

## CAMERA SEPARATORIA

Volume 9, Number 2 / December 2017, pp. 106-130

**Marta GLINKA, Paulina NOWAK, Marian KAMIŃSKI\***

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk

Gdansk University of Technology, Chemical Faculty, Chemical and Process Engineering Department

\*Autor do korespondencji: [marian.kaminski@pg.edu.pl](mailto:marian.kaminski@pg.edu.pl)

### **Wpływ rodzaju kwaśnego dodatku do eluentu oraz właściwości fazy stacjonarnej na rozdzielanie średnio i nisko hydrofobowych kwaśnych organicznych związków chemicznych w odwróconych układach faz kolumnowej elucyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej - RP HPLC**

**Streszczenie:** Jedną z serii prac badawczych nad opracowaniem optymalnych warunków rozdzielania, identyfikacji i oznaczania względnie, średnio i nisko polarnych składników mieszanin organicznych związków chemicznych otrzymywanych z procesu konwersji biomasy lignocelulozowej, lub suszu roślinnego z wykorzystaniem wysokosprawnej kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) z elucją izokratyczną, a wówczas gdy okaże się to celowe - do otrzymywania składników w czystej postaci w skali procesowej. Rozdzielane są składniki ekstraktów roślinnych, powstałych w rezultacie ekstrakcji – ługowania metabolitów ze źródeł roślinnych, lub/i ługi powstałe w wyniku hydrolizy, albo fermentacji produktów hydrolizy bio-masy ligno-celulozowej (BMLC) w związku z wykorzystaniem BMLC, po hydrolizie, do otrzymywania ciekłych bądź gazowych biopaliw, szczególnie bio-wodoru, lub bioetanolu, w sprzężeniu z procesami bio-rafinacji.

Zbadano wpływ modyfikatora eluentu, takiego jak: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH i TFA, dla trzech wybranych faz stacjonarnych typu C18 na bazie żelu krzemionkowego różniących się charakterystyką powierzchni sorpcyjnej pod względem stopnia inaktywacji pozostałościowych grup hydroksylowych (OH) na powierzchni sorpcyjnej. Wykonane badania, których ważniejsze rezultaty prezentuje niniejsza praca, powinny ułatwić dobór optymalnego sorbentu oraz optymalnych warunków możliwie nisko – kosztowego rozdzielania oraz wydzielania w skali preparatywnej i być może, w przyszłości – w skali procesowej określonych składników, lub grup składników badanych i podobnych mieszanin, w procesach bio-rafinacji.

Rezultaty badań przedstawione w pracy wskazują, że optymalnym dodatkiem do eluentu spośród kwasów nieorganicznych, jest kwas ortofosforowy (pK<sub>a1</sub> = 2,16). Jednak jego zastosowanie ogranicza możliwość stosowania selektywnej detekcji w postaci spektrometrii mas (LC-MS). To może utrudniać wyodrębnienie określonych składników rozdzielanych mieszanin oraz odzysk wszystkich składników eluatu w skali preparatywnej lub procesowej. Natomiast, najkorzystniejszym modyfikatorem spośród lotnych kwasów organicznych, okazał się kwas mrówkowy (pK<sub>a</sub> = 3,75). Jednakże, kwas mrówkowy absorbuje promieniowanie UV do ok. 230nm, co uniemożliwia wykorzystanie w tym zakresie długości fali detektora typu UV-VIS-DAD do detekcji, identyfikacji oraz oznaczania związków chemicznych o charakterze alifatycznych kwasów karboksylowych, czy tego rodzaju hydroksy-kwasów karboksylowych, lub ich estrów, zawierających wyłącznie niearomatyczne struktury molekularne, które absorbują światło UV w tym samym zakresie, jak kwas mrówkowy.

**Słowa kluczowe:** Nisko i średnio hydrofobowe kwasowe związki organiczne; Rozdzielanie; Wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa z elucją izokratyczną; Układ faz odwróconych – RP-HPLC; Optymalny kwaśny dodatek do eluentu; Wpływ właściwości fazy stacjonarnej.

### **Influence of the type of acid addition to the eluent and properties of the stationary phase on the separation of medium and low-hydrophobic acid chemical compounds in reversed columnar elution systems of high-performance liquid chromatography - RP HPLC**

**Abstract:** One of a series of research works on the development of optimal conditions for the separation, identification and determination of relatively, medium and low-polar components of organic chemical compounds mixtures obtained from the conversion process of lignocellulosic biomass (BMLC), or vegetable drought using high-efficiency elution columnar liquid chromatography in reversed phase systems (RP-HPLC) with isocratic elution, and when it proves expedient - to obtain ingredients in a pure form on a process scale. Separated are the components of plant extracts

resulting from extraction - leaching of metabolites from plant sources, or / and lyes resulting from hydrolysis or fermentation of hydrolysis products of BMLC in connection with the use of BMLC, after hydrolysis, for obtaining liquid or gaseous biofuels, especially bio-hydrogen or bioethanol, in conjunction with bio-refining processes.

The effect of the eluent modifier, such as: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH and TFA, for three selected stationary phases of type C18 based on silica gel differing in the sorption surface characteristics in terms of the degree of inactivation of residual hydroxyl groups (OH) on the sorption surface.

The performed research, whose more important results are presented in this paper, should facilitate the selection of the optimal sorbent and optimal conditions of low-cost separation and separation on a preparative scale and possibly in the future on the process scale of specific components or groups of components tested and similar mixtures, bio-refining processes.

The results of the research presented in the paper indicate that the optimum addition to the eluent among inorganic acids is orthophosphoric acid (pKa1 = 2.16). However, its use limits the possibility of using selective detection in the form of mass spectrometry (LC-MS). This may hinder the separation of specific components of the separated mixtures and the recovery of all components of the eluate on a preparative or process scale. However, the most preferred modifier of volatile organic acids was formic acid (pKa = 3.75). However, formic acid absorbs UV radiation up to approx. 230nm, which makes it impossible to use the UV-VIS-DAD detector wavelength in this range for detection, identification and determination of aliphatic carboxylic acid compounds or such hydroxy-carboxylic acids, or their esters, containing only non-aromatic molecular structures that absorb UV light in the same range as formic acid.

**Key words** Low and medium hydrophobic acidic organic compounds; Separation; Reverse Phase High Performance Isocratic Elution Column Liquid Chromatography – RP-HPLC; Optimal acidic component of eluent; Stationary phase effect.

## 1. Wstęp (Introduction)

Celowość wykorzystania bogactwa cennych składników zawartych w materiałach roślinnych, w tym, o charakterze leków spowodowała i nadal wpływa na rozwój techniki i technologii rozdzielania. Wykorzystuje się różne techniki i metodyki rozdzielania. Jednak, w celu otrzymywania poszczególnych nietlotnych, lub nisko lotnych indywidualów z mieszanin o bogatym składzie szczególne znaczenie ma elucyjna kolumnowa chromatografia cieczowa (LC). W ostatnich latach coraz większe znaczenie zaczyna też odgrywać kolumnowa chromatografia z nadkrytycznym eluentem (SFC – *Super Fluid Chromatography*) w zastosowaniu rozdzielania i otrzymywania czystych, nisko i średnio polarnych związków chemicznych z mieszanin o bogatym składzie [1].

Ważnymi składnikami ekstraktów materiałów roślinnych oraz hydrolizatów chemicznych lub enzymatycznych biomasy lignocelulozowej (BMLC), szczególnie frakcji ligniny, są metabolity o kwasowym charakterze, do których m.in. zalicza się kwasy fenolowe, np., kwas trans-ferulowy, wanilinowy, czy kawowy i inne względnie polarne organiczne związki chemiczne, takie, jak tzw., nisko cząsteczkowe kwasy tłuszczowe, hydroksykwas karboksylowe itp. Znaczna ich część należy do grupy tzw. antyutleniaczy wykorzystywanych przy produkcji kosmetyków, suplementów diety, a także jako składniki leków, lub prekursorzy do ich wytwarzania. Dodatkowo, w wyniku hydrolitycznej bądź ekstrakcyjnej obróbki materiału roślinnego obok tychże związków chemicznych możliwe jest pozyskiwanie także innych, użytecznych organicznych związków chemicznych pochodzenia naturalnego, w tym, tzw. związków fenolowych, m.in. waniliny, stosowanej przede wszystkim w przemyśle spożywczym, jako główny składnik aromatów waniliowych, czy gwajakolu, wykorzystywanego jako środek wykrztuśny, a także, hydroksy-kwasów, jako suplementów diety, składników kosmetyków itp.

Różnice we właściwościach fizykochemicznych składników ekstraktów roślinnych, czy hydrolizatów są przyczyną wykorzystania do ich rozdzielania różnych w układach chromatograficznych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) – układów faz odwróconych (RP-HPLC), oddziaływań hydrofilowych (HILIC), bądź faz normalnych (NP-HPLC). Ostatni, szczególnie w przypadku rozdzielania składników stanowiących mieszaniny izomerów strukturalnych [2].

Rozdzielanie, identyfikacja i oznaczanie, czasem, otrzymywanie w postaci czystej określonych ilości niskolotnych składników lub grup składników wieloskładnikowych mieszanin związków organicznych pochodzenia naturalnego jest w ostatnich latach szczególnie często wykonywane z wykorzystaniem wysokosprawnej elucyjnej kolumnowej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC). Opracowanie optymalnych warunków rozdzielania w celu otrzymywania składników, lub grup składników takich mieszanin wymaga szczególnie wysokiej selektywności układu rozdzielczego, a następnie optymalnego wykorzystania zasad przenoszenia (powiększania) skali rozdzielania ze skali „modelowej” (często, analitycznej), do preparatywnej, czy procesowej [3].

W badaniach składu i wydzieleniu składników skomplikowanych mieszanin zawsze najważniejszy jest dobór jak najbardziej selektywnych warunków rozdzielania (maksymalizacja selektywności rozdzielania). Jednocześnie, korzystna jest wysoka sprawność rozdzielania – wysoka liczna półek teoretycznych kolumny (N). Wówczas, gdy składniki rozdzielanej mieszaniny charakteryzują się znacznym zakresem polarności /

hydrofobowości, stosuje się elucję gradientową w skali analitycznej lub semi-preparatywnej [1, 4-5]. Jednakże, nie jest to optymalne w skali procesowej rozdzielania takich mieszanin. Ze względów ekonomicznych w skali preparatywnej, a szczególnie, procesowej, celowe jest stosowanie elucji izokratycznej (o stałym składzie eluentu), ewentualnie elucji skokowej [6, 7].

Ostatnio, w przypadku rozdzielania bardzo skomplikowanych mieszanin techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w skali analitycznej i semi-preparatywnej, coraz częściej wykorzystuje się dwuwymiarowe rozdzielanie (2D), z elucją gradientową w pierwszym i drugim „wymiarze” rozdzielania [2, 4]. W skali procesowej wydaje się bardziej korzystne stosowanie elucji skokowej w I-szym oraz w drugim „wymiarze” rozdzielania.

Naturalne organiczne związki fenolowe i polifenolowe, w tym flawonoidy, zarówno glikozydy, jak i ich aglikony, są słabymi kwasami organicznymi. Ich rozdzielanie chromatograficzne w układach faz odwróconych (RP) wymaga zakwaszonego eluentu w celu „cofnięcia” kwasowej dysocjacji elektrolitycznej [2] (patrz - studium poniżej). W literaturze odnotowano, że podczas rozdzielania związków chemicznych z grupy flawonoidów, pH eluentu mieszczące się w zakresie od ok. 3 do 6 powodowało zwiększenie stopnia rozmycia pików chromatograficznych, spowodowane ich asymetrią. Natomiast, po zakwaszeniu eluentu do pH = 2,5÷3, uzyskano wyraźną poprawę rozdzielczości pików (R/Rs) [4].

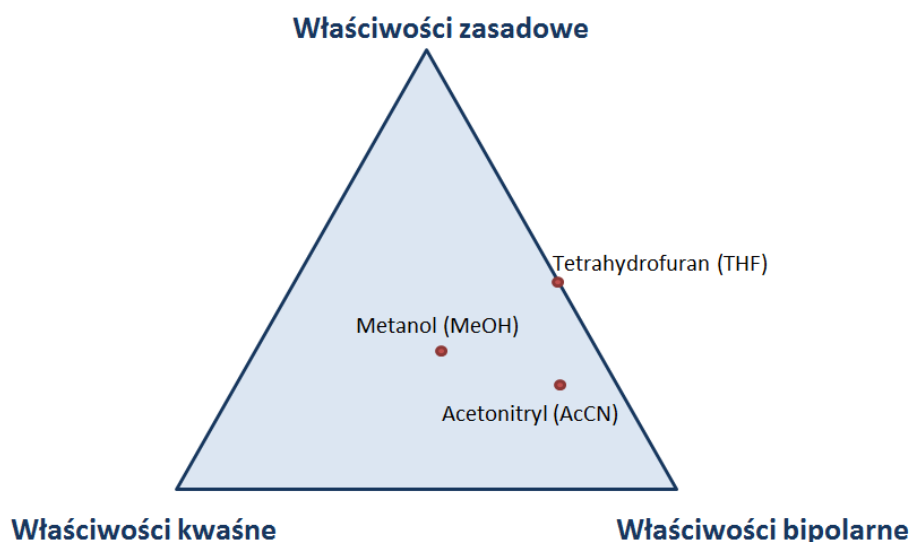
W literaturze panuje też opinia, że stosowanie programowania siły elucyjnej eluentu poprzez realizację rozdzielania w warunkach elucji gradientowej poprawia rozdzielczość pików [8-14]. Jest to jednak pozorny wzrost rozdzielczości. W warunkach stosowania elucji gradientowej ma miejsce pozorne zwężenie pików przy jednoczesnym istotnym zmniejszeniu „odległości” między pikami (zmniejszenie wartości oraz różnicy wartości objętości retencji).

Należy podkreślić, że elucja gradientowa jest celowa tylko z powodu dążenia do minimalizacji czasu rozdzielania w przypadku separacji mieszanin o składnikach różniących się znacznie powinowactwem sorpcyjnym. Natomiast, potencjalnie maksymalna selektywność rozdzielania jest możliwa do uzyskania tylko w warunkach elucji izokratycznej. Jedyny wyjątek stanowi rozdzielanie aminokwasów, peptydów i polipeptydów oraz innych podobnych organicznych związków chemicznych, które mogą jednocześnie wykazywać zjawisko elektrolitycznej dysocjacji kwasnej oraz zasadowej (tworzyć albo aniony, albo kationy, lub kationy po „sprotonowaniu”, jak ma to miejsce w przypadku aminokwasów i peptydów). Tak, więc, jedynie w przypadku rozdzielania aminokwasów, peptydów, czy białek w układach faz odwróconych (RP-HPLC), ma miejsce wzrost selektywności rozdzielania po zastosowaniu elucji gradientowej. Natomiast, w przypadku innych zadań rozdzielczych, elucja gradientowa zawsze wiąże się z obniżeniem selektywności ( $\alpha$ ) oraz rozdzielczości (R, lub Rs) w stosunku do warunków izokratycznych.

Interesującym rozwiązaniem zapewniającym maksymalizację selektywności i wysoki poziom ufności w zakresie identyfikacji rozdzielanych składników złożonych mieszanin jest wykorzystanie dwuwymiarowej chromatografii cieczowej w sprzężeniu z „dwuwymiarową” spektrometrią mas (LC x LC - MS/MS) w opcji RP-HPLC x HILIC [2,4]. Montenero i in. zaproponowali rozdzielanie związków fenolowych z ekstraktu z jabłek z wykorzystaniem w pierwszym wymiarze (HILIC) - kolumny Lichrospher Diol-5 (150 × 1.0 mm, 5  $\mu$ m) z programowanym składem eluentu, gdzie eluent (A) stanowiła mieszanina acetonitryl : kwas octowy (98:2 v/v), natomiast eluent (B) metanol : woda : kwas octowy (95:3:2 v/v/v). W drugim wymiarze wykorzystano (RP-HPLC) kolumnę chromatograficzną C18 (50 × 4.6 mm, 2.7  $\mu$ m). Przez pierwsze 25,4 min rozdzielania LC x LC zastosowano gradient elucji, z następującymi eluentami: woda + 0,1% kwasu mrówkowego (A) oraz acetonitryl (B). Następnie po 25,4 min rozdzielania eluent (A) pozostał ten sam, natomiast eluent (B) stanowiła mieszanina acetonitryl : metanol (1:1 v/v). W konsekwencji dokonano identyfikacji 65 związków chemicznych z grupy flawonoidów oraz kwasów fenolowych w badanym materiale. Jednak to rozwiązanie, może być zastosowane jedynie w skali analitycznej.

