

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Krit Lossmann

**Perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butüülalkoholi kasutamine
eluendilisanditena kõrgefektiivses vedelikkromatograafias**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Füüsika, keemia ja materjaliteadus

Juhendajad:

Rūta Veigure, MSc

Professor Ivo Leito

Karin Kipper, PhD

Tartu 2019

SISUKORD

1. KASUTATUD LÜHENDID	3
2. SISSEJUHATUS	4
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
3.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.....	6
3.2. Happeliste ja aluseliste analüütide lahutamine HPLC meetodil.....	6
3.3. Eluendilisandid ja puhverlahused	8
3.4. Fluoroalkoholid	8
3.4.1. Perfluoropinakool	9
3.4.2. Nonafluoro- <i>tert</i> -butanool	10
3.5. Ioonpaari efekt	10
4. EKSPERIMENTAALNE OSA	12
4.1. Kasutatud kemikaalid	12
4.2. Analüüsitavad ained	12
4.3. Eluendid.....	13
4.4. UV-Vis detektor	14
5. TULEMUSED JA ARUTELU	16
5.2. Anioonsel kujul analüüdid (A ⁻)	16
5.3. Neutraalsel kujul analüüdid (HA, B).....	19
5.4. Katioonsel kujul analüüdid (HB ⁺)	22
5.5. Fluoroalkoholide mõju	25
6. KOKKUVÕTE	27
7. SUMMARY	28
8. KASUTATUD KIRJANDUS	29
9. LISAD	32

1. KASUTATUD LÜHENDID

GC	gaasikromatograafia
HFIP	Heksafluoro-2-propanool
HFTB	1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-metüül-2-propanool
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
LC	vedelikkromatograafia
MeCN	atsetonitriil
MeOH	metanool
MS	massispektromeetria
NFTB	nonafluoro- <i>tert</i> -butanool
pK_a	happe dissotsiatsioonikonstandi negatiivne kümnendlogaritm
TEA	trietüülamiin
TFA	trifluoroetaanhape
UV-Vis	ultraviolettkiirgus ja nähtav valgus
RC	regeneereeritud tselluloos

2. SISSEJUHATUS

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia on üheks laialdaselt levinud ainete lahutamise meetodiks keemias. Seda meetodit kasutatakse erinevates valdkondades näiteks toiduainetetööstuses, ravimitööstuses, meditsiinis ja biokeemias. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia võimaldab nii kvalitatiivset kui ka kvantitatiivset analüüsi.

Pöördfaasvedelikkromatograafias, kus statsionaarne faas on mittepolaarne ning eluent polaarne, on polaarsetel ainetel sageli lühikesed retentsiooniajad ning nende lahutamine proovi komponentidest on seega keeruline. Selline olukord esineb sageli just aluseliste analüütide puhul (näiteks paljud ravimid), mis on traditsioonilistes – mõõdukalt happelistes – eluentides suuresti protoneeritud kujul. Ajalooliselt on vedelikkromatograafia eluendid olnud pigem happelised, sest kõrge pH kahjustas analüütilisi kolonne.

Moodsate kolonnidega on ilma probleemideta võimalik kasutada ka eluente, mille pH on üle 7. Sellistes eluentides on aluselised analüüdid osaliselt või täielikult neutraalsel kujul ja nende retentsioon on tugevam. Aluseliste eluentide, mille pH on stabiilne, saamiseks tuleb kasutada aluselisi puhvreid. Puhvrikomponendid peavad olema lenduvad, kui detektoriks on massispektromeeter. Selliseid puhversüsteeme ei ole väga palju. Üheks selliseks ainete grupis, mida saab eluendilisanditena kasutada, on fluoroalkoholid koos ammoniaagiga, mis ühtlasi tagavad mobiilfaasi puhverdusvõime aluselises pH alas.

Bakalaureusetöö eesmärk on uurida fluoroalkoholide kui mobiilfaasi lisandite mõju nii aluseliste kui happeliste analüütide retentsioonile pöördfaasvedelikkromatograafias kasutades kõige laialdasemalt levinud C18 statsionaarset faasi ning võrrelda fluoroalkoholide ja laialdaselt kasutatavate eluendilisandite mõju. Töös vaadeldakse erinevate ainete, mahtuvusfaktorite muutumist sõltuvalt eluendilisandist kui ka pH-st. Valitud analüütide hulgas on nii happeliste, neutraalsete kui ka aluseliste omadustega aineid. Uuritud mobiilfaasi pH väärtustel on mõned neist põhiosas anioonsel, mõned neutraalsel ja mõned katioonsel kujul. Valitud analüüdid on lihtsad ja püsivad, nende pK_a väärtused on leitavad kirjandusest ning kõigil molekulidel esineb aromaadne tuum, mis tagab võimaluse lihtsa ja töökindla UV-Vis detektori kasutamiseks. Eluendilisanditena uuritakse laialdaselt levinud ammooniumatsetaati, ning kahte seni vedelikkromatograafias vähe kasutatud fluoroalkoholi: heksafluoro-2,3-trifluorometüül-2,3-butaandiool (perfluoropinakool) ja nonafluoro-*tert*-butüülalkohol. Mobiilfaasi pH väärtustena kasutatakse 8,5; 9,0 ja 10,0.

Saadud tulemuste abil soovitakse näidata fluoroalkoholide sobivust vedelikkromatograafia eluendilisanditena. Uute lisanditega laiendatakse mobiilfaaside valikut, mida on võimalik kasutada nii UV-Vis- kui ka massispektrometriliste detektoritega. Lisaks eelnevale proovitakse tugevalt mõjutada ka polaarsete ainete retentsiooni C18 statsionaarsel faasil.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) on meetod, mis eraldab proovis leiduvad komponendid vastavalt nende vastasmõjule statsionaarse ja mobiilse faasiga. Eri tugevusega interaktsioonide tõttu elueeruvad analüüdid kolonnist eri hetkedel [1]. HPLC-s sisestatakse proov lahuse kujul vedelasse mobiilsesse faasi. Kõrge rõhu abil kannab mobiilne faas proovi läbi tahkete statsionaarse faasi osakestega tihedalt täidetud kolonni [2]. Komponentide elueerumine registreeritakse detektoriga. Tulemusena koostatakse kromatogramm mille telgedeks on detektori signaal ja aeg [2].

Tänapäeval on pöördfaas-vedelikkromatograafia valitsev vedelikkromatograafia liik, sest see on töökindel, efektiivne ja hea korratavusega [1,2]. Peaaegu 90% ravimite kromatograafilistest analüüsides madalate molekulmasside puhul tehakse pöördfaas-vedelikkromatograafiaga [3]. Pöördfaas-vedelikkromatograafias on statsionaarne faas mittepolaarne, tavaliselt on tegu poorse tahke kandja pinnale kinnitatud pikkade alküülhelatega, näiteks C18 (kuid võib-olla ka C1-C18, C30) [3], levinud on ka fenüülrühmad [2]. Mobiilne faas on enamasti segu veest või vee baasil puhverlahusest ja orgaanilisest lahustist nagu metanool (MeOH) või atsetonitriil (MeCN). Polaarsemad komponendid elueeruvad kolonnist kiiremini, kui vähem polaarsed, sest polaarsetel ühenditel on tugevam vastastikmõju polaarse mobiilse faasiga [1]. Kui tõsta mobiilse faasi veesisaldust, suureneb ka komponentide retentsiooniaeg. Pöördfaasile omane probleem on väga polaarsete analüütide liiga kiire elueerumine [2].

HPLC eelised on kiire ja täpne analüüs ning automatiseeritavus. Samuti on HPLC kasutatav enamiku ühendite puhul erinevalt näiteks gaasikromatograafiast (GC), millega pole umbes 75% huvipakkuvatest ühenditest võimalik analüüsida [2]. GC puhul peab lahutatavad ühendid olema lenduvad, samas kui HPLC puhul piisab, kui need on lahustuvad [2]. HPLC üks probleemidest on kõikide ühendite jaoks universaalse detektori puudumine. Teine on lahutamise efektiivsus, mis on HPLC korral madalam kui GC korral. [2].

3.2. Happeliste ja aluseliste analüütide lahutamine HPLC meetodil

Suur osa analüüte on kas happeliste või aluseliste omadustega. Selliste ainete vedelikkromatograafilisel lahutamisel mängib mobiilfaasi pH olulist rolli. Pöördfaas-

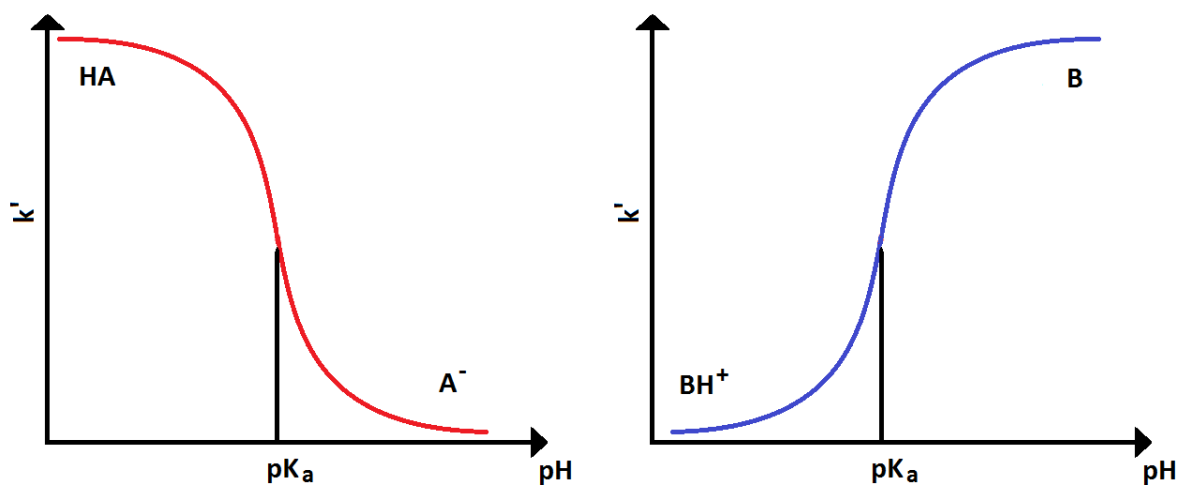
vedelikkromatograafias on ioonsel kujul analüüdid mobiilfaasiga tugevamas vastasmõjus kui neutraalsel kujul analüüdid. Seetõttu on ioonsel kujul analüütide retentsiooniajad lühemad. Happed ioniseeruvad ja kaotavad prootoni kui mobiilfaasi pH tõuseb. Alused ioniseeruvad ja saavad juurde prootoni kui mobiilfaasi pH langeb. [2] pK_a on negatiivne kümnendlogaritm happe dissotsiatsioonikonstandist K_a (1).

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (1)$$

Kui analüüdil leidub mitu ioniseeritavat rühma, siis on ka antud analüüdil mitu pK_a väärtust. Aluste pK_a on arvatud alusele vastava konjugeeritud happe dissotsiatsioonikonstandist [4]. Neutraalsetel analüütidel jäävad retentsiooniajad pH-d muutes enam vähem samaks. Selliste analüütide puhul, mis võivad ioniseeruda, võivad retentsiooniajad pH muutmisel suures ulatuses muutuda. [5] Neil analüütidel sõltub lahutus mobiilfaasi pH-st, sest sellest oleneb, kui suures osas on analüüt ioniseeritud kujul (vt Joonis 1) [6]. Happeliste analüütide deprotoneeritud vormi osakaal suureneb pH tõusul ja analüüt veedab vähem aega statsionaarses faasis. Aluseliste analüütide deprotoneeritud vormi osakaal suureneb pH tõusul ja analüüt veedab rohkem aega statsionaarses faasis, sest analüüt on vähem polaarne. Mahtuvusfaktor k' (2) näitab analüüdi hulkade tasakaalulist suhet statsionaarses faasis ja mobiilses faasis: [2].

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

kus t_R on aine retentsiooniaeg ja t_M on surnud aeg.



Joonis 1. Happeliste ja aluseliste ainete retentsiooni sõltuvus mobiilfaasi pH-st.

Puhvrile orgaanilist lahustit lisades võivad muutuda mobiilse faasi pH ja analüütide pK_a väärtused. pH mõõtmisi soovitatakse sellegipoolest teha enne orgaanilise lahusti lisamist, sest selleks, et peale orgaanilise lahusti lisamist korrektselt pH mõõta, tuleks pH meeter kalibreerida vastava koostisega vesi-orgaanika segudes, mis on aga praktikas väga tülikas [2].

3.3. Eluendilisandid ja puhverlahused

Kasutades UV-Vis detektorit tuleb arvestada puhverlahuse valguse neelamist soovitud lainepikkustel. Kõige levinumad mobiilse faasi lisandid UV-Vis detektorit kasutades on etaanhape ja fosforhape, sest neid on võimalik kasutada ka lühematel lainepikkustel kui 220 nm, ning sidrunhape, kuid sellega pole võimalik teha mõõtmisi alla 220 nm [7]. Vedelikukromatograafia massispektromeetria (LC-MS) meetodi puhul peavad eluendilisandid olema lenduvad ning mitte maha suruma lahutatavate ainete ionisatsiooni massispektromeetri (MS) ioonallikas [7]. Seetõttu on MS detektori puhul puhvrite valik piiratud (vt Tabel 2 Lisas). LC-MS korral on traditsiooniliselt kasutatavateks aluselisteks puhvriteks ammooniumatsetaat ja ammooniumkarbonaat [8], kuna need soolad on mõlemad lenduvad.

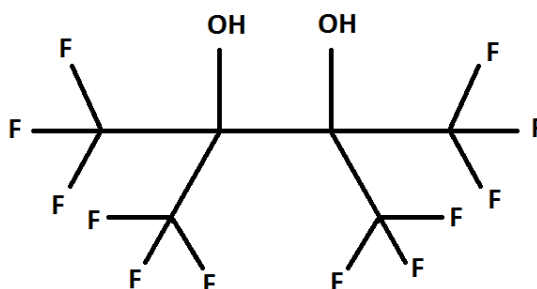
Analüütide lahutus saavutatakse ioonse vormi nõrgema ning neutraalse vormi tugevama retentsiooni arvelt. Kuna mobiilfaasi pH stabiilsus mängib korratavate tulemuste saamisel üliolulist rolli, kasutatakse eluendilisandeid, mis tagavad puhverdusvõime ja hoiavad pH stabiilsena. Tagamaks piisava puhverdusvõime on soovitatav, et puhversüsteemi pK_a asuks $\pm 1,5$ pH ühiku ulatuses soovitud pH väärtusest [2]. Puhverlahus on kõige efektiivsem siis, kui selle ioniseeritud ja mitteioniseeritud osade kontsentratsioonid on lähedased [2]. Puhverlahustel, millel on mitu komponenti, mis on nõrgad happed või nõrgad alused, tekib mitu puhvriala, mis piisava läheduse puhul liituvad suuremaks puhverdusalaks. Sama kehtib ka siis, kui mõnel komponendil on mitu pK_a väärtust. Anorgaaniliste puhverlahuste puhul on vaja arvestada ka puhvri lahustumisega eluendis, orgaaniliste puhverlahuste puhul üldiselt lahustuvuse probleemi ei esine [2].

