0.83	26	90
C ₁₂ H ₂₅ (C ₂ H ₅ O) ₂₅ OH	Brij 35	0.06	100 ^a	41
C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _{9,5}	Titron X-100	0.3	67 ^a	140

^a punkt rosy

Micelle jako układy dynamiczne występują w równowadze z monomerami, które w odróżnieniu od formy zagregowanej mogą adsorbować się na fazie stacjonarnej. W zależności od rodzaju procesu faza stacjonarna może być bardziej hydrofobowa (adsorpcja części jonowej surfaktantu) lub posiadać własności zbliżone do fazy

jonowymiennej (adsorpcja łańcucha alkilowego amfifila). Dorsey [96] i Berthod [97] wykazali, że dla większości surfaktantów i stosowanych faz stacjonarnych (m.in. C18, C8) ilość zaadsorbowanego amfifila po osiągnięciu równowagi pozostaje stała. Warto podkreślić, iż adsorpcja amfifila na fazie stacjonarnej ma charakter odwracalny. W porównaniu z klasyczną metodą RP-HPLC, modyfikacja fazy ruchomej i fazy stacjonarnej prowadzi do wzrostu różnorodności oddziaływań. W MLC mamy do czynienia z oddziaływaniami o charakterze elektrostatycznym, hydrofobowym oraz przestrzennym. Dzięki temu możliwe jest jednoczesne rozdzielanie mieszaniny cząsteczek naładowanych i obojętnych, jak również molekuł nierozpuszczalnych w roztworach wodnych. Pomimo dużej różnorodności oddziaływań technika ta charakteryzuje się małą efektywnością rozdzielania. Konsekwencją adsorpcji cząsteczek surfaktantu jest bowiem wzrost grubości fazy stacjonarnej, co w połączeniu ze wzrostem lepkości fazy ruchomej wpływa na zmniejszenie szybkości procesu przeniesienia masy, a tym samym poszerzenia pików i spadku efektywności rozdzielania. Dorsey et al. [98] zauważył, iż niewielki dodatek n-proponolu zmniejszał asymetryczność pików. Na podstawie uzyskanego wyniku przebadano również inne alkohole jako dodatki do micelarnej fazy ruchomej w układach klasycznych achiralnych surfaktantów [99]. Wzrost efektywności rozdzielania Hinze [99] tłumaczył redukcją grubości zaadsorbowanego surfaktantu i wzrost współczynnika dyfuzji. W przypadku jonowych surfaktantów dodatkowo zachodzi proces zmniejszenia gęstości ładunku na powierzchni naładowanej miceli, a tym samym zmniejszenia udziału oddziaływań o charakterze elektrostatycznym. Objętość dodanego modyfikatora zależy zarówno od rozpuszczalności samego dodatku jak również własności układu zagregowanego. Zbyt duże stężenie dodatku alkoholu może prowadzić do procesu deagregacji układu micelarnego. Fisher i Jandera [100] badając wpływ MeOH na wartość CMC dla SDS i CTAB, wykazali iż wzrost stężenia alkoholu w fazie ruchomej przesuwa równowagę procesu w kierunku monomerów surfaktantu w fazie ruchomej. Przy objętości do 10% MeOH (v/v) wpływ alkoholu na CMC był niewielki, powyżej jednak 25% MeOH (v/v) obserwowano deagregację układu micelarnego.

W porównaniu do metody RP-HPLC, mechanizm retencji w micelarnej chromatografii cieczowej jest bardziej złożony. W najstarszym modelu zaproponowanym przez Armstronga i Nome [101], rozpatrywano podział substancji oznaczanej pomiędzy trzy

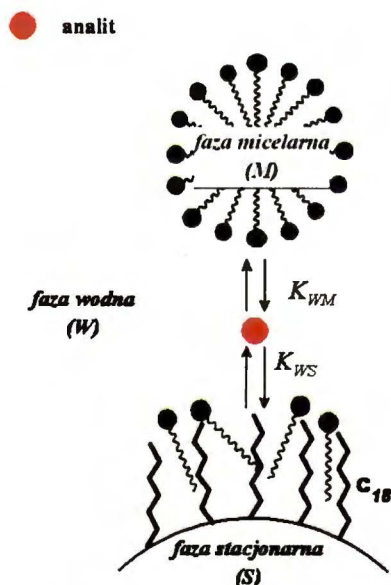
fazy: fazę wodną (W), fazę micelną (M) oraz fazę stacjonarną (S) (Rys. 4.4). Wyrażony za pomocą podstawowych parametrów chromatograficznych przez Guerouche [102], powyższy model przewiduje liniową zależność pomiędzy odwrotnością współczynnika retencji ($1/k$), a stężeniem surfaktantu w formie zagregowanej (C_{mic}):

$$\frac{1}{k} = \left[\frac{v \cdot (K_{WM} - 1)}{(\phi \cdot K_{WS})} \right] \cdot C_{mic} + \frac{1}{\phi \cdot K_{WS}} \quad \text{Równ. 4.8}$$

gdzie K_{WM} oznacza stałą podziału faza wodna/faza micelarna, K_{WS} jest stałą podziału faza wodna/faza stacjonarna, ϕ wyraża stosunek objętości fazy ruchomej do objętości fazy stacjonarnej, v jest objętością molową surfaktantu. Stała podziału K_{SM} (faza stacjonarna/faza micelarna) wyrażona jest za pomocą zależności:

$$K_{SM} = \frac{K_{WS}}{K_{WM}} \quad \text{Równ. 4.9}$$

Powyższy model Armstronga i Nome pomimo swojej prostoty dobrze opisuje wiele układów liniowych surfaktantów w roztworach wodnych w określonym zakresie stężeń.



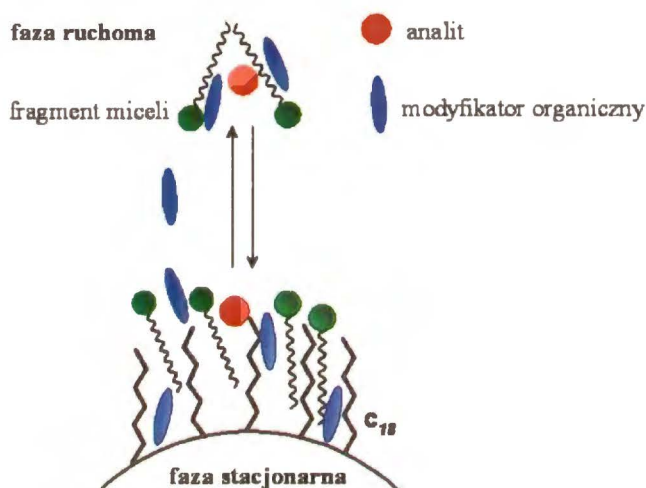
Rys. 4.4 Schemat oddziaływań w modelu trzyfazowym Armstronga i Nome

Ciekawe podejście do opisu mechanizmu retencji w układzie MLC zastosował Foley [103], w którym to proces oddziaływania surfaktantu z analitem przyrównał do reakcji tworzenia kompleksu. Analit w fazie ruchomej może występować w formie wolnej (A) lub skompleksowanej z micelą (AM). W zależności od tego różny jest charakter

oddziaływania z fazą stacjonarną. Ogólne równanie opisujące badany układ przedstawić można za pomocą zależności:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_A} + \frac{K_{AM}}{k_A} \cdot C_{mic} \quad \text{Równ. 4.10}$$

gdzie k_A jest współczynnikiem retencji wolnego analitu, K_{AM} jest stałą asocjacji (analit-micela), C_{mic} stężeniem surfaktantu w formie zagregowanej.



Rys. 4.5 Schemat oddziaływań w układzie z modyfikatorem organicznym

Zarówno model Armstronga jak i Foleya należą do grupy modeli koncepcyjnych o charakterze ogólnym. Nie rozpatrują one bowiem wpływu m.in. czynnika modyfikującego jakim może być rozpuszczalnik organiczny. Jednoczesne modelowanie wpływu stężenia surfaktantu jak i modyfikatora jest zadaniem bardzo trudnym. Otrzymane zależności dla współczynników retencji często są relacjami nieliniowymi. W literaturze zaproponowano kilka modeli opisujących taki układ. Ze względu na złożoność procesu rozdzielania, żadnego z nich nie można jednak nazwać uniwersalnym. Spośród istniejących na szczególną uwagę zasługuje model zaproponowany przez Loginovą [104] oparty na koncepcji modelu działania mas (Rys. 4.5). Loginova rozpatrywała zmianę otoczenia środowiska analitu podczas jego przejścia do micelarnej fazy ruchomej oraz fazy stacjonarnej. Model ten zakłada, że w fazie ruchomej molekula analitu ulokowana jest w miceli modyfikowanej cząsteczkami rozpuszczalnika organicznego. W fazie stacjonarnej z kolei jest 'solwatowana' przez cząsteczki rozpuszczalnika oraz monomery surfaktantu. Cząsteczki modyfikatora organicznego podzielone są zatem pomiędzy trzy fazy: głębie

roztworu, micelle w fazie ruchomej, powierzchnie fazy stajonarnej. Równanie opisujące powyższy układ zapisać można w następującej postaci:

$$\log k = \text{const} - x \log C_R + y\beta \log C_S + x \log(1 + (P-1)\nu_S(C_S - CMC)) + y\beta \log(1 - \beta) \quad \text{Równ. 4.11}$$

gdzie $\text{const} = y \log K' + \log K + \log \phi$; C_R , C_S oznaczają całkowite stężenie modyfikatora organicznego (R) oraz surfaktantu (S) w roztworze eluentu; ν_S jest objętością molową surfaktantu; P opisuje współczynnik podziału modyfikatora pomiędzy fazę wodną a micelną; K' jest stałą tworzenia miceli; K jest stałą procesu przeniesienia analitu z fazy ruchomej do fazy stajonarnej; ϕ wyraża stosunek objętości fazy ruchomej do objętości fazy stajonarnej, β jest stałą wiązania przeciwnionów, x i y są to współczynniki stechiometryczne [104]. Mimo, że matematycznie i koncepcyjnie powyższy model jest poprawny, jego złożoność w znaczący sposób ogranicza możliwości użytkowe.

Obok fizykochemicznych modeli retencji układów MLC w literaturze opisano również wiele modeli empirycznych przewidujących retencje związków badanych [praca przeglądowa 105]. Nie opisują one jednak żadnych własności fizykochemicznych badanych układów oraz charakteryzują się małą dokładnością w dużym zakresie stężeń zarówno surfaktantu jak i modyfikatora organicznego.

4.1.3.1 Cholany w technice MLC

Do najczęściej stosowanych chiralnych surfaktantów w metodzie MLC należą sole kwasów cholowych. Szczegółowy opis budowy i własności tych związków zawiera rozdział 2 niniejszej rozprawy. Wzrost stężenia surfaktantu w fazie ruchomej powoduje wzrost lepkości fazy, co wymusza zastosowanie mniejszego przepływu fazy, a tym samym wydłuża czas analizy. W przypadku cholanów w zakresie stężeń 20-150mM wzrost lepkości fazy jest niewielki, dzięki czemu możliwe jest stosowanie typowych przepływów charakterystycznych dla techniki HPLC [106]. Dodatkową zaletą cholanów jest ich transparentność w zakresie światła widzialnego, co ma istotne znaczenie w doborze sposobu detekcji [107].

Podobnie jak dla liniowych surfaktantów achiralnych w przypadku cholanów zaobserwowano adsorpcje surfaktantu na powierzchni fazy stajonarnej. Hinze [106]

badając własności deoksyholanu sodu jako dodatku do fazy ruchomej, wyznaczył, że ilość zaadsorbowanego surfaktantu na jeden gram fazy C18 leży w zakresie 80 - 149mg. Wyznaczona wielkość jest porównywalna z otrzymanymi przez Borgerdinga [108, 109] dla surfaktantów liniowych takich jak SDS, CTAB, Brij-35. Adsorpcja cholanów na fazie stacjonarnej może zachodzić na kilka sposobów. Najbardziej prawdopodobnym wydaje się być ten, w którym hydrofobowa *powierzchnia* β zwrócona jest w kierunku fazy nieruchomej, dzięki czemu możliwe jest oddziaływanie grup metylowych z łańcuchami alkilowymi fazy stacjonarnej. Hydrofilowa *powierzchnia* α skierowana jest w kierunku fazy ruchomej. Zmodyfikowana w ten sposób faza jest bardziej polarna w porównaniu z tą o niemodyfikowanej powierzchni. Adsorpcja cholanów na fazie stacjonarnej jest procesem odwracalnym. Przemycanie stężonym roztworem metanolu 80 - 100% całkowicie desorbuje warstwę. Ze względu na wysoką rozpuszczalność cholanów w metanolu (NaDC – 3.2 mg/100ml, NaC – 1.8 mg/100ml) [110] bezpośrednio można przejść z roztworu micelnego do 100% metanolu, bez konieczności przemycania kolumny fazą wodną (100%), czego nie można pominąć w przypadku stosowania m.in. anionowego SDS-u.

Badając rozdzielanie mieszanin achiralnych związków hydrofobowych Hinze [106] zauważył, że dodatek rozpuszczalnika organicznego poprawiał efektywność rozdzielania oraz symetryczność pików. Najlepsze wyniki uzyskano dla alkoholi o średniej długości łańcucha węglowego (butanol, pentanol). Wpływ dodatku organicznego na rozdzielanie chiralne w literaturze opisane jest bardzo skromnie. Brak jest syntetycznych danych opisujących efekt modyfikatora organicznego na proces rozpoznania chiralnego.

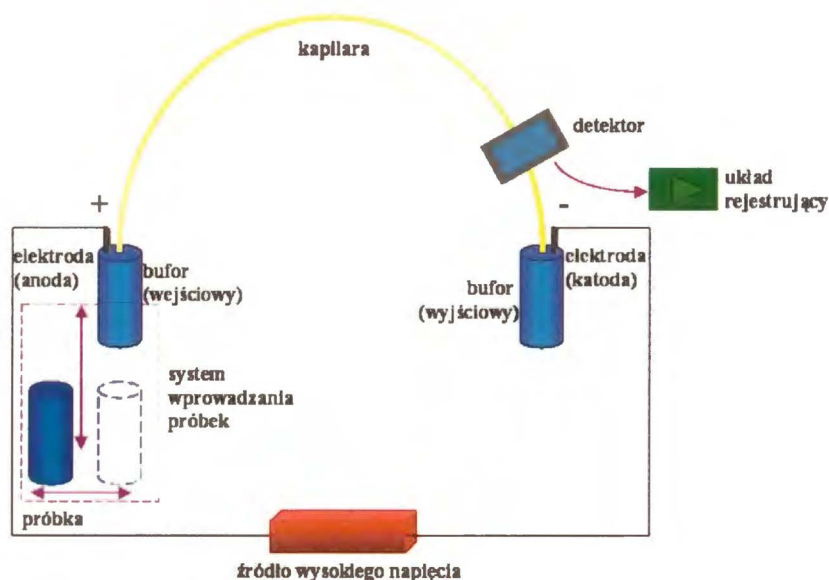
Obok rozdziałów mieszanin izomerów strukturalnych m.in. metyloindolu, witaminy D, na micelarnej fazie ruchomej z cholanem uzyskano również rozdziały stereoizomerów m.in. estriolu, Dns-DL-aminokwasów [106, 107]. oraz pochodnych binaftyli [111]. Na podstawie przeprowadzonych analiz, wnioskuje się, że układy micelarne soli kwasów cholowych wykazują największą zdolność rozpoznania chiralnego w stosunku do molekuł posiadających centra chiralne blisko głównych grup funkcyjnych np. pierścienia aromatycznego [112] oraz cząsteczek o chiralności aksjalnej [107]. Szczególnie istotne jest to z punktu widzenia rozdzielania związków chiralnych o zahamowanej rotacji do których należą pochodne binaftyli. Powszechnie używane

cyklodekstryny, ze względu na dość dużą objętość luki, nie zawsze znajdują zastosowanie w enancjoseparacji tej klasy analitów i w tym aspekcie rozpoznania chiralnego sole kwasów cholowych mogą być ich doskonałym zamiennikiem.

4.2 Elektroforeza kapilarna (CE)

Pod pojęciem elektroforezy rozumiemy ruch cząsteczek naładowanych pod wpływem pola elektrycznego. Zjawisko to znane było już pod koniec XIX wieku, ale dopiero prace Arne Tiseliusa [113] dotyczące rozdzielania mieszaniny białek (α -, β - i γ -globulin) prowadzone na początku XX wieku pokazały praktyczne zastosowanie niniejszego zjawiska, za co autor prac nagrodzony został w 1948 roku Nagrodą Nobla. Metodę charakteryzowała jednak stosunkowo niska sprawność rozdzielania mieszanin, wynikająca z dużej wartości konwekcji i dyfuzji. Nowa era rozwoju metod elektroforetycznych nastąpiła dopiero w latach osiemdziesiątych, kiedy to Jorgenson i Lukacs [114, 115, 116] do separacji mieszanin zastosowali kapilary o średnicy wewnętrznej 75 μm . Takie rozwiązanie znacznie ograniczyło wpływ wydzielanego ciepła przy zastosowanym napięciu rzędu kV i pozwoliło uzyskać wysokie sprawności rozdzielania. Od tego czasu nastąpił dynamiczny postęp w rozwoju metody zarówno w zakresie teorii jak i rozwiązań aparaturowych. Obecnie wysokosprawna elektroforeza kapilarna (ang. *High Performance Capillary Electrophoresis*, **HPCE**) dzięki dużym możliwościom rozdzielczym traktowana jest jako alternatywna metoda analityczna w stosunku do metod chromatograficznych.

Uproszczony schemat zestawu do elektroforezy kapilarnej (ang. *Capillary Electrophoresis*, **CE**) przedstawiono na Rys. 4.6. W skład układu do CE wchodzi: (1) zasilacz wysokiego napięcia (0-30kV); (2) kapilara (najczęściej stosowane są kapilary ze stopionego kwarcu pokryte warstwą ochronną poliamidu) o średnicy wewnętrznej 20-200 μm i długości 0.2-1 m; (3) dwa pojemniki z buforem, w których umieszczone są końce kapilary; (4) dwie elektrody platynowe połączone z zasilaczem wysokiego napięcia; (5) system wprowadzania próbek; (6) detektor; (7) system sterowania układem i zbierania danych.



Rys. 4.6 Schemat budowy układu pomiarowego

Podstawą rozdzielania w elektroforezie kapilarnej są różnice w ruchliwościach elektroforetycznych (μ_e) oznaczanych analitów. Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego (E) naładowane cząsteczki poruszają się z różną prędkością (v_e) zdefiniowaną równaniem:

$$v_e = \mu_e E$$

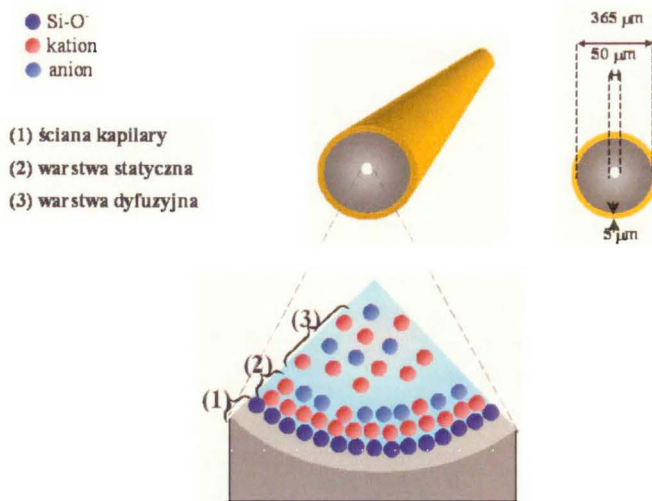
Równ. 4.12

Ruchliwość elektroforetyczna (μ_e) w danym roztworze jest wielkością charakterystyczna dla oznaczanego jonu. Wartość μ_e zależy zarówno od ładunku jonu (q), jego promienia hydrodynamicznego (r) oraz własności fizykochemicznych buforu (lepkości roztworu, pH, siły jonowej):

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Równ. 4.13

Z powyższego równania wynika, że większą ruchliwość elektroforetyczną będą wykazywały jony o niewielkich rozmiarach i dużej gęstości ładunku. Istotny wpływ na ruchliwość ma również skład buforu. Wzrost stężenia i siły jonowej buforu zmniejsza ruchliwość analitów, zaś zmiana pH wpływa bezpośrednio na postać analitów, będących słabymi kwasami lub słabymi zasadami.



Rys. 4.7 Przekrój poprzeczny kapilary

W zetknięciu z roztworem elektrolitu przy $\text{pH} > 3$, na wewnętrznej ścianie kapilary dochodzi do procesu jonizacji grup silanolowych (Si-OH). Naładowana w ten sposób ujemnie ścianka przyciąga jony dodatnie znajdujące się w roztworze elektrolitu podstawowego. Na granicy faz dochodzi zatem do powstania podwójnej warstwy elektrycznej o potencjale elektrokinetycznym zwanym potencjałem zeta (ζ):

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon}$$

Równ. 4.14

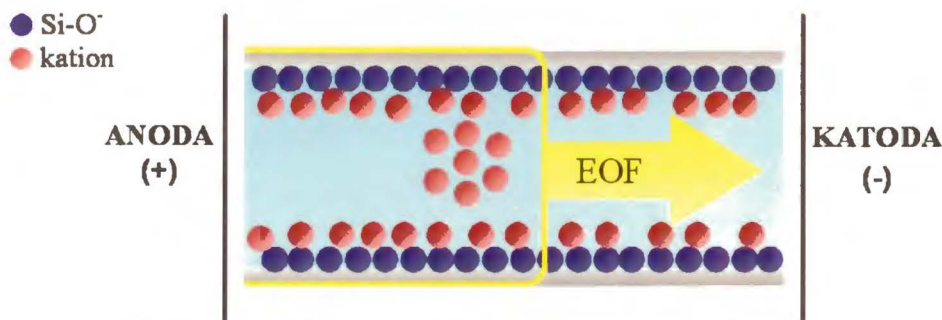
gdzie δ jest grubością warstwy podwójnej, e wyraża wartość ładunku na powierzchni, ϵ jest stałą przenikalności elektrycznej buforu. Na wartość potencjału zeta ma wpływ kilka czynników. Do najważniejszych należą pH roztworu oraz stężenie i siła jonowa stosowanego buforu.

Warstwa elektryczna składa się z dwóch części: statycznej bezpośrednio przylegającej do ścianki kapilary oraz części dyfuzyjnej rozciągającej się w głąb roztworu o nadmiarowym ładunku dodatnim (Rys. 4.7). Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego następuje zjawisko migracji kationów w kierunku katody. Ruch hydratowanych kationów części dyfuzyjnej warstwy podwójnej prowadzi do przepływu cieczy w kapilarze (Rys. 4.8), określanego mianem przepływu elektroosmotycznego (ang. *Electroosmotic Flow*, **EOF**). Przepływ elektroosmotyczny (v_{EOF}) opisuje równanie:

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta} E = \mu_{EOF} E$$

Równ. 4.15

gdzie μ_{EOF} jest ruchliwością elektroforetyczną buforu. Cechą charakterystyczną przepływu elektroosmotycznego jest jego płaski profil (Rys. 4.8), dzięki któremu metoda CE osiąga wysoką sprawność rozdzielczą. Liczba pólk teoretycznych wynosi ok. 10^5 - 10^6 i jest co najmniej o rząd wielkości większa w porównaniu z metodą GC oraz HPLC, które charakteryzuje przepływ laminarny.



Rys. 4.8 Przepływ elektroosmotyczny

EOF jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na czas migracji oznaczanej cząsteczki. Poprzez czas migracji (t_e) rozumiemy czas, w jakim oznaczony składnik próbki dociera do miejsca detekcji.

Obserwowaną ruchliwość oznaczanych molekuł (μ_{app}) wyrazić można następującą zależnością:

$$\mu_{app} = \frac{l_d l_t}{t_e V} \quad \text{Równ. 4.16}$$

gdzie l_d jest efektywną długością kapilary (do detektora), l_t opisuje całkowitą długość kapilary, V oznacza przyłożone napięcie, zaś t_e jest czasem migracji danego jonu. Wyznaczona wartość ruchliwości elektroforetycznej w obecności przepływu elektroosmotycznego jest wielkością pozorną. Zawiera ona bowiem ruchliwość jonów wynikającą również z przepływu elektroosmotycznego. Skorygowaną wartość ruchliwości nazywaną ruchliwością efektywną (μ_{eff}), opisać można następującym równaniem:

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{EOF} = \frac{l_d l_t}{V} \cdot \left(\frac{1}{t_e} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad \text{Równ. 4.17}$$

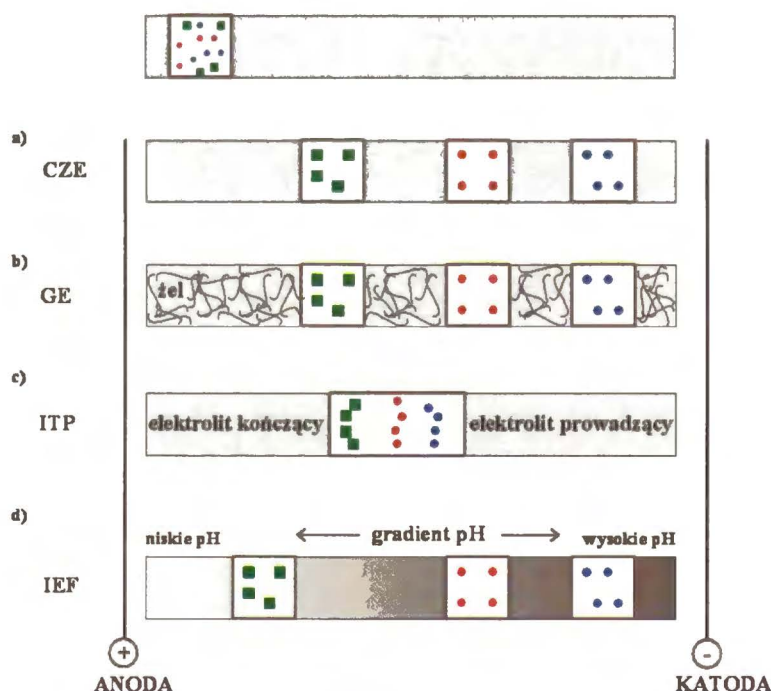
Efektywną ruchliwość wyznaczyć można przez niezależny pomiar przepływu elektroosmotycznego za pomocą neutralnego markera EOF poruszającego się z prędkością równą v_{EOF} . Do najczęściej stosowanych markerów należą N,N-dimetyloformamid (DMF), sulfotlenek dimetylowy (DMSO), metanol.

Z powyżej przedstawionych równań wynika, że wartość μ_{app} będzie dodatnia dla kationów, zaś ujemna dla anionów, zaś szybkość poruszania się molekuł obojętnych będzie równa szybkości przepływu elektroosmotycznego.

Sprawność rozdziału w CE podobnie jak w technikach chromatograficznych opisać można liczbą pól teoretycznych (N):

$$N = \frac{\mu_{eff} \cdot V}{2D_0} \quad \text{Równ. 4.18}$$

gdzie (μ_{eff}), jest efektywną ruchliwością elektroforetyczną, V oznacza wielkość przyłożonego napięcia prądu elektrycznego, zaś D_0 jest współczynnikiem dyfuzji. Rozmycie strefy próbki pogarszające sprawność rozdzielania może wynikać m.in. ze zbyt dużej objętości wprowadzonej próbki, gradientu temperatury oraz elektrodyspersji spowodowanej dużymi różnicami w przewodnictwie strefy próbki i buforu.



Rys. 4.9 Schematy metod stosowanych w elektroforezie kapilarnej: a) kapilarna elektroforeza strefowa (CZE), b) elektroforeza żelowa (GE), c) izotachoforeza (ITP.), d) izoelektryczne ogniskowanie (IEF)

W metodzie elektroforezy kapilarnej znanych jest kilka technik analitycznych: kapilarna elektroforeza strefowa (CZE), kapilarna elektroforeza żelowa (CGE), izotachoforeza kapilarna (CITP), izoelektryczne ogniskowanie kapilarne (CIEF), micelarna

elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC). Ilustrację zasad wybranych metod CE schematycznie przedstawiono na

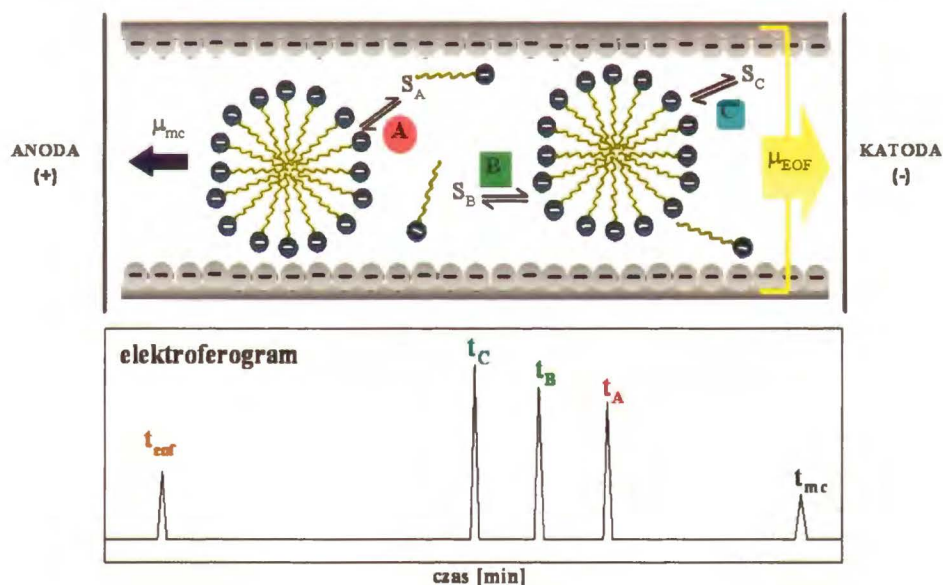
Rys. 4.9. Najbardziej rozpowszechniona jest technika CZE. Proces rozdzielania naładowanych substancji mało- i wielocząsteczkowych prowadzony jest w kapilarze wypełnionej w całej objętości tym samym buforem. W przypadku elektroforezy żelowej separacja prowadzona jest na nośnikach o charakterze żeli o odpowiednich średnicach porów. W technice CITP wykorzystuje się natomiast zjawisko identycznej szybkości jonów po osiągnięciu stanu równowagi. Rozdzielanie prowadzone jest przy zastosowaniu dwóch różnych elektrolitów, z których pierwszy tzw. wiodący zawiera jony o ruchliwości większej niż ruchliwość jonów oznaczanej próbki, zaś drugi tzw. elektrolit kończący zawiera jony o ruchliwości mniejszej niż jony próbki. Szczególne znaczenie przy rozdzielaniu białek odgrywa technika izoelektrycznego ogniskowania. Jako podstawę rozdzielania wykorzystuje się w tej metodzie różnice punktów izoelektrycznych oznaczanych analitów. Generowany w kapilarze stabilny gradient pH powoduje rozdzielanie analitów na ostre strefy zgodnie z ich wartościami punktu izoelektrycznego. Szczegółowy opis poszczególnych technik znaleźć można w pozycjach literaturowych [80, 83].

Ostatnia z technik tzw. micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC) ze względu na wykorzystanie w niniejszej rozprawie doktorskiej zostanie dokładnie omówiona w oddzielnym podrozdziale.

4.2.1 Micelarna Elektrokinetyczna Chromatografia Kapilarna (MECC)

W klasycznym modzie elektroforeza kapilarna należy do technik umożliwiających rozdzielanie cząsteczek naładowanych. Pozbawione ładunku cząsteczki migrują z szybkością przepływu elektroosmotycznego i nie ulegają separacji. W celu jednoczesnego rozdzielania molekuł naładowanych oraz obojętnych w metodzie CE, Terabe [117, 118] użył jonowych surfaktantów powyżej określonego ich stężenia CMC jako dodatków do elektrolitu wiodącego. Powodzenie eksperymentu stało się podstawą do rozwinięcia nowego modu techniki CE znanego jako micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MECC). Podstawą rozdzielania w metodzie MECC jest podział analitu pomiędzy dwie fazy o różnej polarności: fazę micelarną oraz fazę buforu. Fazę micelarną tworzą

naładowane elektrycznie micelle, które wędrują w polu elektrycznym zgodnie ze swoim ładunkiem. Surfaktanty anionowe migrują zatem w kierunku anody, niemniej jednak szybkość przepływu elektroosmotycznego w kierunku katody jest większa niż szybkość migracji miceli, co ostatecznie prowadzi do migracji układu w kierunku EOF (Rys. 4.10). Hydrofobowa faza wnętrza miceli określana jest mianem fazy pseudostacjonarnej, w której przemieszczają się substancje o właściwościach hydrofobowych. Im substancja wykazuje większy charakter hydrofobowy, tym silniejsze jest oddziaływanie z fazą micelną i dłuższy jej czas migracji. Na elektroferogramie Rys. 4.10 najbardziej polarnym jest związek C, najmniej zaś A. Anality neutralne o charakterze polarnym, które nie oddziałują z fazą micelną migrują w czasie równym t_{eof} . Cząsteczki, które całkowicie wbudowują się do wnętrza miceli (wysoco hydrofobowe), migrują z czasem równym migracji miceli (t_{mc}). Do molekuł tego typu należą m.in. Sudan III, pyren, antracen i pełnią funkcję markerów miceli.



Rys. 4.10 Migracja cząsteczek obojętnych (A, B, C) w układzie MECC z anionowym surfaktantem. S_A , S_B , S_C oznaczają podział substancji pomiędzy fazę micelną a fazą buforu; t_{eof} , t_C , t_B , t_A , t_{mc} oznaczają czas migracji odpowiednio markera EOF, analitów A, B i C oraz miceli.

Współczynnik retencji k , podobnie jak w metodach chromatograficznych, jest miarą czasu, w jakim dany składnik próbki przebywa w fazie pseudostacjonarnej, w stosunku do czasu jaki przebywa w fazie buforu. Wyrażając za pomocą czasów migracji, k opisać można równaniem:

$$k = \frac{t_e - t_{eof}}{t_{eof} \cdot \left(1 - \frac{t_e}{t_{mc}}\right)}$$

Równ. 4.19

Podstawowe wyrażenie na rozdzielczość pików w MECC jest analogiczne do stosowanego w metodach chromatograficznych, z uwzględnieniem migracji fazy micelarnej:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1} \cdot \left[\frac{1 - \frac{t_{eof}}{t_{mc}}}{1 + k_1 \cdot \frac{t_{eof}}{t_{mc}}} \right]$$

Równ. 4.20

gdzie indeksy 1 i 2 odnoszą się do analitów migrujących w kolejności odpowiednio jako pierwszy i drugi. Zmiana stężenia surfaktantu w buforze bezpośrednio wpływa na współczynnik retencji. Na podstawie uzyskanych wyników Terabe [118] opracował prosty, matematyczny model opisujący proces zachodzący w układzie MECC:

$$k = \frac{\bar{v}(C_{surf} - CMC)}{1 - \bar{v}(C_{surf} - CMC)} P_{MW}$$

Równ. 4.21

gdzie \bar{v} jest cząstkową objętością molową surfaktantu, C_{surf} jest całkowitym stężeniem surfaktantu, CMC krytycznym stężeniem micelarnym, zaś P_{MW} współczynnikiem podziału analitu pomiędzy fazę micelarną a fazę wodną.

Współczynnik rozdzielania α dla dwóch sąsiednich pików definiowany jest jako stosunek ich współczynników retencji k i jest wprost proporcjonalny do stosunku stałych podziału P_{MW} :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \cong \frac{P_{MW_2}}{P_{MW_1}}$$

Równ. 4.22

Ze względu na procesy zachodzące wewnątrz kapilary m.in. podział substancji, migrację elektrokinetyczną, oddziaływania o charakterze hydrofobowym, metoda MECC traktowana jest jako kombinacja dwóch innych metod: CZE oraz RP-HPLC. Można ją zatem traktować zarówno jako metodę elektroforetyczną jak i chromatograficzną. Aparatura do MECC jest dokładnie taka sama jak w klasycznej technice CE (rozdział 4.2), różny jest tylko skład buforu. Metoda micelarnej elektroforezy kapilarnej jest jedyną metodą elektroforetyczną umożliwiającą separację zarówno molekuł jonowych jak i obojętnych. Możliwość modyfikacji składu chemicznego fazy pseudostacjonarnej i/lub fazy buforowej, umożliwia w prosty sposób

kontrolowanie procesu rozdzielania, a tym samym daje szerokie możliwości w tworzeniu korzystniejszych metod separacyjnych.

4.2.1.1 Fazy pseudostacjonarne w układzie MECC

Fazami pseudostacjonarnymi w technice MECC są wodne roztwory surfaktantu o stężeniu powyżej jego krytycznego punktu micelnego. Można stosować zarówno kationowe, anionowe jak i zwitterjonowe surfaktanty. Istotne jest, aby amfifil był dobrze rozpuszczalny i chemicznie stabilny w danym elektrolicie, a jego **CMC** nie było wysokie. Bardzo duże stężenie surfaktantu zwiększa bowiem lepkość buforu, co przekłada się na niepożądany wzrost prądu i wzrost temperatury w kapilarze.

Do najczęściej stosowanych achiralnych liniowych detergentów w technice MECC należą: sól sodowa siarczanu dodecyłu (SDS) oraz bromek tetradecylotriamoniowy (DTAB). Duża popularność SDS-u wynika przede wszystkim z niskiej wartości punktu Krafa (16°C), niskiego **CMC**, oraz co istotne przy detekcji: jest niewidzialny w świetle UV. Za pomocą SDS rozdzielono wiele mieszanin związków o znaczeniu biologicznym [praca przeglądowa 119].

Rozdziały chiralne w MECC uzyskiwane są dzięki zastosowaniu chiralnych faz pseudostacjonarnych [praca przeglądowa 120]. Zastosowanie znalazły zarówno naturalne jak i syntetyczne amfifile (np. surfaktanty glikozydowe). Do naturalnych, chiralnych surfaktantów używanych w MECC należą sole kwasów cholowych, digitoniny oraz saponiny. Największą popularnością cieszą się sole kwasów cholowych. Budowę oraz własności tych związków omówiono w rozdziale 2. Od czasów pierwszej publikacji Terabe [121] dotyczącej separacji Dns-D,L-aminokwasów, liczba rozdzielanych molekuł chiralnych z zastosowaniem tych chiralnych amfifili znacznie się powiększyła [120]. Spośród wszystkich cholanów, najbardziej efektywnym chiralnym selektorem wydaje się być taurodeoksycholan sodu (NaTDC) [122]. W porównaniu z SDS, sole kwasów cholowych wykazują większy zakres tolerancji stężenia dodatku organicznego, bez rozpadu układu micelnego.

Duże znaczenie w rozdzielaniu związków chiralnych mają również fazy oparte na układach mieszanych. Często stosuje się układy typu sól kwasu cholowego - cyklodekstryna [120] lub sól kwasu cholowego - achiralny surfaktant [123]. Rola

achiralnego surfaktanta polega głównie na polepszeniu rozdzielania na skutek zwiększenia selektywności układu.

Do często stosowanych czynników achiralnych dodawanych do faz pseudostacjonarych polepszających selektywność i rozdzielczość układu należą rozpuszczalniki organiczne. Najczęściej stosowane to: metanol, etanol, acetonitryl, propan-2-ol. Modyfikator organiczny wpływa na redukcję przepływu elektroosmotycznego i zmiany szybkości przepływu fazy micelarnej.

5

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było doświadczalne opracowanie i optymalizacja faz opartych na chiralnych układach samoorganizujących się cząsteczek cholanu sodu (NaC) oraz deoksycholanu sodu (NaDC) w technikach rozdzielczych. Badania planowano przeprowadzić w układach z użyciem trzech analitycznych technik separacyjnych: podziałowej chromatografii gazowej (GLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz elektroforezy kapilarnej (CE).

W układzie podziałowej chromatografii gazowej zaplanowano zbadanie właściwości separacyjnych formamidowej fazy stacjonarnej modyfikowanej molekułami surfaktantu. Zaplanowane eksperymenty miały służyć określeniu wpływu stężenia amfifila na własności rozdzielcze układu. Przewidywano, że przeprowadzane eksperymenty stężeniowe oraz temperaturowe przyczynią się do pełniejszego zrozumienia mechanizmu procesu agregacji w niewodnych rozpuszczalnikach organicznych.

W układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej cząsteczki surfaktantu miały być użyte jako chiralne modyfikatory wodnej fazy ruchomej. Własności rozdzielcze badanej fazy chiralnej planowano zbadać na grupie cząsteczek modelowych-pochodnych optycznie czynnych binaftyli. Zaplanowane eksperymenty miały pokazać wpływ stężenia surfaktantu oraz wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego na proces enancjoseparacji cząsteczek modelowych. Dodatkowo planowane badania temperaturowe umożliwiłyby wyznaczenie zmian parametrów termodynamicznych towarzyszących procesom w badanych układach. Interpretacja uzyskanych wyników pozwoliłaby na opisanie wpływu środowiska na mechanizm rozpoznania molekularnego przez badane układy micelarne.