W ogólności, w odwróconych układach faz (RP HPLC), także, przypadku rozdzielania metabolitów roślinnych, czy kwasowych organicznych produktów hydrolizy BMLC, jako organiczny składnik eluentu, wykorzystuje się rozpuszczalny w wodzie i w rozcieńczonych roztworach buforowych metanol (MeOH), acetonitryl (AcCN), czasem tetrahydrofuran (THF), albo ich mieszaniny, jako organiczne składniki eluentu [15-17]. Bardzo rzadko można spotkać stosowanie jako dodatku do eluentu etanolu (powoduje tworzenie eluentu o bardzo wysokiej lepkości z wodą, albo tzw. wodnymi roztworami buforowymi), czy izopropanolu (tym wyższy wzrost lepkości eluentu), albo etoksy-etanolu (stosunkowo kosztowny i względnie bardzo hydrofobowy), czy acetonu, albo butanonu (absorbujących UV w szerokim zakresie i także względnie bardzo hydrofobowe).

Na rys. 1 przedstawiono schematycznie różnice we właściwościach najważniejszych rozpuszczalników, stosowanych jako organiczne dodatki do eluent w warunkach RP.



Rys. 1. Schemat przedstawiający właściwości rozpuszczalników, wykorzystywanych w układach faz odwróconych [18].  
Fig. 1. Diagram showing the properties of solvents used in reversed phase systems [18].

Tetrahydrofuran charakteryzuje się wśród nich najniższą polarnością oraz najwyższą siłą elucyjną, tzn., najwyższą wartością parametru  $P'$  wyznaczonego przez Snyder'a [19]. Parametr ten uwzględnia trzy główne składowe oddziaływań, tzn., właściwości protono-akceptorowe, protono-donorowe oraz dipolowe. Wartości siły elucyjnej typowych składników eluentu w odwróconych układach faz (RP) przedstawia się następująco: woda („W”,  $P' = 0$ ), metanol (MeOH,  $P' = 3$ ), acetonitryl (AcCN,  $P' = 3,1$ ), tetrahydrofuran (THF,  $P' = 4,4$ ) [19]. Większość organicznych produktów hydrolizy BMLC, a także istotna część roślinnych metabolitów wtórnych, to związki chemiczne o względnie niskiej hydrofobowości. Wówczas THF jest zbyt nisko polarny jako organiczny dodatek do eluentu. Dodatkowo, niekorzystny jest zakres absorpcji światła UV przez THF, spowodowany formowaniem się nadtlenków w kontakcie z powietrzem. To wiąże się z przesunięciem zakresu absorpcji światła UV od 220 nm dla świeżego THF, do zakresu długości fali, nawet wyższej od 250 nm. Jednocześnie, w miarę powstawania nadtlenków THF, ma miejsce zmiana wartości parametru  $P'$ . Dodatkowo, może mieć miejsce utlenianie składników rozdzielanej mieszaniny przez nadtlenki THF, które są, do tego, nisko lotne i mogą pozostawać po odparowaniu frakcji eluatu. W konsekwencji, nie jest celowe stosowanie THF jako dodatku do eluentu, zwłaszcza w preparatywnych zastosowaniach RP-HPLC!

Acetonitryl charakteryzuje się nieco niższą lepkością i nieco wyższą lotnością od metanolu. Przede wszystkim, mniej intensywny jest nieliniowy wzrost lepkości mieszaniny acetonitrylu i wody w miarę wzrostu zawartości acetonitrylu od mieszanin woda - alkohol. Maksimum lepkości ma w każdym przypadku miejsce dla zawartości wody na poziomie ok. 40 - 45% v/v. Przy czym, wartość maksimum lepkości mieszaniny woda - rozpuszczalny w wodzie organiczny składnik eluentu jest znacznie wyższa dla mieszaniny metanol - woda, a zwłaszcza etanol - woda, niż dla acetonitryl - woda. Np. lepkość dynamiczna ( $\eta_{AcCN/H_2O - 2/8, 25^\circ C}$ ) mieszaniny acetonitryl : woda 2:8 v/v wynosi w temperaturze 25 °C ok. 0,95 mPas. Natomiast w identycznych warunkach dla mieszaniny metanolu i wody ok. 1,4 mPas [20].

Nieco wyższa siła elucyjna acetonitrylu, niż metanolu, jest korzystna z punktu widzenia rozdzielania chromatograficznego średnio hydrofobowych związków organicznych. Jednak, dla nisko hydrofobowych - niekorzystna [14]. Hadad i współpracownicy stwierdzili w badaniach dotyczących rozdzielania związków chemicznych z grupy poli-fenoli w warunkach RP-HPLC i elucji izokratycznej, że acetonitryl obecny w eluencie w zawartości powyżej 13% v/v powoduje znaczny wzrost selektywności rozdzielania, a także zmniejszenie retencji średnio hydrofobowych składników mieszaniny względem metanolu jako organicznego składnika eluentu. Wzrost selektywności rozdzielania Autor tłumaczy ograniczeniem asymetrii pików. Jednakże, wątpliwości budzi brak zakwaszenia eluentu w tych badaniach [16]. Jest wysoce prawdopodobne, że po zakwaszeniu eluentu obserwowana poprawa selektywności mogłaby być znacznie mniej wyraźna.

Związki chemiczne rozdzielane w badaniach tej pracy charakteryzują się właściwościami słabych kwasów, ze względu na obecność w ich strukturze grup karboksylowych, a także, grup hydroksylowych o charakterze kwaśnym. Obniżając pH środowiska (fazy ruchomej) poprzez dodatek kwasu wpływa się na zmianę ich hydrofobowości w wyniku cofnięcia dysocjacji elektrolitycznej. Przy czym, niezależnie od tego ile protonów może odszczepiać kwas w wyniku dysocjacji elektrolitycznej, pod uwagę należy brać tylko I-szy stopień dysocjacji kwaśnej, który charakteryzuje się zawsze najwyższą wartością stałej równowagi kwaśnej dysocjacji każdego wieloprotonowego kwasu ( $K_{a1}$ ).

Równanie 1, przedstawia schematycznie reakcję pierwszego stopnia dysocjacji elektrolitycznej kwasu „x protonowego” w środowisku wodnym:



gdzie: HA – kwas w formie niezdysojowanej elektrolitycznie,  $H_3O^+$  - jon hydroniowy;  $A^-$  – anion reszty kwasowej pierwszego stopnia dysojacji elektrolitycznej kwasu x-protonowego.

Powyższe równanie opisuje pierwszy stopień dysojacji elektrolitycznej słabego kwasu. W przypadku słabych kwasów (tu – organicznych), dochodzi do ustalenia się równowagi między częścią zdysocjowaną a niezdysojowaną, opisaną stałą równowagi  $K_{a1}$  (równanie (2)). Wartość stałej równowagi nie zależy od pH roztworu (eluentu). Natomiast, pH eluentu wpływa na stopień dysojacji kwasu. Zbadanie lub obliczenie na drodze modelowania wartości stężeń indywidualnych chemicznych w równaniu 2 pozwala na wyznaczenie stałej równowagi elektrolitycznej pierwszego stopnia dysojacji kwasnej ( $K_{a1}$ ):

$$K_{a1} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]} \quad (2)$$

gdzie [ ] – molowe stężenie jonów / niezdysojowanych cząsteczek [ $mol/dm^3$ ].

Do opisanego w sposób „mocy kwasu” dla pierwszego stopnia dysojacji, wykorzystuje się parametr  $pK_{a1}$  (równanie 3), będący wartością ujemnego logarytmu ze stałej dysojacji.:

$$pK_{a1} = -\log[K_{a1}] \quad (3)$$

Wartości parametru  $pK_{a1}$  są stabilizowane dla bardzo wielu związków chemicznych o charakterze kwaśnym. Natomiast pH eluentu można obliczyć z zależności przedstawionej jako równanie 6 :

$$pH = -\log[H_3O^+] \quad (4)$$

Wprowadzenie jonów hydroniowych do wodnego roztworu względnie słabego kwasu będącego w stanie równowagi (wg równania nr 1), powoduje łączenie zdysocjowanych jonów w cząsteczki. W układach faz odwróconych ze względu na wykorzystywanie eluentów ze stosunkowo dużą ilością wody, czyli warunków sprzyjających dysojacji elektrolitycznej, jest szczególnie istotne ustalenie takiej wartości pH eluentu, by równowaga była ustalona „po stronie” niezdysojowanej postaci kwasu. Korzystnie wartość pH eluentu powinna być o co najmniej 0.5 jednostki pH niższa od minimalnej wartości  $pK_{a1}$  składników rozdzielanej mieszaniny, co zapewnia brak istnienia anionów  $A^-$ . Jony nie ulegają sorpcji na hydrofobowej powierzchni wypełnienia kolumny i są eluowane z objętością martwą kolumny, lub bardzo blisko objętości martwej, jeśli jony posiadają duże hydrofobowe fragmenty. Zwiększanie hydrofobowości rozdzielanych składników przez cofnięcie ich dysojacji powoduje wzrost retencji. Rodzaj kwasu zastosowanego do cofania dysojacji może też mieć wpływ na selektywność rozdzielania w warunkach odwróconych układów faz.

Należy podkreślić, że w przypadku rozdzielania organicznych względnie nisko hydrofobowych związków chemicznych w odwróconych układach faz, bardzo ważne znaczenie ma utrzymywanie określonych wartości pH eluentu (w celu „cofania” kwasnej dysojacji elektrolitycznej organicznych związków chemicznych o charakterze słabych kwasów). Rodzaj kwasu zastosowanego do cofania dysojacji elektrolitycznej może mieć, natomiast, istotny wpływ na selektywność rozdzielania organicznych związków chemicznych o charakterze kwaśnym. Na przykład, zastosowanie jako dodatku do eluentu mocnego kwasu tri-fluorooctowego (TFA), posiadającego w strukturze molekularnej bardzo hydrofobową grupę  $CF_3$ , powoduje cofnięcie dysojacji elektrolitycznej grup karboksylowych, podobnie, jak w przypadku dodatku do eluentu każdego innego mocnego kwasu, albo kwaśnego roztworu buforowego. Najprawdopodobniej powoduje, także, cofnięcie dysojacji elektrolitycznej grup  $-OH$  o kwasowym charakterze na powierzchni sorpcyjnej. Dodatkowo, w przypadku związków chemicznych posiadających ujemnie spolaryzowane grupy funkcyjne, np. grupę aminową, albo amidową, bądź heterocykliczny azot, w warunkach dostatecznie niskich wartości pH eluentu, może mieć miejsce protonowanie tych elementów cząsteczki, tym bardziej wyraźne, im niższe jest pH eluentu. Następnie, możliwa jest solwatacja jonami  $CF_3COO^-$  sprotonowanych fragmentów cząsteczek na zasadzie tworzenia par jonowych, co wiąże się ze wzrostem oddziaływań hydrofobowych solwatów na hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej adsorbentu, a także jednak, ze wzrostem oddziaływań hydrofobowych w przestrzeni eluentu. Efektem obniżenia pH eluentu oraz zwiększenia energii hydrofobowych oddziaływań na hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej powinien być wzrost retencji, a także, poprawa symetrii pików chromatograficznych. Jednakże, istnienie hydrofobowych oddziaływań TFA z hydrofobowymi fragmentami cząsteczek składników rozdzielanych mieszanin w przestrzeni eluentu, powinno wpływać z kolei na obniżenie retencji. Podobne, lecz słabsze oddziaływania powinny wykazywać aniony takich kwasów karboksylowych, jak octowy, czy mrówkowy, a już znacznie słabsze, takie aniony,  $H_2PO_4^{3-}$ , czy  $SO_4^{2-}$ , albo  $Cl^-$ .

Istotnym zagadnieniem przy doborze warunków chromatograficznych w odwróconych układach faz, oprócz składu eluentu, jest także charakterystyka fazy stacjonarnej. Zwłaszcza w przypadku rozdzielania

składników o względnie niskiej hydrofobowości, zalecane jest wykorzystywanie wypełnień kolumn o względnie wysokiej hydrofobowości powierzchni sorpcyjnej. Dotychczas najczęściej, szczególnie w zastosowaniach preparatywnych, czy procesowych, stosowany jest żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi („C18” / „RP18” / „ODS” – *Octa Decyl Siloxane*). Modyfikacja powierzchni porów na powierzchni żelu krzemionkowego ma najczęściej miejsce poprzez utworzenie kowalencyjnego wiązania siloksanowego grupy modyfikatora z grupami –Si-OH. Wówczas zakres pH powinien zostać ograniczony do przedziału od ok. 2.0 – 3.0 do ok. 8.5 – 9.0. Poza tym przedziałem może mieć miejsce hydroliza wiązań siloksanowych. Możliwa jest też modyfikacja powierzchni sorpcyjnej żelu krzemionkowego poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego -Si-C-. Wówczas zakres pH eluentu może być znacznie rozszerzony – od ok. 1 do ok. 10,5. Powyższe dotyczy stosowania temperatury do ok. 30 C. Powyżej tej temperatury zakres pH eluentu powinien zostać ograniczony niezależnie od sposobu związania aktywnych grup funkcyjnych z powierzchnią sorpcyjną żelu krzemionkowego.

Ze względów sterycznych - nie wszystkie grupy Si-OH na powierzchni ziaren i wewnątrz-ziarnowych porów żelu krzemionkowego mogą zostać zastąpione grupami C18, na drodze utworzenia kowalencyjnych połączeń siloksanowych, czy wiązań -Si-C-. Można „maskować” wolne grupy Si-OH na drodze metoksylicacji, tzn., tworzenia wiązań –Si-O-CH<sub>3</sub> (wykonywanie tzw. endcappingu). Wyróżnia się wypełnienia RP (zwłaszcza C18), z obecnością oraz bez „endcappingu” (tworzenia metylo-siloksanów w miejsce resztkowych grup funkcyjnych -Si-OH na powierzchni porów żelu krzemionkowego). Obecnie istnieją też sorbenty typu RP (szczególnie C18) - bez, albo z dodatkowym „alifatycznym „sieciovaniem” w rejonie powierzchni sorpcyjnej, powodującym przeszkody steryczne dostępu do resztkowych grup OH, lub do względnie nisko hydrofobowego metoksylovanego krzemu w miejscu grup OH. Takie przygotowanie powierzchni sorpcyjnej typu RP powoduje zwiększenie stopnia jej obsadzenia węglem i wzrost hydrofobowości fazy stacjonarnej.

Ograniczenie do minimum możliwości oddziaływania polarnych resztkowych grup -Si-OH z polarnymi fragmentami organicznych składników rozdzielanych mieszanin ma istotne znaczenie w warunkach odwróconych układów faz. Organiczne związki chemiczne posiadające w swojej strukturze molekularnej polarne grupy funkcyjne, mogą oddziaływać z względnie kwaśnymi „nieosłoniętymi” grupami hydroksylowymi, lub karboksylowymi, na powierzchni sorpcyjnej sorbentów typu RP, posiadających resztkowe grupy -Si-OH. Przy czym, sąsiedztwo struktur alifatycznych w pobliżu resztkowych grup –Si-OH, powoduje względny wzrost polarności oraz zwiększenie kwasowego charakteru grup –Si-OH. Względnie polarne resztkowe grupy -Si-OH mają wówczas istotny wpływ na zmianę mechanizmu podziału organicznych związków chemicznych zawierających polarne struktury między fazę stacjonarną i ruchomą. Może powodować asymetrię pików, a także, wpływać na zmianę selektywności rozdzielania w warunkach RP. Obecność aktywnych resztkowych grup hydroksylowych na hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej powoduje asymetrię pików organicznych związków chemicznych o charakterze kwasów organicznych, zwłaszcza w takich warunkach pH, gdy organiczne kwasowe związki chemiczne są częściowo elektrolitycznie zdysocjowane [10]. Należy dodać, że szczególnie silne oddziaływania mają wówczas miejsce z grupami funkcyjnymi o charakterze zasadowym.