3.4. Fluoroalkoholid

Fluoroalkoholid on grupp ühendeid, millel on alkoholi funktsionaalrühm ning molekulis on vähemalt üks C-F side. Ulatuslikult fluoreeritud alkoholid on lenduvad. See on eelduseks eluendilisanditele, mida kasutatakse MS-detektoriga. Fluororühma kõrge elektronegatiivsuse tõttu on fluoroalkoholid happelisemad kui vastavad fluoreerimata alkoholid [9]. Mobiilfaasi lisanditena HPLC-s on fluoroalkohole kasutatud ka varem [10–12]. Heksafluoro-2-propanool

(HFIP) puhul on uuritud oligosahhariide, oligonukleotiide ja antibiootikuid ning on saadud hea kromatograafiline eraldus [11–13]. 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-metüül-2-propanooli (HFTB) lisandi mõju on uuritud happeliste ja aluseliste analüütidega ja oligonukleotiididega ning on leitud, et see on sobilik LC-MS analüüsiks [10,14]. Käesolevas töös uuritud fluoroalkohole on kasutatud väga piiratult. Nonafluoro-*tert*-butanooli on uuritud oligonukleotiidide analüüsi puhul [15].

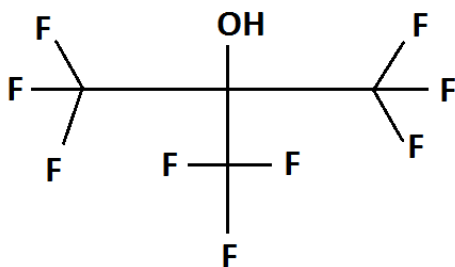
3.4.1. Perfluoropinakool



Joonis 2. Perfluoropinakooli struktuur

Perfluoropinakoolil (heksafluoro-2,3-trifluorometüül-2,3-butaandiool) on kaks hüdroksürühma (vt Joonis 2). Arvukate fluoroasendajate tõttu on perfluoropinakool märgataval määral happeline. Kahe hüdroksürühma tõttu on sellel happel kaks pK_a väärtust ning kaks puhvriala: $pK_{a1} = 5,95$ [16] ja $pK_{a2} = 10,43$ (mõõdetud magistrant Elisabeth Parman'i poolt kasutades töös [16] kirjeldatud meetodikat). Keemistemperatuur on $129\text{ }^{\circ}\text{C}$ ning sulamistemperatuur on $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. [17] Perfluoropinakooli kahe pK_a väärtuse tõttu võib olla saavutatav rahuldav puhverduisvõime ammoniaagiga pH vahemikus 5,0-11,5. Puhversüsteemis oleva ammooniumiooni pK_a on 9,24 [1], mille sattumine perfluoropinakooli pK_a väärtuste vahele annab võimaluse pidevamale puhverdumisvõimele tänu puhverdusalade kattumisele.

3.4.2. Nonafluoro-*tert*-butanool



Joonis 3. Nonafluoro-*tert*-butanooli struktuur

Nonafluoro-*tert*-butanooli (vt Joonis 3) keemistemperatuur on 44-45 °C ja sulamistemperatuur on -17 °C [18]. NFTB on üks tugevamaid vesiniksideme doonoreid [19]. Tänu arvukatele fluoroasendajatele on see aine märkimisväärselt happeline: $pK_a = 5,33$ [16]. NFTB on uuritud eluendilisandina oligonukleotiidide analüüsil, kuid on leitud, et NFTB surub maha oligonukleotiidide ionisatsiooni [15]. Kasutades koos ammoniaagiga, NFTB ning ammoniaagi puhverdusosalad liituvad üheks vahemikuks 4,5-10,5.

3.5. Ioonpaari efekt

Pöördfaasile omast probleemi – kõrge polaarsusega analüütide liiga kiiret elueerumist – on võimalik mõjutada lisades ioonpaari reagenti [2]. Ioonpaar-reagenti struktuur koosneb tavaliselt ioonsest rühmast ja mittepolaarsest ahelast. Reagenti mittepolaarne osa interakteerub tugevalt mittepolaarse statsionaarse faasiga ja ioonne rühm jääb polaarsete mobiilfaasi poole, millega võivad omakorda interakteeruda vastaslaenguga ioniseeritud analüüdid [20]. Samas võivad ioonpaarid tekkida ka mobiilses faasis, kus vastaslaengutega analüüt ja reagenti hüdrofiilne osa interakteeruvad ning moodustavad neutraalse (mittepolaarsema) osakese, mis siis omakorda interakteerub mittepolaarse statsionaarse faasiga kasvatades analüüdi retentsiooni [21]. Ioonpaari efekt on tugevam statsionaarses faasis [22]. Neutraalsete analüütide retentsiooniajad vähenevad, kui kasutada ioonpaar-reagente, sest reagentid konkureerivad neutraalse analüüdiga statsionaarsele faasile [20].

Levinud ioonpaar-reandid on alküülsulfonaadid ja tertsiarsed ammooniumsoolad, karboksüülhapped ja suured nõrgalt hüdraatuvad ioonid (kaatroobid) [2]. Fluoroalkoholid võivad käituda ioonpaar-reagentidena [10]. Fluoroalkoholidest on kõige rohkem kasutatud HFIP koos trietüülamiiniga (TEA) oligonukleotiidide analüüsil. Samas on uuritud teiste

fluoroalkoholide ja ioonpaar-reagentide käitumist. HFIP ja HFTB avaldavad sarnast mõju oligonukleotiidide lahutusele, kui kasutada samu ioonpaar-reagente. [14]

4. EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1. Kasutatud kemikaalid

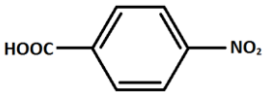
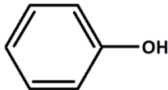
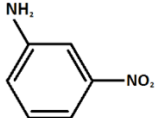
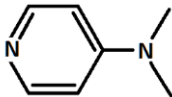
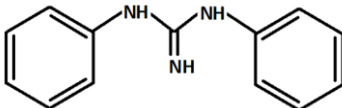
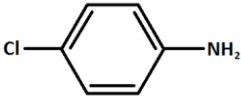
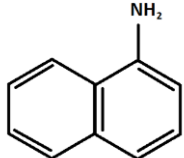
Eluentide valmistamiseks kasutati ammooniumatsetaati (Sigma-Aldrich, LC-MS puhtusega), ammooniumhüdroksiidi (Sigma-Aldrich, $\geq 25\%$, LC-MS puhtusega) heksafluoro-2,3-trifluorometüül-2,3-butaandiooli (Sigma-Aldrich, 96%), nonafluoro-*tert*-butanooli (Fluorochem, 97%), metanooli (Sigma-Aldrich, LC-MS puhtusega), ülipuhast MilliQ vett, mis puhastati Millipore Advantage A10 süsteemiga. Happelised analüüdid olid 4-nitrobensoehape (Reakhim, „puhas“) ja fenool (Riedel de Haën, „ACS analytical grade“). Aluselised analüüdid: 3-nitroaniliin, 4-dimetüülaminopüridiin, difenüülguanidiin, 4-kloroaniliin ja 1-naftüülamiin olid samad, mis töödes [23] ja [24].

4.2. Analüüsitavad ained

Analüüsiks valiti mudelanalüüdid, mis on lihtsad, püsivad, odavad ning mille pK_a on teada. Valikusse võeti nii neutraalseid kui ka lahuses uuritavatel pH-l ioniseeritud kujul olevaid analüüte (vt Tabel 1). Kõigil analüütidel on olemas aromaadne tuum, mis tagab neeldumise UV-Vis alas.

Emalahuste valmistamiseks kaaluti analüüt umbes 10 mg Sartorius LA 230 S kaalul, mille lahutusvõime on 0,0001 g ja lahustati 0,1% metaanhappe ja 0,1 mM ammooniumatsetaadi vesilahuses. 4-nitrobensoehappest, 3-nitroaniliinist, 4-dimetüülaminopüridiinist, difenüülguanidiinist ja 4-kloroaniliinist valmistati emalahused kontsentratsiooniga 1 mg/mL. 1-naftüülamiinist valmistati emalahus kontsentratsiooniga 2,9 mg/mL ja fenoolist 2 mg/mL. Ainete emalahuseid lahjendati 0,1% metaanhappe ja 0,1 mM ammooniumatsetaadi vesilahusega ning analüüsiks kasutati ainete standardlahuseid kontsentratsiooniga 1 $\mu\text{g/mL}$. Enne standardlahuste automaatsesse süstimissüsteemi sisestamist filtreeriti lahused läbi 0,2 μm Sartorius Minisart RC 4 süstlafiltrit proovi automaatsisestaja viaali.

Tabel 1. Analüüsitavad ained

Aine	pK _a (HA)	pK _a (BH ⁺)	Struktuur
4-nitrobensoehape	3,4 [25]		
Fenool	9,89 [26]		
3-nitroaniliin	> 14	2,41 [27]	
4-dimetüülaminopüridiin		9,60 [28]	
Difenüülguanidiin		10,0 [29]	
4-kloroaniliin		3,81 [30]	
1-naftüülamiin		3,92 [31]	

4.3. Eluendid

Eluentidena kasutati lisandite vesilahuse (puhverlahuse) ja metanooli segu suhtega 75:25. Eluendi lisandite kontsentratsioonid vees olid 5 mM. Võrdluseluendi puhverkomponentideks olid ammooniumatsetaat ja NH₃. Vesilahuse pH modifitseeriti kasutades ammooniumhüdrosiidi ja pH mõõdeti pH-meetriga E6115 (Evikon) enne vesilahusele metanooli lisamist. Vajalik ammooniumhüdrosiidi kogus sõltus soovitud pH väärtusest.

Vesilahused valmistati kolme pH väärtusega: 8,5; 9,0 ja 10,0. Valmistatud eluendid filtreeriti läbi 0,45 µm membraanfiltrit. pH-meetrit kalibreeriti iga päev enne mõõtmisi pH = 7,01 puhverlahusega (Evikon) ja pH = 10,00 puhverlahusega (FischerChemical). Puhverlahuseid hoiti võimalikult õhukindlalt.

Ammooniumatsetaati kaaluti 0,3830-0,3874 g, mis lahustati 1L ülipuhtas MilliQ vees. Ammooniumhüdrosiidi kulus pH = 8,5 saamiseks 150-160 µL, pH = 9,0 saamiseks 390 µL ja pH = 10,0 saamiseks 3270-3400 µL. 894 µL perfluoropinakooli lahustati 1L MilliQ vees. Ammooniumhüdrosiidi kulus pH = 8,5 saamiseks 730-762 µL, pH = 9,0 saamiseks 950-1090 µL ja pH = 10,0 saamiseks 4900-5750 µL. 697 µL nonafluoro-*tert*-butanooli lahustati 1L MilliQ vees. Ammooniumhüdrosiidi kulus pH = 8,5 saamiseks 900 µL, pH = 9,0 saamiseks 1230 µL ja pH = 10,0 saamiseks 3780 µL. Tuginedes töös [32] esitatud põhimõtetele võis pH mõõtmiste määramatus olla hinnanguliselt ± 0,05.

4.4. UV-Vis detektor

UV-Vis detektor mõõdab kolonnist väljuva vedeliku neelduvuse muutumist ajas ja suudab tuvastada aineid, mis kasutataval lainepikkusel kiirgust neelavad [33]. Detektoris läbib kiirgus läbivoolorakus voolavat analüüsivat lahust ja langeb seejärel kiirgustundlikule elemendile (nt fotodiood või diodriivi) mis muundab kiirguse intensiivsuse elektriliseks signaaliks [2]. Neelduvus A leitakse ilma analüüdita lahust ehk võrdluslahust läbinud kiirguse intensiivsuse I_0 suhtest analüüti sisaldava lahusest läbinud kiirguse intensiivsusesse I (3):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (3)$$

Beeri-Lamberti seaduses on A – neelduvus, ϵ – neelduvustegur, b – lahusekihi paksus, mida läbib kiirgus, I – intensiivsus, I_0 – võrdluselahuse läbinud kiirguse intensiivsus [2].

UV-Vis detektor on enamasti vedelikkromatograafias esimene detektori valik kui ei ole tegemist ülimaldlate sisalduste määramisega ja kui analüütides leidub kromofoore, mis tagavad neeldumise detektori tööalas. UV-Vis detektoril on hea tundlikkus ja lai lineaarne ala [2]. UV-Vis detektor on töökindel ja lihtne kasutada, samas ei sõltu signaali muutus palju temperatuurist ega vedeliku voolu muutustest [2]. Analüüt peab neelama UV või nähtavat kiirgust lainepikkuste vahemikus 190-780 nm. Eluent peab neelama kiirgust mõõdetaval lainepikkusel võimalikult vähe [2].

4.5. Kasutatud aparatuur ja kromatografeerimise tingimused

Kromatografeerimine viidi läbi Agilent 1200 HPLC vedelikkromatograafil, mis koosnes kvaternaarsest pumbast, automaatselt termostateerimata süstimisüsteemist, termostateerimata kolonnist, eluendi degasaatorist ning 5-kanalilisest UV-Vis detektorist. Kasutatud analüütiline

kolonn oli Agilent ZORBAX Extend-C18 100 × 2.1 mm, osakeste suurusega 3,5 µm. Eluendi voolukiiruseks seati 0,5 mL/min. UV-Vis detektori lainepikkus valiti 254 nm, ribalaius ±2 nm. Referentslainepikkus oli 360 nm, ribalaius ±50 nm. Lainepikkusel 254 nm on kõikidel uuritavatel analüütidel piisav neelduvus. Sisestatud analüüdi lahuse kogus oli 10 µL. Iga lahusega tehti kolm kordusmõõtmist. Kromatogrammide analüüsiks kasutati tarkvara Agilent ChemStation B.04.03.

4-dimetüülaminopüridiini kromatogrammi piigi kuju tõttu viidi läbi kontrollanalüüs (vt Joonis 18 Lisas). Kontrollanalüüs viidi läbi Shimadzu Nexera XR LC-20AD HPLC süsteemiga, mis koosnes kvaternaarsest pumbast, automaatselt süstimisüsteemist, eluendi degasaatorist, fotodiodrivi detektorist ja Shimadzu LCMS-2020 massispektromeetrist. Kasutatud analüütiline kolonn oli Agilent ZORBAX C18 100 × 2.1 mm, osakeste suurusega 3,5 µm. Eluendi voolukiiruseks seati 0,5 mL/min. UV-Vis detektori lainepikkus valiti 254 nm. Sisestatud analüüdi lahuse kogus oli 10 µL. Iga lahusega tehti kolm kordusmõõtmist. Kromatogrammide analüüsiks kasutati tarkvara Shimadzu LabSolutions 5.75 SP2. Sama süsteemiga, kuid detektor oli massispektromeeter, viidi läbi ka eluendi lisandite mõõtmised, kus uuriti nende interaktsioone statsionaarse faasiga.

