

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Giedrė Kesiūnaitė

**KIETAFAZĖ DISPERGUOJAMOJI EKSTRAKCIJA –
ULTRAEFEKTYVIOJI SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJA
ORGANINIŲ JUNGINIŲ NUSTATYMO KIETOSE
MATRICOSE**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2005-2009 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai,
chemija – 03 P)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
IVADAS	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografija (HILIC)	9
1.1.1. HILIC savybės bei atskyrimo mechanizmas	9
1.1.2. Įvairių veiksnių įtaka atskyrimui HILIC metode	12
1.1.3. HILIC sorbentai	15
1.1.4. HILIC metodo taikymas	19
1.2. Kietafazė disperguojamoji ekstrakcija (KDE)	21
1.2.1. KDE metodo principai	21
1.2.2. Veiksniai įtakoiantys KDE efektyvumą ir atrankumą	24
1.3. Karbadoksas ir olakvindoksas	31
1.3.1. Savybės ir taikymas	31
1.3.2. Karbadokso ir olakvindokso nustatymo metodai	32
1.4. Sudano dažikliai	36
1.4.1. Dažiklių savybės ir taikymas	36
1.4.2. Sudano dažiklių nustatymo metodų apžvalga	38
II. EKSPERIMENTO METODIKA	44
2.1. Aparatūra	44
2.2. Reagentai ir tirpalai	45
2.3. Procedūros	46
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	47
3.1. Karbadokso ir olakvindokso nustatymas KDE-HILIC metodu	47
3.1.1. Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas HILIC metodu	47
3.1.2. KDE sąlygų tyrimas	58
3.1.3. Analizinės charakteristikos ir taikymas	65
3.2. Sudano dažiklių nustatymas čili pipirų milteliuose	68
3.2.1. Sudano dažiklių detektavimo ir atskyrimo sąlygų tyrimas	68
3.2.2. Sudano dažiklių ekstrakcija	74

3.2.3. Metodo tinkamumo įvertinimas	82
IŠVADOS	87
Mokslinių publikacijų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas	89
PADĖKA	90
LITERATŪROS SĄRAŠAS	90

SANTRUMPOS

ACN – acetonitrilas

ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija

EtOH – etanolis

HILIC – hidrofilinės sąveikos chromatografija

KDE – kietafazė disperguojamoji ekstrakcija

MeOH – metanolis

MIPs – molekulių išspaudų polimeriniai sorbentai

MS – masių spektrometrija

MS/MS – tandeminė masių spektrometrija

PDA – skenuojantis fotodiodinės matricos detektorius

UESCh – ultraefektyvioji skysčių chromatografija

IVADAS

Jau daugiau nei dešimtmetį dominuojančiu cheminės analizės metodu yra chromatografija. Chromatografijos populiarumą lėmė tai, kad šis metodas jungia dvi labai svarbias analizei procedūras: analizių atskyrimą ir jų kiekybinį nustatymą. Nelakių bei nepasižyminčių dideliu terminiu stabilumu organinių junginių nustatymui neabejotinai tinkamiausias metodas – efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh). ESCh metodo variantų gausa be didelių papildomų sąnaudų (manipuliuojant tik sorbento ir judrios fazės prigimtimi) leidžia efektyviai atskirti ir kiekybiškai nustatyti tiek jonizuotus, tiek ir neutralius įvairaus poliškumo bei neutralius polinius, tiek ir visiškai nepolinius junginius. Pastarąjį dešimtmetį sėkmingai apjungus ESCh metodą su moderniais skenuojančiais spektrofotometriniais bei masių spektrometriniais detektoriais, jis tapo nepakeičiamu identifikavimo ir kiekybinio nustatymo metodu aplinkos, biologinių ir biomedicininų objektų analizėje. Tobulėjant detektavimo technikai limituojančiu faktoriumi ESCh metode tapo chromatografinio atskyrimo etapas. Dėl riboto chromatografinių sistemų efektyvumo sudėtingesnių mišinių atskyrimas dažnai trunka 30 ir daugiau min. 2004 m. buvo įvesta į rinką nauja ESCh sistema – ultraefektyvioji skysčių chromatografija (UESCh), sudaryta iš naujos kartos 1000 bar maksimalaus slėgio binarinio siurblio, dideliems slėgiams pritaikytos automatinės mėginio įleidimo sistemos bei dideliems slėgiams atsparaus, porėto 1,7 μm dalelių dydžio etilsiloksano/silikagelio hibridinio sorbento. Tai leido ženkliai pagerinti atskyrimo efektyvumą ir atrankumą bei pagreitinti atskyrimą.

Nepaisant ypatingo chromatografijos atrankumo, analizuojant realius objektus net ir šiam metodui būtinos papildomos mėginių paruošimo procedūros, kurių pagalba analitės išskiriamos iš mėginio matricos ir, jei reikia, sukonzentruojamos. Bene daugiausiai problemų šiuolaikinėje analizėje kelia kietų mėginių paruošimas. Įprastai, iš kruopščiai homogenizuotų kietų mėginių analitės yra išskiriamos ekstrahuojant jas organiniais tirpikliais. Kadangi ekstrakcija skysčiais nepasižymi atrankumu, gauti ekstraktai dar papildomai valomi skystafazės arba kietafazės ekstrakcijos metodais. Tai pakankamai ilgos

bei reikalaujančios daug darbo ir medžiagų sąnaudų procedūros. Šiame kontekste ypač patraukliai atrodo kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos (KDE) metodas, skirtas greitam ir efektyviam organinių junginių išskyrimui iš kietų, pusiau kietų arba labai klampių sudėtingos matricos mėginių. KDE metodas užpatentuotas dar 1993 m., tačiau platesnio mokslininkų susidomėjimo susilaukė tik po 2000 m. Pirmieji, nors dar palyginti negausūs KDE metodo tyrimo ir taikymo praktikoje rezultatai leidžia teigti, jog šis metodas yra gerokai efektyvesnis, greitesnis ir paprastesnis už tradicinius ekstrakcinius metodus. Be to, KDE metodas ypač lengvai suderinamas su chromatografiniais nustatymo metodais. Tokiu būdu, KDE apjungimas su naujos kartos UESCh metodu turėtų atverti puikias perspektyvas organinių junginių nustatymui kietuose sudėtingos matricos mėginiuose.

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – nuodugniai ištirti ir pritaikyti kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos ir ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodus greitam ir efektyviam organinių junginių nustatymui kietose matricose. Tyrimams buvo pasirinktos dvi pakankamai aktualios analizių/mėginio matricos sistemos: karbadoksas ir olakvindoksas pašaruose bei Sudano dažikliai čili pipirų milteliuose.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Nuodugniai ištirti karbadokso ir olakvindokso chromatografinę elgseną UESCh metode hidrofilinės sąveikos chromatografijos sąlygose bei palyginti su jų atskyrimu atvirkščių fazių ESCh metodu.
2. Optimizuoti Sudano dažiklių atskyrimo UESCh metodu sąlygas.
3. Ištirti ir optimizuoti KDE metodą karbadokso ir olakvindokso išskyrimui iš pašarų bei Sudano dažiklių išskyrimui iš čili pipirų miltelių.
4. Įvertinti metodų analizines charakteristikas ir pritaikyti naujas sistemas realių mėginių analizei.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Karbadokso ir olakvindokso bei Sudano dažiklių atskyrimas UESCh metodu yra efektyvesnis, atrankesnis ir greitesnis už jų atskyrimą atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

2. Hidrofilinės sąveikos chromatografija leidžia atrankiai ir efektyviai nustatyti labai polinius organinius junginius nenaudojant gradientinės eliucijos. Hidrofilinės sąveikos chromatografijos principo panaudojimas KDE metode pagreitina hidrofobinių junginių ekstrakciją bei pagerina ekstrakcijos atrankumą.
3. Naujos karbadokso ir olakvindokso bei Sudano dažiklių ekstrakcijos iš kietų matricų KDE metodu procedūros yra greitesnės, efektyvesnės ir paprastesnės už iki šiol taikytus skystafazės ir kietafazės ekstrakcijos metodus.
4. Optimizuotos KDE-UESCh analizinės sistemos tenkina ES reikalavimus, keliamus vaistų likučių ir draudžiamų medžiagų nustatymui maisto produktuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Hidrofilinės sąveikos chromatografija (HILIC)

1.1.1. HILIC savybės ir atskyrimo mechanizmas

Efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh) – tai vienas iš universaliausių ir plačiausiai šiuo metu naudojamų analizės metodų. Metodas taikomas nustatyti įvairiausiems junginiams dar įvairesniuose mėginiuose pradedant nuo maistinių medžiagų, farmacijos produktų, biologinių audinių, kosmetikos iki aplinkos teršalų ir pramonės produktų [1]. ESCh priklausomai nuo stacionarios ir judrios fazių poliškumo bei atskyrimo mechanizmo skirstoma į adsorbcinę normalių ir atvirkščių fazių chromatografiją, jonų mainų, jonų porų, pasiskirstymo, giminigumo, molekulinį sietų ir kt. metodus.

Normalių fazių chromatografija yra viena pirmųjų skysčių chromatografijos rūšių, dominavusi iki atsirandant atvirkščių fazių chromatografijai. Normalių fazių chromatografijoje sorbentas (silikagelis, aliuminio oksidas, aminopropilsilikagelis ir pan.) yra poliškesnis už judrią fazę (benzenas, chloroformas, heksanas ir pan. bei jų mišiniai). Šiuo chromatografijos metodu nustatomi nejoniniai organiniai junginiai, tirpūs nepoliniuose organiniuose tirpikliuose. Analitės sulaikomos jų poliškumo stiprėjimo tvarka. Judriomis fazėmis naudojant nepolinius tirpiklius, jų molekulės adsorbuojasi ant polinio sorbento paviršiaus. Atskyrimo metu analitės pakeičia palyginti silpnai paviršiuje adsorbuotas tirpiklio molekules, t.y. atskyrimas vyksta konkurentinės adsorbcijos principu. Tokioje sistemoje esant judrioje fazėje net ir nežymiam vandens kiekiui, pastarasis labai stipriai adsorbuojasi ant polinio sorbento paviršiaus suformuodamas jame ploną vandens sluoksnį ir taip užblokuodamas galimybę adsorbuotis analitėms. Dėl oro drėgmės bet koks organinis tirpiklis, kontaktuodamas su supančia aplinka įgeria tam tikrą kiekį vandens, kuris palaipsniui dezaktyvuoja sorbentą, sumažindamas analičių sulaikymo trukmes bei pablogindamas atskyrimo atrankumą. Siekiant išvengti šios problemos, buvo bandoma dehidratuoti

judrią fazę, praleidžiant ją prieš pat analizę per vandenį sugeriančius molekulinis sietus [2], tačiau tai tik sulėtindavo paminėtus procesus.

Kiti normalių fazių skysčių chromatografijos trūkumai – lėtas pusiausvyros procesas ant neorganinių oksidų bei jų paviršiaus heterogeniškumas, sukeliantis nesimetrišką smailių formą bei keičiantis sulaikymo trukmes priklausomai nuo analitės koncentracijos [3]. Be to, normalių fazių chromatografijoje sunku atlikti gradientinę eliuciją, ribotas sorbentų ir judrių fazių pasirinkimas bei labai menkos galimybės įtakoti atskyrimo kokybę. Metodas labai jautrus eksperimento sąlygoms: drėgmei, temperatūrai, tėkmės greičiui [4]. Galiausiai, labai polinės analitės (baltymai, aminorai, sulfo rūgštys, sultonatai ir kt.) dažnai negrižtamai adsorbuojasi sorbento paviršiuje ir/arba blogai tirpsta nepolinėse judrioje fazėje. Dėl paminėtų trūkumų prieš kelis dešimtmečius šį metodą visiškai nukonkuravo žymiai lankstesnis atvirkščių fazių skysčių chromatografijos variantas.

Atvirkščių fazių chromatografijoje naudojami nepoliniai sorbentai (oktadecilsilikagelis, oktilsilikagelis, anglis ir pan.) ir polinės judrios fazės (vandens-acetonitrilo arba vandens-metanolio mišiniai), todėl analitės sulaikomos jų poliškumo mažėjimo tvarka. Atvirkščių fazių chromatografija – labai universali ir lanksti, puikiai tinkanti tiek visiškai nepolinių, tiek ir palyginti polinių junginių atskyrimui. Deja, labai polinių bei jonogeninių ir todėl silpnai sulaikomų junginių atskyrimui būtina judri fazė, kurioje vanduo, kaip poliškiausias iš tirpiklių, sudarytų didžiąją ar beveik visą judrios fazės dalį. Tai kenkia atvirkščių fazių chromatografijoje naudojamiems sorbentams, iš kurių tik nedaugelis gali išlikti nepažeisti tokiose poliškose judrioje fazėje. Beveik visi minėti sorbentai „vandeningose“ judrioje fazėje yra blogai drėkinami, be to, gali suirti paviršinę sorbentų struktūrą, kai alkilo grandinės ant sorbento paviršiaus sukimba ir sorbentas netenka savo sorbcinių savybių [2].

1990 metais labai polinių junginių atskyrimui buvo pasiūlytas naujas hidrofilinės sąveikos chromatografijos (HILIC) metodas [5]. Šis metodas tarsi apjungė normalių ir atvirkščių fazių ESCh variantus. HILIC metode

atskyrimas atliekamas ant polinių, įprastai normalių fazių chromatografijoje naudojamų sorbentų su polinėmis atvirkščių fazių chromatografijos judriomis fazėmis, kurių didesnę dalį (>60 %) sudaro polinis organinis tirpiklis (dažniausiai acetonitrilas), o likusioji dalis – vanduo. Iš pirmo žvilgsnio, tokia sorbento ir judrios fazės kombinacija atrodo visiškai nesuderinama, kadangi polinėje judrioje fazėje esantis vanduo užblokuoja polinio sorbento (pvz. silikagelio) adsorbcinius centrus, todėl organinės analitės tokiose sąlygose turėtų būti visiškai nesulaikomos. Tačiau eksperimentiniai HILIC metodo tyrimai parodė, jog šis metodas pasižymi unikaliomis savybėmis [5-8]. Kaip ir buvo tikėtasi, visiškai nepoliniai ir vidutinio poliškumo junginiai tokiose sąlygose yra beveik nesulaikomi. Tuo tarpu polinių ir ypač teigiamą krūvį turinčių (pvz. protonizuotų aminų ir pan.) organinių junginių sorbcija, nepaisant minimalaus sorbento adsorbcinio aktyvumo, yra pakankamai stipri.

Analičių sulaikymo mechanizmas HILIC metode nėra paremtas vienu principu. Metodo pradininko Alpert [5] nuomone, HILIC metode polinės analitės sulaikomos jau ne adsorbciniu, bet pasiskirstymo tarp dviejų skirtingo poliškumo skysčių mechanizmu. Leidžiant polinę, vandens turinčią judrią fazę per polinį sorbentą, vandenilinių ryšių pagalba sorbento paviršiuje susiformuoja plonas vandens sluoksnis, atliekantis taip vadinamos skystos nejudrios fazės vaidmenį. Pats sorbentas šiuo atveju turėtų atlikti tik inertinio nešiklio funkciją. Atskyrimo metu analitės pasiskirsto tarp labai polinio gryno vandens sluoksnio sorbento paviršiuje ir mažiau polinės judrios fazės sudarytos iš vandens ir organinio tirpiklio. Tokiu būdu nepoliniai ir vidutinio poliškumo junginiai dėl menko tirpumo vandenyje su tokia nejudria faze nesąveikauja ir yra nesulaikomi. Kuo geriau analizė tirpsta vandenyje, t.y. kuo ji poliškesnė, tuo stipriau ji yra sulaikoma. Tokia savybė yra labai svarbi nustatant polinius junginius sudėtinguose mėginiuose, turinčiuose daug organinės kilmės komponentų (pvz. fiziologiniuose tirpaluose, maisto produktuose ir pan.). Tokiais atvejais naudojant HILIC metodą, nereikalingos sudėtingos ir ilgos mėginių ekstraktų valymo procedūros. Tačiau be pasiskirstymo vandeniniame sluoksnyje, analitės papildomai sąveikauja su

sorbento paviršiuje esančiomis aktyviomis funkcinėmis grupėmis [3]. Pavyzdžiui, jei nejudria faze naudojamas silikagelis, katijoninė analizė gali dalyvauti jonų mainuose su neigiamą krūvį turinčiomis disocijavusiomis silanolinėmis grupėmis. Taip pat analizės gali būti papildomai sulaikomos atvirkščių fazių mechanizmu, joms sąveikaujant su siloksaniniais tilteliais, esančiais silikagelio paviršiuje, tačiau ši sąveika yra gana silpna. Kai kuriais atvejais papildomos sąveikos žymiai pagerina atskyrimo atrankumą, tačiau dažnai tai yra smailių išsiplėtimo ir efektyvumo sumažėjimo priežastis. Nors aukščiau paminėtas sulaikymo mechanizmas negali pilnai paaiškinti kai kurių eksperimentinių rezultatų (pvz., kodėl esant mažoms organinio tirpiklio koncentracijoms judrioje fazėje, kai kurių polinių analizių sulaikymas vėl pradeda stiprėti?), alternatyvaus ir geriau aprašančio sulaikymą modelio iki šiol niekas nepasiūlė.

1.1.2. Įvairių veiksmų įtaka atskyrimui HILIC metode

Judrios fazės sudėtis. Judri fazė HILIC metode yra komponuojama iš vandens ir organinio tirpiklio. Populiariausias organinis tirpiklis, naudojamas šiame metode – acetonitrilas. Jo kiekis judrioje fazėje neturi būti didesnis už 95 % ir ne mažesnis nei 60 % [5]. Tirpiklių išstūmimo jėga HILIC sąlygomis stiprėja tokia eile: tetrahidrofuranas < acetonas < acetonitrilas < izopropanolis < etanolis < metanolis < vanduo [6, 9]. Siekiant užtikrinti hidrofilinės sąveikos mechanizmą, be acetonitrilo likusią judrios fazės dalį turi sudaryti grynas vanduo, vandeninis buferio tirpalas arba, žymiai rečiau, kiti didesnio poliškumo organiniai tirpikliai [9]. Didinant acetonitrilo koncentraciją judrioje fazėje, polinių analizių sulaikymas stiprėja. Judrios fazės išstūmimo jėgą galima papildomai reguliuoti, pakeičiant joje dalį acetonitrilo kitais tirpikliais.

Nors judrios fazės sudėtis HILIC yra iš esmės tokia pati kaip įprastoje atvirkščių fazių ESCh, tačiau jos įtaka atskyrimui HILIC metodu žymiai skiriasi nuo atvirkščių fazių ESCh. Judri fazė HILIC yra mažiau hidrofilinė negu sorbentas, o hidrofilinės jonų mainų ir vandenilinių ryšių sąveikos tarp analizių ir sorbento yra daug reikšmingesnės negu atvirkščių fazių ESCh [11].

Kai sulaikymą labiausiai įtakoja susidarantys vandeniliniai ryšiai, tuomet net menki organinės judrios fazės koncentracijos pokyčiai turi lemiamą įtaką atrankumui. Organiniai komponentai judrioje fazėje gali būti skirstomi į polinius, protoninius ir aprotoninius tirpiklius. Metanolis, etanolis, izopropanolis ir acto rūgštis yra poliniai, protoniniai tirpikliai. Poliniai, aprotoniniai tirpikliai HILIC judrioje fazėje yra acetonitrilas ir tetrahidrofuranas. Poliniai, protoniniai tirpikliai gali būti ir donoriai, ir akceptoriai vandenilinėse jungtyse, o aprotoniniai tirpikliai gali būti tik vandenilio ryšio akceptoriais. Dėl sugebėjimo sudaryti vandenilinius ryšius, poliniai, protoniniai tirpikliai gali efektyviau konkuruoti su vandens molekulėmis dėl polinių aktyvių centrų, taip trikdydami vandeninio sluoksnio susidarymą ant HILIC sorbento paviršiaus. Tokiu būdu sorbento paviršius tampa labiau hidrofobinis [12], o analitės linkusios sudaryti stiprius vandenilinius ryšius silpniau sulaikomos. Nustatyta, kad tam tikroms analitėms atskirti gali būti naudojamas ir bevandenis HILIC metodas. Pvz., vandenį judrioje fazėje pakeitus metanoliu, etanoliu ar etilenglikoliu, nukleozidų ir nukleobazių sulaikymas sustiprėjo, dėl vandenį pakeitusio tirpiklio poliškumo sumažėjimo [9].

Norint susilpninti arba visai suardyti elektrostazines sąveikas kolonėlėje, naudojami buferiniai druskų tirpalai. Tačiau druskų pasirinkimas šioms sistemoms yra ribotas dėl jų menko tirpumo organinėje fazėje [13]. Dėl gero suderinamumo su masių spektrometriniu detektoriumi dažniausiai naudojami amonio acetatas bei formiatas. Tinkamos ir kitos druskos: trietilamino fosfatas, natrio perchloratas ir metilfosfonatas [3, 14]. Druskų panaudojimas suardant nepageidaujamas elektrostazines jonų mainų sąveikas susilpnina analičių sulaikymą bei pagerina jų smailių formą. Jei analitės ir sorbento paviršiaus krūviai vienodi (pvz. silikagelio sorbentas ir anijoninės analitės), tai didelė druskos koncentracija judrioje fazėje gali susilpninti esantį elektrostatinį atostūmį ir padidinti anijoninių junginių sulaikymo trukmę [15]. Didelė druskų koncentracija judrioje fazėje gali sustiprinti analičių sulaikymą dar ir dėl to, kad susiformavęs sorbento paviršiuje vandens sluoksnis prisotintas druskos

tampa labiau hidrofiliniu [13]. Nustatyta, kad ir druskos prigimtis nevienodai įtakoja analičių sulaikymą. Pvz., baziniai peptidai ant silpnomis anijonų mainų savybėmis pasižyminčio sorbento sulaikomi stipriau, naudojant trietilamino fosfato druską, tuo tarpu naudojant natrio metilfosfonatą, tie patys peptidai buvo sulaikomi žymiai silpniau. Tai paaiškinama tuo, kad fosfatas sukuria papildomą sluoksnį, kuriame vienas neigiamas krūvis pritraukiamas prie teigiamai įkrauto sorbento, o kitas laisvas neigiamas krūvis pritraukia teigiamai įkrautas peptidų funkcinės grupės. Natrio metilfosfonato atveju laisvas tik vienas neigiamas krūvis, kuris gali sąveikauti arba su sorbento paviršiumi, arba su baziniais peptidais [14].

pH įtaka atskyrimui. Panašiai kaip ir atvirkščių fazių ESCh, HILIC metode judrios fazės pH gali stipriai įtakoti sulaikymą tik jei analizė ir/arba sorbento funkcinės grupės dalyvauja protonizacijos/deprotonizacijos procesuose. Dažniausiai judrios fazės pH varijuojama silpnai rūgščioje ir neutralioje terpėse, kadangi šarminėje terpėje sorbentai silikagelio pagrindu pradeda irti. Didinant judrios fazės pH, sorbento paviršiaus silanolinės grupės deprotonizuojasi ir jo paviršiuje padidėja neigiamų krūvių tankis. Tokiu atveju, dėl sustiprėjusios elektrostatinės sąveikos su teigiamai įkrautais baziniais junginiais, jų sulaikymas stiprėja [16]. Tuo tarpu rūgštinėms analizėms dėl elektrostatinės stūmos sustiprėjimo jų sulaikymas silpnėja [13]. Jei, keičiant judrios fazės pH, keičiasi ir sorbento paviršiaus, ir analizės krūvis, tuomet, priklausomai nuo konkrečios situacijos, analizės sulaikymas gali stiprėti, ženkliai nesikeisti arba silpnėti. Neutralių junginių sulaikymo judrios fazės pH neįtakoja.