Powyższe dotyczy porowatych kulistych sorbentów typu RP opartych na bazie żelu krzemionkowego syntetyzowanego w warunkach bezwodnych z fazy gazowej z wykorzystaniem lotnego chloro-di-metylo-oktadecylo-silanu. W przypadku wypełnień kolumn otrzymywanych z żelu krzemionkowego ze szkła wodnego ma miejsce dodatkowy problem obecności jonów metalu na powierzchni sorpcyjnej (-Si-O-Me, -Si-O-Me-O, lub -Si-O-Me-OH, szczególnie, -Si-O-Fe, -Si-O-FeO, lub -Si-O-Fe-OH). Nie jest możliwe „maskowanie” tego rodzaju struktur grupami hydrofobowymi w procesie „end-keepingu”. Wówczas może mieć miejsce silnie heterogeniczny charakter powierzchni sorpcyjnej typu RP, co prowadzi do szczególnie wyraźnej asymetrii pików organicznych związków chemicznych posiadających polarne struktury molekularne, o kwasowym, a zwłaszcza, o zasadowym charakterze.

W związku z tym, mimo znacznie niższej ciągle jeszcze ceny żelu krzemionkowego o nieregularnych ziarnach, wytwarzanego ze szkła wodnego, np. o nazwie LiChrosorb, albo LiChroprep, od kulistego żelu krzemionkowego, np. LiChrospher, czy Purospher, albo Spherisorb itp., obecnie w zastosowaniach w skali analitycznej, a także, semi-preparatywnej, stosowane są wyłącznie te ostatnie sorbenty nie zawierające metali na powierzchni sorpcyjnej. Także do rozdzielania w skali procesowej mieszanin związków chemicznych posiadających polarne struktury molekularne, coraz powszechniej są ostatnio wykorzystywane wypełnienia typu „...spher”, pozbawione obecności jonów metali na powierzchni sorpcyjnej.

Wśród sorbentów otrzymywanych ze szkła wodnego, wykorzystywanych obecnie już tylko w procesowej skali stosowania kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej - zależnie od producenta sorbentu - wyróżnia się wypełnienia z / bez „endcappingu”, a także, bez / z różnymi sposobami „maskowania” wolnych grup – Si-OH. Dzięki temu ma miejsce zmniejszenie (korzystnie, całkowita eliminacja) wpływu resztkowych grup –OH żelu krzemionkowego na powierzchni sorpcyjnej typu RP.

Eliminacja oddziaływań sorpcyjnych resztkowych grup hydroksylowych na powierzchni sorpcyjnej typu RP jest bardzo ważna, ponieważ związki chemiczne posiadające w swojej strukturze polarne grupy funkcyjne mogą oddziaływać nie tylko z polarnymi fragmentami cząsteczek eluentu, ale także z grupami hydroksylowymi na powierzchni sorbentu. Do tego, jak wspomniano powyżej, grupy –Si-OH usytuowane w

pobliżu hydrofobowych sorpcyjnych centrów aktywnych typu C18, lub większych łańcuchów, czy grup fenylowych, czy di-fenylowych, stają się względnie bardzo polarne, do tego stopnia, że może zachodzić ich dysocjacja elektrolityczna w kontakcie z wodą. Wówczas mogą one wykazywać właściwości kationo-wymienne, albo jonowo - wykluczające. Wpływa to na mechanizm podziału rozdzielanych składników między fazę stacjonarną i ruchomą oraz może mieć bardzo istotny wpływ na retencję i selektywność rozdzielania w warunkach RP HPLC, szczególnie wobec struktur molekularnych o charakterze kationowym, czy wyraźnie elektrostatycznie spolaryzowanych dodatnio. Szczególnie silna asymetria pików ma miejsce – jak wspomniano - w obecności aktywnych resztkowych grup hydroksylowych na hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej w przypadku elucji zasad organicznych!

Należy też dodać, że ze względu na wysoki koszt materiału wypełnienia typu HPLC w przypadku kolumny HPLC w skali procesowej, wykorzystuje się jeszcze często - i najprawdopodobniej długo jeszcze będą wykorzystywane - sorbenty o nieregularnym kształcie ziaren, na bazie żelu krzemionkowego otrzymywanego ze „szkła wodnego”, jednak, całkowicie pozbawionego możliwości oddziaływania jonów metali na powierzchni sorpcyjnej z polarnymi grupami funkcyjnymi rozdzielanych związków chemicznych.

Wówczas, gdy ze względów ekonomicznych nie jest celowa całkowita eliminacja, zwłaszcza kationów żelaza +3, ze struktury powierzchni sorpcyjnej, powinny one zostać w sposób trwały „skompleksowane” za pomocą „kompleksu” o hydrofobowej strukturze grupy funkcyjnej oddziaływującej ze składnikami rozdzielanej mieszaniny i składnikami eluentu. Najczęściej dokonują tego renomowani producenci wypełnień takich kolumn dla skali procesowej. Wówczas gdy tego typu „endkeeping” nie został wykonany, to - szczególnie w przypadku rozdzielania organicznych związków chemicznych posiadających polarne struktury o charakterze donorów pary elektronowej w obecności wody w eluencie - może mieć miejsce polarna heterogeniczna adsorpcja na zasadowych kationo-metalicznych centrach aktywnych, skutkująca bardzo silną asymetrią pików chromatograficznych po stronie zstępującej, i w konsekwencji - szczególnie niska selektywność rozdzielania. Jednakże ten efekt można zminimalizować, albo wyeliminować dodając niewielką zawartość kompleksonu do eluentu.

Opisane powyżej zasady postępowania można zastosować do rozdzielania, identyfikacji i oznaczania, a także, do ewentualnego otrzymywania składników mieszanin organicznych związków chemicznych powstających w rezultacie hydrolizy biomasy ligno-celulozowej (BMLC) oraz w tzw. procesach bio-rafinacji. Bio-rafinerie, to wytwórnie bazujące na maksymalizacji stopnia przetwarzania biomasy ligno-celulozowej, która jest w części wykorzystywana do wytwarzania biopaliwa (w tym, bio-wodoru), a w części do otrzymywania użytecznych produktów dodatkowych w postaci organicznych związków chemicznych, składników hydrolizatów, szczególnie ligniny, a także, części produktów hydrolizy hemicelulozy. Zużycie energii można rekompensować poprzez spalanie otrzymanej frakcji bio-paliwowej, lub innego rodzaju biomasy, albo, pozostałości biomasy, zwłaszcza części nieprzydatnej do produkcji [21].

W procesach bio-rafineryjnych otrzymywane są głównie organiczne chemiczne związki poli-fenolowe należące do słabych kwasów organicznych, a także bardziej kwaśne związki organiczne o charakterze hydroksykwasów i niektóre kwasy karboksylowe. Do ich rozdzielania chromatograficznego oraz oznaczania wykorzystuje się dotychczas przede wszystkim układy faz odwróconych (RP) oraz zakwaszony eluent [2, 4], powodujący cofnięcie dysocjacji elektrolitycznej kwasowych składników rozdzielanej mieszaniny w eluencie oraz wzrost hydrofobowości, zależny od rodzaju kwasu zastosowanego jako dodatek do eluentu.

Wykorzystuje się często, dodatkowo, selektywne warunki detekcji. Jedną z możliwości jest stosowanie detekcji spektrofotometrycznej w zakresie nadfioletu oraz światła widzialnego (UV-VIS), zwłaszcza z zastosowaniem detektora z tablicą fotoelementów (typu DAD – *Diode Array Detection*) oraz wykorzystanie widm w zakresie UV-VIS do identyfikacji związków chemicznych. Ostatnio, coraz częściej wykorzystuje się sprzężenie LC-MS lub LC-MS-MS w celu identyfikacji składników mieszaniny [13].

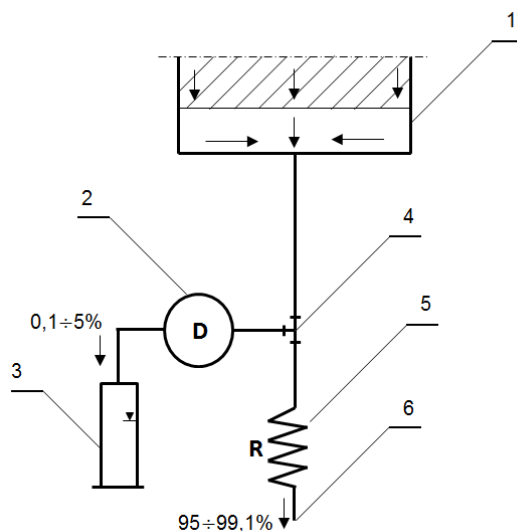
Wówczas, gdy celem rozdzielania jest otrzymywanie wybranych składników złożonych mieszanin z zastosowaniem chromatografii cieczowej w skali preparatywnej, a szczególnie - procesowej oraz z wykorzystaniem eluentów zawierających względnie kosztowne organiczne składniki o wysokiej czystości, takie np., jak AcCN, czy MeOH - w odwróconych układach faz, wtedy, korzystne jest też stosowanie niektórych innych zasad postępowania od stosowanych w skali analitycznej [3, 22, 23].

Między innymi ze względów ekonomicznych bardzo ważne znaczenie posiada wysoki stopień odzysku organicznych składników eluentu [3, 23]. W tym celu, korzystne jest stosowanie elucji izokratycznej, albo, stopniowej, a unikanie elucji gradientowej. Wtedy można bezpośrednio zwracać do procesu rozdzielania eluent stanowiący rozpuszczalnik rozdzielanych składników zawartych w kolekcjonowanych frakcjach eluatu - po odparowaniu i ponownym skropleniu. W przypadku stosowania elucji gradientowej, otrzymywane są frakcje eluatu o zmiennym składzie eluentu. Wówczas otrzymywanie składników eluentu w postaci czystej wymaga zastosowania operacji rektyfikacji, co jest znacznie bardziej energochłonne oraz kosztowne niż zwykłe odparowanie i kondensacja eluentu o stałym składzie.

Czasem należy też unikać naświetlania eluatu światłem UV o niskiej wartości długości fali z lampy deuterowej. To może powodować reakcje chemiczne w roztworze kolekcjonowanym, spowodowane działaniem światła nadfioletowego, w tym szczególnie, wolno-rodnikowe utlenianie rozdzielanych składników tlenem z powietrza, rozpuszczonym w eluencie. Wówczas korzystne jest umieszczenie systemu detekcji na boczniku i kolekcja tylko tej części eluatu, która omija detektor, jak to zilustrowano na rys. 1. Ma to

zastosowanie nie tylko przypadku potrzeby stosowania detektora UV z lampą deuterową, a także przy użyciu każdego detektora o charakterze destrukcyjnym, w tym detekcji LC-MS, Umożliwia to wyodrębnianie składników mieszaniny zawartych we frakcjach eluatu, kierowanych do kolektora frakcji, z jednoczesną kontrolą ich składu (czystości) za pomocą destrukcyjnego detektora umieszczonego na boczniku, przez który przepływa tylko niewielka część eluatu, tym mniejsza im wyższa jest skala rozdzielania (im większa średnica kolumny (dc).

W warunkach stosowania kolumny chromatograficznej o zwiększonej średnicy ważne znaczenie ma także równomierne rozprowadzanie oraz równomierna kolekcja frakcji na / z całej powierzchni wypełnienia kolumny, jak to w sposób poglądowy naszkicowano na rys. 1.



Rys. 2. Schemat ideowy detekcji bocznikowej na wylocie preparatywnej / procesowej kolumny chromatograficznej w warunkach preparatywnego rozdzielania i kolekcji frakcji, z zachowaniem zasady kierowania do kolektora frakcji tylko eluatu omijającego detektor / układ detektorów. Oznaczenia: 1 – wylot z kolumny preparatywnej, 2 – detektor / układ detektorów umieszczony na boczniku, 3 – naczynie na ścieki, 4 – trójnik, 5 – restryktor kapilarny zapewniający określoną wartość podziału strumieni oraz jednakowy czas przepływu między 4-D oraz 4-6, 6 – wlot do kolektora frakcji.

Fig. 2. Schematic diagram of bypass detection in preparative / proces scale separation and fractions collection with bypassing only the small part of effluent to the detector and the same time flow between points 4-6 and 4-2; Marking: 1 - outlet from the preparative/process column, 2 - detector / detector's system placed on the bypass, 3 - vessel for sewage from detector / detector's system, 4 - T-connector, 5 (R) – capillary (restrictor) ensuring a certain value of stream splitting, 6 - inlet to the fraction collector.

Na rys. 2. Pokazano, że w zależności od skali rozdzielania (w zależności od średnicy kolumny preparatywnej / procesowej), przez detektor przepływa od 5-ciu do 0,1% objętościowych eluatu, który jest usuwany do ścieku. Natomiast, główna część eluatu omija detektor i jest bezpośrednio kierowana do kolektora frakcji. Przy tym ważne są takie warunki użytkowania układu według rys. 1, aby sygnał w detektorze D (2) powstawał w tym samym momencie, w którym ma miejsce wlot odpowiedniej frakcji eluatu do kolektora frakcji (6). Uzyskuje się to dzięki doborowi oporu hydraulicznego oraz objętości „restryktora” (R) – element (5) na rys. 2 [3, 7]. Detektor / detektory znajdujące się w „systemie detekcyjnym” to w skali semi-preparatywnej / preparatywnej najczęściej zwykle detektory użytkowane w skali analitycznej HPLC. Natomiast, w skali procesowej, a także niekiedy - w skali preparatywnej, stosuje się detektor UV-VIS o obniżonej czułości poprzez zmniejszenie drogi optycznej w kuwecie przepływowej detektora z 10-ciu / 5-ciu mm, do 1 mm, a nawet do 0.2 mm.

Niniejsza praca jest pierwszą serią, dotyczących opracowania optymalnych warunków rozdzielania w warunkach odwróconych układów faz (RP-HPLC), z eluentem o stałym składzie (w warunkach izokratycznych) względnie nisko, lub średnio hydrofobowych, tzn., względnie polarnych, lub średnio polarnych składników naturalnych mieszanin o charakterze hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej, czy brzeczek fermentacyjnych różnego typu, szczególnie, składników płynów procesowych związanych z wytwarzaniem ciekłych lub gazowych biopaliw, zwłaszcza bio-wodoru, a także, składników ekstraktów, zwłaszcza ze źródeł roślinnych, zawierających metabolity roślinne i inne.

Badania niniejszej pracy dotyczą warunków odwróconych układów faz (RP) i rozdzielania składników mieszanin wzorcowych w warunkach izokratycznych z zastosowaniem analitycznych kolumn HPLC, tzn., w warunkach „modelowych” dla rozdzielania w skali preparatywnej lub procesowej [3, 24]. Są realizowane z myślą o opracowaniu optymalnych zasad, a w przyszłości – optymalnych procedur - rozdzielania identyfikacji, oznaczania oraz otrzymywania w warunkach RP-HPLC wybranych składników



wieloskładnikowych mieszanin organicznych związków chemicznych, powstałych w rezultacie hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej, albo w procesach fermentacji drożdżowej, lub bakteryjnej, albo z ekstraktów roślinnych.

W przyszłości przewidujemy podobne badania w warunkach oddziaływań hydrofilowych (HILIC), w warunkach dynamicznie generowanej lipofilowo – hydrofilowej fazy stacjonarnej (NP-w) [7], a także w warunkach wykluczania jonowego (IExcl) i/lub jonowymiennych – szczególnie w przypadku badań produktów kwaśnej, czy enzymatycznej hydrolizy BMLC.