W układzie elektroforezy kapilarnej zaplanowano zastosowanie cholanów jako chiralnych faz pseudostacjonarnych do rozdzielania stereoizomerów flawanonów. Przeprowadzane eksperymenty miały na celu zbadanie wpływu stężenia surfaktantu

na proces separacji związków. Dodatkowe pomiary wpływu czynników achiralnych (skład buforu wodnego) miały posłużyć do optymalizacji własności rozdzielczych badanego układu micelarnego. Przewidywano, że uzyskane wyniki doprowadzą do lepszego zrozumienia mechanizmu separacji przez micide cholanów. Ponadto, opracowana metoda rozdzielania stereoizomerów flawanonów miała być praktycznie wykorzystana do zbadania składu diastereoizomerycznego soków z wyciskanych owoców cytrusowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

WPROWADZENIE

Część doświadczalna niniejszej rozprawy doktorskiej składa się z pięciu rozdziałów:

- rozdział 6 obejmuje opis zastosowanej aparatury, odczynników i substancji badanych,
- rozdział 7 zawiera wyniki badań uzyskane na fazach stacjonarnych modyfikowanych cząsteczkami soli kwasów cholowych w warunkach podziałowej chromatografii gazowej.
- rozdział 8 zawiera opis wyników uzyskanych w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach ruchomych modyfikowanych cząsteczkami cholanów,
- w rozdziale 9 przedstawiono wyniki badań uzyskane na pseudofazach cholanowych w układzie elektroforezy kapilarnej z uwzględnieniem praktycznego zastosowania opracowanego systemu elektroforetycznego,
- rozdział 10 zawiera podsumowanie uzyskanych najważniejszych wyników, wnioski końcowe.

Prezentowane w rozdziałach 7-9 wyniki zawierają elementy dyskusji. Rozwiązanie takie wybrano ze względu na niezależność wybranych analitycznych technik badawczych. Wcześniejsze komentarze wyników umożliwią przeprowadzenie ogólnego podsumowania w rozdziale 10, bez rozwiązywania wątpliwości jakie pojawiły się w kolejnych etapach realizacji projektu pracy doktorskiej.

6

MATERIAŁY I METODY

Ze względu na zastosowanie w niniejszej pracy trzech niezależnych technik rozdzielczych: podziałowej chromatografii gazowej (GLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MECC), w opisie części doświadczalnej oddzielnie omówiono metody i materiały dla każdej z nich.

6.1 Chromatografia gazowa (GC)

6.1.1 Aparatura

Pomiary chromatograficzne przeprowadzono używając chromatografu gazowego firmy Hewlett-Packard model 5890 seria II wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Czasy retencji oraz powierzchnie pików rejestrowano przy pomocy integratora firmy Hewlett-Packard, model 3396 seria II. Gazem nośnym był argon. Pomiary prowadzono przy stałej prędkości przepływu gazu (40.0 ± 0.5 ml/min). Badania wykonano metodą izotermiczną w temperaturze 30°C . Jako markera czasu substancji niezatrzymywanej na kolumnie użyto metanu. Badania temperaturowe przeprowadzono w zakresie temperatur 30° - 50°C . Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła $0.02\mu\text{l}$.

6.1.2 Kolumny, wypełnienia i preparatyka

W przeprowadzanych eksperymentach użyto kolumn szklanych o wymiarach $2\text{m} \times 4\text{mm}$ I.D. wypełnionych nośnikiem Chromosorb W NAW (60-100 mesh) pokrytym formamidowymi roztworami cholanu (NaC) lub deoksycholanu sodu (NaDC). Impregnację nośnika ciekłą fazą stacjonarną opisano poniżej.

Przygotowany formamidowy roztwór soli sodowej kwasu cholowego rozcieńczono wodą destylowaną i dodano do 15g nośnika. Otrzymaną zawiesinę delikatnie mieszano przez kilka minut. Nadmiar wody usuwano powoli w temp. 30⁰C za pomocą wyparki próżniowej pod ciśnieniem ok. 2.7 kPa. Przygotowane wypełnienie następnie pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej przez 24h. Po upakowaniu, kolumny kondycjonowano w temperaturze 60⁰C przez 12h. W przypadku kolumny matrycowej fazę stacjonarną stanowił roztwór rozpuszczalnika organicznego bez dodatku biosurfaktanta.

Stężenia cholanów w formamidzie (FA) wyrażono za pomocą molalności [*m*] (liczba moli substancji rozpuszczonej w 1000g rozpuszczalnika). Pełną charakterystykę kolumn wraz z użytymi skrótami zamieszczono w Tab. 6.1

Tab. 6.1 Charakterystyka kolumn

Kod kolumny	Rodzaj czynnika modyfikującego	Stężenie (mm)^a
Matryca	-	0
C1	NaC	7
C2	NaC	10
C3	NaC	14
C4	NaC	20
C5	NaC	30
C6	NaC	60
C7	NaC	100
DC1	NaDC	3
DC2	NaDC	7
DC3	NaDC	10
DC4	NaDC	14
DC5	NaDC	20
DC6	NaDC	60
DC7	NaDC	100

^amm = milimolalność

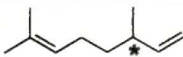
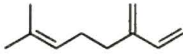
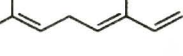
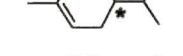
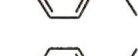




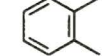
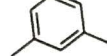







6.1.3 Charakterystyka odczynników i związków modelowych

Użyte odczynniki o stopniu czystości cz.d.a pochodziły z firmy Fluka i nie wymagały dalszego oczyszczania. Szczegółowe informacje zawarte zostały w Tab. 6.2. Wzorce enancjomerów monoterpenujodów jako układy modelowe charakteryzował wysoki stopień czystości. Informacje dotyczące budowy oraz producenta związków modelowych umieszczono w Tab. 6.3.

Tab. 6.2 Odczynniki

Nazwa	Skrót	Producent	
Sól sodowa kwasu cholowego	NaC	Fluka	Buchs, Szwajcaria
Sól sodowa kwasu deoksycholowego	NaDC	Fluka	Buchs, Szwajcaria
Formamid	FA	Fluka	Buchs, Szwajcaria
Chromosorb W NAW 60/100 mesh		Johns-Manville	Litho, USA

Tab. 6.3 Związki modelowe

Związek modelowy	Wzór strukturalny	Producent	
(+)- β -citronellen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
(-)- β -citronellen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
Myrcen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
Ocymenten	 (E-Z)	Fluka	Buchs, Szwajcaria
(+/-)- α -felandren		Fluka	Buchs, Szwajcaria
α -terpinen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
γ -terpinen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
(+)- α -pinen		Aldrich	Milwaukee, USA
(-)- α -pinen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
(+)- β -pinen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
(-)- β -pinen		Fluka	Buchs, Szwajcaria
(+)-kamfen		Aldrich	Milwaukee, USA
(-)-kamfen		Aldrich	Milwaukee, USA
<i>o</i> -ksylen		POCH	Gliwice, Polska
<i>m</i> -ksylen		POCH	Gliwice, Polska
<i>p</i> -ksylen		POCH	Gliwice, Polska
Aceton		POCH	Gliwice, Polska
Octan etylu		POCH	Gliwice, Polska

*centra stereogeniczne
(E-Z) izomeria typu cis-trans

6.1.4 Napięcie powierzchniowe

Pomiar napięcia powierzchniowego formamidowych roztworów surfaktantów przeprowadzono metodą Wilhemly'ego przy użyciu wagi Langmuira firmy Nima Technology w Zakładzie Fizykochemii Miękkiej Materii IChF PAN. Do pomiarów użyto prostokątnej bibuły filtracyjnej (20mm x 10mm x 0.1mm) zamiast zwykle stosowanej płytki platynowej. Badany roztwór umieszczono w szklanym naczynku pomiarowym o podwójnych ściankach termostatowanym za pomocą cyrkulującej wody z termostatu. Temperaturę mierzono z dokładnością $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ termometrem oporowym Pt 100 Ω przyłączonym do multimetru firmy Keithley. Cały układ umieszczono w komorze zapewniającej atmosferę wolną od zanieczyszczeń mechanicznych, ustawionej na stole antywstrząsowym. Pomiar napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia biosurfaktantu przeprowadzono w temperaturze 30 $^{\circ}\text{C}$.

Formamidowe roztwory o odpowiednich stężeniach biosurfaktantów (NaC: 2 mM², 5 mM, 10 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 50 mM oraz NaDC: 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 18 mM, 25 mM, 35 mM) przygotowano poprzez rozcieńczenie stężonego roztworu wyjściowego. Po 5 minutach intensywnego mieszania, roztwory odstawiano w celu osiągnięcia przez nie równowagi. Pomiar wykonywano po czasie 12h od momentu przygotowania próbek. Badania przeprowadzono w układzie 2 serii pomiarowych dla każdego badanego surfaktantu.

6.2 Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

6.2.1 Aparatura

Pomiary w układzie RP-HPLC przeprowadzono na chromatografie cieczowym firmy Knauer (Berlin, Niemcy) wyposażonym w pompę Mini-Star K-501 oraz detektor ze zmienną długością fali UV K-2501. Dozownik wyposażony był w pętlę o objętości 1 μl .

W pomiarach temperaturowych kolumnę termostatowano w termostacie firmy Knauer (Berlin, Niemcy). Sygnał z detektora zbierano za pomocą programu EUROCHROM 2000 dostarczonego przez firmę Knauer (Berlin, Niemcy).

² mM=milimolowość (liczba moli substancji rozpuszczonej w 1000ml roztworu)

6.2.2 Charakterystyka kolumny

Do badań stosowano komercyjną kolumnę firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA). Ogólną charakterystykę kolumny zamieszczono w Tab. 6.4.

Tab. 6.4 Kolumny chromatograficzne

Nazwa	Faza stacjonarna	Długość × średnica wewnętrzna	Rozmiar ziarna
LUNA	C18 (2)	250 × 1.0 mm	5µm

Natężenia przepływu fazy ruchomej było stałe i wynosiło 0.04 ml/min. Pomiarów wykonywano w temperaturze pokojowej. Badania temperaturowe przeprowadzono w zakresie temperatur 10⁰C - 45⁰C.

Zaadsorbowane na fazie stacjonarnej cholany desorbowano 80% wodnym roztworem metanolu. Czas przemywania wynosił średnio 8h.

6.2.3 Odczynniki i substancje badane

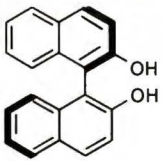
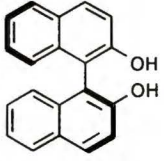
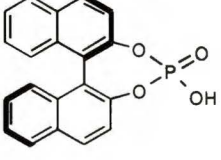
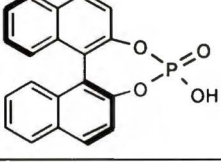
Informacje dotyczące użytych biosurfaktantów umieszczono w Tab. 6.2 . Do rozdzielania stereoizomerów związków modelowych (Tab. 6.6), jako eluenty stosowano wodne roztwory biosurfaktantów z dodatkiem rozpuszczalnika organicznego. Szczegółowe informacje dotyczące użytych rozpuszczalników zawarto w Tab. 6.5. Użyte odczynniki były o stopniu czystości cz.d.a. Substancje badane rozpuszczano w metanolu.

W celu wyznaczenia objętości wolnej kolumny stosowano metanolowy roztwór uracylu. Roztwory eluentów sączono przez filtry membranowe nylonowe o wielkości porów 0.45 µm (Supelco, USA).

Tab. 6.5 Modyfikatory organiczne fazy ruchomej

Odczynnik	Oznaczenie	Producent	
Metanol	MeOH	Lab-Scan	Dublin, Irlandia
butan-1-ol	n-BuOH	POCH	Gliwice, Polska
pentan-1-ol	n-PeOH	BDH	Poole, Wielka Brytania
heksan-1-ol	n-HexOH	POCH	Gliwice, Polska
heptan-1-ol	n-HepOH	BDH	Poole, Wielka Brytania
oktan-1-ol	n-OctOH	POCH	Gliwice, Polska

Tab. 6.6 Opis atropoizomerów związków rozdzielanych w warunkach MLC

Nazwa	Wzór strukturalny	Producent
(<i>R</i>)-(+)- 1,1'-Binaftylo-2,2'-diol		Fluka, Buchs, Szwajcaria
(<i>S</i>)-(-)- 1,1'-Binaftylo-2,2'-diol		
(-)-Fosforan-(<i>R</i>) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu		
(+)-Fosforan-(<i>S</i>) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu		

6.3 Micelarnej elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC)

6.3.1 Aparatura

Pomiary w układzie MECC przeprowadzono za pomocą aparatu do elektroforezy kapilarnej firmy Beckman Coulter model P/ACE wyposażonym w detektor z matrycą diodową (DAD). Widma zbierano w zakresie 190-300 nm. Badania wykonano z użyciem kapilary (Beckman Coulter Instruments, USA) o średnicy wewnętrznej 75 μm i długości całkowitej 58 cm (efektywna długość kapilary: 48 cm). Analizy przeprowadzono w stałej temperaturze. Kapilarę termostatowano płynem chłodzącym. Dokładny opis warunków elektroforetycznych zamieszczono w Tab. 6.7.

Tab. 6.7 Warunki analizy elektroforetycznej

	Opis
Typ polaryzacji elektrod	Normalny, przyłożone napięcie 20kV
Temperatura analizy	25 ⁰ C.
Nastrzyk	Iniekcja hydrodynamiczna (3s / 3.45kPa), całkowita objętość nastrzykiwanej próbki ok. 15 nl

6.3.2 Kondycjonowanie i mycie kapilary

Do kondycjonowania nowej kapilary zastosowano standardową procedurę przemywania zalecaną przez producenta kapilary:

1. metanol / 5 min
2. woda / 2 min
3. kwas chlorowodorowy / 5 min
4. woda / 2 min
5. 0.1 N NaOH / 10min
6. woda / 2 min

W celu uzyskania powtarzalnych wyników pomiędzy każdym nastrzykiem próbki, kapilarę przemywano wg następującego schematu:

1. woda / 3 min
2. NaOH / 2 min
3. woda / 2 min
4. bufor / 1.5 min

W niektórych przypadkach w razie konieczności kapilarę dodatkowo przemywano metanolem (2 minuty).

6.3.3 Odczynniki i substancje badane

Wszystkie zastosowane odczynniki charakteryzowały się najwyższym dostępnym stopniem czystości (Tab. 6.8). Informacje dotyczące użytych biosurfaktantów umieszczono w Tab. 6.2. Do przygotowania roztworów użyto wody destylowanej podwójnie filtrowanej. Pomiary prowadzono z użyciem buforu tetraboranowo-dwufosforanowego przy pH 7.5 (50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / 200 mM NaH_2PO_4)³. Przygotowanie buforu wiodącego opisano poniżej.

Do kolby miarowej szklanej o pojemności 10 ml odważono określoną masę surfaktantu, a następnie dodano zadane objętości stężonego roztworu wodnego soli kwasu tetraboranowego (4.89 ml) oraz soli kwasu dwuwodorofosforowego (2.61 ml). W etapie końcowym dodano określoną objętość rozpuszczalnika organicznego i dopełniono wodą destylowaną do objętości 10 ml. Przygotowany roztwór mieszano w temperaturze

³ stężenia wyjściowe

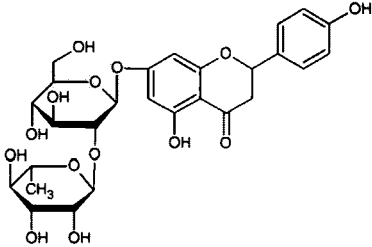
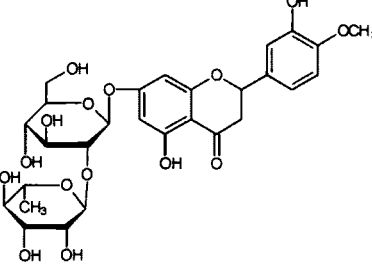
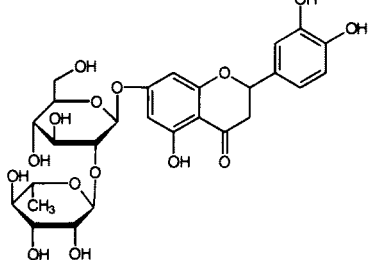
pokojoyej przez 20 min. Przygotowane w ten sposób roztwory buforowe sączone przez filtry strzykawkowe nylonowe o wielkości porów 0.45 μm (Supelco, USA).

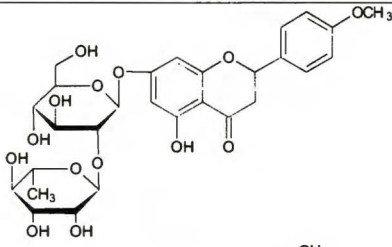
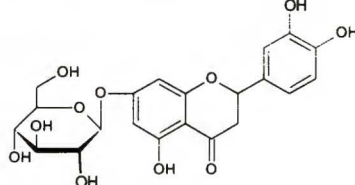
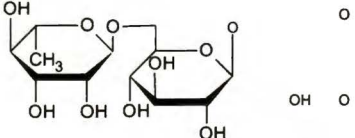
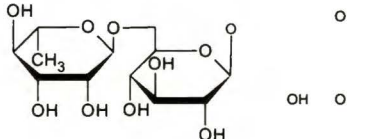
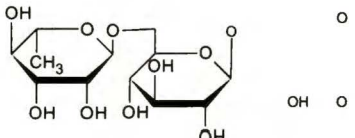
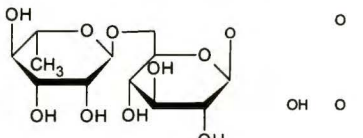
Tab. 6.8 Charakterystyka odczynników używanych w metodzie MECC

Tetraboran sodu	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	POCH	Gliwice, Polska
Dwuwodorofosforan sodu	NaH_2PO_4	POCH	Gliwice, Polska
Metanol	MeOH	Lab-Scan	Dublin, Irlandia
Acetonitryl	CH_3CN	POCH	Gliwice, Polska
2-propanol	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	POCH	Gliwice, Polska

Substancje badane z grupy flawanonów zakupiono w jedynej dostępnej formie, tj. mieszaniny dwóch diastereoizomerów. Wzory strukturalne badanych produktów zamieszczono poniżej w Tab. 6.9.

Tab. 6.9 Flawanony

Naryngina (NAR)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Neohesperydyna (NEH)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Neeriocytryna (NEE)		Carl Roth	Karsruhe, Germany

Ponciryna (PON)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Pyrakantozyd (PYR)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Narirutyna (NUR)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Hesperydyna (HES)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Eriocytryna (ERI)		Carl Roth	Karsruhe, Germany
Didymina (DID)		Carl Roth	Karsruhe, Germany

Substancje badane rozpuszczono w 30% roztworze metanolu.

Do wyznaczenia ruchliwości elektroforetycznej miceli użyto barwnika spożywczego Sudanu III. Ze względu na znikomą rozpuszczalność Sudanu III w roztworach wodno-organicznych, w pomiarach wykorzystano DMSO, jako rozpuszczalnik dla tej substancji. Roztwór wzbogacano dodatkiem octanu amonu, w celu zapewnienia obecności jonów. Jako markera EOF użyto MeOH oraz DMSO.

**CHARAKTERYSTYKA FAZ STACJONARNYCH
MODYFIKOWANYCH CHOLANAMI
W UKŁADZIE
PODZIAŁOWEJ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

7.1 Wyznaczenie krytycznego stężenia micelnego metodą pomiaru napięcia powierzchniowego

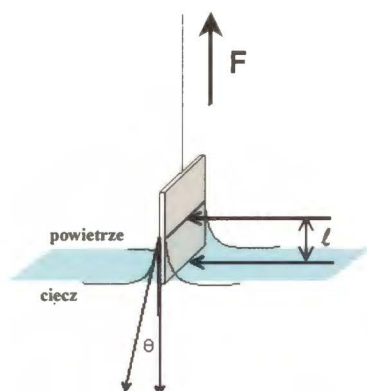
Badanie właściwości rozdzielczych faz stacjonarnych opartych na formamidowych roztworach cholanów w układzie chromatografii gazowej zostały poprzedzone wyznaczeniem krytycznych stężeń micelarnych dla badanych cholanów w formamidzie. Rozpuszczalnik organiczny może w istotny sposób wpłynąć na proces micelizacji, w skrajnym przypadku uniemożliwiając nawet agregację. Układy cholan sodu/formamid oraz deoksycholan sodu/formamid nie zostały dotychczas zbadane i opisane w literaturze. Spośród dostępnych metod badania procesu agregacji, ze względu na własności fizykochemiczne rozpuszczalnika, wybrano metodę pomiaru napięcia powierzchniowego.

Pomiar napięcia powierzchniowego (γ) przeprowadzono metodą Wilhemly'ego (metoda płytkowa). Metoda ta polega na pomiarze siły F , którą należy przyłożyć do pionowej płytki, zetkniętej z powierzchnią badanego roztworu, aby oderwać ją od tej powierzchni (Rys. 7.1). Napięcie powierzchniowe jest wprost proporcjonalne do przyłożonej siły. Wzajemną zależność obu wielkości fizycznych opisuje równanie:

$$\gamma = \frac{F}{l \cdot \cos \theta}$$

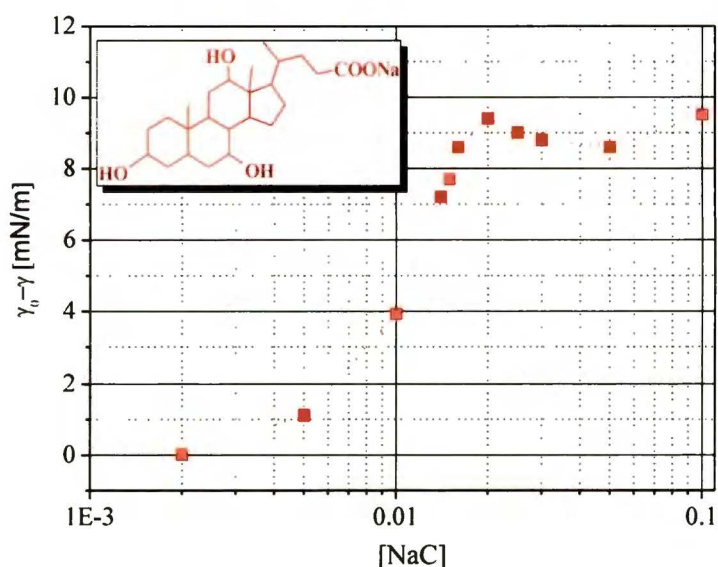
Równ. 7.1

gdzie l [m] jest długością zwilżenia płytki, θ jest kątem zwilżenia.



Rys. 7.1 Ilustracja pomiaru napięcia powierzchniowego metodą Wilhemly'ego

Na Rys. 7.2 przedstawiono doświadczalnie otrzymaną zależność różnicy napięcia powierzchniowego pomiędzy czystym formamidem (γ_0), a roztworem cholanu sodu (γ) w funkcji stężenia molowego tego surfaktantu.

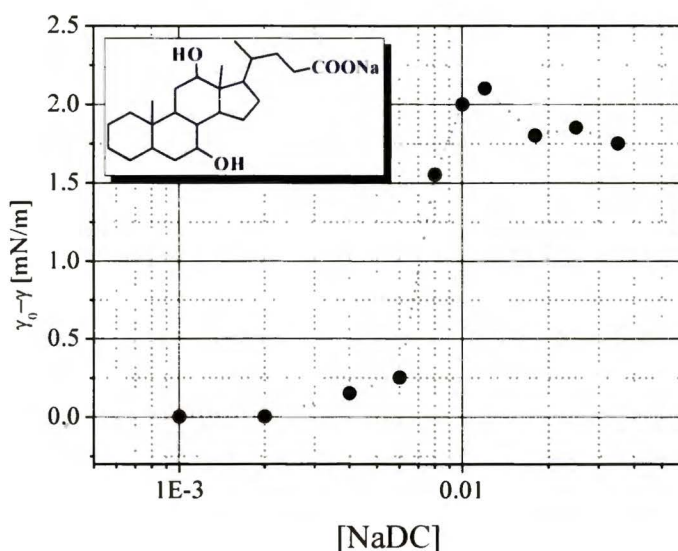


Rys. 7.2 Wpływ stężenia cholanu sodu (NaC) na wartość napięcia powierzchniowego; temp.: 30°C

Zamieszczony powyżej wykres przedstawia typową zależność dla agregujących cząsteczek amfifilowych. Wraz ze wzrostem ilości cząsteczek surfaktantu w roztworze obserwowany jest wzrost ciśnienia powierzchniowego ($\Pi = \gamma_0 - \gamma$). Po przekroczeniu jednak określonego stężenia surfaktantu, napięcie powierzchniowe osiąga wartość stałą. Stężenie to odpowiada wartości krytycznego stężenia micelnarnego (CMC), powyżej którego stężenie monomerów amfifila w roztworze pozostaje stałe.

Dla badanego układu cholan sodu/formamid za wartość **CMC** przyjęto punkt przegięcia na wykresie zależności ciśnienia powierzchniowego od stężenia surfaktantu. Wyznaczona wartość **CMC** dla cholanu sodu wynosi **17 mM**.

Analogiczne pomiary przeprowadzono dla układu deoksycholan sodu/formamid. Otrzymaną zależność przedstawiono na Rys. 7.3. Wyznaczona wartość **CMC** wynosi **9 mM**.



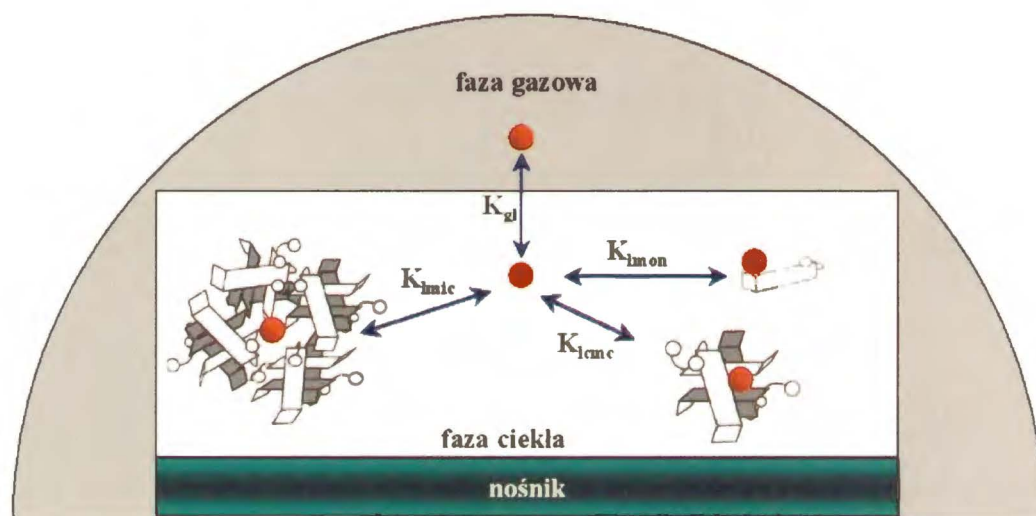
Rys. 7.3 Wpływ stężenia deoksycholany sodu (NaDC) na wartość napięcia powierzchniowego; temp.: 30°C

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w formamidzie następuje proces agregacji zarówno cholanu sodu jak i deoksycholany sodu. Wyższa wartość ciśnienia powierzchniowego blisko punktu **CMC** dla cholanu sodu może być wynikiem sumarycznego efektu wynikającego z większego upakowanie oraz silniejszej adsorpcji cząsteczek NaC na powierzchni fazy. Wyznaczona wartość **CMC** jest prawie dwukrotnie wyższa dla trójhydroksylogowego NaC niż dwuhydroksylogowego NaDC. Należy to tłumaczyć wyższą rozpuszczalnością bardziej polarnego amfifila w polarnym rozpuszczalniku. Otrzymane wartości **CMC** są zbliżone do otrzymanych w roztworach wodnych. Zgodnie z Terabe [124], wartość **CMC** w wodzie (25°C) dla cholanu sodu zawiera się w przedziale 13 - 15 mM, zaś dla deoksycholany sodu przyjmuje wartości 4-6 mM. Wyznaczone wielkości dla roztworu formamidu są zatem nieznacznie wyższe.

7.2 Teoretyczny opis systemu z solami kwasów cholowych w układzie GLC

Rozważmy lotną cząsteczkę analizowanej substancji S (●) przepływającą przez kolumnę której fazę stacjonarną stanowi formamidowy roztwór cholanów B .

Uproszczony schemat sytemu chromatografii gazowej z fazą stacjonarną zawierającą rozpuszczone cząsteczki surfaktantu przedstawiono na Rys. 7.4.



Rys. 7.4 Fenomenologiczny opis równowag zachodzących w kolumnie chromatograficznej

Model oparto na założeniach:

- pomiędzy fazą gazową a ciekłą zachodzi tylko czysty proces podziału,
- formamid znajduje się w fazie objętościowej roztworu i nie jest wbudowywany w struktury micelarne,
- adsorpcja molekuł surfaktantu na nośniku może być pominięta,
- układ znajduje się w liniowym zakresie izotermy podziału,

Do opisu procesów zachodzących w modyfikowanej surfaktantem fazie stacjonarnej rozpatrzono cztery przypadki. Przypadek pierwszy dotyczy procesu przejścia analitu S z fazy gazowej (g) do niemodyfikowanej fazy stacjonarnej (l). Równowagę procesu wyraża zależność :



gdzie K_{gl} jest stałą równowagi procesu podziału, $[S_{(l)}]$ oraz $[S_{(g)}]$ są odpowiednio stężeniami analitu w fazie ciekłej i gazowej.

Przypadek drugi dotyczy układów o stężeniach cholanów poniżej punktu **CMC**. Równowagę procesu zachodzącego w układzie z uwzględnieniem oddziaływań monomerów z cząsteczkami analitu opisuje równanie:



gdzie $B_{(mon)}$ oznacza monomer surfaktantu, K_{lmon} jest stałą równowagi procesu niespecyficznego wiązania monomeru i analitu. Dla oddziaływań o stechiometrii 1:1, wzór na K_{lmon} przybiera postać:

$$K_{lmon} = \frac{[SB_{(lmon)}]}{[S_{(l)}] \cdot [B_{(mon)}]} \qquad \text{Równ. 7.4}$$

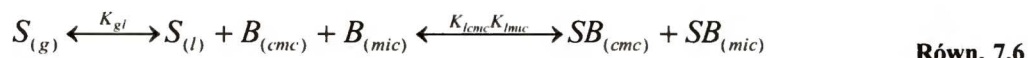
gdzie $[S_{(l)}]$, $[B_{(mon)}]$, $[SB_{(lmon)}]$ są odpowiednio stężeniami analitu, monomerów i układu związanego w fazie ciekłej.

Zwiększając stężenie surfaktantu w roztworze, dochodzi się do krytycznej wartości, powyżej której amfifil w układzie znajduje się w formie zagregowanej. Przypadek ten odnosi się do punktu **CMC**, w którym cała powierzchnia rozpuszczalnika równo pokryta jest warstwą monomerów. Mówimy o nasyceniu powierzchni. Równowagę w tym układzie opisuje równanie:



gdzie $B_{(cmc)}$ oznacza surfaktant w punkcie **CMC**, $SB_{(cmc)}$ formą związaną analitu z surfaktantem w punkcie **CMC**, K_{lcmc} jest stałą równowagi procesu.

Powyżej krytycznego stężenia micelarnego, molekuly analitu oddziałują w roztworze z formami zagregowanymi surfaktantu. Proces zachodzący w fazie stacjonarnej opisuje zależność:



gdzie $B_{(mic)}$ oznacza miecele surfaktantu, $SB_{(mic)}$ kompleks miceli z analitem, K_{lmic} jest stałą równowagi procesu.

Powyższe rozważania mają charakter ogólny. W rozdziale 4.1.2 wspomniano o modelu zaproponowanym przez Armstronga. Należy jednak podkreślić, że dotyczy on przypadku powyżej punktu CMC i nie uwzględnia oddziaływań analitu z monomerami oraz oddziaływań w punkcie CMC.

7.3 Wpływ cholanów na chromatograficzne zachowanie się cząsteczek modelowych

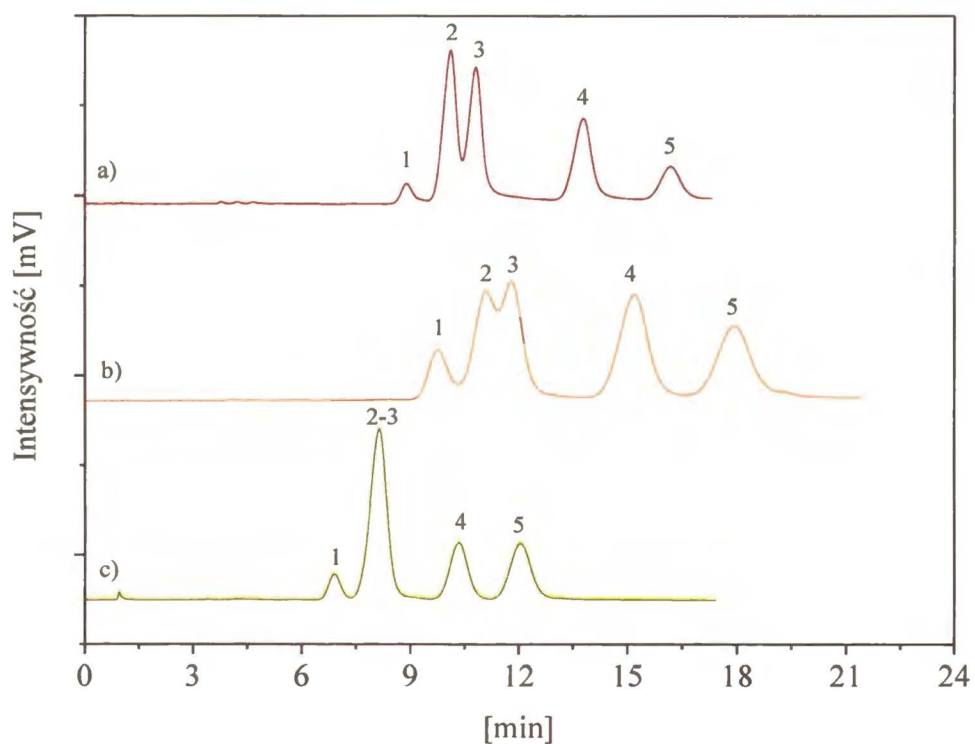
Grupę związków modelowych stanowiły molekuly zarówno o charakterze hydrofobowym (węglowodory alifatyczne i aromatyczne) jak i polarnym (keton, ester). Pod względem budowy przestrzennej w wybranej grupie znalazły się cząsteczki acykliczne, monocykliczne oraz bicykliczne, zawierające centra asymetrii. Szczegółowy opis zamieszczono w rozdziale 6 poświęconym chromatografii gazowej (podrozdział 6.1). Większość molekuł modelowych stanowią monoterpeny. Zostały one wybrane z uwagi na różnorodność izomerów, powszechność występowania w naturze oraz ich dostępność.

7.3.1 Wpływ rodzaju soli kwasu cholowego na elucje związków modelowych

W oparciu o przeprowadzone pomiary napięcia powierzchniowego oraz zbudowany model procesów zachodzących w fazie stacjonarnej, zaproponowano wykonanie faz formamidowych modyfikowanych cząsteczkami cholanu sodu (NaC) i deoksycholanu sodu (NaDC). W tym celu przygotowano ciekłe fazy formamidowe modyfikowane cząsteczkami surfaktantu. Przygotowana kolumna matrycowa (bez dodatku surfaktantu) pełniła rolę kolumny porównawczej.

Na Rys. 7.5 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane dla mieszaniny monoterpenu o budowie monocyklicznej na kolumnie matrycowej, kolumnie modyfikowanej NaC (C6) oraz NaDC (DC4). Stężenia surfaktantów nie są jednakowe, zostały dobrane jednak tak aby były powyżej punktu **CMC** dla danego amfifila.

Zebrane czasy retencji związków modelowych na kolumnach z cholanem i deoksycholanem sodu przedstawiono w Tab. 7.1.



Rys. 7.5 Chromatogramy sztucznej mieszaniny monoterpenu uzyskane na kolumnie matrycowej (c), **DC4** (NaDC -14 mm) (b) i **C6** (NaC- 60 mm) (a); Identyfikacja pików: α -felandren (1), α -terpinen (2), limonen (3), γ -terpinen (4), terpinolen (5); warunki: temp.: 30°C, przepływ argonu: 40 ml/min;

Tab. 7.1 Zredukowane czasy retencji t'_R [min] otrzymane na kolumnie matrycowej oraz kolumnach z cholanem (C6) i deoksycholanem sodu (DC4) o wymiarach 2 m x 4 mm; warunki: temp.: 30°C, przepływ gazu nośnego: 40ml/min

	Matryca	6 mm NaC	14 mm NaDC
(+)- β -citronellen	3.0	5.5	5.7
(-)- β -citronellen			
Myrcen	7.3	10.6	10.8
Ocymenten	11.5	15.4	16.1
(+)- α -felandren	7.2	9.3	9.7
(-)- α -felandren			
α -terpinen	8.3	10.5	11.5
γ -terpinen	12.0	14.6	16.0
(+)- α -pinen	2.3	3.5	3.4
(-)- α -pinen			
(+)- β -pinen	4.7	6.3	6.4
(-)- β -pinen			
(+)-kamfen	3.8	4.8	4.9
(-)-kamfen			
<i>o</i> -ksylen	14.8	14.2	15.1
<i>m</i> -ksylen	9.9	9.4	10.3
<i>p</i> -ksylen	9.8	9.2	10.0
Aceton	23.4	22.3	22.5
Octan etylu	18.1	17.3	17.3

Na podstawie zestawionych w tabeli wyników oraz chromatogramów można zauważyć, że:

- czasy retencji na kolumnach z solami kwasów cholowych dla węglowodorów alifatycznych są dłuższe niż na porównawczej kolumnie matrycowej. Świadczy to o oddziaływaniu struktur micelarnych z cząsteczkami analitu,
- dla węglowodorów aromatycznych czasy retencji otrzymane na kolumnie matrycowej oraz kolumnach modyfikowanych cholanami, przyjmują zbliżone wartości. W badanych warunkach cząsteczki te nie oddziałują z układem zagregowanym.
- czasy retencji uzyskane na kolumnach modyfikowanych cząsteczkami surfaktantów są dla związków o charakterze polarnym niższe niż na kolumnie

porównawczej. Proces przejścia analitu do czystej fazy rozpuszczalnika w stosunku do przejścia do fazy micelarnej jest bardziej uprzywilejowany,

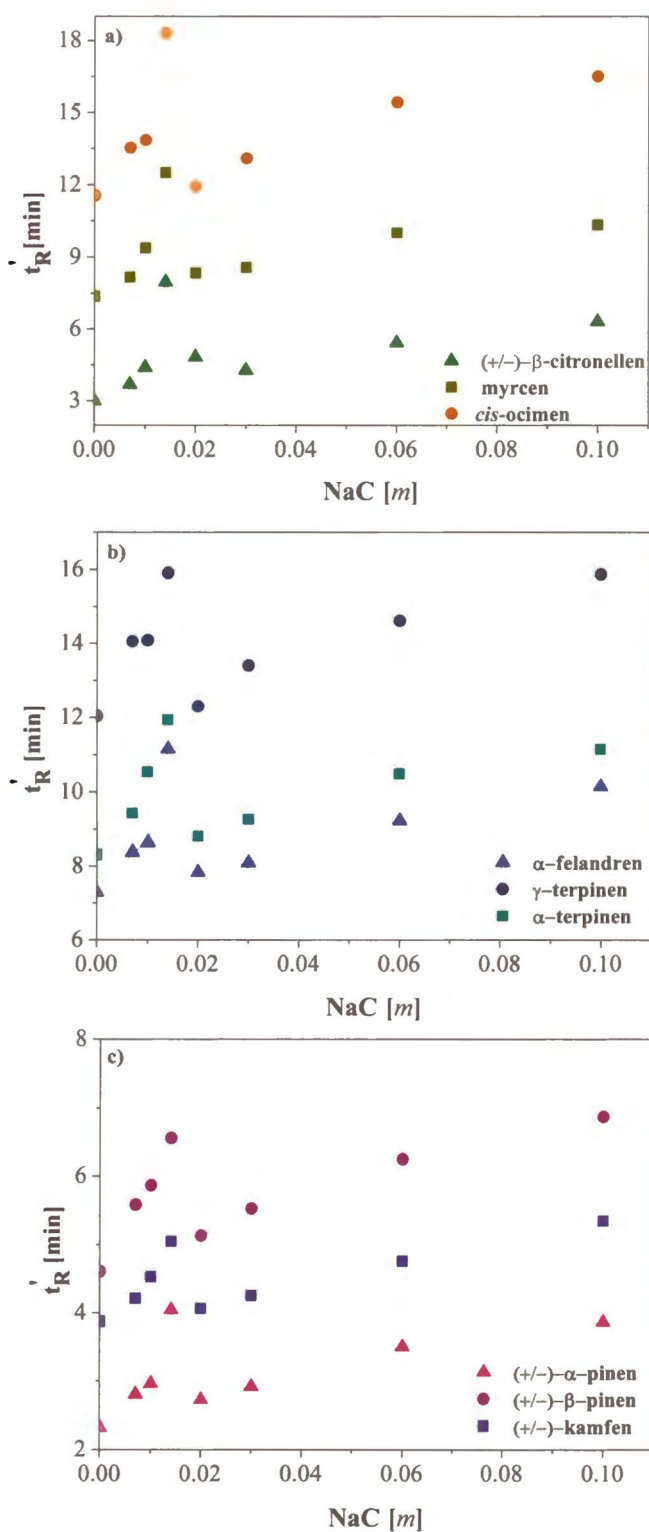
- w badanych układach cholanu i deoksycholanu sodu nie zauważono dostrzegalnej enancjoselektywności, jak również nie zaobserwowano zwiększenia selektywności wobec izomerów konstytucyjnych. W porównaniu z kolumną matrycową zaobserwowano polepszenie rozdzielania mieszaniny węglowodorów alifatycznych. Kolejność wymywania badanych związków nie ulega zmianie.

Powyższe wyniki stały się punktem wyjściowym przeprowadzenia badań w szerokim zakresie stężeńowych dla cholanu i deoksycholanu sodu, ze szczególnym uwzględnieniem obszaru bliskiego punktu CMC.