Kolonėlės temperatūra. Bendru atveju nuo kolonėlės temperatūros priklauso judrios fazės klampa bei analizės difuzijos greitis judrioje fazėje, o tuo pačiu ir jos pasiskirstymo tarp fazių greitis. Temperatūros pakėlimas pagreitina atskyrimą bei dažniausiai pagerina smailių efektyvumą. Be to, buvo nustatyta, kad aukštesnėje temperatūroje judrios fazės poliškumas sumažėja. Kiekybiškai įvertinta, kad acetonitrilo koncentracijos padidėjimas judrioje fazėje 1 %, sulaikymo faktorių paveikia taip pat, kaip judrios fazės

temperatūros pakėlimas 4°C [16, 18-20]. Temperatūros įtaka priklauso ir nuo analičių prigimties bei nuo jų sąveikos su sorbentu principo. Todėl temperatūros įtaka skirtingose HILIC sistemose gali būti nevienoda. Nustatant aspiriną aminopropilsilikagelio kolonėlėje, keliant temperatūrą jo sulaikymo trukmė didėjo, o amido, silikagelio ir cviterjoninėje kolonėlėse – mažėjo [9]. Temperatūra gali įtakoti ne tik atskyrimo efektyvumą ar analitės sąveiką su sorbentu, bet ir pačios analitės būvį. Pvz., gliukozės tautomerija vyksta tirpale priklausomai nuo temperatūros; aukštesnė temperatūra gali sulėtinti kai kurių angliavandenių izomerų susidarymą ir taip papildomai įtakoti jų chromatografinę elgseną [21, 22].

1.1.3. HILIC sorbentai

HILIC atskyrimai dažniausiai atliekami ant įvairių silikagelio pagrindu susintetintų polinių sorbentų. Nemodifikuotas **silikagelis** iki šiol bene dažniausiai buvo naudojamas HILIC metode, ypač mažesnių polinių junginių atskyrimui [23]. Komerciškai prieinami silikageliai skiriasi grynumu ir kitomis savybėmis. A tipo silikagelis yra rūgštinis ir praturtintas metalais, kurie aktyvuoja paviršiaus silanolines grupes bei gali sudaryti kompleksus su chelatus sudarančiais junginiais, taip sustiprindami jų sulaikymą bei smailių asimetriškumą. Naujesni, geriau išvalyti ir ne tokie rūgštiniai silikagelio sorbentai (B tipo silikagelis) turi žymiai mažesnius metalų kiekius ir yra stabilesni pH intervale iki pH 9. Šio tipo silikagelis pasižymi geresniu atskyrimu, ypač analizuojant bazinius junginius. C tipo silikagelis yra modifikuojamas jo paviršiuje silanolines grupes pakeičiant silicio hidrido $\equiv\text{Si-H}$ grupėmis. Jis gali turėti iki 95 % silicio hidrido grupių ir yra mažiau polinis negu paprastas silikagelis. Toks silikagelis gali būti naudojamas ir atvirkščių fazių, ir hidrofilinės sąveikos chromatografijoje [2].

Silikagelio grynumas, ar netgi kolonėlės užpildymo juo procedūrų skirtumai labai stipriai įtakoja atskyrimą bei smailių formą. Tokių problemų išvengiama naudojant kolonėles užpildytas silikageliu pritaikytu būtent HILIC metodui [3]. Įprastai HILIC metode naudojamas silikagelis, kurio dalelių dydis

3-5 μm . 2007 m. Waters firma įvedė į rinką 1,7 μm dalelių dydžio silikagelio sorbentą, skirtą dirbti HILIC režimu ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu [23].

Aminopropilsilikagelis buvo pirmasis modifikuotas silikagelio sorbentas, naudojamas angliavandenių atskyrimui HILIC metodu [3]. Šiuo metu šis sorbentas sėkmingai pritaikytas ir amino rūgštims, peptidams, karboksirūgštims, nukleozidams, oligosacharidams ir kt. junginiams atskirti HILIC metodu [23, 24]. Protonizuojantis amino grupė aminopropilsilikagelio sorbente atsiranda papildoma anijonų mainų sąveika su neigiamai įkrautomis analitėmis [13]. Todėl jeigu baziniai junginiai dėl vandenilinių ryšių ir papildomos katijonų mainų sąveikos su silanolinėmis grupėmis yra stipriau sulaikomi ant nemodifikuoto silikagelio, tai rūgštiniai junginiai rodo didesnę giminiškumą aminopropilsilikagelio sorbentui, o kartais, gali net negrįžtamai adsorbuotis jo paviršiuje [2].

Lyginant su silikageliu, aminopropilsilikageliu užpildytose kolonėlėse dirbant su buferiniais judrių fazių tirpalais pusiausvyra nusistovi per ilgesnį laiką [25]. Be to, HILIC režime dėl ilgainiui išsiplaunančių aminopropilo ligandų jo stabilumas bei analičių smailių forma yra blogesnė [26]. Skirtingų gamintojų aminopropilsilikagelio kolonėlės taip pat duoda skirtingus rezultatus dirbant HILIC sąlygose, ypač jei jos nėra skirtos būtent HILIC.

Amidu modifikuotas silikagelis naudojamas monosacharidų, peptidų, amonio junginių atskyrimui [23], tačiau netinka rūgštinių junginių analizei dėl galimų antrinių sąveikų su amido funkicine grupe [13]. Amido grupė silikagelio paviršiuje yra atskirta trumpa alkiline grupe ir, priešingai amino grupėms yra mažiau reaktinga, nepasižymi bazinėmis savybėmis, todėl analičių sulaikymas mažiau priklauso nuo pH [27]. Be to, rečiau pasireiškia negrįžtama adsorbcija, todėl chromatogramos gerai atsikartoja net po 500 injekcijų [28].

Pasiūlyti keli silikagelio pagrindu susintetinti sorbentai, kurių paviršius padengtas **polisukcinimidu** kovalentinėmis jungtimis sujungus polisukcinimidą ir aminopropilsilikagelį. Pirmiausia silikagelio paviršius

padengiamas poliamido/imido grandinėmis taip, kad dalis polisukcinimido žiedų yra atviri ir gali jungtis su laisvomis aminopropilo grupėmis. Tačiau tikrai dalis polisukcinimido žiedų sudaro tokias jungtis, tuo tarpu kiti žiedai lieka laisvi ir gali jungtis su nukleofilinėmis savybėmis pasižyminčiais junginiais, taip gaunant skirtingų savybių sorbentus. Pvz., tokiu būdu buvo prijungta poliaspartamo rūgštis, silpnai dalyvaujanti katijonų mainuose, poli-2-sulfoetilaspartamidas, stipriai dalyvaujantis katijonų mainuose ir poli-2-hidroksietilaspartamidas. Šio tipo sorbentai buvo plačiai naudojami peptidų, nukleino rūgščių, glikopeptidų, folatų ir kt. medžiagų atskyrimui [6, 8, 29, 30]. Tačiau ilgesnį laiką eksploatuojant minėtus sorbentus, dėl hidrolizės prijungti ligandai išplaunami, blogėja kolonėlės efektyvumas ir atskyrimas [3, 23]. Todėl atsiradus įvairesniems, būtent HILIC metodui skirtiems sorbentams, polisukcinimidu modifikuotas silikagelis beveik nebenaudojamas.

Poliškumo atžvilgiu, **dioliu modifikuotas silikagelis** yra labiausiai nemodifikuoto silikagelio savybes atitinkantis sorbentas. Šio tipo sorbentai naudojami kaip alternatyva silikageliui, siekiant išvengti atskyrimą apsunkinančios analičių adsorbcijos ant nemodifikuoto silikagelio. Dioliu modifikuotas sorbentas yra neutralus, pasižymi dideliu poliškumu, o prijungti ligandai atsparūs hidrolizei [3, 23]. HILIC režime, kuriame nepageidaujama joninė sąveika su silanolinėmis grupėmis, jis turėtų būti idealiai tinkamas [3]. Dioliu modifikuotas silikagelis negrįžtamai nesulaiko redukuojančių angliavandenių, tačiau nesant amino grupių, lėčiau vyksta mutarotacija, todėl atsiranda dvigubos smailės. Tai ištaisoma į judrią fazę pridėjus 0,1 % etildiizopropilamino [31]. Kita vertus, analizuojant angliavandenius ir poliolių, dioliu modifikuotas sorbentas labiausiai tinkamas, nes redukuojantys cukrūs nesudaro su sorbentu Šifo bazių, kaip naudojant aminopropilsilikagelį [32, 33].

Propilnitrilu modifikuotas silikagelis kaip sorbentas buvo naudojamas nuo pat normalių fazių chromatografijos atsiradimo, tačiau HILIC metode jis taikomas retai [34]. Nors paprastai laikomas poline faze, jis nesudaro vandenilinių ryšių, todėl silpnai sulaiko analites. Pvz., palyginus keletą

sorbentų peptidų atskyrimui buvo nustatyta, kad propilnitrilo sorbentas jų visiškai nesulaiko [35]. Etilnitrilu modifikuoto silikagelio sorbentas buvo pritaikytas denatūrantų nustatymui alkoholio matricoje [36]. Nors sorbentas gali būti naudojamas ir su labai vandeningomis, ir su vien organinėmis judriomis fazėmis, jo naudojimą riboja trumpa eksploatavimo trukmė ir menkas skirtingų sorbento partijų atkuriamumas [37].

Ciklodekstrinai dėl savo įdomios kūgio formos struktūros ir cheminių savybių (viduje hidrofobiški, išorėje hidrofilieji) plačiai naudojami ne tik analizinėje chemijoje (chromatografijoje), bet ir organinėje chemijoje, vaistų tyrimuose, fermentų, biochemijos, maisto ir kosmetikos srityse. Plačiausiai taikomi α , β ir γ -ciklodekstrinai, kurie atitinkamai yra sudaryti iš 6, 7 ir 8 gliukozės žiedų [23]. Kadangi ertmės yra suformuotos iš optiškai aktyvaus cukraus, ciklodekstrinai plačiai naudojami kaip chiraliniai selektoriai daugelyje atskyrimo mokslo sričių [38]. Didžioji dalis hidroksigrupių yra išsidėstę ciklodekstrino kūgio išorėje, todėl juo modifikuotas silikagelis yra tinkamas naudoti HILIC metode atskiriant fosforintus angliavandenius [39] bei oligosacharidus [40, 41]. Analizuojant angliavandenius pastebėta, jog, lyginant su aminopropilsilikagelio sorbentais, ciklodekstrinais modifikuoti sorbentai pasižymi geresniu stabilumu ir atkuriamumu [42]. Ciklodekstrinais modifikuotas silikagelis yra daug žadantis sorbentas enantiomerų atskyrimui HILIC metodu [43].

Nesenai HILIC naudojamų sorbentų paletė pasipildė dar vienu, silikagelio pagrindu pagamintu ir cviterjoninėmis savybėmis pasižyminčiu **sulfoalkilbetaino** sorbentu. Šis sorbentas – tai porėtas silikagelis, padengtas polimeru su 3-sulfopropildimetilalkilamonio druskos funkcinėmis grupėmis. Dėl jo cviterjoninės struktūros, ant šio sorbento galima atskirti tiek katijoninius, tiek ir anijoninius junginius [23]. Sorbento paviršiuje moliniu santykiu 1:1 esančios ketvirtinio amonio ir sulfo rūgšties funkcinės grupės duoda artimą nuliui paviršiaus krūvį, tačiau sulfoalkilbetaino cviterjonas yra osmolitas, gebantis sorbento paviršiuje stipriai sulaikyti vandenį. Vandens sąveika su tokia stacionaria faze yra specifinė: vanduo pasiskirsto tarp

cviterjoninio polimero grandinių ir neleidžia kauptis kito tirpiklio molekulėms [44]. Be to, dėl cviterjoninių funkcinių grupių sorbentas nejautrus judrios fazės pH svyravimams. Todėl tokie sorbentai puikiai tinka atskyrimams tiek HILIC (neutraliems junginiams), tiek ir mišriu HILIC+jonų mainų (joniniams junginiams) režimu [44-47]. Norint atskirti jonines analites tik HILIC mechanizmu, į judrią fazę pridedama druskų, kurios slopina jonų mainų sąveikas.

Monolitiniai sorbentai – tai ištisinės struktūros sintetiniai sorbentai, sudaryti iš taip vadinamo monolitinio karkaso, išraižyto pratekančiomis poromis. Chromatografijoje jie naudojami jau beveik du dešimtmečius [48, 49]. Lyginant su didelio porėtumo tradicinių sorbentų dalelėmis, šie sorbentai pasižymi didesniu mechaniniu patvarumu. Be to, didelės pratekančios poros padidina judrios fazės pralaidumą, sumažina slėgį prieš kolonėlę, o didžiųjų porų sienelėse esančiose mikroporose greičiau vyksta masių pernaša. Iki šiol atlikti tik keli tyrimai su organinių polimerų monolitinių sorbentų taikymu HILIC metode [44, 50-53]. Šie monolitiniai sorbentai buvo panaudoti benzenkarboksi rūgšties darinių, mažos molekulinės masės amidų, pirimidinų, purinų bei peptidų atskyrimams HILIC metodu.

Nemodifikuotas monolitinis silikagelio sorbentas buvo panaudotas naprokseno ir varfarino atskyrimui HILIC metodu, tačiau kolonėlės efektyvumas pasirodė esąs blogesnis nei oktadecilo ligandu modifikuoto silikagelio monolitinio sorbento [54].

Apibendrinus literatūros duomenis galima konstatuoti, kad iki šiol dominuojančiu sorbentu HILIC metode vis dar išlieka nemodifikuotas silikagelis. Nors pastaraisiais metais rinkoje pasirodė įvairūs sorbentai kai kuriais aspektais ir yra pranašesni už silikagelį, tačiau didelė jų kaina bei blogesnis stabilumas neleidžia nukonkuruoti silikagelio.

1.1.4. HILIC metodo taikymas

Pirmieji taikomieji HILIC metodo darbai buvo skirti karbohidratų, amino rūgščių, peptidų tyrimui [22, 24, 55-57]. Tačiau pastaraisiais metais

pastebimas vis didėjantis susidomėjimas šio metodo galimybėmis atskirti ir nustatyti mažesnius polinius organinius junginius vaistuose, augalų ekstraktuose, maisto produktuose ir kt. objektuose [7, 25, 58-61].

Olsen [7] panaudojo HILIC farmacijoje naudojamiems poliniams junginiams nustatyti. Buvo palyginti nemodifikuoto silikagelio ir silikagelio su prijungtomis aminopropilo funkcinėmis grupėmis sorbentai. Nustatyta, kad pirimidino (uracilas, cirizinas, fluorocitozinas) bei purino (acikloviras, guaninas) grupių junginiai geriausiai atskiriami, naudojant aminopropilo grupėmis dengtus sorbentus, kai judri fazė sudaryta iš 80 % acetonitrilo bei 20 % vandeninio fosfatinio buferio (pH 6,5). Taip pat buvo tirta galimybė pakeisti judrioje fazėje vandenį mažiau poliniais alkoholiais (metanolio, *n*-propanolio). Buvo nustatyta, kad toks pakeitimas ženkliai padidina analizių sulaikymo trukmes bei pablogina smailių simetriškumą. Kitos junginių klasės – mažos molekulinės masės amidų atstovai – oksamidas, acetamidas, formamidas – geriau atskiriami naudojant nemodifikuoto silikagelio sorbentą.

Valette su kolegomis [25] tyrė tetraciklino grupės antibiotikų (tetraciklino, chlortetraciklino ir oksitetraciklino) nustatymo HILIC metodu ypatumus. Nors visi tirti junginiai analizės sąlygomis turi teigiamą krūvį, buvo pasirinktas aminopropilo grupėmis modifikuotas sorbentas, t.y. taip pat turintis teigiamą krūvį esant judrios fazės pH < 6. Toks variantas yra įmanomas, kadangi esant judrioje fazėje daugiau nei 50 % organinio tirpiklio, hidrofilinė sąveika tampa stipresnė už elektrostatinės stūmos jėgas tarp vienodo krūvio analizių ir sorbento funkcinių grupių. Naudojant šį sorbentą, buvo pasiektas geras efektyvumas bei smailių simetriškumas.

Guo ir Huang [59] panaudojo HILIC metodą trometamino nustatymui vaistuose. Atskirymui buvo naudojama aminopropilo nejudri fazė su vandens/acetonitrilo (20:80 v/v) judria faze ir refraktometriniu detektoriumi. Kitame darbe [60] panaši HILIC sistema sėkmingai pritaikyta manitoliui nustatyti. Gianotti ir kt. [61] sėkmingai panaudojo HILIC metodą biogeniniams aminams (kadaverinas, histaminas, putrescinas, spermidinas, sperminas, triptaminas ir tiraminas) sūryje nustatyti.

Kadangi HILIC metode paprastai naudojamos judrios fazės su palyginti didelėmis organinio tirpiklio koncentracijomis, šis metodas puikiai tinka kombinacijoje su masių spektrometriniu (MS) detektoriumi [62-65]. Pavyzdžiui, darbe [62] HILIC metodas buvo panaudotas antibiotikų, priklausančių aminoglikozidų grupei, nustatymui serume. Šių junginių nustatymui paprastai naudojami imuniniai analizės metodai, tačiau, deja, jie tinka ne visiems aminoglikozidams. Jonų porų chromatografijos bei normalių fazių adsorbcinės chromatografijos metodai netinkami naudoti su MS detektoriumi, kadangi šiuose chromatografijos variantuose naudojamos judrios fazės trikdo detektoriaus darbą. Tuo tarpu HILIC-MS metodui jokių apribojimų nėra.

Apibendrinant reikėtų pažymėti, kad iki šiol mokslinėje literatūroje pagrindinis dėmesys skiriamas HILIC metodo galimybių tyrinėjimui, įvairių tipų polinių organinių junginių atskyrimo ypatumų tyrimui ir tik palyginti nedidelėje dalyje darbų metodas taikomas realių objektų analizei.

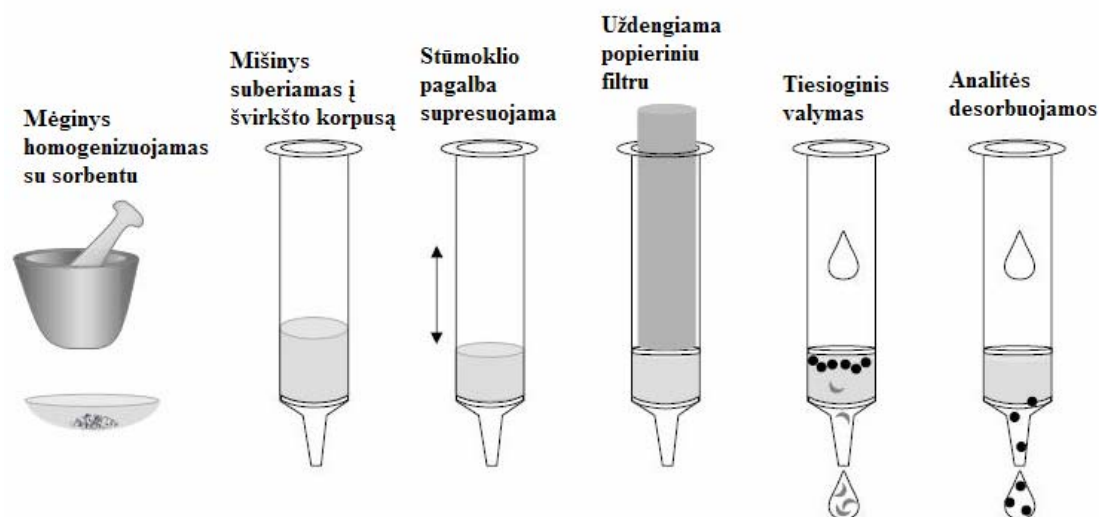
1.2. Kietafazė disperguojamoji ekstrakcija (KDE)

1.2.1. KDE metodo principai

Kietafazė disperguojamoji ekstrakcija (KDE) – mėginio paruošimo analizei metodas, 1989 m. pasiūlytas Barkerio su kolegomis [66] ir 1993 m. užpatentuotas. KDE metodas skirtas organinių junginių išskyrimui iš kietų, pusiau kietų, labai klampių ar netgi skystų mėginių. Šis metodas pastaraisiais metais vis plačiau taikomas mėginių paruošimui dėl keleto privalumų: nereikalinga papildoma aparatūra, ekstrakcijai naudojama mažai mėginio, sorbento ir desorbcijos tirpiklio, o pati ekstrakcijos procedūra yra nesudėtinga ir greitai. KDE metodo principinė schema pavaizduota 1.1 pav.

Mėginio porcija (apie 0,1-0,5 g) yra dedama į stiklo ar agato tiglą, kuriame jau yra atitinkamas kiekis kieto sorbento, pvz. oktadecilsilikagelio ar kt. Mėginys ir sorbentas sutrinamas stiklo ar agato grūstuve. Šioje stadijoje į mišinį gali būti įdedamas vidinis standartas arba analičių standartinis priedas.

Dispergavus mėginį su sorbentu, gaunamas pusiau sausas mišinys, kuriuo užpildoma kolonėlė ar švirkšto korpusas ir supresuojama stūmoklio pagalba. Analitės išplaunamos leidžiant per disperguotą mišinį vieno pasirinkto tirpiklio porciją ar keletą tirpiklių nuosekliai. Jei reikia analitės sukonzentruoti ar pakeisti tirpiklį, eliuatas nugarinamas, tirpinamas, filtruojamas ir analizuojamas.



1.1 pav. Principinė KDE metodo schema.

Siekiant papildomai išvalyti ekstraktus, prieš suberiant su sorbentu disperguotą mėginį, į kolonėlės dugną gali būti pridedama kokio nors kito sorbento porcija [67]. Tokiu atveju, tekėdamas per papildomą sorbento sluoksnį, tos pačios procedūros metu, eliuatas dar labiau išgryninamas tradiciniu kietafazės ekstrakcijos principu.