Zastosowanie w praktyce wyników tych badań powinno zapewnić możliwość opracowania procedur wyodrębniania w skali semi-preparatywnej, lub preparatywnej wszystkich składników w/w mieszanin pod kontrolą detekcji UV-VIS-DAD / MS / LLS, z detektorami umieszczonymi w sposób boczny, jak na rys 1. To w pierwszej kolejności powinno umożliwić ich identyfikację takimi technikami „uzupełniającymi”, jak: absorpcja w zakresie średniej podczerwieni z transformacją Fouriera (MIR-FTIR), spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR, spektrometria fluorescencji rentgenowskiej (XRF), spektrometria absorpcji atomowej (AAS) i innymi technikami. Powinno zapewnić możliwość jednoznacznej identyfikacji wszystkich składników hydrolizatów BMLC z różnego typu surowców. Dać dodatkowe informacje dla optymalizacji warunków rozdzielania ekstraktów roślinnych. Przede wszystkim, pomóc w opracowaniu procedur otrzymywania standardów analitycznych składników hydrolizatów różnego rodzaju BMLC, powstających w rezultacie alkalicznej, lub enzymatycznej hydrolizy w warunkach „zachowawczych”, tzn., bez dodatkowego utleniania, gdy powstają liczne różne produkty, albo tychże, otrzymywanych w warunkach zastosowania dodatkowego utleniania, gdy liczba powstających „produktów” (organicznych związków chemicznych), jest znacznie wyższa.

Opracowane w ten sposób zasady postępowania separacyjnego powinny w dalszej przyszłości umożliwić projektowanie optymalnych warunków wykorzystania dwu-, lub wyżej wymiarowej sorpcji – desorpcji oraz elucyjnej kolumnowej chromatografii cieczowej (2D / nD) do rozdzielania, identyfikacji oraz otrzymywania wszystkich związków chemicznych - produktów hydrolizy lub fermentacji w procesach bio-rafinacji [8], a także wszystkich składników roślinnych ekstraktów. Przy czym, w przypadku obecności peptydów i białek konieczne będzie „włączenie” elektroforezy żelowej (GE) do procedur rozdzielania.

## 2. Część eksperymentalna (*Experimental part*)

### 2.1. Materiały (*Materials*)

Do badań wykorzystano:

- acetonitryl (AcCN) (cz.d.a. HPLC, Merck, Niemcy),
- wodę demineralizowaną,
- kwas siarkowy (VI) min. 96% (czda, POCH, Polska),
- kwas octowy min. 99,5% (czda, Zakłady Chemiczne Oświęcim, Polska),
- kwas trifluoroctowy (TFA) min. 99% (czda, SIGMA-ALDRICH, USA),
- kwas solny 35 – 38% (czda, POCH, Polska),
- kwas ortofosforowy 85% (czda, P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice, Polska),
- kwas mrówkowy min. 99% (czda, AnalR NORMAPUR, Francja).

**Tabela 1.** Skład mieszaniny wzorcowej nr 1.

**Table 1.** Composition of reference mixture No. 1.

Lp. (No.)	Nazwa substancji (Name of the substance)	Stężenie (mg na ml AcCN:woda 3:7 v/v) (Concentration (mg per ml AcCN: water 3: 7 v / v))	Producent (Manufacturer)	Czystość (Purity)
1	Kwercetyna	0,2	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
2	Mirycecyta	0,1	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
3	Kwas 4- hydroksybenzoesowy	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
4	Kwas wanilinowy	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
5	Wanilina	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
6	Kwas trans-ferulowy	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
7	Kwas kawowy	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
8	Kwas 3,4- dihydroksybenzoesowy	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
9	Gwajakol	1	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda

10	2,6-dimetoksyfenol	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda
11	1,2-dihydroksybenzen	0,4	SIGMA-ALDRICH (Niemcy)	Czda

**Tabela 2.** Skład mieszaniny wzorcowej nr 2.

**Table 2.** Composition of reference mixture No. 2.

Lp. (No.)	Nazwa substancji (Name of the substance)	Stężenie (mg na ml AcCN:woda 3:7 v/v) (Concentration (mg per ml AcCN: water 3: 7 v / v))	Producent (Manufacturer)	Czystość (Purity)
1	Kwas 4- hydroksybenzoesowy	0,5	MERCK (Niemcy)	Czda
2	p-hydroksy-benzoesan metylu	0,5	MERCK (Niemcy)	Czda

W badaniach posłużono się następującymi mieszaninami eluentów:

- 1) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v)
- 2) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + HCl (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 3) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 4) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 5) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + HCOOH (2 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 6) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + CH<sub>3</sub>COOH (1 ml/L eluentu, pH = 3,5)
- 7) AcCN : H<sub>2</sub>O (2:8 v/v) + TFA (0,5 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 8) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v)
- 9) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + HCl (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 10) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 11) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 12) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + HCOOH (2 ml/L eluentu, pH = 2,5)
- 13) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + CH<sub>3</sub>COOH (1 ml/L eluentu, pH = 3,5)
- 14) AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + TFA (0,5 ml/L eluentu, pH = 2,5)

Roztwory eluentów zostały sporządzone jako 'pre-mix'.

## 2.2. Aparatura i wyposażenie (Apparatus and equipment)

W badaniach wykorzystano gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia), wyposażony w pompę L-6200, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i – Hamilton USA, detektor UV-VIS DAD L-7450A (Merck HITACHI, Niemcy - Japonia) i kolejno, detektor refraktometrycznego Smartline 2300 (Knauer - Niemcy). Sygnał z obu detektorów przekazywany za pośrednictwem interface D-6000 o komputera z oprogramowaniem HSM-7000, wersja 3.1.1. Dodatkowo, aparat został wyposażony w sześciodrogowy, dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy) do zmiany kierunku przepływu eluentu w kolumnie („backflush”), stosowany w celu elucji składników wykazujących nadmiernie wysokie wartości objętości elucji w warunkach stosowanego eluentu.

Użyto następujących kolumn chromatograficznych:

- Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 3 μm) Phenomenex (USA) (nowoczesny sorbent z „endkeeping’iem” oraz alifatycznym usieciowaniem w pobliżu powierzchni sorpcyjnej),
- MERCK (Niemcy) – LiChroCART (250 x 4 mm, 5 μm) LiChrospher C18e (sorbent z „endkeeping’iem”, bez alifatycznego usieciowania w pobliżu powierzchni sorpcyjnej),
- MERCK – LiChroCART (250 x 4 mm, 5 μm) LiChrospher C18(sorbent bez „endkeeping’u” i bez alifatycznego usieciowania w pobliżu powierzchni sorpcyjnej).

## 2.3. Metodyka (Methods)

Przygotowano mieszaninę substancji wzorcowych, o stężeniach wymienionych w tabeli 1 oraz w tabeli 2. Wzorce rozpuszczano w mieszaninie AcCN : woda 3:7 v/v. Dodatkowo przygotowano próbki pojedynczych wzorców – do weryfikacji kolejności elucji składników w mieszaninie. Probki dozowano z wykorzystaniem automatycznego podajnika próbek. Objętość dozowania wynosiła 4 μl (dla kolumn o wielkości ziarna 5 μm) bądź 2 μl (dla kolumny o średnicy ziarna równej 3 μm). Natężenie przepływu eluentu wynosiło 1.0 mL/min. Detekcję prowadzono z zastosowaniem detektora UV-VIS DAD przy długości fali równej 280 nm (umożliwiającej identyfikację wszystkich składników rozdzielanej mieszaniny). Parametry chromatograficzne wyznaczono z wykorzystaniem oprogramowania HSM.

### 3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Badania obejmowały wpływ składu eluentu i rodzaju kwasu na parametry retencji, selektywność oraz na sprawność rozdzielania, w tym, na symetrię uzyskanych pików, dla eluentów o zróżnicowanej sile elucyjnej, z wykorzystaniem kolumn RP typu C18 o różnych charakterystykach powierzchni sorpcyjnej.

Rozdzielano mieszaniny organicznych związków chemicznych o niskiej i średniej hydrofobowości, o charakterze słabych kwasów.

Uwzględniono trzy rodzaje fazy stacjonarnej typu C18, bazującej na żelu krzemionkowym. Przy czym, w badaniach zastosowano trzy różne fazy stacjonarne różniące się stopniem eliminacji wpływu resztkowych grup OH na hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej na warunki sorpcji składników rozdzielanej mieszaniny / składników eluentu.

W tabeli 3 zestawiono parametry kolumn chromatograficznych oraz ich wypełnień, użytych w badaniach wg malejącej hydrofobowości. Jak widać, użyte sorbenty różnią się ze względu na powierzchnię właściwą, procent pokrycia węglem oraz zakres „użytkowy” pH.

**Tabela 3.** Zestawienie podstawowych parametrów kolumn chromatograficznych użytych w badaniach.

**Table 3.** List of basic parameters of chromatographic columns used in the research.

Lp	Faza stacjonarna (Stationary phase)	Endcapping/ Usieciowanie (Endcapping / Cross-linking)	Długość kolumny x średnica wewnętrzna (Column length x internal diameter)	Rozmiar cząstek (Particle size)	Rozmiar porów (Pore size)	Powierzchnia właściwa (Specific surface)	Procent pokrycia węglem (Percent age of carbon coating)	Zakres pH (pH range)
1.	Luna C-18( 2)	Tak/Tak	150 x 4,6 mm	3 µm	100 Å	440 m <sup>2</sup> /g	19%	1,5 – 10
2.	LiChrospher RP-18e	Tak/Nie	250 x 4 mm	5 µm	100 Å	350 m <sup>2</sup> /g	21,6%	2 – 7,5
3.	LiChrospher RP-18	Nie/Nie	250 x 4 mm	5 µm	100 Å	350 m <sup>2</sup> /g	21%	2 – 7,5

Tabela 4, zawiera spis rozdzielanych substancji wzorcowych wraz z ich kwasowością (pKa) oraz wartością logP, czyli parametru charakteryzującego w sposób ogólny hydrofobowość składników rozdzielanej mieszaniny, jako wartość współczynnika podziału (P) - n-oktanol / woda. Wartość P jest miarą hydrofobowości danego związku chemicznego (równanie 1).

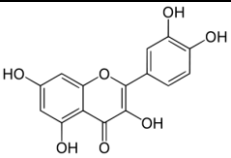
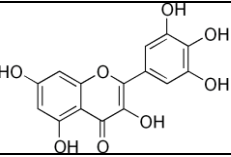
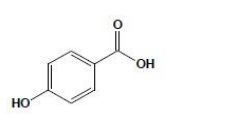
$$P = \frac{C_{\text{oktanol}}}{C_{\text{woda}}}, \quad (5)$$

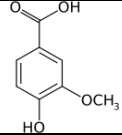
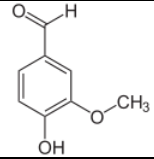
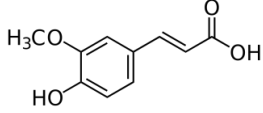
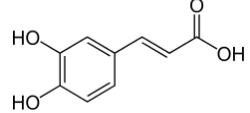
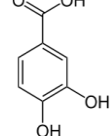
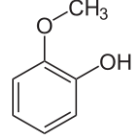
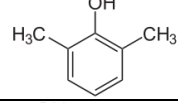
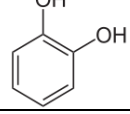
$$\log P = \log C_{\text{oktanol}} - \log C_{\text{woda}} \quad (6)$$

gdzie: P – współczynnik podziału n-oktanol/woda; C<sub>oktanol</sub> – stężenie molowe substancji chemicznej w oktanolu (mol/dm<sup>3</sup>); C<sub>woda</sub> – stężenie molowe substancji chemicznej w wodzie – w stanie równowagi.

**Tabela 4.** Zestawienie wartości pKa, logP oraz struktur molekularnych związków chemicznych wchodzących w skład badanej mieszaniny.

**Table 4.** List of pKa, logP values and molecular structures of chemical compounds included in the tested mixture.

Lp. (No.)	Nazwa substancji (Substance name)	pKa	logP	Wzór strukturalny (Structural formula)
1	Kwercetyna	pKa(1) -OH w pozycji C-3 wynosi 5, dla innych grup -OH przy pierścieniach A i B wynosi 10	2,08	
2	Mirycetyna	pKa(1) 6,43, dla innych grup -OH przy pierścieniach A i B wynosi 10	2,11	
3	Kwas 4-hydroksybenzoesowy	4,48	1,42	

4	Kwas wanilinowy	4,45	1,33	
5	Wanilina	7,78	1,19	
6	Kwas trans-ferulowy	pKa(1) = 4,5 pKa(2) = 8,7	1,64	
7	Kwas kawowy	4,62	1,42	
8	Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy	4,48	1,16	
9	Gwajakol	9,98	1,19	
10	2,6-dimetoksyfenol	10,59	2,36	
11	1,2-dihydroksybenzen	9,48	0,88	

Zastosowane do badań związki chemiczne, stanowią główne składniki hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej (BMLC), które jednocześnie są cennymi składnikami ze względu na możliwość ich przemysłowego wykorzystania. Z punktu widzenia właściwości fizykochemicznych, związki chemiczne charakteryzujące się wartością  $\log P < 1$  określane są jako związki hydrofilowe (np., 1,2-dihydroksybenzen). Natomiast przy wartości  $\log P > 3$ , mówimy o związkach chemicznych silnie hydrofobowych. Związki chemiczne o średniej hydrofobowości charakteryzują się wartością  $\log P$  mieszczącą się w zakresie  $1 < \log P < 3$  (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, wanilina, gwajakol, kwas wanilinowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy, kwas kawowy, kwas trans-ferulowy kwercetyna, mirycetyna, 2,6-dimetoksyfenol).

Tabela 5 zawiera spis kwaśnych modyfikatorów eluentów, które wykorzystano do obniżenia pH fazy ruchomej. W badaniach wykorzystano zarówno kwasy nieorganiczne (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), jak i organiczne (HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH, CF<sub>3</sub>COOH). Jak wspomniano w części eksperymentalnej, pH eluentów wynosiło 2,5, z wyjątkiem kwasu octowego, którego pH ze względu na niską kwasowość wynosiło 3,5.

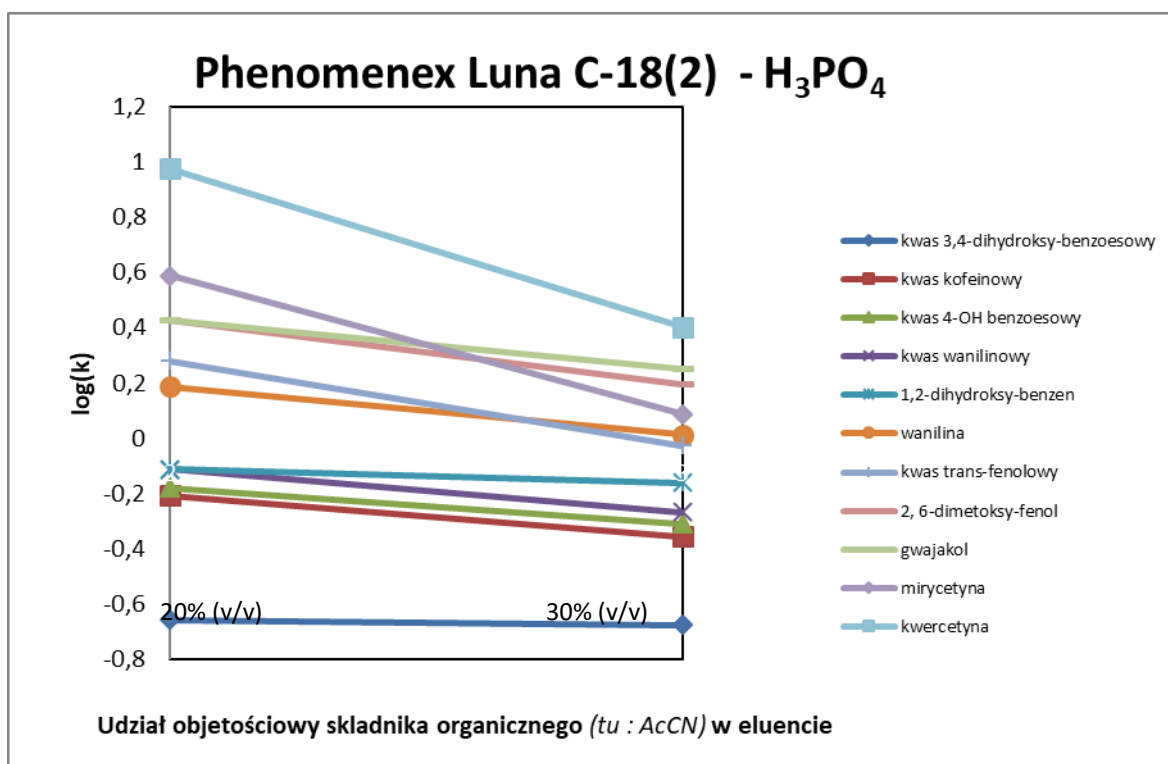
**Tabela 5.** Zestawienie modyfikatorów eluentu wykorzystanych w badaniach wraz z wartościami pKa i logP.  
**Table 5.** Comparison of the eluent modifiers used in the studies together with pKa and logP values.