4.6. Fluoroalkoholide elueerumine

Saamaks infot fluoroalkoholide käitumise kohta kromatograafilises protsessis tehti mõõtmised, kus analüüdiks olid perfluoropinakool või nonafluoro-*tert*-butanool. Eluendina kasutati ammooniumatsetaadi ja metanooli segu suhtega 75:25. Mõõtmised viidi läbi samade pH väärtuste juures: 8,5; 9,0 ja 10,0. Mõõtmised viis läbi Rūta Veigure. Fluoroalkoholide kromatogramme on näha Lisas (vt Joonis 15 ja Joonis 16). pH muutumisel mõlema fluoroalkoholi puhul on näha retentsiooniaegade lühenemist pH tõstmisel. Nonafluoro-*tert*-butanooli retentsiooniaeg oli umbes 4 min, aga perfluoropinakooli retentsiooniaeg oli umbes 20 min. See näitab, et perfluoropinakool püsib statsionaarses faasis kauem, samas kui nonafluoro-*tert*-butanool interakteerub statsionaarse faasiga vähem.

5. TULEMUSED JA ARUTELU

5.1. Uuritud analüütide grupid ja oodatud trendid

Eri analüütide gruppide mahtuvusfaktorite muutused sõltuvad pH muutustest erinevalt. Hapete puhul võib oodata, et mahtuvusfaktorid vähenevad eluendi pH tõusuga, sest anioonse vormi osakaal suureneb (vt Joonis 1). Anioonid on eluendi keskkonnas neutraalidest tugevamini solvateeritud ja käituvad seetõttu polaarsemate osakestena kui neutraalid. Mittepolaarse C18 statsionaarse faasi ja polaarset eluendi puhul polaarsemad analüüdid elueeruvad kiiremini, sest nad veedavad elueerumise käigus proportsionaalselt rohkem aega eluendi faasis. Kuna anioonse vormi osakaal pH tõstmisel tõuseb, siis võib oodata, et pH tõstes mahtuvusfaktorid 4-nitrobensoehappel ja fenoolil vähenevad.

Neutraalsete ainete puhul on oodata, et mahtuvusfaktorid pH muutudes oluliselt ei muutu, kuna kasutatud pH vahemikus analüüdid märgatavalt ei ioniseeru. Seetõttu on oodata, et pH vahemikus 8,5-10,0 mahtuvusfaktorid sarnased.

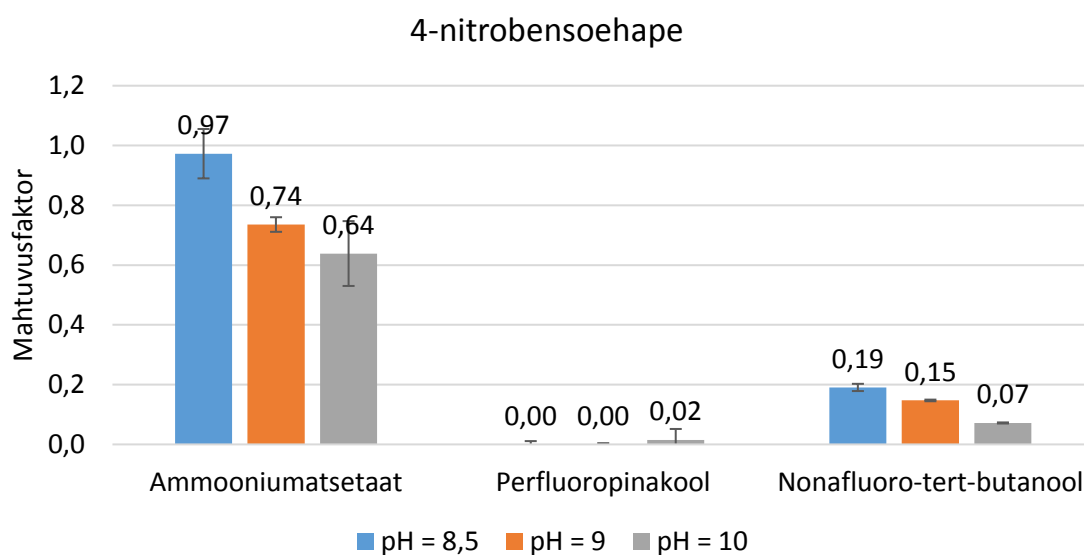
Aluste puhul võib oodata, et mahtuvusfaktorid mittepolaarse C18 statsionaarse faasi puhul kasvavad eluendi pH väärtuse tõusuga. Protoneeritud aluse pK_a väärtusest madalama pH juures on lahuses märkimisväärselt katioonset vormi, mis on (sarnaselt anioonidele) väga polaarne ja viibib elueerimisel märgatava aja eluendi faasis. Kõrgema pH väärtuse juures protoneeritud vormi osakaal väheneb (vt Joonis 1), aine viibib elueerumisel rohkem statsionaarses faasis ning elueerub aeglasemalt.

5.2. Anioonsel kujul analüüdid (A^-)

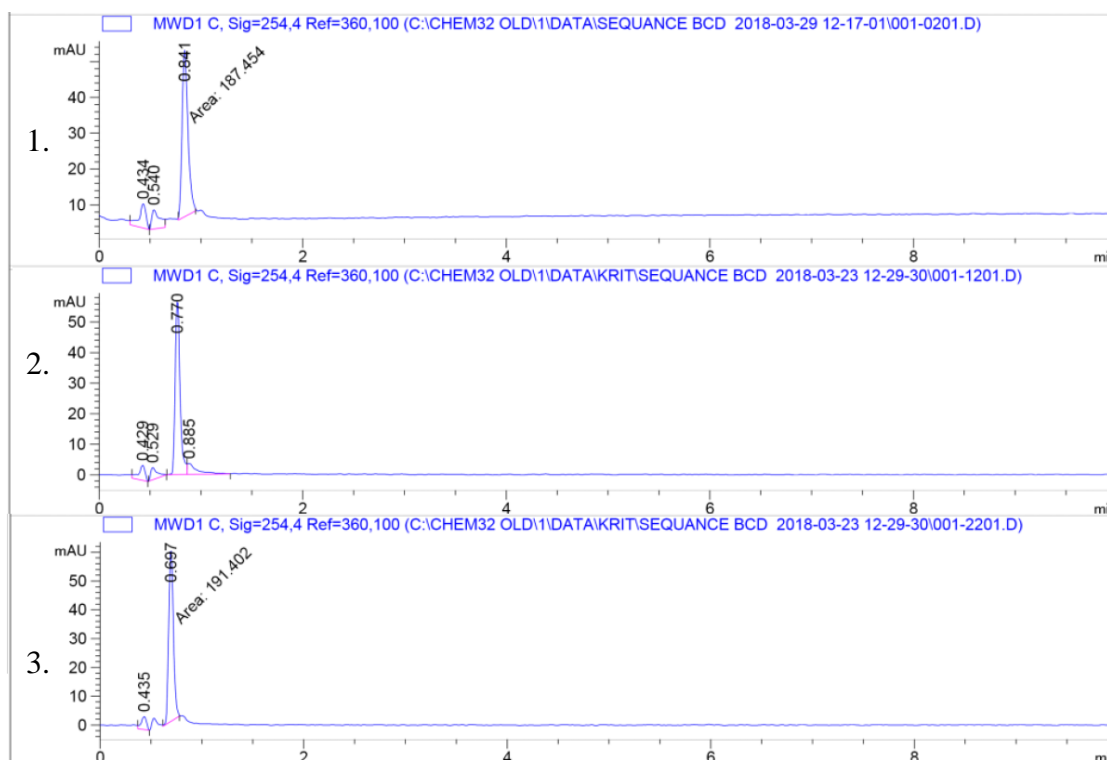
4-nitrobensoehappe pK_a väärtus on 3,4, mis tähendab, et see aine on uuritud eluendi pH väärtuste (8,5 – 10,0) juures praktiliselt täielikult anioonsel kujul. Seetõttu on ka 4-nitrobensoehappe retentsiooniajad lühikesed ning mahtuvusfaktorid madalad. Fenooli pK_a väärtus on 9,89, ning seetõttu on see aine pH 8,5 ja 9,0 juures põhiosas eeldatavasti neutraalsel kujul ning pH 10,0 juures on anioonse ja neutraalse vormi sisaldused võrreldavad.

Ammooniumatsetaati eluendi lisandina kasutades, kui metanooli sisaldus oli 25%, vähenes 4-nitrobensoehappe keskmine mahtuvusfaktor pH tõusuga 8,5 pealt 9,0 peale ning samuti tõusuga 9,0 pealt 10,0 peale (vt Joonis 4 - Joonis 5). Samas, mahtuvusfaktorite varieeruvus kordusmõõtmiste vahel oli suur. Perfluoropinakooli puhul elueerus analüüt kolonnist surnud ajal. Nonafluoro-*tert*-butanooliga vähenes 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktor pH tõusuga.

Näidiskromatogrammid 4-nitrobensoehappe kohta on välja toodud Lisas (vt Joonis 22 ja Joonis 23).

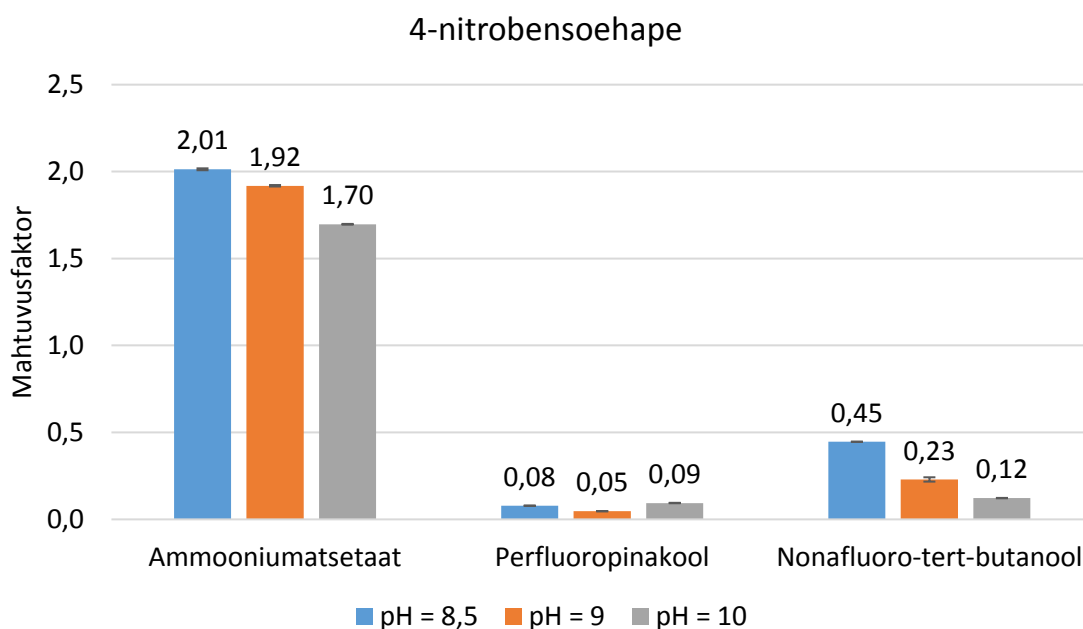


Joonis 4. 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktorid uuritud eluendilisandite ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%). Kui mahtuvusfaktor on 0, siis analüüt elueerus surnud ajal.



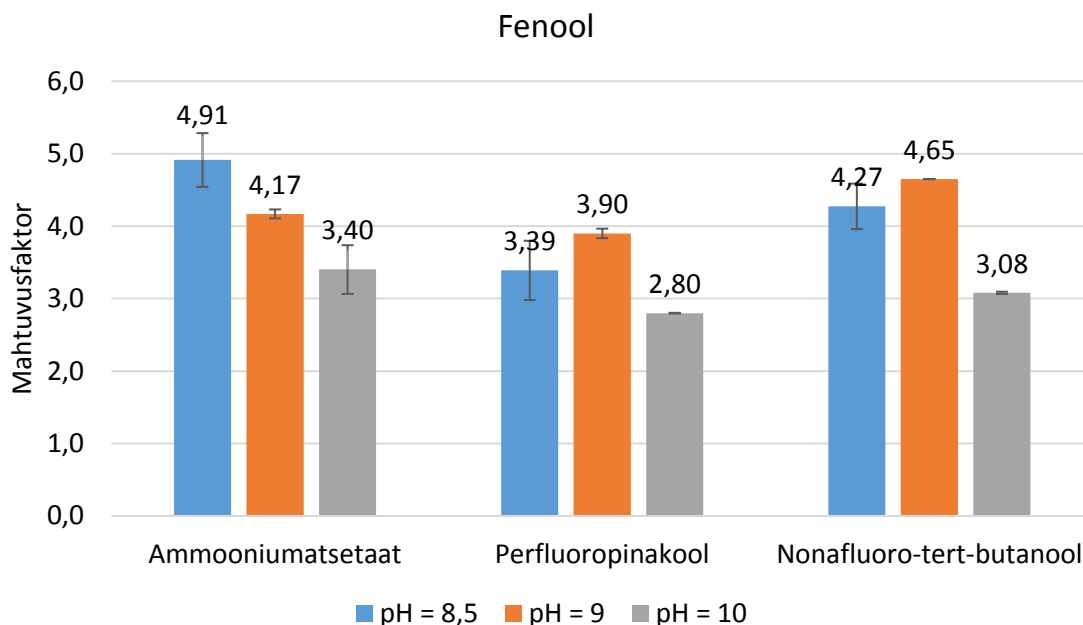
Joonis 5. 4-nitrobensoehappe kromatogrammid ammooniumatsetaadi lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 25%) (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0).

Väga madalate mahtuvusfaktorite tõttu viidi läbi kordusmõõtmised. Kontrollmõõtmised viidi läbi madalamal metanooli osakaalul eluendis: 10% metanool ja 90% eluendi lisandit (vt Tabel 4 - Tabel 8 Lisas). Metanooli sisalduse vähenemisel muutub eluent polaarsemaks ning retentsiooniajad eeldatavasti pikenevad ning mahtuvusfaktorid suurenevad. Juhul kui eluendi lisandiks olid ammooniumatsetaat ja nonafluoro-*tert*-butanool, mahtuvusfaktorid kasvasid võrreldes kõrgema metanooli sisaldusega (vt Joonis 6). Samas 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktorite muutuste trendid jäid samaks võrreldes kõrgemate metanooli sisaldusega eluentidega. Ammooniumatsetaati kasutades retentsioonifaktorid vähenesid pH tõstmisel. Perfluoropinakooliga väljus analüüt kolonnist praktiliselt surnud ajal iga pH puhul ka madalamal metanooli osakaalul. Nonafluoro-*tert*-butanooli puhul 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktorid vähenesid pH tõustes.