KDE remiasi keletu paprastų cheminių ir fizikinių principų. Mechanškai maišant mėginį su kietu sorbentu, suardoma mėginio struktūra, o mėginio matrica sąveikauja su sorbento paviršiuje esančiomis prijungtomis grupėmis arba sorbento paviršiumi. Dispergavimo metu ne tik susmulkinamas mėginys, bet ir inicijuojamos įvairios hidrofilinės, hidrofobinės ar kt. mėginio komponentų ir sorbento sąveikos. Norint gerai disperguoti skystus, neklampus mėginius (vyną, sultis, pieną, riebalus) dažniausiai užtenka maišymo. Tuo

tarpu kieti mėginiai dažnai pirma homogenizuojami atskirai, o vėliau sutrinami su pasirinktu sorbentu. Kaip ir chromatografinėje kolonėlėje, dėl pasiskirstymo ir/arba adsorbcijos pusiausvyrų analitės pasiskirsto tarp disperguoto mėginio, sorbento ir desorbcijos tirpiklio. Kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodo išskirtinė savybė yra ta, kad analitės tolygiai adsorbuojasi visame sorbento tūryje, o ne viršutiniame sorbento sluoksnyje. Homogeniškas plonas mėginio sluoksnis ant sorbento dalelių leidžia efektyviai vykti masės pernašos procesams. Todėl KDE metode aukštai išgavai pasiekti užtenka palyginti nedidelių desorbcijos tirpiklių tūrių [68]. Deja, detalesni tyrimai apie KDE ekstrakcijos mechanizmą iki šiol neatlikti.

Klasikiniai kietų ar pusiau kietų mėginių paruošimo metodai chromatografiniai analizei prasideda mėginio smulkinimu, sutrynimu, tirpinimu ar veikiant kitais mechaniniais būdais, kurie suardo jo struktūrą. Daugelis tokių procesų suardo mėginio struktūrą iki ląstelių lygmens, tačiau tai ne visada atliekama efektyviai. Norint visiškai suardyti mėginio ląsteles, kad būtų dar lengviau atlikti mėginio komponentų išskyrimą bei ekstrakciją, be mechaninio veikimo dažnai papildomai skaidoma fermentais, naudojami tirpikliai, rūgštys, šarmai, buferiai, aštrios dalelės, druskos, detergentai arba chelatus sudarantys agentai. Toliau mėginiai yra ekstrahuojami tirpikliais, ekstraktai papildomai valomi, filtruojami, centrifuguojami, jei reikia, džiovinami naudojant bevandenę druską ar kitokias higroskopines medžiagas. Neretai po šių procedūrų vis dar susiduriama su nepageidaujamu emulsijų susidarymu, prarandama dalis analizių. Minėtos procedūros reikalauja daug laiko ir darbo sąnaudų. Po visų žingsnių skirtų grynam ekstraktui gauti, lieka daug nereikalingų atliekų, neretai kenksmingų aplinkai tirpiklių. KDE metodas atitinka keletą žaliosios chemijos (*green chemistry*) [69] koncepcijos principų: sujungti keli analizių išskyrimo etapai, taupomas laikas, naudojama „sausą“ chemiją, naudojamas mažas mėginio kiekis. Dirbant su kietais ar pusiau kietais mėginiais KDE metodas eliminuoja tradicinių metodų sunkumus ir tokiu būdu žymiai pagreitina ir supaprastina mėginio paruošimą [70, 71].

1.2.2. Veiksniai įtakoję KDE efektyvumą ir atrankumą

Sorbento prigimtis. Sorbento savybės turi lemiamą įtaką KDE metodo efektyvumui ir atrankumui. Didelę įtaką KDE procesui turi sorbento dalelių dydis. Labai mažo dydžio (3-20 μm) sorbento dalelės labai sulėtina analitų desorbciją, o kartais net ir visiškai užkemša kolonėlę, todėl norint pasiekti reikalingą eluocijos greitį būtina papildomai naudoti vakuumą arba slėgį [72]. Plačiausiai naudojami sorbentai, kurių dalelių dydis siekia 40-100 μm , o porų dydis 60-100 Å. Tokiu atveju net ir be papildomo slėgio pasiekiami dideli eluocijos greičiai. Be to, didesnio dalelių dydžio sorbentai dar ir žymiai pigesni. Dažniausiai naudojami mėginio ir sorbento masės santykiai yra 1:2-1:4 srityje. Konkrečiam mėginiui ir analitams šis santykis paprastai nustatomas empiriškai metodo optimizavimo metu [73].

Disperguojančiu sorbentu gali būti naudojami ir modifikuoti, ir nemodifikuoti sorbentai. Pastariesiems priskiriami silikagelis [74, 75], diatomitinė žemė [75, 76], florisilas [76-84], aliuminio oksidas [85], smėlis [86] ir anglis [87]. Pvz., optimizuojant fenolinių junginių išskyrimą iš vyno sąlygas, geriausios išgavos (99,5-100,9 %) buvo gautos sorbentu naudojant silikagelį. Nors įprastai KDE metode mėginys pirmiausia disperguojamas su kietu sorbentu, ekstrahuojant skystus mėginius, mėginio porcija, prieš tai suregulavus pH ir joninę jėgą, gali būti pilama tiesiai į kolonėlę užpildytą atitinkamu sorbentu. Tokiu būdu sunaudojamas mažesnis mėginio kiekis, o paruošimas tampa dar paprastesniu [75]. Tačiau, mūsų nuomone, toks variantas turėtų būti priskiriamas jau nebe KDE, o kietafazės ekstrakcijos metodui. Nustatyta, kad silikagelis tinkamiausias sorbentas pesticidų likučių ekstrakcijai iš bičių pikio [74]. Tačiau dėl matricos sudėtingumo, KDE metu išekstrahuojama ir gana daug trukdančių medžiagų, todėl reikalingos papildomos ekstrakto valymo procedūros.

Diatomitinė žemė yra ne sintetinis, o natūralios kilmės sorbentas, sudarytas iš silicio oksido ir aliuminio, geležies, magnio, natrio, kalio, kalcio, titano oksidų priemaišų ir pasižymintis dideliu porėtumu (porų dydis 100-1000

nm) [88]. Naudojant šį sorbentą pesticidų likučių nustatymui, be papildomo ekstraktų valymo pasiekiamos 71-118 % išgavos [75].

Optimizuojant fungicidų išskyrimą KDE metodu iš vyno [76], fosfororganinių junginių išskyrimą iš dulkių [78], chlororganinių pesticidų išskyrimą iš dirvožemio [79], iš augalų [80, 84], iš sulčių [82] ir iš tabako [83] buvo pasirinktas florisilas. Florisilas – magnio silikato sorbentas, pasižymintis mažesniu poliškumu nei silikagelis ar aliuminio oksidas [76] ir gerai adsorbuojantis polinius junginius. Deja, šis sorbentas nėra labai atrankus, todėl beveik visuose darbuose buvo naudojami papildomi ekstrakto valymo būdai.

Nors aliuminio oksidas dažniausiai naudojamas papildomu sorbentu ekstraktų valymui ir pigmentų pašalinimui, keletas autorių panaudojo jį kaip pagrindinį KDE sorbentą [81, 85]. Po išsamių statistinių skaičiavimų, įvertinančių įvairių (disperguojančiojo sorbento, ekstrakto valymo sorbento, desorbcijos tirpiklio prigimtį) veiksnių įtaką KDE efektyvumui, aliuminio oksidas buvo pasirinktas, kaip tinkamiausias sorbentas 36-ių chlororganinių pesticidų ekstrakcijai iš galvijų pašaro [81]. Kitame darbe [85] pesticidų išskyrimui iš gyvulinės kilmės riebalų, geriausios išgavos (90-101 %) taip pat buvo pasiektos su aliuminio oksidu.

Šiuolaikinėje analizėje siekiama išvengti ar bent sumažinti toksiškų reagentų naudojimą, trumpinti darbo trukmę, miniatiūrizuoti įrangą ir taip sumažinti kaštus. Flavonoidų bei fenolinių junginių nustatymui augalinėse matricose disperguojančiu sorbentu pasiūlytas jūros smėlis [86, 89, 90]. Sorbentas prieš analizę plaunamas dejonizuotu vandeniu ir metanolio. Nors didžiausias jo privalumas – nedidelė kaina, tačiau adsorbcijos savybėmis jis taip pat nenusileidžia tradiciniams komerciniams sorbentams. Pvz., antocianinų ekstrakcijai iš juodųjų serbentų palyginus oktaedcilsilikagelį ir jūros smėlį, buvo gauti labai panašūs KDE efektyvumo rezultatai, o atsižvelgus į sorbentų kainą, smėlis pripažintas tinkamesniu analizei [86].

Darbuose [91, 92] teigiama, kad nemodifikuoti sorbentai tik suardo mėginio matricos struktūrą, o modifikuoti sorbentai – dar ir papildomai sorbuoja analites, tačiau šis teiginys nepagrįstas jokiais eksperimentiniais

tyrimais. Dažniausiai KDE metode naudojami modifikuoti atvirkščių fazių sorbentai. Neabejotinai pats populiariausias – oktadecilsilikagelio (C18) sorbentas [81, 86, 87, 93-103]. Eilėje darbų [81, 95, 99] nustatyta, kad prijungtos alkilo grupės pagerina hidrofobiškesnių mėginio komponentų tirpumą bei geriau išvalo ekstraktus iš gyvulinės kilmės matricų – raumenų, kepenų, inkstų ar riebios žuvies. Desorbcijai dažniausiai naudojami poliniai tirpikliai (acetonitrilas, metanolis, etanolis ar jų mišiniai) [68, 104].

C18 sorbentas yra labai universalus analičių ir mėginio matricos atžvilgiu. Jis naudojamas mikotoksinams riešutuose ir obuolių produktuose [93, 105], pesticidams vaisiuose, daržovėse [96, 99], galvijų pašaruose [81], mėsoje [97], veterinariniams vaistams pieno produktuose ir mėsoje [101, 102], akrilamidui miltų produktuose [94], izoflavonoidams augaluose [87], fenoliniams junginiams vynuogėse [103], policikliniams aromatiniais angliavandeniams jūros gėrybėse [99], vaistams audiniuose [95] nustatyti. C18 puikiai disperguoja daug lipidų turinčius mėginius, pvz. kepenis. Toks mėginys pirmiausiai homogenizuojamas, o vėliau disperguojamas su sorbentu [97]. C18 sorbento savybes ir tinkamumą ekstrakcijai lemia dar ir tai, ar likutinės silanolinės grupės yra užblokuotos. Esant atitinkamam pH laisvos silanolinės grupės gali dalyvauti papildomose sąveikose su analitėmis. Pvz., palyginus du C18 ligandais modifikuotus sorbentus antocianinų ekstrakcijai, naudojant sorbentą su neužblokuotomis likutinėmis silanolinėmis grupėmis buvo gautos geresnės išgavos ir grynesni ekstraktai [86].

Mažiau populiarius C8 ir C30 ligandais modifikuoti sorbentai buvo panaudoti pesticidų [106, 107] ir karotinoidų ekstrakcijai [108] iš vabzdžių ir iš augalų, tačiau jokiais išskirtiniais privalumais, lyginant su C18, nepasižymėjo.

Naudojant aminopropilsilikagelį ar kitus pirminiais ir antriniais aminais modifikuotus sorbentus, gaunami daug švaresni sudėtingų riebių mėginių ekstraktai, nei naudojant C18 modifikuotą silikagelio sorbentą. Amino ligandais padengti sorbentai atrankesni, nes pasižymi dar ir anijonų mainų savybėmis. Tai labai patogu dirbant su biologinėmis matricomis, kuriose reikia

efektyviai sulaikyti riebiąsias rūgštis [84]. Amino grupėmis modifikuoti sorbentai taikyti ir pesticidų išskyrimui iš augalinės kilmės mėginių [109].

Be aukščiau paminėtų sorbentų, KDE metode naudojami ir mažiau populiarūs netradiciniai sorbentai. Vieni iš jų – molekuliniai įspaudų polimeriniai sorbentai (MIPs). Tokie polimerai dėl savo unikalaus atrankumo konkrečiai analitei ar jų grupei yra prilyginami imunoafininėms medžiagoms. MIPs pasižymi dideliu stabilumu plačiame pH intervale, aukštesnėse temperatūrose, yra mechaniškai tvirti ir pakankamai pigūs. MIPs dažniau naudojami dirbant su sudėtingomis biologinėmis matricomis, kurių sudėtyje yra daug analizei trukdančių riebalų, baltymų ir kt. junginių. Nustatyta [109], kad išskiriant penkis fluorokvinolonus iš kiaušinių ir kiaulės raumens matricų, molekuliniai įspaudų sorbentas atrankumu ženkliai pranoksta įprastus C18 ir florisilo sorbentus. Chloramfenikolio – draudžiamo naudoti antibiotiko – išskyrimui taip pat buvo pritaikytas MIPs. Ekstrahuojant žuvies mėginius, šis sorbentas pasižymėjo didele sorbcijos talpa bei puikiu atrankumu analitei. Buvo gautos pakankamai aukštos išgavos (89,8-101,4 %), tačiau pasiekti minimalią reikalaujamą nustatymo ribą (0,3 ng/g) nepavyko [96]. Molekuliniai įspaudų polimeriniai sorbentai buvo panaudoti KDE metodu nustatinėjant klenbuterolį galvijų kepenyse [111].

Flavanoidams išskirti iš medicinoje naudojamų vaistinių augalų KDE metodu buvo susintetintas laurilo ligandais modifikuotas chitozono polimeras. Laurilo grupės prijungimas prie chitozono stipriai padidino sorbento hidrofobiškumą ir susilpnino vandenilinių ryšių susidarymą [112].

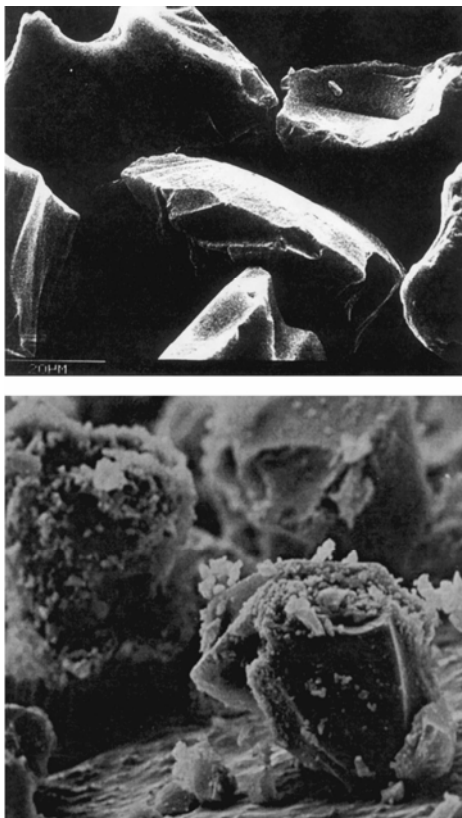
Ekstraktų valymas. Net ir rūpestingai parinkus sorbentą bei analičių desorbcijos tirpiklį, kartais KDE metode nepavyksta gauti pakankamai gryno ekstrakto, tinkamo tiesioginei tolimesnei analizei. Tuomet į mėginio paruošimo procesą įterpiama ir ekstrakto valymo procedūra. Pirminio ekstrakto valymas dažniausiai apjungiamas su pačiu ekstrakcijos procesu, todėl mėginio paruošimo procedūros trukmė ir darbo sąnaudos nepadidėja. Tai atliekama į KDE kolonėlės apačią papildomai pridėjus nedidelę porciją sorbento, kuris sorbuoja priemaišas. Disperguojantis ir ekstraktą valantis

sorbentai turi pasižymėti skirtingomis sorbcinėmis savybėmis. Dažniausiai normalių fazių (poliniai) sorbentai naudojami sulaikyti polinius junginius, kurie ekstrahuojasi iš mėginio, disperguoto su atvirkščių fazių (nepoliniais) sorbentais [113-116]. Pavyzdžiui, silikagelis yra naudojamas ekstraktų valymui ekstrahuojant fungicidus, pesticidus ir insekticidus iš vaisių ir daržovių matricų oktadecilsilikageliu [113, 114], o anglis – pašalinti kartu su analitėmis iš daržovių mėginių išsiekstrahavusius pigmentus [115].

Kitas būdas padidinti KDE metodo atrankumą – papildomas disperguoto mėginio „praplovimas“ prieš ekstrakciją [117-119]. Jo pagalba išplaunami trukdantys analizei pašaliniai junginiai, o analitės lieka disperguotame mėginyje. Įprastai trukdančios medžiagos išplaunamos 1-2 ml tirpiklio/100 mg sorbento-mėginio mišinio. Srauto greitis turi būti toks, kad plovimo tirpiklis kontaktuotų su sorbentu tik apie 1-2 minutes. Hidrofilinėms priemonėms atsikirti nuo hidrofobinių analizių dažniausiai naudojamas plovimas dejonizuotu vandeniu arba 10-20 mmol/l koncentracijos buferiniais tirpalais. Pvz., vanduo buvo naudojamas pašalinti cukrų ir kitas polines medžiagas iš vaisių mėginių, disperguotų ant C18 modifikuoto silikagelio paviršiaus [117]. Nepoliniai junginiai, pvz. riebalai ar riebiosios rūgštys, yra pašalinami plaunant su mažiau poliniais tirpikliais ar jų mišiniais, pvz., etilacetatu ar etilacetato-metanolio mišiniu [118]. Bet kuriuo atveju, siekiant neprarasti analizių, praplovimo procesą būtina griežtai kontroliuoti. Jei praplovimo tirpiklis nesimaišo su desorbcijos tirpikliu, po praplovimo disperguotas mišinys išdžiovinamas. Džiovinimas atliekamas naudojant vakuumą, prapučiant N₂ ar CO₂ srove arba centrifuguojant. Kai desorbcijos tirpiklis maišosi su vandeniu, tuomet galima visai nenaudoti kolonėlės džiovinimo [119].

Mėginio matricos prigimtis. KDE metu didelę dalį sorbento paviršiaus padengia mėginio matrica, taip sudarydama dar vieną kietą fazę (1.2 pav.). Taigi, mėginio matrica KDE procese dalyvauja kaip chromatografinės sistemos dalis, t.y. kaip papildoma fazė. Todėl akivaizdu, kad ekstrakcijos efektyvumas turėtų priklausyti ir nuo mėginio matricos prigimties. Deja, iki

šiol neatlikti išsamūs mėginio matricos įtakos KDE tyrimai. Nepaisant to, daromos prielaidos, kad pvz. riebalų, baltymų ir kitų mėginio matricos komponentų kiekis ir papildoma jų sąveika su sorbentu/analitėmis KDE metode turi įtakos analičių desorbcijos eigai ir ekstrakcijos efektyvumui [72, 97].



1.2 pav. Gryno silikagelio sorbento dalelių (viršuje) ir to paties sorbento disperguoto su jaučio kepenų mėginiu dalelių nuotraukos [72].

Analičių desorbcija. Paskutinis KDE etapas – analičių desorbcija tirpikliais. Kaip ir kituose ekstrakciniuose methoduose, KDE metode labai svarbu tinkamai suderinti tirpiklio, analičių ir disperguojančio sorbento poliškumus. Tirpiklis turi puikiai drėkinti mėginį, gerai tirpinti analites ir efektyviai bei kuo atrankiau desorbuoti jas iš sorbento paviršiaus. Akivaizdu, kad suderinti visas šias tirpiklio savybes nėra paprastas uždavinys, todėl dažniausiai tirpiklis parenkamas empiriškai bandymų ir klaidų keliu. Teisingai parinkus vieną ar nuosekliai kelis skirtingo poliškumo tirpiklius galima atskirti skirtingo poliškumo analites arba netgi frakcionuoti cheminius junginius pagal

klases. Vynuogių mėginiams, desorbuojant HCl parūgštintu vandeniu ir po to etanolio, pirma buvo išplautos organinės rūgštys, o vėliau fenoliniai junginiai [103]. Patogu naudoti tirpiklius, kurie maišosi su vandeniu, kadangi tuomet galime nedžiovinti kolonėlės. Be to, tirpiklio savybės turi būti tinkamos tolimesniems mėginio paruošimo etapams bei detektavimui. Taikant koncentravimą nugarinimu arba ekstrakto analizę dujų chromatografijos metodu, tirpiklis turėtų būti pakankamai lakus. Skysčių chromatografijai – desorbcijos tirpiklis turėtų būti suderinamas su atskyrimui naudojama judria faze. Dažniausiai desorbcijos tirpikliai naudojami metanolis, acetonitrilas, acetonas, etilacetatas, dichlormetanas, heksanas, tirpiklių mišiniai su skruzdžių ar acto rūgštimis (1-5 %) ar su lakių aminių (trietilamino, trimetilamino) priedais, kurie neutralizuoja likutinių silanolinių grupių krūvį [83].

Optimalus tirpiklis ir jo tūris konkrečiai sistemai paprastai parenkami eksperimentiškai. Dažniausiai naudojami tirpiklio tūriai – 5-15 ml. Be abejo, desorbcijos tirpiklio tūris priklauso nuo mėginio/sorbento kiekio. Kartais pakanka net itin mažų tirpiklio kiekių: pvz., tik 0,5 ml parūgštinto metanolio pakako pilnai išekstrahuoti chloramfenikolį iš 0,07 g žuvies mėginio disperguoto su 0,1 g MIP sorbento [96]. Karotenoidams desorbuoti iš špinatų mėginio užteko 0,5 ml acetono, prieš tai vandens-metanolio mišiniu pašalinus trukdančias polines medžiagas [108].

Desorbcijos metu svarbu kontroliuoti greitį, t.y. tirpiklio tekėjimo disperguotu mėginiu srautą. Desorbuodami per dideliu greičiu galime pilnai neišplauti analičių, o jei tirpiklis leidžiamas labai lėtai – blogėja ekstrakto grynumas. Įprastai desorbuojama 1-5 ml/min greičiu naudojant vakuuminį siurbį [96], o kartais ir be jo [81].

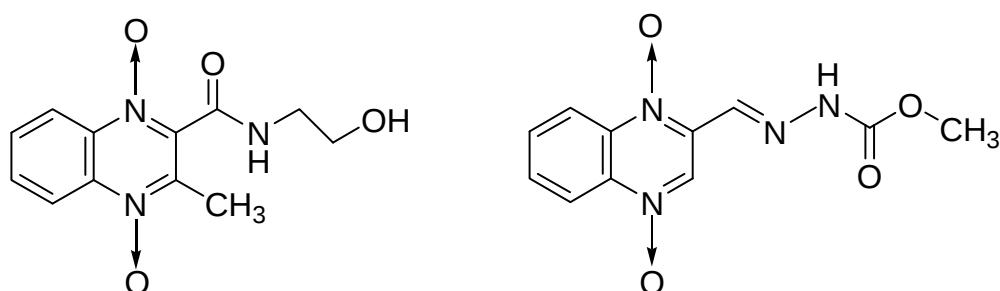
Apibendrinant galima konstatuoti, kad KDE metodas ženkliai sumažina sunkumus, atsirandančius atliekant klasikinę skysčių-skysčių ar kietafazę ekstrakciją iš kietų arba pusiau kietų sudėtingos matricos mėginių. Pagrindiniai KDE metodo privalumai – paprastumas ir greitis. Metodo trūkumams reikėtų priskirti tai, kad iki šiol didžioji publikuotų darbų dalis yra grynai taikomojo pobūdžio. Nėra fundamentalesnių, apibendrinančių bei palyginamųjų tyrimų,

nėra darbų, tiriančių KDE ekstrakcijos mechanizmą. Tai apsunkina metodo pasirinkimo ir optimizavimo naujoms analizinėms sistemoms darbus.