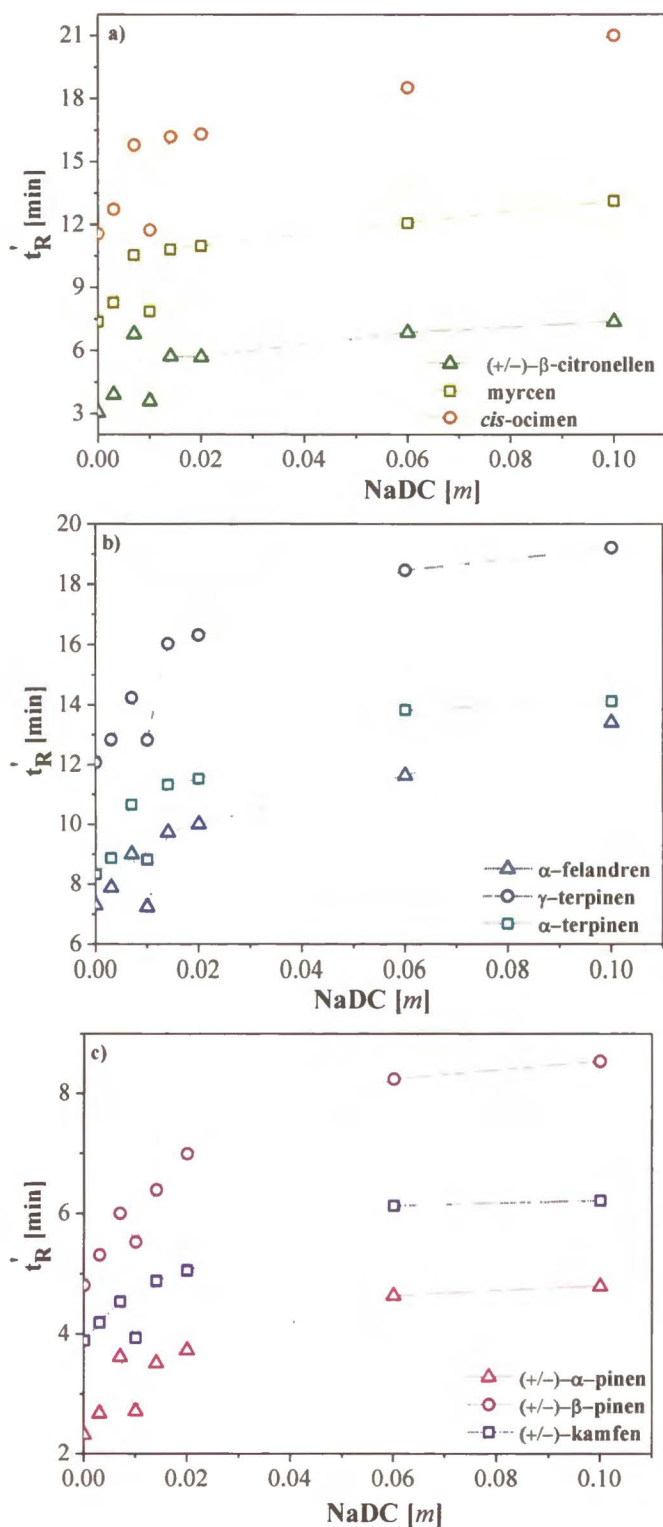
7.3.2 Wpływ stężenia cholanu sodu i deoksycholanu sodu na podstawowe parametry chromatograficzne

Aby zbadać wpływ stężenia cholanu i deoksycholanu sodu na podstawowe parametry chromatograficzne, przygotowano serie faz stacjonarnych modyfikowanych surfaktantem o stężeniach zarówno powyżej, poniżej jak i w pobliżu wyznaczonego metodą napięcia powierzchniowego punktu CMC.

Na Rys. 7.6 przedstawiono wyniki uzyskane na kolumnach z cholanem sodu (NaC) dla cząsteczek należących do grupy monoterpenu. Dla wszystkich badanych węglowodorów alifatycznych zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia monomerów NaC w fazie stacjonarnej w zakresie stężeń 0-14 mm, następuje szybki wzrost czasów retencji badanych związków. Po osiągnięciu wartości maksymalnej dla 14 mm NaC, obserwowano ich szybki spadek dla stężenia 20 mm NaC. Stężenie to jest bliskie krytycznemu stężeniu micelarnemu (17 mM). Wartość t'_R w tym punkcie dla żadnego z badanych związków nie była niższa niż otrzymana na kolumnie porównawczej. W zakresie stężeń powyżej 20 mm NaC, czyli dla obszaru fazy micelarnej, zaobserwowano ponowny wzrost czasów retencji. Przyrosty te są jednak bardziej umiarkowane w porównaniu z obszarem stężeń niezagregowanego surfaktantu.



Rys. 7.6 Zależność zredukowanych czasów retencji dla monoterpenu acyklicznego(a), monocyklicznego (b), bicyklicznego (c) od stężenia cholanu sodu (NaC); temp. 30°C



Rys. 7.7 Zależność zredukowanych czasów retencji dla monoterpenu acyklicznego(a), monocyklicznego (b), bicyklicznego (c) od stężenia deoksycholenu sodu (NaDC); temp. 30°C

Porównując czasy retencji acyklicznych, monocyklicznych i bicyklicznych węglowodorów otrzymane na kolumnach z cholanem sodu, silniej z NaC oddziałują cząsteczki o budowie acyklicznej niż mono- i bicykliczne.

Analogicznie pomiary przeprowadzono dla układu deoksycholany sodu (NaDC). Uzyskane zależności przedstawiono na Rys. 7.7. Przebieg krzywych jest podobny do tych uzyskanych dla układu NaC. W obszarze niezagregowanego surfaktantu (0 - 7mm) zaobserwowano wzrost czasów retencji związków modelowych. W obszarze bliskim krytycznemu stężeniu micelarnemu NaDC, następował znaczny spadek czasów retencji. Dalszy wzrost stężenia surfaktantu w formie zagregowanej (20 - 100 mm) wpływał na wzrost wyznaczonych zredukowanych czasów retencji. W porównaniu z układem trójhydroksylowego NaC, dwuhydroksylowy NaDC w obszarze micelarnym, silniej oddziałuje z cząsteczkami węglowodorów alifatycznych. Niepolarne molekuly analitów bardziej preferują przejście z fazy roztworu do fazy micelarniej surfaktantu o mniejszej polarności.

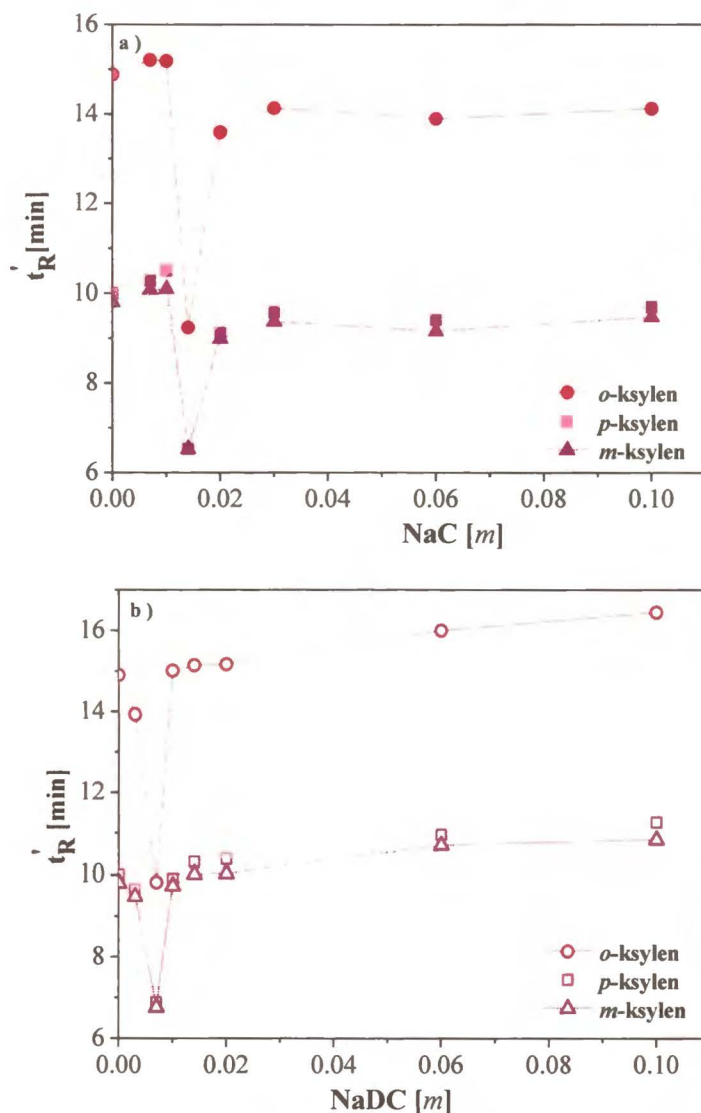
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że przebieg krzywych stężeniowych ściśle zależy od formy mononerycznej lub zagregowanej surfaktantu w roztworze formamidowym. Obserwowana nieciągłość zależności koresponduje z przejściem surfaktantu z formy wolnej do formy micelarniej i odpowiada punktowi CMC.

Zarówno dla cholany jak i dla deoksycholany sodu w całym zakresie badanych stężeń nie zauważono dostrzegalnej enancjoselektywności, jak również w porównaniu w kolumną odniesienia, brak jest wyraźnego wpływu na proces rozróżnienia izomerów konstytucyjnych.

7.3.2.1 Anomalne zachowanie węglowodorów aromatycznych i związków polarnych na fazach cholany

Na Rys. 7.8 przedstawiono wyniki dla izomerów *orto*-, *meta*- i *para*- ksylenu uzyskane na fazach stacjonarnych modyfikowanych cząsteczkami cholany sodu (NaC) lub deoksycholany sodu (NaDC). W zakresie stężeń 0-7 mm NaC (Rys. 7.1a) nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy otrzymanymi czasami retencji dla danego izomeru ksylenu. Dla stężenia 14 mm NaC odnotowano nieoczekiwany spadek czasu retencji. W porównaniu z kolumną matrycową, uzyskane wartości są około 35% mniejsze. Wydaje się, że obserwowana redukcja czasów retencji jest wynikiem niekorzystnych zmian zachodzących na powierzchni fazy stacjonarnej ograniczających

proces sorpcji analitu. Dalszy wzrost stężenia surfaktantu w fazie stacjonarnej wpływa na ponowny przyrost czasu retencji do osiągnięcia stanu plateau.

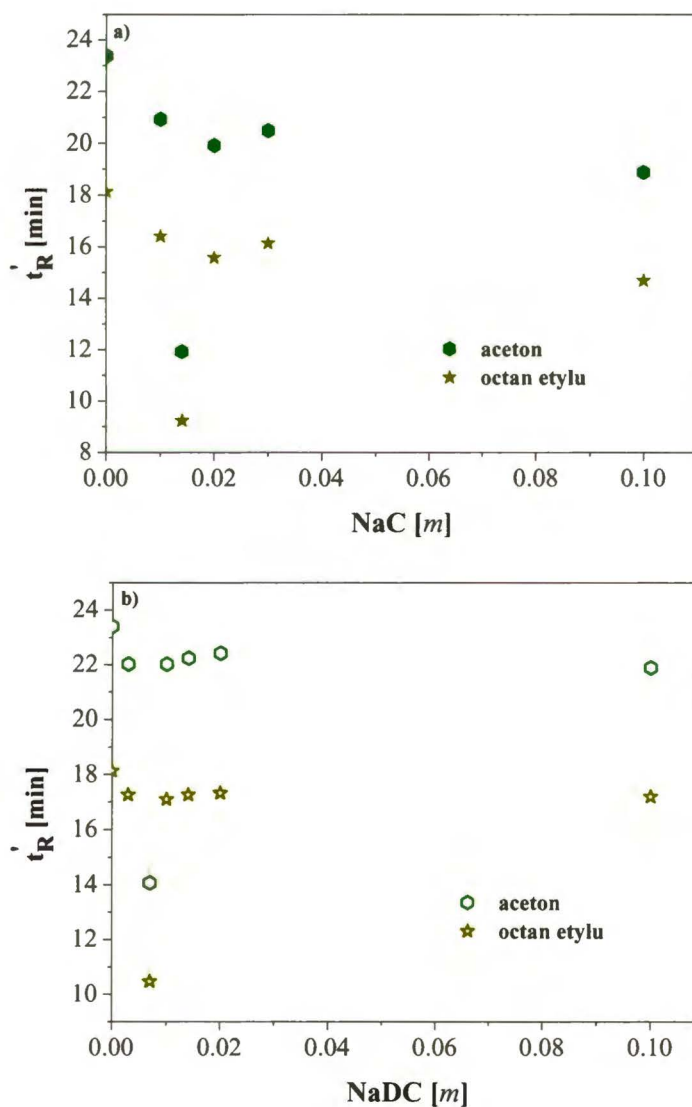


Rys. 7.8 Zależność zredukowanego czasu retencji dla izomerów ksyleneń w funkcji stężenia cholanu sodu (a) lub deoksycholanu sodu (b); temp.: 30°C

Analogiczną zależność uzyskano dla izomerów ksyleneń na fazach modyfikowanych deoksycholaniem sodu (Rys. 7.1b). W tym przypadku istotną redukcję czasów retencji odnotowano dla stężenia 7 mm NaDC. Spadek zredukowanych czasów retencji w stosunku do kolumny porównawczej wyniósł 34% i 31%, odpowiednio dla *orto*- oraz

meta- i *para*- ksyleny. W zakresie stężeń 10 – 100 μM nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy otrzymanymi czasami retencji w porównaniu z kolumną matrycową.

W grupie początkowo wybranych związków modelowych, ze względu na naturę badanego procesu, znajdowały się jedynie cząsteczki o charakterze hydrofobowym. Na podstawie uzyskanych interesujących wyników, postanowiono powiększyć badaną grupę o cząsteczki o charakterze polarnym. Zakładano, że ze względu na właściwości fizykochemiczne, nie będą oddziaływały z układami micelnymi i będą mogły pełnić rolę substancji odniesienia.



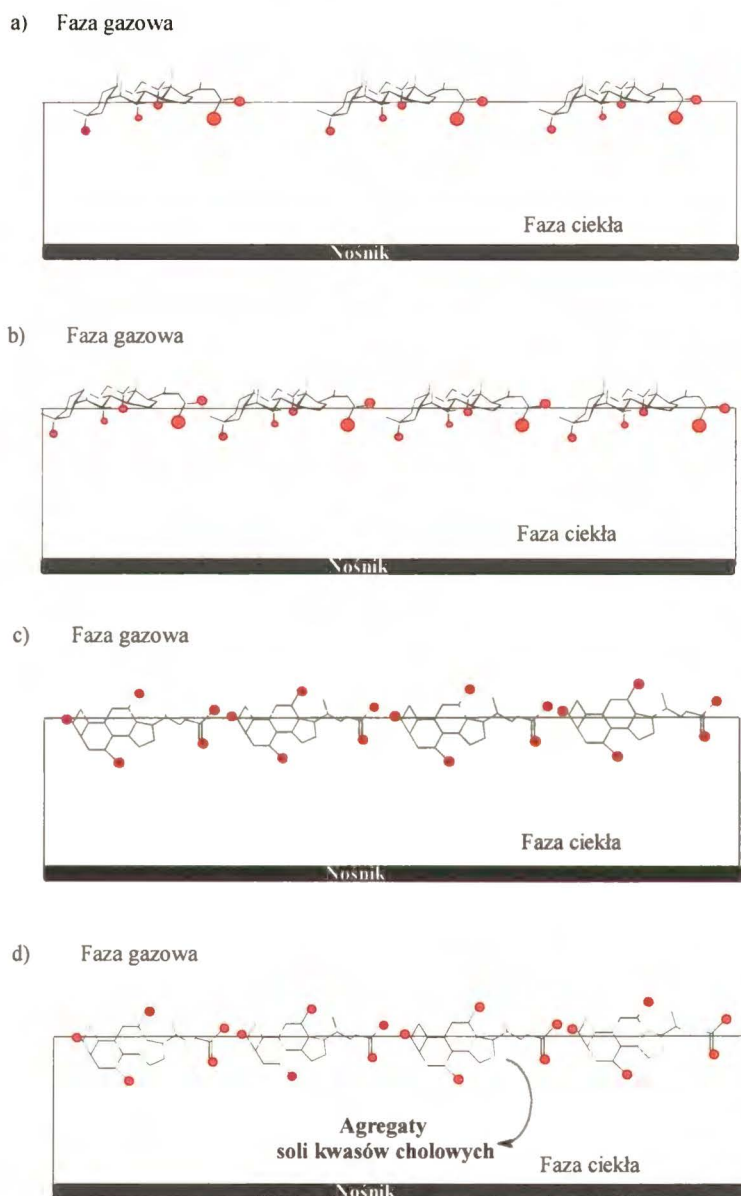
Rys. 7.9 Zależność zredukowanych czasów retencji dla badanych związków polarnych w funkcji stężenia cholanu sodu (a) lub deoksycholanu sodu (b); temp.: 30°C

Na Rys. 7.9 przedstawiono wyniki uzyskane dla acetonu i octanu etylu, otrzymane na kolumnach modyfikowanych NaC (Rys. 7.9a) oraz NaDC (Rys. 7.9b). Nieoczekiwanie, przebieg procesu dla obu cząsteczek jest identyczny z opisany powyżej dla węglowodorów aromatycznych. Skrócenie czasów retencji na kolumnie o stężeniu 14 mm NaC dla acetonu i octanu etylu nastąpiło o 49%, natomiast na kolumnie 7 mm NaDC odnotowano spadek czasów o 40% i 42%, odpowiednio dla acetonu i octanu etylu. W przedziale stężeń 20 - 100 mm dla NaC oraz 10 - 100 mm dla NaDC, czasy retencji analitów osiągnęły wartość stałą, niższą w porównaniu z otrzymaną na kolumnie matrycowej.

Skrócenie czasów retencji na kolumnach modyfikowanych surfaktantem w stosunku do kolumny matrycowej jest zjawiskiem zaskakującym i nietypowym. Jak w przypadku związków polarnych można by to tłumaczyć większym powinowactwem do polarnej fazy rozpuszczalnika, tak w przypadku węglowodorów aromatycznych bardziej naturalne wydawałoby się oddziaływanie z fazą micelarną, czego nie zaobserwowano. Analiza procesu oparta na otrzymanych zależnościach stężeniowych dla całej grupy związków modelowych, pozwala postawić następującą hipotezę:

Sole kwasów cholowych należą do grupy planarnych amfifili o dość sztywnej konstrukcji. W zakresie stężeń poniżej punktu CMC, czyli obszarze wolnego surfaktantu, jest bardzo prawdopodobne, iż monomery cholanów leżą płasko na powierzchni formamidu, grupami hydroksylowymi zwróconymi w kierunku fazy ciekłej (Rys. 7.10a). Wzrost stężenia surfaktantu powoduje akumulację monomerów w obrębie obszaru międzyfazowego. Wpływa to na gęstsze upakowanie monomerów cholanów w warstwie powierzchniowej (Rys. 7.10b). Efekt ten pozostaje w zgodności z opisany przez Tissa [125] dla soli kwasów cholowych zaobserwowany na granicy faz woda/powietrze. Na otrzymanych krzywych stężeniowych odpowiada to punktowi maksymalnej lub minimalnej wartości zredukowanych czasów retencji odpowiednio dla węglowodorów alifatycznych lub węglowodorów aromatycznych. W pobliżu punktu CMC badanych układów surfaktantów, następuje zjawisko całkowitego nasycenia powierzchni. Gęste upakowanie cząsteczek cholanów w sztywno uporządkowanej warstwie, sprzyja procesowi reorganizacji orientacji molekuł z płaskiej na prostopadłą z powierzchniami hydrofobowymi zwróconymi do siebie (Rys. 7.10c). Dalszy wzrost stężenia amfifila indukuje tworzenie form zagregowanych, przy stałym stężeniu

monomerów (Rys. 7.10d). Analogiczny proces zmiany orientacji cząsteczek został opisany przez Almgrena et.al. [126] dla układu NaC i NaDC w roztworze wodnym.



Rys. 7.10 Schematyczne przedstawienie organizacji cząsteczek soli kwasów cholowych w fazie stacjonarnej w obszarze stężeń poniżej punktu CMC (a, b), blisko punktu CMC (c), powyżej punktu CMC (d).

Powróćmy zatem do otrzymanych krzywych stężeniowych. Wzrost czasów retencji dla ksylenów i molekuł polarnych lub spadek czasów retencji dla monoterpenów punkcie 20 mm NaC oraz 10 mm NaDC, można wytłumaczyć procesem zmiany orientacji molekuł surfaktantu na powierzchni międzyfazowej. W efekcie powoduje to częściowe odsłonięcie powierzchni polarnej rozpuszczalnika, przez co staje się ona bardziej

dostępna dla cząsteczek polarnych i izomerów ksylenów. Zmniejszeniu ulega natomiast hydrofobowa powierzchnia oddziaływania pomiędzy cząsteczkami surfaktantu a węglowodorami alifatycznymi. O ile łatwo zrozumieć większe powinowactwo polarnych cząsteczek w stosunku do formamidu, o tyle zaskakującym jest preferowanie fazy objętościowej polarnego rozpuszczalnika przez cząsteczki badanych węglowodorów aromatycznych. Logicznym wydawałby się proces oddziaływania niepolarnych cząsteczek z hydrofobowym wnętrzem miceli. To nietypowe zjawisko można próbować wytłumaczyć w oparciu o obliczenia kwantowo-mechaniczne. Thomas et.al. [127] badając proces zwijania łańcuchów polipeptydowych, rozważył proces oddziaływania benzenu z atomem tlenu cząsteczki formamidu. Przeprowadzone obliczenia metodami *ab initio* wykazały istnienie niespecyficznego, krótkozasięgowego oddziaływania pomiędzy tlenem grupy karbonylowej a elektronami π pierścienia aromatycznego. Przy orientacji prostopadłej formamidu do benzenu, w zależności od odległości energia oddziaływania O/π wynosiła od około -20.9 kJ/mol do -10.5 kJ/mol. Dla porównania wartość entalpii swobodnej (ΔG^0) rozpuszczania benzenu w chowanie sodu (NaC/H₂O; liczba agregacji 8.6) wyznaczona przez Sugioaka [128] wynosi -10.2 kJ/mol.

7.4 Badania temperaturowe

Pomiary w warunkach chromatografii gazowej prowadzone są w temperaturach wyższych niż temperatura otoczenia. Wysoka temperatura układu może jednak doprowadzić do deagregacji układu micelarnego. Aby sprawdzić termiczną stabilność faz stacjonarnych modyfikowanych cząsteczkami surfaktantu postanowiono przeprowadzić pomiary temperaturowe. Do badań wybrano acykliczną cząsteczkę β -citronellenu, monocykliczny α -terpinen, bicykliczny α -pinen oraz *orto*-ksylen. Pomiary przeprowadzono na kolumnach o stężeniach surfaktantów zarówno poniżej, blisko oraz powyżej stężenia CMC, jak również na kolumnie odniesienia.

7.4.1 Opis termodynamiczny sorpcji analitu na fazach ciekłych modyfikowanych cząsteczkami surfaktantu

Podstawowe parametry chromatograficzne są często wykorzystywane do obliczeń wartości funkcji termodynamicznych procesu przejścia analitu z fazy

ruchomej do fazy stacjonarnej. Najważniejszą zależnością łączącą entalpię przejścia (ΔH^0) ze stałą równowagi procesu przeniesienia masy (K), jest relacja van't Hoffa opisana równaniem:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{Równ. 7.7}$$

ponieważ

$$k = \phi \cdot K \quad \text{Równ. 7.8}$$

zatem dla procesu chromatograficznego relację van't Hoffa wyraża zależność:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad \text{Równ. 7.9}$$

gdzie k jest współczynnikiem retencji, ΔH^0 i ΔS^0 są odpowiednio zmianą entalpii i entropii związaną z przejściem z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej, ϕ wyraża stosunek objętości fazy stacjonarnej do fazy ruchomej, R jest stałą gazową, T wyraża temperaturę w skali Kelvina. Odstępstwa od liniowej zależności van't Hoffa najczęściej wynikają ze złożonego mechanizmu retencji. Wyznaczenie wówczas wartości funkcji termodynamicznych bez wprowadzenia odpowiednich poprawek jest niemożliwe.

Rozpatrzmy układ fazy stacjonarnej modyfikowanej cząsteczkami surfaktantu. Dla kolumny matrycowej, w której zachodzi jedynie proces podziału, wyznaczona wartość ΔH_I opisuje entalpię procesu transportu masy składnika S z fazy gazowej do fazy ciekłej.

W obszarze stężeń poniżej punktu CMC obok procesu sorpcji zachodzi dodatkowo proces oddziaływania analitu z monomerami w fazie ciekłej. Wyznaczona entalpia przejścia ΔH_{II} będzie zatem sumą entalpii dwóch procesów: przejścia z fazy gazowej do stacjonarnej oraz oddziaływania analitu z wolnymi cząsteczkami surfaktanta (ΔH_{mon}):

$$-\Delta H_{II} = -(\Delta H_I + \Delta H_{mon}) \quad \text{Równ. 7.10}$$

W punkcie bliskim stężeniu CMC, kiedy powierzchnia fazy ciekłej jest gęsto upakowana molekułami surfaktantu, wyznaczona wartość zmiany entalpii ΔH_{III} opisuje równanie:

$$-\Delta H_{III} = -(\Delta H_I + \Delta H_{cmc}) \quad \text{Równ. 7.11}$$

gdzie ΔH_{cmc} wyznacza entalpię oddziaływania analitu z cząsteczkami surfaktantu w punkcie CMC.

Powyżej punktu CMC w obecności agregatów w fazie ciekłej, niepolarna cząsteczka analitu może przechodzić do hydrofobowego rdzenia miceli. Energię przejścia ΔH_{IV} w tym układzie opisuje równanie:

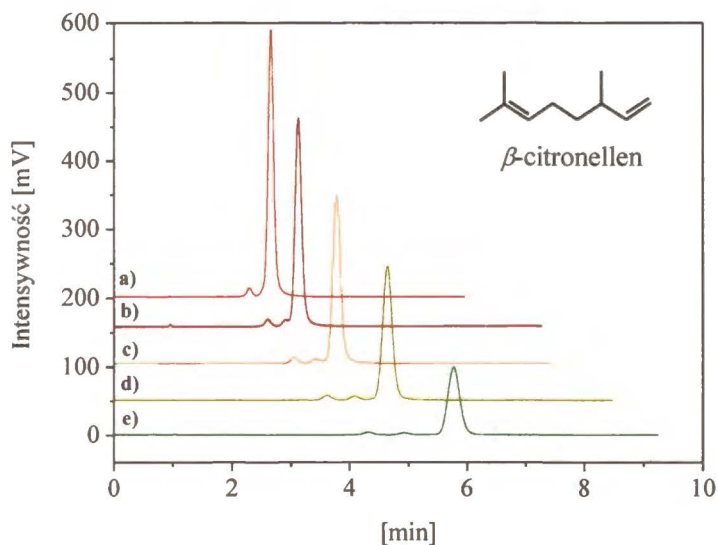
$$-\Delta H_{IV} = -(\Delta H_I + \Delta H_{cmc} + \Delta H_{mic}) = -(\Delta H_{III} + \Delta H_{mic}) \quad \text{Równ. 7.12}$$

gdzie ΔH_{mic} oznacza entalpię oddziaływania analitu z agregatem w ciekłej fazie stacjonarnej.

W powyższym opisie termodynamicznym sorpcji analitu, założono brak wpływu cząsteczki analizowanej na proces micelizacji cholanów w fazie stacjonarnej. Jednym z wielu czynników, które mogą modyfikować proces agregacji w polarnych rozpuszczalnikach jest cząsteczka związku analizowanego [30]. Shaw wykazał jednak, że dopóki stężenie analitu w rozpuszczalniku jest dużo mniejsze niż stężenie surfaktantu ($C_{surf} \gg C_{analit}$), efekt wpływu cząsteczki badanej na micelizację jest nieznaczny i może być pominięty w rozważaniach [129].

7.4.2 Wyznaczenie wartości entalpii oddziaływania dla analitu w układzie formamidowego roztworu surfaktantu

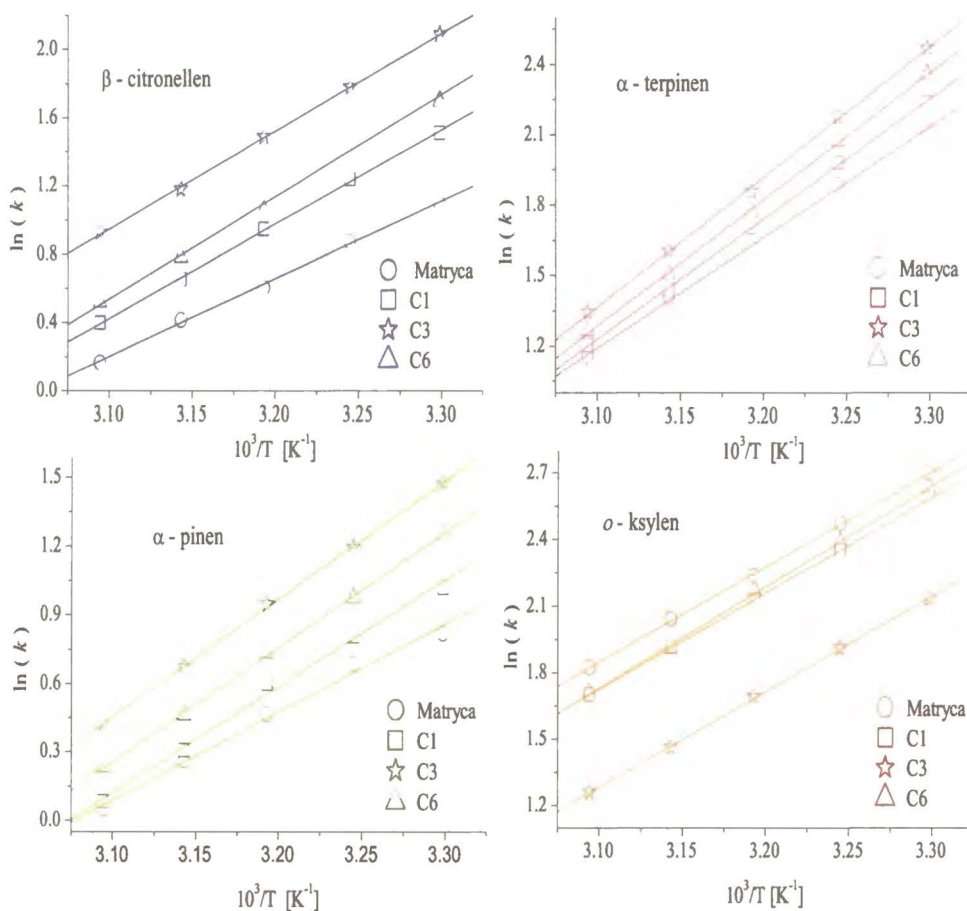
Na Rys. 7.11 przedstawiono wpływ temperatury na proces elucji acyklicznego monoterpenu na fazie stacjonarnej modyfikowanej deoksycholanem sodu.



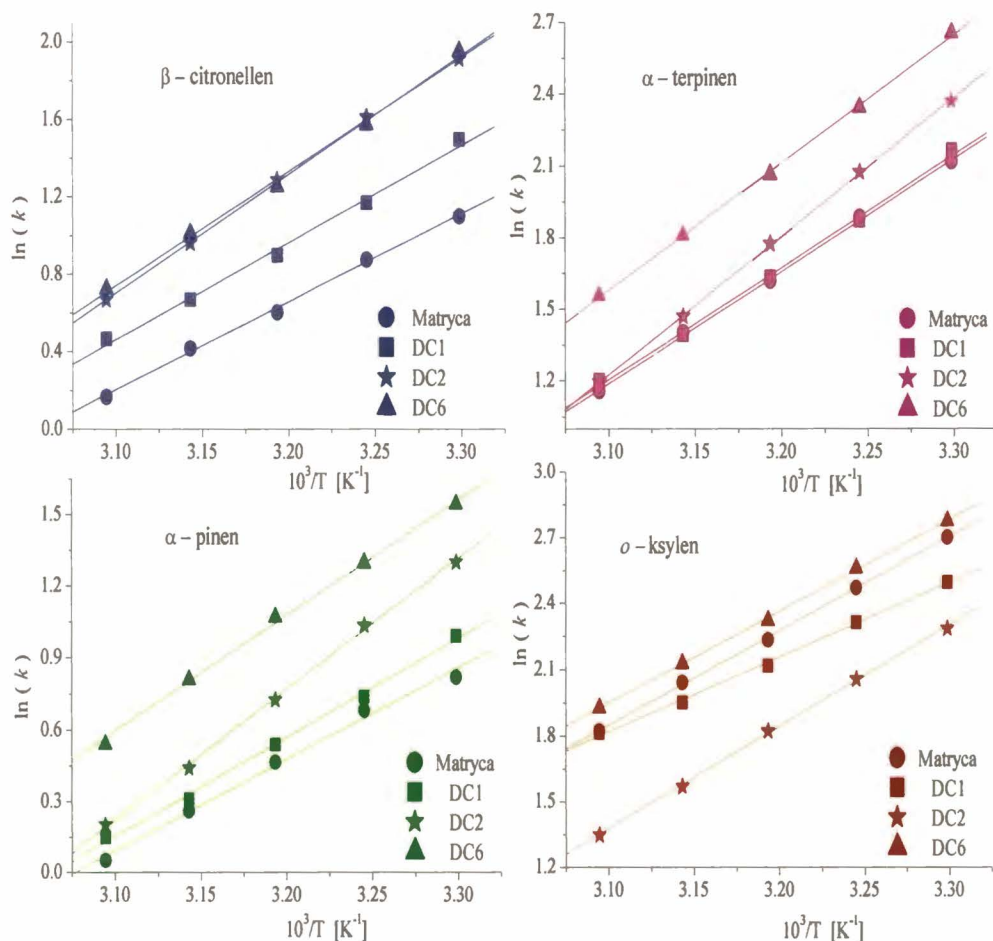
Rys. 7.11 Chromatogramy uzyskane dla cząsteczki β -citronellenu na kolumnie 60 mm NaDC w temperaturze 30°C (a.) 35°C (b) 40°C (c) 45°C (d) 50°C (e)

Dla wszystkich modelowych cząsteczek w badanym zakresie temperatur (30⁰-50⁰C) odnotowano skrócenie czasów retencji. Kształt i symetria pików nie uległy zmianie.

Na Rys. 7.12 i Rys. 7.13 zamieszczono przykładowe zależności temperaturowe otrzymane na fazach modyfikowanych odpowiednio cholanem sodu (NaC) lub deoksycholanem sodu (NaDC). Otrzymane relacje są liniowe w badanym zakresie temperatur ze współczynnikiem dopasowania $R^2 > 0.992$. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w badanym zakresie temperatur zarówno dla faz o stężeniu surfaktantu poniżej punktu **CMC**, jak również w obszarze struktur micelarnych, brak jest odchyłeń od liniowości. Potwierdza to termiczną stabilność badanych faz stacjonarnych w zakresie 30⁰-50⁰C.



Rys. 7.12 Zależności van't Hoffa dla cząsteczek modelowych otrzymane na wybranych fazach stacjonarnych modyfikowanych cholanem sodu: 0 mm (Matryca), 7 mm (C1), 14 mm (C3), 60 mm (C6); warunki analizy: zakres temperatur: 300-500C, przepływ gazu nośnego: 40.0 ml/min; kolumny szklane 2 m x 4 mm



Rys. 7.13 Zależności van't Hoffa dla cząsteczek modelowych otrzymane na wybranych fazach stacjonarnych modyfikowanych deoksychohanem sodu: 0 mm (Matryca), 3 mm (DC1), 7 mm (DC2), 60 mm (DC6); warunki analizy: zakres temperatur: 30⁰-50⁰C, przepływ gazu nośnego: 40.0 ml/min; kolumny szklane 2 m x 4 mm

Z nachylenia prostej opisanej zależnością van't Hoffa (Równ. 7.9) wyznaczono wartości zmian entalpii procesu przejścia dla poszczególnych układów chromatograficznych: w obszarze stężeń monomerów, blisko punktu CMC oraz zakresie stężeń form zagregowanych. Otrzymane wartości ΔH_I , ΔH_{II} , ΔH_{III} , ΔH_{IV} przedstawiono w Tab. 7.2.

Tab. 7.2 Zmiana entalpii przejścia [kJ/mol] oraz zmiana entalpii oddziaływania [kJ/mol] analitu z NaC lub NaDC w fazie stacjonarnej.

	kolumna	β -citronellen	α -terpinen	α -pinen	o-ksylen
<i>Bez surfaktantu</i>					
$-\Delta H_I$	Matryca	37.82 (0.998)	39.07 (0.998)	31.92 (0.992)	35.58 (0.998)
<i>Cholan sodu (NaC)</i>					
$-\Delta H_{II}$	C3	47.55 (0.998)	45.88 (0.998)	42.81 (0.998)	35.75 (0.998)
$-\Delta H_{III}$	C4	44.81 (0.998)	41.39 (0.998)	38.57 (0.998)	36.57 (0.996)
$-\Delta H_{IV}$	C6	47.97 (0.999)	44.72 (0.998)	41.57 (0.998)	37.92 (0.998)
$-\Delta H_{mon}$		9.73	6.81	10.89	0.17
$-\Delta H_{cmc}$		6.99	2.32	6.65	0.99
$-\Delta H_{mic}$		3.16	3.33	3.00	1.25
<i>Deoksyholan sodu (NaDC)</i>					
$-\Delta H_{II}$	DC2	51.21 (0.998)	47.96 (0.998)	45.56 (0.998)	38.48 (0.998)
$-\Delta H_{III}$	DC3	42.48 (0.997)	40.25 (0.998)	34.58 (0.997)	34.41 (0.999)
$-\Delta H_{IV}$	DC5	49.22 (0.994)	45.06 (0.998)	40.23 (0.994)	34.58 (0.998)
$-\Delta H_{mon}$		13.39	8.89	13.64	2.90
$-\Delta H_{cmc}$		4.66	1.18	2.66	-1.17
$-\Delta H_{mic}$		6.74	4.81	5.65	0.17

(R^2)= współczynnik dopasowania

Zmiany entalpii oddziaływania surfaktantu w formie wolnej, zagregowanej oraz punkcie bliskiemu CMC z cząsteczką analitu wyliczono z równań 7.10-7.12. Wyznaczone wartości ΔH_{mon} , ΔH_{cmc} oraz ΔH_{mic} , zamieszczono w Tab. 7.2. Wartości zmian entalpii dla układu micelarnego określono na jedną cząsteczkę surfaktantu. Jak do tej pory brak jest informacji dotyczących liczby agregacji i struktury miceli soli kwasów cholowych w formamidzie.

Na podstawie zestawionych w tabeli wyników zauważono, że zmiana entalpii oddziaływania pomiędzy analitem a monomerami w porównaniu z formami zagregowanymi cholanu lub deoksycholanu sodu, jest większa. Sugeruje to, że cząsteczki surfaktantu w agregacie w fazie ciekłej, ustawione są powierzchniami hydrofobowymi do siebie (ang. *back-to-back stacking*), przez co relatywnie zmniejszona zostaje hydrofobowa powierzchnia kontaktu pomiędzy niepolarnym analitem a surfaktantem. Porównując wartości zmian entalpii oddziaływania pomiędzy węglowodorami alifatycznymi a układem cholanu lub deoksycholanu sodu, zaobserwowano, że $|\Delta H_{\text{mon}}|$ i $|\Delta H_{\text{mic}}|$ przyjmuje większe wartości dla soli kwasu dwuhydroksylogowego (NaDC), podczas gdy $|\Delta H_{\text{cmc}}|$ jest większe dla soli kwasu trójhdroksylogowego (NaC). Większą wartość $|\Delta H_{\text{mic}}|$ dla NaDC można tłumaczyć mniejszą polarnością cząsteczki. Tworzone agregaty NaDC zapewniają bardziej hydrofobowe mikrośrodowisko dla cząsteczek węglowodorów alifatycznych niż micelle NaC. Wyższa wartość $|\Delta H_{\text{cmc}}|$ dla cholanu sodu może być konsekwencją korzystniejszego upakowania surfaktantu na powierzchni fazy stacjonarnej. Z badań napięcia powierzchniowego wynika, że dla cholanu sodu w punkcie CMC mamy powierzchnie gęściej upakowaną cząsteczkami (większe ciśnienie powierzchniowe). Bardziej rozwinięta powierzchnia hydrofobowa wpływa korzystniej na proces oddziaływania z niepolarnym analitem.

Bez względu na stężenie surfaktantu NaC lub NaDC w fazie ciekłej zmiana entalpii oddziaływania dla cząsteczki *orto*-ksylenu jest bliska zeru.

8

***SOLE KWASÓW CHOLOWYCH JAKO CHIRALNE
MODYFIKATORY FAZY RUCHOMEJ
W WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ***

Projekt dotyczący zastosowania soli kwasów cholowych jako modyfikatorów fazy ruchomej zrealizowano w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pionierskie badania w tym temacie wykonał Hinze w latach dziewięćdziesiątych [106,107]. Opisane w literaturze dane są jednak niesystematyczne i niewystarczające do charakterystyki chiralnych cholanowych faz ruchomych.