Joonis 6. 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktorid uuritud eluendilisandite ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 10%).

Ammooniumatsetaati eluendi lisandina kasutades vähenesid fenooli mahtuvusfaktorid pH tõustes (vt Joonis 7). See on ootuspärane tulemus, sest fenooli pK_a asub uuritud pH-de läheduses. Kui eluendi pH muutub uuritava aine pK_a läheduses, tõuseb deprotoneeritud vormi osakaal pH tõusuga oluliselt, mis seletab fenooli mahtuvusfaktori märgatavat kahanemist. Perfluoropinakooli puhul fenooli mahtuvusfaktor ei muutu pH kasvades ühtlaselt vaid on juhuslikult hajunud. Nonafluoro-*tert*-butanooli kasutades on pH = 10,0 juures fenooli mahtuvusfaktor madalam kui pH 8,5 või 9,0 juures.



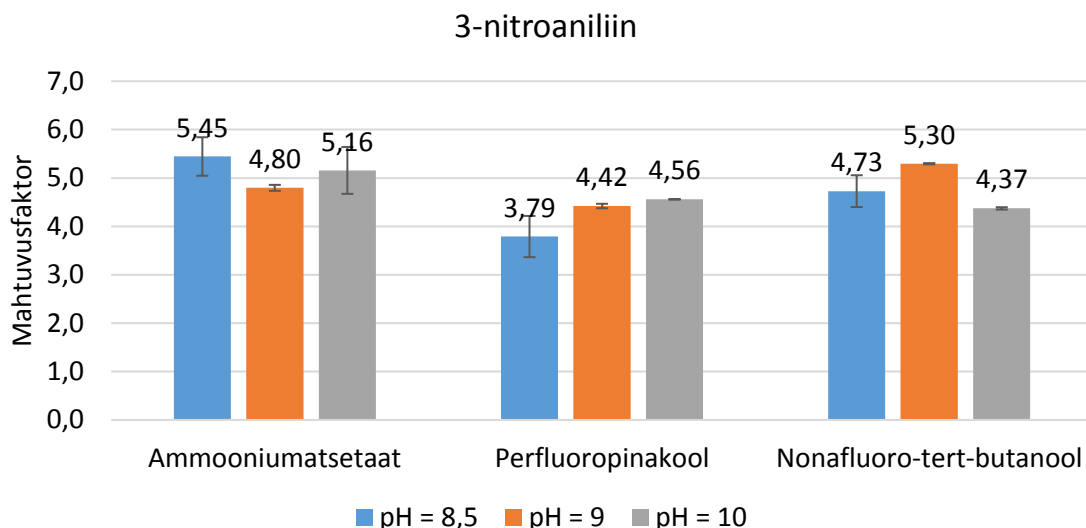
Joonis 7. Fenooli mahtuvusfaktorid erinevate eluendilisandite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Ammooniumatsetaadi puhul mõlema happelise analüüdi mahtuvusfaktorid vähenesid eluendi pH kasvades, mida oli ka oodata. Fluoroalkoholide puhul selget trendi ei ilmnenud, fenooli mahtuvusfaktorid ei muutu pH kasvades ühtlaselt, vaid on juhuslikult hajunud. Fenooli puhul olid mahtuvusfaktorid sarnased kasutades nii ammooniumatsetaati kui ka fluoroalkohole. 4-nitrobensoehappe puhul on fluoroalkohole kasutades mahtuvusfaktorid üle 5 korra madalamad kui ammooniumatsetaadi lisandiga.

5.3. Neutraalsel kujul analüüdid (HA, B)

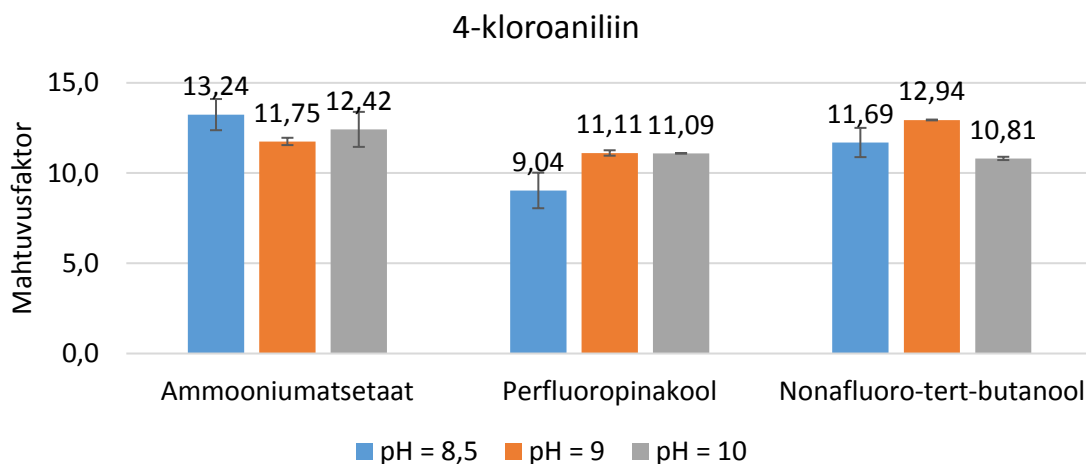
Protoneeritud 4-kloroaniliini pK_a väärtus on 3,81, protoneeritud 1-naftüülamiini pK_a on 3,92, protoneeritud 3-nitroaniliini pK_a väärtus on 2,41. 3-nitroaniliini kui happe pK_a väärtus on üle 14 ning ülejäänud kahel ainel veel oluliselt kõrgem. Seega, mobiilfaasides kasutatud pH väärtuste vahemikus on need ained praktiliselt täielikult neutraalsel kujul.

3-nitroaniliini mahtuvusfaktorite muutus pH muutudes oli väike iga mobiilse faasi lisandi puhul ning kindlaid trende pH kasvamisega välja ei saa tuua (vt Joonis 8). Eri eluendilisandite puhul olid mahtuvusfaktorid sarnased.



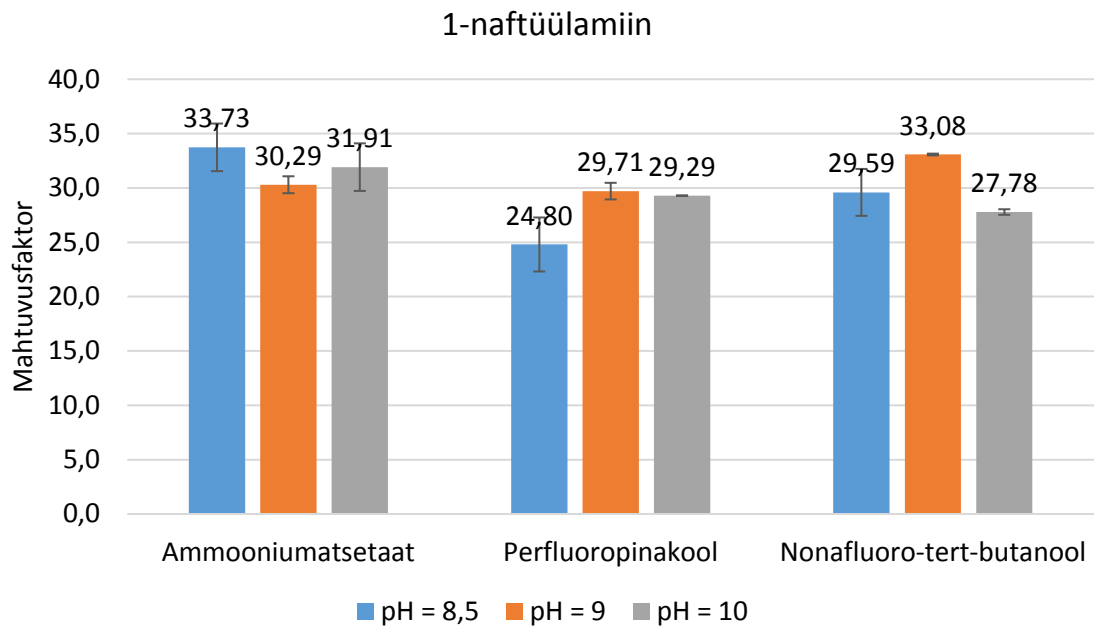
Joonis 8. 3-nitroaniliini mahtuvusfaktorid erinevate eluendiliseidite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

4-kloroaniliini mahtuvusfaktorite muutusel pH tõstmisel pole kindlat tõusvat või langevat trendi ühegi eluendiliseidite juures ning võib väita, et mahtuvusfaktorid ei muutu oluliselt (vt Joonis 9).

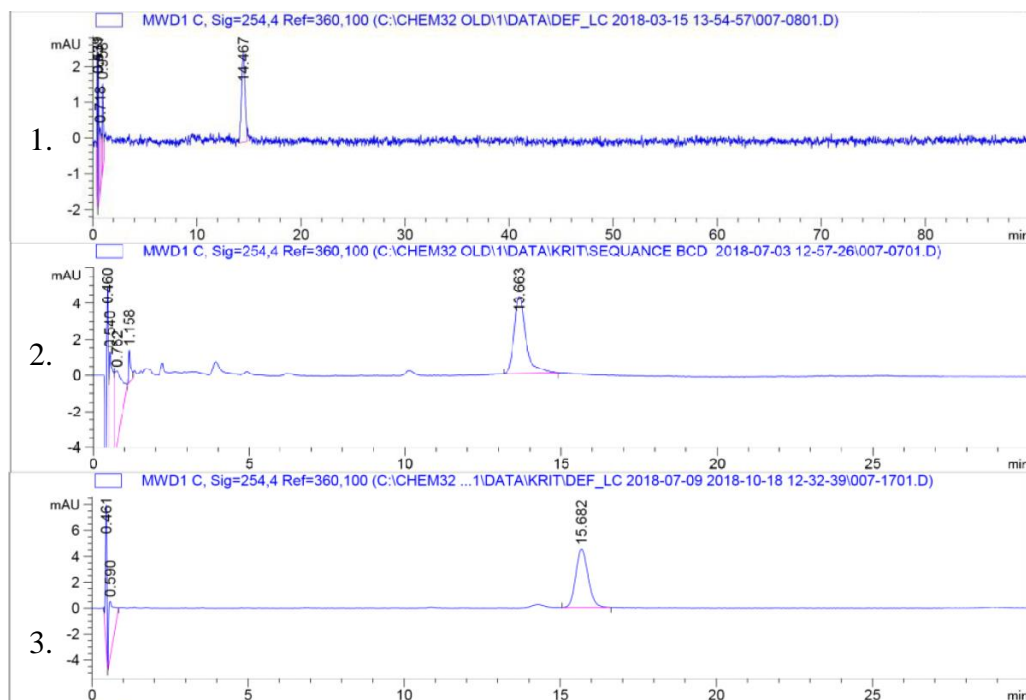


Joonis 9. 4-kloroaniliini mahtuvusfaktorid erinevate eluendiliseidite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

1-naftüülamiini analüüsil kõikide eluendiliseiditega võib öelda, et mahtuvusfaktorite muutus ei ole oluline, sest ühtlast trendi ei ole ning mahtuvusfaktorid on juhuslikult hajunud (vt Joonis 10). 1-naftüülamiini kui ühe neutraalse analüüdi näidiskromatogramm on välja toodud (vt Joonis 11).



Joonis 10. 1-naftüülamiini mahtuvusfaktorid erinevate eluendilisandite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



Joonis 11. 1-naftüülamiini kromatogrammide erinevate eluendilisandite puhul pH = 9,0 juures (1: ammooniumatsetaat; 2: perfluoropinakool; 3: nonafluoro-*tert*-butanool) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Kokkuvõttes olid nende kolme aine mahtuvusfaktorid kõikide uuritud eluendilisandite puhul sarnased ja pH muutmisel esines vaid juhuslik mahtuvusfaktorite hajumine, mis oli

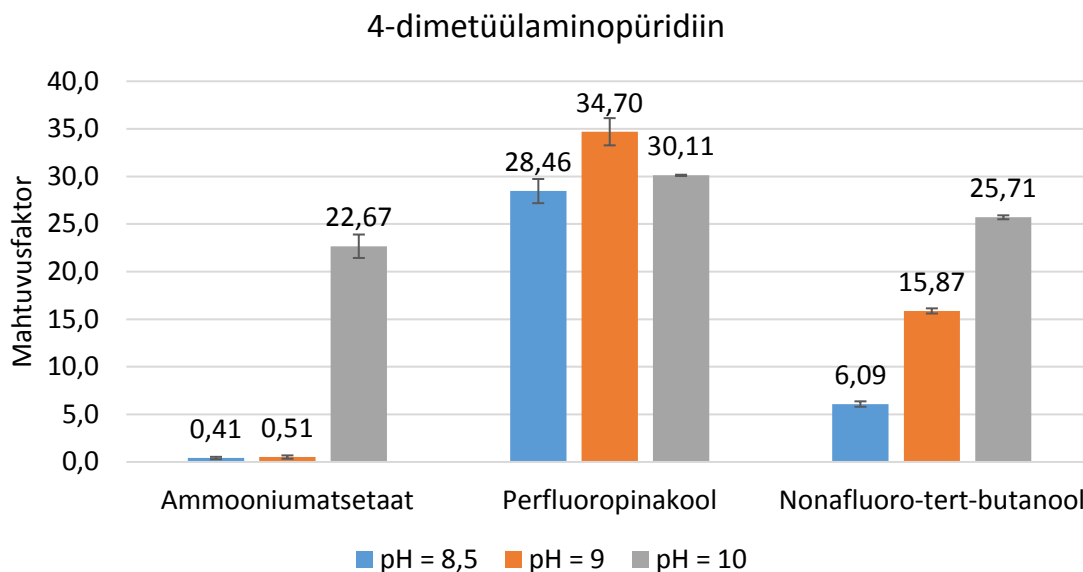
tingitud elueerumisel esinevatest juhuslikest efektidest näiteks ebastabiilne temperatuur. See on ka ootuspärane, sest pH muutudes tasakaal nende ainete erinevate vormide vahel ei muutu.

5.4. Katioonsel kujul analüüdid (HB⁺)

Protoneeritud 4-dimetüülaminopüridiini pK_a on 9,60, seetõttu on pH 10,0 juures lahuses neutraalset 4-dimetüülaminopüridiini mõnevõrra rohkem kui protoneeritud vormi. Protoneeritud difenüülguanidiini pK_a väärtuseks on 10,0 ning seetõttu on see aine pH 8,5 juures eeskätt katioonsel kujul, pH 9,0 juures domineerib katioonne vorm vähem ning pH 10,0 juures on katioonse ja neutraalse vormi sisaldused võrreldavad.