1.3. Karbadoksas ir olakvindoksas

1.3.1. Savybės ir taikymas

Karbadoksas ($C_{11}H_{10}N_4O_4$, sisteminis pavadinimas 3-(2-kvinoksalinmetileno) karbazido rūgšties metilesterio N,N'-dioksidas, molinė masė 262,22 g/mol) ir olakvindoksas ($C_{12}H_{13}N_3O_4$, sisteminis pavadinimas N-(2-hidroksietil)-3-metil-2-kvinoksalinkarboksamido-1,4-dioksidas, molinė masė 263,25 g/mol) – sintetiniai, antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys junginiai (1.3 pav.). Tai geltonos spalvos bekvapės kristalinės medžiagos, tirpios tiek karštame, tiek šaltame vandenyje ir poliniuose organiniuose tirpikliuose.



1.3 pav. Olakvindokso (kairėje) ir karbadokso struktūrinės formulės.

Ilgą laiką šie sintetiniai junginiai buvo naudojami kaip antimikrobiniai vaistai bei augimą skatinančios medžiagos gyvulininkystėje ir paukštininkystėje. Šeriant gyvulius pašarais, papildytais šiais vaistais, didėja masės augimo efektyvumas. Toks poveikis aiškinamas keliais principais – antimikrobiniai vaistai sunaikina bakterijas, kurios naudoja maisto medžiagas ir išskiria toksinus, trukdančius virškinimo traktui jas pasisavinti, žarnyne mažėja lengvų infekcijų bei greitėja maisto medžiagų absorbuojimas, o tai savo ruožtu duoda didžiulę ekonominę naudą [121].

Tačiau nuolatinis augimą skatinančių medžiagų naudojimas žemės ūkyje kenkia gyvulių bei žmonių sveikatai. Atlikus tyrimus, įrodančius olakvindokso

ir karbadokso kancerogeninį, mutageninį bei fotoalerginį [122-126] poveikį, nuo 1999 metų Europos Sąjungoje jų naudojimas buvo uždraustas [127]. 2004 metais šios medžiagos buvo uždraustos Kanadoje, o JAV šiuos preparatus vis dar leidžiama naudoti kaip kiaulių pašarų priedą ne ilgiau nei likus 42 dienoms iki skerdimo. Tuo tarpu Kinijoje augimą skatinančios medžiagos vis dar plačiai naudojamos [126].

Siekiant efektyviai kontroliuoti nelegalų uždraustų medžiagų naudojimą, būtini jautrūs, specifiški, greiti ir ekonomiškai analizės metodai.

1.3.2. Karbadokso ir olakvindokso nustatymo metodai

Ilgą laiką vaistų likučių kontrolei buvo naudojami mikrobiologiniai metodai, kuriuose antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant vaistų difuziją agare su pasėtais mikroorganizmais [128]. Antibakterinių medžiagų buvimą mėginyje, rodo agaro gelyje susiformavusios vieno ar kelių mikroorganizmų inhibicijos zonos. Antibakterinių medžiagų įvairovė labai plati, todėl remiantis mikrobiologiniais testais sunku identifikuoti jų kilmę. Mikrobiologiniai metodai nėra atrankūs, dažniausiai gaunamas tik bendras teigiamas/neigiamas atsakas.

Imunofermentiniai metodai yra pagrįsti konkurentinėmis reakcijomis tarp analitės ir peroksidaze žymėtos analitės bei analitei ir jos analogams specifinių antigenų [129]. Mikrokiuветės padengiamos specifiniais analitei antigenais. Pridėjus tiriamo antibiotiko standartinio tirpalo ar mėginio ekstrakto ir fermentu pažymėto antibiotiko, laisvi ir fermentu pažymėti antikūnai konkuruoja ir susijungia su mikrokiuветėje esančiais antigenais, o kompleksų nesudarę antikūnai išplaunami. Pridėjus substrato (dažniausiai tetrametilbenzidinas) reakcijos mišinys įgauna spalvą. Reakcija stabdoma rūgštimi, o optinis tankis matuojamas fotometriškai. Komerciškai prieinamų imunofermentinių rinkinių aprašymuose deklaruojama, jog analičių aptikimo riba – 100 µg/kg pašaruose bei 2 µg/kg mėsos, krevečių, žuvies matricose [130]. Deja, imunofermentiniais metodais gaunami kiekybinės analizės rezultatai yra palyginti netikslūs, todėl šie metodai naudojami tik kaip

apžvalginiai, t.y. atrinkti užterštus mėginius kokybiškai nustčius juose vaistus.

Dėl didelio karbadokso ir olakvindokso poliškumo bei menko lakumo jų nustatymui dujų chromatografija beveik nenaudojama. Prieš du dešimtmečius Aerts su kolegomis [131] olakvindokso nustatymui kiaulių kepenyse panaudojo kapiliarinės dujų chromatografijos metodą. Siekiant padidinti analitės lakumą, ji buvo derivatizuojama iki metilo esterio. Nors metodas buvo pakankamai jautrus (nustatymo riba – 3 µg/kg), sudėtinga mėginio paruošimo (skysčių-skysčių ekstrakcija+ekstrakto valymas) ir derivatizacijos procedūra riboja platesnį jo taikymą.

Vėlesniuose darbuose karbadokso ir/arba olakvindokso bei jų metabolitų nustatymui buvo taikomas tik ESCh metodas [132-143]. Detektavimui dažniausiai naudojami fotometriniai arba masių spektrometriniai (MS) detektoriai.

Karbadokso ir jo metabolito kvinoksalin-2-karboksirūgšties nustatymui mėsoje pasiūlytas ESCh su fotometriniu detektoriumi metodas [132]. Vaistai ekstrahuojami 0,3 % metafosforo rūgšties ir metanolio (7:3 v/v) mišiniu, gautas ekstraktas papildomai valomas Bond Elut C18 kietafazės ekstrakcijos kolonėlėje. Atskyrimas ESCh metodu atliekamas kolonėlėje, užpildytoje 5 µm dalelių dydžio C18 sorbentu. Judria faze naudojamas 0,01 mol/l fosfatinis buferis (pH 2) su acetonitrilo priedu, srauto greitis 0,6 ml/min. Analčių išgavos iš kiaulės raumens ir kepenų siekia 85,0-94,3 % (1 mg/kg koncentracijai), o nustatymo ribos – 0,5 mg/kg karbadoksui ir 0,1 mg/kg jo metabolitui. Viso analizės ciklo trukmė – 2 val.

Karbadokso ir jo metabolitų nustatymui kiaulės audiniuose ESCh metodu panaudota analčių pokolonėlinė derivatizacija natrio hidroksidu [133]. Analitės išskiriamos ekstrahuojant mėginį metanolio-acetonitrilo mišiniu, ekstraktas valomas kietafazės ekstrakcijos būdu aliuminio oksido-florisilo kolonėlėje ir papildomai dar ekstrahuojamas izooktanu. Detektuojama fotometriškai prie 420 nm. Nustatymo riba – 5 µg/kg, o išgavos svyruoja nuo 81 iki 87 %. Akivaizdu, kad mėginio paruošimui naudojamos trys ekstrakcijos

bei papildomas derivatizacijos procesas labai apsunkina visą nustatymo procedūrą.

Daugelis siūlomų metodų skirti aptikti ir nustatyti draudžiamas medžiagas ar jų metabolitus tuomet, kai šios patenka į maistui naudojamus produktus. Tačiau svarbiausia, kuo anksčiau sustabdyti nelegalų draudžiamų medžiagų naudojimą augimo skatinimui [134], kad jos nenueitų ilgo kelio nuo gyvulininkystės iki galutinio maisto produkto. Tam reikalingi patikimi, nesudėtingi, mažai laiko ir reagentų reikalaujantys tyrimų metodai šioms medžiagoms nustatyti dar pašaruose. Nustatant vaistus pašaruose dažniausiai jie yra ekstrahuojami iš mėginio matricos organiniais tirpikliais, o po to ekstraktas papildomai valomas skysčių-skysčių arba kietafazės ekstrakcijos metodais [135, 136]. Tai pakankamai ilgos ir reikalaujančios daug darbo procedūros. Pašarų analizė sudėtinga dar ir dėl to, jog jų sudėtyje yra įvairiausių organinės ir neorganinės kilmės medžiagų: baltymų, riebalų, vitaminų, mineralų ir kt.

Pagal Luchterfeld pasiūlytą metodiką [137] karbadoksas 45 min ekstrahuojamas iš pašarų 2 % NH_4OH tirpalu acetone, gautas ekstraktas valomas skysčių-skysčių ekstrakcija heksanu, analizė nustatoma ESCh metodu detektuojant prie 365 nm. Karbadokso nustatymo riba – 0,024 mg/kg.

Kitame darbe [138] olakvindokso ir karbadokso nustatymui pašaruose, jie 30 min šildant 60 °C temperatūroje buvo ekstrahuojami anglies tetrachlorido-dimetilformamido mišiniu (80:20 v/v). Ekstraktas maišomas su vandeniu santykiu 25:45 v/v, vėl ekstrahuojamas ir po centrifugavimo vandeninis sluoksnis analizuojamas ESCh metodu su fotometriniu detektavimu (305 ir 262 nm). Esant 20-50 mg/kg analičių koncentracijoms pašaruose, išgavos siekia 92 ± 9 % karbadoksui ir 93 ± 6 % olakvindoksui.

Uždraustų veterinarinių vaistų (tame tarpe ir olakvindokso) kontrolei buvo sukurtas ESCh-MS/MS metodas leidžiantis vienu metu identifikuoti ir kiekybiškai gyvulių pašare nustatyti keletą junginių [139]. 2,5 g pašarų mėginio buvo 30 min ekstrahuojama 10 ml metanolio/vandens mišinio (70:30 v/v), gautas ekstraktas 10 min centrifuguojamas, skiedžiamas vandeniu ir

valomas kietafazės ekstrakcijos būdu OASIS kolonėlėje. Analitės desorbavus 2 ml acetonitrilo/vandens (50:50 v/v) mišinio ir praskiedus acetonitrilu, tirpalas buvo analizuojamas C18 sorbentu užpildytoje kolonėlėje. Atskirymui naudotas gradientinis judrios fazės režimas iš 0,3 % skruzdžių rūgšties vandeninio tirpalo ir acetonitrilo. Priklausomai nuo pašarų matricos, nustatymo riba olakvindoksui siekė 0,55-0,62 mg/kg.

Vėliau šis metodas tų pačių autorių pastangomis buvo tobulinamas siekiant supaprastinti ekstrakcijos procedūrą [140]. Nuodugniai ištyrę įvairius tirpiklius ir jų mišinius autoriai nustatė, kad vis dėlto olakvindokso ekstrakcijai geriausiai tinka pirmame darbe naudota ekstrakcijos procedūra. Metodas buvo įteisintas ir pritaikytas skirtingiems pašarų mėginiams analizuoti [141]. Validuojant šį metodą tyrimuose dalyvavo 11 ES laboratorijų. Tyrimų rezultatai parodė, jog pasiūlytas ESCh-MS/MS metodas yra tinkamas nustatyti uždraustas antibiotines medžiagas pašaruose.

Karbadokso ir olakvindokso nustatymui kiaulių pašaruose Hutchinson ir kolegos [142] optimizavo ESCh-MS metodą. Analitės 30 min ekstrahuojamos acetonitrilo/chloroformo (50:50 v/v) mišiniu, ekstraktas džiovinamas azoto srovėje 65° C temperatūroje, tirpinamas judrioje fazėje ir analizuojamas. MS detektoriumi buvo registruojami 231 ir 90 m/z karbadokso, bei 212 ir 143 m/z olakvindokso molekuliniai jonai. Vaistų nustatymo ribos siekė 0,5 mg/kg. Būtina pažymėti, kad tai vienintelis mums žinomas metodas, kuriame nenaudojama papildoma ekstraktų valymo procedūra.

Gizzi su bendraautoriais [143] karbadokso ir olakvindokso nustatymui pašaruose panaudojo ESCh su skenuojančiu fotometriniu detektavimu metodą. Mėginio paruošimui autoriai naudojo [139] darbe aprašytą dviejų ekstrakcijų procedūrą. Metodas buvo panaudotas tarplaboratoriniuose tyrimuose ir nustatyta, kad analičių išgavos iš pašarų yra 80-110% ribose, o metodo glaudumas neviršija 20%.

Apibendrinus literatūros duomenis galime išskirti dvi pagrindines problemas. Pirmoji – ilgas ir daug darbo sąnaudų reikalaujantis kietų mėginių paruošimo analizei procesas. Kita, aukščiau pateiktoje apžvalgoje neminėta

problema susijusi su karbadokso ir olakvindokso chromatografiniu atskyrimu. Iki šiol abu junginiai buvo atskiriami tik atvirkščių fazių ESCh metodu. Abi analitės – poliniai junginiai, todėl ant atvirkščių fazių chromatografijos metode naudojamų nepolinių sorbentų jos sulaikomos ganėtinai silpnai. Tokiu būdu jų atskyrimui būtina naudoti tik labai silpną išstūmimo jėgą pasižyminčias vandenines judrias fazes su nedideliais (2-10 %) organinių tirpiklių (metanolio arba acetonitrilo) priedais. Tokios vandeningos judrios fazės pagreitina brangaus chromatografinės kolonėlės sorbento degradaciją. Be to, dėl polinių analizių sąveikos su likutinėmis silanolinėmis grupėmis labai pablogėja smailių efektyvumas. Galiausiai, šios sąlygos ypač nepalankios serijinėms analizėms, kadangi realiuose mėginiuose esantys hidrofobiškesni junginiai yra stipriau sulaikomi ir po kiekvienos analizės reikia ilgai plauti kolonėlę siekiant atstatyti pradines sąlygas.

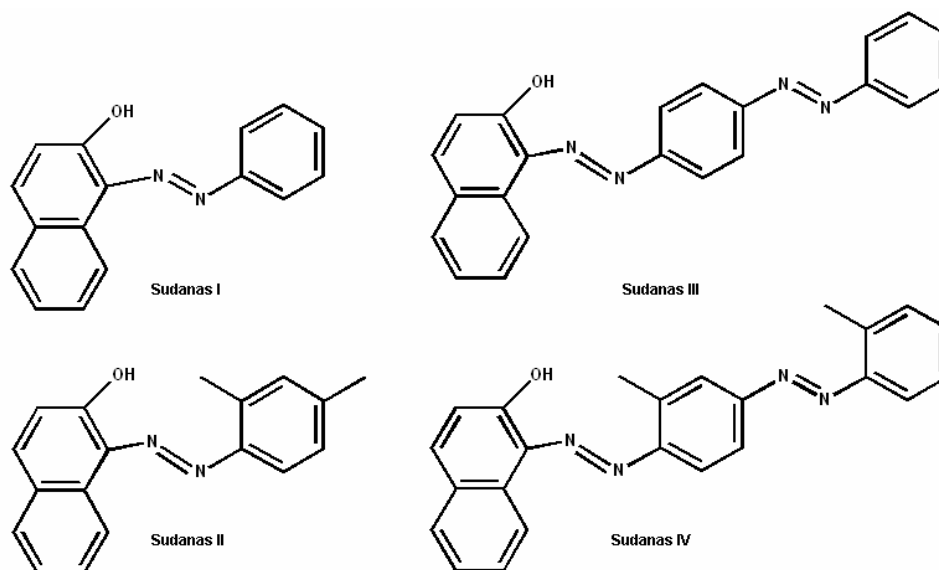
1.4. Sudano dažikliai

1.4.1. Dažiklių savybės ir taikymas

Azo dažikliai – svarbi sintetinių dažiklių grupė, kuriai charakteringa viena ar keletas azo grupių ($-N=N-$) prisijungusių prie dviejų benzeno žiedų. Sintetinių azo dažiklių yra labai daug: literatūroje jų priskaičiuojama iki 2000. Priklausomai nuo cheminės sudėties ir panaudojimo srities, azo junginiams priskiriamas taip vadinamas „spalvos indeksas“. Šie monoazo, diazo, triazo, poliazo dažikliai su atitinkamai priskirtais spalvos indeksu numeriais plačiai naudojami lakų, popieriaus, audinių, rašalo, tapybos priemonių, plastikų, kosmetikos pramonėje bei spalvotoje fotografijoje. Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros duomenimis, kai kurie azo grupės dažikliai pasižymi mutageniniu, kancerogeniniu ir teratogeniniu poveikiu gyvūnams ir žmonėms [144].

Sudano I-IV dažikliai (1.4 pav.) pagal struktūrą priskiriami diazo grupės dažikliams. Normaliomis sąlygomis Sudano dažikliai yra miltelių ar kristalų pavidalo. Visų keturių dažiklių absorbcijos maksimumai yra regimosios šviesos srityje, intervale nuo 485 iki 520 nm. Šie dažikliai netirpsta vandenyje, bet tirpsta šiek tiek mažesnio poliškumo (etanolyje ar metanolyje) ir

nepoliniuose organiniuose tirpikliuose. Ištirpinti organiniuose tirpikliuose Sudano I-IV dažikliai yra intensyvios geltonos-raudonos spalvos. Ištirpę dažikliai nesijonizuoja [145].



1.4 pav. Sudano dažiklių struktūrinės formulės.

Dažikliai labai lengvai sąveikauja su lipidais ir juos nudažo [146]. Tai, kad Sudano I-IV dažikliai nesąveikauja su jokiais kitais substratais, lemia platų jų panaudojimą biocheminiuose tyrimuose, dažant trigliceridus, riebiąsias rūgštis, jais galima kokybiškai ir kiekybiškai nustatyti lipidų buvimą [147]. Sudanas II ir III buvo panaudoti gaminant kosmetiką ir vaistus, kurie naudojami tik išoriškai, o Sudanas IV buvo panaudotas sintetinant polimerus skirtus gaminti optines duomenų laikmenas [148].

Kai kuriose šalyse (Indijoje, Pakistane, Turkijoje, Libane ir kitose Tolimųjų ir Vidurio Rytų šalyse) Sudano dažikliai yra naudojami maisto pramonėje, siekiant paryškinti ir išlaikyti reikiamą spalvą čili pipirų milteliuose, prieskoniuose ir palmių aliejuje, kadangi natūrali šių produktų spalva ilgai neišlaikoma. Tačiau Europos Sąjungoje Sudano I-IV dažiklių panaudojimas maisto pramonėje yra uždraustas nuo 1999 m. [149]. Buvo nustatyta, kad organizme vykstant biocheminėms reakcijoms, dažiklių skilimo produktai – fenoliai ar aromatiniai aminai – yra mutageniški ir kancerogeniški. Sudanas I pagal ES kriterijus klasifikuojamas kaip trečios kategorijos

kancerogenas ir trečios kategorijos mutagenas [150]. Sudano II, III ir IV dažiklių skilimo produktai priskiriami antros kategorijos kancerogenams. Remiantis atliktais tyrimais nustatyta, kad antros kategorijos kancerogenai sukelia piktybinius navikus žmonėms ir nėra jų koncentracijų, kurios galėtų būti nepavojingos [151]. Vartojant maisto produktus net su nedideliu kiekiu Sudano dažiklių, išlieka rizika vėžiniams susirgimams atsirasti, nes bet kokios, net ir mažiausios 2 kategorijos kancerogenų dozės yra pavojingos vartotojų sveikatai. Todėl importuojant prieskonius, čili pipirus, palmių aliejų ar jų produktus iš šalių, kuriose Sudano dažikliai vis dar naudojami maisto pramonėje, reikalingi tyrimai, leidžiantys greitai ir tiksliai nustatyti ar mėginiai nėra užteršti.

1.4.2. Sudano dažiklių nustatymo metodų apžvalga

Sudano dažikliai dažniausiai nustatomi tos pačios rūšies mėginiuose – čili pipiruose, jų produktuose, palmių aliejuje ir padažuose. Dažiklių išskyrimas iš mėginių dažniausiai atliekamas skysčių-skysčių ekstrakcijos metodu. Populiariausi skysčių ekstrakcijos tirpikliai yra *n*-heksanas [152], acetonas, [153, 154], cikloheksanas [155, 156], acetono/dichlormetano/metanolio mišinys [157], acetonitrilas [158]. Be tradicinės skysčių-skysčių ekstrakcijos buvo naudota mikroekstrakcija [159], kietafazė ekstrakcija su derivatizacija [152], poveikis ultragarsu [155] ir temperatūra [157], ekstrakcija aukštame slėgyje [160].

Priešingai nei karbadokso ir olakvindokso atveju, Sudano dažiklių nustatymo metodų įvairovė yra platesnė: naudojami efektyviosios skysčių chromatografijos ir jai giminingi metodai, voltamperometriniai ir imunofermentiniai analizės metodai.

Chromatografiniai metodai. Sudano dažikliai dažniausiai atskiriami atvirkščių fazių ESCh metodu nepoliniu C18 sorbentu užpildytose kolonėlėse. Judri fazė paprastai formuojama iš acetonitrilo ar metanolio su vandeniu ar vandeniniu skruzdžių rūgšties tirpalu. Metodai skiriasi tik detektavimo sąlygomis.

Calbiani su bendraautorais [154] Sudano I-IV dažiklių nustatymui pasiūlė atvirkščių fazių ESCh metodą su MS/MS detektavimu. Sudano dažikliai 30 min ekstrahuojami acetonu. Ekstraktas filtruojamas ir skiedžiamas vandeniu. Dažikliai atskiriami per 20 min C18 sorbentu užpildytoje kolonėlėje izokratinės eliucijos režime eliuuojant judria faze, sudaryta iš metanolio ir vandeninio 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalo (97:3 v/v). Metodas pritaikytas Sudano I-IV dažiklių nustatymui čili pipiruose, jų tyrėje ir sūrio padaže. Čili pipirų tyrėje nustatymo ribos svyruoja nuo 5 iki 17 µg/kg, o čili pipiruose ir sūrio padaže nustatymo ribos yra 25-50 µg/kg intervale. Vėliau šis metodas buvo patobulintas naudojant kapiliarinę skysčių chromatografiją ir detektuojant trigubo kvadrupolio masių spektrometru. Aptikimo ir nustatymo ribos sumažėjo daugiau nei 10 kartų [161].