8.1 Badanie adsorpcji cholanów na fazie stacjonarnej C18

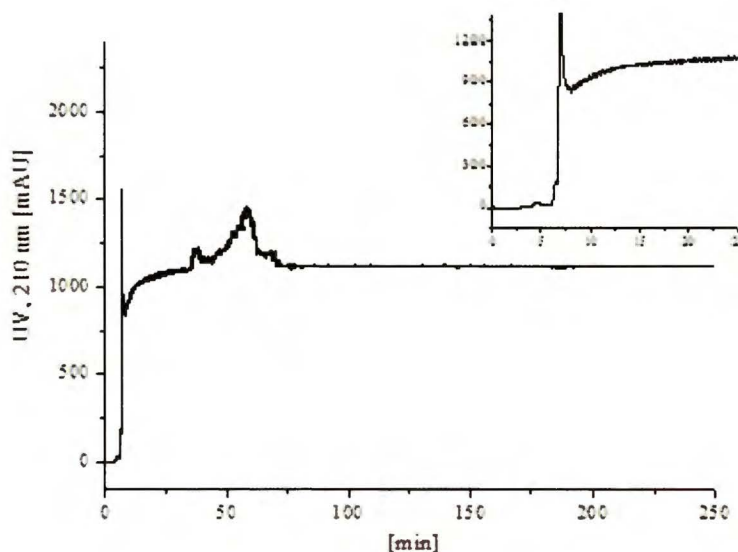
Do głównych własności cząsteczek amfifilowych należą: możliwość tworzenia struktur micelarnych w roztworach wodnych oraz adsorpcja fizyczna molekuł na powierzchni międzyfazowej. Adsorpcja soli kwasów cholowych na fazach stacjonarnych jest ubogo opisana w literaturze. Informacja ta jest jednak niezbędna do przeprowadzenia planowanych eksperymentów. Jak wiadomo adsorpcja surfaktantów na fazach stacjonarnych w układzie RP, zależy nie tylko od typu amfifila, ale również od środowiska np. dodatków organicznych, temperatury.

Tab. 8.1 Charakterystyka fazy stacjonarnej użytej kolumny-dane producenta www.phenomenex.com

Kolumna	Powierzchnia właściwa [m ² /g]	Zawartość węgla [%]	Pokrycie fazy [μmol/m ²]	Masa fazy stacjonarnej [g]	Zakres pracy pH
LUNA C18(2)	400	17.5	3.0	0.1143	1.5-10

Na Rys. 8.1 zamieszczono otrzymaną krzywą przejścia dla 100 mM wodnego roztworu cholanu sodu (NaC). Pomiary przeprowadzono na fazie C18 (ang. *octadecylsilica*

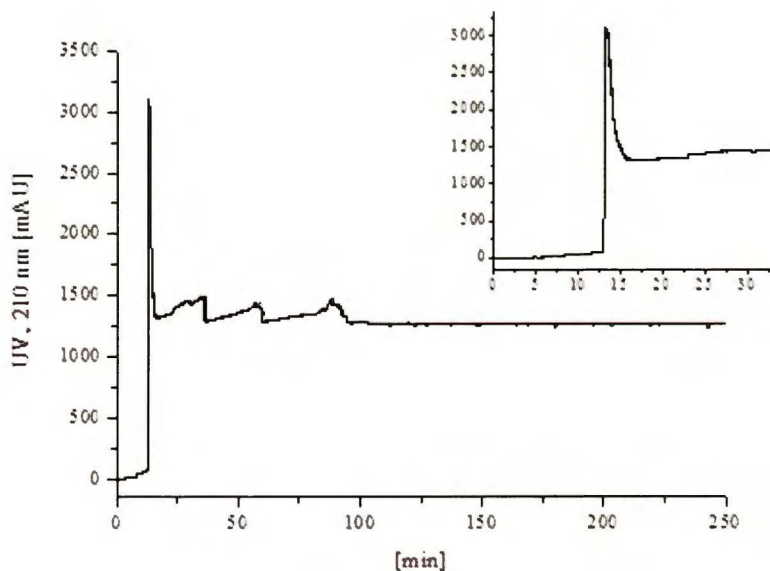
column, ODS) w temperaturze pokojowej w przepływie 0.04 ml/min (Tab. 8.1). Czas retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie wynosił 2.2 min.



Rys. 8.1 Chromatograficzna krzywa przejścia dla wodnego roztworu 100 mM NaC; warunki: detekcja 210 nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C, kolumna: ODS (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

Przedstawiona krzywa adsorpcji cholanu na fazie stacjonarnej jest podobna do otrzymanej przez Hu [130] dla zwitterjonowych surfaktantów o budowie planarnej (CHAPS, CHAPSO). W przebiegu krzywej zauważono trzy etapy. W pierwszym (0-4 min), pomimo przejścia eluentu przez kolumnę, sygnał z detektora pozostał niezmienny. Sugeruje to, że cały surfaktant zawarty w fazie ruchomej uległ adsorpcji na fazie ODS. Znając stężenie surfaktantu, przepływ fazy ruchomej oraz masę wypełnienia kolumny wyznaczono przybliżoną masę zaadsorbowanego surfaktantu w pierwszym etapie. Obliczona masa zaadsorbowanego surfaktantu na 1 g wypełnienia kolumny wynosiła ok. 58.6 mg. W drugim etapie (4-6.5 min) zaobserwowano wzrost wartości sygnału detektora (absorbancji), co sugeruje obecność cholanu sodu w fazie ruchomej. Wzrost ten jednak jest nieznaczny i świadczy o tym, że stan równowagi nie został osiągnięty i proces adsorpcji nadal postępuje. Po ok. 7 min. na krzywej przejścia NaC zanotowano ostry pik. Wydaje się, że obserwowany nagły wzrost i spadek sygnału może wynikać z niehomogeniczności fazy ruchomej na wyjściu z kolumny. Po ok. 75 min absorbancja osiągnęła wartość stałą, równą absorbancji roztworu

wejściowego. Dalsze przemywanie fazy stacjonarnej wodnym roztworem cholanu sodu nie wpłynęło na proces adsorpcji surfaktantu. Zakładając, że adsorpcja surfaktantu następuje w pierwszym i drugim etapie, obliczona masa zaadsorbowanego cholanu sodu na 1 g wypełnienia kolumny LUNA C18(2) wynosiła 99.7 mg



Rys. 8.2 Chromatograficzna krzywa przejścia dla wodnego roztworu 100 mM NaDC; warunki: detekcja 210nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C kolumna: ODS (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

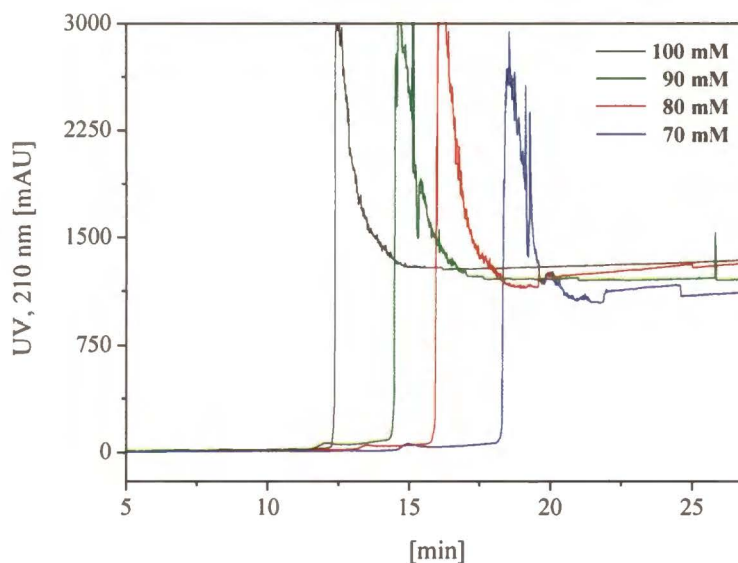
Analogiczną krzywą przejścia uzyskano dla wodnego roztworu deoksycholanu sodu (NaDC) (Rys. 8.2). Czas retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie wynosił 2.2 min. W przypadku roztworu NaDC obliczona masa surfaktantu, osadzona na fazie ODS w pierwszym (ok. 114 mg/g) oraz drugim etapie przemywania, jest dwukrotnie wyższa (ok. 185 mg/g) niż dla roztworu bardziej polarnego NaC. Po ok. 105 min, sygnał detektora osiągnął wartość stałą, co świadczy o ustaleniu się stanu równowagi procesu adsorpcja/desorpcja. Otrzymane wielkości zaadsorbowanego NaDC pozostają w zgodzie z wynikami otrzymanymi przez Hinze [106]. Wyznaczona wówczas ilość zaadsorbowanego surfaktantu NaDC na jeden gram fazy C18, w zależności od składu fazy ruchomej oraz temperatury, leżała w zakresie 80-149 mg. Otrzymane przez autora niniejszej pracy wyższe wartości adsorpcji mogą wynikać z dwóch czynników: innej struktury ziaren złoża oraz uproszczonej idei obliczeniowej (założono, że obsadzenie w pierwszym i drugim etapie przebiega w 100%).

Obok krzywych przejścia z roztworów wodnych NaC oraz NaDC, zarejestrowano również przykładowe zależności dla roztworów z dodatkiem 1% v/v rozpuszczalnika organicznego w różnych stężeniach surfaktantu. Należy podkreślić, że w przypadku metanolu i propanolu, użyte stężenie modyfikatora było poniżej jego rozpuszczalności (S) w wodzie, zaś dla alkoholu długołańcuchowego n-HepOH powyżej S (H_2O) (Tab. 8.2).

Tab. 8.2 Rozpuszczalność wybranych alkoholi w wodzie [11]

	MeOH	n-PeOH	n-HepOH
S (H_2O) [g/100g]	∞	2.4	0.1

Zarówno zmiana stężenia amfifila (Rys. 8.3) jak i dodatek modyfikatora organicznego (Rys. 8.4) nie wpłynęły na zmianę profilu krzywej. W Tab. 8.3 zamieszczono uzyskane wyniki adsorpcji.



Rys. 8.3 Chromatograficzne krzywe przejścia dla roztworu 3% v/v MeOH o stężeniu NaDC odpowiednio 0.1 M, 0.09 M, 0.08 M oraz 0.07 M; warunki: detekcja 210nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C kolumna: ODS (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Otrzymane dane pozostają w zgodności z opublikowanymi przez Berthoda [131] dla surfaktantów liniowych, sugerując zależność procesu adsorpcja/desorpcja od dodanego n-alkoholu. Zgodnie z przewidywaniem, w badanym układzie dodatek rozpuszczalnika organicznego zredukował ilość zaadsorbowanego na fazie stacjonarnej

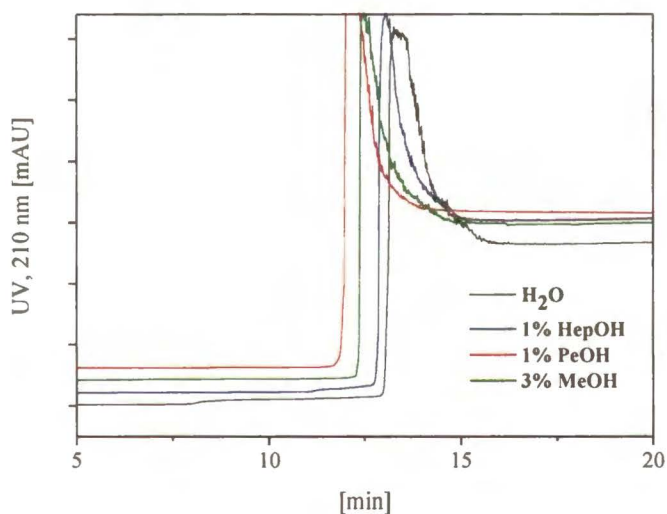
surfaktantu. Większe obsadzenie deoksychołanem sodu fazy stacjonarnej uzyskano dla roztworów z dodatkiem 1% metanolu niż 1% pentan-1-olu. Adsorpcja alkanolu oraz surfaktantu na fazie ODS są procesami konkurencyjnymi. Alkohol o długim łańcuchu węglowym jest silnie adsorbowany na fazie stacjonarnej, przez to może zmieniać organizację łańcuchów C18 i ograniczać adsorpcję surfaktantu. Alkohole krótkołańcuchowe (C1-C3) wykazują jedynie tendencję do zwilżania fazy stacjonarnej, bez zmiany orientacji łańcuchów C18 [132]. Ze względu na małe stężenie dodatku organicznego w fazie, efekt solwatacji cząsteczki surfaktantu może być pominięty.

Tab. 8.3 Wpływ stężenia surfaktantu na proces adsorpcji na fazie stacjonarnej C18(2)

Faza ruchoma	Masa zaadsorbowanego surfaktantu na 1g wypełnienia kolumny [mg]
<i>Cholan sodu NaC</i>	
0.08 M	
+ 4% v/v PeOH	91.9
0.09 M	
+ 4% v/v PeOH	91.0
0.1 M	99.7
<i>Deoksychołan sodu NaDC</i>	
0.07 M	
+ 3% v/v MeOH	182.8
0.08 M	
+ 3% v/v MeOH	182.8
0.09 M	
+ 3% v/v MeOH	182.0
0.1 M	185.5
+ 1% v/v HepOH	182.0
+ 1% v/v PeOH	166.2
+ 3% v/v MeOH	178.5

Ciekawy rezultat otrzymano dla 1% heptan-1-olu w układzie 100 mM deoksychołanu sodu. W tym przypadku ilość zaadsorbowanego NaDC jest niewiele mniejsza niż dla niemodyfikowanego wodnego roztworu surfaktantu. Sugeruje to, że dla stężenia

powyżej $S(H_2O)$, alkohol długołańcuchowy wnika do wnętrza miceli, przez co tylko nieliczne molekuly alkoholu obecne są w fazie objętościowej roztworu (czego nie można powiedzieć o alkoholach C1-C5). Dysocjacja układu zagregowanego, prowadzi do obsadzenia fazy ODS monomerami surfaktantu, które z kolei na skutek samoorganizacji mogą tworzyć na powierzchni fazy agregaty zewnętrzne. W przypadku roztworu NaDC z dodatkiem n-heptanolu, ilość zaadsorbowanego alkoholu nie wpłynęła w znaczący sposób na obsadzenie fazy ODS surfaktantem (znaczną przewagę wolnych cząsteczek amfifila w stosunku do wolnych molekuł modyfikatora organicznego).



Rys. 8.4 Chromatograficzne krzywe przejścia dla 0.1 M roztworu NaDC z dodatkiem rozpuszczalnika organicznego: 3% MeOH, 1% PeOH oraz 1% HepOH; warunki: detekcja 210nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C kolumna: ODS (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

W pomiarach stężeniowych nie zaobserwowano znaczących różnic w ilości zaadsorbowanego NaC lub NaDC na fazie stacjonarnej (Tab. 8.3). Potwierdza to założenie, że wybrany do badań zakres stężeń cholanów znajduje się powyżej punktu **CMC**, a zatem w roztworze obecne są zagregowane układy surfaktantu.

Z fazy stacjonarnej cholany desorbowano za pomocą 80% roztworu MeOH. Całkowitą desorpcję warstwy obserwowano po czasie ok. 120 min.

Powyższe dane wykorzystano jakościowo do planowania warunków prowadzenia kolejnych eksperymentów. Na podstawie uzyskanych informacji ustalono optymalny

czas przemywania micelną fazą ruchomą złoży kolumny, potrzebny do nasycenia fazy stacjonarnej monomerami surfaktantu (4h).

8.2 Wpływ długości łańcucha alkilowego n-alkoholu na enancjoselektywność badanych układów cholanowych

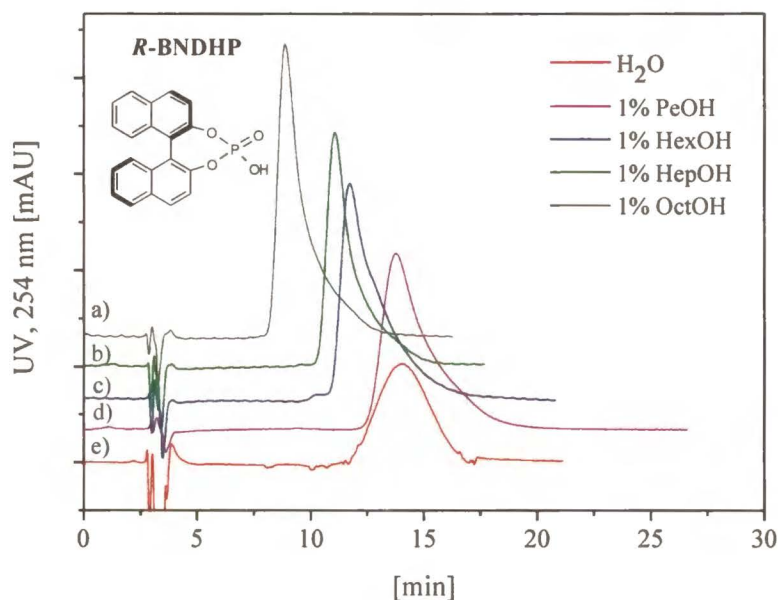
Związkami modelowymi w badaniach własności enancjoseparacyjnych cholanowych faz ruchomych były atropoizomery fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BNDHP) oraz 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN). Badania prowadzono w temperaturze 25°C. W warunkach przeprowadzanych eksperymentów (pH 7.8-8.1) molekuly BN występowały jako cząsteczki obojętne ($pK_{a1}=9.04$, $pK_{a2}=10.90$ [133]), zaś izomery BNDHP były całkowicie zjonizowane (pK_a bliskie 1.12 [134]). Wyznaczone podstawowe parametry chromatograficzne: współczynnik retencji (k), współczynnik rozdzielnia (α), rozdzielczość pików (R_s) oraz asymetryczność piku (A_s) i liczba pól teoretycznych (N), posłużyły do opisu procesu enancjoseparacji badanych układów surfaktantów.

8.2.1 Układ cholanu sodu

Na Rys. 8.5 przedstawiono przykłady zarejestrowanych chromatogramów dla izomeru (*R*)- fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu w układzie 0.1 M roztworu cholanu sodu z 1% v/v dodatkiem n-alkoholu. Z przytoczonych przykładów wynika, że czasy retencji uzyskane dla *R*- BNDHP na cholanowej fazie ruchomej z 1% dodatkiem n-HexOH, n-HepOH oraz n-OctOH są dużo krótsze niż w roztworze niemodyfikowanym. Analogiczną tendencję redukcji czasów retencji otrzymano dla pozostałych izomerów cząsteczek modelowych. Zakładając potrójny model oddziaływań zaproponowany przez Armstronga (rozdział 4.1.3), sugeruje to przesunięcie stałej równowagi procesu w kierunku micelarnej fazy ruchomej ($K_{WS} > K_{WM}$). Duże powinowactwo molekuł BN oraz BNDHP ($\log P_{BN}=4.36$, $\log P_{BNDHP}=3.99$)* do węglowodorowej fazy stacjonarnej uniemożliwiło rejestrację chromatogramów bez dodatku amfifila w fazie ruchomej (zbyt długi czas retencji nawet w 40% roztworze MeOH). Uzyskane wyniki miały służyć jako wartości odniesienia dla

* wartości otrzymane z programu *ChemSketch*

analogicznych układów z dodatkiem amfifila w formie zagregowanej (dla układów >50% MeOH obserwowano proces deagregacji).



Rys. 8.5 Chromatogramy (*R*)-BNDHP otrzymane w układzie 0.1 M NaC z 1% (v/v) dodatkiem *n*-OctOH (a), *n*-HepOH (b), *n*-HexOH (c), *n*-PeOH (d), oraz **bez dodatku** rozpuszczalnika organicznego (e); warunki: przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

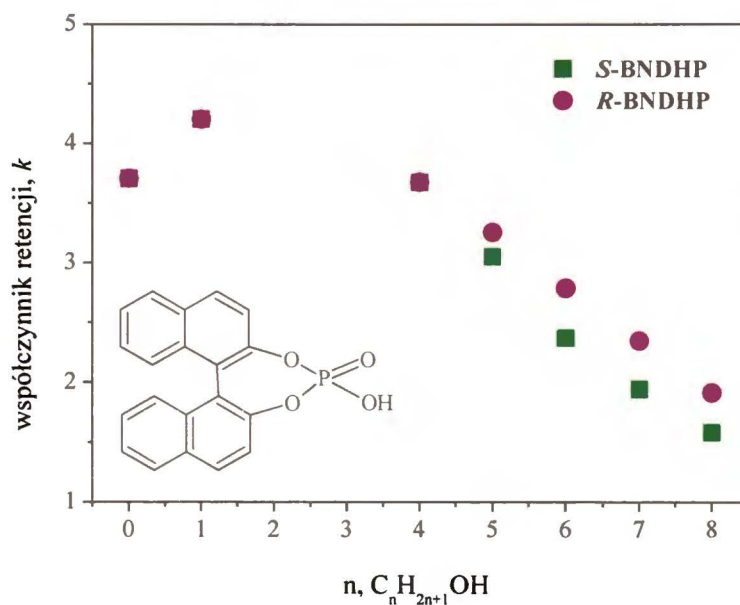
W celu porównania wpływu dodatku *n*-alkoholu na proces enancjoseparacji wyznaczono współczynniki retencji k , współczynniki rozdzielania α oraz rozdzielczości pików R_s dla modelowych cząsteczek izomerów. Wyznaczone wartości przedstawiono w Tab. 8.4. Na niemodyfikowanym alkoholu roztworze NaC uzyskane wartości k są dużo niższe dla izomerów BNDHP niż BN. Efekt ten najprawdopodobniej wynika z różnic w budowie i właściwościach fizykochemicznych obu molekuł. W przeciwieństwie do BN, BNDHP jest molekułą bardziej sztywnej i w badanych warunkach obdarzoną ładunkiem ujemnym. Prawdopodobnym wydaje się zatem, że niższy współczynnik retencji uzyskany dla molekuł BNDHP wynika z efektu elektrostatycznego odpychania z fazą stacjonarną pokrytą anionowym surfaktantem. W przypadku obojętnej molekuły BN, brak jest oddziaływań o charakterze elektrostatycznym.

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że zarówno dla molekuł BNDHP jak i BN w układzie 1% MeOH następował wzrost współczynników retencji w stosunku do roztworu odniesienia (bez dodatku, 100% H₂O/NaC). Efekt ten można tłumaczyć wzrostem powinowactwa badanych molekuł do fazy stacjonarnej. Cząsteczki MeOH występują głównie w fazie objętościowej roztworu i wpływają na zmianę polarności oraz siły jonowej roztworu. W stosunku do fazy stacjonarnej wykazują jedynie tendencję do zwilżania. Niemniej jednak nie można wykluczyć ich wpływu na ułożenie zaadsorbowanego surfaktantu na fazie stacjonarnej tzw. architekturę fazy stacjonarnej.

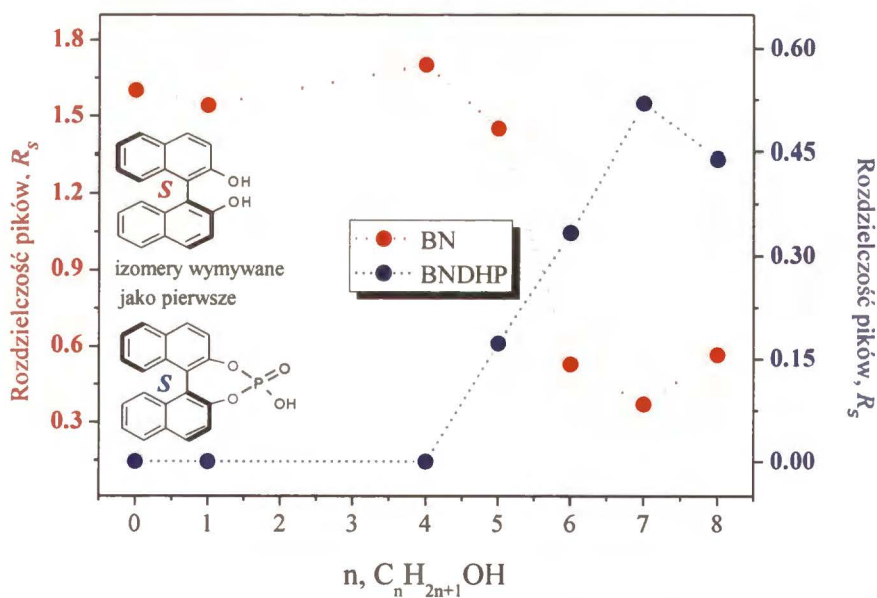
Tab. 8.4 Wpływ rozpuszczalnika organicznego (1% v/v) na współczynniki retencji k , współczynnik rozdzielania α oraz rozdzielczość pików R_s dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie 0.1 M NaC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25^oC, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

0.1 M NaC	BNDHP				BN			
	k_R	k_S	α	R_s	k_R	k_S	α	R_s
H ₂ O	3.70	3.70	1.00	0.00	52.95	37.59	1.41	1.60
MeOH	4.20	4.20	1.00	0.00	59.88	42.73	1.40	1.54
n-BuOH	3.67	3.67	1.00	0.00	38.02	28.03	1.36	1.70
n-PeOH	3.22	3.03	1.06	0.17	26.27	21.75	1.21	1.45
n-HexOH	2.78	2.37	1.17	0.33	13.41	12.16	1.10	0.53
n-HepOH	2.34	1.94	1.21	0.52	13.19	12.05	1.10	0.37
n-OctOH	1.91	1.58	1.21	0.44	14.79	13.12	1.13	0.56

Analiza wyników dla pozostałych badanych alkanoli wykazała, że wydłużenie łańcucha węglowego w cząsteczce modyfikatora wpływało na spadek wartości k dla badanych cząsteczek modelowych. W przypadku izomerów BNDHP obserwowana redukcja współczynników retencji dla n-alkoholi C5-C8 miała charakter liniowy (Rys. 8.6). Największy spadek uzyskano na fazie ruchomej z dodatkiem 1%v/v oktan-1-olu i wynosił on 57% i 48% odpowiednio dla izomeru *S*- i *R*-BNDHP.



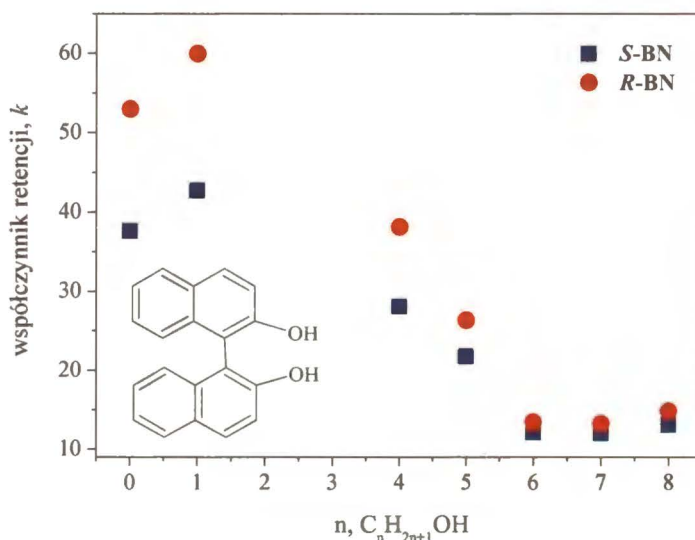
Rys. 8.6 Zależność współczynników retencji dla izomerów fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkiolowym n-alkoholu (1% v/v) w układzie cholanu sodu (NaC).



Rys. 8.7 Wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego na zdolność rozdzielczą układu cholanu sodu.

W niemodyfikowanym układzie 0.1M NaC dla izomerów BNDHP nie zaobserwowano rozróżnienia chiralnego. Separację atropoizomerów BNDHP uzyskano dopiero

w fazach z 1% dodatkiem alkoholu o liczbie atomów węgla powyżej 4 ($C > 4$). Bez względu na rodzaj modyfikatora, jako pierwszy z kolumny wymywany był izomer o konfiguracji *S*. Ponadto zauważono, że im dłuższy łańcuch węglowy *n*-alkoholu, tym większa jest zdolność rozdzielcza pików (Rys. 8.7). Spadek wartości R_s dla fazy z dodatkiem oktanolu wynika ze wzrostu asymetryczności piku.



Rys. 8.8 Zależność współczynników retencji dla izomerów 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN) w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkiolowym *n*-alkoholu (1% v/v) w układzie cholanu sodu (NaC).

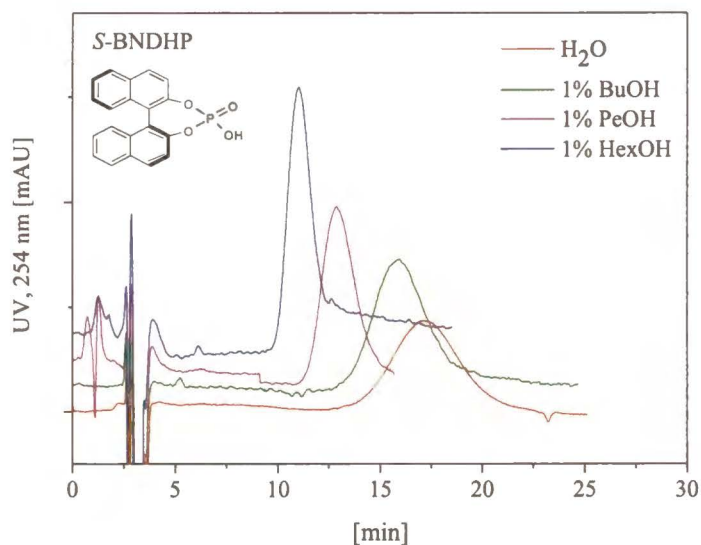
Dla atropoizomerów obojętnego 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN) (Rys. 8.8) zaobserwowano, że na eluentach z dodatkiem *n*-alkoholu C6-C8, k osiąga wartość w przybliżeniu stałą. Średni spadek współczynników retencji na tych fazach wynosił 69% i 74% odpowiednio dla izomeru *S*- i *R*-BN. Wraz z redukcją współczynników retencji dla izomerów BN, zaobserwowano spadek zdolności rozdzielczej układu (Rys. 8.7). Wyznaczona zależność jest odwrotna w porównaniu do uzyskanej dla cząsteczek BNDHP. W tym przypadku przesunięcie równowagi procesu w kierunku micelarnej fazy ruchomej zmniejsza enecjoselektywność układu w stosunku do badanych molekuł. Podobnie jak dla atropoizomerów BNDHP silniej z micelami NaC oddziaływał izomer o konfiguracji *S* (*S*-BN).

Zakładając możliwość oddziaływania analitu z układem zagregowanym w fazie ruchomej (oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania o charakterze hydrofobowym), wielkość spadku współczynników retencji jest miarą

oddziaływania pomiędzy surfaktantem a substancją badaną. Im większy spadek wartości k , tym silniejsze oddziaływanie pomiędzy amfifilem w fazie ruchomej a analitem. Cząsteczki alkoholu modyfikują zarówno powierzchnię fazy stacjonarnej jak i micelle w fazie ruchomej. Ze względu na taki sam ładunek na cząsteczkach BNDHP i NaC, wzmocnienie procesu rozpoznania chiralnego połączone ze spadkiem wartości k tłumaczyć można wzrostem oddziaływań stereoselektywnych między analitem a chiralnym układem micelarnym w fazie ruchomej, zmodyfikowanym cząsteczkami rozpuszczalnika organicznego. Im dłuższy alkohol tym większe jego powinowactwo do miceli i prawdopodobnie większa modyfikacja struktury układu zagregowanego. Ponadto należy pamiętać o procesie oddziaływania rozpuszczalnika z molekułami zaadsorbowanego surfaktantu. Przesunięcie równowagi procesu w kierunku micelarnej fazy ruchomej wynikać może ze wzrostu polarności fazy stacjonarnej, będącym wynikiem sorpcji alkanolu na modyfikowanej surfaktantem fazie. Dla wszystkich badanych cząsteczek modelowych obserwowane były znaczne spadki współczynników retencji. Silniejszym zatem wydaje się być oddziaływanie pomiędzy analitem a micelą niż analitem a fazą stacjonarną. W zależności jednak od budowy analitu oddziaływanie charakteryzowała różna enancjoselektywność. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami BN a modyfikowaną alkanolem micelą NaC było dużo mniej stereosektywne niż w przypadku izomerów BNDHP. Wzrost długości łańcucha węglowego dodatku wpływał bowiem na spadek zdolności rozdzielczej układu. Sugeruje to, że w przypadku izomerów BN w procesie enancjoseparacji atropoizomerów szczególną rolę odgrywa faza stacjonarna. Ograniczenie powierzchni kontaktu z cholanową fazą stałą zmniejszało zdolność rozpoznania chiralnego układu.

8.2.2 Układ deoksyholanu sodu

W celu porównania dwóch soli kwasów cholowych analogiczne pomiary przeprowadzono dla układu 0.1 M deoksyholanu sodu (NaDC). Na Rys. 8.9 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane dla izomeru *S*-BNDHP w badanych układach NaDC. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność oktan-1-olu w wodnym roztworze deoksyholanu sodu, pomiarów nie przeprowadzono dla eluentu o składzie 1%v/v OctOH / 0.1 M NaDC.



Rys. 8.9 Chromatogramy (S)-BNDHP otrzymane w układzie 0.1 M NaDC z 1% (v/v) n-HexOH (a), n-PeOH (b), BuOH (c) oraz **bez dodatku** rozpuszczalnika organicznego (e); warunki: przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

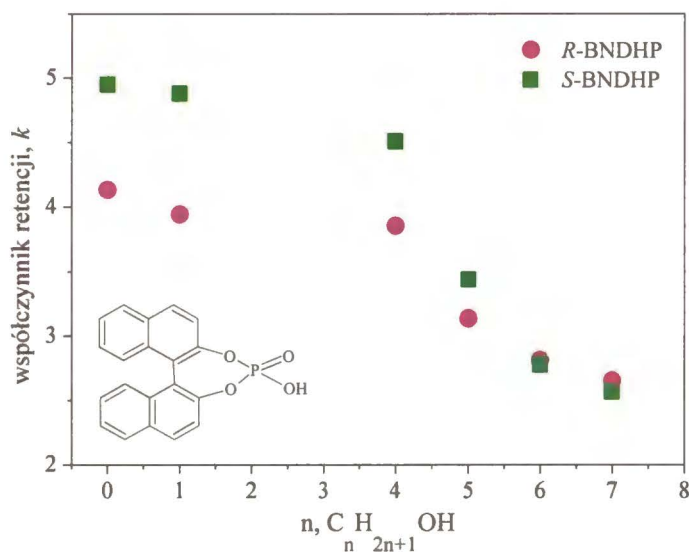
Podobnie jak dla przedstawionego izomeru *S*-BNDHP, również dla pozostałych cząsteczek modelowych zaobserwowano skrócenie czasów retencji wraz ze wzrostem łańcucha alkilowego w cząsteczce modyfikatora organicznego. W Tab. 8.5 umieszczono wyznaczone wartości współczynników retencji k , współczynników rozdzielania α oraz rozdzielczości pików R_s dla badanych molekuł. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że dodatek organiczny obniżał k dla wszystkich cząsteczek modelowych w stosunku do eluentu odniesienia (100% H₂O/ NaDC). Im dłuższy łańcuch węglowy w molekule rozpuszczalnika, tym niższe wartości współczynników retencji dla cząsteczek modelowych. Dla izomerów BNDHP wielkości uzyskanych współczynników retencji były porównywalne z otrzymanymi w układzie cholanu sodu. W przypadku natomiast atropoizomerów BN wartości k uzyskane w niemodyfikowanym roztworze NaDC, są prawie dwukrotnie niższe niż w analogicznej fazie z NaC (Tab. 8.4). Sugeruje to większe powinowactwo molekuł BN do mniej polarnych miceli NaDC niż NaC obecnych w fazie ruchomej.

Tab. 8.5 Wpływ rozpuszczalnika organicznego (1% v/v) na współczynniki retencji k , zdolność rozdzielczą pików R_s oraz współczynnik rozdzielenia α dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie 0.1 M NaDC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

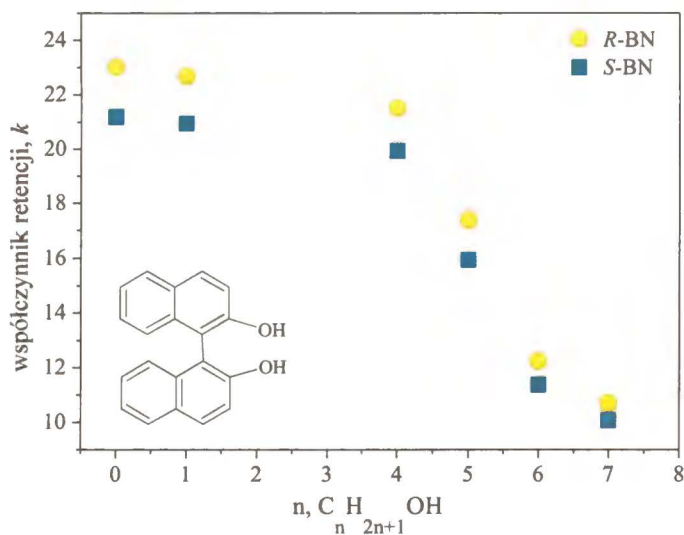
0.1 M NaDC	BNDHP				BN			
	k_R	k_S	α	R_s	k_R	k_S	α	R_s
H ₂ O	4.13	4.95	1.20	0.18	23.00	21.18	1.11	0.21
MeOH	3.94	4.88	1.24	0.20	22.65	20.94	1.08	0.20
n-BuOH	3.85	4.51	1.17	0.16	21.48	19.93	1.08	0.16
n-PeOH	3.13	3.44	1.10	0.12	17.36	15.80	1.09	0.17
n-HexOH	2.80	2.79	1.00	0.00	12.22	11.38	1.07	0.12
n-HepOH	2.65	2.57	1.04	0.00	10.68	10.07	1.06	0.00

Na Rys. 8.10 i Rys. 8.11 przedstawiono otrzymane zależności k w funkcji długości łańcucha węglowego alkoholu odpowiednio dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie soli kwasu deoksycholowego. Obie krzywe charakteryzuje podobny przebieg. Dla alkoholi krótkołańcuchowych ($C \leq 4$) redukcja k w stosunku do układu odniesienia była niewielka. Znaczący spadek k zauważono dla faz z dodatkiem alkoholu o $C \geq 5$. Największą redukcję wartości k odnotowano na fazie ruchomej z dodatkiem heptan-1-olu i wynosiła ona odpowiednio 48% i 35% dla izomerów *S* i *R*-BNDHP oraz 52% i 55% dla izomerów *S*- i *R*-BN.

Wyznaczone spadki współczynników retencji są mniejsze w stosunku do uzyskanych na analogicznej fazie z NaC. Wydaje się zatem, że wpływ rozpuszczalnika na proces oddziaływania analitu z micelami NaDC jest słabszy. Niemniej jednak dodatek rozpuszczalnika organicznego przesunął równowagę procesu w kierunku micelarniej fazy ruchomej. Oddziaływanie analitu ze zmodyfikowanymi cząsteczkami rozpuszczalnika micelami NaDC, charakteryzowała jednak niska stereoselektywność. Wraz z wydłużeniem łańcucha alkilowego *n*-alkoholu odnotowano spadek współczynników selektywności oraz rozdzielczości pików dla obu badanych par izomerów w układzie NaDC (Tab. 8.5). Najlepsze wyniki enancjoseparacji uzyskano w niemodyfikowanym układzie NaDC. Jako pierwszy z pary atropoizomerów BNDHP oraz BN eluowany był odpowiednio izomer *R*-BNHHP oraz *S*-BN. W stosunku zatem do fazy ruchomej z NaC, zaobserwowano odwrócenie kolejności wymywanych izomerów BNDHP. Świadczy to o silniejszym powinowactwie izomeru *R*-BNDHP do miceli NaDC.



Rys. 8.10 Zależność współczynników retencji dla izomerów fosoranu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym n-alkoholu w układzie deoksyholanu sodu.



Rys. 8.11 Zależność współczynników retencji dla izomerów 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym n-alkoholu w układzie deoksyholanu sodu

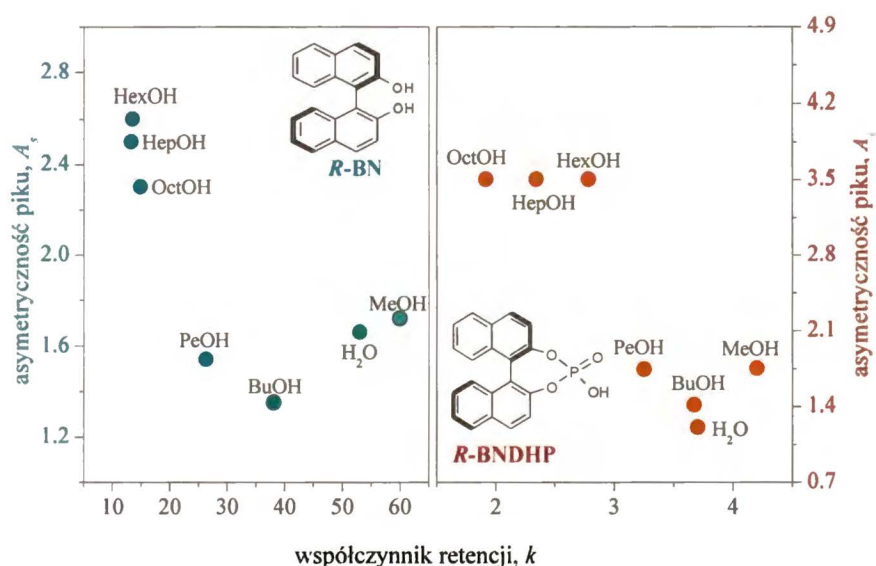
Ciekawie przedstawiał się przypadek separacji izomerów BNDHP w układzie NaDC. W tym przypadku wydłużenie łańcucha węglowego w dodatku organicznym wpłynęło na zmianę enancjoselektywności układu. Na fazach z 1% dodatkiem alkoholi C1-C5 jako pierwszy eluował izomer o konfiguracji *R*. Dla 1% dodatku heksan-1-olu (C6)

obserwowano koelucję atropoizomerów BNDHP. Zamiana modyfikatora na 1% v/v heptan-1-ol (C7) wpłynęła natomiast na zamianę kolejności wymywania izomerów. W tym przypadku izomer *S*-BNDHP miał niższy współczynnik retencji i wymywany był jako pierwszy z pary *R/S*.