Lp. (No.)	Nazwa kwasu (The name of the acid)	pKa	logP
1	Kwas solny	-8	0,00
2	Kwas siarkowy (VI)	1,99	-1,03
3	Kwas ortofosforowy	2,16	-2,15
4	Kwas mrówkowy	3,75	-0,54
5	Kwas octowy	4,76	-0,17
6	Kwas trifluoroctowy (TFA)	0,52	1,24

Istotną informacją, którą przyniosły wykonane badania są różnice w kolejności elucji rozdzielanych składników mieszaniny w zależności o udziału objętościowego organicznego składnika w eluencie. Mianowicie, gdy zastosowano eluent AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v, kolejność pików chromatograficznych prezentuje

się następująco: kwas 3,4 dihydroksybenzoesowy, kwas kawowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy, kwas wanilinowy, 1,2 dihydroksybenzen, wanilina, kwas trans-ferulowy, 2,6 dimetoksyfenol, gwajakol, mirycetyna, kwercetyna. Natomiast, z wykorzystaniem eluentu AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 v/v, zaobserwowano zmiany w kolejności elucji po piątym pik, mianowicie, po 1,2 dihydroksybenzenie kolejny pik pochodził od kwasu trans-ferulowego, później waniliny, mirycetyny, 2,6 dimetoksyfenolu, gwajakolu i kwercetyny. Zwiększenie zawartości wody w eluencie w warunkach układów odwróconych faz powoduje wzrost tendencji eluentu do eliminacji z jego przestrzeni hydrofobowych fragmentów molekuł, co wpływa na tym większy wzrost retencji składników rozdzielanej mieszaniny, im wyższa jest wartość log P. tzn., im wyższa jest różnica energii pozytywnej solwatacji powierzchni fazy stacjonarnej oraz negatywnych oddziaływań z hydrofobowymi fragmentami molekuł w fazie ruchomej.

W celu uwidocznienia tych zmian sporządzono wykresy zależności logarytmu z wartości współczynnika retencji ( $\log(k)$ ) od objętościowej zawartości organicznego składnika w eluencie. Rys. 3. przedstawia przykład takiej zależności dla eluentu zawierającego AcCN : woda + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5 dla kolumny Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m) Phenomenex (USA). Można zauważyć, że większość linii jest praktycznie równoległa. Jednak, niektóre charakteryzują się różnym kątem nachylenia. To sugeruje zróżnicowanie mechanizmu sorpcji poszczególnych związków chemicznych. Np. poprzez istnienie sorpcji dwupunktowej w miejsce jednopunktowej. Niewielkie różnice kąta nachylenia linii  $\log k = f(\text{ułamka objętościowego organicznego dodatku do eluentu})$ , mogą być powodowane zróżnicowanymi oddziaływaniami fragmentów charakterze hydrofilowym w przestrzeni eluentu, szczególnie tworzeniem wiązań wodorowych lub podobnego typu oddziaływań polarnych fragmentów eluowanych molekuł z wodą, oraz z azotem acetonitrylu, a także/lub z grupą OH alkoholu, jeśli stanowi organiczny dodatek do eluentu w warunkach faz odwróconych.



Rys. 3. Wykres zależności  $\log(k)$  od zawartości składnika organicznego w eluencie – kolumna PhenomenexC-18(2), eluent AcCN : woda + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5.

Fig. 3. Graph of  $\log(k)$  dependence on the content of organic component in the eluent - Phenomenex C-18 column (2), eluent : AcCN water + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2.5.

Podobne wykresy wykonano na podstawie danych zawartych w tabelach 6 do 14 dla różnych użytych w badaniach faz stacjonarnych typu C18, dla eluentu acetonitryl/woda, lub metanol/woda oraz różnych kwaśnych dodatków do eluentu. Przebiegi są podobne, jak na rys. 3., ale nie identyczne. Na rysunkach 4 do 12 zamieszczono chromatogramy otrzymane w opisanych warunkach badań, a odpowiednie dane ( $k$ ,  $\alpha$ ), w tabelach 6 do 14. Na tej podstawie można ocenić retencję ( $k$ ), selektywność ( $\alpha$ ) oraz sprawność rozdzielania, a także, stopień asymetrii pików. Odpowiednie wartości rezultatów badań, opisujące sprawność rozdzielania mierzona liczbą półek teoretycznych ( $N$ ), wyznaczoną na podstawie pomiaru szerokości pików w połowie ich wysokości oraz charakterystykę asymetrii całkowicie rozdzielonych pików kwercetyny – zamieszczono w tabelach 15 do 18.

Rozpatrując wpływ kwaśnego modyfikatora eluentu na zwiększenie hydrofobowości organicznych składników o kwaśnym charakterze poprzez cofnięcie dysocjacji elektrolitycznej oraz na retencję i selektywność rozdzielania składników badanej mieszaniny wzorców dla stosowanych w niniejszych badaniach faz stacjonarnych (kolumn chromatograficznych), można sformułować następujące stwierdzenia :

- Kolumna Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m) Phenomenex (USA) zapewnia maksymalną retencję. Szczególnie wysoką - względnie wysoko hydrofobowej kwercetyny ( $k_{11}$ ). Największe wartości retencji zaobserwowano w przypadku eluentu zakwaszanego kwasem ortofosforowym, zarówno w przypadku mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v ( $k_{11}$  = 9,46), jak i 3:7 v/v ( $k_{11}$  = 2,52). Natomiast, dla eluentów AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v z dodatkiem kwasu octowego ( $k_{11}$  = 6,88) oraz AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 z kwasem mrówkowym ( $k_{11}$  = 1,61), stwierdzono niższe wartości współczynników retencji kwercetyny, a także innych eluowanych składników mieszaniny wzorcowej;
- Dla kolumny MERCK (Niemcy) – LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher C18e maksymalną wartość współczynnika retencji kwercetyny uzyskano dla mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v gdy eluent nie został zakwaszony -  $k_{11}$  = 13,81. Natomiast, dodatek kwasu octowego dla eluentu AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v -  $k_{11}$  = 8,40. W przypadku eluentu AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 v/v, zakwaszonego kwasem octowym  $k_{11}$  = 2,97, a dla zakwaszenia kwasem mrówkowym mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 v/v -  $k_{11}$  = 1,91. Zakwaszenie eluentu powoduje więc, istotne zmniejszenie współczynnika retencji, a także zmianę selektywności w stosunku do rezultatów otrzymanych dla kolumny Phenomenex C-18 (2), bez istotnego wzrostu asymetrii pików. Stąd wynika wniosek, że oprócz oddziaływań z C18, istotny wpływ na retencję mają oddziaływania grup tri-metylo-siloksanowych na powierzchni sorpcyjnej;
- Dla kolumny MERCK – LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher C18, analogicznie jak w punkcie b) – największą retencję kwercetyny uzyskano dla mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v gdy eluent nie został zakwaszony ( $k_{11}$  = 14,98). Natomiast, w przypadku mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 v/v najwyższa wartość czasu retencji kwercetyny występuje, gdy eluent zakwaszono kwasem octowym ( $k_{11}$  = 2,95). W przypadku tej kolumny dodatek kwasu octowego do eluentu AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v obniża retencję kwercetyny do  $k_{11}$  = 9,24, a mrówkowego dla mieszaniny AcCN:H<sub>2</sub>O 3:7 v/v – do  $k_{11}$  = 1,90;

Dodatkowo, obniżenie pH eluentu spowodowało lepsze rozdzielanie organicznych związków chemicznych o pKa w zakresie ok. 4 – 6 w porównaniu do niezakwaszonego eluentu. Jednakże, mimo to, nie odnotowano całkowitego rozdzielania wzorców.

W przypadku kolumny Luna C18 (2) (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m) Phenomenex (USA) i eluentu AcCN:woda 2:8 v/v występuje ko-elucja kilku składników mieszaniny wzorcowej, z których część eluowana jest dość szybko, blisko czasu martwego (z wyjątkiem kwercetyny, gwajakolu, 2,6-dimetoksyfenolu oraz mirycetyny).

Porównując wpływ kwaśnych modyfikatorów eluentu na stopień rozdzielania pików chromatograficznych, można zauważyć, że dla wszystkich kolumn występuje niedostateczne rozdzielanie dwóch par związków chemicznych, tj. kwasu wanilinowego od 1,2-dihydroksybenzenu oraz 2,6-dimetoksyfenolu od gwajakolu. Porównując chromatogramy wykonane z dodatkiem kwaśnego modyfikatora eluentu z chromatogramem bez dodatku kwasu, widoczne jest, że obniżenie pH ma znaczący wpływ na stopień rozdzielania składników mieszaniny wzorcowej. Analogiczny wniosek można także sformułować rozpatrując zmniejszenie zawartości organicznego składnika eluentu z 30% do 20% AcCN (rys.4 do 6). Z eluentem zawierającym 20 % AcCN, uzyskano wyższe wartości współczynników retencji (co jest oczywiste) i znaczne lepsze rozdzielanie pików chromatograficznych.

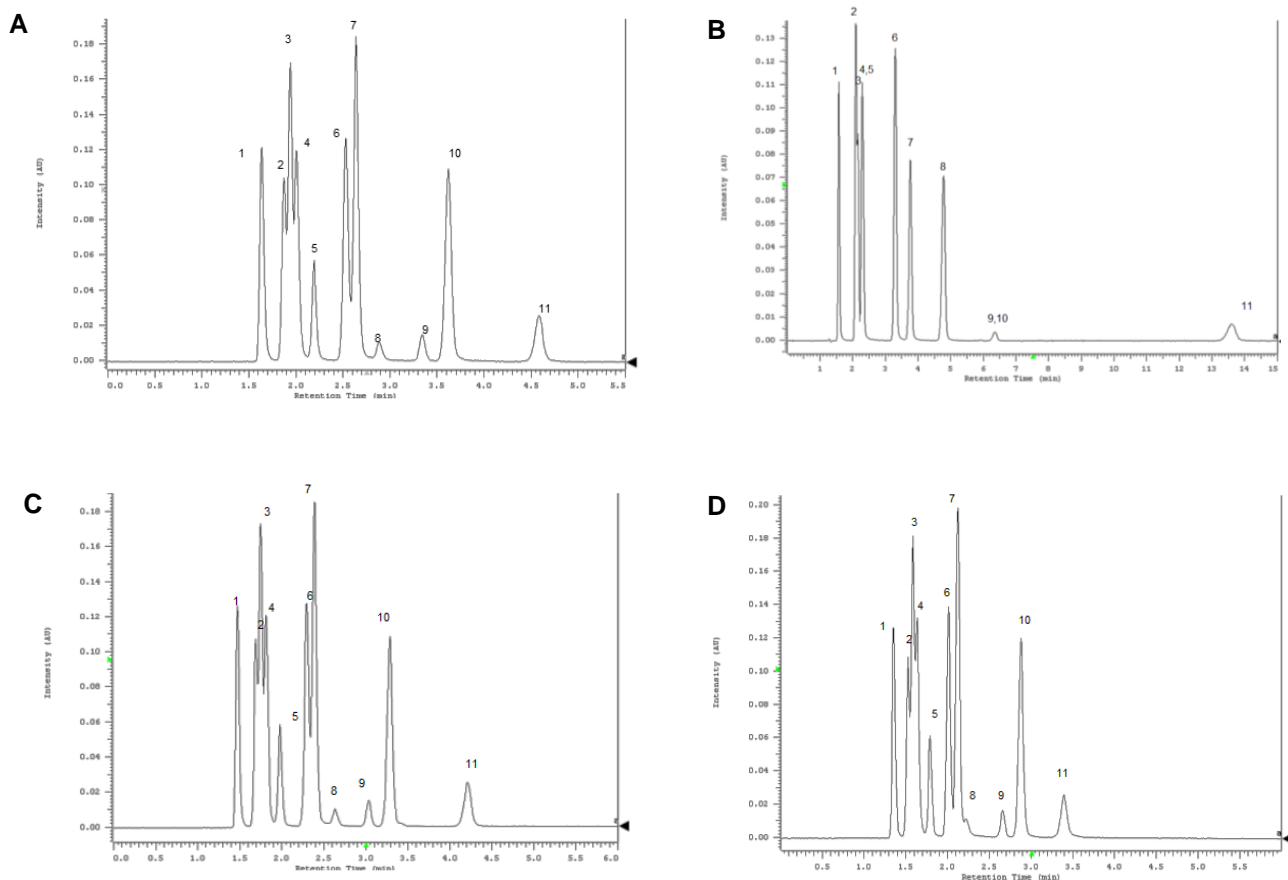
Bez korekty pH eluentu – występują 3 pary składników o identycznym współczynniku retencji (tj. 1 - kwas kawowy i kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2 - kwas wanilinowy i 1,2-dihydroksybenzen, 3 - kwas trans-ferulowy i wanilina). Natomiast po zakwaszeniu eluentu (do pH = 2,5) możliwe jest zaobserwowanie wszystkich 11 składników mieszaniny wzorcowej, jednakże nie wszystkie z nich ulegają całkowitemu rozdzielaniu (koelucja kwasu kawowego z kwasem 4-hydroksybenzoesowym oraz z kwasem wanilinowym, a także kwasu trans-ferulowego z waniliną).

Najbardziej korzystnym kwaśnym modyfikatorem eluentu w rozpatrywanych warunkach jest kwas ortofosforowy, w dalszej kolejności wyróżnić można także kwas solny oraz siarkowy (rys. 4), natomiast z kwasów organicznych – mrówkowy (rys.6). Ponadto, można zaobserwować, że w przypadku dodatku kwasu organicznego, czas rozdzielania jest o ok. 1 min krótszy niż przy zastosowaniu kwasu nieorganicznego.

Ponadto, porównując chromatogramy z różną zawartością acetonitrylu (rys. 4) można zauważyć opisane poprzednio różnice w zmianie kolejności eluacji oraz obniżenie selektywności rozdzielania składników badanej mieszaniny.

Kolejną kolumną użytą w badaniach stanowiła kolumna LiChroCART z wypełnieniem LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm). Wykorzystując eluent podstawowy – AcCN:woda 2:8 v/v, zakwaszony kwasem siarkowym (VI), piki chromatograficzne mirycetyny, gwajakolu oraz 2,6-dimetoksyfenolu częściowo nakładają się na siebie. Podobne zjawisko występuje w przypadku zastosowania kwasu tri-fluorooctowego. Natomiast, gdy zastosowano dodatek kwasu mrówkowego, piki chromatograficzne pochodzące od gwajakolu oraz 2,6-dimetoksyfenolu nadal charakteryzuje ko-elucja, lecz pik mirycetyny jest rozdzielony (całkowicie u podstawy). Analogiczne wnioski można wyciągnąć dla eluentu AcCN:woda 2:8 v/v z dodatkiem kwasu ortofosforowego, jednak piki chromatograficzne gwajakolu oraz 2,6-dimetoksyfenolu nakładają się w większym stopniu niż w przypadku zastosowania kwasu mrówkowego. Dodatkowo, porównując

chromatogramy uzyskane z wykorzystaniem kolumny Phenomenex Luna C-18(2) i LiChroCART z wypełnieniem LiChrospher RP-18e z eluentem w postaci AcCN:woda 2:8 v/v + CH<sub>3</sub>COOH (pH = 3,5), widoczne są rozbieżności w kolejności elucji składników badanej mieszaniny. Mianowicie, przy zastosowaniu LiChrospher RP-18e, mirycetyna jest 7-mym pikiem (za kwasem trans-ferulowym), natomiast przy zastosowaniu kolumny Phenomenex, 9-tym (za gwajakolem).