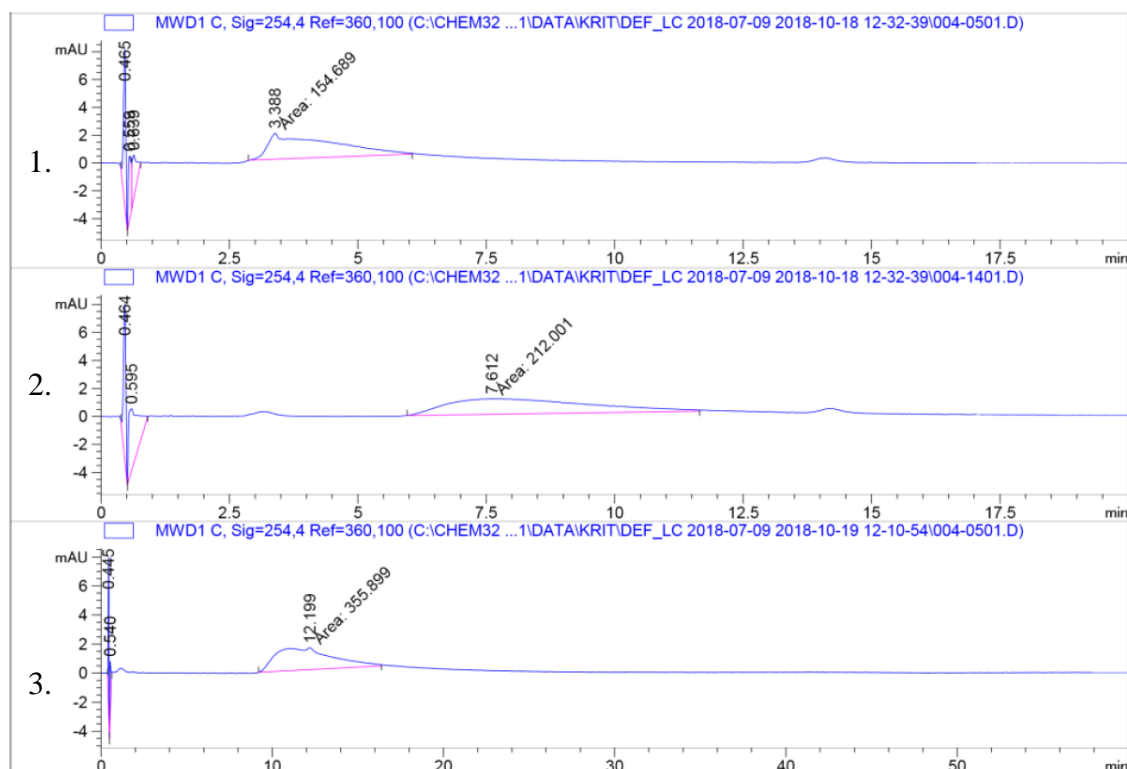
Ammooniumatsetaadi puhul kahe madalama pH juures 4-dimetüülaminopüridiini mahtuvusfaktorite väärtused kattuvad, kuid pH = 10 juures on näha üle 40-kordset mahtuvusfaktori tõusu (vt Joonis 12). Seda põhjustab 4-dimetüülaminopüridiini pK_a , mille tõttu pH = 10 lähedal toimub neutraalsete osakeste osakaalu märgatav tõus. Mõõtmistel ammooniumatsetaadiga olid piigid kõigi pH väärtuste juures asümmeetrilised (vt Joonis 17 Lisas). Perfluoropinakooli puhul on samade pH väärtuste juures mahtuvusfaktorid kõrgemad kui ammooniumatsetaadi puhul. pH 8,5 ja 9,0 juures on mahtuvusfaktorid üle 68 korra kõrgemad kui ammooniumatsetaadiga. Nonafluoro-*tert*-butanooli puhul toimub pH tõustes mahtuvusfaktorite kasvamine. pH tõustes 8,5 juurest 9 juurde mahtuvusfaktor kasvas üle 2 korra ja pH 9-lt 10-le kasvas umbes 1,5 korda. Kuna 4-dimetüülaminopüridiini pK_a jääb pH-de 9 ja 10 vahemikku, siis esinebki mahtuvusfaktorite tõus, sest neutraalsete osakeste osakaal pH tõustes kasvab.

Nonafluoro-*tert*-butanooliga viidi läbi lisamõõtmised, sest piigi kuju järgi oleks võinud oletada, et tegemist on kahe kattunud piigiga (vt Joonis 13). Massispektromeetriga detekteeritud 4-dimetüülaminopüridiini piik oli sama kujuga. Sellest selgus, et tegemist oli ühe ja sama ainega (vt Joonis 24 Lisas).



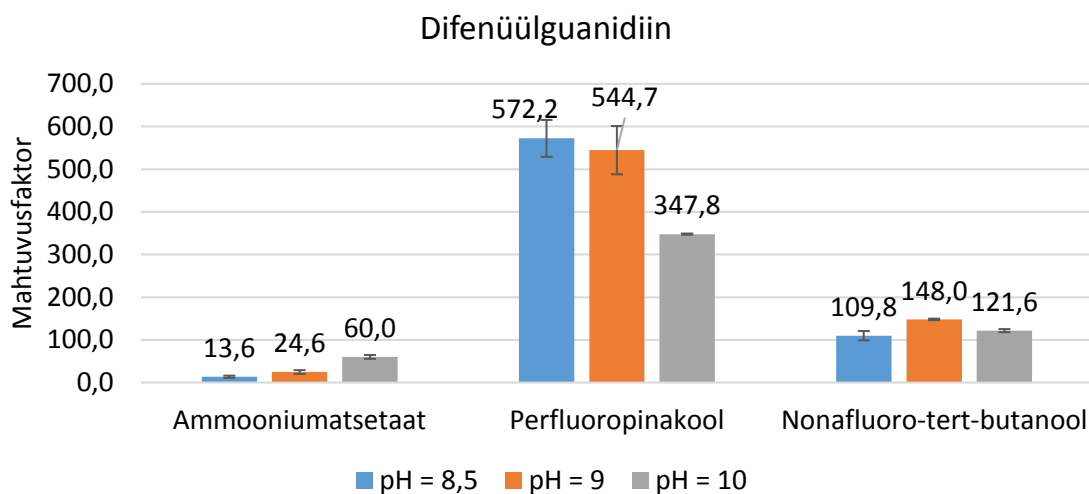
Joonis 12. 4-dimetüülaminopüridiini mahtuvusfaktorid erinevate eluendilisandite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Fluoroalkoholide puhul esines iga pH juures piikide asümmeetriat (vt Joonis 17 ja Joonis 18 Lisas). Kõigi eluendi lisandite puhul võis piikide asümmeetria põhjustada näiteks protoneeritud aluste interakteerumine kaitsmata silanoolrühmadega statsionaarses faasis.



Joonis 13. 4-dimetüülaminopüridiini kromatogrammid nonafluoro-*tert*-butanooli lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Kasutades ammooniumatsetaati eluendi lisandina difenüülguanidiini analüüsidest pH tõustes kasvavad ka mahtuvusfaktorid (vt Joonis 14). Perfluoropinakooli kasutades olid mahtuvusfaktorid ammooniumatsetaadi omadest umbes 42 korda kõrgemad pH = 8,5 juures, 22 korda kõrgemad pH = 9,0 puhul ja umbes 6 korda kõrgemad pH = 10,0 juures. Võrreldes perfluoropinakooli nonafluoro-*tert*-butanooli kasutamisega olid mahtuvusfaktorid pH = 8,5 puhul 5 korda kõrgemad, pH = 9,0 juures 4 ja pH = 10,0 puhul 3 korda kõrgemad. Nonafluoro-*tert*-butanooli kasutades on mahtuvusfaktorid pH kasvamise suunas vastavalt 8, 6 ja 2 korda kõrgemad kui ammooniumatsetaati kasutades. Perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butanooli kasutades eluendi lisandina eri pH väärtustel saadud mahtuvusfaktorite vahel olulist erinevust ei ole v.a. perfluoropinakooli korral pH = 10,0 juures, kus toimus mahtuvusfaktorite langus. Kõikide pH väärtuste ning eluendilisandite juures esines piikide asümmeetriat (vt Joonis 19 - Joonis 21 Lisas).



Joonis 14. Difenüülguanidiini mahtuvusfaktorid erinevate eluendilisandite puhul ning eri pH väärtuste juures (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Ammooniumatsetaati kasutades difenüülguanidiini mahtuvusfaktorid kasvasid, sest polaarse katioonse vormi osakaal vähenes ja madala polaarsusega neutraalse vormi osakaal kasvas. 4-dimetüülaminopüridiini mahtuvusfaktorid pH 8,5 ja 9,0 juures oluliselt ei erine, kuid pH 10,0 juures kasvavad mahtuvusfaktorid oluliselt, eeldatavasti samal põhjusel. Fluoroalkoholide kasutamisel ainult 4-dimetüülaminopüridiini puhul, kui eluendi lisandiks oli nonafluoro-*tert*-butanooli, toimus mahtuvusfaktorite suurenemine pH kasvades. Fluoroalkoholide puhul on mahtuvusfaktorid märgatavalt kõrgemad kui ammooniumatsetaadi puhul. Perfluoropinakooli puhul mahtuvusfaktor vähenes pH = 10 juures, kuid oodatult peaks

mahtuvusfaktorid suureneva, sest analüüdi polaarse vormi osakaal väheneb. See näitab võimalikku ionpaaride tekkimist fluoroalkoholidega.

5.5. Fluoroalkoholide mõju

Neutraalsel kujul esinevate analüütide puhul fluoroalkoholidel ootuspäraselt puudus märgatav mõju mahtuvusfaktoritele.

Analüütide korral, mis esinevad eeskätt anioonsel kujul, on fluoroalkoholide mõju märgatav. 4-nitrobensoehappe puhul mahtuvusfaktorid vähenesid fluoroalkohole kasutades. See toetab Kipper et al. poolt töös [10] esitatud hüpoteesi, et fluoroalkoholid seostuvad statsionaarsele faasile ja moodustavad kihi, mis on osaliselt anioonne. Anioonsel kujul esinevad analüüdid seonduvad selliselt muutunud statsionaarse faasiga vähem, tänu laengute elektrostaatilisele tõukumisele. Kuna perfluoropinakool elueerub kolonnist oluliselt kauem (retentsiooniaeg umbes 20 min) (vt Joonis 15 Lisas) kui nonafluoro-*tert*-butanool (retentsiooniaeg umbes 4 min) (vt Joonis 16 Lisas), siis on tõenäoline, et perfluoropinakool seostub statsionaarsele faasile oluliselt tugevamini kui nonafluoro-*tert*-butanool ning perfluoropinakooli moodustatud osaliselt anioonne kiht statsionaarsel faasil mõjutab elueerumist oluliselt rohkem kui nonafluoro-*tert*-butanooli korral. See selgitab, miks perfluoropinakooli puhul olid 4-nitrobensoehappe mahtuvusfaktorid madalamad kui nonafluoro-*tert*-butanooli puhul.

Fluoroalkoholide puhul on katioonses vormis olevatel analüütidel mahtuvusfaktorid märgatavalt kõrgemad kui ammooniumatsetaati kasutades. See näitab fluoroalkoholide anioonide tugevat interaktsiooni protoneerunud aluseliste analüütidega. Võib esineda ionpaari efekt, mille tõttu katioonsel kujul analüüdid tõmbuvad negatiivselt laetud fluoroalkoholide poole ning moodustavad ionpaare. See võib toimuda nii mobiilfaasis tekkivate neutraalsete analüüdi ja fluoroalkoholide kompleksidena, mille retentsioon statsionaarsel faasil on tugevam, kui ka statsionaarsele faasile kinnitunud fluoroalkoholi aniooni ja positiivselt laetud analüüdi vastastikmõjust tänu erimärgiliste laengute tõmbumisele. Perfluoropinakool elueerub kolonnist hiljem kui nonafluoro-*tert*-butanool. See näitab, et perfluoropinakool seonduvad statsionaarse faasiga tugevamini ja moodustab kõrgema tõenäosusega osaliselt negatiivse laenguga kihi statsionaarsele faasile. Nonafluoro-*tert*-butanooli retentsiooniaeg on lühem. See viitab sellele, et nonafluoro-*tert*-butanooli korral domineerib pigem ionpaaride moodustumine mobiilfaasis. 4-dimetüülaminopüridiini mahtuvusfaktorite kasvamine pH tõustes võib viidata sellele, et nonafluoro-*tert*-butanool suuremas osas moodustab neutraalseid aeglasemini elueeruvaid

analüüdi ja nonafluoro-*tert*-butanooli komplekse mitte kihti statsionaarsele faasile. Perfluoropinakooli puhul difenüülguanidiini mahtuvusfaktorite langus $\text{pH} = 10$ juures on selgitatav sellega, et pH tõustes muutub fluoroalkoholi kiht polaarsemaks, kuna perfluoropinakoolil on kaks hüdroksürühma, mis võivad mõlemad deprotoneeruda. Samas pH tõusmisel muutub difenüülguanidiin vähem polaarsemaks ning interakteerub vähesemal määral anioonse kihiga kui difenüülguanidiini polaarne vorm.

6. KOKKUVÕTE

Perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butüülalkoholi kasutamine eluendilisanditena kõrgefektiivses vedelikkromatograafias

Töö eesmärk oli uurida kahe fluoroalkoholi – perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butanooli – kui eluendi lisandite mõju erinevate neutraalsete, aluseliste ja happeliste analüütide retentsioonile pöördfaasvedelikkromatograafias ning võrrelda saadud tulemusi ammooniumatsetaadiga kui traditsioonilise eluendilisandiga.

Iga eluendilisandiga viidi mõõtmised läbi kolmel pH tasemel: 8,5; 9,0 ja 10,0. Iga analüüdiga tehti kolm kordusmõõtmist.

Neutraalsete analüütide mahtuvusfaktorid fluoroalkoholide kasutamisel oluliselt ei muutunud.

Ammooniumatsetaadi puhul, kasutatud pH väärtuste juures põhiosas anioonsel kujul esinevate analüütide mahtuvusfaktorid vähenesid eluendi pH tõstes. Üldiselt fluoroalkohole kasutades olid mahtuvusfaktorid tunduvalt madalamad. Selle põhjuseks võib olla perfluoropinakooli puhul statsionaarsele faasile tekkinud kiht, mis on osaliselt anioonne ning seetõttu anioonsel kujul analüüdid interakteeruvad statsionaarse faasiga vähem ja elueeruvad varem.