Murty ir kolegų darbe [162] analičių nustatymui siūlomas pastaruojų metu beveik nenaudojamas normalių fazių ESCh metodas su MS/MS detektavimu. Atskirymui naudota silikagelio kolonėlė, o judria faze pasirinktas heksanas su 0,3 % izopropanolio priedu. Analitės iš mėginių ekstrahuojamos trimis porcijomis heksano, ekstraktas sausinamas natrio sulfatu ir analizuojamas. Nustatymo riba čili pipiruose siekia 0,12 mg/kg.

Siekiant efektyviau išekstrahuoti septynis azo dažiklius iš čili padažų, čili pipirų miltelių, kario ir kurkuma prieskonių bei čili mėsos, buvo optimizuotas ekstrakcijos aukštame slėgyje (70 bar, 95°C) metodas su papildomu ekstrakto valymu molekulinės sietų chromatografijos būdu [160]. Pilna mėginio paruošimo analizei trukmė siekia 60 min. Ekstraktas analizuojamas ESCh-MS/MS metodu. Nors šis metodas ypač jautrus (nustatymo ribos pipirų milteliams siekia net 0,006-0,036 µg/kg) ir efektyvus (išgavos siekia 94-105%), mėginio paruošimas reikalauja specializuotos įrangos bei aukštesnės operatoriaus kvalifikacijos, todėl nėra tinkamas rutininėms analizėms.

Sun su bendraautorais [163] pasiūlytame ESCh-MS/MS metode čili tyrė, padažas ar čili pipirų minkštimas nuosekliai du kartus po 12 min ekstrahuojami acetonitrilo ir etilacetato mišiniu (50:50 v/v). Nugarintas likutis tirpinamas etilacetato ir cikloheksano mišinyje (50:50 v/v) ir valomas leidžiant

jį per kolonėlę su molekulinį sietų sorbentu. Dažikliai desorbuojami tokiu pat etilacetato ir cikloheksano mišiniu, eliuatas nugarinamas, tirpinamas metanolyje ir analizuojamas. Priklausomai nuo matricos prigimties, aptikimo ribos svyruoja nuo 0,4 iki 5,0 µg/kg. Dažiklių išgavos skirtingose matricose kinta nuo 81,7 % iki 92,9 %.

Kinų mokslininkai [152] Sudano I-IV dažiklių nustatymui kiaušiniuose panaudojo dujų chromatografijos su MS detektavimu metodą. Kiaušinių mėginys 2 kartus po 35 min ekstrahuojamas n-heksano/acetono (95:5 v/v) tirpalu, ekstraktas valomas kietafazės ekstrakcijos būdu aliuminio oksido kolonėlėje ir nugarinamas. Kadangi analitės nelakios, po nugarinimo jos papildomai derivatizuojamos N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetamidu. Mažiausių nustatomų koncentracijų intervalas – 2,0-4,2 µg/kg.

Kadangi Sudano dažikliai stipriai absorbuoja šviesą tiek UV, tiek ir matomoje bangos ilgių srityse, jų detektavimui po chromatografinio atskyrimo puikiai tinka ir fotometriniai detektoriai. Sudano dažiklių nustatymui ESCh metodu paprikose, aliejuje, padažuose, žemuogių tyrėje, sūdytuose kiaušiniuose buvo palyginti du detektavimo būdai – MS ir fotometrinis [164]. Mėginio paruošimui taip pat naudoti du būdai: mikroekstrakcija magnetinės maišyklės strypeliu (*stir-bar*) ir skystafazė mikroekstrakcija kapiliare. Atskyrimas buvo atliekamas C18 kolonėlėje izokratiniu režimu eliuuojant metanolio-tetrahidrofurano-vandens (40:30:10 v/v/v) arba acetonitrilo su 1 % vandeninio skruzdžių rūgšties (95:5 v/v) judriomis fazėmis. Fotometriškai detektuojama prie 478 nm (Sudanas I ir Sudanas II) ir 520 nm (Sudanas III ir Sudanas IV) bangos ilgių. Autoriai pažymi, kad abu mikroekstrakcijos metodai duoda panašius rezultatus, tačiau *stir-bar* variantas yra greitesnis, stabilesnis ir reikalauja mažesnio tirpalo tūrio lyginant su mikroekstrakcija kapiliare. Pastaruoju metodu lengviau dirbti ir nereikia papildomų prietaisų. Nors nustatymo ribos fotometriniam detektoriumi (0,09-0,95 µg/l) ir yra mažesnės už gautas detektuojant MS detektoriumi (2,5-6,2 µg/l), tačiau masių spektrometrinis detektavimas suteikia patikimesnę kokybinę informaciją apie Sudano dažiklius realiuose mėginiuose. Būtina pažymėti, kad aprašyti

mikroekstrakcijos metodai tinka tiesioginei analičių ekstrakcijai tik iš skystų mėginių. Tuo tarpu kietus mėginius prieš mikroekstrakciją būtina dar ir ištirpinti arba išskirti iš jų analites ekstrakcijos būdu.

Sudano I išskyrimui iš čili pipirų miltelių buvo panaudota kietafazė ekstrakcija molekulinį įspaudų polimeriniais sorbentais [165]. Palyginus du MIP sorbentus 4-vinilpiridino ir metakrilo rūgšties pagrindu buvo nustatyta, kad analizė geriau sorbuojama ant pirmojo sorbento. Sudano I desorbcijai sorbentas nuosekliai plaunamas chloroformu, dichlormetanu ir galiausiai metanolio. Atskyrimui naudota C18 kolonėlė, judri fazė – metanolio ir acetonitrilo mišinys (40:60 v/v) Detektavimas atliekamas UV srityje prie 254 nm bangos ilgio. Deja, šiuo metodu buvo gautos tik 70 % Sudano I dažiklio išgavos. Be to, kaip ir aukščiau paminėtu atveju, kietafazė ekstrakcija skirta skystiems (arba dujiniais) mėginiams, todėl prieš kietafazės ekstrakcijos procesą pipirų milteliai yra papildomai ekstrahuojami.

ESCh metodui su fotometriniu detektavimu pasiūlytas naujas, drumstimosi taško ekstrakcijos metodas (angl. *cloud point extraction*) [166]. Sudanų ekstrakcijai ir sukonzentravimui naudojama nejoninė paviršiaus aktyvi medžiaga Triton X-100. Analizuojant čili pipirus, mėginys bei Triton X-100/vandens/acetono mišinys 20 min kaitinamas 40 °C temperatūroje papildomai veikiant ultragarsu. Po centrifugavimo mėginio likutis pakartotinai ekstrahuojamas tuo pačiu būdu, ekstraktai apjungiami, veikiami Na₂CO₃ ir analizuojami. Atskyrimui naudojama gradientinė eliacija C18 kolonėlėje, judri fazė – acetonitrilo ir vandens mišinys. Dažiklių atskyrimo trukmė – 25 min. Junginiai detektuojami prie 500 nm. Taikant šį metodą Sudano I-IV dažiklių išgavos svyruoja 80,7-85,4% ribose, o dažiklių nustatymo ribos – 7,0-12,0 µg/kg. Mūsų manymu šis metodas visiškai neperspektyvus, kadangi ekstrakcijos procedūra pakankamai sudėtinga, o ekstrakcijai naudojama paviršiaus aktyvi medžiaga labai greitai sugadina chromatografinę kolonėlę.

Mejia su bendradarbiais [167] Sudano I-IV dažiklių nustatymui čili pipirų milteliuose panaudojo micelinę elektrokinetinę chromatografiją. Junginiai atskiriami poliimidu padengtame kapiliare, o detektuojami prie 214 nm bangos

ilgio. Darbe [168] pasiūlyta Sudano dažiklius nustatyti kapiliarinės elektrochromatografijos metodu naudojant neporėtu sorbentu užpildytas kapiliarines kolonėles. Detektuojama amperometriškai and anglies pluošto elektrodo (įtampa +0,95 V). Tačiau lyginant su ESCh metodais, abu siūlomi metodai nepasižymi nei greičiu, nei jautriu, o mėginio paruošimui naudotos standartinės skysčių-skysčių ekstrakcijos procedūros.

Keturių Sudano dažiklių nustatymui aitriosios paprikos produktuose pasiūlytas ESCh metodas su cheminės liuminescencijos detektavimu [169]. Detektavimo sistemoje nuolatine elektros srove generuojami nestabilūs BrO^- jonai šarminėje terpėje reaguoja su liuminoforu ir sukelia silpną šviesos emisiją. Sudano dažikliai šį silpną šviesos signalą sustipina daug kartų. Nustatymo ribos – 13-27 $\mu\text{g/kg}$. Autoriai siūlo šį metodą naudoti ne tik nustatant Sudano dažiklius aitriojoje paprikoje ir jos produktuose, bet ir naftos produktuose, dyzeline ir plastikuose. Tačiau cheminės liuminescencijos detektorius jautrus ne tik analitėms, bet ir pašaliniais junginiais, todėl mėginio paruošimui/valymui būtini net trys skysčių-skysčių ekstrakcijos etapai, kurių kiekvieno trukmė po 30 min.

Pasiūlytas ESCh metodas su ciklinės voltamperometrijos detektavimu, leidžiantis atskirti ir nustatyti visus keturis Sudano dažiklius gaiviuosiuose gėrimuose [170]. Detektavimui panaudotas daugiasieniais anglies nanovamzdeliais-skysto jonito gelio modifikuotas stikliškosios anglies elektrodas. Gaivieji gėrimai buvo nugarinami azoto sraute, praskiedžiami judria faze ir analizuojami. Metodą pritaikius realių mėginių analizei, analičių išgavos siekė 93-103 %. Deja, dažniausiai Sudano I-IV dažiklius reikia nustatinėti čili pipiruose, prieskoniuose ir panašiose matricose, o tikimybė, jog šių draudžiamų junginių pasitaikys gaiviuosiuose gėrimuose yra labai menka.

Elektrocheminiai analizės metodai. Kadangi Sudanas I pakankamai lengvai redukuojasi, t.y. pasižymi elektrocheminiu aktyvumu, jis gali būti nustatomas elektrocheminiais metodais. Pasirodė keletas publikacijų apie Sudano I dažiklio nustatymą voltamperometrijos metodu. Aitriosios paprikos milteliams tirti pasiūlyta ciklinė ir tiesinio skleidimo voltamperometrija ant

aktyvuotos stiklo anglies elektrodo [171], ciklinė ir kvadratinės bangos voltamperometrija ant daugiasieniais anglies nanovamzdeliais modifikuoto stiklo anglies elektrodo [172, 173] bei ant kalcio montmorilonitu modifikuoto anglies pastos elektrodo [174]. Tačiau minėti metodai nepasižymi atrankumu, todėl autoriai pažymi, kad tik derinant voltamperometrijos metodą su atskyrimo metodais, tokiais kaip ESCh ar kapiliarinė elektroforezė, galima sukurti atrankius ir efektyvius Sudano dažiklių nustatymo sudėtingose matricose metodus.

Imunofermentiniai metodai. Sudano dažikliams nustatyti kuriami ir imunofermentiniai metodai. Neseniai pasirodė publikacijos apie imunofermentinius tyrimus naudojant monokloninius antikūnius Sudanui I [175] ir Sudanams I bei III nustatyti [176]. Pavyko susintetinti labai specifiskus antikūnius, kurių dėka analizei netrukdo pašalinės kryžminės reakcijos. Tačiau matricos efektas vis vien įtakoja analizės eigą ir rezultatų tikslumą. Šį poveikį siūloma šalinti skiedžiant mėginius. Kaip jau buvo minėta, imunofermentiniais metodais gaunami kiekybinės analizės rezultatai yra palyginti netikslūs.

Baigiant būtina pažymėti, kad daugelyje apžvelgtų darbų tiriamos ir taikomos sudėtingos dažiklių išskyrimo ir koncentravimo procedūros siekiant pagerinti nustatymo jautrį. Deja, autoriai (sąmoningai ar ne?) pamiršta, kad priešingai nei veterinariniai vaistai, dažikliai į atitinkamus produktus dedami siekiant paryškinti ir išlaikyti produktų spalvą. Šiam tikslui reikalingi palyginti dideli (mg/kg eilės) dažiklių priedai. Tokių, sąlyginai didelių kiekių nustatymui čili pipirų produktuose žymiai svarbiau ne jautris, bet analizės procedūros paprastumas ir greitis.

II. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Aparatūra

Tyrimai UESCh metodu buvo atliekami ultraefektyviosios skysčių chromatografijos sistema Waters Acquity UPLC (Waters, Milford MA), sukomplektuota iš aukšto slėgio 2 kanalų gradientinio siurblio su automatiniu judrios fazės nудujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos ir fotodiodinės matricos (PDA) skenuojančio detektoriaus (190-500 nm). Įleidžiamo mėginio tūris – 10 µl. Judrios fazės tekėjimo greitis – 0,5 ml/min. Judrios fazės sudėtys ir eliucijos gradiento programa pateiktos atitinkamuose „Rezultatai ir jų aptarimas“ dalies skyriuose. Rezultatams apdoroti buvo naudojama „Empower“ programinė įranga.

Tyrimams buvo naudojamos šios kolonėlės (Waters):

Acquity UPLC BEH HILIC, 1,7 µm, 100 × 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 100 × 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH C8, 1,7 µm, 100 × 2,1 mm;

Acquity UPLC BEH Phenyl, 1,7 µm, 100 × 2,1 mm.

Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas ESCh metodu buvo atliekamas chromatografu Waters Alliance 2695, sukomplektuotu iš keturnario gradientinio siurblio, automatinės mėginio įleidimo sistemos ir fotometrinio detektoriaus Waters 2487. Įleidžiamo mėginio tūris – 20 µl. Judrios fazės tekėjimo greitis – 1 ml/min.

ESCh tyrimams buvo naudojamos šios kolonėlės:

LichroCART Purosphere RP-18, 5 µm, 250 × 4,6 mm;

Waters Symmetry Shield RP-8, 5 µm, 250 × 4,6 mm;

Zorbax Phenyl SDB, 5 µm, 150 × 4,6 mm.

Skysčių-skysčių ekstrakcijos metu gautų ekstraktų valymui naudotos AccuBond Alumina N (500 mg/5 ml) kietafazės ekstrakcijos kolonėlės (Agilent, Milford, MA, USA).

KDE ekstrakcijai buvo naudoti silikagelio (40-63 μm), aminopropilsilikagelio (40-63 μm), oktadecilsilikagelio (40-63 μm) ir florisilo (80-120 μm) sorbentai (Sigma-Aldrich).

2.2. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudotos tokios medžiagos:

Karbadoksas, 99,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Olakvindoksas, 98,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Sudanas I, 99,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Sudanas II, 99,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Sudanas III, 98,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Sudanas IV, 98,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Acetonitrilas, gradientinės ESCh grynumo (ROTH, Vokietija).

Metanolis, gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Etanolis, ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Acetonas, ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Etilacetatas, ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Pirminiai etaloniniai 100 mg/l koncentracijos karbadokso ir olakvindokso tirpalai buvo ruošiami svėrinius tirpinant acetonitrile. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminius etaloninius tirpalus bidistiliuotu vandeniu. Etaloniniai tirpalai buvo laikomi tamsiuose buteliuose 4°C temperatūroje.

Pirminiai etaloniniai 100 mg/l koncentracijos Sudano dažiklių tirpalai buvo ruošiami svėrinius tirpinant etanolyje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminius etaloninius tirpalus acetonitrilu. Etaloniniai tirpalai buvo laikomi tamsiuose buteliuose 4°C temperatūroje.

Visi judrios fazės tirpalai buvo filtruojami per 0,2 μm membraninį filtrą. Paršelių pašarų ir viščiukų lesalo mėginiai buvo gauti iš Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto. Visi mėginių paruošimo analizei tyrimai buvo atliekami su realių mėginių matricomis be analičių.

2.3. Procedūros

Optimizuotos KDE procedūros pateiktos atitinkamuose „Rezultatai ir jų aptarimas“ dalies skyriuose. Efektyvumas konkrečioms analitėms buvo skaičiuojamas pagal formulę:

$$N = 16 (t_R/w)^2$$

N – kolonėlės teorinių lėkštelių skaičius; t_R – atitinkamos analitės sulaikymo trukmė, min.; w – analitės smailės pagrindo plotis, min.

Kolonėlės teorinės lėkštelės aukštis H (mm) skaičiuojamas pagal formulę:

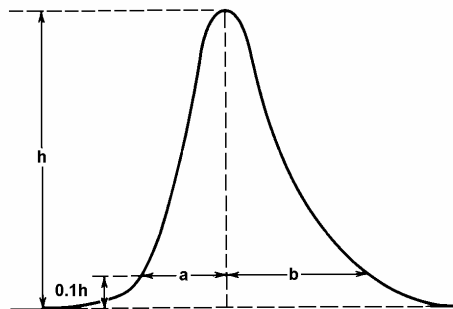
$$H = L/N$$

L – kolonėlės ilgis, mm.

Smailių asimetriškumo faktorius A_s buvo skaičiuojamas pagal formulę:

$$A_s = a/b$$

a ir b atstumai (žiūr. 2.1 pav.) išmatuoti ties $1/10$ smailės aukščio naudojant kompiuterinę programą.



2.1 pav. Smailių asimetriškumo matavimas.

III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Karbadokso ir olakvindokso nustatymas KDE-HILIC metodu

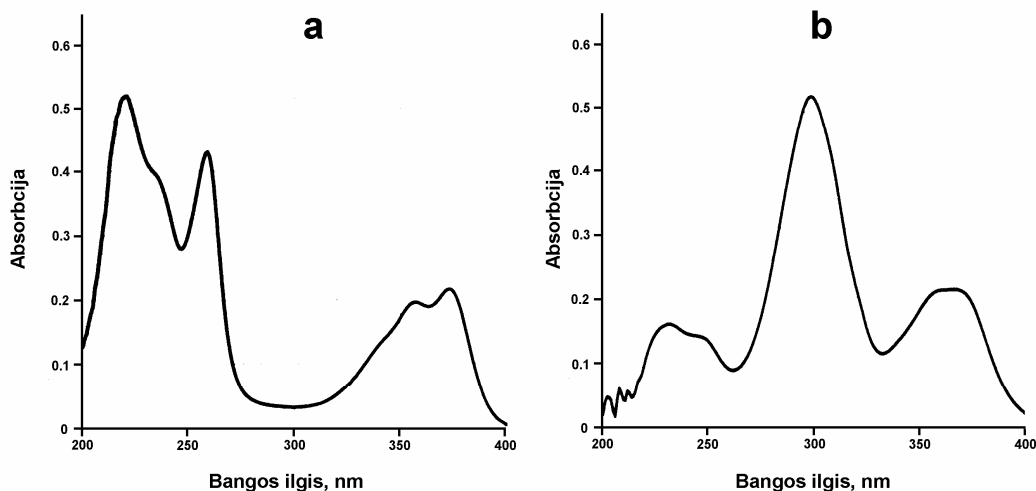
Nors karbadoksas ir olakvindoksas – poliniai junginiai, tačiau iki šiol jų atskyrimui buvo taikomas tik atvirkščių fazių ESCh metodas. Ant atvirkščių fazių chromatografijos metode naudojamų nepolinių sorbentų, poliniai junginiai sulaikomi labai silpnai, todėl jų atskyrimui būtina naudoti tik labai silpna išstūmimo jėga pasižyminčias judrias fazes. Tokios sąlygos ypač nepalankios serijinėms analizėms, kadangi realiuose mėginiuose esantys hidrofobiškesni junginiai yra stipriau sulaikomi ir po kiekvienos analizės būtina dar ilgai kondicionuoti kolonėlę judria faze, siekiant išplauti iš jos pašalinius komponentus. Be to, dėl papildomos sąveikos su likutinėmis silanolinėmis grupėmis polinių analizių smailės tokiose sąlygose dažniausiai būna asimetriškos bei išplitusios.

Siekiant išvengti aukščiau paminėtų problemų šiame darbe karbadokso ir olakvindokso atskyrimui pirmą kartą buvo panaudotas hidrofilinės sąveikos chromatografijos (HILIC) variantas. Tokį pasirinkimą lėmė dar ir tai, kad 2007 m. Waters įvedė į rinką naujos kartos 1,7 μm dalelių dydžio polinį silikagelio sorbentą Acquity UPLC BEH HILIC, skirtą polinių junginių atskyrimui UESCh metodu HILIC režime.

3.1.1. Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas HILIC metodu

Detektavimas. 3.1 pav. pateikti abiejų analizių absorbcijos spektrai, išmatuoti skenuojančiu fotometriniu detektoriumi. Nors olakvindoksas pasižymi stipriausia absorbcija prie 220 bei 258 nm bangos ilgių, siekiami didesnio atrankumo (200-260 nm srityje absorbuoja šviesą daugybę pašalinių junginių) jį detektavome prie 373 nm bangos ilgio. Optimalus detektavimo bangos ilgis karbadoksui – 300 nm. Paprastumo dėlei, žemiau pateiktuose atskyrimo bei ekstrakcijos sąlygų optimizavimo tyrimuose abi analizės buvo detektuojamos prie 373 nm, o matuojant analizes charakteristikas bei

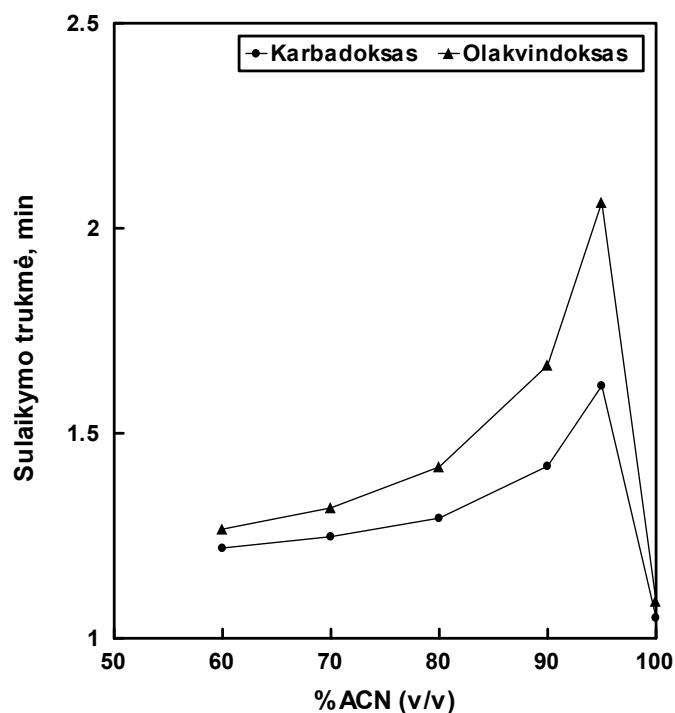
atliekant mėginių analizes, detektavimui jau naudojome du skirtingus bangos ilgius (300 ir 373 nm).



3.1 pav. Olakvindokso (a) ir karbadokso (b) absorbcijos spektrai (analičių koncentracija 5 mg/l).