Rys. 4. Chromatogramy DAD 280 nm mieszaniny wzorców 1 – kwas 3,4 dihydroksybenzoesowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas 4-hydroksybenzoesowy, 4 – kwas wanilinowy, 5 – 1,2-dihydroksybenzen, 6 – kwas trans-ferulowy, 7 – wanilina, 8 – mirycetyna, 9 – 2,6-dimetoksyfenol, 10 – gwajakol, 11 - kwercetyna, kolumna: Luna Phenomenex C-18(2) (150 x 4,6 mm, 3 μm), przepływ: 1,5 ml/min, temperatura: 35°C, objętość dozowania: 2 μl, detekcja: UV-VIS DAD,

A-eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

B- eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (2: 8 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

C- eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

D- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + HCOOH, pH = 2,5

Fig. 4. Chromatograms DAD 280 nm of mixture of standards 1 - 3,4 dihydroxybenzoic acid, 2 - caffeic acid, 3 - 4-hydroxybenzoic acid, 4 - vanillic acid, 5 - 1,2-dihydroxybenzene, 6 - trans-ferulic acid, 7 - vanillin, 8 - mirycetin, 9 - 2,6-dimethoxyphenol, 10 - guaiacol, 11 - quercetin, column: Luna Phenomenex C-18 (2) (150 x 4.6 mm, 3 μm), flow: 1.5 ml / min, temperature: 35 ° C, dosing volume: 2 μl, detection: UV-VIS DAD,

A-eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

B- eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (2: 8 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

C- eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH = 2,5,

D- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + HCOOH, pH = 2,5

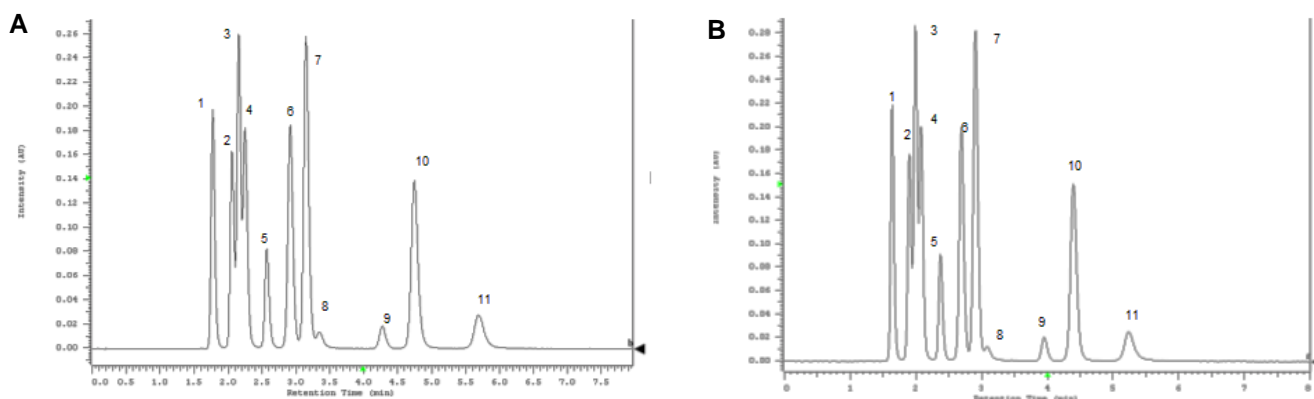
**Tabela 6.** Zestawienie podstawowych parametrów chromatograficznych (kolejność wg czasu retencji) - kolumna Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 3 µm) Phenomenex (USA) (rys. 4)

**Table 6.** Summary of basic chromatographic parameters (sequence by retention time)-column Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 3 µm) Phenomenex (USA) (fig. 4)

Skład eluentu:		A-AcCN : H <sub>2</sub> O (3:7 v/v) + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 2.5			B- AcCN: H <sub>2</sub> O (2: 8 v / v) + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 2.5			C- AcCN: H <sub>2</sub> O (3: 7 v / v) + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH = 2.5			D- AcCN : H <sub>2</sub> O (3:7 v/v) + HCOOH, pH = 2,5		
Lp. /No.	Nazwa substancji chemicznej (The name of the chemical substance)	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]
1.	kwask 3,4-dihydroksybenzoesowy (1)	1,64	0,21	-	1,58	0,22	-	1,47	0,13	-	1,35	0,04	-
2.	kwask kawowy (2)	1,87	0,44	1,69	2,1	0,62	2,86	1,69	0,3	2,27	1,53	0,17	4,25
3.	kwask 4-hydroksybenzoesowy (3)	1,94	0,49	1,12	2,16	0,66	1,08	1,75	0,35	1,15	1,59	0,22	1,26
4.	kwask wanilinowy (4)	2,01	0,54	1,1	2,3	0,77	1,16	1,81	0,39	1,13	1,64	0,26	1,19
5.	1,2-dihydroksybenzen (5)	2,19	0,69	1,26				1,98	0,52	1,32	1,79	0,38	1,45
6.	kwask trans-ferulowy (6)	2,53	0,94	1,37	3,31	1,54	2,01	2,3	0,77	1,47	2,01	0,55	1,45
7.	wanilina (7)	2,64	1,03	1,09	3,77	1,9	1,23	2,39	0,84	1,09	2,13	0,64	1,16
8.	mirycetyna (8)	2,89	1,22	1,18	4,79	2,68	1,41	2,63	1,03	1,23	2,23	0,71	1,12
9.	2, 6-dimetoksyfenol (9)	3,34	1,57	1,29				3,03	1,33	1,3	2,66	1,05	1,47
10.	gwajakol (10)	3,62	1,78	1,14	6,35	3,88	1,45	3,29	1,53	1,15	2,88	1,22	1,16
	kwercetyna (11)	4,58	2,52	1,41	13,59	9,46	2,44	4,21	2,24	1,47	3,39	1,61	1,32







**Rys. 5.** Chromatogramy DAD 280 nm mieszaniny wzorców 1 – kwas 3,4 dihydroksybenzoesowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas 4-hydroksybenzoesowy, 4 – kwas wanilinowy, 5 – 1,2-dihydroksybenzen, 6 – kwas trans-ferulowy, 7 – wanilina, 8 – mirycetyna, 9 – 2,6-dimetoksyfenol, 10 – gwajakol, 11 – kwercetyna, kolumna: LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher RP-18e, przepływ: 1,5 ml/min, temperatura: 35°C, objętość dozowania: 2  $\mu$ l, detekcja: UV-VIS DAD,

A-eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2.5

B- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + TFA, pH = 2,5

**Fig. 5.** Chromatograms DAD 280 nm of mixture of standards 1 - 3,4 dihydroxybenzoic acid, 2 - caffeic acid, 3 - 4-hydroxybenzoic acid, 4 - vanillic acid, 5 - 1,2-dihydroxybenzene, 6 - trans-ferulic acid, 7 - vanillin, 8 - mirycetin, 9 - 2,6-dimethoxyphenol, 10 - guaiacol, 11 - quercetin, column: LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher RP-18e, flow: 1.5 ml / min, temperature: 35 ° C, dosing volume: 2  $\mu$ l, detection: UV-VIS DAD,

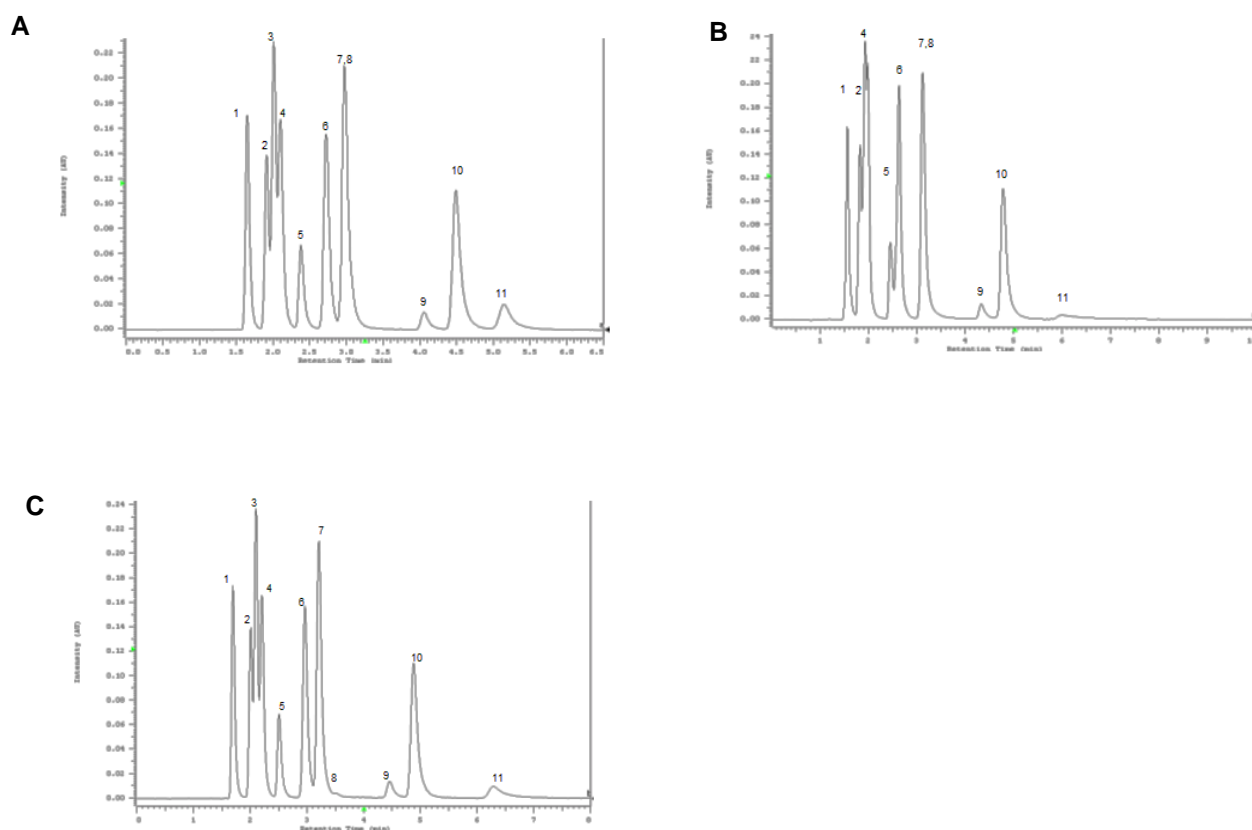
A-eluent: AcCN: H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2.5

B- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + TFA, pH = 2,5

**Tabela 7.** Zestawienie podstawowych parametrów chromatograficznych (kolejność wg czasu retencji) - kolumna LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher RP-18e) (rys. 5)

**Table 7.** Summary of basic chromatographic parameters (sequence by retention time)-column LiChroCART (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m) LiChrospher RP-18e) (fig. 5)

Skład eluentu:		A-AcCN: H <sub>2</sub> O (3: 7 v / v) + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 2.5			B- AcCN : H <sub>2</sub> O (3:7 v/v) + TFA, pH = 2,5		
Lp. /No.	Nazwa substancji chemicznej (The name of the chemical substance)	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) $\alpha$ [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) $\alpha$ [-]
1.	kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (1)	1,78	0,08	-	1,65	0,1	-
2.	kwas kawowy (2)	2,06	0,25	3,15	1,91	0,27	2,77
3.	kwas 4-hydroksybenzoesowy (3)	2,16	0,31	1,24	2	0,33	1,23
4.	kwas wanilinowy (4)	2,25	0,37	1,18	2,09	0,39	1,17
5.	1,2-dihydroksybenzen (5)	2,57	0,56	1,53	2,38	0,59	1,5
6.	kwas trans-ferulowy (6)	2,92	0,77	1,39	2,7	0,8	1,36
7.	wanilina (7)	3,15	0,91	1,19	2,91	0,94	1,18
8.	mirycetyna (8)	3,35	1,03	1,13	3,09	1,06	1,12
9.	2, 6-dimetoksyfenol (9)	4,27	1,59	1,55	3,95	1,64	1,55
10.	gwajakol (10)	4,74	1,87	1,18	4,4	1,93	1,18
11.	kwercetyna (11)	5,69	2,45	1,31	5,23	2,49	1,29



**Rys. 6.** Chromatogramy DAD 280 nm mieszaniny wzorców 1 – kwas 3,4 dihydroksybenzoesowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas 4-hydroksybenzoesowy, 4 – kwas wanilinowy, 5 – 1,2-dihydroksybenzen, 6 – kwas trans-ferulowy, 7 – wanilina, 8 – mirycetyna, 9 – 2,6-dimetoksyfenol, 10 – gwajakol, 11 - kwercetyna, kolumna: LiChroCART (250 x 4 mm) LiChrospher RP-18, przepływ: 1,5 ml/min, temperatura: 35°C, objętość dozowania: 2  $\mu$ l, detekcja: UV-VIS DAD,

A- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2,5

B- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + CH<sub>3</sub>COOH, pH = 3,5

C- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v)

**Fig. 6.** Chromatograms DAD 280 nm of mixture of standards 1 - 3,4 dihydroxybenzoic acid, 2 - caffeic acid, 3 - 4-hydroxybenzoic acid, 4 - vanillic acid, 5 - 1,2-dihydroxybenzene, 6 - trans-ferulic acid, 7 - vanillin, 8 - mirycetin, 9 - 2,6-dimethoxyphenol, 10 - guaiacol, 11 - quercetin, column: LiChroCART (250 x 4 mm) LiChrospher RP-18, flow: 1.5 ml / min, temperature: 35 ° C, dosing volume: 2  $\mu$ l, detection: UV-VIS DAD,

A- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3: 7 v / v) + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 2.5

B- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) + CH<sub>3</sub>COOH, pH = 3,5

C- eluent: AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v)

Zwiększając udział acetonitrylu w eluencie podstawowym do 30%, podobnie jak w poprzednim przypadku, także dla kolumny LiChroCART LiChrospher RP-18e, odnotowano poprawę pod względem rozdzielania składników mieszaniny wzorcowej, w odniesieniu do zawartości AcCN równej 20%. Jednakże nawet pomimo zastosowania korekty pH nie udało się całkowicie rozdzielić wszystkich składników zawartych w próbce. Stwierdzono, że najbardziej „problematiczne” są związki chemiczne tj. kwas kawowy, który częściowo nakłada się z kwasem 4-OH benzoesowym oraz z kwasem wanilinowym (dla wspomnianych związków współczynnik  $\alpha$  nieznacznie przekracza wartości „1”). Ponadto, problematyczne jest też rozdzielanie w niniejszych warunkach (izokratycznych) mirycetyny oraz waniliny, których piki chromatograficzne częściowo nakładają się na siebie.