Ze względu na małą sprawność układu, zdolności rozdzielcze pików były bardzo małe (Tab. 8.5). W badanych warunkach nie udało się zarejestrować chromatogramów z rozdzielonymi pikami mieszaniny izomerów. Zarówno dla pary atropoizomerów BN oraz BNDHP, zdolność rozdzielcza pików nie osiągnęła wartości większej niż 0.20. Wyższe wartości współczynników rozdzielania uzyskano dla izomerów BNDHP. Porównując zdolność rozróżnienia chiralnego cholanu i deoksycholanu sodu w stosunku do cząsteczek modelowych w temperaturze 25⁰C, lepsze wyniki uzyskano w układzie z cholaniem sodu

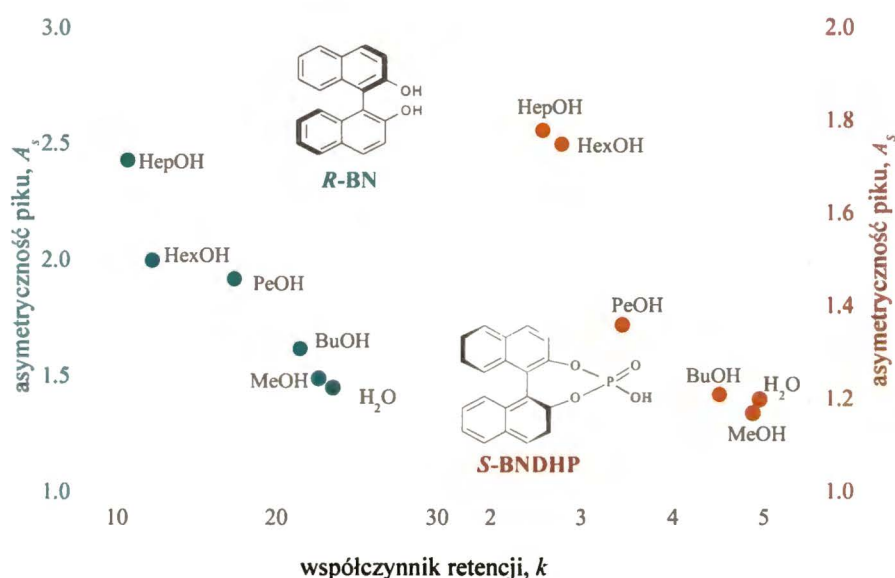
8.2.3 Sprawność układu cholanu i deoksycholanu sodu

Do opisu sprawności rozdzielania izomerów binaftyli na cholanowej i deoksycholanowej fazie ruchomej, użyto parametru asymetryczności pików A_s . Wielkości te wyznaczono na podstawie Równ. 4.4.



Rys. 8.12 Zależność parametru asymetryczności pików A_s w funkcji wartości współczynników retencji dla *R*-BN oraz *R*-BNDHP (izomery eluowane jako drugie) uzyskana w układzie cholanu sodu.

Na Rys. 8.12 przedstawiono zależności wyznaczonych A_s dla izomerów *R*-BNDHP oraz *R*-BN w funkcji współczynników retencji w układzie cholanu sodu. Oba izomery wymywane są jako drugie z mieszaniny *R/S*-BNDHP lub *R/S*-BN. Zarówno dla izomeru *R*-BNDHP jak i *R*-BN zaobserwowano, że im niższa wartość współczynnika k , tym większa asymetryczność pików. Na fazach ruchomych z dodatkiem alkoholu o liczbie atomów węgla 6-8, A_s przyjmuje wartość powyżej 2.2 dla *R*-BN oraz w przybliżeniu równą 3.5 dla *R*-BNDHP.



Rys. 8.13 Zależność parametru asymetryczności pików A_s w funkcji wartości współczynników retencji dla *R*-BN oraz *S*-BNDHP (izomery eluowane jako drugie) uzyskana w układzie deoksycholenu sodu.

Analogiczne zależności wyznaczono w układzie z deoksycholem sodu (Rys. 8.13). Na podstawie analizy kształtu pików ostatniego eluowanego izomeru z pary zauważono, że zarówno dla izomeru *R*-BN jak i *S*-BNDHP, 1% v/v dodatek organiczny zwiększał asymetryczność pików (Rys. 8.13). Im dłuższy łańcuch węglowy dodanego rozpuszczalnika, tym większa wartość A_s . Dla izomeru BN nie zauważono znaczących różnic w wartościach A_s uzyskanych na fazach z NaC i NaDC. W przypadku zjonizowanej cząsteczki BNDHP, odnotowano natomiast wzrost symetryczności pików. Efekt ten można by próbować wytłumaczyć spadkiem udziału oddziaływań jonowych pomiędzy ujemnie naładowanymi molekułami w układzie deoksycholenu sodu.

Dla molekuł BN i BNDHP w badanych układach 0.1 M NaC i 0.1 M NaDC zauważono, że wraz ze spadkiem współczynników retencji spada również szerokość w połowie wysokości piku. Przekłada się to zgodnie z Równ. 4.3 na wzrost liczby półek teoretycznych, a tym wzrost sprawności rozdzielczej układu. Przykładowe wartości liczby półek teoretycznych N zestawiono w Tab. 8.6.

Tab. 8.6 Liczba półek teoretycznych wyznaczonych dla izomerów eluowanych jako drugie w układach 0.1 M cholanu sodu oraz deoksycholanu sodu

	<i>drugi wymywany- BNDHP</i>		<i>drugi wymywany -BN</i>	
	NaC	NaDC	NaC	NaDC
H ₂ O	106	129	383	333
MeOH	95	128	366	297
n-BuOH	154	190	540	283
n-PeOH	260	308	712	301
n-HexOH	264	428	737	286
n-HepOH	286	460	843	294

Ciekawie przedstawia się przykład izomeru *R*-BN na fazie z deoksycholanem sodu. Bez względu na rodzaj modyfikatora organicznego wielkość N pozostaje w przybliżeniu stała, niższa co do wartości w stosunku do otrzymanej na analogicznych fazach z NaC. Asymetria pików wynikać może z wielu czynników. Do najważniejszych zaliczyć należy przeładowanie kolumny, niejednorodność fazy stacjonarnej, niejednorodność złoża oraz efekty pozakolumnowe. Goshlan-Shirazi i Guiochon [135] pokazali, że ogonowanie piku powstałe na skutek wolnej kinetyki wymiany masy występuje głównie w układach opisywanych niewielką liczbą półek teoretycznych. Dondi [136] i Cavazzini [137] rozważając rolę heterogeniczności powierzchni fazy stacjonarnej wykazali, że dla układów opisywanych liniową izoterma pomimo niejednorodności fazy, otrzymany profil piku był w przybliżeniu symetryczny. W przypadku badanych faz z dodatkiem cholanu i deoksycholanu sodu wysoka asymetria pików najprawdopodobniej wynikała z powolnej kinetyki wymiany masy pomiędzy modyfikowaną surfaktantem fazą stacjonarną a fazą ruchomą. Modyfikacja surfaktantem fazy stacjonarnej wpłynęła na porowatość i strukturę fazy ODS. Im grubsza warstwa pokrycia fazy tym większa sztywność fazy a tym samym mniejszy współczynnik dyfuzji. W obu badanych układach micelarnych 1% dodatek n-alkoholu

często wpływał na zwiększenie asymetryczności pików. Szczególnie jest to widoczne dla alkoholi długołańcuchowych (C6-C8). W warunkach przeprowadzanego eksperymentu alkohole te wbudowują się w micelle w fazie ruchomej zmieniając ich pierwotną strukturę. Bezpośrednio może mieć to wpływ na kinetykę procesu przeniesienia analitu z fazy stałej do miceli obecnych w fazie ruchomej.

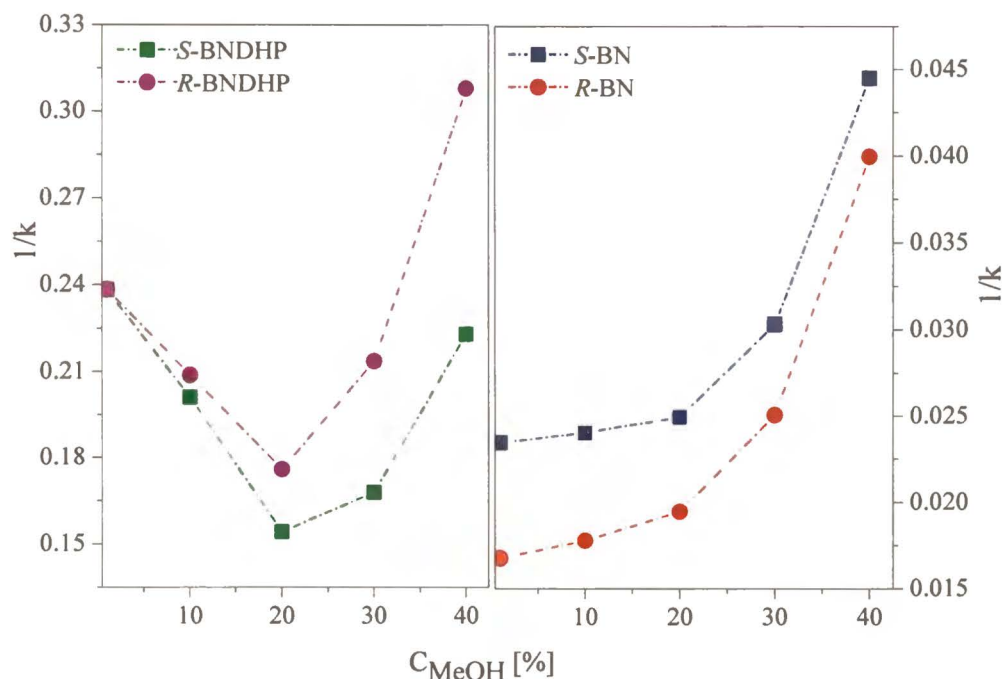
8.3 Wpływ stężenia modyfikatora organicznego na proces rozróżnienia chiralnego w badanych układach soli kwasów cholowych.

Do badań wpływu stężenia modyfikatora organicznego na proces enancjoseparacji atropoizomerów w układzie NaC (100 mM) oraz NaDC (100 mM), wybrano dwa alkohole: metanol (MeOH) i pentan-1-ol (PeOH). Cząsteczkę metanolu wybrano ze względu na nieograniczoną rozpuszczalność w roztworze wodnym oraz fakt, że w roztworze micelarnym znajduje się w objętościowej fazie roztworu.

Tab. 8.7 Wpływ stężenia modyfikatora organicznego na parametry chromatograficzne związków modelowych w układzie cholanu sodu; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

	BNDHP				BN			
	k_R	k_S	α	R_s	k_R	k_S	α	R_s
0.1 M NaC	3.70	3.70	1.00	0.00	52.95	37.95	1.41	1.60
+ MeOH								
1% v/v	4.20	4.20	1.00	0.00	59.88	42.73	1.40	1.54
10% v/v	4.80	4.98	1.04	0.10	56.43	41.66	1.35	1.26
20% v/v	5.69	6.49	1.14	0.39	51.54	40.16	1.28	1.27
30% v/v	4.69	5.96	1.27	0.92	40.00	33.02	1.21	1.14
40% v/v	3.25	4.49	1.38	1.45	25.03	22.48	1.11	0.59
+ PeOH								
1% v/v	3.22	3.03	1.06	0.17	26.27	21.75	1.21	1.45
2% v/v	2.86	2.5	1.14	0.28	15.04	13.15	1.14	0.78
3% v/v	1.92	1.61	1.19	0.49	10.12	9.07	1.11	0.69
4% v/v	1.25	1.04	1.2	0.18	8.81	8.10	1.09	0

W przeciwieństwie do metanolu, pentan-1-ol należy do alkoholi o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, które wbudowują się w strukturę miceli. Uzyskane wcześniej wyniki w układach NaC oraz NaDC z 1% v/v MeOH lub 1% v/v n-PeOH, wykazały zdolność rozróżnienia chiralnego w stosunku do badanych cząsteczek modelowych.

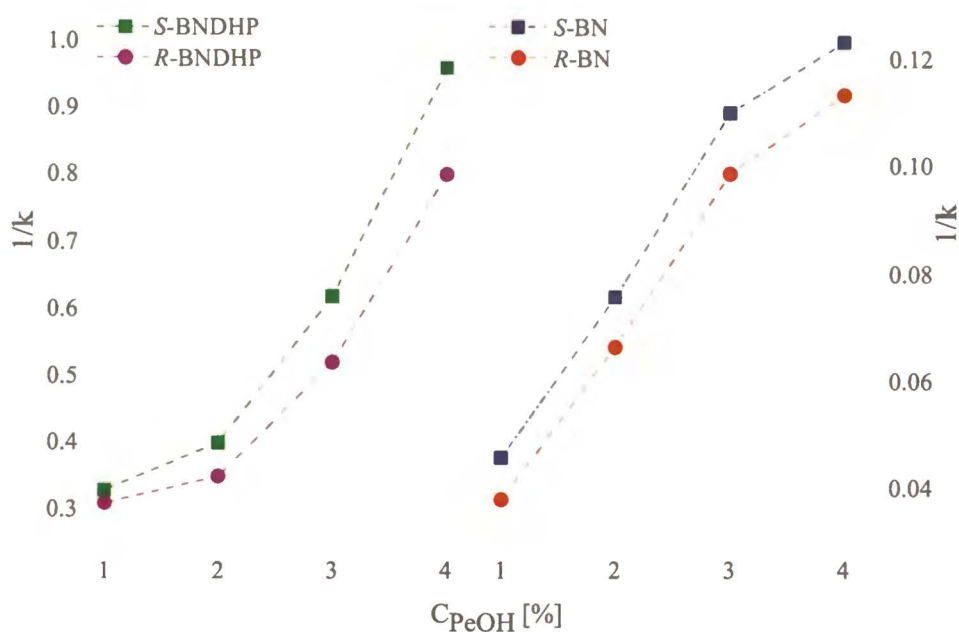


Rys. 8.14 Wpływ stężenia MeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 250C, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Na Rys. 8.14 przedstawiono zależność odwrotności współczynników retencji w funkcji stężenia metanolu (C_{MeOH} %) dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie cholanu sodu. Wpływ MeOH na retencję obu par izomerów jest różny. Dla cząsteczek BNDHP zaobserwowano nietypowy przebieg zależności. W zakresie stężeń MeOH 1-20 %, wraz ze wzrostem stężenia dodatku w fazie micelarnej obserwowano wzrost współczynników retencji. Molekuły analitu były chętniej zatrzymywane na fazie stacjonarnej niż transportowane przez micelle NaC w fazie ruchomej modyfikowanej cząsteczkami MeOH. Powyżej stężenia 20% MeOH zaobserwowano odwrócenie tendencji. Efektu tego nie zaobserwowano dla molekuł BN. Dla atropoizomerów BN w całym zakresie badanego stężenia MeOH (1-40%) obserwowano spadek współczynników retencji wraz

ze wzrostem stężenia modyfikatora w fazie ruchomej. Podobnie jak dla izomerów BNDHP, wykres $1/k$ vs stężenie MeOH w zakresie 1-20% opisać można zależnością liniową, o dodatnim nachyleniu dla izomerów BN i ujemnym dla izomerów BNDHP. Odstępstwo od liniowości w fazach o wyższej zawartości metanolu sugeruje zmianę mechanizmu retencji procesu. Najprawdopodobniej na skutek wzrostu siły jonowej eluentu oraz częściowej deagregacji układu micelarnego (wzrost CMC, spadek stężenia miceli w fazie), równowaga procesu przesunięta została w kierunku metanolowej fazy objętościowej.

Niezależnie od stężenia metanolu w badanym układzie, jako pierwszy z pary izomerów BNDHP oraz BN wymywany był odpowiednio izomer *R* oraz izomer *S*. W przypadku pary izomerów BNDHP wzrost stężenia metanolu generował i wzmacniał proces enancjoseparacji. Obserwowano wzrost rozdzielczości pików. Odwrotny efekt zauważono dla molekuł BN. W tym przypadku wzrost stężenia MeOH wpływał na skrócenie czasów retencji, pogorszenie współczynnika rozdzielania oraz spadek rozdzielczości pików (Tab. 8.7).



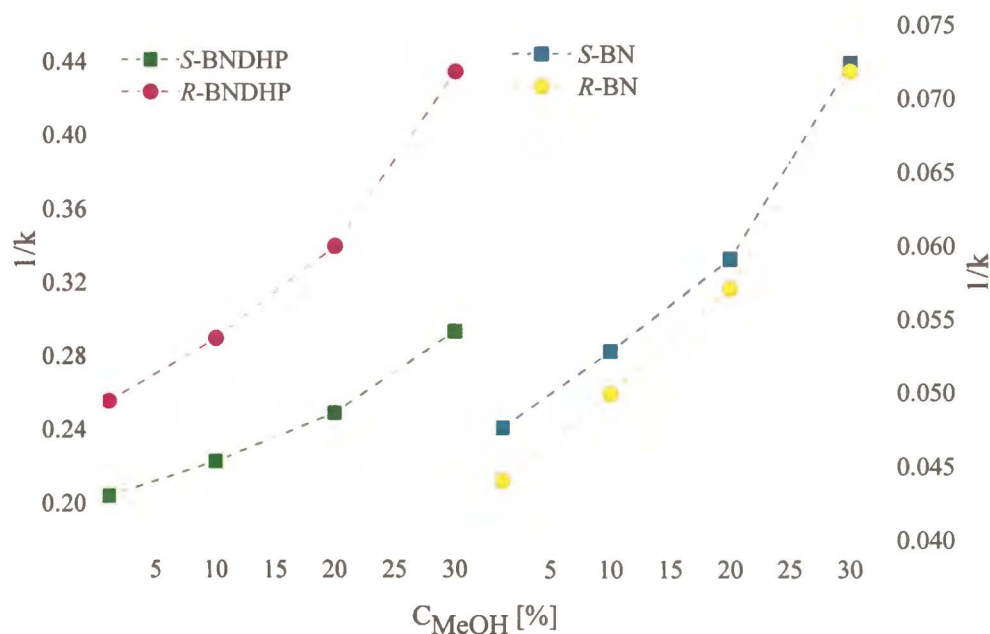
Rys. 8.15 Wpływ stężenia PeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

Na Rys. 8.15 graficznie przedstawiono uzyskane wyniki dla atropoizomerów BNDHP oraz BN w układzie 0.1 M NaC/n-PeOH. W tym przypadku dla obu par izomerów zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia n-PeOH następował spadek współczynników retencji. Jako pierwszy z pary izomerów wymywany był *S*-BNDHP oraz *S*-BN. W stosunku zatem do fazy z dodatkiem MeOH nastąpiła zmiana kolejności wymywanych atropoizomerów BNDHP. Dla izomerów BNDHP otrzymana zależność $1/k$ vs $C_{\text{PeOH}\%}$ w całym zakresie badanego stężenia PeOH odbiega od liniowości. Świadczy to o złożonym wpływie modyfikatora na proces oddziaływania pomiędzy surfaktantem a analitem. W przypadku izomerów BN dla stężeń pentanolu w zakresie jego rozpuszczalności w wodzie ($\leq 3\%$), otrzymano zależność w przybliżeniu liniową. Dla stężenia powyżej rozpuszczalności w wodzie (4%), zaobserwowano odstępstwo od liniowości. Najprawdopodobniej ma to związek z modyfikacją układu micelnego przez łańcuchy alkilowe alkoholu, a tym samym zmianą stałej równowagi procesu oddziaływania pomiędzy analitem a micelą.

Tab. 8.8 Wpływ stężenia modyfikatora organicznego na parametry chromatograficzne związków modelowych w układzie deoksyholanu sodu (NaDC); warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

	BNDHP				BN			
	k_R	k_S	α	R_S	k_R	k_S	α	R_S
0.1 M NaDC	4.13	4.95	1.20	0.18	23.00	21.18	1.11	0.21
+ MeOH								
1% v/v	3.90	4.88	1.25	0.20	22.65	20.94	1.08	0.20
10% v/v	3.44	4.47	1.30	0.44	19.98	18.9	1.06	0.10
20% v/v	2.90	4.00	1.38	0.68	17.50	16.9	1.03	0.07
30% v/v	2.30	3.40	1.48	0.64	13.90	13.80	1.01	0.00
+ PeOH								
1% v/v	3.13	3.45	1.10	0.12	17.36	15.96	1.09	0.17
2% v/v	2.60	2.73	1.05	0.00	12.30	11.60	1.06	0.11
3% v/v	2.12	2.12	1.00	0.00	9.23	8.84	1.04	0.00

Wpływ cząsteczek PeOH na proces enancjoseparacji dla par izomerów BNDHP oraz BN jest podobny jak w przypadku MeOH. Wzrost stężenia PeOH w fazie ruchomej poprawiał współczynnik rozdzielania dla izomerów BNDHP i pogarszał dla izomerów BN. Mała wartość R_s dla izomerów BNDHP otrzymana na fazie z dodatkiem 4% v/v PeOH wynikała ze wzrostu asymetrii pików.



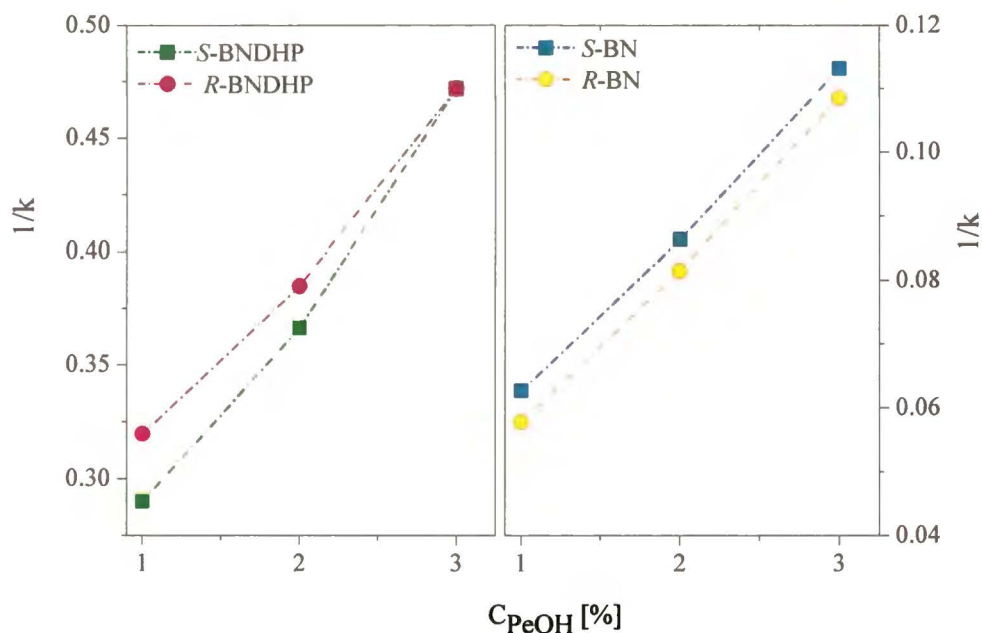
Rys. 8.16 Wpływ stężenia MeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaDC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Wpływ stężenia MeOH oraz PeOH na proces rozdzielania izomerów BN i BNDHP w układzie 0.1 M deoksychołanu sodu (NaDC) przedstawiono na Rys. 8.16 i Rys. 8.17. Bez względu na rodzaj modyfikatora zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia alkoholu w fazie ruchomej spada wartość współczynnika retencji badanych izomerów (Tab. 8.8). W żadnym z badanych układów surfaktantu nie odnotowano wzrostu wartości współczynnika retencji dla izomerów BNDHP. Podobnie jak dla cholanowej fazy ruchomej, w zakresie stężeń MeOH 1-20%, zaobserwowano liniową zależność $1/k$ vs. $C_{MeOH\%}$ (Rys. 8.16). 30% dodatek MeOH wpływał na nieliniowy spadek współczynnika retencji BN i BNDHP w badanym układzie deoksychołanu sodu. Efekt

ten widoczny był również na fazach z NaC i najprawdopodobniej wynika ze wzrostu siły jonowej eluentu i przesunięcia równowagi w kierunku fazy wodno-organicznej.

Deoksycholanowa faza ruchoma modyfikowana cząsteczkami MeOH wykazywała znaczną enancjoselektywność w stosunku do izomerów BNDHP. Wartości współczynników rozdzielania były wyższe niż na analogicznych fazach z cholanem sodu. Gorsze wyniki rozdzielania uzyskano natomiast dla izomerów BN. Podobnie jak w układzie cholanu sodu, wzrost stężenia MeOH wzmacniał proces enancjoseparacji dla izomerów BNDHP i osłabiał dla cząsteczek BN.

Układ z NaDC modyfikowany cząsteczkami PeOH wykazywał dużo gorszą zdolność rozpoznania chiralnego w stosunku do analogicznych faz z NaC. Zwiększenie stężenia PeOH w fazie ruchomej wpływało na spadek enancjoselektywności układu w stosunku do izomerów BN jak i BNDHP. W badanym zakresie stężeń PeOH (1-3%) zarówno dla izomerów BNDHP jak i BN zaobserwowano liniową zależność odwrotności współczynników retencji $1/k$ w funkcji stężenia PeOH w fazie ruchomej (Rys. 8.17).



Rys. 8.17 Wpływ stężenia PeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaDC; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Bez względu na rodzaj modyfikatora organicznego w układzie deoksycholany sodu jako pierwszy z pary izomerów BNDHP wymywany był izomer o konfiguracji *R*, natomiast z pary BN atropoizomer o konfiguracji *S*.

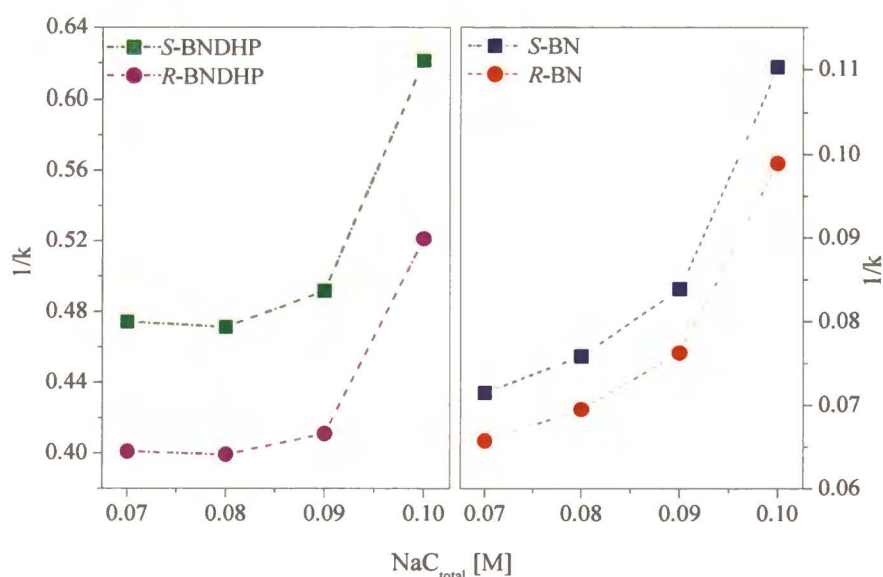
8.4 Wpływ stężenia cholany sodu i deoksycholany sodu na chromatograficzne zachowanie się izomerów związków modelowych

Aby określić charakter oddziaływania pomiędzy analitem a badanym układem micelnym cholany sodu (NaC) lub deoksycholany sodu (NaDC) przeprowadzono pomiary stężeniowe. W tym celu wykonano serię faz ruchomych o stężeniach surfaktantów : 0.1 M, 0.09 M, 0.08 M oraz 0.07 M. Użyte micelarne fazy ruchome wzbogacono o 3% dodatek rozpuszczalnika organicznego. Modyfikatorem faz z NaC był pentanol, zaś faz z NaDC metanol. Stężenie i rodzaj dodatku dobrane były w ten sposób, aby badane układy surfaktantów wykazywały enancjoselektywność w stosunku do cząsteczek modelowych oraz aby sam dodatek nie wpływał na budowę miceli w fazie ruchomej.

Tab. 8.9 Wpływ stężenia cholany sodu oraz deoksycholany sodu na podstawowe parametry chromatograficzne; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

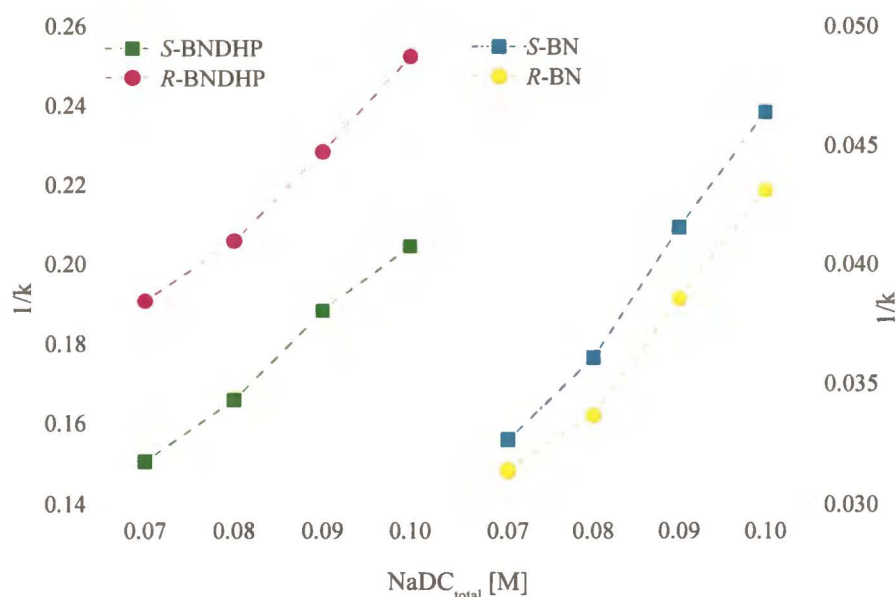
	BNDHP				BN			
	k_R	k_S	α	R_s	k_R	k_S	α	R_s
<i>Cholan sodu (NaC)</i>								
+ 3% v/v PeOH								
0.07 M	2.49	2.11	1.18	0.67	15.24	14.00	1.08	0.64
0.08 M	2.5	2.12	1.18	0.69	14.42	13.19	1.09	0.69
0.09 M	2.43	2.03	1.19	0.70	13.13	11.92	1.10	0.73
0.10 M	1.92	1.61	1.19	0.49	10.12	9.07	1.11	0.70
<i>Deoksycholan sodu (NaDC)</i>								
+ 3% v/v MeOH								
0.07 M	5.35	6.78	1.26	0.40	31.85	30.59	1.04	0.15
0.08 M	4.85	6.02	1.24	0.30	29.69	27.67	1.07	0.15
0.09 M	4.37	5.30	1.21	0.20	25.88	24.03	1.07	0.19
0.10 M	3.96	4.88	1.23	0.20	23.17	21.53	1.07	0.17

Otrzymane parametry chromatograficzne dla cząsteczek modelowych przedstawiono w Tab. 8.9. Na podstawie zestawionych wyników zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia NaC w fazie ruchomej dla izomerów BN obserwowano spadki wartości współczynników retencji i wzrost enancjoselektywność układu. Dla izomerów BNDHP w zakresie stężeń 0.07 – 0.09 M nie zaobserwowano znaczących różnic w wartościach wyznaczonych współczynników retencji. Na fazie z 0.1 M NaC zaobserwowano natomiast ok. 20% spadek k . Na Rys. 8.18 przedstawiono zależności odwrotności współczynników retencji dla izomerów BNDHP oraz BN w funkcji całkowitego stężenia NaC. W badanym zakresie stężeń prezentowane zależności nie są liniowe. Nieliniowość mogła wynikać z procesu reorganizacji układu micelnarnego (m.in. zmiany rozmiaru i/lub kształtu miceli). Zmiany te nie miały jednak znaczącego wpływu na zdolność rozpoznania chiralnego przez układ. Wraz ze wzrostem stężenia NaC dla izomerów BN zaobserwowano bowiem nieznaczny wzrost współczynników rozdzielania α oraz zdolności rozdzielczej pików R_s . Dla izomerów BNDHP w badanym zakresie stężeń α pozostała niezmienną, a R_s nieznacznie wzrosło. Zmniejszenie rozdzielczości pików na fazie 0.1 M NaC związane było ze wzrostem asymetryczności pików.



Rys. 8.18 Zależność odwrotności współczynników retencji od całkowitego stężenia cholanu sodu w fazie ruchomej dla atropoizomerów BNDHP oraz BN; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

Wyniki uzyskane w układzie deoksyholanu sodu są podobne do otrzymanych w fazach z NaC (Tab. 8.9). Wzrost stężenia deoksyholanu sodu wpłynął na redukcję współczynników retencji związków modelowych. W przeciwieństwie do fazy z NaC, spadek obserwowany jest w całym zakresie badanych stężeń NaDC zarówno dla izomerów BN jak i BNDHP. Wzrost stężenia NaDC nie wpłynął w znaczący sposób na enancjoselektywność układu. Na Rys. 8.19 przedstawiono zależności $1/k$ w funkcji całkowitego stężenia deoksyholanu sodu. W porównaniu z zależnościami otrzymanymi w układzie z NaC dla BN oraz BNDHP, zaobserwowano zmianę przebiegu zależności. Odwrotność współczynników retencji jest liniową funkcją stężenia deoksyholanu sodu o dodatnim stopniu nachylenia prostej.



Rys. 8.19 Zależność odwrotności współczynników retencji od całkowitego stężenia deoksyholanu sodu w fazie ruchomej dla atropoizomerów BNDHP oraz BN; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5µm) 250 x 1.0 mm i.d.

Armstrong i Stine [138] badając oddziaływanie analitu z układem micelarnym w zależności od sposobu wiązania, zaproponowali podział substancji na trzy klasy: (i) wiążące z micelami, (ii) nie oddziałujące z układem zagregowanym oraz (iii) wypychane z układu micelarnego. Zgodnie z Równ. 4.8 dla substancji wiązanej przez micelle, nachylenie prostej przyjmuje wartość dodatnią ($K_{WM} > 0$), zaś dla wypychanej z układu micelarnego wartość ujemną ($K_{WM} < 0$). Anality dla których wzrost stężenia

surfaktantu nie wpływa na zmianę współczynników retencji ($K_{WM}=0$) nie oddziałują z układem micelarnym. Powyższe rozważania odnoszą się do liniowych zależności stężeniowych. Analogiczne rozważania przeprowadzić można dla zależności kwadratowych. Zgodnie z powyższą klasyfikacją izomery BNDHP oraz BN należą do molekuł oddziałujących z układem micelarnych cholanu sodu oraz deoksycholanu sodu. Dla wszystkich bowiem badanych molekuł otrzymane zależności $1/k$ vs. $C_{\text{surfaktantu}}$ w całym zakresie badanych stężeń mają nachylenie dodatnie. Ciekawie przedstawia się zależność dla izomerów BNDHP w układzie cholanu sodu. Dla stężeń NaC z zakresu 0.07 - 0.09 M, współczynniki retencji izomerów BNDHP tylko nieznacznie różnią się między sobą. Mogłoby to sugerować, że ujemnie naładowane molekuły BNDHP nie oddziałują z micelami. Należy jednak pamiętać, że faza C18 pokryta była zaadsorbowanymi molekułami NaC. W przypadku braku powinowactwa analitu zarówno do micelarniej fazy ruchomej jak modyfikowanej fazy stacjonarnej, należałoby spodziewać się wymywania izomerów BNDHP w objętości substancji nie zatrzymywanej na kolumnie. Uzyskane wyniki doświadczalne tego nie potwierdzają ($k > 0$). Sugerują natomiast, że pomimo takiego samego ładunku na analicie i surfaktancie, dzięki oddziaływaniom o charakterze hydrofobowym molekuły BNDHP oddziałują z micelami NaC.

8.5 Wpływ temperatury na separację związków w badanych układach micelarnych

Do badań wpływu temperatury na retencję i separację izomerów BNDHP wybrano dwie fazy wodno-organiczne modyfikowane cząsteczkami cholanu sodu (NaC) lub deoksycholanu sodu (NaDC). Pomiary w układzie 0.1 M NaC przeprowadzono na fazach z dodatkiem 30% MeOH oraz 3% PeOH (v/v). W przypadku 0.1 M NaDC wybrano fazy z dodatkiem 30% MeOH oraz 3% MeOH (v/v). Uzyskane wyniki enancjoseparacji BNDHP w układzie 0.1 M NaDC/3% PeOH były niezadowalające, dlatego też zdecydowano o zamianie modyfikatora organicznego na MeOH. Badania przeprowadzono w zakresie temperatur 15-45⁰ C. W Tab. 8.10 zawarto uzyskane wyniki.

Zgodnie z teorią zmiana temperatury wpływa na równowagę procesu poprzez zmianę energii swobodnej Gibbsa (ΔG^0). Wzajemną relację pomiędzy parametrami wyraża równanie van't Hoffa:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Równ. 8.1

gdzie K jest stałą równowagi procesu przeniesienia analitu z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej, zaś ΔH^0 i ΔS^0 są odpowiednio molową entalpią i entropią przejścia.

Dla procesu chromatograficznego równanie przybiera postać (Równ.7.9):

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi$$

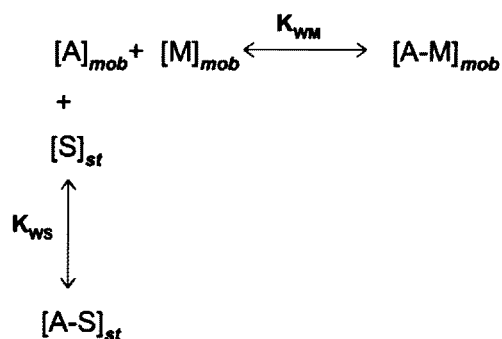
gdzie k jest współczynnikiem retencji związku wymywanego, ϕ wyraża stosunek objętościowy faz, T jest temperaturą w skali Kelvina. W przypadku separacji dwóch izomerów równanie przedstawić można w następującej formie:

$$\ln \alpha = \ln \frac{k_2}{k_1} = -\frac{\Delta \Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta \Delta S^0}{R}$$

Równ. 8.2

gdzie $\Delta \Delta H^0$ i $\Delta \Delta S^0$ są różnicami zmian molowej entalpii i entropii pomiędzy eluowanymi izomerami.

Równ. 7.9 służy do wyznaczenia parametrów termodynamicznych w układzie faz wodno-organicznych. W porównaniu z układem faz odwróconych, w układzie micelarnej chromatografii cieczowej system równowag jest bardziej złożony. W najprostszym przypadku rozważyć należy podział analitu pomiędzy ruchomą fazę micelarną a zmodyfikowaną cząsteczkami surfaktantu fazę stacjonarną :



gdzie indeksy dolne *mob* i *st* odnoszą się odpowiednio do procesów zachodzących w fazie ruchomej i stacjonarnej, A oznacza cząsteczkę analitu, M- micelę w fazie ruchomej, S-zaadsorbowany na fazie stacjonarnej surfaktant, zaś K_{WM} , K_{WS} to stałe równowag procesów. Opierając się na powyższym modelu Dorsey [139] bezpośrednio

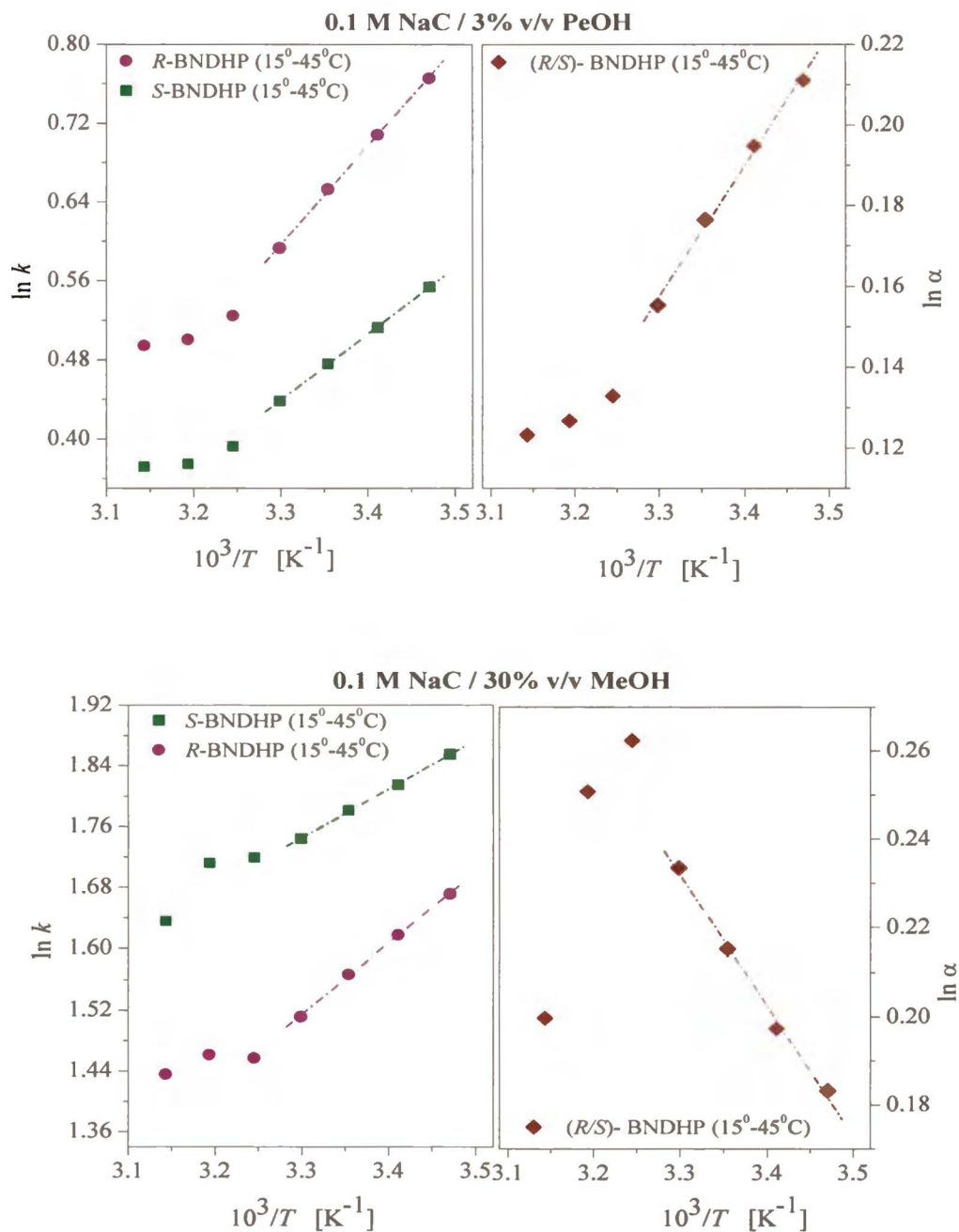
zastosował Równ. 7.9 do wyznaczenia parametrów termodynamicznych w układzie MLC. Równanie to nie rozważa wszystkich możliwych równowag w układzie, niemniej jednak pozwala zrozumieć układ jako całość.