Chromatografinės elgsenos tyrimas. Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas HILIC metodu iki šiol nebuvo tiriamas, todėl buvo atliekami išsamesni jų chromatografinės elgsenos tyrimai. Pirmiausiai buvo optimizuojamas tirpiklių (vandens-acetonitrilo) santykis judrioje fazėje. Gauti rezultatai pavaizduoti 3.2 pav. Didinant acetonitrilo koncentraciją vandeninėje judrioje fazėje nuo 60% iki 95%, analičių sulaikymas tolygiai stiprėja. Tai rodo, kad tiriamoje sorbentas/judri fazė sistemoje vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga už acetonitrilą. Tokia priklausomybė, kai vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga nei acetonitrilas, būdinga tiek hidrofilinės sąveikos, tiek ir normalių fazių adsorbcinės chromatografijos metodams. Tačiau perėjus prie 100% CH₃CN judrios fazės, analičių sulaikymo trukmės ženkliai sumažėjo (iki 1,1-1,2 min), o jų smailės išsiplėtė. Jei atskyrimas vyktų adsorbcinės normalių fazių chromatografijos mechanizmu, gryname acetonitrile analičių sulaikymas dar sustiprėtų, o efektyvumas neturėtų ženkliai pablogėti. Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, polinių junginių atskyrimas HILIC režime vyksta pasiskirstymo mechanizmu: silikagelio sorbento paviršiuje susidarantis adsorbuoto vandens sluoksnis atlieka skystos nejudrios fazės vaidmenį, o

analitės atskiriamos dėka nevienodo jų pasiskirstymo tarp stacionaraus adsorbuoto vandens sluoksnio ir mažiau polinės judrios fazės. Taigi, visiškai pašalinus vandenį iš judrios fazės analičių atskyrimo mechanizmas keičiasi iš HILIC į adsorbcinį, todėl drastiškai pasikeičia jų sulaikymo trukmės bei pablogėja smailių efektyvumas.



3.2 pav. Acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka analičių sulaikymo trukmėms. Judri fazė: CH₃CN/H₂O. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH HILIC. Tėkmės greitis - 0,25 ml/min.

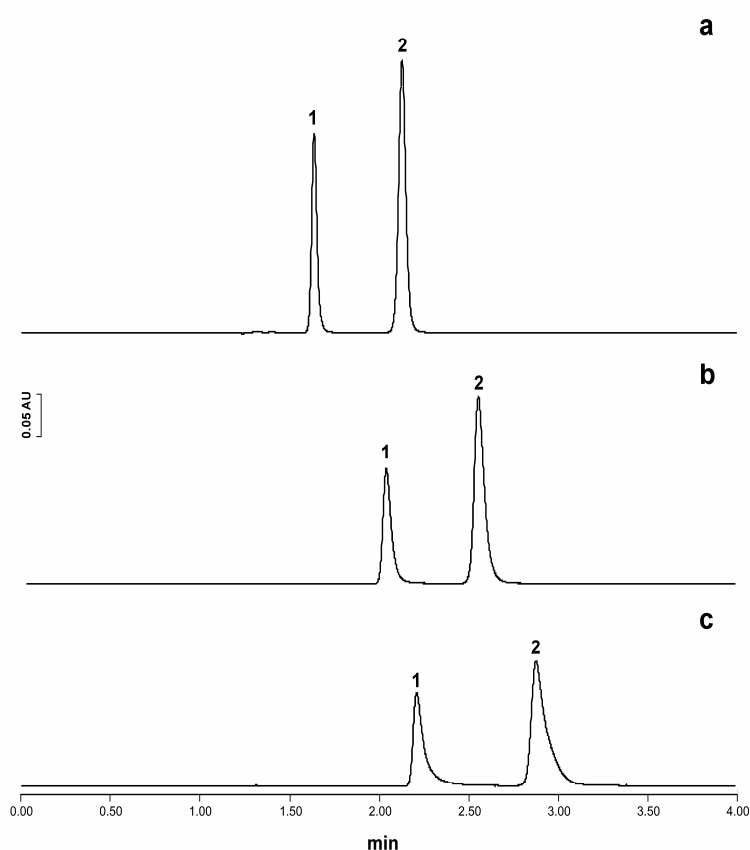
Taip pat ištyrėme, kaip įtakojamas analičių sulaikymas pakeitus vandenį judrioje fazėje kitu poliniu (protoniniu) tirpikliu. Palyginome metanolį ir etanolį. 3.3 pav. pavaizduotos karbadokso ir olakvindokso standartinio mišinio chromatogramos, išmatuotos identiškose sąlygose naudojant judrią fazę 95% CH₃CN su 5% atitinkamo tirpiklio priedu. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad HILIC režime protoninių tirpiklių išstūmimo jėga silpnėja tokia tvarka:

vanduo > metanolis > etanolis

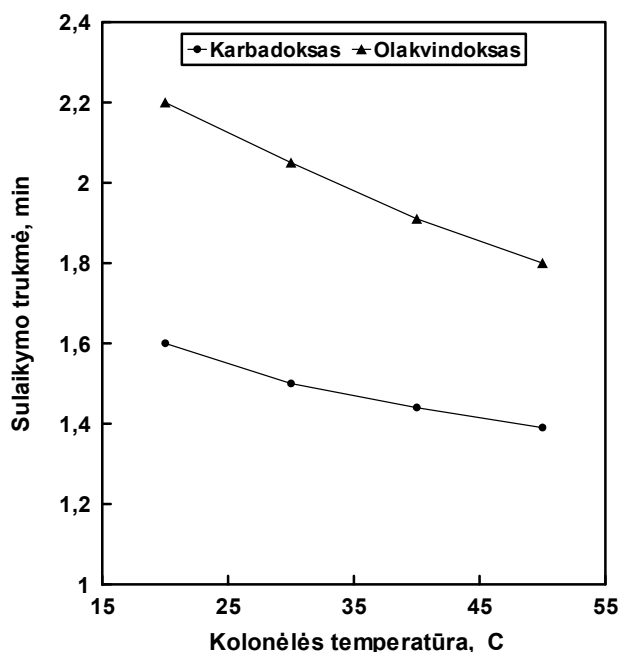
Be to, protoninio tirpiklio prigimtis stipriai įtakoja ir analičių smailių efektyvumą: pakeitus vandenį etanoliumi, smailės išsiplečia apie 2 kartus bei pablogėja jų simetriškumas. Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad poliškesnis tirpiklis (vanduo) efektyviau užblokuoja (neutralizuoja) silanolines funkcines

grupės silikagelio sorbento paviršiuje ir efektyviau eliminuoja antrinę analičių sąveiką (adsorbciją) su sorbento paviršiumi.

3.4 pav. pavaizduota kolonėlės temperatūros įtaka analičių sulaikymo trukmėms. Didinant kolonėlės temperatūrą nuo 20 iki 50 °C, analičių sulaikymas tolygiai silpnėja dėl jų pasiskirstymo tarp fazių koeficiento sumažėjimo. Tuo tarpu temperatūros įtaka smailių efektyvumui nežymi ir tai papildomai patvirtina analičių atskyrimo pasiskirstymo mechanizmu dominavimą. Temperatūros didinimas pagreitina masių mainus tarp fazių ir taip pagerina smailių efektyvumą. Tačiau masių mainų proceso įtaka efektyvumui žymiai stipresnė adsorbcinėje chromatografijoje nei pasiskirstomojoje chromatografijoje [1]. Visi tolimesni tyrimai buvo atliekami 30°C kolonėlės temperatūroje.



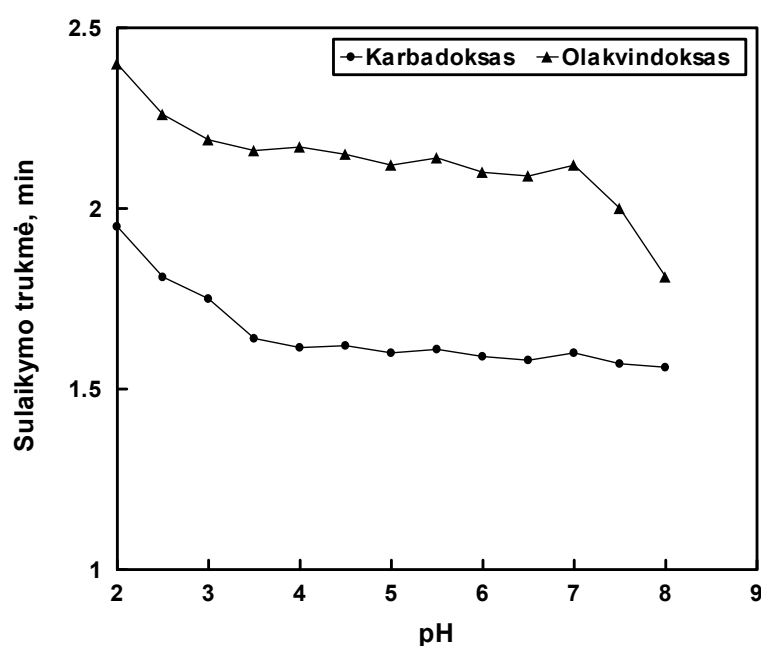
3.3 pav. Tirpiklio prigimties įtaka karbadokso (1) ir olakvindokso (2) atskyrimui HILIC metodu. Judri fazė: a - CH₃CN/H₂O (95:5 v/v); b - CH₃CN/MeOH (95:5 v/v); c - CH₃CN/EtOH (95:5 v/v); tėkmės greitis - 0,25 ml/min.



3.4 pav. Kolonėlės temperatūros įtaka karbadokso ir olakvindokso sulaikymo trukmėms. Judri fazė: CH₃CN/H₂O (95:5 v/v); tėkmės greitis - 0,25 ml/min.

Judrios fazės pH įtaka buvo tiriama intervale nuo 2 iki 8 (3.5 pav.). Nustatyta, kad judrios fazės pH reikšmingai neįtakoja nei analičių sulaikymo, nei smailių efektyvumo pH intervale 4,0-8,0 karbadoksui ir 3,5-7,0 olakvindoksui. Bendru atveju, analitės sulaikymo trukmės pokyčiai, keičiantis judrios fazės pH, skysčių chromatografijoje dažniausiai yra susiję su jos krūvio pasikeitimu dėl protonizacijos/deprotonizacijos. Deja, analičių protonizacijos konstantų literatūroje neradome ir tai apsunkino gautų rezultatų interpretavimą. Galime daryti prielaidą, kad esant pH<3 olakvindokso pradeda protonizuotis įgydamas teigiamą krūvį. Dėl atsirandančios papildomos elektrostatinės olakvindokso katijono sąveikos su neigiamą krūvį turinčiomis silanolinėmis sorbento grupėmis jo sulaikymas šioje pH srityje stiprėja. Ta pati priežastis lemia ir karbadokso sulaikymo trukmių didėjimą mažinant judrios fazės pH intervale nuo 4 iki 2. Būtina pažymėti, kad paminėtose pH srityse ryškiai pablogėja abiejų analičių smailių efektyvumai, o tai papildomai liudija apie antrinės (jonų-mainų) sąveikos atsiradimą chromatografinėje sistemoje. pH srityje nuo 4 iki 8 karbadokso, o nuo 3,5 iki 7 olakvindokso sulaikymas yra pastovus ir tai rodo, kad šiose srityse analitės nedalyvauja

protonizacijos/deprotonizacijos procesuose. Galiausiai, kai pH viršija 7 olakvindokso sulaikymo trukmė pradeda greitai mažėti. Labiausiai tikėtina tokios elgsenos priežastis: dėl hidroksi funkcinės grupės disocijacijos olakvindokso įgyja neigiamą krūvį ir elektrostatinė stūma nuo neigiamų silanolinių grupių sorbento paviršiuje apsunkina jo perėjimą į vandens sluoksnį. Tokias prielaidas patvirtina neseniai publikuotas HILIC metodo pradininko Alpert darbas [177], kuriame pirmą kartą nuodugniai tyrinėti katijoninių, neutralių ir anijoninių junginių sulaikymo HILIC metode ypatumai.

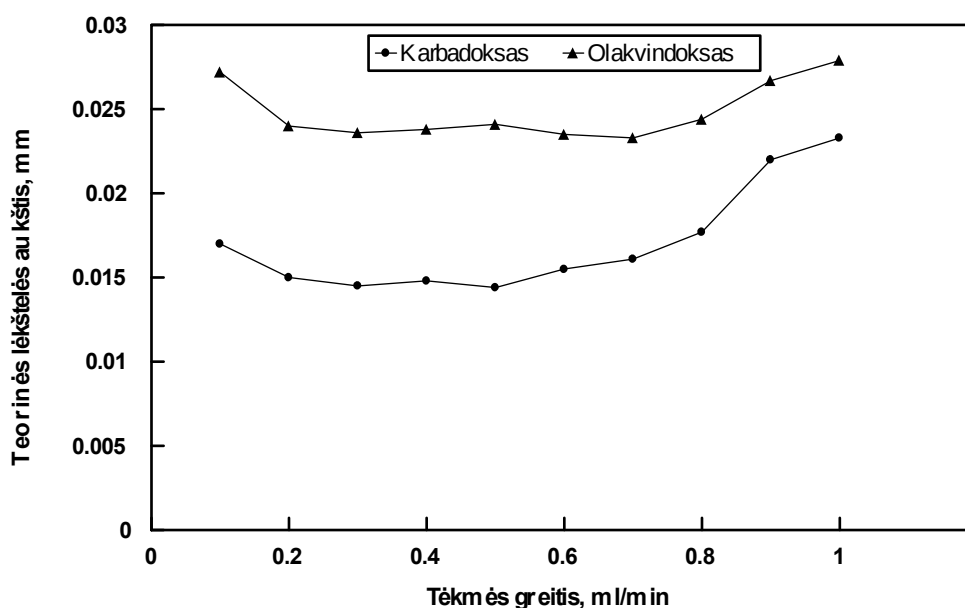


3.5 pav. Judrios fazės pH įtaka analičių sulaikymo trukmėms. Judri fazė: 0,5 mmol/l H_3PO_4 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5 v/v) mišinyje neutralizuotas NaOH iki atitinkamos pH vertės; tėkmės greitis - 0,25 ml/min.

Ištyrus elektrolito (amonio acetato) koncentracijos (nuo 5 iki 50 mmol/l) judrioje fazėje įtaką buvo nustatyta, kad elektrolito koncentracija visiškai neįtakoja abiejų analičių sulaikymo. Siekiant užtikrinti judriai fazei bent minimalias buferines savybes tolimesniuose tyrimuose į judrią fazę buvo papildomai pridedama 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

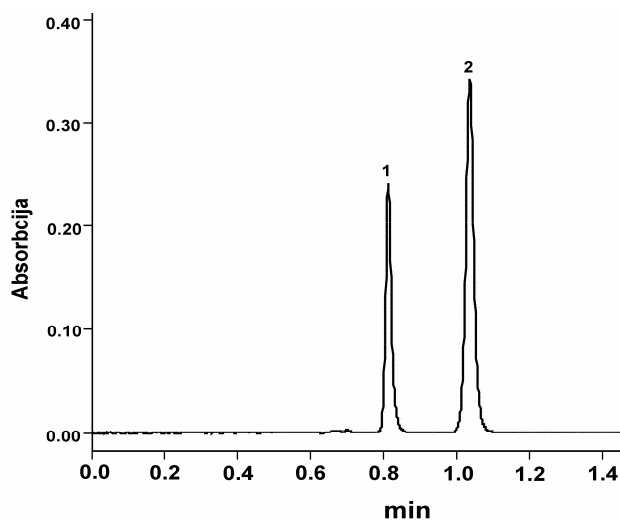
Palyginti didelis analičių sulaikymo trukmių skirtumas leidžia pagreitinti atskyrimą padidinus judrios fazės greitį. Todėl pirmiausiai įvertinome judrios

fazės tėkmės greičio įtaką analičių smailių efektyvumui. Iš 3.6 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant judrios fazės tėkmės greitį iki maždaug 0,6-0,7 ml/min, smailių efektyvumas neblogėja. Taigi, judrios fazės greičio padidinimas nuo 0,25 ml/min iki 0,5 ml/min leido dvigubai sumažinti atskyrimo trukmę neaukojant efektyvumo.

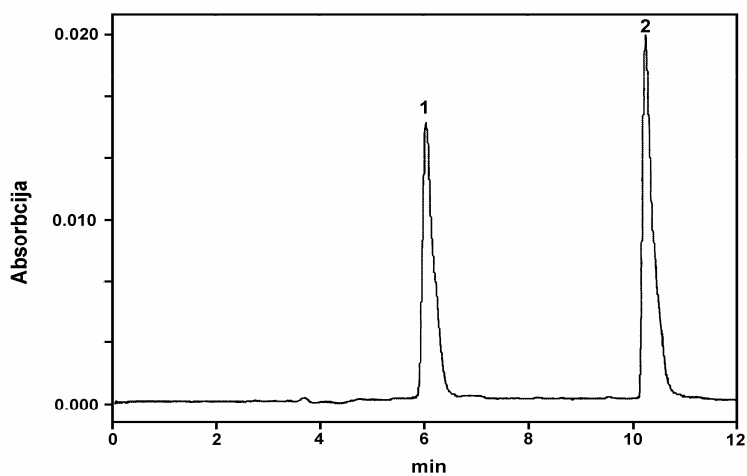


3.6 pav. Judrios fazės tėkmės greičio įtaka karbadokso ir olakvindokso smailių efektyvumui (teorinės lėkštelės aukščiui).

3.7 pav. pavaizduota analičių standartinio mišinio chromatograma, išmatuota optimizuotose sąlygose. Abi analitės puikiai atskiriamos UESCh metodu HILIC režime izokratinės eliacijos sąlygose per maždaug 1 min. Palyginimui, 3.8 pav pateikta karbadokso ir olakvindokso mišinio chromatograma, gauta atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Matome, kad šiuo atveju net ir naudojant gradientinę eliaciją karbadokso ir olakvindokso atskyrimas trunka apie 11 min, analičių smailės nesimetriškos, o detektavimo jautris žymiai blogesnis. Teisingumo dėlei reikėtų pažymėti, kad HILIC metode buvo naudotas 1,7 μ m dalelių dydžio sorbentas, o atvirkščių fazių ESCh metode – 5 μ m dalelių dydžio sorbentas.



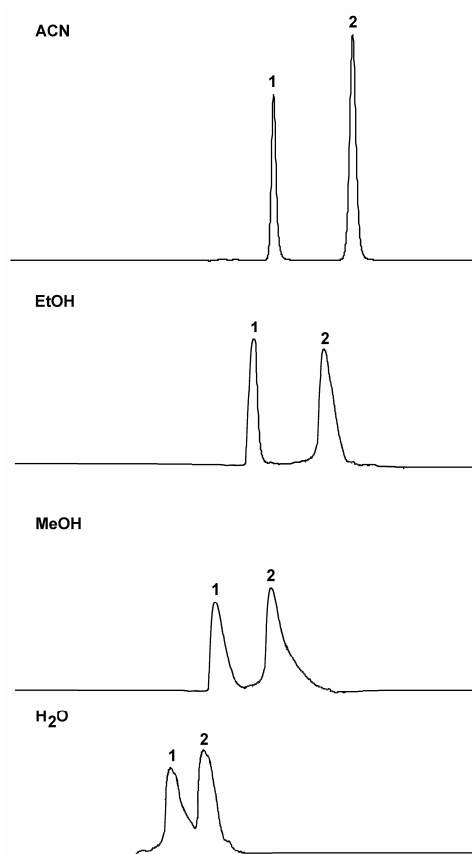
3.7 pav. Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas optimizuotose HILIC-UESCh sąlygose. Judri fazė: 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5 v/v) mišinyje; tėkmės greitis 0,5 ml/min; Kolonėlės temperatūra 30°C; Smailės: 1 – karbadoksas; 2 – olakvindoksas.



3.8 pav. Karbadokso ir olakvindokso atskyrimas optimizuotose atvirkščių fazių ESCh sąlygose. Kolonėlė: Waters Symmetry Shield RP-8 (5 μm). Gradientinė eliucija $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ mišiniu. Smailės: 1 – olakvindoksas; 2 – karbadoksas.

Mėginio tirpiklio ir tūrio įtaka. Skysčių chromatografijoje didelę įtaką atskyrimo efektyvumui turi mėginio tirpiklis. Mėginio tirpiklio išstūmimo jėga neturi smarkiai viršyti judrios fazės išstūmimo jėgos. Priešingu atveju pablogėja smailių efektyvumas ir atskyrimo atrankumas. Tačiau tirpiklio prigimties įtaka nėra vienoda skirtingiems skysčių chromatografijos

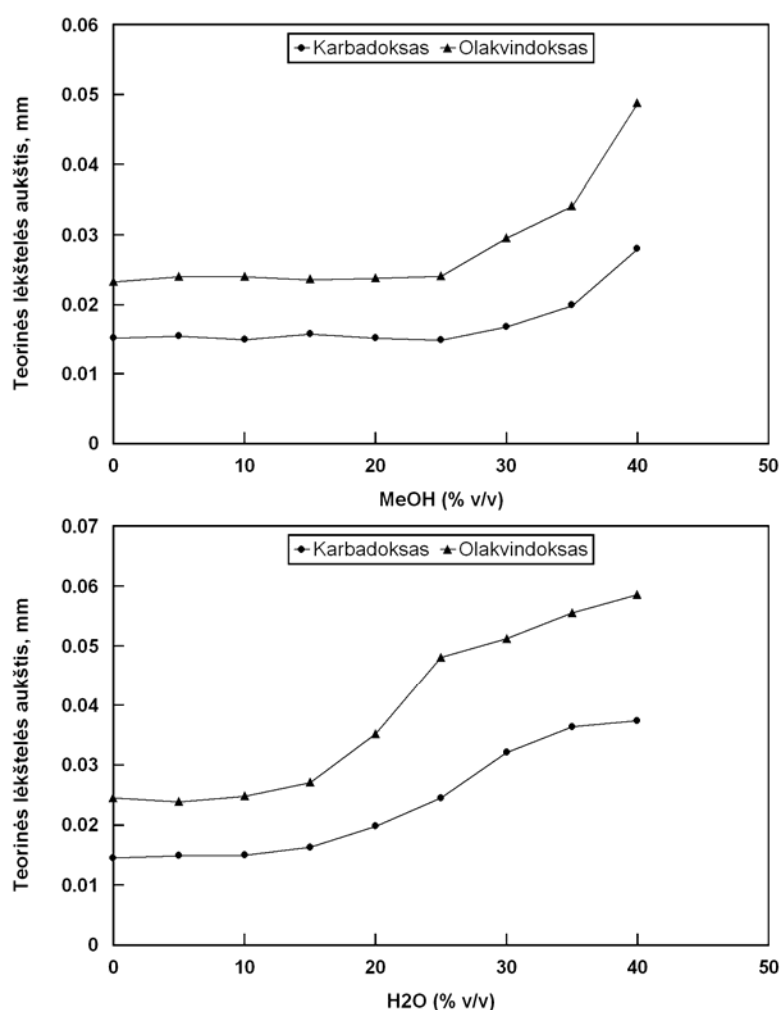
variantams. Pvz. adsorbcinėje atvirkščių fazių chromatografijoje ji žymiai menkesnė nei adsorbcinėje normalių fazių arba pasiskirstomojoje chromatografijoje. Kadangi HILIC metode iki šiol mėginio tirpiklio įtakos tyrimai nebuvo atliekami, tai paskatino mus papildomai ją patyrinėti. Tai labai svarbu parenkant tirpiklių sistemas analičių ekstrakcijai iš realių mėginių. 3.9 pav. palygintos analičių standartinio tirpalo paruošto keturiuose skirtinguose tirpikliuose (ACN, EtOH, MeOH ir H₂O) chromatogramos. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad HILIC režime mėginio tirpiklio prigimties įtaka analičių smailių efektyvumui bei atskyrimo atrankumui silpnėja tokia tvarka: vanduo > metanolis > etanolis > acetonitrilas. Tokia pat tvarka silpnėja ir šių tirpiklių išstūmimo jėga HILIC režime.