**Tabela 8.** Zestawienie podstawowych parametrów chromatograficznych (kolejność wg czasu retencji) - kolumna LiChroCART (250 x 4 mm, 5 µm) LiChrospher RP-18) (rys. 6)

**Table 8.** Summary of basic chromatographic parameters (sequence by retention time)-column LiChroCART (250 x 4 mm, 5 µm) LiChrospher RP-18) (rys. 6)

Skład eluentu:		A- AcCN: H <sub>2</sub> O (3: 7 v / v) + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 2,5			B-AcCN : H <sub>2</sub> O (3:7 v/v) + CH <sub>3</sub> COOH, pH = 3,5			C- AcCN : H <sub>2</sub> O (3:7 v/v)		
Lp. /No.	Nazwa substancji chemicznej (The name of the chemical substance)	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]	Czas retencji (Retention time) t <sub>r</sub> [min]	Współ. retencji (Retention coefficient) k [-]	Selektywność (Selectivity) α [-]
1.	kwasy 3,4-dihydroksybenzoesowy (1)	1,65	0,09	-	1,7	0,07	-	1,57	0,02	-
2.	kwasy kawowy (2)	1,91	0,26	2,95	2,01	0,27	3,85	1,83	0,18	2,14
3.	kwasy 4-hydroksybenzoesowy (3)	2,01	0,32	1,25	2,11	0,32	1,22	1,94	0,25	1,38
4.	kwasy wanilinowy (4)	2,1	0,38	1,18	2,21	0,39	1,19	1,99	0,29	1,14
5.	1,2-dihydroksybenzen (5)	2,38	0,57	1,48	2,51	0,58	1,5	2,46	0,59	2,05
6.	kwasy trans-ferulowy (6)	2,73	0,79	1,4	2,97	0,87	1,49	2,64	0,7	1,2
7.	wanilina (7)	2,97	0,96	1,2	3,21	1,02	1,18	3,13	1,02	1,45
8.	mirycetyna (8)				3,52	1,21	1,19			
9.	2, 6-dimetoksyfenol (9)	4,05	1,67	1,74	4,46	1,81	1,49	4,33	1,8	1,77
10.	gwajakol (10)	4,49	1,95	1,17	4,88	2,07	1,15	4,78	2,08	1,16
11.	kwercetyna (11)	5,15	2,39	1,22	6,29	2,95	1,43	6,01	2,88	1,38

Analizując otrzymane chromatogramy (w warunkach chromatograficznych: kolumna LiChrospher RP-18e, eluent: AcCN:woda 3:7 v/v) pod kątem wpływu rodzaju kwaśnego modyfikatora eluentu na rozdzielanie substancji wzorcowych, wytypowano 2 spośród 6 zastosowanych kwasów. Mianowicie, wyróżnia się kwas ortofosforowy oraz kwas tri-fluorooctowy (rys. 6). Przy wykorzystaniu powyższych kwasów uzyskano, co prawda nieznaczne, ale widoczne różnicowanie w wartościach współczynników retencji dla waniliny i mirycetyna (częściowe rozdzielanie się pików).

Trzecim rodzajem kolumn wykorzystanym w badaniach, była kolumna LiChroCART z wypełnieniem LiChrospher RP-18 (250 x 4 mm). W warunkach chromatograficznych, gdzie eluent podstawowy stanowiła mieszanina acetonitrylu : woda 2:8 v/v z/bez dodatku kwasu, zaobserwowano całkowite nakładanie się pików chromatograficznych pochodzących od kwasu kawowego i 4-hydroksybenzoesowego oraz dodatkowo częściowe nałożenie pików kwasu wanilinowego i 1,2-dihydroksybenzenu. Ponadto, identyczny problem występuje w przypadku pary związków chemicznych: 2,6-dimetoksyfenol i gwajakol. W tym przypadku także piki chromatograficzne praktycznie całkowicie nakładają się na siebie, a jedynie rozdzielanie z wykorzystaniem kwasu octowego (pH = 3,5) umożliwi na niewielkie różnicowanie w retencji niniejszych składników. Jednakże rozpatrując całkowity przebieg chromatogramu, należy stwierdzić, że wspomniany kwas octowy wpływa na pogorszenie rozdzielania pozostałych składników mieszaniny (m.in. koelucja kwasu trans-ferulowego, mirycetyny oraz częściowo waniliny). Dodatkowo, zaobserwowano, że oprócz kwasu octowego, także dodatek kwasu siarkowego (VI) wpływa na zmianę w rozdzielaniu 3 wspomnianych składników mieszaniny - koelucja kwasu trans-ferulowego, mirycetyny oraz waniliny. Pozostałe chromatogramy mają podobny przebieg, a jedyne, znaczne różnice występują w wartościach współczynników retencji ostatniego z pików – kwercetyny (największa wartość dla kwasu ortofosforowego). Zwiększając udział acetonitrylu w eluencie podstawowym do 30% odnotowano, że wanilina i mirycetyna charakteryzują się identyczną wartością współczynnika retencji dla większości wykorzystanych eluentów. Wyjątek stanowią eluenty AcCN : woda 3:7 v/v z dodatkiem kwasu octowego (pH eluentu = 3,5) oraz z TFA (pH eluentu = 2,5), gdzie zaobserwować można niewielkie rozdzielanie pików. Rozpatrując rozdzielanie wszystkich pików, można uznać, że najbardziej odpowiednimi modyfikatorami eluentu w tych warunkach jest właśnie kwas octowy, jak również z kwasów nieorganicznych: kwas solny i ortofosforowy.

Powyżej (rys. 6) umieszczono chromatogram mieszaniny wzorcowej, uzyskany z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej bez „endcappingu” oraz z niezakwaszonym eluentem AcCN : H<sub>2</sub>O (3:7 v/v). Porównując przebieg chromatogramami można zauważyć znaczny spadek selektywności rozdzielania. Ponadto, w przypadku zakwaszenia eluentu kwasem organicznym czas rozdzielania mieszaniny był o ok.0,5 min dłuższy, natomiast kwasem nieorganicznym o ok. 1 min krótszy niż przy zastosowaniu eluentu nie zakwaszonego. Może to wynikać, że znacznej zmiany w hydrofobowości cząsteczek w zależności od zastosowanego kwasu. W przypadku kwasu organicznego może mieć miejsce łączenie się fragmentów cząsteczek analitów z zdysocjowanymi w środowisku wodnym kwasami.

Dodatkowo, na podstawie współczynników asymetrii (jak również na podstawie wizualnej analizy przebiegu chromatogramów) można stwierdzić, że w przypadku kolumn chromatograficznych zawierających wypełnienie typu RP-18e, tzw. „ogonowanie” pików jest znacznie mniejsze niż podczas użytkowania kolumny typu RP-18 bez „endcappingu”. Jest to konsekwencją występowania oddziaływań grup polarnych analitów z powierzchnią wypełnienia (przez występowanie resztkowych grup hydroksylowych na powierzchni wypełnienia) i mieszanego mechanizmu sorpcji. W przypadku kolumn posiadających wypełnienie z „endcappingiem” (tj. po metylowaniu bądź silanizacji wolnych grup hydroksylowych) obserwowana jest większa symetria pików, jak również lepsze ich rozdzielanie. Ciekawym zjawiskiem jest także zmiana w kolejności elucji dla kolumny bez encappingu z eluentem AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v w porównaniu do dwóch pozostałych kolumn typu C-18e. Mianowicie zauważono koelucję waniliny i mirycetyny w przypadku niestosowania żadnego dodatku kwasu oraz koelucję kwasu trans-ferulowego oraz mirycetyny w przypadku dodatku kwasu octowego.

W tabeli 8 zestawiono wyznaczone wartości współczynników asymetrii ( $A_{0,5}$ ) dla związku chemicznego o największej retencji – kwercetyny. Kwercetyna, zarówno z wykorzystaniem eluentu w postaci acetonitrylu : woda 2:8 oraz 3:7, jest eluowana, jako ostatnia, co także przekłada się na występowanie największych odkształceń od gaussowskiego kształtu piku. Ponadto, pik kwercetyny w każdym z wykorzystanych warunków chromatograficznych ulega rozdzielaniu do podstawy, co umożliwia jednoznaczną interpretację wyników w zakresie oceny sprawności rozdzielania oraz asymetrii pików.

**Tabela 9.** Zestawienie współczynników asymetrii dla kwercetyny.**Table 9.** List of asymmetric coefficients for quercetin.

Skład eluentu podstawowego	Dodatek kwasu (pH eluentu)	Rodzaj kolumny chromatograficznej/typ sorbentu (Chromatographic column type / sorbent type)		
		Phenomenex Luna C-18(2) (150x4,6 mm, 3 µm)	LiChroCARTLiChrospher RP C-18e - 250x4 mm, 5 µm	LiChroCARTLiChrospher RP C-18 - 250x4 mm, 5 µm
AcCN:H <sub>2</sub> O 2:8 v/v	-	Koelucja składników mieszaniny	2,12	2,80
	HCl (pH = 2,5)	0,90	1,54	2,55
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 2,5)	0,95	1,47	2,08
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 2,5)	0,96	1,25	2,07
	HCOOH (pH = 2,5)	0,91	1,40	2,20
	CH <sub>3</sub> COOH (pH = 3,5)	1,16	1,68	2,10
AcCN:H <sub>2</sub> O 3:7 v/v	TFA (pH = 2,5)	1,02	1,38	2,27
	-	1,69	2,15	3,62
	HCl (pH = 2,5)	1,15	1,50	1,82
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 2,5)	0,95	1,29	1,78
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 2,5)	1,01	1,28	1,77
	HCOOH (pH = 2,5)	1,12	2,05	2,25
	CH <sub>3</sub> COOH (pH = 3,5)	1,60	2,17	2,57
TFA (pH = 2,5)	1,16	1,40	2,03	

**Tabela 10.** Kolumna Phenomenex Luna C-18(2)**Table 10.** Phenomenex Luna C-18 column (2)

	Kwaśny modyf. Eluentu	Kwas 4-hydroksybenzoesowy			p-hydroksybenzoesan metylu			Wsp. rodz./selekt. α [-]
		Czas retencji, t <sub>r</sub> [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba pólek teoret. N [-]	Czas retencji, t <sub>r</sub> [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba pólek teoret. N [-]	
AcCN : woda 2:8 v/v	-	1,18	0,93	979	5,84	8,57	16477	9,18
	HCl	2,09	0,62	10785	5,84	3,53	15439	5,71
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,08	0,60	11005	5,75	3,43	16567	5,71
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,11	0,62	10802	5,91	3,55	15356	5,72
	HCOOH	2,05	0,58	10443	5,64	3,34	15428	5,76
	CH <sub>3</sub> COOH	1,97	0,52	10363	5,16	2,97	15650	5,37
	TFA	2,05	0,57	10561	5,58	3,29	15522	5,73
AcCN : woda 3:7 v/v	-	1,83	0,49	4642	3,08	1,50	12599	3,07
	HCl	1,71	0,28	8258	3,28	1,45	13751	5,20
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,73	0,29	8373	3,38	1,52	13721	5,19
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,95	0,50	8758	3,77	1,90	14451	3,81
	HCOOH	1,59	0,23	8349	2,94	1,26	13488	5,59
	CH <sub>3</sub> COOH	1,70	0,31	9130	3,37	1,59	14545	5,18
	TFA	1,71	0,31	8593	3,31	1,55	14122	4,95

**Tabela 11.** Kolumna LiChrospher RP-18e**Table 11.** LiChrospher RP-18e column

	Kwaśny modyf. Eluentu	Kwas 4-hydroksybenzoesowy			p-hydroksybenzoesan metylu			Wsp. rodz./selekt. α [-]
		Czas retencji, t <sub>r</sub> [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba pólek teoret. N [-]	Czas retencji, t <sub>r</sub> [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba pólek teoret. N [-]	
AcCN : woda 2:8 v/v	-	2,42	0,32	1574	10,06	4,50	12223	13,95
	HCl	2,79	0,71	8992	9,23	4,66	12447	6,75
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,90	0,93	9508	9,03	5,02	12839	5,38
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,80	0,71	9024	9,30	4,67	12494	6,60
	HCOOH	2,69	0,81	9098	8,73	4,86	12318	6,02
	CH <sub>3</sub> COOH	2,67	0,60	9952	8,12	3,86	12546	6,47
	TFA	2,71	0,63	9189	8,73	4,26	12346	6,76
AcCN : woda 3:7 v/v	-	1,97	0,33	9395	4,56	2,08	11763	6,24
	HCl	2,01	0,29	7904	4,37	1,82	11242	6,18
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,09	0,29	9036	4,63	1,86	11649	6,46
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,16	0,31	8229	4,77	1,89	11449	6,12
	HCOOH	1,91	0,26	8474	3,97	1,63	11588	6,21
	CH <sub>3</sub> COOH	2,07	0,37	7942	4,83	2,20	11522	5,96
	TFA	2,01	0,33	8093	4,43	1,93	11274	5,87

**Tabela 12.** Kolumna LiChrospher RP-18**Table 12.** LiChrospher RP-18 column

	Kwaśny modyf. Eluentu	Kwas 4-hydroksybenzoesowy			p-hydroksybenzoesan metylu			Wsp. rodz./selekt. $\alpha$ [-]
		Czas retencji, tr [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba póltek teoret. N [-]	Czas retencji, tr [min]	Wsp. retencji, k [-]	Liczba póltek teoret. N [-]	
AcCN : woda 2:8 v/v	-	2,39	0,58	1683	9,83	5,51	9734	9,42
	HCl	2,89	0,73	7097	9,55	4,72	10387	6,44
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,73	0,64	7363	8,58	4,17	10367	6,49
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,91	0,76	7347	9,68	4,83	10725	6,40
	HCOOH	2,81	0,69	7709	9,19	4,53	11035	6,53
	CH <sub>3</sub> COOH	2,61	0,67	8061	8,01	4,14	10803	6,17
	TFA	2,83	0,60	7490	9,17	4,18	10871	7,01
AcCN : woda 3:7 v/v	-	1,95	0,26	5596	4,87	2,14	9709	8,22
	HCl	2,03	0,30	5824	4,45	1,85	9053	6,10
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,05	0,31	6313	4,52	1,90	9354	6,08
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,01	0,32	6068	4,45	1,93	9544	5,95
	HCOOH	1,93	0,27	7009	4,05	1,66	9502	6,21
	CH <sub>3</sub> COOH	2,11	0,32	6735	4,95	2,11	10250	6,50
	TFA	2,07	0,34	6391	4,65	2,00	9728	5,93

Zgodnie z założeniami, można zaobserwować spadek w symetrii pików wraz ze spadkiem hydrofobowości frazy stacjonarnej. Ponadto, najbardziej korzystny wpływ na symetrię pików posiadają eluenty zakwaszone kwasem ortofosforowym, siarkowym rozpatrując kwasy nieorganiczne, natomiast w przypadku kwasów organicznych: mrówkowy oraz TFA.

Wpływ rodzaju eluentu na sprawność wyrażaną w postaci liczby póltek ilości teoretycznych (N), wyznaczono dla uproszczonej (dwuskładnikowej) mieszaniny wzorców składającej się z kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz p-hydroksybenzoesanu metylu (tabele 9-11).

Najwyższą wartość liczby póltek teoretycznych (N) osiągnięto dla kolumny Phenomenex Luna C-18(2) i eluentu w postaci AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N = 11005 dla kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz N = 16567 dla p-hydroksybenzoesanu metylu). Podobne rezultaty uzyskano także w przypadku zakwaszenia eluentu kwasem ortofosforowym (odpowiednio N = 10802 oraz 15356). W przypadku wykorzystania eluentu podstawowego zawierającego 30% v/v AcCN uzyskano podobne rezultaty (liczbę póltek teoretycznych oszacowano jako 9 tys. dla pierwszego pików oraz 11 tys. dla drugiego). Jednak, w przypadku bardziej złożonej mieszaniny eluent w postaci AcCN:H<sub>2</sub>O 2:8 v/v nie gwarantował dostatecznego rozdzielania pików, ze względu na niską siłę elucyjną oraz możliwe oddziaływania związków chemicznych z fazą ruchomą – pomimo wzrostu sprawności, widoczne jest obniżenie selektywności rozdzielania wraz ze zwiększaniem zawartości składnika organicznego w eluencie.