Tab. 8.10 Wpływ temperatury na retencję i enancjoseparację izomerów BNDHP w wybranych układach cholanu lub deoksycholanu sodu; warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

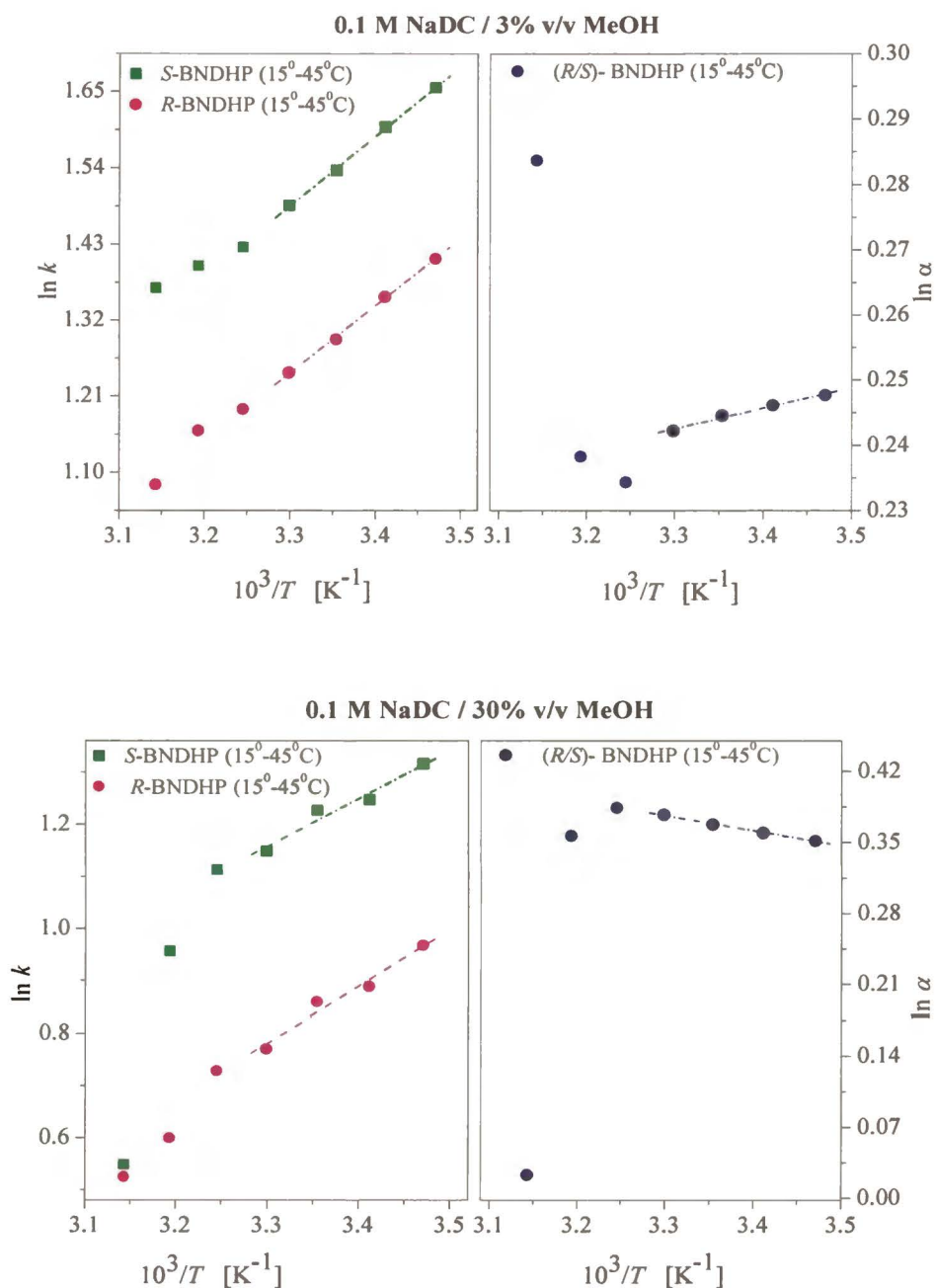
		BNDHP						
		15 ⁰ C	20 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	40 ⁰ C	45 ⁰ C
0.1 M	<i>Cholan sodu (NaC)</i>							
	+ 3% v/v <i>PeOH</i>							
k_R		2.15	2.03	1.92	1.81	1.69	1.65	1.62
k_S		1.74	1.67	1.61	1.55	1.48	1.45	1.43
α		1.235	1.215	1.193	1.168	1.142	1.135	1.131
	+ 30% v/v <i>MeOH</i>							
k_R		5.32	5.04	4.79	4.53	4.29	4.31	4.20
k_S		6.39	6.14	5.94	5.72	5.58	5.54	5.13
α		1.201	1.218	1.240	1.263	1.300	1.285	1.221
0.1 M	<i>Deoksycholan sodu (NaDC)</i>							
	+ 3% v/v <i>MeOH</i>							
k_R		4.09	3.87	3.64	3.47	3.29	3.19	2.95
k_S		5.24	4.95	4.65	4.42	4.16	4.05	3.92
α		1.281	1.279	1.277	1.274	1.264	1.269	1.328
	+ 30% v/v <i>MeOH</i>							
k_R		2.63	2.43	2.36	2.16	2.07	1.82	1.69
k_S		3.73	3.48	3.41	3.15	3.04	2.60	1.73
α		1.421	1.432	1.444	1.458	1.468	1.428	1.023

Opierając się na powyższych rozważaniach Równ. 7.9 oraz Równ. 8.2 posłużyły do wyznaczenia zmian entalpii oraz entropii przejścia z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej dla izomerów BNDHP w badanych układach faz ruchomych. W Tab. 8.10 zawarto otrzymane parametry chromatograficzne. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że w zakresie badanych temperatur wraz ze wzrostem T następuje spadek wartości współczynników retencji k . Dla układów NaC oraz NaDC o niskim stężeniu modyfikatora organicznego (3% v/v) w zakresie temperatur 15° - 35° C, wraz ze spadkiem k obserwowano dodatkowo spadek współczynników rozdzielania α . Dla układów o wysokim stężeniu alkoholu (30% v/v) odnotowano tendencję odwrotną. W zakresie temperatur 15° - 35° C pomimo spadku k obserwowano bowiem wzrost wartości α . Zwiększenie temperatury ($>35^{\circ}$ C) zmniejszało enancjoselektywność układu. Kolejność wmywanych izomerów BNDHP pozostała niezmienną w całym zakresie badanych temperatur. Bez względu na stężenie MeOH zarówno dla układu cholanu jak i deoksycholanu sodu, jako pierwszy z pary atropoizomerów BNDHP wmywany był izomer o konfiguracji R. Dla układu cholanu sodu modyfikowanego czasteczkami *n*-PeOH (3% v/v) jako pierwszy eluował izomer o konfiguracji S.

Na Rys. 8.20 przedstawiono wykresy $\ln k$ vs. $1/T$ dla *R*- i *S*-BNDHP w układzie NaC. Otrzymane zależności nie są liniowymi w całym zakresie badanych temperatur (15° - 45° C). Powyżej temperatury 30° C obserwowano odejście od liniowości. Podobnie przebiega zależność $\ln \alpha$ vs. $1/T$. Jedynie w zakresie temperatur 15° - 30° C obserwowano zależność liniową. Analogiczne zależności otrzymano dla modyfikowanego metanolem układu NaDC (Rys. 8.21). Podobnie jak dla soli kwasu trójhydroksylowego, otrzymane zależności van't Hoffa dla parametru k oraz α były liniowymi w zakresie temperatur 15° - 30° C. Dla fazy z dodatkiem 30% MeOH wzrost temperatury (35° - 45° C) wpływał na spadek wartości współczynnika rozdzielania α . Odwrotnie przedstawia się sytuacja w układzie 3% dodatku MeOH. W tym przypadku wzrost temperatury (35° - 45° C) zwiększał enancjoselektywność układu.



Rys. 8.20 Zależności van't Hoffa dla izomerów BNDHP w układzie cholanu sodu (NaC); warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.



Rys. 8.21 Zależności van't Hoffa dla izomerów BNDHP w układzie deoksyholanu sodu (NaDC); warunki: detekcja 254nm, przepływ 0.04 ml/min, kolumna C18 (5 μ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Zmiana profilu zależności temperaturowych dla obu badanych surfaktantów wskazuje na zmianę mechanizmu retencji. W ogólnym przypadku zmiana temperatury kolumny wpływa na dwa konkurencyjne procesy: adsorpcję na fazie stacjonarnej oraz proces oddziaływania z micelami w fazie ruchomej. Prawdopodobnym wydaje się zatem,

że w zakresie temperatur 15⁰-30⁰C pokrycie fazy stacjonarnej jak również morfologia miceli pozostawały w przybliżeniu stałe. Powyżej jednak 35⁰C najprawdopodobniej dochodziło do zmiany geometrii układu micelnego i/lub zmiany pokrycia surfaktantem fazy stacjonarnej, co wpłynęło na obserwowane na wykresie odstępstwo od liniowości korelujące ze zmianą mechanizmu retencji.

Tab. 8.11 Parametry termodynamiczne procesu enancjoseparacji, wyznaczone w zakresie temperatur 15⁰-30⁰C, dla izomerów BNDHP w wybranych układach badanych surfaktantów (wytłuszczonym drukiem podkreślono izomer wymywany jako pierwszy z pary).

		BNDHP					
	ΔH^0 [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^0 + \ln \phi$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	R^2	$\Delta_\alpha \Delta H^0$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta_\alpha \Delta S^0$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	R^2	$\Delta_{25c} \Delta G^0$ [kJ·mol ⁻¹]
0.1 M cholano sodu							
	+ 3% v/v	<i>PeOH</i>					
R-BNDHP	-8.23	-22.36	0.999	-2.66	-7.56	0.994	-0.40
S-BNDHP	-5.57	-17.71	0.999				
	+ 30% v/v	<i>MeOH</i>					
R-BNDHP	-7.73	-12.88	0.999	2.44	10.01	0.994	-0.53
S-BNDHP	-5.23	-2.99	0.999				
0.1 M deoksychołano sodu							
	+ 3% v/v	<i>MeOH</i>					
R-BNDHP	-7.98	-16.21	0.998	-0.25	1.14	0.985	-0.59
S-BNDHP	-8.31	-15.04	0.998				
	+ 30% v/v	<i>MeOH</i>					
R-BNDHP	-8.99	-23.19	0.967	1.23	7.21	0.995	-0.91
S-BNDHP	-7.64	-15.63	0.956				

Na podstawie uzyskanych wyników dla cząsteczek modelowych, w liniowym zakresie zależności (15⁰-30⁰C), wyznaczono podstawowe parametry termodynamiczne. Otrzymane wartości zestawiono w Tab. 8.11. Dla badanych układów NaC i NaDC,

zmiany entalpii przeniesienia cząsteczek BNDHP z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej przyjmowały wartości ujemne ($\Delta H^0 < 0$). Dla układu cholanu sodu (NaC), bez względu na rodzaj dodatku organicznego, większą wartość $|\Delta H^0|$ posiadał izomer o konfiguracji *R*. Porównując układy NaC z dodatkiem MeOH oraz PeOH, zauważono, że $|\Delta H^0|$ dla obu systemów charakteryzuje zbliżona wartość, podczas gdy człon $|\Delta S^0 + \ln \phi|$ jest dużo wyższy dla faz z dodatkiem PeOH. Sugeruje to wyższy stopień molekularnego uporządkowania procesu asocjacji analitu. Ciekawie przedstawiają się wyniki różnicy zmian entalpii oraz entropii pomiędzy izomerami. Dla układu NaC/3% PeOH, $\Delta_\alpha \Delta H^0$ i $\Delta_\alpha \Delta S^0$ przyjmują wartości ujemne. W tym przypadku czynnikiem determinującym proces enancjoseparacji jest zatem czynnik entalpowy. Dla układu NaC/30% MeOH oba parametry termodynamiczne przyjmują wartości dodatnie. W tych warunkach proces kontrolowany jest zatem zmianami entropii. Dla obu badanych faz cholanu sodu dużym zmianom $|\Delta \Delta H^0|$ nie towarzyszą równie duże zmiany $|\Delta_{25C} \Delta G^0|$ (Tab. 8.11). Świadczy to o znaczącej roli czynnika entropowego w procesie separacji izomerów BNDHP.

Dla układów z deoksycholaniem sodu (NaDC), $|\Delta H^0|$ przyjmuje wartość wyższą dla izomeru *R*-BNDHP na fazie z dodatkiem 3% MeOH oraz izomeru o konfiguracji *S* na fazie z dodatkiem 30% MeOH. Wzrost stężenia metanolu w fazie ruchomej prowadził do zwiększenia członu $|\Delta S^0 + \ln \phi|$ o ok. 4% i 43% odpowiednio dla izomeru *S*-BNDHP i *R*-BNDHP. Bezwzględne różnice zmian entalpii dla izomerów BNDHP w układzie NaDC, są wyższe niż w układzie NaC. Sugeruje to, że agregaty NaDC są lepszymi selektorami chiralnymi dla molekuł BNDHP. Dodatnie wartości $\Delta_\alpha \Delta H^0$ oraz $\Delta_\alpha \Delta S^0$ otrzymane na fazie z dodatkiem 30% MeOH, świadczą o entropowym charakterze procesu enancjoseparacji. Dziesięciokrotne zmniejszenie stężenia rozpuszczalnika organicznego (3%), wpłynęło na zmianę charakteru procesu. Ujemna wartość $\Delta_\alpha \Delta H^0$ oraz dodatnia $\Delta_\alpha \Delta S^0$ sugerują, że zarówno czynnik entalpowy jak i entropowy faworyzują proces rozdzielania chiralnego molekuł.

MICELE SOLI KWASÓW CHOLOWYCH JAKO CHIRALNE FAZY PSEUDOSTACJONARNE W MICELARNEJ ELEKTROKINETYCZNEJ CHROMATOGRAFII KAPILARNEJ

Zastosowanie cholanowych faz pseudostacjonarnych do diastereoseparacji izomerów flawanonów zostało zaproponowane po raz pierwszy w 2003 roku przez dr inż. M. Asztemborską z Laboratorium Analiz Chromatograficznych ICHF PAN [140].. Przy użyciu cholanu sodu Asztemborska rozdzieliła diastereomery neohesperydyny oraz narynginy. Próby z użyciem innych soli sodowych kwasów cholowych podjęte zostały również przez grupę Schuriga [72]. Uzyskane wyniki były jednak niezadowalające. Dotychczas, głównie stosowanymi selektorami w rozdzielach chiralnych flawanonów były naturalne cyklodektryny [141, 76, 142] oraz ich pochodne [143]. Jak do tej pory nie udało się rozdzielić diastereoizomerów flawanonów w środowisku achiralnym. Niniejsza praca stanowi kontynuację i rozwinięcie projektu zastosowania cholanu i deoksycholanu sodu do rozdzielania diastereoizomerów glikozydów flawanonów.

9.1 Wpływ składu buforu wiodącego na proces separacji związków modelowych

Związki rozdzielane z grupy chiralnych flawonoidów opisano w rozdziale 3 (podrozdział 3.4). Zaprojektowanie optymalnego układu elektroforetycznego służącego do rozdzielania epimerów flawanonów rozpoczęto od określenia wpływu składu buforu na własności separacyjne badanych faz pseudostacjonarnych. Do badań wybrano trzy bufony wiodące^{4,5}: *Bufor I*- tetraboranowy (25 mM Na₂B₄O₇/ 200 mM H₃BO₃),

⁴ W każdym przypadku dodatkowo dodano MeOH (10%);

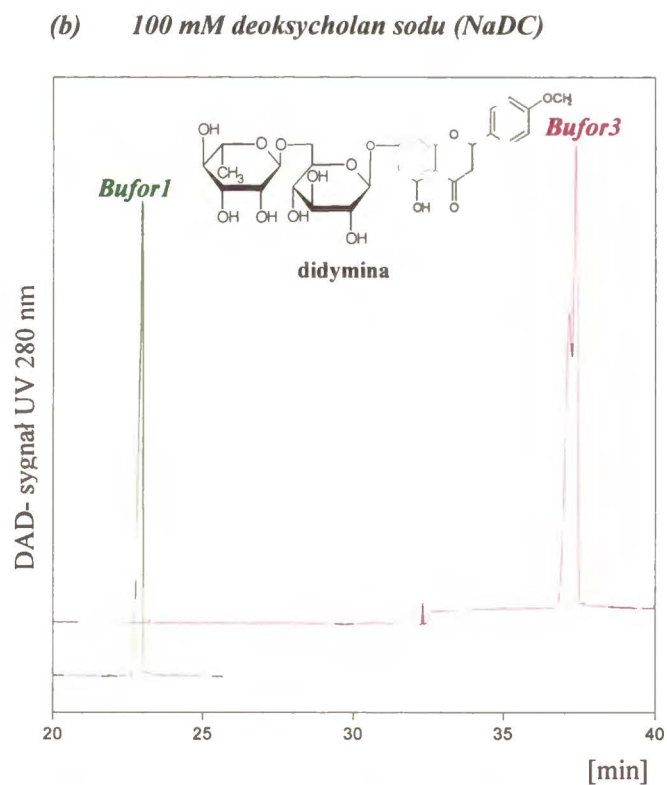
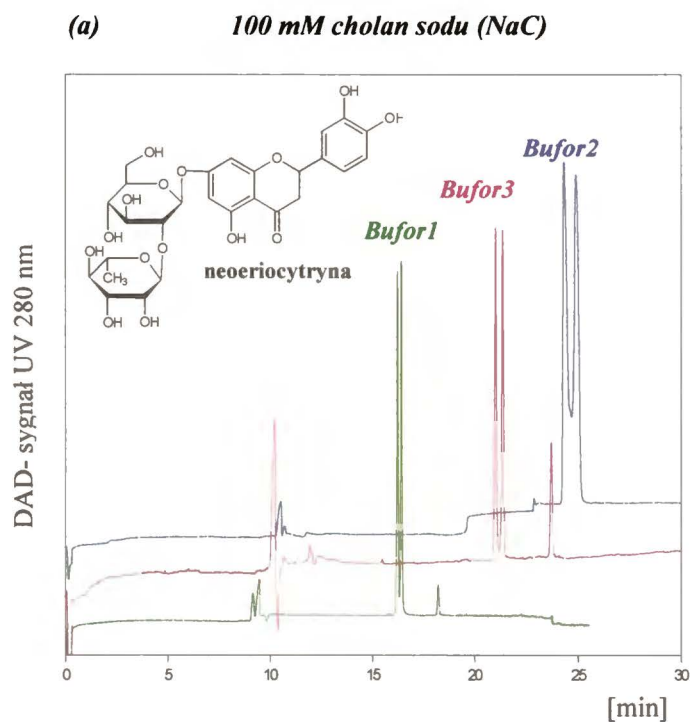
Bufor2-fosforanowy (50mM, produkt firmy Beckman Coulter), *Bufor3*- tertaboranowo-dwufosforanowy (50 mM Na₂B₄O₇/200 mM NaH₂PO₄).

Bufor tetraboranowy jest najczęściej stosowanym do rozdzielania flawanonów. Bardzo dobre wyniki separacji Morin [144] tłumaczył możliwością tworzenia ujemnie naładowanego kompleksu pomiędzy jonami buforu a grupami OH pierścieni polifenolowych flawanonu. W przypadku zastosowania jednak anionowego selektora, duży ładunek ujemny na analicie może wpłynąć niekorzystnie na proces rozdzielania. Aby tego uniknąć stosuje się zamiennie niekompleksujący bufor fosforanowy lub tetraboranowo-fosforanowy [72].

Separację izomerów flawanonów przeprowadzono przy pH 7.5. Stężenie surfaktantu (NaC lub NaDC) wynosiło 100 mM. Flawanony są słabymi kwasami i ich pK_a mieści się w zakresie 7-10 [145]. W badanych warunkach występują zatem w formie niezdysocjowanej lub zjonizowanej w niewielkim stopniu. Oddziaływania pomiędzy anionowymi micelami a analitem mają zatem głównie charakter hydrofobowy.

Na Rys. 9.1 przedstawiono przykładowe elektroferogramy uzyskane dla neoericytryny i didyminy w warunkach badanych buforów. Czasy migracji wszystkich flawanonów umieszczono w Tab. 9.1. Jak widać w układzie cholanu sodu dla wszystkich badanych związków najkrótsze czasy migracji uzyskano stosując bufor tetraboranowy (*Bufor1*). W porównaniu do *Buforu1*, w *Buforze2* i *Buforze3* zaobserwowano ponad 30% wzrost czasów migracji. Dla większości cząsteczek czasy t_m uzyskane w *Buforze2* są nieznacznie krótsze w stosunku do otrzymanych w *Buforze3* ($t_m^{Bufor3} > t_m^{Bufor2} > t_m^{Bufor1}$). Wyjątek stanowi grupa molekuł, dla której aglikonem jest cząsteczka eriodykcjolu. Należą do niej: neoericytryna, pyrakantozyd oraz ericytryna. W tym przypadku dłuższe czasy migracji otrzymano na buforze fosforanowym ($t_m^{Bufor2} > t_m^{Bufor3} > t_m^{Bufor1}$). Kolejność migrujących cząsteczek w układzie 100 mM NaC/*Bufor1* oraz 100 mM NaC/*Bufor3* jest podobna, znacząco różni się jednak w stosunku do układu 100 mM NaC/*Bufor2*. Biorąc pod uwagę własności separacyjne trzech układów buforowych największe różnice czasów migracji pomiędzy poszczególnymi flawanonami otrzymano w *Buforze3*. Rodzaj stosowanego buforu nie wpłynął na kolejność migracji diastereoizomerów z danej pary. Jako pierwszy migrował zawsze izomer o konfiguracji *S*.

⁵ W nawiasach podano stężenia wyjściowe głównych składników buforu



Rys. 9.1 Elektroferogramy neoircytryny (NEE) oraz didyminy (DID) otrzymane w fazie pseudostacjonarnej odpowiednio cholanu sodu (a) oraz deoksycholanu sodu (b) w różnych systemach buforowych: *Bufor1*- tetraboranowy, *Bufor2*-fosforanowy, *Bufor3*-tetraboranowo-fosforanowy; warunki: pH 7.5, temp.25⁰C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Tab. 9.1 Czasy migracji (t_m) flawanonów w badanych układach buforowych; warunki: pH 7.5, temp. 25°C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Flawanon		0.1 M NaC			0.1 M NaDC		
		<i>Bufor1</i>	<i>Bufor2</i>	<i>Bufor3</i>	<i>Bufor1</i>	<i>Bufor2</i>	<i>Bufor3</i>
		$t_{eof}=9.30$	$t_{eof}=10.50$	$t_{eof}=10.50$	$t_{eof}=8.50$	$t_{eof}=10.50$	$t_{eof}=10.20$
Naryngina (NAR)	(S)	19.19	25.64	26.73	21.52	33.50	31.29
	(R)	19.57	26.42	27.47	21.64	33.80	31.59
Neohesperydyna (NEH)	(S)	19.16	25.22	26.50	22.43	38.00	32.24
	(R)	19.57	25.92	27.28	22.62	38.58	32.66
Neoericytryna (NEE)	(S)	16.22	24.32	21.75	14.93	30.05	19.36
	(R)	16.41	24.89	22.11	15.04	30.32	19.55
Ponciryna (PON)	(S)	20.78	26.61	29.04	24.48	44.20	40.14
	(R)	20.90		29.21	24.27	43.53	39.62
Pyrakantozyd (PYR)	(S)	16.35	27.23	21.38	15.12	30.93	19.63
	(R)	16.45	27.50	21.55			
Narirutyna (NUR)	(S)	17.35	22.90	23.46	20.60	29.45	28.10
	(R)						28.20
Hesperydyna (HES)	(S)	17.62	21.52	22.20	19.90	35.13	26.52
	(R)						
Eriocytryna (ERI)	(S)	11.22	21.87	19.90	14.28	27.68	18.12
	(R)						
Didymina (DID)	(S)	19.40	25.20	26.62	24.08	40.94	36.95
	(R)						36.74

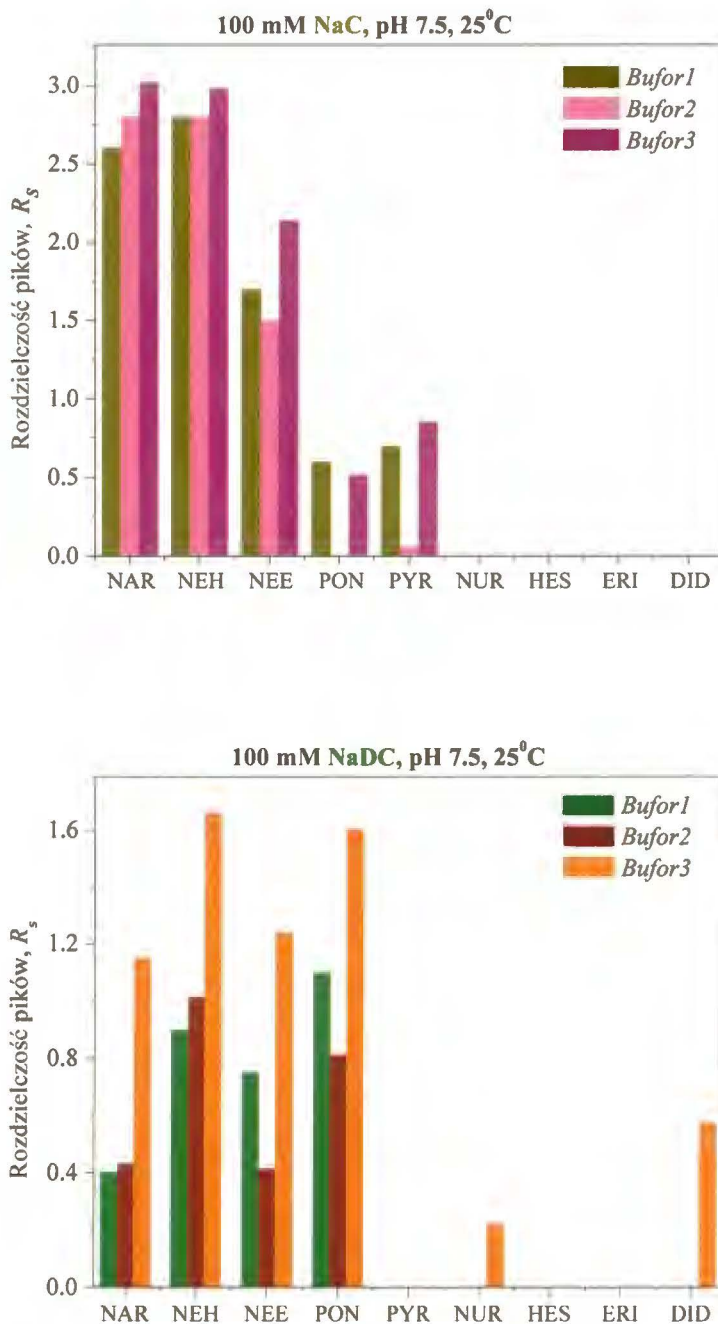
W układzie 100 mM NaDC zbadano również trzy bufory: tetraboranowy (*Bufor1*), fosforanowy (*Bufor2*) oraz tetraboranowo-dwufosforanowy (*Bufor3*). Dla wszystkich badanych flawanonów najdłuższe czasy migracji uzyskano w *Buforze2*:

$t_m^{Bufor2} > t_m^{Bufor3} > t_m^{Bufor1}$ (Tab. 9.1). W układzie *Buforu2*, w stosunku do *Buforu1*, najmniejszy wzrost t_m odnotowano dla cząsteczki NUR (40%), największy natomiast dla PYR (104%). W *Buforze3* obserwowane wzrosty były mniejsze. Maksymalny wzrost odnotowano dla cząsteczki PON i wynosił 63%.

Układ NaDC/*Bufor3* charakteryzowała najwyższa selektywność ze wszystkich badanych układów buforowych. Obserwowano bowiem największe zróżnicowanie czasów migracji flawanonów. Bez względu na rodzaj środowiska achiralnego, dla większości cząsteczek kolejność wymywanych diastereoizomerów w układzie NaDC była podobna. Wyjątek stanowi NUR w *Buforze2*, który to migruje szybciej w stosunku do pozostałych flawanonów w układzie *Buforu1* i *Buforu3*. Dla większości badanych cząsteczek jako pierwszy migrował izomer o konfiguracji *S*. Wyjątek stanowią diastereomery PON dla których $t_m^R > t_m^S$. W porównaniu zatem do układu cholanu sodu dla izomerów poncirynu zaobserwowano odwrócenie kolejności migracji. Efekt ten związany jest z działaniem selektora chiralnego.

Porównując diastereoselektywność soli kwasów cholowych w różnych buforach zauważono, że zarówno dla układu cholanu jak i deoksycholanu sodu najwyższe wartości współczynników rozdzielania uzyskano w *Buforze3*. Otrzymane wielkości R_s dla poszczególnych systemów buforowych przedstawiono na Rys. 9.2. Dla układu cholanu sodu wielkości R_s uzyskane w *Buforze1* oraz *Buforze3* są porównywalne. Najmniejszą diastereoselektywność micelle cholanu sodu wykazywały w *Buforze2*. W układzie NaDC wpływ buforu na separację izomerów jest bardziej znaczący. W *Buforze2* dla NAR i NEH, R_s osiągały wartości porównywalne z uzyskanymi w *Buforze1*, zaś dla NEE i PON znacznie niższe. Znaczący wzrost współczynników rozdzielania odnotowano w układzie *Buforu3*. W stosunku do *Buforu1* zaobserwowano wzrost R_s o ponad 120% dla izomerów NAR i NEH, zaś dla NEE i PON o ponad 40%. Ponadto w układzie NaDC/*Bufor3* zaobserwowano wygenerowanie diastereoselektywności miceli NaDC⁶ w stosunku do izomerów DID oraz NUR

⁶ Indukowana diastereoseparacja nie jest wynikiem działania samego środowiska achiralnego, co zostało opisane w rozdziale poświęconym wpływowi stężenia surfaktantu na separację związków badanych.



Rys. 9.2 Wpływ buforu na wartość współczynnika rozdzielania w badanych układach cholanu sodu (wykres górny) oraz deoksycholanu sodu (wykres dolny).

Powyzsze wyniki pozwoliły na dokonanie wyboru buforu wiodącego dla badanych układów soli kwasów cholowych. Pomimo dłuższych czasów migracji oraz porównywalnej diastereoselektywności w układzie cholanu sodu, dalsze badania

postanowiono przeprowadzać w buforze tetraboranowo-dwufosforanowym (*Bufor3*). Znaczne wzmocnienie diastereoselektywności oraz większe zróżnicowanie czasów migracji pomiędzy poszczególnymi flawanonami w układzie deoksyholanu sodu okazały się czynnikami decydującymi przy wyborze elektrolitu wiodącego.

9.2 Wpływ dodatku organicznego na diastereoseparację flawanonów

Aby sprawdzić rolę dodatku organicznego w procesie separacji flawanonów do badań wytypowano trzy rozpuszczalniki organiczne: metanol (MeOH), acetonitryl (ACN) oraz propan-2-ol (2-PrOH). Rozpuszczalniki te różnią się między sobą polarnością. Metanol i acetonitryl należą do rozpuszczalników występujących w objętościowej fazie roztworu. W przeciwieństwie do metanolu i propan-2-olu, acetonitryl jest rozpuszczalnikiem aprotycznym. Stężenie dodatku organicznego we wszystkich przypadkach wynosiło 10%. Dla takiej wartości stężenia wpływ modyfikatora na CMC miceli soli kwasów cholowych jest nieznaczący i może być pominięty [146]. W celu porównania otrzymanych wyników dodatkowo wykonano pomiary w buforze odniesienia (bez dodatku modyfikatora organicznego).

Tab. 9.2 przedstawia otrzymane parametry elektroforetyczne dla trzech flawanonów. Rozpuszczalnik organiczny może wpłynąć zarówno na podwójną warstwę elektryczną na ścianie kapilary (przepływ elektroosmotyczny) i zmianę własności fizykochemicznych buforu wiodącego (m.in. lepkości), ale również na stabilność i selektywność układu selektora w stosunku do cząsteczek analitu. We wszystkich modyfikowanych rozpuszczalnikami organicznymi buforach z cholanem sodu zaobserwowano spadek ruchliwości elektroforetycznej buforu. Największą redukcję EOF w stosunku do buforu odniesienia odnotowano w buforze z dodatkiem 2-PrOH, najmniejszą natomiast w buforze z dodatkiem ACN ($\mu_{eof}^{brak} > \mu_{eof}^{ACN} > \mu_{eof}^{MeOH} > \mu_{eof}^{2-PrOH}$). Porównując czasy migracji badanych flawanonów w układzie z NaC, najdłuższe czasy uzyskano w buforze modyfikowanym MeOH. Czas migracji w stosunku do buforu odniesienia wzrósł o ponad 49%, 51% oraz 64% odpowiednio dla NAR, NEH oraz NEE. W stosunku do cząsteczek NAR i NEH badany układ charakteryzowała bardzo wysoka diastereoselektywność. Analogiczne wzrosty czasów migracji odnotowano w buforze z dodatkiem 2-PrOH (35% dla NAR i NEH oraz 60% dla NEE).

Tab. 9.2 Wpływ rozpuszczalnika organicznego na proces diastereoseparacji wybranych flawanonów; warunki: pH 7.5, temp.25°C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Flawanon		40 mM NaC/ <i>Bufor3</i>			100mM NaDC/ <i>Bufor3</i> ⁷			
		<i>Bez modyfikatora</i>	10% ACN	10% 2-PrOH	10% MeOH	10% ACN	10% 2-PrOH	10% MeOH
Naryngina (NAR)	t_{m2}	10.84	10.19	14.65	16.20	18.61	21.40	28.49
	α_{app}	1.024	1.011	1.013	1.025	1.007	1.003	1.046
	R_s	1.60	0.86	1.50	2.19	0.68	0.10	1.16
Neohesperydyna (NEH)	t_{m2}	10.80	10.19	14.59	16.48	18.66	21.71	28.75
	α_{app}	1.025	1.012	1.016	1.030	1.009	1.006	1.014
	R_s	0.90	0.72	1.50	2.72	0.89	0.81	1.62
Neoeriocytryna (NEE)	t_{m2}	8.89	10.35	14.29	14.64	13.37	18.77	17.93
	α_{app}	1.008	1	1.004	1.007	1.006	1.007	1.010
	R_s	0.83	0	0.28	0.56	0.58	0.86	0.90
EOF	t_m	6.00	7.20	9.50	8.90	8.0	10.0	9.40
	μ_{eof}	2.32	1.93	1.45	1.56	1.74	1.39	1.48

t_{m2} - czas migracji drugiego diastereomeru z pary [min], $\alpha_{app}=t_1/t_2$ - współczynnik rozdzielania, R_s - rozdzielczość pików; μ_{eof} - ruchliwość elektroforetyczna buforu [$10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]

⁷ *Bufor3*^{*}: tetraboranowo- dwufosforanowy (25 mM Na₂B₄O₇/100 mM NaH₂PO₄)

Selektywność układu była jednak niższa. Ciekawie przedstawia się układ NaC/ACN. W tym przypadku, w porównaniu z buforem odniesienia ($t_{eof}^{brak} < t_{eof}^{ACN}$), dla molekuł NAR i NEH zaobserwowano 5% spadek czasów migracji. Efektu tego nie zaobserwowano dla cząsteczki NEE. W stosunku do buforu niemodyfikowanego, czas migracji wzrósł o 17%. Układ NaC/ACN charakteryzował się najniższą diastereoselektywnością spośród badanych. Zaobserwowano ogólne pogorszenie rozdzielania diastereomerów, zaś w przypadku izomerów neoericytryny całkowity jego zanik.

Analogiczne pomiary przeprowadzono w układzie deoksyholanu sodu. Ze względu na małą stabilność buforu odniesienia i związany z tym efekt żelowania buforu, nie wykonano pomiarów w układzie NaDC bez modyfikatora organicznego. Podobnie jak dla NaC, największą ruchliwość elektroforetyczną buforu otrzymano w układzie z ACN, najmniejszą natomiast dla dodatku 2-PrOH. Dla wszystkich badanych cząsteczek najkrótsze czasy migracji uzyskano w buforze z dodatkiem ACN. Porównując diastereoselektywność badanych układów zauważono, że najwyższą zdolnością rozdzielczą charakteryzował się układ z dodatkiem MeOH, najniższą natomiast z dodatkiem ACN. Wyniki ten jest analogiczny do uzyskanego w fazach z cholanem sodu.

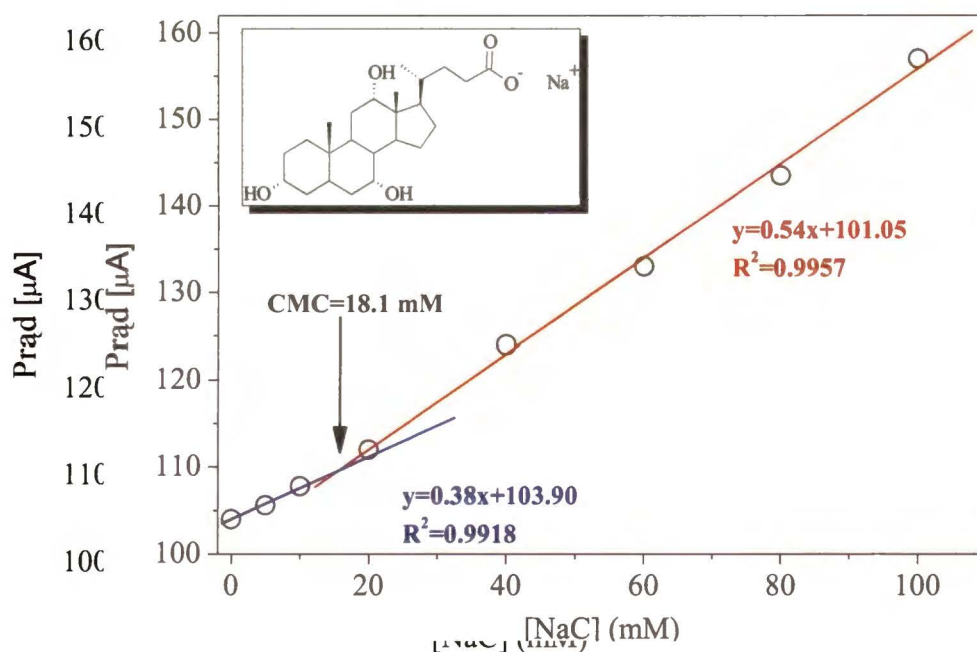
Powyższe wyniki pozwoliły na ostateczny wybór modyfikatora organicznego. Do dalszego etapu optymalizacji metody rozdzielania mieszaniny flawanonów wybrano bufor tetraboranowo-dwufosforanowy z 10% dodatkiem MeOH

9.3 Wyznaczenie krytycznego stężenia micelnego dla cholanu sodu i deoksyholanu sodu w badanych warunkach elektroforetycznych

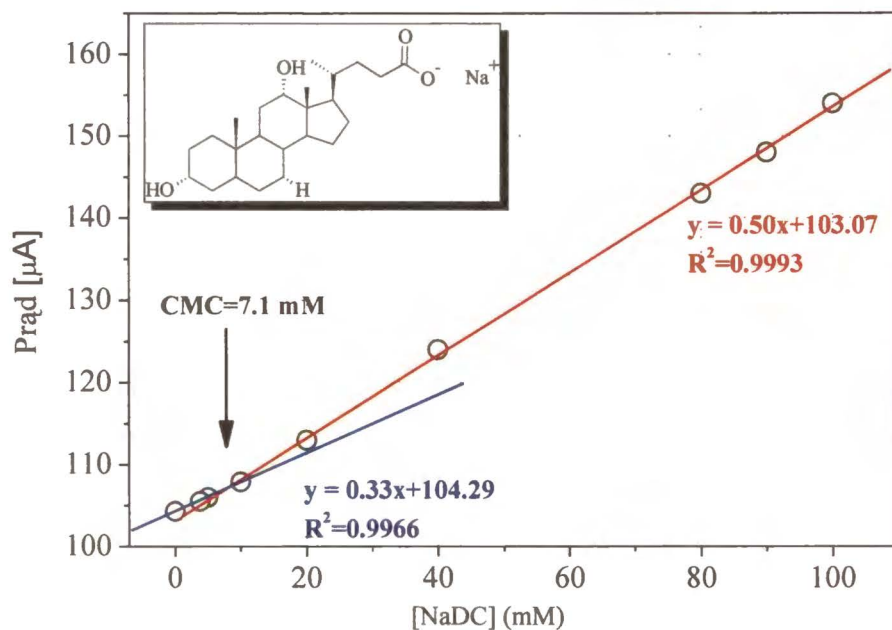
Wartość krytycznego stężenia micelnego w warunkach MECC dla badanych soli kwasów cholowych wyznaczono metodą zaproponowaną przez Cifuentesa [147] dla roztworów wodnych. Metoda oparta jest na pomiarze prądu roztworu micelnego elektrolitu wiodącego w funkcji całkowitego stężenia surfaktantu. W układach wodnych surfaktantu, w punkcie CMC obserwuje się bowiem spadek przewodnictwa właściwego roztworu. Wynika to zarówno ze zjawiska inkluzji do wnętrza miceli przeciwnie naładowanych jonów amfifila (ang. *co-ions*) oraz wzrostu oporu ruchu miceli w roztworze wynikającym ze zmiany jonowego otoczenia miceli (oddziaływanie ko-

jonów z zewnętrzną powierzchnią miceli). W warunkach elektroforezy kapilarnej dla micelarnych roztworów wodnych, otrzymuje się dwie proste o różnym nachyleniu. Pierwsza opisuje zależność prądową w obszarze wolnego surfaktantu, druga natomiast odnosi się do układu zagregowanego. Miejsce przecięcia obu prostych wyznacza punkt **CMC**.