3.9 pav. Mėginio tirpiklio prigimties įtaka karbadokso ir olakvindokso atskyrimui. Sąlygos kaip ir 3.7 pav. Smailės: 1 – karbadoksas; 2 – olakvindoksas.

Kitame eksperimente ištyrėme analičių smailių efektyvumo pokyčius tirpinant analičių standartus tirpiklių mišiniuose. Pagrindiniu tirpikliu

naudojome ACN, kuriame palaipsniui didiname kito tirpiklio tūrio dalį ir matavome analičių smailių efektyvumus. 3.10 pav. pateikti tyrimų rezultatai ACN-MeOH ir ACN-H₂O mišiniams. Matome, kad atskiriant analites acetonitrilo/metanolio mišinyje, jų smailių efektyvumas išlieka nepakitęs pridėjus iki 25% v/v metanolio. Vandens atveju, maksimali jo koncentracija acetonitrile neįtakojanti efektyvumo beveik dvigubai mažesnė ir siekia maždaug 15% v/v, tuo tarpu etanolio (rezultatai nepateikti) - 40% v/v.

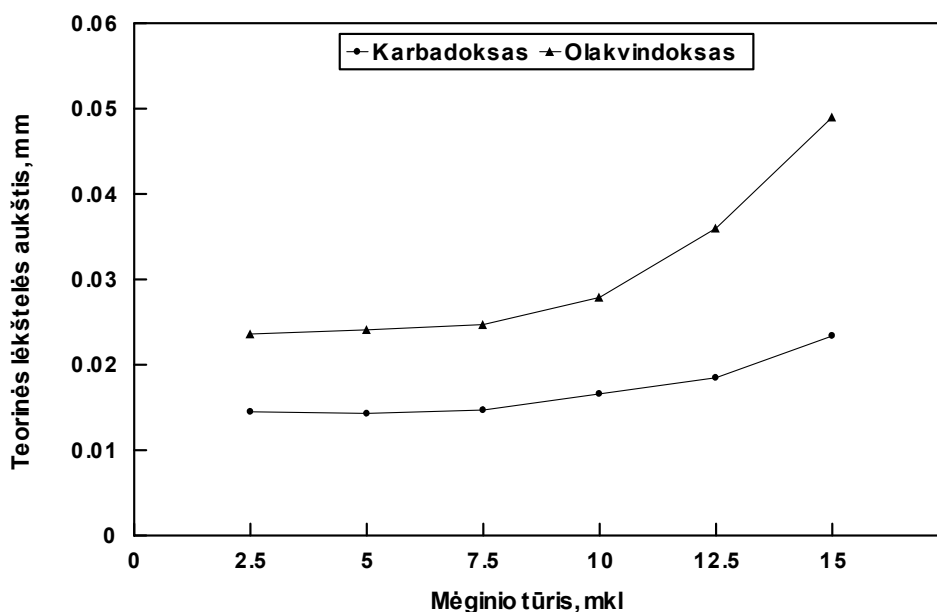


3.10 pav. Karbadokso ir olakvindokso smailių efektyvumų priklausomybė nuo MeOH ir H₂O tūrio dalies mėginyje. Pagrindinis mėginio tirpiklis ACN.

Apibendrinant tyrimų rezultatus galima konstatuoti, kad optimizuojant analičių ekstrakcijos iš realių mėginių procedūrą tinkamiausias tirpiklis grynas acetonitrilas arba acetonitrilas su atitinkamais EtOH, MeOH arba H₂O priedais.

Tokiu atveju nereikalinga ekstrakto nugarinimo iki sausos liekanos ir pertirpinimo tinkamame tirpiklyje procedūra. Be to, būtina pažymėti, kad HILIC metodas yra jautresnis mėginio tirpiklio prigimčiai nei atvirkščių fazių ESCh metodas.

Chromatografijoje detektavimo jautris priklauso ir nuo įleidžiamo mėginio tūrio, todėl paprastai siekiama analizuoti kuo didesnius mėginio tūrius. Maksimalus leistinas mėginio tūris tiesiogiai susijęs su chromatografiniam atskyrimui naudojamos kolonėlės parametrais – ilgiu ir vidiniu skersmeniu. Kadangi ultraefektyviojoje skysčių chromatografijoje naudojamos mažesnių parametru kolonėlės nei įprastinėje efektyviojoje skysčių chromatografijoje, šiam metodui būtina papildomai optimizuoti mėginio tūrį. Iš 3.11 pav. pateiktų analizių smailių efektyvumų priklausomybių nuo įleidžiamo mėginio tūrio matyti, kad šiuo metodu be ypatingų efektyvumo nuostolių galime analizuoti maksimalius 7,5-10 μ l tūrio mėginius. Palyginimui, tradicinėse ESCh kolonėlėse (ilgis 15-25 cm, vidinis skersmuo 3,0-4,6 mm) maksimalus leistinas mėginio tūris 20-50 μ l.



3.11 pav. Karbadokso ir olakvindokso (10 mg/l) smailių efektyvumų priklausomybė nuo įleidžiamo mėginio tūrio. Mėginio tirpiklis – ACN.

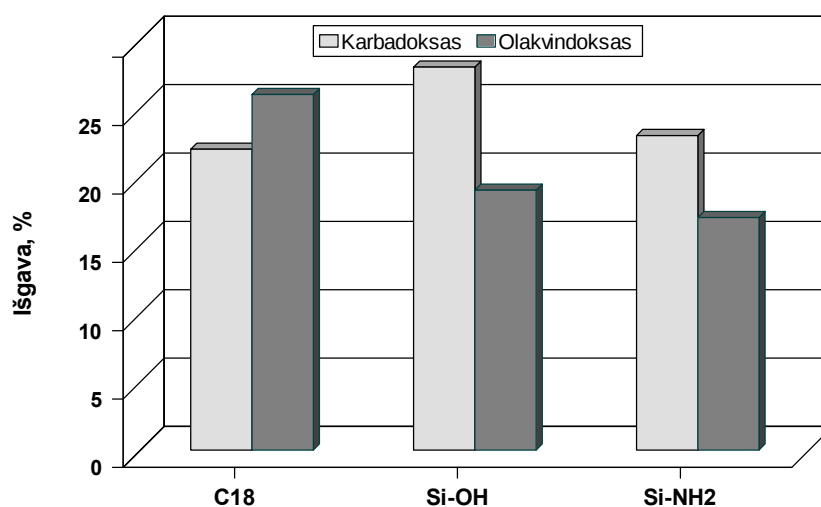
3.1.2. KDE sąlygų tyrimas

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, bene daugiausiai problemų šiuolaikinėje biologinių objektų analizėje kelia mėginio paruošimas. Nustatant veterinarinius vaistus kietuose mėginiuose dažniausiai jie yra ekstrahuojami iš mėginio matricos organiniais tirpikliais, o po to ekstraktas dar papildomai valomas skysčių-skysčių arba kietafazės ekstrakcijos metodais. Tai pakankamai ilgos ir reikalaujančios daug darbo sąnaudų procedūros. Siekdami pagreitinti ir supaprastinti mėginių paruošimo procedūrą, karbadokso ir olakvindokso išskyrimui iš pašarų mėginių ištyrėme kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodą.

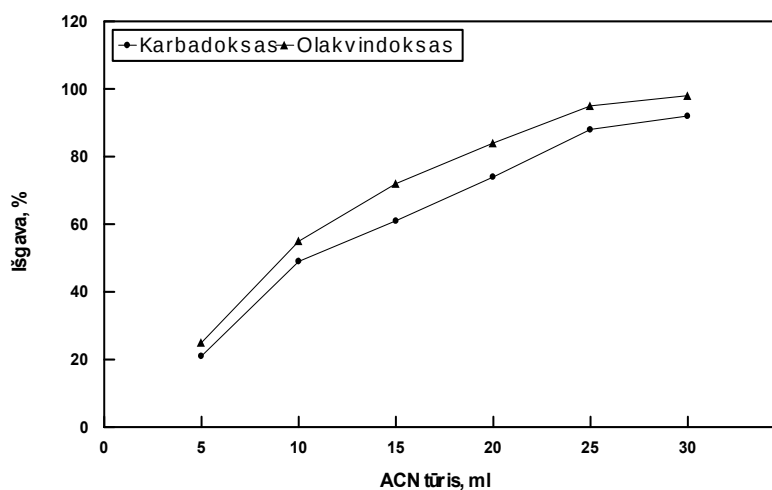
Sorbentų palyginimas. Preliminariems tyrimams buvo pasirinkti trys skirtingomis savybėmis pasižymintys komerciniai sorbentai: nepolinis oktadecilsilikagelis C_{18} , ir du poliniai sorbentai – silikagelis (Si-OH) ir aminopropilsilikagelis (Si-NH₂). Preliminariuose tyrimuose 0,25 g pašaro su analičių standartiniu priedu buvo disperguojami (~2 min trinami agato grūstuvėje) su 0,5 g atitinkamo sorbento, gautas mišinys suberiamas į 15 ml talpos polipropileno kietafazės ekstrakcijos švirkštą su filtrais iš abiejų galų ir analitės desorbuojamos leidžiant per mišinį 5 ml acetonitrilo 1 ml/min greičiu. Tyrimų metu buvo atsižvelgiama į du pagrindinius kriterijus: analičių išgavas ir gautų ekstraktų grynumą. Ekstraktų grynumas buvo vertinamas ir vizualiai (drumstumas, spalvos intensyvumas), ir lyginant pašalinių smailių skaičių bei jų intensyvumą skenuojančiu fotometriniu detektoriumi 200-500 nm bangos ilgių intervale registruojamose ekstraktų chromatogramose. Buvo nustatyta (3.12 pav.), kad su visais trimis sorbentais gaunamos panašios ir palyginti nedidelės (15-30%) karbadokso ir olakvindokso išgavos. Tačiau ekstraktų grynumai skyrėsi labai reikšmingai. Gryniausi ekstraktai buvo gaunami naudojant nepolinį oktadecilsilikagelį, todėl šis sorbentas ir buvo pasirinktas tolimesniems tyrimams.

Tirpiklio parinkimas. Paprasčiausias būdas padidinti analičių išgavas – didesniu tirpiklio tūriu ekstrahuoti jas iš sorbentu disperguoto mėginio.

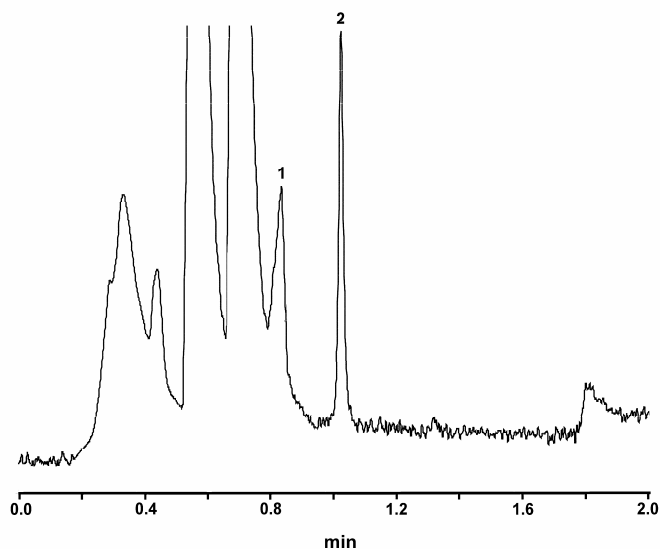
Nustatėme, kad padidinus acetonitrilo tūrį iki 25-30 ml – analičių išgavos padidėja iki 85-90% (3.13 pav.), tačiau kartu padidėja ir ekstraktų užterštumas, apsunkinatis karbadokso smailės integravimą. Tai iliustruoja 3.14 pav. pateikta ekstrakto chromatograma. Iš pateiktos chromatogramos profilio akivaizdu, kad didesniu ACN tūriu papildomai išekstrahuojami/desorbuojami didesniu hidrofobiškumu už analites pasižymintys ir todėl silpnai sulaikomi HILIC režime pašaliniai junginiai. Be to, palyginti didelis ekstrakto tūris sumažina analizės jautrį (jei ekstraktai prieš analizę nenugarinami) arba prailgina analizės trukmę (jei ekstraktai nugarinami).



3.12 pav. Karbadokso ir olakvindokso išgavos ($n=3$), išmatuotos pašaro su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu mėginius disperguojant skirtingais sorbentais. Desorbcija – acetonitrilu (5 ml).



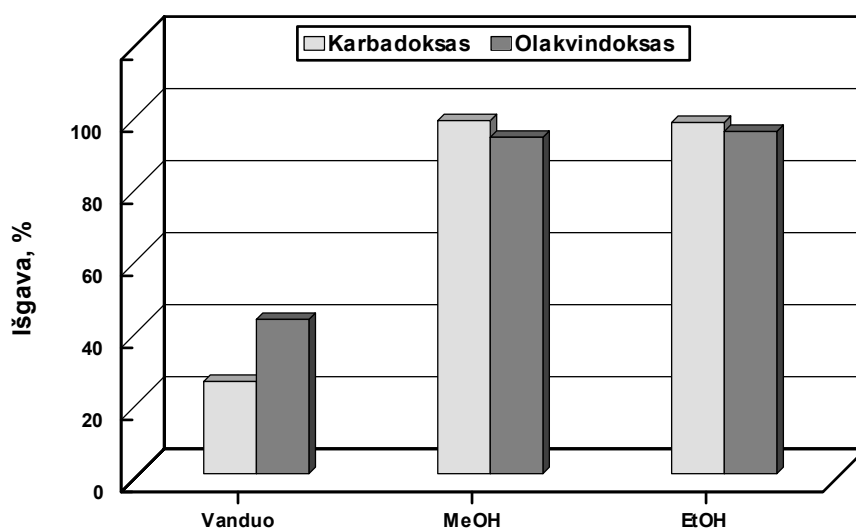
3.13 pav. Analčių išgavų iš pašarų mėginio priklausomybė nuo ACN tūrio. Disperguojantis sorbentas C_{18} (0,5 g).



3.14 pav. Pašarų mėginio su 10 $\mu\text{g/g}$ analičių priedu ekstrakto chromatograma (detektavimas prie 373 nm). Desorbcija – 25 ml ACN. 1 – karbadoksas; 2 – olakvindoksas.

KDE metode ekstrakcijos metu vyksta keli procesai: analitės pasiskirsto tarp trijų fazių – mėginio matricos, disperguojančiojo sorbento ir desorbcijos tirpiklio. Todėl ekstrakcijai naudojamas tirpiklis turi efektyviai ir kuo atrankiau ekstrahuoti analites iš kieto mėginio matricos bei efektyviai desorbuoti jas iš disperguojančio sorbento paviršiaus. Labiausiai tikėtina, kad palyginti menkos analičių ekstrakcijos išgavos acetonitrilu susijusios su neefektyvia analičių ekstrakcija būtent iš mėginio matricos. Tuo nesunkiai įsitikinome atlikę papildomą eksperimentą, kuriame į 0,5 g oktadecilsilikagelio sorbento pridėjome žinomą kiekį analičių standartinio tirpalo ir eliuavome įvairiais ACN tūriais. Tokiu būdu iš ekstrakcinės sistemos eliminavome vieną iš fazių - mėginio matricą. Nustatėme, kad šiuo atveju abi analitės beveik pilnai išplaunamos iš sorbento tik su 5-6 ml acetonitrilo. Taigi, siekiant pagerinti KDE efektyvumą tiriamoms analitėms būtina parinkti geriau jas tirpinantį (t.y. geriau išekstrahuojantį iš mėginio matricos) tirpiklį. Kadangi abi analitės geriau tirpsta protoniniuose tirpikliuose, tikėtina, kad tokio tirpiklio panaudojimas leistų efektyviau (mažesniu tirpiklio tūriu) išekstrahuoti polines analites iš pašarų mėginio matricos. 3.15 pav. pateiktos analičių išgavos iš pašarų mėginio su 10 $\mu\text{g/g}$ analičių priedu ekstrahuojant/desorbuojant trimis

skirtingais protoniniais tirpikliais (10 ml). Kaip ir buvo tikėtasi, naudojant desorbcijai gryną metanolį ar etanolį, pilnai abiejų analičių ekstrakcijai (išgavos $\geq 90\%$) užtenka 10 ml (arba netgi mažiau; mažesni tūriai nebuvo tiriami) tirpiklio. Tuo tarpu žymiai mažesnės analičių išgavos naudojant vandenį greičiausiai susijusios su ypač silpna šio tirpiklio išstūmimo jėga iš nepolinio C_{18} sorbento. Nors naudojant desorbcijai gryną metanolį ar etanolį, abi analitės išekstrahuojamos žymiai efektyviau nei acetonitrilu, tačiau 10 ml metanolio ar etanolio ekstraktų grynumas buvo dar blogesnis nei 30 ml acetonitrilo ekstraktų grynumas. Taigi, iš gautų rezultatų akivaizdu, kad protoniniai tirpikliai (MeOH, EtOH) žymiai efektyviau už ACN tirpina/desorbuoja analites iš mėginio matricos, tuo tarpu ACN yra atrankesnis – po desorbcijos ekstraktuose yra mažiau priemaišų.



3.15 pav. Desorbuojančio tirpiklio prigimtės įtaka analičių išgavoms iš pašarų mėginių su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu. Tirpiklio tūris - 10 ml. Disperguojantis sorbentas C_{18} (0,5 g).

Vėliau išbandėme ACN ir MeOH mišinio ekstrakcines savybes. 3.1 lentelėje palygintos analičių išgavos iš pašarų mėginių su standartų priedu, gautos ekstrahuojant įvairiais ACN-MeOH tirpiklių mišiniais (9:1, 8:2, 7:3 ir 6:4, v/v). Palyginimui pateiktos ir išgavos, gautos ekstrahuojant grynu ACN. Visais atvejais bendras tirpiklių mišinio tūris buvo 10 ml. Matome, kad analičių ekstrakcijos efektyvumui reikšmingai pagerinti užtenka palyginti nedidelio MeOH priedo: abi analitės išekstrahuojamos pilnai ($\geq 90\%$), kai

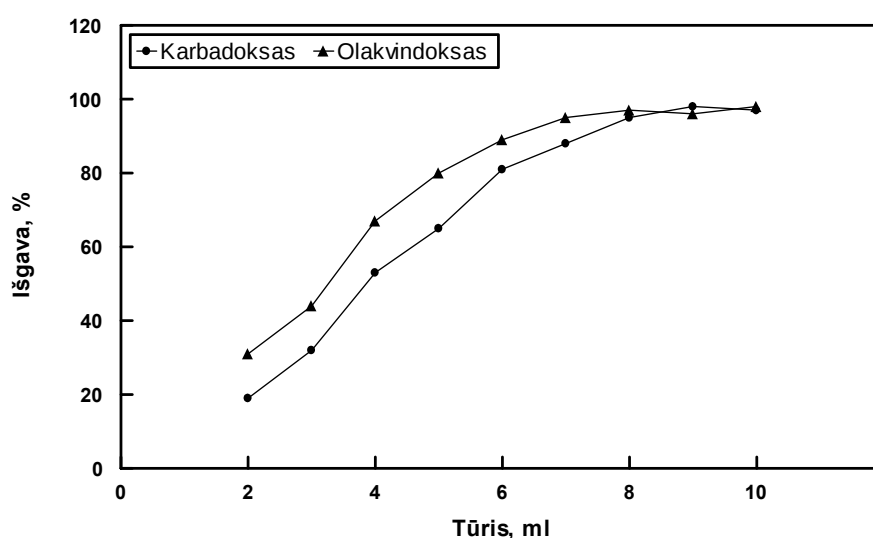
MeOH koncentracija acetonitrile $\geq 20\%$, v/v. Taigi, ACN-MeOH (8:2, v/v) mišinys puikiai suderinamas su tolimesne HILIC analize bei, siekiant padidinti analizės jautrį, gali būti lengvai ir greitai nugarinamas.

3.1 lentelė

Karbadokso ir olakvindokso išgavos, išmatuotos desorbuojant analites iš pašarų mėginių ($10 \mu\text{g/g}$) ACN-MeOH tirpiklių mišiniais (10 ml). Sorbentas - oktadecilsilikagelis.

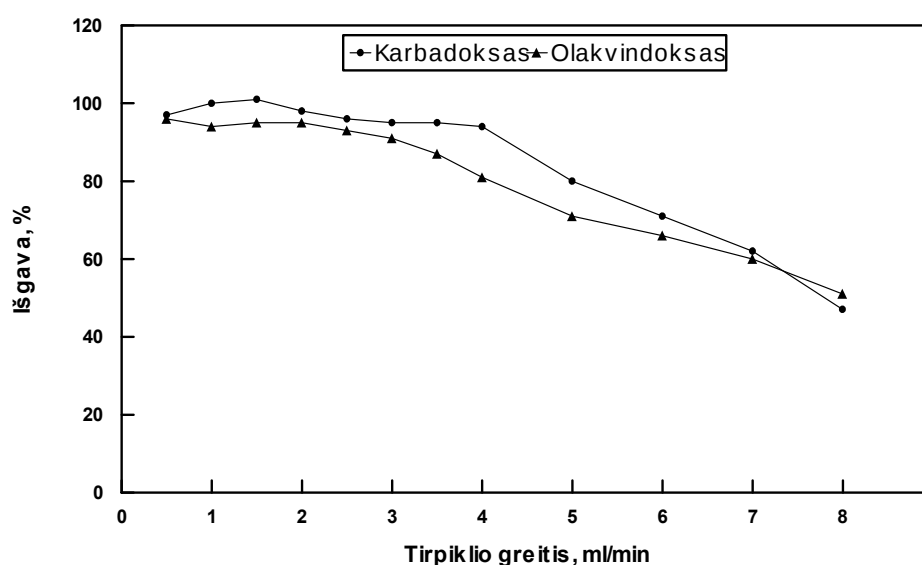
ACN-MeOH (v/v)	Išgava (% , n = 3)	
	Karbadoksas	Olakvindoksas
10:0	53	59
9:1	91	76
8:2	99	94
7:3	95	94
6:4	97	93

Desorbcijos/ekstrakcijos tirpiklio tūrio įtaka. Optimizuojant analičių ekstrakcijos sąlygas paprastai siekiama pilno ir kuo atrankesnio jų išskyrimo iš mėginio matricos minimaliu tirpiklio tūriu. 3.16 pav. pateikta analičių išgavų iš pašarų mėginio priklausomybė nuo ACN-MeOH mišinio tūrio. Tyrimų rezultatai rodo, kad pilna analičių ekstrakcija/desorbcija pasiekama kai ACN-MeOH mišinio tūris ≥ 8 ml.