Katioonsel kujul analüütidel mahtuvusfaktorid tõusid ammooniumatsetaati kasutades, sest, analüüdi protoneeritud vormi osakaal vähenes pH tõustes. See vaadeldud trend on põhjustatud ainult pH muutustest. Fluoroalkoholide puhul olid katioonsel kujul analüütide mahtuvusfaktorid märgatavalt kõrgemad kui ammooniumatsetaadi lisandiga. See näitab, et perfluoropinakool ja nonafluoro-*tert*-butanool on paljulubavad, et neid võib kasutada eluendi lisanditena ravimite analüüsil. Fluoroalkoholide kõrgemad mahtuvusfaktorid on põhjustatud ioonpaari efektist, mis võib olla nii mobiilfaasis tekkivad neutraalsed analüüdi ja fluoroalkoholide kompleksid, mille retentsioon statsionaarsel faasil on tugevam (enamasti nonafluoro-*tert*-butanooli puhul), kui ka statsionaarsele faasile tekkinud fluoreeritud kihina, mis on anioonne. Positiivselt laetud analüüdid erimärgiliste laengute vastastikmõju tõttu tõmbuvad sellele kihile. Perfluoropinakooli pikema retentsiooniaja tõttu võib arvata, et perfluoropinakool moodustab kihi statsionaarsele faasile märgatavalt kõrgemal määral kui nonafluoro-*tert*-butanool.

7. SUMMARY

Perfluoropinacol and nonafluoro-*tert*-butanol as eluent additives in HPLC

The aim of this work was to study the influence of two fluoroalcohols (perfluoropinacol and nonafluoro-*tert*-butanol) as novel eluent additives on the retention for different analytes in reversed phase liquid chromatography. The involved analytes included neutral, basic and acidic compounds. The results obtained when using fluoroalcohols were compared to the results obtained with ammonium acetate as a conventional eluent additive.

Measurements were performed at three pH levels 8,5; 9,0 and 10,0. Three repetitions were made with each analyte.

For neutral analytes no significant change in retention factors was observed.

Retention factors for the anionic analytes decreased with ammonium acetate when the pH of eluent was increased. In comparison, when using fluoroalcohols as eluent additives, the retention factors were considerably lower. This may be due to the partially anionic layer formed by the fluoroalcohols onto the stationary phase. Therefore, anionic analytes interact with stationary phase to lesser extent (are retained less) and elute earlier.

For cationic analytes, the retention factors obtained with ammonium acetate increased, when increasing the mobile phase pH, because the amount of protonated form of the analyte decreased. This observed outcome is only due to eluent's pH changes. The retention factors, in case of fluoroalcohols, were significantly higher than those obtained, when ammonium acetate was used as eluent additive. This shows promise that perfluoropinacol and nonafluoro-*tert*-butanol can be used as eluent additives for drug analysis. The cause of the increased retention factors is the ion-pairing effect, which may be due to the neutral ion-pair complexes formed in the mobile phase between analyte and eluent additive, as well as due to the partially anionic fluororous layer formed by the fluoroalcohols, which increases the retention of cationic analytes. Due to the longer retention time of perfluoropinacol, it can be assumed that perfluoropinacol forms a layer on to the stationary phase to a larger extent than nonafluoro-*tert*-butanol.

8. KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, (2000).
- [2] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, Third Edit, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.
- [3] Y. V Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons, 2007.
- [4] T.L. Brown, *Chemistry: the central science*, Pearson Education, 2009.
- [5] J.W. Dolan, Back to basics: The Role of pH in Retention and Selectivity, *LC GC N. Am.* 35 (2017) 22–28.
- [6] M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 2. Effect of pH, Ionic Strength, and Mobile Phase Composition on the Retention of Weak Acids, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4094–4100.
- [7] J. Dolan, A guide to HPLC and LC-MS buffer selection, *ACE HPLC Columns--ultra inert base-deactivated HPLC columns.* (2016) 1–20.
- [8] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Buffer considerations for LC and LC--MS, *LC GC N. Am.* 27 (2009) 1000–1004.
- [9] I. Shukloy, N. Dubrovina, A. Börner, Fluorinated alcohols as solvents, co-solvents and additives in homogeneous catalysis, *Synthesis (Stuttg).* (2007) 2925–2943.
- [10] K. Kipper, K. Herodes, I. Leito, Fluoroalcohols as novel buffer components for basic buffer solutions for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry: Retention mechanisms, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8175–8180.
- [11] A. Apffel, J.A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W.S. Hancock, Analysis of oligonucleotides by HPLC- electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1320–1325.
- [12] K. Solakyildirim, Z. Zhang, R.J. Linhardt, Ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization ion trap mass spectrometry for chondroitin disaccharide analysis., *Anal. Biochem.* 397 (2010) 24–28.
- [13] K. Kipper, K. Herodes, I. Leito, L. Nei, Two fluoroalcohols as components of basic buffers for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric determination of antibiotic residues, *Analyst.* 136 (2011) 4587–4594.
- [14] L. Gong, R. Liu, Y. Ruan, Z. Liu, The role of fluoroalcohols as counter anion for ion-pair reversed-phase liquid chromatography/high resolution electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33 (2019).
- [15] B. Basiri, H. van Hattum, W.D. van Dongen, M.M. Murph, M.G. Bartlett, The Role of Fluorinated Alcohols as Mobile Phase Modifiers for LC-MS Analysis of Oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 190–199.

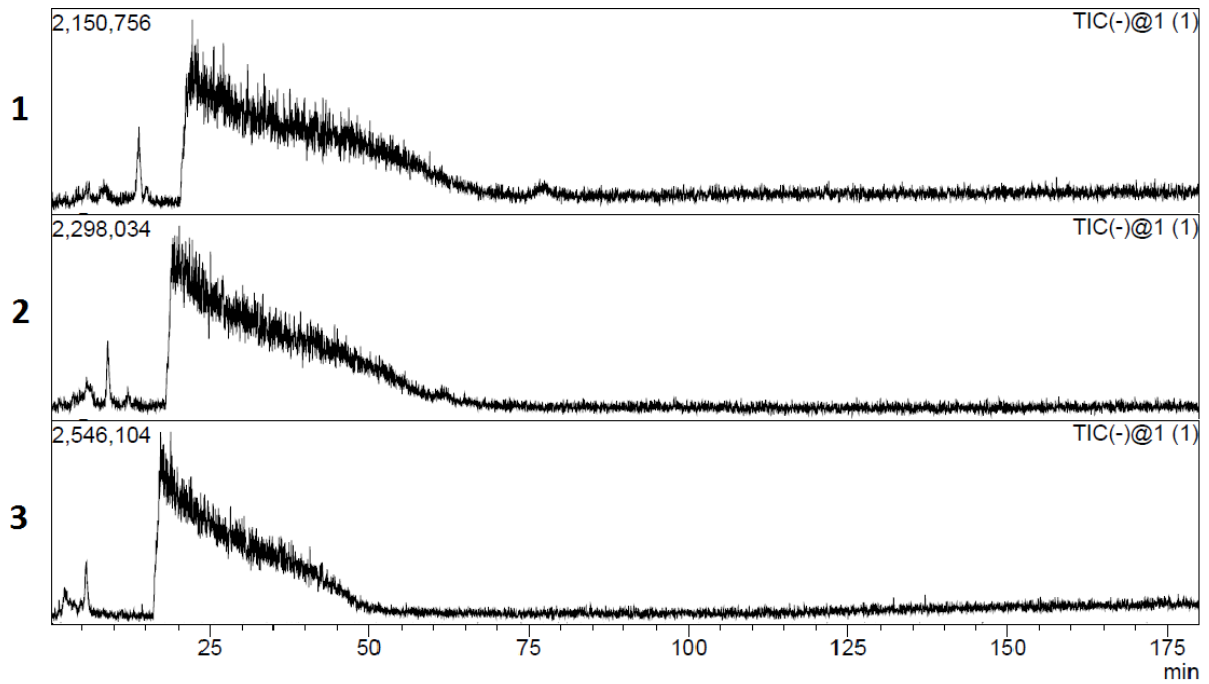
- [16] E. Parman, L. Toom, S. Selberg, I. Leito, Determination of pK_a values of fluorocompounds in water using ¹⁹F NMR, *J. Phys. Org. Chem.* (2018) e3940.
- [17] R. V Lindsey, W.J. Middieton, Perfluoropinacol and synthesis thereof, (1964).
- [18] N.C. for B. Information., 2-Propanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(trifluoromethyl)-, PubChem Compd. Database. (2019).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16924> (vaadatud 18. märts 2019).
- [19] J.L. Cook, C.A. Hunter, C.M.R. Low, A. Perez-Velasco, J.G. Vinter, Solvent Effects on Hydrogen Bonding, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 3706–3709.
- [20] J.W. Dolan, Ion Pairing - Blessing or Curse, *LCGC Eur.* 21 (2008) 258–263.
- [21] J. Dai, P.W. Carr, Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1072 (2005) 169–184.
- [22] J. Dai, P. Carr, Effect of mobile phase anionic additives on selectivity, efficiency, and sample loading capacity of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 6695–6705.
- [23] M. Oss, A. Kruve, K. Herodes, I. Leito, Electrospray Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2865–2872.
- [24] I. Kaljurand, A. Kütt, L. Sooväli, T. Rodima, V. Mäemets, I. Leito, I.A. Koppel, Extension of the Self-Consistent Spectrophotometric Basicity Scale in Acetonitrile to a Full Span of 28 pK_a Units: Unification of Different Basicity Scales, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 1019–1028.
- [25] J. Shorter, F.J. Stubbs, 255. The additive effect of substituents on the strength of benzoic acid, *J. Chem. Soc.* (1949) 1180–1183.
- [26] G. Kortüm, K. Andrussow, Dissociation constants of organic acids in aqueous solution, Butterworths, 1961.
- [27] J.M. Vandenberg, C. Henrich, S.G. Vandenberg, Comparison of pK_a Values Determined by Electrometric Titration and Ultraviolet Absorption Methods, *Anal. Chem.* 26 (1954) 726–727.
- [28] P. Przuszyński, Synthesis and properties of phenyl substituted derivatives of 2-phenyl-1,1,3,3-tetramethylguanidine, *Can. J. Chem.* 65 (1987) 626–629.
- [29] M.M. Davis, H.B. Hetzer, Comparative Strengths of Four Organic Bases in Benzene, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* (1934). 48 (1952) 381–391.
- [30] S.L. Shapiro, E.S. Isaacs, V. Bandurco, L. Freedman, Apparent Dissociation Constants of Haloaralkylamines, *J. Med. Pharm. Chem.* 5 (1962) 793–799.
- [31] N.F. Hall, M.R. Sprinkle, Relations between the structure and strength of certain organic bases in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 54 (1932) 3469–3485.

- [32] E. Koort, K. Herodes, V. Pihl, I. Leito, Estimation of uncertainty in pKa values determined by potentiometric titration, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 720–729.
- [33] T. Owen, A. Technologies, *Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer*, Agilent Technologies, 2000.
- [34] Waters Corporation, *XBridge Columns Care and Use Manual*, (2012).

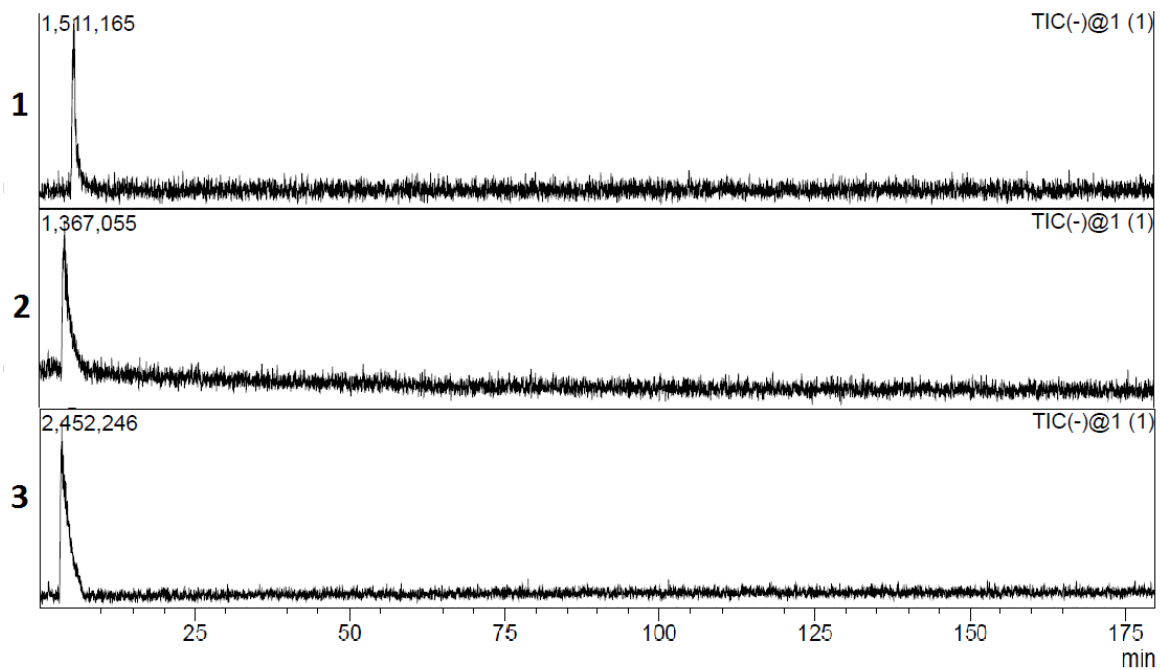
9. LISAD

Tabel 2. Levinumad puhverlahuste komponendid ja nende omadused [34]