Na Rys. 9.3 i Rys. 9.4 przedstawiono zależności natężenia prądu w funkcji stężenia odpowiednio cholanu sodu i deoksycholanu sodu w układzie MeOH/*Bufor3* w temperaturze 25⁰C. Otrzymane zależności są typowymi dla micelarnych roztworów wodnych. W zależności od formy surfaktantu (wolna/zagregowana) w roztworze, otrzymano proste o różnym kącie nachylenia. Wyznaczone z przecięcia linii wartości **CMC** wynosiły **18.1 mM** i **7.1 mM** odpowiednio dla cholanu i deoksycholanu sodu. Wyznaczone wartości **CMC** dla obu soli kwasów cholowych pozostają w dobrej zgodności z opisanymi w literaturze [30].



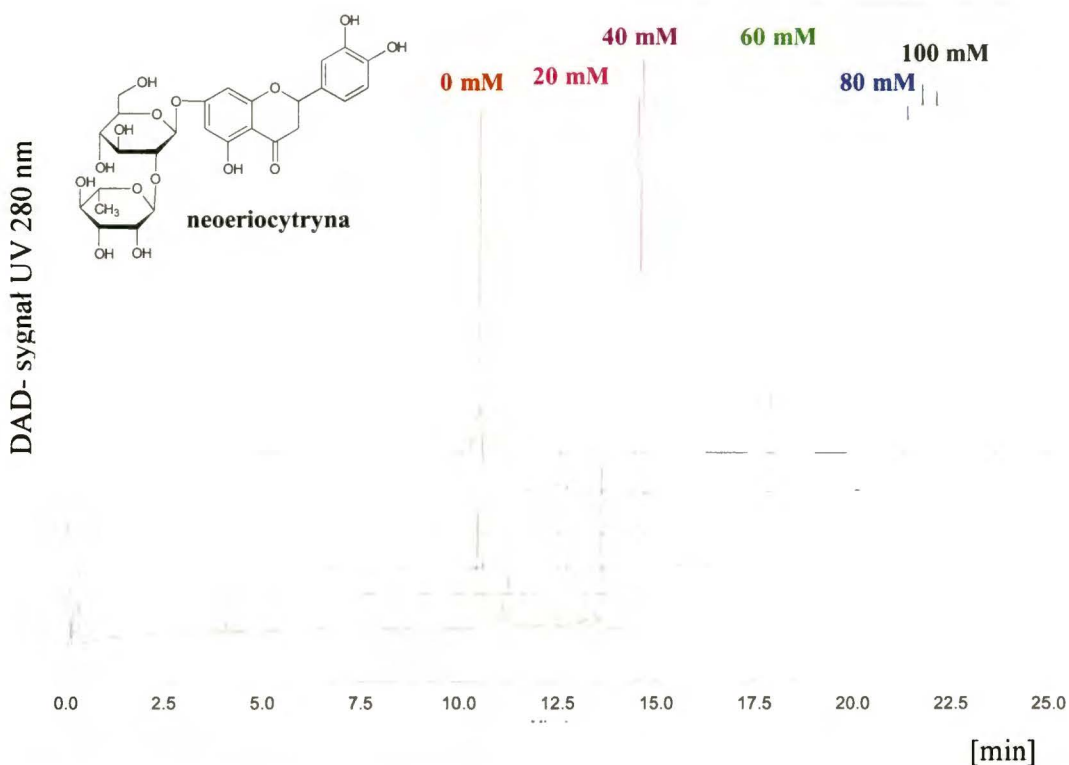
Rys. 9.3 Wykres zależności natężenia prądu w funkcji stężenia cholanu sodu (NaC) w warunkach MECC: bufor $Na_2B_4O_7 / NaH_2PO_4$ + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25⁰C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;



Rys. 9.4 Wykres zależności natężenia prądu w funkcji stężenia deoksycholanu sodu (NaDC) w warunkach MECC: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: $58 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

9.4 Wpływ stężenia surfaktantu na separację związków modelowych

Jednym z istotniejszych czynników wpływających na selektywność układu jest stężenie surfaktantu. Na Rys. 9.5 przedstawiono przykładowe elektroferogramy uzyskane dla neoericyrtyny (NEE) w różnych stężeniach cholenu sodu jako chiralnego selektora w układzie MECC. Wzrost stężenia cholenu sodu wydłużał czasy migracji izomerów związku badanego. Wzrost stężenia surfaktantu wpływał również na wzrost EOF. Analogiczne wyniki uzyskano dla wszystkich dziewięciu flawanonów w obu systemach faz pseudostacjonarnych (NaC oraz NaDC).



Rys. 9.5 Elektroferogramy neoeriocytrynu otrzymane na cholanowej fazie pseudostacjonarnej w zakresie stężeń choanu sodu 0-100 mM. warunkach MECC: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: 58 cm \times 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Wpływ stężenia cholanu i deoksycholanu sodu na efektywną mobilność elektroforetyczną oraz współczynnik retencji dla dziewięciu badanych flawanonów przedstawiono w Tab. 9.3 i Tab. 9.4. Efektywne ruchliwości elektroforetyczne oraz współczynniki retencji wyznaczono odpowiednio za pomocą Równ. 4.17 i Równ. 4.19. Indeks dolny 2 odnosi się do izomeru migrującego z mniejszą prędkością. Dla stężeń 10 mM i 20 mM NaC oraz 10 mM NaDC nie wyznaczono wartości współczynników retencji k . Dla poprawnego określenia wartości potrzebna jest bowiem znajomość ruchliwości selektora bądź to w formie monomerycznej bądź zagregowanej. Zastosowana w pracy pośrednia metoda pomiaru ruchliwości cząsteczki Sudanu III, jako markera układu micelarnego, dla stężenia poniżej CMC lub też w bliskim jego obszarze (małe agregaty), okazała się nieskuteczna.

Tab. 9.3 Zależność efektywnej ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynnika retencji dla badanych diastereomerów flawanonów w układzie cholanu sodu; warunkach: bufor Na₂B₄O₇ / NaH₂PO₄ + 10% MeOH (pH 7.5), temp.25^oC, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV;

Flawanon	izomer		Cholan sodu (NaC) / 50mM Na ₂ B ₄ O ₇ / 200mM NaH ₂ PO ₄ / 10%MeOH ^(a)						
			0 mM	10 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM	100 mM
Naryngina (NAR)	(S)	μ_{eff2}	0.00	-1.85	-4.13	-6.82	-7.67	-8.03	-7.94
		k_2	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.82	2.58	3.12	3.72
Neohesperydyna (NEH)	(S)	μ_{eff2}	0.00	-2.07	-4.39	-6.98	-7.73	-8.04	-7.90
		k_2	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.95	2.65	3.14	3.64
Neoericytryna (NEE)	(S)	μ_{eff2}	-4.63	-5.21	-5.48	-5.99	-6.45	-6.75	-6.73
		k_2	0.35	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.29	1.54	1.73	2.00
Ponciryndyna (PON)	(S)	μ_{eff2}	0.00	-2.15	-4.58	-7.08	-7.89	-8.35	-8.85
		k_2	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	2.48	3.14	4.12	5.18
Pyrakantozyd (PYR)	(R)	μ_{eff2}	-5.14	-5.26	-5.33	-5.77	-6.26	-6.78	-6.79
		k_2	0.39	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.23	1.42	1.77	1.92
Narirutyna (NUR)	<i>b.r</i>	μ_{eff}	0.00	-1.50	-3.13	-5.62	-6.57	-7.09	-7.35
		k	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.11	1.60	2.01	2.39
Hesperydyna (HES)	<i>b.r</i>	μ_{eff}	0.00	-1.64	-3.25	-5.40	-6.40	-6.60	-6.80
		k	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.06	1.51	1.69	1.90
Eriocytryna (ERI)	<i>b.r</i>	μ_{eff}	-4.26	-4.77	-5.19	-5.51	-5.76	-5.79	-6.06
		k	0.31	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.04	1.15	1.24	1.49
Didymina (DID)	<i>b.r</i>	μ_{eff}	0.00	-1.76	-3.67	-6.62	-7.34	-7.55	-7.54
		k	0.00	<i>b.d</i>	<i>b.d</i>	1.70	2.29	2.68	3.28

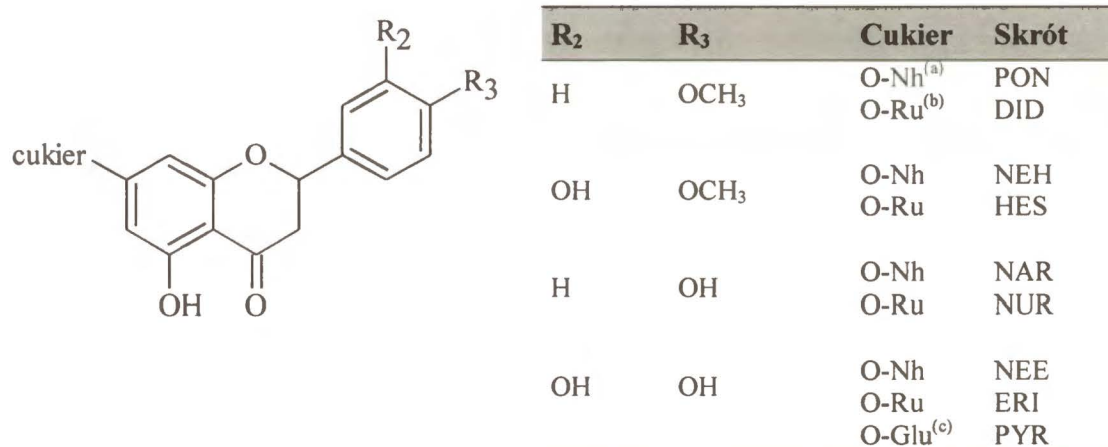
(a) w zakresie 40-100 mM k wyznaczono z Równ. 4.19; μ_{eff} : 10⁻⁵cm²V⁻¹s⁻¹; *b.r* = brak rozdzielania; *b.d* = brak danych

Tab. 9.4 Zależność efektywnej ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynnika retencji dla badanych diastereomerów flawanonów w układzie deoksycholany sodu; warunkach: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 10\% \text{ MeOH}$ (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: $58 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m ID}$, przyłożone napięcie 20kV;

Flawanon	izomer		Deoksycholan sodu (NaDC) / $50\text{mM Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $200\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ / $10\% \text{ MeOH}$ ^(a)						
			(I)	0 mM	10 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM
Naringin (NAR)	(S)	μ_{eff}^2	0.00	-4.02	-6.44	-8.56	-9.32	-9.57	-9.65
		k_2	0.00	b.d	0.94	1.82	2.43	3.02	3.46
Neohesperydyna (NEH)	(S)	μ_{eff}^2	0.00	-4.47	-6.90	-8.96	-9.59	-9.82	-9.78
		k_2	0.00	b.d	1.07	2.14	2.70	3.21	3.68
Neoeriocytryna (NEE)	(S)	μ_{eff}^2	-4.63	-4.73	-5.43	-6.39	-6.81	-6.89	-6.94
		k_2	0.35	b.d	0.67	0.90	1.02	1.15	1.22
Ponciryna (PON)	(R)	μ_{eff}^2	0.00	-5.57	-8.61	-10.09	-10.49	-10.91	-10.61
		k_2	0.00	b.d	1.73	2.85	4.21	4.78	5.76
Pyrakantozyd (PYR)	b.r	μ_{eff}^2	-5.14	-5.39	-5.83	-6.56	-6.94	-7.06	-6.97
		k_2	0.39	b.d	0.75	0.96	1.09	1.15	1.23
Narirutyna (NUR)	(S)	μ_{eff}^2	0.00	-3.15	-5.55	-7.75	-8.69	-9.02	-9.04
		k_2	0.00	b.d	0.70	1.42	1.95	2.43	2.76
Hesperydyna (HES)	b.r	μ_{eff}	0.00	-3.17	-5.17	-7.51	-8.64	-9.18	-8.97
		k	0.00	b.d	0.61	1.25	1.78	2.29	2.47
Eriocytryna (ERI)	b.r	μ_{eff}	-4.26	-4.63	-4.92	-5.67	-6.13	-6.27	-6.37
		k	0.31	b.d	0.56	0.80	0.87	0.99	1.10
Didymina (DID)	(R)	μ_{eff}^2	0.00	-4.77	-7.85	-9.55	-10.03	-10.37	-10.28
		k_2	0.00	b.d	1.37	2.34	3.22	3.89	4.55

(a) w zakresie stężeń 20-100 mM k obliczono z Równ. 4.19; $\mu_{\text{eff}}: 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; b.r = brak rozdzielania; b.d = brak danych;

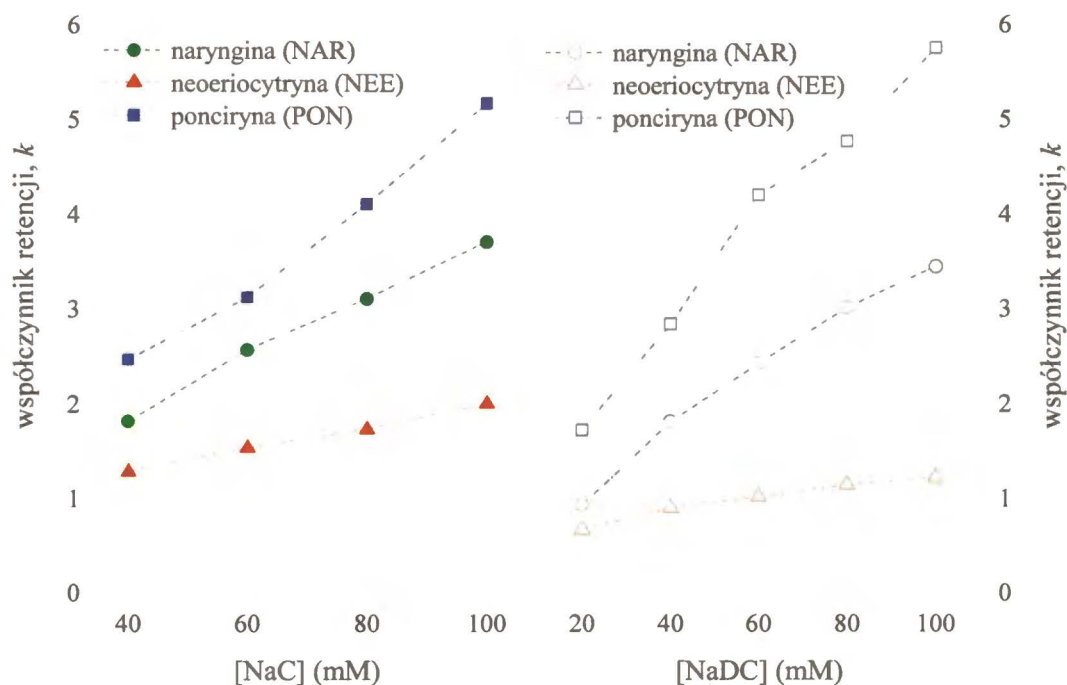
Na podstawie zestawionych w tabelach danych zauważyć można, że otrzymane wartości efektywnych ruchliwości mieszczą się z zakresie 0 – 9 [$10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] dla układu cholanu sodu oraz 0 - 11 [$10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] dla układu deoksycholau sodu. Przy braku surfaktantu w buforze, sześć z spośród badanych flawanonów (NAR, NEH, PON, DID, NUR, HES, Rys. 9.6) migrowały z prędkością EOF. Dla cząsteczek NEE, PYR oraz ERI odnotowano niezerową efektywną ruchliwość elektroforetyczną (Rys. 9.6). Molekuły te posiadają taki sam aglikon- eriodykcjol, który w warunkach przeprowadzanych analiz (pH 7.5) jest częściowo zjonizowany ujemnie ($\text{pK}_a = 6.7$). Dodatkowo na podstawie wcześniejszych obserwacji w innych układach buforowych (m.in. TRIS) wydaje się być wysoce prawdopodobnym tworzenie naładowanych kompleksów pomiędzy badanym aglikonem a jonami tetraboranowymi. Dla wszystkich izomerów flawanonów zarówno w układzie cholau jak i deoksycholau sodu μ_{eff} przyjmuje wartości ujemne.



Rys. 9.6 Budowa aglikonu w badanych O-glikozydach flawanonów; (a) neohesperydoza, (b) rutynoza, (c) glukoza

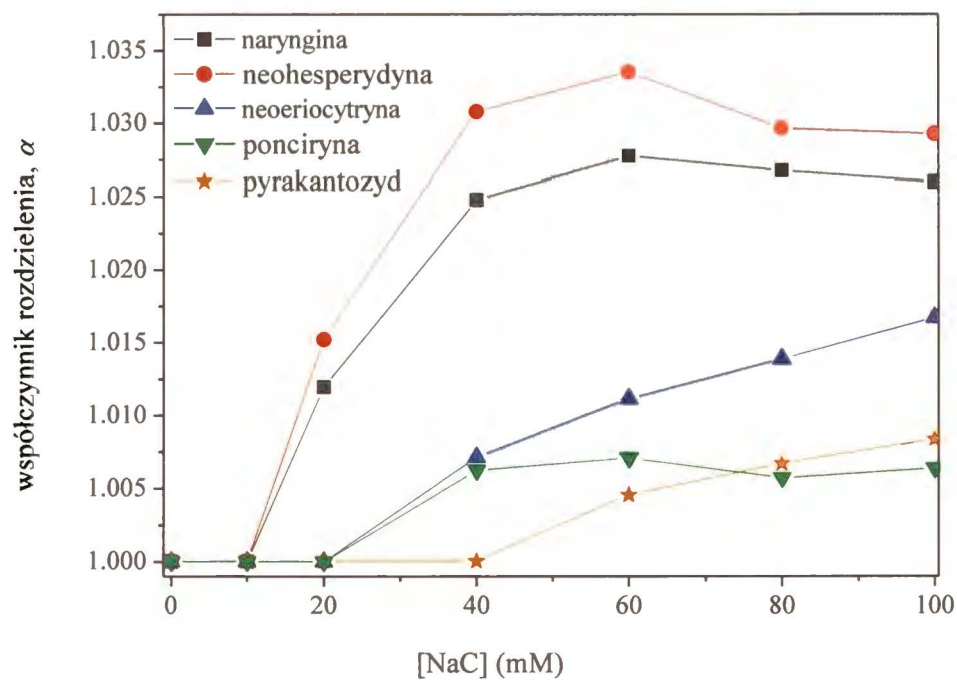
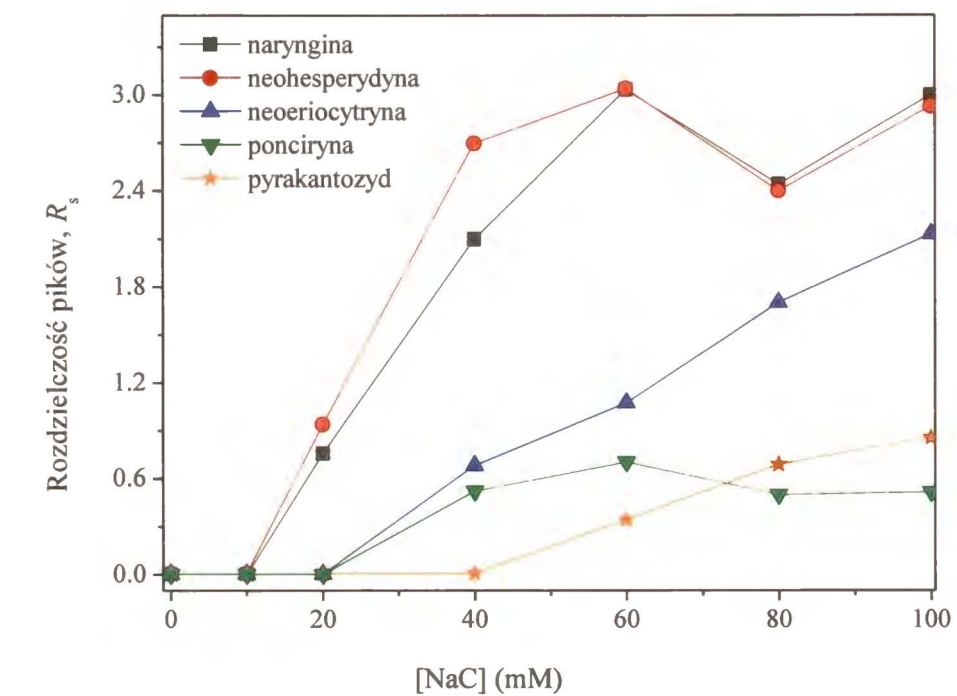
W zakresie stężeń 0 - 40 mM NaC i NaDC dla większości badanych cząsteczek zaobserwowano nagły wzrost $|\mu_{\text{eff}}|$. Dalsze zwiększenia stężenia surfaktantu w buforze nie wpłynęło w znaczący sposób na wzrost ruchliwości elektroforetycznej, obserwowano efekt plateau. Dla cząsteczek NEE, PYR oraz ERI (ten sam aglikon- eriodykcjol, Rys. 9.6) zależność efektywnej ruchliwości elektroforetycznej od stężenia surfaktantu (NaC lub NaDC) przebiegała w łagodniejszy sposób. Spośród wszystkich

badanych flawanonów cząsteczki te charakteryzowały się najmniejszymi wartościami $|\mu_{\text{eff}}|$ przy największym badanym stężeniu surfaktantu (NaC lub NaDC).

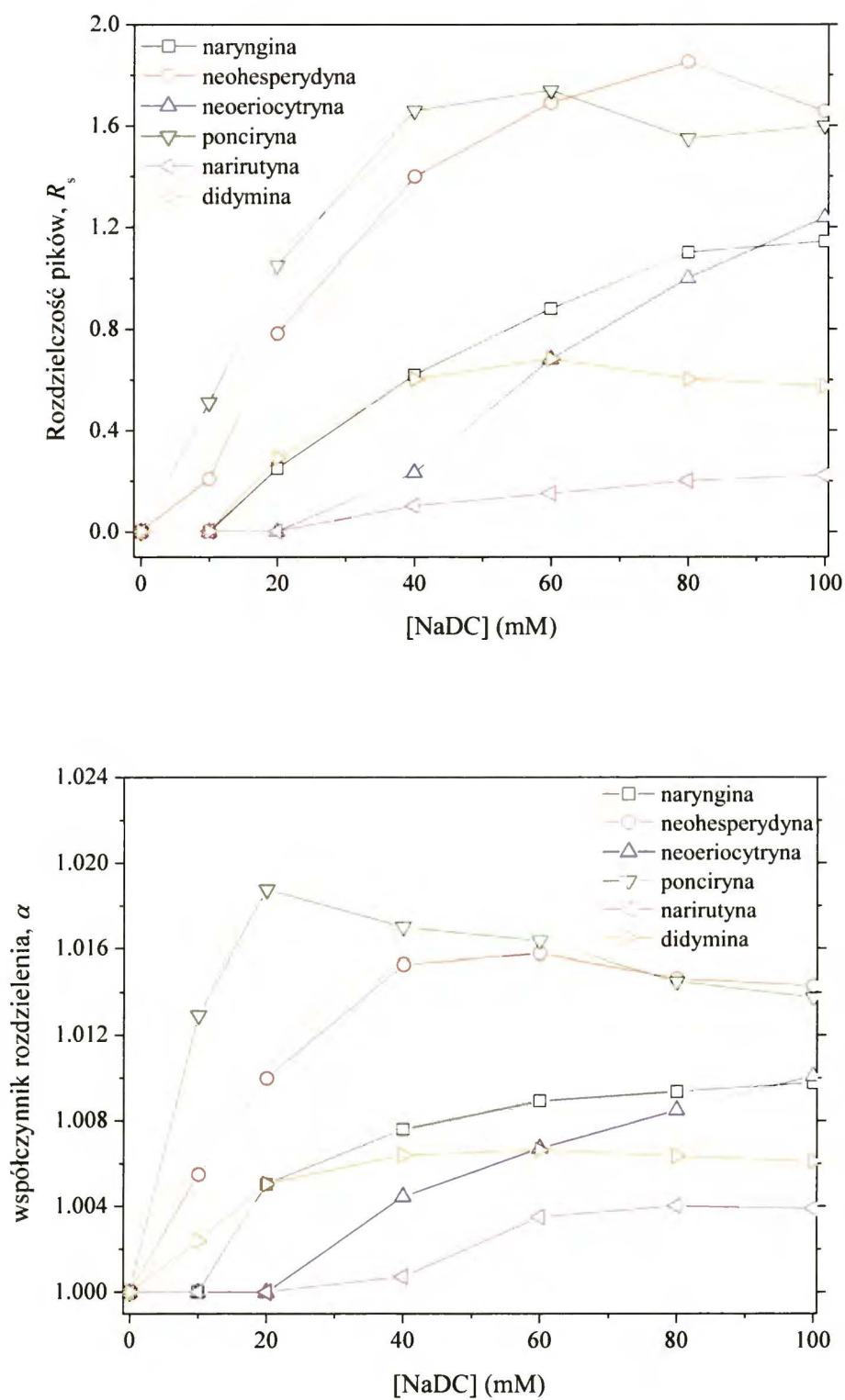


Rys. 9.7 Zależność współczynnika retencji od stężenia cholanu sodu (NaC) lub deoksycholanu sodu (NaDC) w buforze dla wybranych flawanonów.

Wraz ze wzrostem stężenia NaC oraz NaDC w buforze odnotowano wzrost współczynników retencji k . Najniższe wartości k charakteryzowały cząsteczki NEE, PYR oraz ERI, przy czym nieznacznie wyższe współczynniki retencji dla tych flawanonów uzyskano w układzie soli kwasu cholowego. Dla cząsteczek NAR, NEH oraz NUR wartości k w obu systemach micelarnych były porównywalne. Znaczące różnice odnotowano dla cząsteczek HES, PON oraz DID. Dużo wyższe wartości k dla tych cząsteczek uzyskano w buforze z dodatkiem deoksycholanu sodu (wzrost o 30%, 21% i 38% odpowiednio dla HES, PON i DID). Dla wszystkich badanych flawanonów w obu układach surfaktantów, powyżej punktu CMC, wyznaczone współczynniki retencji były proporcjonalne do stężenia surfaktantu. Przykładowe zależności dla wybranych cząsteczek w układzie NaC oraz NaDC przedstawiono na Rys. 9.7.



Rys. 9.8 Wpływ stężenia cholanu sodu na diastereo-separację badanych flawanonów



Rys. 9.9 Wpływ stężenia deoksycholenu sodu na diastereoseparację badanych flawanonów

Wpływ stężenia cholanu sodu na diastereoseparację badanych flawanonów przedstawiono na Rys. 9.8. Najwyższe wartości współczynników rozdzielienia i rozdzielczości pików uzyskano dla cząsteczek NEH i NAR. Diastereoseparacja dla tych związków była już obserwowana przy 20 mM stężeniu NaC. Dla cząsteczek NAR, NEH oraz PON, maksymalne wartości współczynników rozdzielienia α uzyskano w buforze o stężeniu NaC równym 60 mM. W przypadku NEE oraz PYR obserwowano wzrost ciągły, bez wartości maksymalnej. Dla większości badanych flawanonów jako pierwszy migrował izomer o konfiguracji *S*. Wyjątek stanowią diastereomery PYR dla których obserwowano odwrotną kolejność migracji. W układzie NaC nie uzyskano rozdzielienia izomerów w których część cukrową stanowi rutynoza (NUR, ERI, HES, DID). Poniżej punktu CMC (18 mM) układ cholanu sodu nie wykazywał diastereoselektywności.

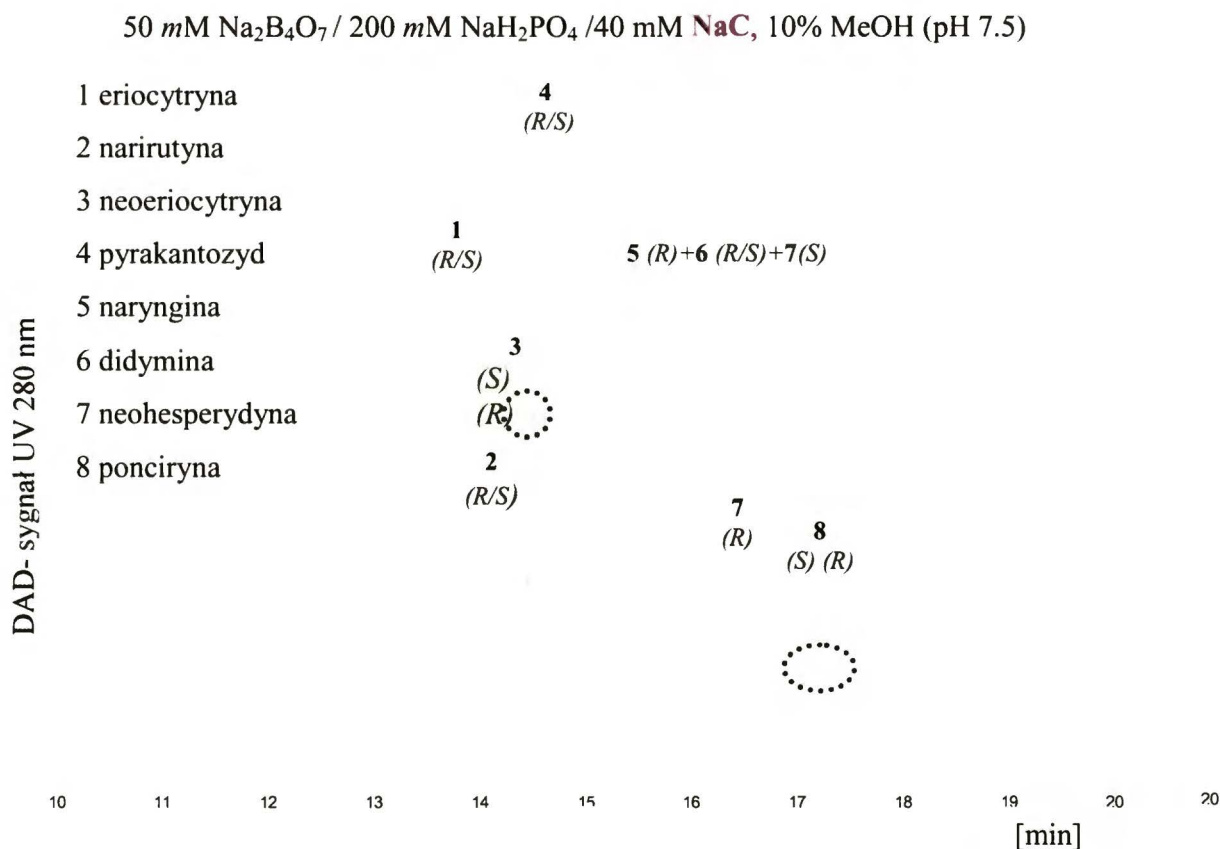
Wpływ stężenia deoksycholalu sodu na separację badanych flawanonów przedstawiono na Rys. 9.9. W porównaniu z układem NaC, w buforze z NaDC nie uzyskano diastereoseparacji izomerów PYR, jednakże obok rozdzielenia narynginy neohesperydydy oraz neoeriocytryny (pochodne neohesperydydy), zaobserwowano po raz pierwszy separację izomerów narirutyny oraz didyminy. Obie cząsteczki należą do grupy glikozydów w których grupę cukrową stanowi rutynoza. Budowa aglikonu obu cząsteczek jest różna, aczkolwiek jedynie pozycja R_3 jest podstawiona ($R_2=H$). Dla cząsteczek NAR, NEH oraz NEE w układzie NaDC R_3 przyjmowało wartości niższe niż w analogicznym układzie z NaC. W stosunku do izomerów PON wyższą diastereoselektywnością charakteryzowały się micelle NaDC. Dla cząsteczek NAR, NEH, DID i NUR wzrost stężenia deoksycholalu sodu w zakresie 60 – 100 mM nie wpływał w znaczący sposób na zmianę współczynników rozdzielienia. Dla izomerów PON obserwowano spadek wartości α . Dla części molekuł maksymalne wartości α uzyskano już przy stężeniu 40 mM NaDC. Za wyjątkiem DID i PON, dla badanych flawanonów jako pierwszy migrował izomer o konfiguracji *S*. W stosunku zatem do układu z NaC, zaobserwowano zmianę kolejności migracji dla izomerów PON.

Porównując własności separacyjne obu soli kwasów cholowych wydaje się, że zarówno oddziaływanie grupy cukrowej jak i aglikonu z micelami odgrywają znaczącą rolę w procesie separacji flawanonów. Dla miceli soli kwasu trójhydroksylowego (NaC) istotne są oddziaływania wodorowe pomiędzy grupą cukrową analitu a grupami

hydroksylowymi surfaktantu (diastereoseparacja izomerów jedynie o określonej budowie grupy cukrowej). W przypadku soli kwasu dwyhydroksylowego (NaDC) bardziej znaczące wydaje się być hydrofobowe oddziaływanie aglikonu analitu z micelą. Bez względu na rodzaj układu micelnego nie uzyskano rozdzielania chiralnego form bezcukrowych (aglikonów).

9.5 Weryfikacja eksperymentalna metody

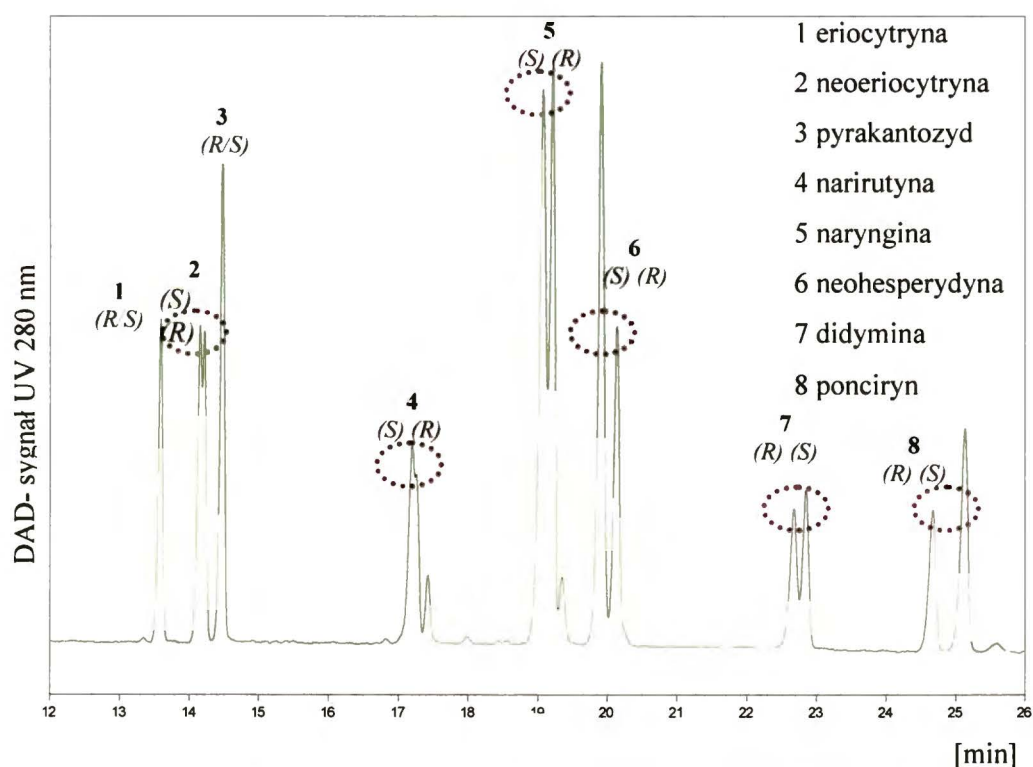
Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono warunki optymalne do rozdzielania mieszanin flawanonów w układzie cholanu i deoksycholanu sodu. Poniżej przedstawiono elektroferogramy sztucznych mieszanin diastereomerów ośmiu flawanonów (Rys. 9.10 i Rys. 9.11). Analizy przeprowadzono w temperaturze 25⁰C w układzie buforu tetraboranowo-dwufosforanowego z 10% dodatkiem metanolu przy określonym stężeniu surfaktantu.



Rys. 9.10 Elektroferogram sztucznej mieszaniny flawanonów w układzie 40 mM cholanu sodu; warunki: bufor Na₂B₄O₇ / NaH₂PO₄ + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25⁰C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Pomimo lepszych wyników diastereoseparacji dla poszczególnych flawanonów uzyskanych w układzie NaC, otrzymany elektroferogram dla mieszaniny ośmiu nie jest satysfakcjonujący. Dla żadnego z badanych flawanonów nie odnotowano całkowitego rozdzielania diastereomerów. R_s dla izomerów neoericytryny wyniósł 0.75, zaś dla ponciryny 0.52. Izomery (*R*)-narynginy, (*S*)-neohesperydyny oraz (*R/S*)-didyminy migrują w tym samym czasie. Zwiększenie stężenia surfaktantu z 40 mM na wyższe skutkowało pogorszeniem separacji mieszaniny. Było to związane ze wzrostem czasu migracji cząsteczek analitu i efektem ko-migracji cząsteczek. Micele cholanu sodu w stosunku do badanych flawanonów wykazują wysoką diastereoselektywność, ale charakteryzują się niską selektywnością wobec badanych flawanonów.

40 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / 150 mM NaH_2PO_4 / 40 mM NaDC, 10% MeOH



Rys. 9.11 Elektroferogram sztucznej mieszaniny flawanonów w układzie 40 mM deoksyholanu sodu; warunki: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / NaH_2PO_4 + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25°C, kapilara: 58 cm × 75 μm ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Uzyskane wyniki rozdzielania mieszaniny flawanonów w układzie deoksycholany sodu są duże lepsze. Poszczególne flawanony są doskonale od siebie odseparowane. Przy stężeniu 40 mM NaDC nie odnotowano zjawiska ko-migracji cząsteczek. Układ charakteryzuje znaczna diastereoselektywność. Diastereoseparację uzyskano dla izomerów neoericytryny ($R_s=0.23$), narynginy ($R_s=0.61$), neohesperydiny ($R_s=1.40$), didyminy ($R_s=0.64$) oraz ponciryny ($R_s=1.72$). W przypadku izomerów narirutyny, otrzymano pogrubiony podwójny pik, bardzo słabo rozdzielony ($R_s \sim 0.1$). Dla układu NaDC zaobserwowano około 40 % wzrost czasu analizy w stosunku do układu NaC. W badanych warunkach micelle deoksycholany sodu wykazywały wyższą ogólną selektywność wobec poszczególnych flawanonów jak i ich diastereomerów niż micelle cholany sodu. Należy podkreślić, że opisana diastereoseparacja flawanonów w układzie NaDC została po raz pierwszy otrzymana przez autora niniejszej rozprawy.

9.6 Praktyczne zastosowanie cholanowych faz pseudostacjonarnych. Analiza składu diastereoizomerycznego flawanonów w sokach z owoców cytrusowych.

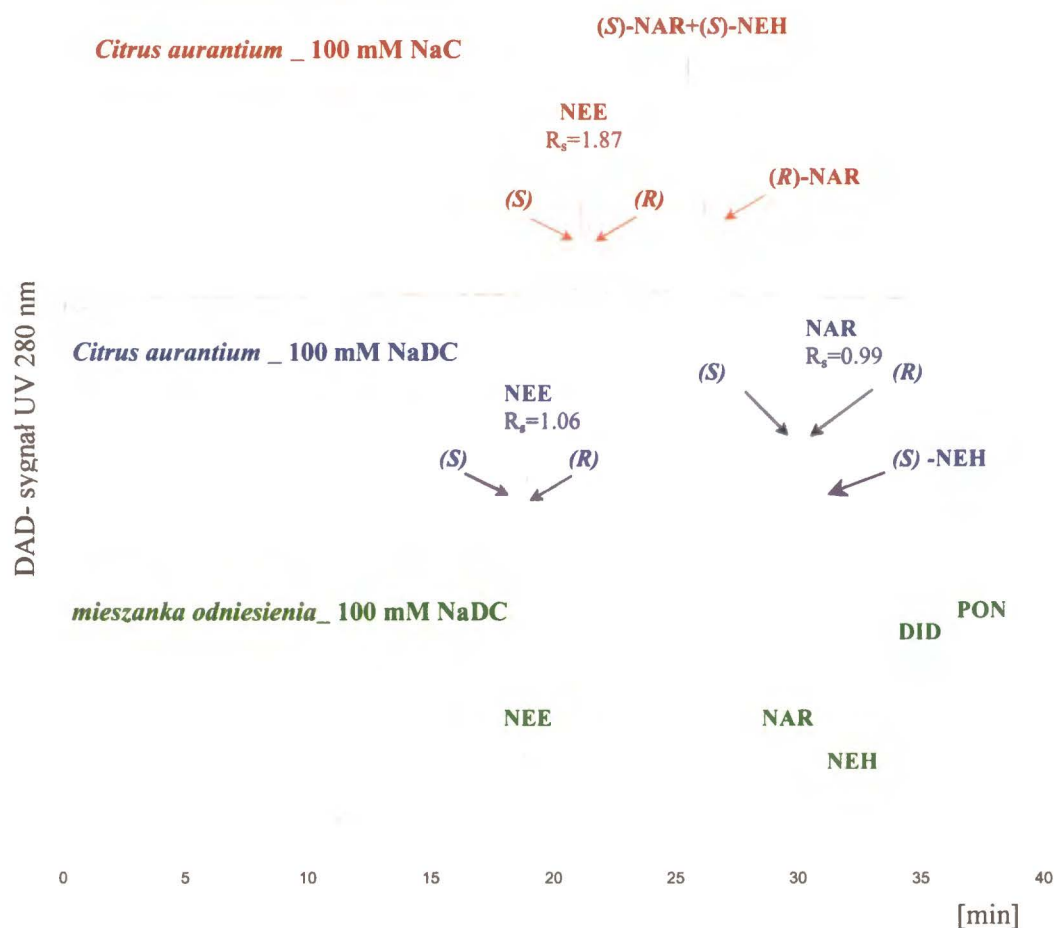
Głównym źródłem flawanonów w diecie są owoce, a zwłaszcza owoce cytrusowe (Rodzina *Rutaceae*). Związki te najczęściej występują jako pochodne rutynozy lub neohesperydozy. W zależności od owocu i jego dojrzałości, skład oraz zawartość % poszczególnych komponentów może być inna. Cytryny, mandarynki oraz słodkie pomarańcze zawierają głównie flawanony, w których grupę cukrową stanowi rutynoza. Głównym składnikiem soków z tych owoców jest hesperydina. Grejpfruty oraz kwaśne pomarańcze zawierają natomiast flawanony, w których grupę cukrową stanowi neohesperydoza. Głównie składnikiem jest naryngina. W przeciwieństwie do flawanonów-7-O-rutynozy które są pozbawione smaku, flawanony-7-O-neohesperydozy nadają owocom charakterystyczny gorzki smak. W Tab. 9.5 przedstawiono skład soków z wybranych owoców cytrusowych [63].