W przypadku wykorzystania kolumny C-18(2) i eluentu niezakwaszonego z 20% acetonitrylu odnotowano znaczny spadek sprawności dla kwasu 4-hydroksybenzoesowego (N = 979). Dla 30% - w mniejszym stopniu. Praktycznie brak rozdzielania mieszaniny złożonej z 11 składników, jak ma to miejsce z zastosowaniem wypełnień C18 o bardziej korzystnej charakterystyce pod względem „endkeeping’u”, tzn., zamaskowania możliwości polarnych oddziaływań grup funkcyjnych, jak ma to miejsce w przypadku kolumn stosowanych w badaniach zrelacjonowanych we wcześniejszej części niniejszej pracy. To potwierdza wnioski z wcześniejszych naszych badań [24], że szczególnie w przypadku kolumn C18, gdy „maskowanie” możliwości oddziaływania grup OH nie jest wystarczająco doskonale wykonane przez producenta sorbentu, ich stosowanie do rozdzielania składników hydrolyzatów, będących w dużej części organicznymi kwasami o różnej „mocy”, konieczne jest stosowanie wyłącznie kolumn C18 o względnie „porządnie” dokonanym endkeeping’iem.

Ten wniosek jest bardzo niekorzystny z praktycznego punktu widzenia, ponieważ tego rodzaju sorbenty, lub kolumny preparatywne wypełnione tego rodzaju sorbentami są wyraźnie bardziej kosztowne od „zwykłych” wypełnień kolumn typu C18.

#### 4. Podsumowanie

Retencja i selektywność rozdzielania w przypadku stosowania określonego typu sorbentu jest wypadkową wielu czynników. Przede wszystkim, zależy od rodzaju fazy stacjonarnej oraz od składu eluentu (rodzaju i zawartości organicznego modyfikatora w eluencie). W przypadku elucji gradientowej, także od charakterystyki programu elucji. W przypadku faz stacjonarnych typu C18, stosowanych w badaniach, ważne znaczenie ma także stopień pokrycia węglem powierzchni sorpcyjnej. Przy rozdzielaniu organicznych związków chemicznych o kwaśnym (a także o zasadowym charakterze), istotny jest stopień doskonałości wykonania tzw. endkeeping’u, tzn., maskowania możliwości oddziaływania resztkowych grup funkcyjnych

OH na powierzchni żelu krzemionkowego, tzn., grup funkcyjnych OH, w których – ze względów sterycznych wodór nie mógł zostać zastąpiony łańcuchem węglowodorowym.

Rozdzielczość kolumny zależy, jak wiadomo, też od sprawności kolumny, mierzonej liczbą pólk teoretycznych (N). Tu znaczenie ma średnia wielkość ziaren, szerokość frakcji ziarnowej wypełnienia, wartość liniowej prędkości przepływu eluentu, jego lepkość dynamiczna, a także, temperatura, stopień upakowania kolumny i inne czynniki. Przede wszystkim, jednak, charakter profilu przepływu eluentu w poprzecznym przekroju wypełnienia kolumny.

Przedmiotem pracy był dobór optymalnych izokratycznych warunków elucyjnego rozdzielania mieszaniny 11 związków chemicznych o charakterze słabych kwasów z wykorzystaniem RP-HPLC. Skład mieszaniny wzorcowej dobrano na podstawie potencjalnego składu hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej (BMLC).

Stwierdzono, że zastosowanie eluentu o zawartości 30% v/v acetonitrylu wpływa nieoczekiwanie na zwiększenie stopnia rozdzielania dużej części składników badanej mieszaniny, mimo wzrostu w tych warunkach siły elucyjnej eluentu. Odnotowano też zmianę w kolejności elucji, niektórych rozdzielanych składników skład ze zmianą siły elucyjnej eluentu.

Zakwaszenie eluentu do pH równego 2,5 - 3 (*poniżej najniższej wartości pKa najbardziej kwaśnego składnika mieszaniny o co najmniej 0.5*), powoduje wzrost wartości  $\alpha$  - selektywności rozdzielania związków chemicznych o pKa mieszczącym się w zakresie od ok. 4 do 6. Jest to powodowane przede wszystkim, „cofnięciem” dysocjacji kwaśnej eluowanych składników rozdzielanej mieszaniny, a stąd podwyższeniem ich względnej hydrofobowości. Istotne znaczenie może też mieć „cofanie” kwaśnej dysocjacji wolnych grup OH na powierzchni żelu krzemionkowego, które w obecności w pobliżu łańcuchów C18, mogą – w części, znajdować się na powierzchni sorpcyjnej o postaci anionów Si-O<sup>-</sup> (?)

Badania tej pracy wykazały, że optymalne warunki rozdzielania średnio i nisko hydrofobowych organicznych związków chemicznych o charakterze słabych kwasów, jakich w znacznie większej liczbie, należy się spodziewać w hydrolizatach BMLC, a także, w niektórych ekstraktach z materiałów roślinnych. Niezwykle celowe jest stosowanie sorbentu z endcappingiem oraz dodatkowym sieciowaniem powierzchniowym (tu - Luna C-18(2)); Jednak, należy liczyć się z tym, że w przypadku rozdzielania w skali preparatywnej wykorzystanie tego typu sorbentów będzie wiązało się z podwyższonymi kosztami inwestycyjnymi, ze względu na ciągle jeszcze znacznie wyższą cenę tego rodzaju sorbentów. Optymalny eluent to mieszanina acetonitryl (AcCN) – woda. Badana wstępnie wykazały wyraźnie gorszą selektywność w przypadku eluentu metanol (MeOH) – woda. W przypadku rozdzielania mieszanin o złożonym składzie i o znacznej rozpiętości wartości hydrofobowości składników rozdzielanej mieszaniny (znacznym zróżnicowaniu wartości log P), w zastosowaniach preparatywnych celowe będzie wykorzystywanie elucji stopniowej, począwszy od ok. 5% v/v AcCN, do ok. 40% v/v AcCN. Zróżnicowane wartości współczynników nachylenia linii  $\lg k = f(\text{udziału AcCN w eluencie})$ , sugeruje, że w każdym przypadku konkretnego problemu rozdzielczego, będzie konieczne staranne określenie optymalnych warunków elucji. Pomocne może być wykorzystywanie pomocniczo narzędzi programowych umożliwiających optymalizację składu eluentu. celu osiągnięcia całkowitego rozdzielania pików do podstawy niezbędne jest wykorzystanie elucji gradientowej ze zmianą składu eluentu. Najbardziej korzystnym modyfikatorem eluentu, wpływającym na poprawę symetrii pików oraz selektywności rozdzielania jest kwas ortofosforowy (fosforowy V) oraz siarkowy (VI). Jednak, w przypadku korzystania z detekcji za pomocą spektrometru mas niedopuszczalne jest stosowanie dodatku do eluentu w postaci kwasów nieorganicznych. Dlatego też, jako optymalny dodatek obniżający pH eluentu, należy wyróżnić lotny i średnio mocny kwas mrówkowy.

Przedstawiona w pracy metodyka identyfikacji, wykorzystująca dokładne określenie wartości współczynnika retencji eluowanych składników mieszaniny, a wtedy, gdy to tylko możliwe – widma w zakresie UV-VIS za pomocą detektora UV-VIS-DAD, pozwala na identyfikację związków chemicznych o niskiej i średniej hydrofobowości, wchodzących w skład hydrolizatów z biomasy ligno-celulozowej, stosując w badaniach wzorce odpowiednich związków chemicznych. Jednakże, identyfikacja w ten sposób składników hydrolizatów otrzymywanych w warunkach utleniania będzie w ten sposób utrudniona. Najbardziej celową metodyka identyfikacji wydaje się wówczas sprzężenie HPLC-MS. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku korzystania z detekcji za pomocą spektrometru mas, niedopuszczalne jest stosowanie dodatku do eluentu w postaci kwasów nieorganicznych. Dlatego też, jako optymalny dodatek obniżający pH eluentu w warunkach LC-MS należy wyróżnić kwas mrówkowy.

W przypadku rozdzielania oraz badania składu „rzeczywistych” hydrolizatów, szczególnie otrzymywanych w warunkach utleniania, czy z wykorzystaniem takich „promotorów” hydrolizy, jak gliceryna, czy alkanoloaminy, lub pi-perydyna itp., hydrolizaty będą mieszaninami złożonymi ze znacznie wyższej liczby składników, niż stosowana w badaniach mieszanina wzorcowa. Wówczas skali analitycznej, czy semi-preparatywnej dla całkowitego rozdzielania wszystkich składników mieszaniny do podstawy pików celowe będzie najprawdopodobniej wykorzystywanie dwuwymiarowego rozdzielania z elucją gradientową w każdym stopniu rozdzielania (2D-grad-HPLC) oraz detekcji UV-VIS-DAD / MS. Natomiast, w skali preparatywnej lub procesowej celowe wydaje się, wówczas, stosowanie rozdzielania dwuwymiarowego z elucją skokową w każdym „wymiarze” separacji (2D-el./stopn. – HPLC), detekcją UV-VIS-DAD / MS. Tego rodzaju badania będą przedmiotem kolejnych publikacji.

## 5. Wnioski końcowe

Badania tej pracy wykazały, że optymalnym dodatkiem do eluentu wykorzystanym do rozdzielania, identyfikacji i oznaczania względnie, średnio i nisko polarnych składników mieszanin organicznych związków chemicznych otrzymywanych z procesu konwersji biomasy lignocelulozowej, lub suszu roślinnego z wykorzystaniem wysokosprawnej kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) z elucją izokratyczną, spośród kwasów nieorganicznych, jest kwas ortofosforowy. Jednak jego zastosowanie ogranicza możliwość stosowania selektywnej detekcji w postaci spektrometrii mas. Natomiast, najkorzystniejszym modyfikatorem spośród lotnych kwasów organicznych, okazał się kwas mrówkowy. Jednakże, kwas mrówkowy absorbuje promieniowanie UV do ok. 230 nm, co uniemożliwia wykorzystanie w tym zakresie długości fali detektora typu UV-VIS-DAD do detekcji, identyfikacji oraz oznaczania związków chemicznych o charakterze alifatycznych kwasów karboksylowych, czy tego rodzaju hydroksy-kwasów karboksylowych, lub ich estrów, zawierających wyłącznie niearomatyczne struktury molekularne, które absorbują światło UV w tym samym zakresie, jak kwas mrówkowy. Celowe jest również stosowanie sorbentu z endcappingiem oraz dodatkowym sieciowaniem powierzchniowym.

### Conclusions

*Studies of this work have shown that the optimum addition to the eluent used for the separation, identification and determination of relatively medium and low polar components of organic chemical mixtures obtained from the conversion process of lignocellulosic biomass or vegetable drought using high performance elution column chromatography in reversed phase systems ( RP-HPLC) with isocratic elution, is as from the inorganic acid - orthophosphoric acid. However, its use limits the possibility of using selective detection in the form of mass spectrometry. Notwithstanding formic acid proved to be the most preferred modifier among volatile organic acids. However, formic acid absorbs UV radiation up to around 230 nm, which makes it impossible to use the UV-VIS-DAD detector wavelength in this range for detection, identification and determination of aliphatic carboxylic acids or such hydroxy-carboxylic acids. or their esters, containing only non-aromatic molecular structures that absorb UV light in the same range as formic acid. It is also desirable to use a sorbent with endcapping and additional surface crosslinking.*

**Praca finansowana z grantu NCN, pt. „Badania zasadowej hydrolizy biomasy ligno-celulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów” [nr projektu: 2014/13/B/ST8/04258].**

*This work was supported by the National Science Centre, „Research of alkaline hydrolysis of lignocellulosic biomass and conversion of hydrolysis products to bio-gases” [grant number 2014/13/B/ST8/04258].”*

### Literatura (Literature)

- [1] T. Fornstedt, R.E. Majors, *Modern Supercritical Fluid Chromatography – Possibilities and Pitfalls*, LCGC Europe, 28(8) (2015) 445-450.,
- [2] Y. Ma, A. Kosińska-Cagnazoo, W. Kerr, R. Amarowicz, R.B. Swanson, R.B. Pegg, *Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanched peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1356 (2014) 64-81. doi: 10.1016/j.chroma.2014.06.027.,
- [3] M. Kamiński, Problemy stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej jako metody otrzymywania substancji, Praca habilitacyjna, *Problems of Rusing Column Liquid Chromatography as a Method of Obtaining of Substances, Habilitation*, Gdansk University of Technology, PG, Gdansk 1992.,
- [4] H.-J. Chen, B. S. Inbaraj, and B.-H. Chen, *Determination of phenolic acids and flavonoids in Taraxacum formosanum kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique*, International Journal of Molecular Science, 13 (2012) 260-285. doi: 10.3390/ijms13010260.,
- [5] M. Kamiński (red.) Kartanowicz, R., Gazda, K., Jastrzębski, D., Kandybowicz, B., Makuch, B., Śliwka-Kaszyńska, *Chromatografia cieczowa, Liquid chromatography*, Wydawnictwo Centrum Doskonałości Analityki i Monitorowania Środowiska, Politechnika Gdańska (2004).,
- [6] K. Jones, *Chromatographia*, 25 No6 (1988) 547-559, *A Review of Very Large Scale Chromatography*.,
- [7] M. Kamiński, B. Śledzińska, j. Klawiter, *Studies on the optimization of parameters of preparative liquid chromatographic columns for production of cardiac glycosides*. J. Chromatogr. A 367 (1986) 45-58.,



- [8] L. Montero, M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography*, *Journal of chromatography A*, 1313 (2013) 275-283.
- [9] I.K. Bea, H.M. Ham, M.H. Jeong, D.H. Kim, H.J. Kim, *Simultaneous Determination of 15 Phenolic Compounds and Caffeine in Teas and Mate Using RP-HPLC/UV Detection: Method Development and Optimization of Extraction Process*, *Food Chemistry*, 172 (2015) 469-475. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.050.
- [10] S. Magiera, I. Baranowska, A. Lautenszleger, *UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102 (2015) 468-475.
- [11] J. Lee, B.L.S. Chan, A.E. Mitchell, *Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS)*, *Food Chemistry*, 215 (2017) 301-310. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.166.
- [12] B.Y. Hsu, S.W. Lin, B.S. Inbaraj, B.H. Chen, *Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132 (2017) 109-116. doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.027.
- [13] K. Belguidoum, H. Amira-Guebailia, Y. Boulmouk, O. Houache, *HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45 (2014) 1314-1320. doi: 10.1016/j.jtice.2014.03.014.
- [14] R.T. Huang, J.F. Lu, B.S. Inbaraj, B.H. Chen, *Determination of phenolic acids and flavonoids in *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry*, *Journal of Functional Foods*, 12 (2015). doi: 10.1016/j.jff.2014.12.002.
- [15] T. Taylor, *The LCGC Blog: Practical HPLC Method Development Screening*, LC GC Chromatography online, (2016) (dostęp dnia: 17-03-2017, na stronie: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-practical-hplc-method-development-screening>)
- [16] G. M. Hadad, R. A. Abdel Salam, R. M. Soliman, M. K. Mesbah, *Rapid and simultaneous determination of antioxidant markers and caffeine in commercial teas and dietary supplements by HPLC-DAD*, *Talanta*, 101 (2012) 38-44.
- [17] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3-rd edition, Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.,
- [18] A.R. Johnson, M.F. Vitha, *Chromatographic selectivity triangles*, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 556-586. doi: 10.1016/j.chroma.2010.09.046.
- [19] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Grant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems*, *Journal of Chromatography A*, 165 (1979) 3-30. doi: 10.1016/S0021-9673(00)85726-X.
- [20] V. Randaev, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Edition (2006).
- [21] B. Burczyk, *Biorafinerie: ile w nich chemii? Biorefineries: how much chemistry in them?*, *Wiadomości Chemiczne*, 63 (2009) 9-10.
- [22] A. Vailaya and C. Horváth, *Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption?*, *Journal of Chromatography A*, 829 (1998) 1-27.
- [23] K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1998).
- [24] M. Glinka, M. Antolak, R. Łukajtis, M. Kamiński, *Camera Separatoria*, 7 (2015) 25-40, *Wpływ rodzaju kwasu jako dodatku do eluentu na parametry rozdzielania poli-fenoli techniką chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC)*.