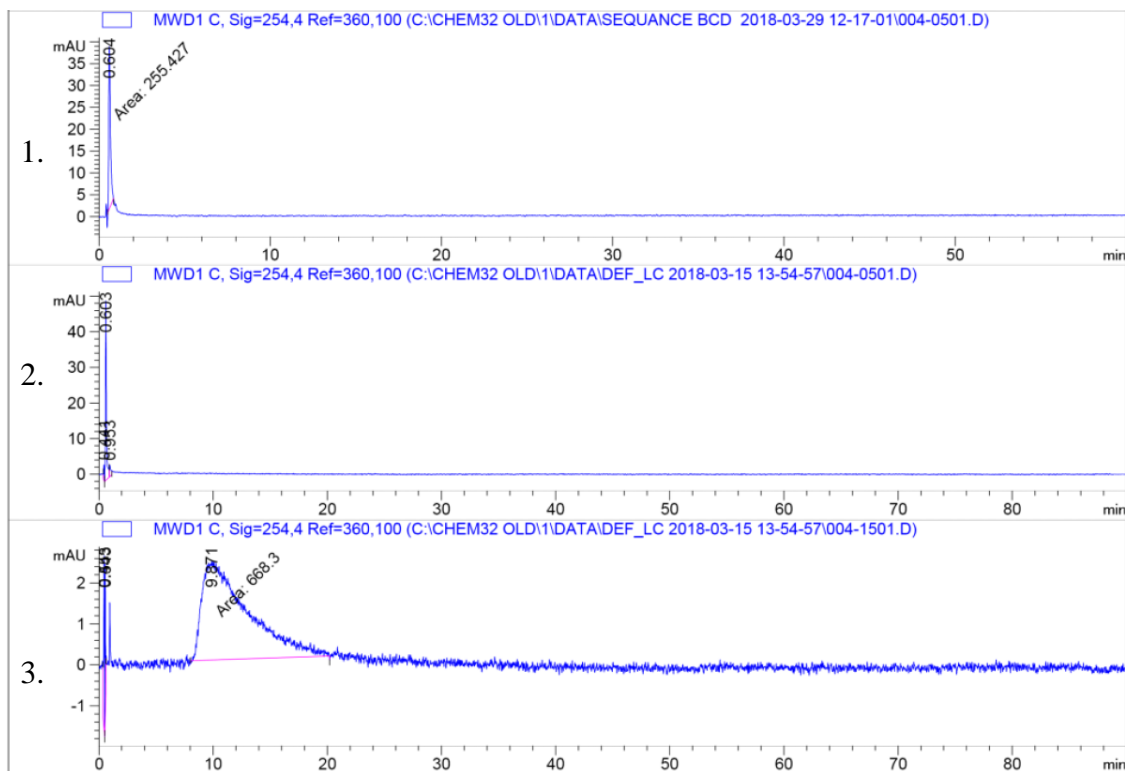
Lisand	pK _a	Puhverdusala (± 1 pH ühik)	Lenduvus	Kasutatav LC-MS	Kommentaariid
TFA	0,3		Lenduv	Jah	Võib MS signaali alla suruda. Kasutatakse 0,02-0,1% vahemikus.
Etaanhape	4,76	3,76-5,76	Lenduv	Jah	Parim puhverdusvõime koos ammooniumatsetaadiga. Kasutatakse 0,1-1,0% vahemikus.
Metaanhape	3,75	2,75-4,75	Lenduv	Jah	Parim puhverdusvõime koos ammooniummetanaadiga. Kasutatakse 0,1-1,0% vahemikus.
Fosforhape	2,15 7,20 12,3	1,15-3,15 6,20-8,20 11,3-13,3	Mittelenduv	Ei	Traditsiooniline puhver, vähene UV neeldumine. Ei ole kasutatav MS detektoriga.
Ammoniaak	9,2	8,2-10,2	Lenduv	Jah	Kasutatakse 1-10mM vahemikus. Hea puhvermahtuvus pH 10 juures.
Boraat	9,2	8,2-10,2	Mittelenduv	Ei	Kaitsekolonn soovitatav. Ei ole kasutatav MS detektoriga.
Glütsiin	2,4 9,8	8,8-10,8	Mittelenduv	Ei	Tsvitteriooniline puhver, tagab pikema kolonni säilimise kui boraat. Ei ole kasutatav MS detektoriga.
1-metüül-piperidiin	10,2	8,3-10,3	Lenduv	Pigem ei	Kasutatakse 1-10mM vahemikus. Surub maha analüütide ionisatsiooni
Trietüülamiin	10,7	9,7-11,7	Lenduv	Pigem ei	Kasutatakse 0,1-1,0% ulatuses. Surub maha analüütide ionisatsiooni
Pürrolidiin	11,3	10,3-12,3	Lenduv	Pigem ei	Keskmine puhver, tagab kolonni pika säilivuse. Surub maha analüütide ionisatsiooni



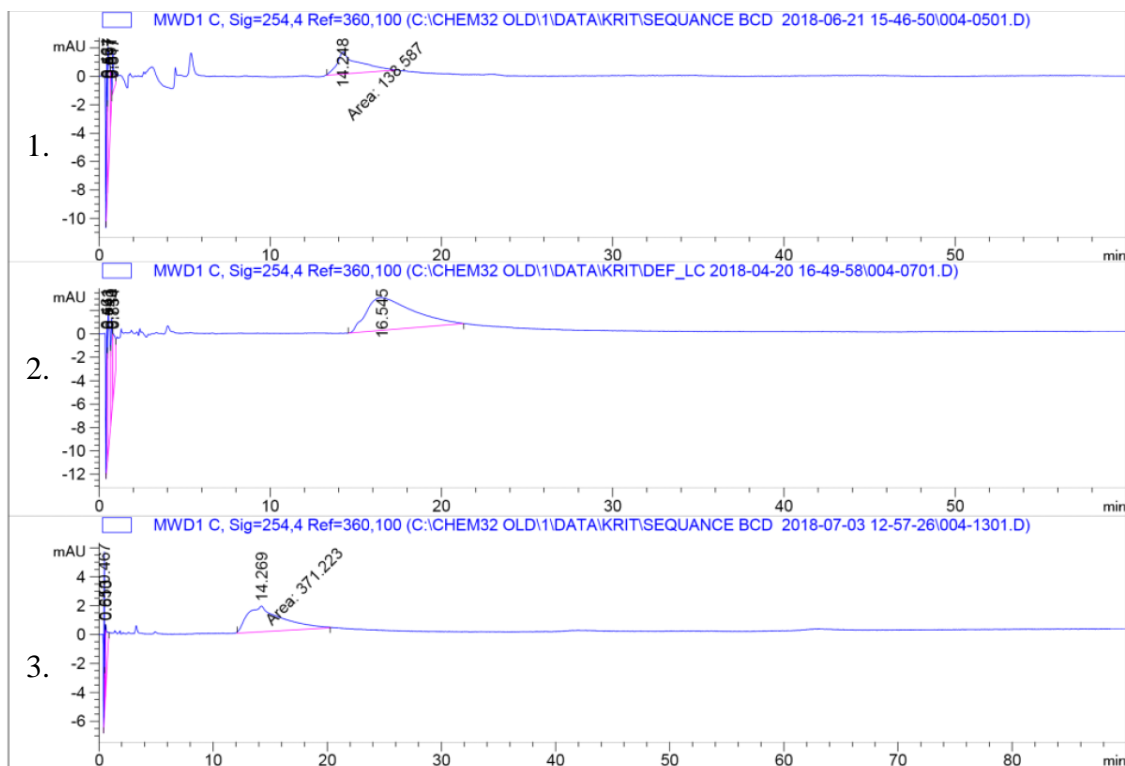
Joonis 15. Perfluoropinakooli kromatogrammid, kus metanooli sisaldus eluendis oli 25%. 1 analüüdi retentsiooniaeg on 22,274 min pH = 8,5 juures; 2 analüüdi retentsiooniaeg on 20,215 min pH = 9,0 juures, 3 analüüdi retentsiooniaeg on 17,333 min pH = 10,0 juures. Surnud aeg oli 1,3 min.



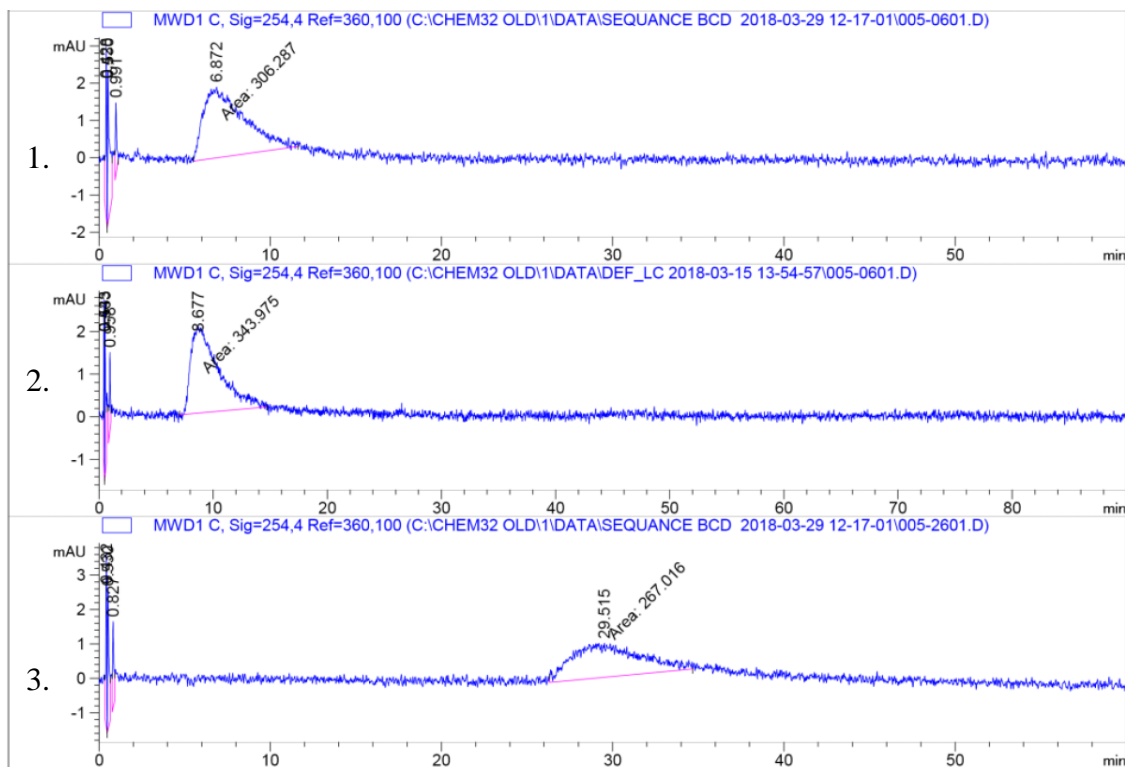
Joonis 16. Nonafluoro-*tert*-butanooli kromatogrammid, kus metanooli sisaldus eluendis oli 25%. 1 retentsiooniaeg on 5,727 min pH = 8,5 juures; 2 retentsiooniaeg on 4,166 min pH = 9,0 juures, 3 retentsiooniaeg on 3,547 min pH = 10,0 juures. Surnud aeg oli 1,3 min.



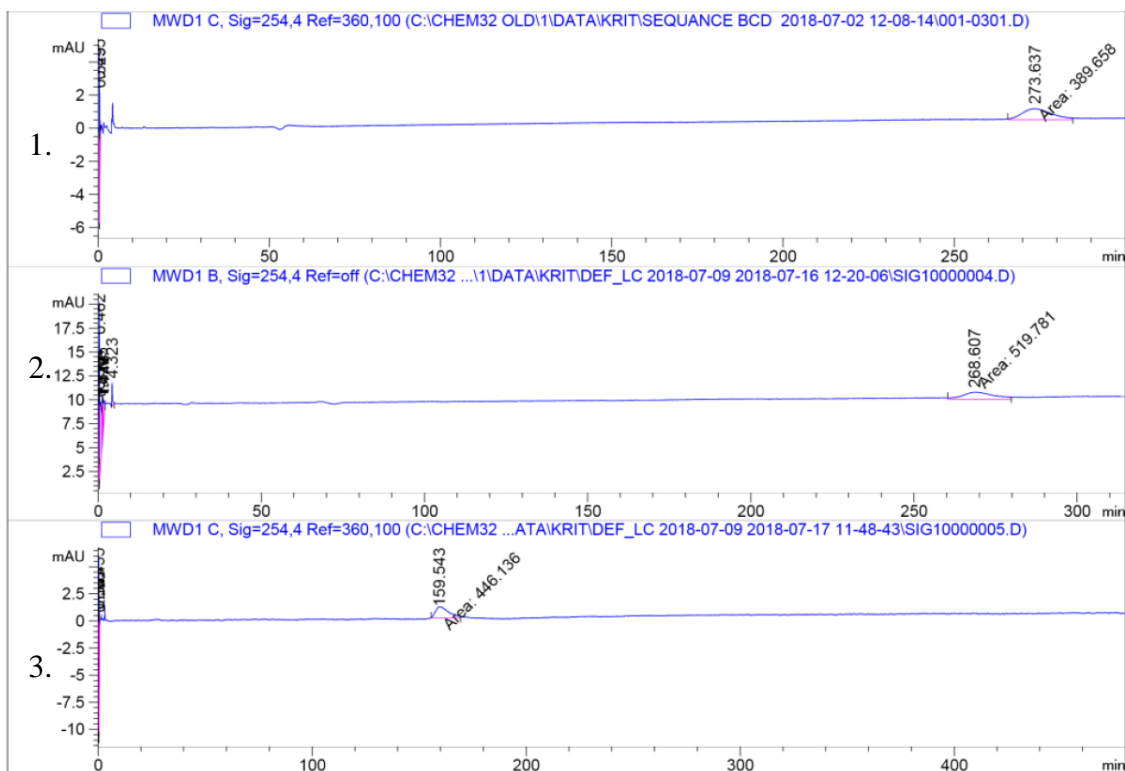
Joonis 17. 4-dimetüülaminopüridiini kromatogrammide ammooniumatsetaadi lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



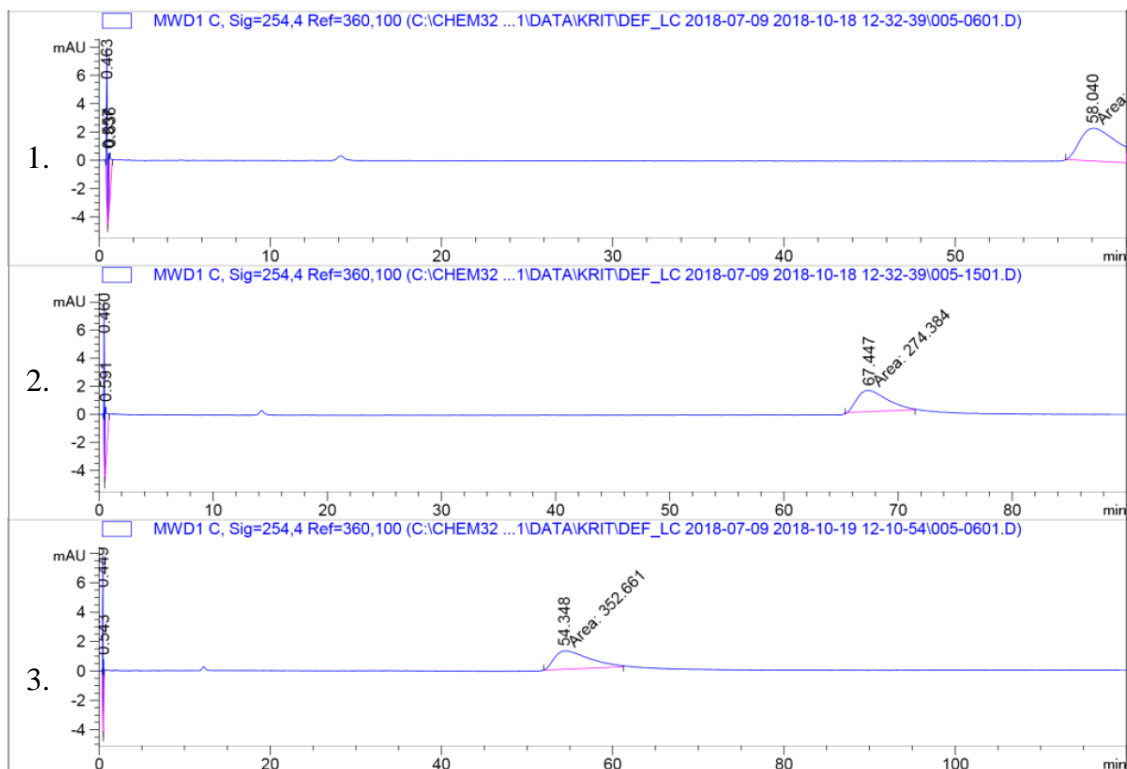
Joonis 18. 4-dimetüülaminopüridiini kromatogrammide perfluoropinakooli lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