Tab. 9.5 Skład frakcji flawanoidowej soków cytrusowych: NAR-naryngina, NUR-narirutyna, NEH-neohesperydyna, NEE-neoericytryna, ERI-ericytryna, HES-hesperydyna DID-didymina, PON-ponciryna.

Sok	NAR	NUR	NEH	NEE	ERI	HES	DID	PON
Słodka pomarańcza (<i>C. sinensis</i>)	-	√√	-	min	min	√√√	√	min
Mandarynka (<i>C. clementina</i>)	min	√√	-	-	-	√√√	-	-
Grejpfrut (<i>C. paradisi</i>)	√√	√	√	min	min	min	Min	√
Cytryna (<i>C. limon</i>)	-	-	-	-	√√	√√	-	-
Gorzka pomarańcza (<i>C. aurantium</i>)	√	-	√	min	-	-	-	-

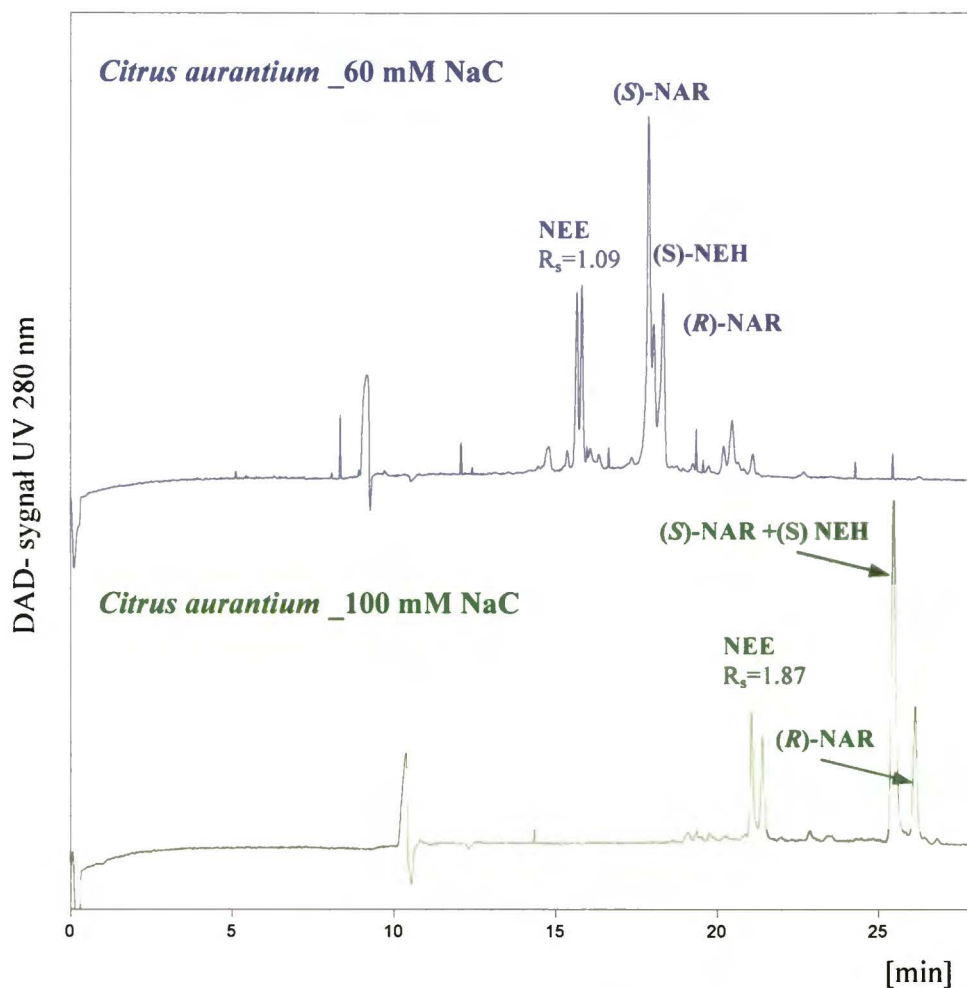
oznaczenia: √√√>30 mg/100ml, √√ 10-30 mg/100ml, √ 2-10 mg/100ml, min<1 mg/100ml (skład w odniesieniu do wszystkich składników soku)

Dokładne określenie składu diastereoizomerycznego metodą elektroforetyczną w świeżym soku z owoców cytrusowych nie jest sprawą oczywistą. Problemu dostarczają takie procesy jak ko-migracja flawanonów oraz proces diastereoizomeryzacji. Opracowaną metodę separacji flawanonów w środowisku soli kwasów cholowych praktycznie wykorzystano do zbadania składu diastereoizomerycznego frakcji flawanowej soków z gorzkiej pomarańczy (*C. aurantium*) oraz grejpfruta (*C. paradisi*). Soki otrzymano metodą opisaną przez Krause [148]. Wyciśnięty sok (5ml) ekstrahowano do fazy stałej z wykorzystaniem kolumniek do SPE (DPA-6S SPE, 6 ml, 500 mg) firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA). Po przepłukaniu kolumniki wodą (10ml) i wysuszeniu fazy, składniki ekstrahowano metanolem (1ml). Tak otrzymane zatężone roztwory rozcieńczono wodą i poddano analizie elektroforetycznej.



Rys. 9.12 Separacja diastereoizomerów neoericytryny (NEE), narynginy (NAR) oraz neohesperydyna (NEH) w soku z pomarańczy gorzkiej (*C. aurantium*); skróty: DID-didymina, PON-ponciryna; warunki: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 10\% \text{ MeOH}$ (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: $58 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m ID}$, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm;

Na Rys. 9.12 przedstawiono elektroferogramy uzyskane w układzie 100 mM cholanu sodu oraz 100 mM deoksycholanu sodu dla soku z pomarańczy gorzkiej (*C. aurantium*). Głównymi składnikami mieszaniny są: neoericytryna, naryngina oraz neohesperydyna. Porównując własności separacyjne obu systemów micelarnych zauważono, że micelle NaDC wykazują mniejszą stereoselektywność, ale czasy migracji poszczególnych izomerów były bardziej zróżnicowane. Stąd też na elektroferogramie w układzie 100 mM NaDC otrzymano separację trzech flawanonów, podczas gdy w układzie 100 mM NaC, *S*-NAR i *S*-NEH migrowały z taką samą prędkością. Obniżenie stężenia do 60 mM NaC sprzyjało polepszeniu rozdzielania poszczególnych flawanonów, kosztem spadku sprawności rozdzielczej układu (Rys. 9.13).

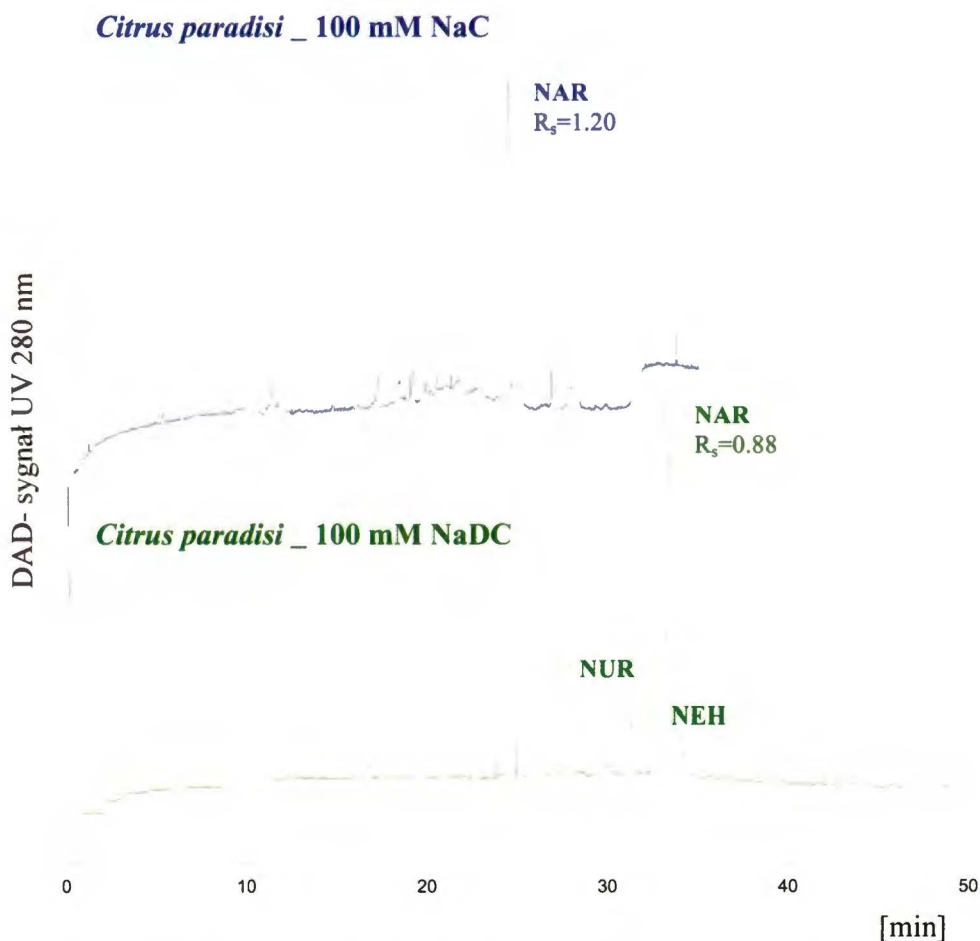


Rys. 9.13 Elektroferogram uzyskany dla wyciągu z owocu gorzkiej pomarańczy przy różnych stężeniach selektora chiralnego; użyte skróty: NEE-neoericytryna, NAR-naryngina, NEH-neohesperydyna; warunki: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 10\% \text{ MeOH}$ (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: $58 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m ID}$, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm

Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że w odróżnieniu od neoericytryny oraz narynginy, neohesperydyna występowała jedynie w formie *S*. Stosunek form *S*:*R* w świeżo wyciśniętym preparacie wynosi 61: 39 i 68: 32 odpowiednio dla izomerów neoericytryny oraz narynginy. Proporcje takie wskazują na wysoki stopień świeżości owocu. W soku z owoców dojrzałych na skutek procesu diastereoizomeryzacji stosunek *S*:*R* dla neoericytryny wynosi 50:50, zaś dla narynginy 60:40 [62]. Wyniki analiz wykonanych na tej samej próbce w odstępach parodniowych wykazały zachodzący w mieszaninie proces diastereoizomeryzacji (Tab. 9.6). Proces ten zachodzi w sposób naturalny i nie jest promowany warunkami przeprowadzanych analiz (pH, bufor).

Tab. 9.6 Stosunek form diastereoizomerycznych w próbce soku w zależności od czasu analizy

Dzień analizy	Neoferiocytryna	Naryngina
	S:R	S:R
0	61:39	68:32
1	60:40	68:32
7	58:42	50:50



Rys. 9.14 Elektroferogram uzyskany dla wyciągu z owocu różowego grejpfruta w układzie 100 mM NaDC oraz 100 mM NaC; użyte skróty: NUR- narirutyna, NAR- naryngina, NEH- neohesperydyna; warunki: bufor $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ + 10% MeOH (pH 7.5), temp. 25°C , kapilara: $58 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ ID, przyłożone napięcie 20kV, detekcja 280 nm

Analogicznie przygotowano świeży roztwór z owocu różowego grejpfruta (*C. paradisi*). Wyniki analiz przedstawiono na Rys. 9.14. Głównym składnikiem soku była naryngina. Stosunek form *S:R* wynosił 55:45. Stężenia innych flawanonów były poniżej możliwości detekcji aparatu CE.

Podsumowanie i wnioski

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki dotyczą zastosowania cholanu (NaC) oraz deoksycholanu sodu (NaDC) jako chiralnych cząsteczek samoorganizujących w wybranych technikach rozdzielczych. Badane molekuly należą do grupy soli kwasów żółciowych, które w układach wodnych tworzą struktury micelarne o istotnym znaczeniu biologicznym. Podstawowe pojęcia z działu chemii surfaktantów jak również opis badanych płaszczyznowych amfifili i cząsteczek rozdzielanych zamieszczono w części literaturowej pracy (rozdziały 1 - 3).

Projekt zrealizowano w układach z użyciem trzech analitycznych technik rozdzielczych (rozdział 4): podziałowej chromatografii gazowej (GLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz elektroforezy kapilarnej (CE). Dokładny opis aparatury oraz stosowanych procedur przedstawiono w rozdziale 6.

W rozdziale 7 zamieszczono wyniki otrzymane w układzie podziałowej chromatografii gazowej. Celem tej części pracy było zbadanie trwałości oraz możliwości separacyjnych cholanowych faz stacjonarnych. Cząsteczki cholanu oraz deoksycholanu użyto jako modyfikatorów formamidowej fazy stacjonarnej. Agregację cholanów w niewodnym rozpuszczalniku organicznym zbadano metodą pomiaru napięcia powierzchniowego. Modelowy zbiór cząsteczek rozdzielanych stanowiła grupa izomerów o różnej polarności. Badania przeprowadzono w dużym zakresie stężeń amfifila (0- 100 *mm*). Zbadano nie tylko wpływ stężenia surfaktantu na podstawowe parametry chromatograficzne, ale również wpływ temperatury na trwałość badanych faz. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

- Zarówno cholan jak i deoksycholan sodu agregują w roztworze formamidu. W temperaturze 30⁰C wartość krytycznego stężenia micelnego cholanu sodu wynosi 17 **mM**, zaś deoksycholanu sodu 9 **mM**.

- Wszystkie badane węglowodory alifatyczne oddziałują zarówno z monomerami jak i micelami soli kwasów cholowych w ciekłej fazie stacjonarnej.
- Przebieg krzywych stężeniowych ściśle zależy od formy surfaktantu: mononerycznej lub zagregowanej w roztworze formamidu. Obserwowana nieciągłość zależności koresponduje z przejściem surfaktantu z formy wolnej do formy micelarnej i odpowiada punktowi krytycznego stężenia micelnego.
- W obszarze micelarnym silniej z cząsteczkami węglowodorów alifatycznych oddziałują mniej polarne micle dwuhydroksylogowego deoksycholanu sodu.
- Węglowodory aromatyczne oraz molekuły polarne nie oddziałują z micelami badanych kwasów cholowych.
- Przeprowadzone badania temperaturowe wskazują na termiczną stabilność badanych faz w zakresie stosowanych temperatur (30⁰-50⁰C).
- Bezwzględna zmiana entalpii oddziaływania pomiędzy węglowodorami alifatycznymi a cząsteczkami surfaktantu jest większa w obszarze niezagregowanego amfifila.

Bez względu na rodzaj stosowanego surfaktantu (NaC lub NaDC) oraz jego stężenie w ciekłej fazie stacjonarnej, w badanych warunkach nie zauważono dostrzegalnej enancjoselektywności w stosunku do chiralnych cząsteczek z grupy modelowej jak również brak wyraźnego wpływu na proces rozróżnienia izomerów konstytucyjnych.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano hipotezę objaśniającą mechanizm retencji w warunkach micelarnej chromatografii gazowej.

W rozdziale 8 opisano zastosowanie soli kwasów cholowych: cholanu i deoksycholanu sodu, jako modyfikatorów fazy ruchomej w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Własności enancjoseparacyjne micelarnych faz chiralnych zbadano na grupie optycznie czynnych pochodnych binaftyli: fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BNDHP) oraz 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN). W warunkach przeprowadzanych eksperymentów molekuła BNDHP była zjonizowana. W projekcie zbadano wpływ stężenia i typu amfifila, jak również rodzaj i stężenie dodatku organicznego (n-alkohol) na proces rozpoznania chiralnego przez badane układy

micelarne. Badania termodynamiczne przeprowadzono przy dwóch różnych stężeniach modyfikatora organicznego dla obu badanych faz cholanowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

- Adsorpcja soli sodowych kwasów cholowych na fazie C18 (ODS) przebiega w podobny sposób jak w układach klasycznych liniowych surfaktantów. Na ilość zaadsorbowanego surfaktantu istotny wpływ ma stężenie i rodzaj modyfikatora organicznego. Dodatek rozpuszczalnika organicznego zmniejsza ilość zaadsorbowanego amfifila na fazie stacjonarnej.
- Badane izomery cząsteczek modelowych oddziałują w fazie ruchomej z micelami cholanu i deoksycholanu sodu.
- Wzrost długości łańcucha węglowego w dodatku organicznym wpływa na przesunięcie równowagi procesu rozdzielania w kierunku micelarnej fazy ruchomej.
- Dodatek organiczny w istotny sposób wpływa na zdolność rozpoznania chiralnego przez cząsteczki cholanu sodu. Im dłuższy łańcuch węglowy dodatku n-alkoholu, tym większa jest zdolność układu do enancjoseparacji cząsteczek BNDHP.
- W odróżnieniu od zjonizowanych izomerów BNDHP, proces rozpoznania chiralnego obojętnych molekuł BN w układzie NaC zachodzi głównie na modyfikowanej surfaktantem fazie stacjonarnej
- Dodatek modyfikatora organicznego do faz z NaDC ma mniejszy wpływ na proces oddziaływania pomiędzy analitem a micelą niż w układzie z NaC.
- Wzrost stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej wpływa na przesunięcie równowagi w kierunku fazy micelarnej lub fazy wodno-organicznej. Kierunek procesu ściśle zależy od natury i stężenia dodatku w fazie (dokładniej: stosunku liczby moli alkoholu do liczby moli amfifila). Zbyt duże stężenia modyfikatora prowadzi do deagregacji układu micelnego i zaniku zdolności rozpoznania chiralnego w stosunku do badanych molekuł.
- Agregaty mniej polarnego deoksycholanu sodu są lepszymi selektorami chiralnymi dla cząsteczek BNDHP. Dla cząsteczek BN lepszymi selektorami okazują się być micle cholanu sodu.

- Wzrost temperatury układu wpływa na stabilność badanych faz micelarnych. Wysoka temperatura sprzyja deagregacji miceli i zmienia stopień pokrycia surfaktantem fazy stacjonarnej. W efekcie obserwuje się zmianę mechanizmu retencji.
- Duży wpływ na charakter procesu rozpoznania molekularnego ma natura i stężenie modyfikatora organicznego. Bez względu na rodzaj stosowanego surfaktantu, przy wysokim stężeniu modyfikatora (30% MeOH) proces rozpoznania chiralnego kontrolowany jest czynnikiem entropowym. Przy niskim stężeniu modyfikatora (3%) istotną rolę zaczyna odgrywać czynnik entalpowy.

Interpretacja uzyskanych wyników umożliwiła lepsze poznanie wpływu środowiska na proces rozpoznania molekularnego przez badane układy micelarne.

W rozdziale 9 przedstawiono zastosowanie miceli soli kwasów cholowych w układzie micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej. Celem tej części pracy było zbadanie właściwości separacyjnych cholanowych faz pseudostacjonarnych. Grupę cząsteczek rozdzielanych stanowiły diastereoizomery flawanonów. Zbadano wpływ składu buforu wiodącego, rodzaju rozpuszczalnika i stężenia surfaktantu na retencję i diastereoseparację związków rozdzielanych. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że:

- Micele cholanu (NaC) i deoksycholanu sodu (NaDC) są dobrymi selektorami chiralnymi do rozdzielania stereoizomerów flawanonów.
- Bez względu na skład stosowanego buforu (tetraboranowy, fosforanowy, tetraboranowo-dwufosforanowy) diastereoselektywność miceli cholanu i deoksycholanu sodu pozostaje niezmienną. Jako pierwszy z pary izomerów w układzie NaC migruje zawsze izomer *S*. Micele NaDC charakteryzuje identyczna stereoselektywność, za wyjątkiem izomerów poncirynu dla których jako pierwszy migruje izomer o konfiguracji *R*.
- W buforze tertaboranowo-dwufosforanowym obserwuje się wzmocnienie zdolności rozpoznania chiralnego przez micide cholanu oraz deoksycholanu sodu w stosunku do grupy badanych flawanonów.

- Bez względu na rodzaj fazy pseudostacjonarnej najlepsze wyniki stereoseparacji flawanonów uzyskuje się w środowisku dodatku metanolu. Acetonitryl wpływa na zwiększenie ruchliwości elektroforetycznej buforu i pogorszenie zdolności rozpoznania chiralnego przez micelle NaC i NaDC. Najgorsze wyniki diastereoseparacji uzyskuje się w buforach z dodatkiem 2-propanolu.
- W warunkach przeprowadzanych eksperymentów wyznaczona wartość krytycznego stężenia micelnego cholanu sodu wynosi **18 mM**, zaś deoksycholanu sodu **7 mM**.
- Wzrost stężenia surfaktantu w buforze wpływa na wzrost czasów migracji cząsteczek rozdzielanych.
- Micelle cholanu sodu wykazują zdolność diastereoseparacji jedynie tych flawanonów, u których część cukrową stanowi neohesperidoza.
- Bardzo dobre wyniki rozdzielania flawanonów uzyskano już przy 60 mM stężeniu, NaC oraz 40 mM NaDC. Wzrost stężenia surfaktantu w buforze wpływa na polepszenie zdolności rozdzielczej pików, ale pogorszenie selektywności układu. Obserwuje się bowiem nieznaczne różnice w czasach migracji poszczególnych flawanonów.
- Dla miceli soli kwasu trójhydroksylowego (NaC) istotne są oddziaływania wodorowe pomiędzy grupą cukrową analitu a grupami hydroksylowymi surfaktantu. W przypadku soli kwasu dwyhydroksylowego (NaDC) bardziej znaczące wydaje się być oddziaływanie aglikonu analitu z micelą.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono warunki optymalne do rozdzielania mieszanin flawanonów w układzie cholanu i deoksycholanu sodu. Opracowana metoda została praktycznie wykorzystana do zbadania składu diastereoizomerycznego soków wyciskanych owoców cytrusowych.

10.1 Dalszy kierunek badań

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki dotyczą zastosowania chiralnych biosurfaktantów z grupy soli kwasów cholowych w wybranych technikach rozdzielczych. Przeprowadzone badania pokazały zarówno ograniczenia stosowanych układów jak i ich możliwości separacyjne w wybranych technikach rozdzielczych.

Zastosowanie cholanów jako chiralnych modyfikatorów fazy stacjonarnej w układzie podziałowej chromatografii gazowej stanowi nowe wyzwanie dla badaczy. Potencjalne korzyści z opracowania nowych chiralnych faz są niezwykle duże. Niemniej jednak obecny stan wiedzy na temat agregacji biosurfaktantów w rozpuszczalnikach organicznych limituje rozwój tego działu nauki. Przeprowadzone w niniejszej rozprawie badania ograniczone zostały do jednego rozpuszczalnika o dość niskiej temperaturze stosowalności. Dalsze badania w tym kierunku powinny zostać rozszerzone o wyżej wrzące rozpuszczalniki np. glicerynę, glikole polietylenowe, dzięki czemu zbiór cząsteczek modelowych znacznie się powiększy. Ciekawym wydaje się również przeprowadzenie badań w układzie miceli odwróconych. Do tego celu autor niniejszej pracy sugeruje zastosowanie faz silikonowych o małej polarności. Badania w układzie GLC przeprowadzone zostały na kolumnach pakowanych, które charakteryzowała niska sprawność. Zastosowanie kolumn kapilarnych poprawiłoby sprawność i rozdzielczość układu oraz umożliwiłoby separację izomerów w przypadku niewielkiego zróżnicowania w oddziaływaniu z układem micelnym.

Uzyskane wyniki w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej umożliwiły pełniejszy opis procesu separacji atropoizomerów w micelarnych fazach cholanowych. Przeprowadzone badania potwierdziły znaczną rolę modyfikowanej surfaktantem fazy C18 w procesie separacji. W celu pełnego zrozumienia roli fazy stacjonarnej należałoby prowadzone badania dodatkowo poszerzyć o pomiary w innych kolumnach chromatograficznych np. C2, C8. Badania należałoby prowadzić zarówno w zależności od stężenia surfaktanta jak i modyfikatora organicznego.

Otrzymane na bazie soli sodowych kwasów cholowych fazy pseudostacjonarne w układzie micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej doskonale nadały się do rozdzielania diastereoizomerów flawanonów. Opracowana metoda separacji mieszaniny diastereomerów bardzo dobrze sprawdza się dla naturalnych wyciągów mieszanin z owoców cytrusowych. Dalsze badania powinny być ukierunkowane na poprawę rozdzielania diastereomerów aglikonów rutynozy oraz skróceniu czasu analizy. W tym celu należałoby przebadać inne bufory, zastosować kapilarę o mniejszej średnicy oraz zastosować inne pochodne soli kwasów cholowych. Dodatkowo ciekawym wydaje się być sprawdzenie możliwości separacyjnych mieszanych układów biosurfaktantów.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano dwie sole kwasów żółciowych: cholan i deoksycholan sodu. Naturalnym wydaje się być poszerzenie obiektu badań o inne sole kwasów z tej rodziny we wszystkich badanych technikach separacyjnych. Niezwykle interesująca i obiecująca jest sól kwasu taurocholowego. Mała wartość krytycznego stężenia micelnego oraz niskie pK_a , umożliwiają pracę już przy niskich stężeniach surfaktantu w pH roztworu poniżej 7.

Reasumując, sole kwasów cholowych należą do grupy chiralnych biosurfaktantów o dużym potencjale aplikacyjnym, które można stosować z powodzeniem w różnych technikach separacyjnych. Wiedza na temat zakresu ich stosowalności w danych metodach rozdzielczych pozwala na zaprojektowanie układów i opis procedur koniecznych do prawidłowego przeprowadzenia analiz.

WYKAZ LITERATURY

1. G. C. Kresheck, *Aqueous Solution of Amphiphiles and Macromolecules*, **1975**, Plenum Press: New York and London
2. M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, **2004**, 3rd Edition, Wiley-Interscience
3. S. Reis, C.G. Moutinho et al., *Anal. Biochem.*, **2004**, 334, 117-126
4. A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, *J. Chem. Educ.*, **1997**, 74, 1227-1231
5. G. S. Hartley, *Aqueous Solutions of Praffin Chain Salt*; **1936**, Hermann: Paris,
6. F. M. Menger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1086-1089.
- 7 Y. Moroi, *Micelles, Theoretical and Applied Aspects*, Plenum Press: New York, **1992**
8. P. W. Atkins, *Chemia Fizyczna*, PWN, **2001**, 682-683
9. J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, **1992**, Academic Press: London,
10. N. T. Southall, K. A. Dill, A.D.J. Haymet, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 521-533
11. W. Mizerski, *Tablice Chemiczne*, **2003**, Adamantan: Warszawa
12. Y. Marcus, *Ion Solvation*, **1986**, Wiley: London
13. M. Sjöber, U. Heriksson, T. Wärnheim, *Langmuir*, **1990**, 6, 1205-1211
14. M. Ramadan, D. Evans, R. Lumry, S. Philson, *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 3405-3408
15. M. S. Akther, S. M. Alawi, *Colloids and Surfaces A*, **2000**, 173, 95-100
16. J. Aguiar, J.A. Molina-Bolivar, J. M. Peula-Garcia, C.C. Ruiz, *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, 255, 382-390
17. R. Zana, *Colloids and Surfaces A*, **1997**, 123-124, 27-35
18. M. Moyá, A. Rodríguez, M. Graciani, G. Fernández, *J. Colloid Interface Sci.*, **2007**, 317, 787-795
19. G. G. Chang, T. M. Huang, H. C. Hung, *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)*, **2000**, 24 (3), 89-100
20. K. Bloch, B. N. Berg, D. Rittenberg, *J. Biol. Chem.*, **1943**, 149, 511-517
21. N. B. Javitt, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 292, 1147-1153
22. S. Mukhopadhyay, U. Maitra, *Current Science*, **2004**, 87, 12, 1666-1683
23. M. Makishima, A. Y. Okamoto, J. J. Repa, *Science*, **1999**, 284, 1362-1365
24. D. J. Parks, S. G. Blanchard, R. K. Bledsoe, *Science*, **1999**, 284, 1365-1368
25. L.B. Partay, P. Jedlovszky, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 9886-9896
26. H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 735, 57-76
27. M. G. Khaledi, J. G. Bumgarner, M. Hadpmohammadi, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 802, 35-47
28. A.N.D. Diaz, F. G. Sanchez, A. G. Pareja, *Colloids and Surface A*, **1998**, 142, 27-34

29. U. Subuddhi, A. K. Mishra, *Colloids and Surface B.*, **2007**, 57, 102-107
30. S. Reis, C. G. Moutinho, C. Matos et. al., *Analytical Biochemistry*, **2004**, 334, 117-126
31. J. Santhanalakshmi, G. S. Lakshmi, V. K. Aswal, P. S. Goyal, *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, **2001**, 113, 55-62
32. H. Kawamura, Y. Murata, T. Yamaguchi et al., *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 3321-3326
33. E. Giglio, S. Loreti, N. V. Pavel, *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 2858-2862
34. D.B. Warren, D. K. Chalmers, K. H. Hutchison, W. Dang, C.W. Pouton, *Colloids and Surface A*, **2006**, 280, 182-183
35. M. C. Carey, D. M. Small, *Arch. Intern. Med.*, **1972**, 130, 506-527
36. E. Virtanen, E. Kolehmainen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 3385-3399
37. Nonappa, U. Maitra, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 657-669
38. A. Enhsen, W. Kramer, G. Wess, *Drug Discovery Today*, **1998**, 3 (9), 409-418
39. A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 243-253
40. A. Petitjean, R. G. Khoury, N. Kyritsakas and J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6637-6647
41. Y. Zhao, Z. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17894-17901
42. Y. Zhao, Z. Zhong, E. Ryu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 218-225
43. H. Dodziuk, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 12941-12946
44. R. T. Morrison, R. N. Boyd, *Chemia Organiczna*, **1998**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
45. I. Z. Siemion, *Biostereochemia*, **1985**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
46. E. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, **1994**, John Willey & Sons
47. M. Nogradi, *Stereochemia podstawy i zastosowania*, **1988**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
48. L. Wrzeciono, L. Zaprutko, *Chemia związków naturalnych*, **2001**, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego: Poznań,
49. J. Clayden, S. Warren, N. Greeves, P. Wothers, *Organic Chemistry*, **2001**, Oxford University Press
50. J. B. Harborne, *Ekologia biochemiczna*, **1997**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
51. J. H. Fuhrhop, C. Endisch, *Molecular and Supramolecular Chemistry of Natural Products and Their Model Compounds*, **2000**, Marcel Dekker, Inc. : New York, 243-259
52. M. Asztemborska, J. R. Ochocka, *Bioactive Natural Products*, **2002**, ed. Atta-ur-Rahman, vol. 27, Elsevier, 361-391
53. M. Lindstrom, T. Norin, I. Valterova, J. Vrkoc, *Naturwissenschaften*, **1990**, 77, 134-135
54. V. Schurig, U. Leyrer, U. Kohnle, *Naturwissenschaften*, **1985**, 72, 211-211

55. M. Berhod, G. Mignami, G. Woodward, M. Lemaire, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1801-1836
56. J. M. Brunel, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 857-897
57. Y. Chen, S. Yekta, A. K. Yudin, *Chem Rev.*, **2003**, 103, 3155-3211
58. M. Terada, *Chem Commun.*, **2008**, 35, 4097-4112
59. G. Bringmann, D. Menche, *Accounts of Chemical Research*, **2001**, 34 (8), 615-624
60. G. Francois, G. Timpreaman, W. Eling, L. A. Assi, J. Holenz, G. Bringmann, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 2533-2539
61. T. A. Geissman, *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, **1962**, Pergamon Press
62. J. A. Yanez, P. K. Andrews, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **2007**, 848, 159-181
63. G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, C. Caristi, *Molecules*, **2007**, 12, 1641-1673
64. P. C. H. Hollman, I. C. W. Arts, *J. Sci. Food Agr.* **2000**, 80, 1081-1093.
65. B. S. Buslig, J. A., Manthey, *Flavonoids in cell function.*, **2002**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY,
66. K. Herrmann, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1970**, 12, 161
67. V. Cody, E. Middleton, J. B. Harborne, A. Beretz, *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 280; Alan R. Liss: New York, **1988**
68. D. K. Sharma, *J. Sci. Ind. Res.* **2006**, 65, 391-401
69. R. Cermak, S. Wolfram, *Curr. Drug Metab.* **2006**, 7, 729-744
70. H. K. Wang, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, 9, 2103-2119
71. C. O. Miles, L. Main, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1988**, 2, 195-198
72. D. Wistuba, O. Trapp, N. Gel-Moreto, R. Galensa, V. Schurig, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3424-3433
73. M. Asztemborska, J. Żukowski, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1134, 95-100
74. M. Krause, R. Galensa, *J. Chromatogr.*, **1990**, 514, 147-159
75. M. Krause, R. Galensa, *J. Chromatogr.*, **1991**, 588, 41-45
76. N. Gel-Moreto, R. Streich, R. Galensa, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 925, 279-289
77. Z. Witkiewicz, E. Soczewiński, Z. Suprynowicz, *Nomenklatura Chromatograficzna*, **1996**, Polskie Towarzystwo Chemiczne: Warszawa
78. Z. Witkiewicz, J. Hetper, *Słownik chromatografii i elektroforezy*, **2004**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
79. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, **1999**, Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa
80. R. Kocjan, *Chemia analityczna, analiza instrumentalna 2*, **2000**, Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa

81. Z. Witkiewicz, J. Hetper, *Chromatografia gazowa*, **2001**, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne: Warszawa
82. M.C. McMaster, *HPLC, a practical user's guide*, **2007**, John Willey & Sons, Inc.
83. D.N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, **1997**, Hewlett Packard Company: France
84. T. Kościelski, D. Sybilska, S. Belniak, J. Jurczak, *Chromatographia*, **1986**, 21, 413-416
85. Mulk, P.; Feltl, L. *J. Chromatogr.* **1995**, 696, 101-112.
86. Mulk, P.; Feltl, L.; Schurig, V. *J. Chromatogr.* , **1996**, 732, 63-74.
87. J. Ge, R. Fu, A. Zhang, R. Zhu, J. Deng, J. Gu, J. Zhu, Z. Huang, B. Zhang, *J. Microcol. Sep.*, **1991**, 3, 121-126
88. R. V. Golovnya, M. B. Terenina, E. L. Ruchkina, *Russian Chemical Bulletin*, **1994**, 43, 2049-2053
89. J. L Anderson, V. Pino, E. C. Hagberg, V. V. Sheares, D. W. Armstrong, *Chem. Commun.* **2003**, 19, 2444-2445
90. A. W. Lantz, V. Pino, J. L. Anderson, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1115, 217-224
91. J. Robenson, B. W. Foster, S. N. Rosenthal, E. T. Adams, E.J. Fendler, *J. Phys. Chem.*, **1981**, 85, 1254-1261
92. A. N. Diaz, F. G. Sanchez, A. G. Pareja, *Colloids and Surface A*, **1998**, 142, 27-34
93. D. W. Armstrong, S. J. Henry, *J. Liq. Chromatogr.*, **1980**, 3, 657-662
94. A. Berthod, M. C. Garcia-Alvarez-Coque, *Micellar liquid Chromatography*, **2000**, Marcel Dekker: New York
95. M. A. Garcia, M. L. Marina, *Micellar Liquid Chromatography*, In: Encyclopedia of separation science. Level II. Methods and Instrumentation., Elsevier, **2000**, 729-737
96. J. G. Dorsey, M. G. Khaledi, J. S. Landy, J. L. Lin, *J. Chromatogr.* , **1984**, 316, 183-191
97. A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1356-1358
98. J. G. Dorsey, M. T. De Echegaray, J. S. Landy, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 924-928
99. M. F. Borgerding, R. L. Williams, W. L. Hinze, F. H. Quina, *J. Liq. Chromatogr.*, **1989**, 12, 1367-1406
100. J. Fischer, P. Jandera, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 681, 3-19
101. D. W. Armstrong, F. Nome, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1662-1666
102. M. Guermouche, D. Habel, S. Guermouche, *Fluid Phase Equilibria*, **1998**, 147, 301-307
103. J. P. Foley, *Analytica Chimica Acta*, **1990**, 231, 237-247
104. L. P. Loginova, L. V. Samokhina, A. P. Boichenko, A. U. Kulikov, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1104, 190-197

105. S.L. Grio, J.J. Baeza Baeza, M.C. Garcia Alvarez-Coque, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 381, 275-285
106. R. W. Williams, Z. S. Fu, W.L. Hinze, *J. Chromatogr. Sci.*, **1990**, 28, 292-302
107. W. L. Hinze, R. W. Williams, Z. S. Fu, Y. Suzuki, F. H. Quina, *Colloids and Surface*, **1990**, 48, 79-94
108. M.L. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, W.C. Hamlin, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1353-1358
109. M.L. Borgerding, R. W. Williams, W.L. Hinze, F.H. Quina, *J. Liq. Chromatogr.*, **1998**, 12, 1367-1406
110. D.M. Small, *The Bile Acids*, **1971**, Plenum Press: New York, 249-356
111. A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczuk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 159-170
112. J. G. Clothier, L. M. Daley, S. A. Tomellini, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 683, 37-45
113. A. Tiselius, *The Moving Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins*, Ph. D. Thesis, Uppsala Sweden, **1930**
114. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1298-1302
115. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, **1981**, 218, 209-216
116. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science*, **1983**, 222, 266-272
117. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 111-113
118. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 834-841
119. P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 780, 41-61
120. K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 875, 163-178
121. S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 403-411
122. H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 735, 57-76
123. J. G. Clothier, L. M. Daley, S. A. Tomellini, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 683, 37-45
124. S. Terabe, N. Chen, K. Otsuka, *Advances in Electrophoresis*, vol.7, VCH. Weinheim, **1994**, p.91,
125. A. Tiss, S. Ransac, H. Lengsfeld, P. Hadvary, A. Cagna, R. Verger, *Chem. Phys. Lipids*, **2001**, 111, 73-85
126. M. Swanson-Vethamuthu, M. Almgren, P. Hansson, J. Zhao, *Langmuir*, **1996**, 12, 2186-2189
127. K. A. Thomas, G. M. Smith, T. B. Thomas, R. J. Feldman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 4843-4847
128. H. Sugioka, Y. Moroi, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1394, 99-110
129. R. Shaw, W. H. Elliott, B. G. Barisas, *Microchim. Acta*, **1991**, 105, 137-145

130. W. Hu, P.R. Haddad, *Chromatographia*, **2000**, 52, 543-551
131. A. Berthod, A. Roussel, J. *Chromatogr. A*, **1988**, 449, 349-360
132. M. E. Montgomery, Jr. Wirth, M. J. Wirth, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 680-684
133. N. Mofaddel, H. Krajjian, D. Villemin, P.L. Desbene, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1211, 142-150
134. A. Mohanty, J. Dey, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1128, 259-266
135. S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, in: F. Dondi, G. Guiochon (Eds.), *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*, Kluwer, Dordrecht, **1992**.
136. F. Dondi, G. Blo, M. Remelli, P. Reschiglian, in: F. Dondi, G. Guiochon (Eds.), *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*, Kluwer, Dordrecht, **1992**.
137. A. Cavazzini, M. Remelli, F. Dondi, A. Felinger, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3453-3462.
138. D. W. Armstrong, G. Y. Stine, *Anal. Chem.* **1983**, 55 (14), 2317-2320
139. J. G. Dorsey, M. T. DeEchegaray, J. S. Landy, *Anal. Chem.* 1983, 55, 924-928
140. M. Asztemborska, M. Miśkiewicz, D. Sybilska, *Electrophoresis*, **2003**, 26, 844-850
141. O. Mellenthin, Dissertation, Universität Bonn, **1998**
142. N. Gel-Moreto, R. Streich, R. Galensa, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 2716-2722
143. Z. Aturki, M. Sinibaldi, *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 844-850
144. Ph. Morin, F. Vilard, M. Dreux, *J. Chromatogr.*, **1993**, 628, 153-160
145. K. Lemańska, *Free Radical Biology and Medicine*, **2001**, 31, 869-881
146. R. O. Cole, M. J. Sepaniak, M.J. Hinze, W.L. Gorse, K. Oldiges, *J. Chromatogr.*, **1991**, 557, 113-123
147. A. Cifuentes, J. L. Bernal, J. C. Diez-Masa, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4271-4274
148. M. Krause, R. Galensa, *J. Chromatogr.*, **1991**, 588, 41.



B. 421/10

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.421/10



70000000028447