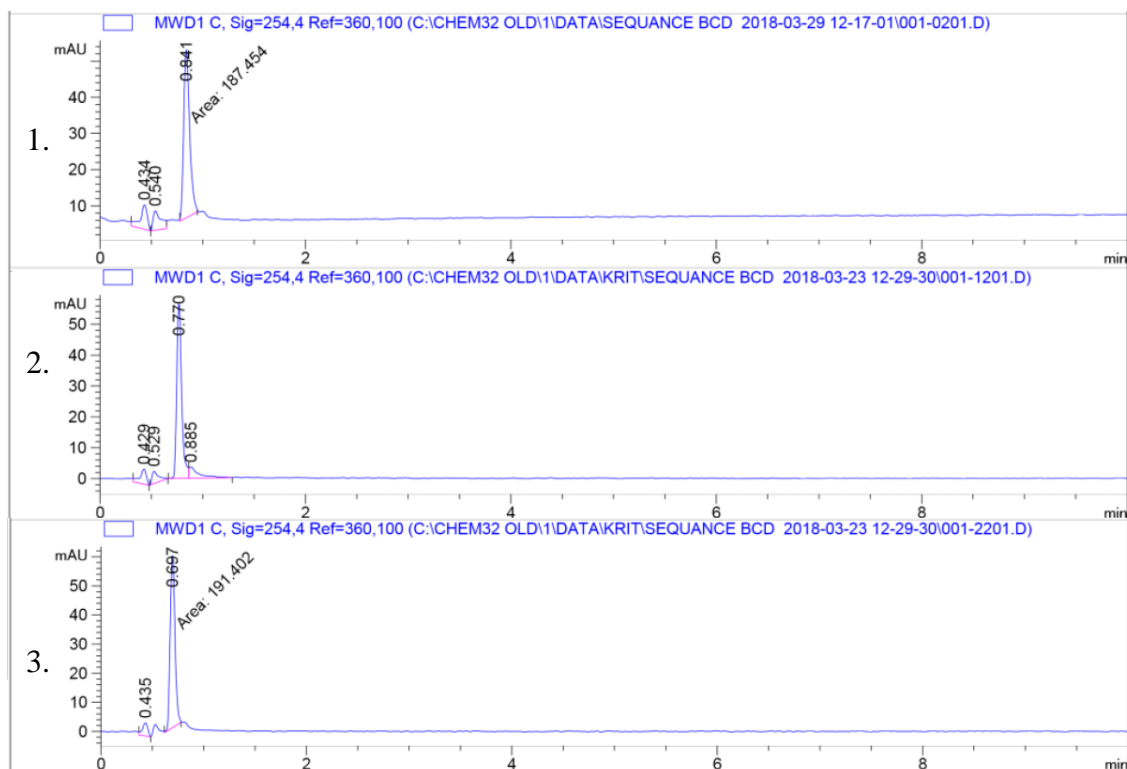
Joonis 19. Difenüülguanidiini kromatogrammide ammooniumatsetaadi lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



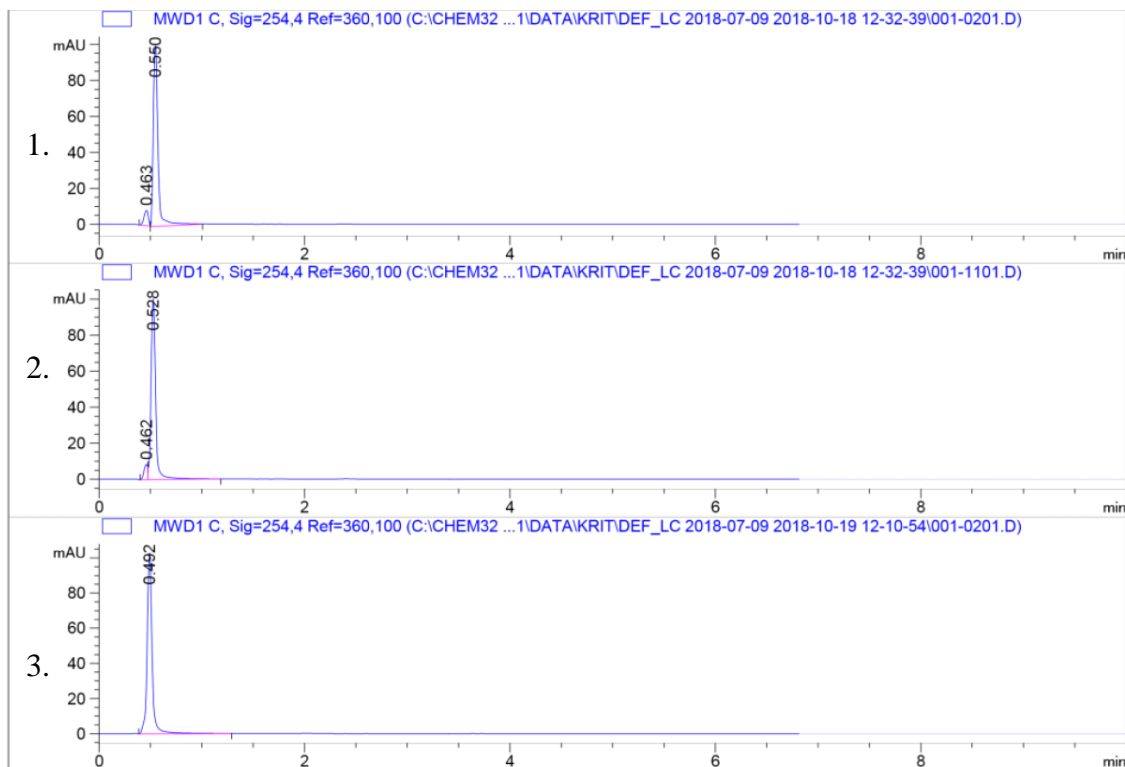
Joonis 20. Difenüülguanidiini kromatogrammide perfluoropinakooli lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



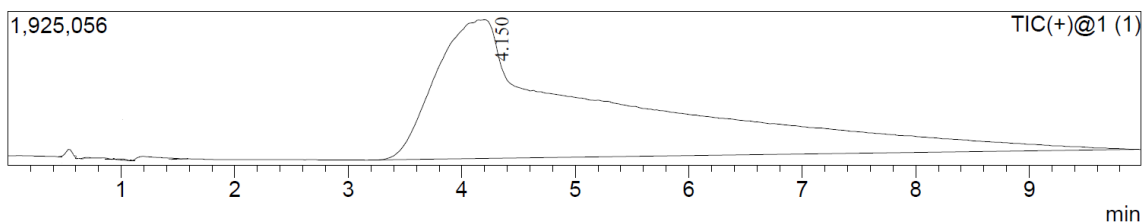
Joonis 21. Difenülguanidiini kromatogrammid nonafluoro-*tert*-butanooli lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



Joonis 22. 4-nitrobensoehappe kromatogrammid ammoniumatsetaadi lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



Joonis 23. 4-nitrobensoehappe kromatogrammid nonafluoro-*tert*-butanooli lisandiga (1. pH = 8,5; 2. pH = 9,0; 3. pH = 10,0) (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).



Joonis 24. 4-dimetüülaminopüridiini massispektromeetiline kromatogramm nonfluoro-*tert*-butanooli lisandiga pH = 8,5 (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Tabel 3. Mahtuvusfaktorid amooniumatsetaadi lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
										pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoe-hape	1,07	0,98	0,87	0,77	0,71	0,73	0,79	0,55	0,58	0,97	0,74	0,64	0,08	0,02	0,11
Fenool	5,18	5,17	4,39	4,25	4,10	4,16	3,87	3,12	3,21	4,91	4,17	3,40	0,37	0,06	0,34
3-nitroaniliin	5,74	5,71	4,88	4,86	4,72	4,81	5,8	4,7	4,9	5,45	4,80	5,3	0,40	0,06	0,5
4-dimetüül-aminopüridiin	0,31	0,59	0,34	0,34	0,69	*	20,9	23,7	23,4	0,41	0,51	22,7	0,12	0,17	1,2
Difenüül-guanidiin	10,0	16,5	14,3	18,3	28,3	27,1	55,5	*	64,6	13,6	24,6	60,0	2,7	4,5	4,5
4-kloroaniliin	13,9	13,8	12,0	12,00	13,82	11,75	13,8	11,6	11,9	13,2	11,75	12,4	0,9	0,20	1,0
1-naftüülamiin	35,6	35,0	30,7	31,1	29,3	30,5	35,0	30,1	30,7	33,7	30,3	31,9	2,2	0,8	2,2

*Mõõtmise ebaõnnestus

Tabel 4. Mahtuvusfaktorid ammooniumatsetaadi lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 10%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
										pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoe-hape	2,020	2,013	2,007	1,924	1,916	1,916	1,700	1,696	1,696	2,013	1,919	1,697	0,005	0,004	0,002

Tabel 5. Mahtuvusfaktorid perfluoropinakooli lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoehape	0,000	0,000	0,007	0	0	0	0,00	0,01	0,06	0,002	0,00	0,02	0,003	-	0,04
Fenool	3,1	3,1	4,0	3,96	3,93	3,81	2,804	2,800	2,793	3,4	3,90	2,799	0,4	0,07	0,004
3-nitroaniliin	3,5	3,5	4,4	4,47	4,44	4,36	4,557	4,559	4,563	3,8	4,42	4,559	0,4	0,05	0,003
4-dimetüülaminopüridiin	26,9	28,5	30,0	35,0	36,3	32,8	30,02	30,18	30,14	28,5	34,7	30,11	1,3	1,4	0,07
Difenüülguanidiin	512	611	594	586	583	465	345,8	349,2	348,3	572	545	347,8	43	57	1,4
4-kloroaniliin	8,3	8,4	10,4	11,28	11,15	10,92	11,085	11,115	11,083	9,0	11,11	11,094	1,0	0,15	0,015
1-naftüülamiin	23,0	23,1	28,3	30,3	30,1	28,6	29,27	29,33	29,27	24,8	29,7	29,29	2,5	0,8	0,03

Tabel 6. Mahtuvusfaktorid perfluoropinakooli lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 10%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoehape	0,0795	0,0795	0,0786	0,0487	0,0462	0,0462	0,0949	0,0923	0,0949	0,0786	0,0470	0,0940	0,0012	0,0012	0,0012

Tabel 7. Mahtuvusfaktorid nonafluoro-*tert*-butanooli lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 25%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
										pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoehape	0,202	0,174	0,106	0,148	0,150	0,143	0,070	0,072	0,074	0,191	0,147	0,072	0,012	0,003	0,002
Fenool	4,06	4,04	4,72	4,648	4,650	4,652	3,07	3,08	3,10	4,27	4,650	3,08	0,31	0,002	0,02
3-nitroaniliin	4,49	4,50	5,19	5,296	5,311	5,280	4,35	4,36	4,41	4,73	5,296	4,37	0,33	0,012	0,02
4-dimetüülaminopüridiin	5,69	6,20	6,37	15,55	15,85	16,21	25,52	25,61	25,99	6,09	15,87	25,71	0,29	0,27	0,21
Difenüülguanidiin	101	104	125	145,7	148,4	150,0	117,1	121,8	126,0	110	148,0	121,6	11	1,8	3,6
4-kloroaniliin	11,1	11,2	12,8	117,15	12,92	12,94	10,69	10,85	10,90	11,7	12,94	10,81	0,8	0,02	0,09
1-naftüülamiin	27,9	28,3	32,6	10,69	33,09	33,17	27,43	27,90	28,02	29,6	33,08	27,78	2,2	0,08	0,25

Tabel 8. Mahtuvusfaktorid nonafluoro-*tert*-butanooli lisandiga (metanooli sisaldus eluendis oli 10%).

Analüüt	pH = 8,5			pH = 9,0			pH = 10,0			Keskmine			Standarhälve		
										pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0	pH=8,5	pH=9,0	pH=10,0
4-nitrobensoehape	0,4457	0,4457	0,4478	0,246	0,228	0,215	0,1217	0,1217	0,1239	0,4464	0,230	0,1225	0,0010	0,012	0,0010

INFOLEHT

Perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butüülalkoholi kasutamine eluendilisanditena kõrgefektiivses vedelikkromatograafias

Töö eesmärk oli uurida kahe fluoroalkoholi kui eluendi lisandi – perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butanooli – mõju eri analüütide, nii aluseliste kui ka happeliste omadustega, retentsioonile pöördfaasvedelikkromatograafias ning võrrelda ammoniumatsetaadiga. Töös viidi läbi iga eluendilisandiga mõõtmised kolmel pH-l: 8,5; 9,0 ja 10,0. Töö tulemusena kirjeldati fluoroalkoholide mõju eri analüütidele ja võrreldes ammoniumatsetaadiga tulid välja fluoroalkoholidele omased erinevused.

Märksõnad: eluendi lisand, HPLC, fluoroalkohol, perfluoropinakool, NFTB

Perfluoropinacol and nonafluoro-*tert*-butanol as eluent additives in HPLC

The aim of this work was to study the effect of two fluoroalcohols (perfluoropinacol and nonafluoro-*tert*-butanol) as novel eluent additives on the retention of different analytes, both basic and acidic, in reversed-phase liquid chromatography and compare the results with ammonium acetate. Measurements were performed at three pHs 8,5; 9,0 and 10,0. As a result, the influence of fluoroalcohols for different analytes was described and compared to the results obtained with ammoniumacetate as conventional eluent additive.

Keywords: eluent additive, HPLC, fluoroalcohol, perfluoropinacol, NFTB

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Krit Lossmann

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Perfluoropinakooli ja nonafluoro-*tert*-butüülalkoholi kasutamine eluendiliseanditena kõrgefektiivses vedelikkromatograafias“,

mille juhendajad on Rūta Veigure, Karin Kipper, Ivo Leito,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu alates 01.06.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Krit Lossmann

29.05.2019