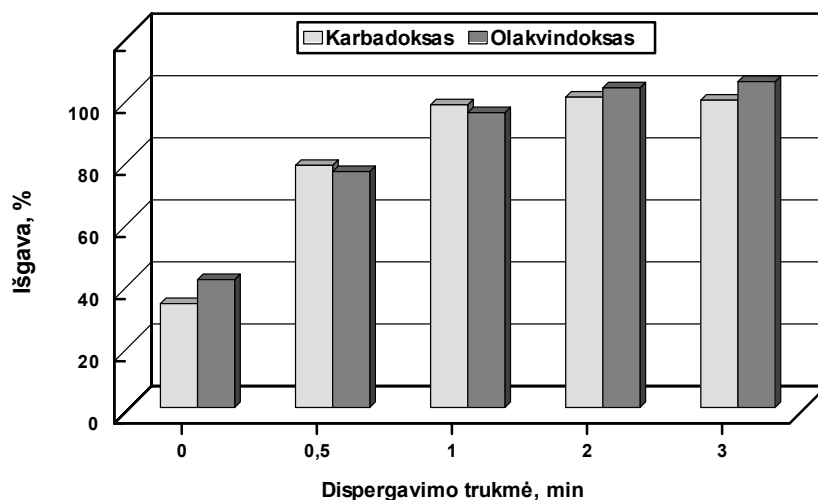
3.16 pav. Desorbcijos tirpiklio (ACN/MeOH, 80:20 v/v) tūrio įtaka karbadokso ir olakvindokso ($10 \mu\text{g/g}$) išgavoms iš pašarų mėginio.

Desorbcijos/ekstrakcijos greičio įtaka. KDE atliekama dinaminėse sąlygose pastoviu greičiu leidžiant tirpiklį per disperguotą mėginio/sorbento mišinį. Jei tirpiklis leidžiamas per lėtai – nukenčia ekstrakcijos atrankumas. Priešingu atveju analizės išekstrahuojamos nepilnai. Įprastai, šis parametras eksperimentiškai optimizuojamas konkrečiai KDE sistemai. Tiriamoms analizėms (3.17 pav.) jų išgavos iš pašarų mėginio nepriklauso nuo tirpiklio greičio iki 3 ml/min olakvindoksui ir iki 4 ml/min karbadoksui. Analizei pasirinkome 2 ml/min greitį.



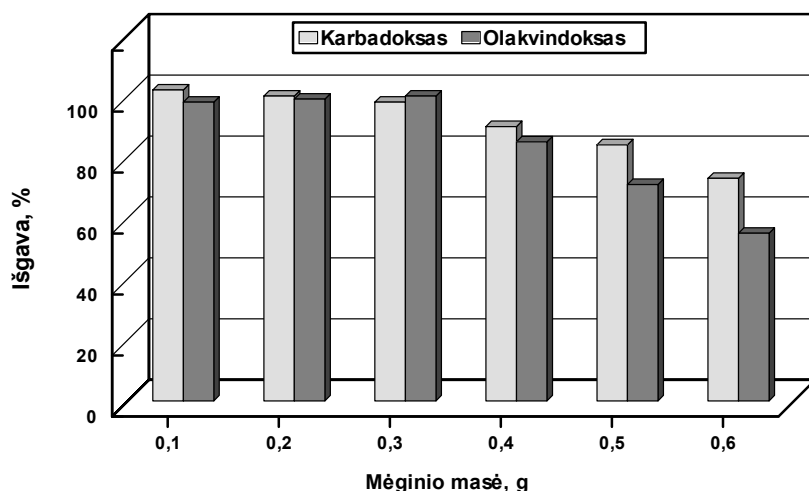
3.17 pav. Desorbcijos tirpiklio (ACN/MeOH, 80:20 v/v) greičio įtaka karbadokso ir olakvindokso (10 µg/g) išgavoms iš pašarų mėginio.

Dispergavimo trukmė. Iš 3.18 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad nedisperguojant mėginio su sorbentu analičių ekstrakcija visiškai neefektyvi (išgavos 30-36%). Pilnai analičių ekstrakcijai būtina disperguoti mėginį ne trumpiau nei 1 min. Reikėtų pažymėti, jog disperguojama rankiniu būdu trinant mišinį tiglyje, tad proceso efektyvumas priklauso ir nuo šį darbą atliekančio operatoriaus savybių (jėgos, trynimo intensyvumo ir pan.). Siekdami išvengti paklaidų visuose tyrimuose dispergavome mėginius ne mažiau nei 2 min.



3.18 pav. Dispergavimo trukmės įtaka karbadokso ir olakvindokso (10 $\mu\text{g/g}$) išgavoms iš pašarų mėginio.

Mėginio masės įtaka. Kaip ir kituose ekstrakciniuose metoduose, KDE metode siekiama pilnai išekstrahuoti analites iš kuo didesnio mėginio kiekio minimaliomis medžiagų (sorbento, tirpiklio ir pan.) ir laiko sąnaudomis. Nuo mėginio ir sorbento masių santykio priklauso tiek ekstrakcijos efektyvumas bei ekstraktų grynumas, tiek ir nustatymo jautris. Optimizuojant šį parametą tolygiai didinome pašarų mėginio masę, o disperguojančio sorbento masę ir analičių kiekį mėginyje palaikėme pastoviais (0,5 g sorbento ir po 2,5 μg karbadokso ir olakvindokso). Tyrimų rezultatai pateikti 3.19 pav. Kai mėginio masė viršija 0,3 g, analičių išgavos pradeda mažėti. Be to, ekstrahuojant didesnius mėginio kiekius ekstraktų grynumas labai pablogėja.



3.19 pav. Mėginio masės įtaka karbadokso ir olakvindokso (2,5 μg) išgavoms iš pašarų. Sorbento masė 0,5 g.

Optimizuotos karbadokso ir olakvindokso ekstrakcijos KDE metodu sąlygos: 0,5 g oktadecilsilikagelio agato tiglyje maždaug 2 min triname su 0,25 g pašarų mėginio, disperguotą mišinį suberiame į polipropileninį švirkšto korpusą su filtru dugne, uždengiame iš viršaus kitu filtru, lengvai supresuojame ir desorbuojame analites 10 ml ACN/MeOH mišiniu (80:20 v/v, greitis ~2 ml/min), centrifuginame mėgintuvėlyje surinktą ekstraktą nugariname vakuume azoto sraute, likutį tirpiname 0,5 ml acetonitrilo ir analizuojame. Pilna mėginio paruošimo ciklo trukmė 10-15 min.

3.1.3. Analizinės charakteristikos ir taikymas

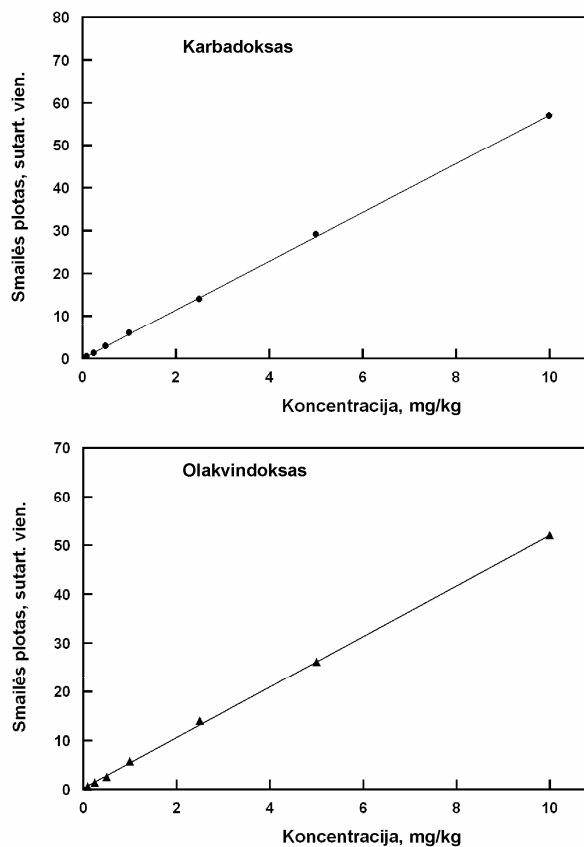
Kalibracinių kreivių teisiškumo intervalai kiekvienai analitei buvo matuojami su septyniomis skirtingomis analičių koncentracijomis. Kiekvienos koncentracijos tirpalas buvo matuojamas po 3 kartus. Aptikimo ribos buvo nustatomos esant signalo/fono triukšmų santykiui 3, o nustatymo ribos – esant signalo/fono triukšmų santykiui 10. Šios charakteristikos surašytos 3.2 lentelėje, o 3.20 pav. pateiktos abiejų analičių kalibracinės kreivės.

3.2 lentelė

Kalibracinių kreivių tiesiškumo intervalai ir aptikimo bei nustatymo ribos ($n=3$)

Analitė	Tiesiškumo intervalas, mg/kg	Koreliacijos koeficientas (r^2)	Aptikimo riba, mg/kg	Nustatymo riba, mg/kg
Karbadoksas	0,1 - 10	0,999	0,02	0,07
Olakvindoksas	0,1 - 10	0,998	0,03	0,10

Analizės rezultatų teisingumas buvo vertinamas atliekant išgavos testus paršelių pašarui ir viščiukų lesalui. 3.3 lentelėje pateikti išgavos testo rezultatai rodo, kad karbadokso ir olakvindokso nustatymui visiškai netrukdo kiti mėginio matricos komponentai. 3.21 pav. demonstruojamos paršelių pašaro ekstrakto (a) ir to paties pašaro su 0,25 mg/kg analičių priedu ekstrakto (b) chromatogramos.



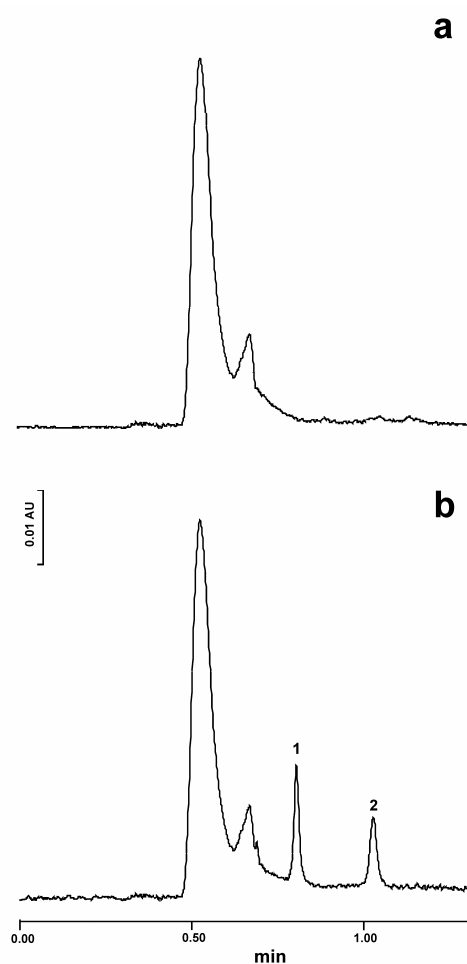
3.20 pav. Karbadokso ir olakvindokso kalibracinės kreivės ($n=3$).

3.3 lentelė

Karbadokso ir olakvindokso išgavos iš pašarų mėginių

Mėginys	Analitė	Pridėta (mg/kg)	Išgava (%) $\pm$ SSN (% n=3)
Paršelių pašaras	Karbadoxas	1,0	98 ± 7
		5,0	95 ± 5
	Olakvindoksas	1,0	89 ± 10
		5,0	94 ± 8
Viščiukų lesalas	Karbadoxas	1,0	96 ± 6
		5,0	95 ± 7
	Olakvindoksas	1,0	92 ± 8
		5,0	96 ± 7

3.4 lentelėje pagrindinės karbadokso ir olakvindokso nustatymo KDE-HILIC-UESCh metodu charakteristikos palygintos su alternatyvaus skysčių-skysčių ekstrakcijos (SSE)-ESCh metodo charakteristikomis. Išgavos bei analizės rezultatų atsikartojamumas yra panašūs abiem metodais. Pagrindiniai KDE-HILIC-UESCh metodo privalumai: 10 kartų didesnis nustatymo jautris bei maždaug 6-7 kartus greitesnė analizės procedūra. Be to, HILIC sąlygomis hidrofobiškesni mėginio komponentai yra nesulaikomi, todėl metodas nėra jautrus mėginio matricai. Tuo tarpu tiesiogiai analizuoti sudėtingesnės matricos mėginių ekstraktus atvirkščių fazių ESCh metodu be papildomo ekstraktų valymo negalime.



3.21 pav. Paršelių pašaro ekstrakto (a) ir to paties pašaro su 0,25 mg/kg analičių priedu (b) mėginių chromatogramos. Smailės: 1 – karbadoksas; 2 – olakvindoksas.

3.4 lentelė

Karbadokso ir olakvindokso nustatymo KDE-HILIC-UESCh ir SSE-ESCh metodais charakteristikų palyginimas

Charakteristika	KDE-HILIC-UESCh	SSE-ESCh
Išgavos ^a (%)	89-98	91-97
SSN ^a (%)	6-10	5-7
Aptikimo riba, mg/kg	0,02; 0,03	0,3; 0,2
Mėginio masė (g)	0,25	1,0
Tirpiklio tūris (ml)	10	10
Mėginio paruošimo trukmė (min)	15	90
Chromatografinės analizės trukmė (min)	2 (izokratinė eliucija)	20 (gradientinė eliucija)

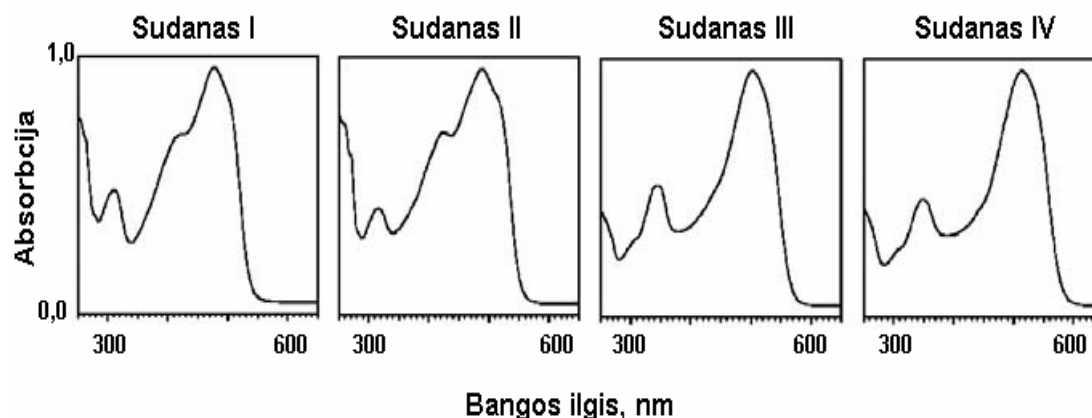
^a1,0 mg/kg analičių koncentracijoms (n=3).

3.2. Sudano dažiklių nustatymas čili pipirų milteliuose

3.2.1. Sudano dažiklių detektavimo ir atskyrimo sąlygų tyrimas

Priešingai nei karbadoksas ir olakvindoksas, Sudano dažikliai yra palyginti hidrofobiniai junginiai, todėl jų atskyrimui alternatyvos atvirkščių fazių skysčių chromatografijos variantui nėra. Šis variantas (ultraefektyviosios skysčių chromatografijos formate) ir buvo pasirinktas Sudano dažiklių atskyrimui ir nustatymui.

Detektavimo sąlygų parinkimas. 3.22 pav. pavaizduoti analičių absorbcijos spektrai, išmatuoti PDA detektoriumi. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad visos analitės yra pakankamai jautriai registruojamos 490-510 nm bangos ilgių srityje, todėl tolimesniems tyrimams detektavimui buvo pasirinktas fiksuotas 500 nm bangos ilgis.



3.22 pav. Sudano dažiklių (0,5 mmol/l) absorbcijos spektrai.

Nejudrių fazių palyginimas. Kadangi skirtingų Sudano dažiklių hidrofobiškumas skiriasi gana smarkiai, atskirti juos atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodu nėra sudėtinga. Pagrindinė problema yra ta, kad net ir naudojant labai stiprią išstūmimo jėgą pasižyminčias judrias fazes, Sudanų atskyrimo trukmės siekia keliasdešimt minučių. Tokiu atveju paprasčiausiu būdu pagreitinti atskyrimą galima mažinant kolonėlės ilgį ir/arba naudoti poliškesnį sorbentą. Sudano dažiklių atskyrimui UESCh metodu palyginome tris skirtingas kolonėles, kurių pagrindinės charakteristikos surašytos 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė

Atskyrimui naudotų kolonėlių charakteristikos

Kolonėlė	Vid. skersmuo×ilgis, mm	Sorbento dalelių skersmuo, μm	Anglies kiekis, %
Acquity UPLC BEH C18	2,1 × 100	1,7	18
Acquity UPLC BEH C8	2,1 × 100	1,7	13
Acquity UPLC BEH Phenyl	2,1 × 100	1,7	15

Pirmiausiai palyginome Sudano dažiklių atskyrimą izokratinėse sąlygose. Pradinę judrią fazę pasirinkome 20% vandens ir 80% acetonitrilo mišinį. 3.6 lentelėje palygintos pagrindinės tiriamų kolonėlių charakteristikos Sudano

dažikliams: analičių sulaikymo trukmės, jų smailių asimetriškumo faktoriai A_s ir smailių efektyvumai N . Matome, kad su visomis kolonėlėmis Sudanai yra gerai atskiriami (sulaikymo trukmių skirtumai pakankami). Kaip ir buvo tikėtasi, truputį mažiau hidrofobinėse C8 ir fenilo kolonėlėse jie yra sulaikomi silpniau. Geriausiu efektyvumu bei smailių simetriškumu pasižymi Acquity UPLC BEH C18 kolonėlė, kuri ir buvo pasirinkta tolesniems tyrimams.

3.6 lentelė

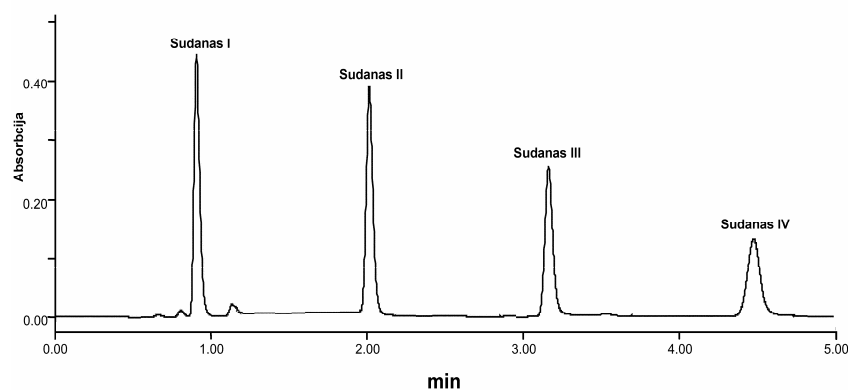
Sudano dažiklių atskyrimo skirtingose kolonėlėse charakteristikų palyginimas

Kolonėlė	Analitė	Sulaikymo trukmė, min	Asimetriškumo faktorius, A_s	Teorinių lėkštelių skaičius, N
Acquity UPLC BEH C18	Sudanas I	0,96	0,997	3076
	Sudanas II	2,02	0,988	3900
	Sudanas III	3,16	0,982	4640
	Sudanas IV	4,52	0,972	5045
Acquity UPLC BEH C8	Sudanas I	0,81	0,855	2810
	Sudanas II	1,85	0,885	3520
	Sudanas III	3,04	0,920	4050
	Sudanas IV	4,19	0,953	4160
Acquity UPLC BEH Phenyl	Sudanas I	0,55	0,732	1545
	Sudanas II	1,08	0,705	2720
	Sudanas III	1,86	0,681	2080
	Sudanas IV	2,25	0,655	2240

Atskyrimo sąlygų optimizavimas. 3.23 pav. pavaizduota Sudano dažiklių mišinio chromatograma gauta izokratinėse sąlygose Acquity UPLC BEH C18 kolonėlėje. Iš pateiktos chromatogramos matyti, kad nors analitės puikiai atskiriamos, tačiau jų atskyrimo trukmė siekia net 5 min. Lyginant su ESCh

metodu tai labai greitas atskyrimas, tačiau palyginti lėtas UESCh metodui. Deja, padidinus judrios fazės išstūmimo jėgą (sumažinus H₂O kiekį judrioje fazėje) Sudanas I eliuojamas beveik kartu su „tuščiu“ kolonėlės tūriu (~0,4 min). Tai komplikuoja jo kiekybinį nustatymą, kadangi analizuojant realius mėginius, su „tuščiu“ kolonėlės tūriu įprastai eliuojama daug pašalinių mėginio matricos komponentų.

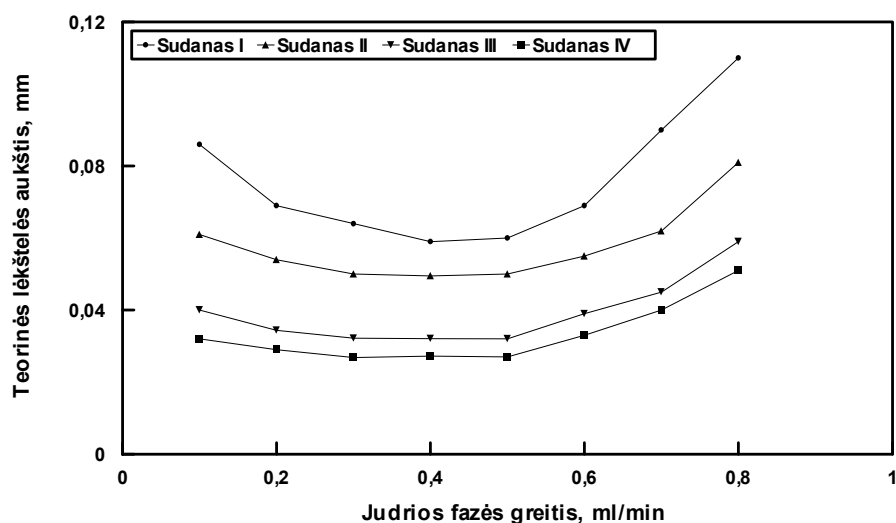
Kitas būdas pagreitinti atskyrimą izokratiname režime – padidinti judrios fazės tekėjimo greitį. Tačiau iš 3.24 pav. pateiktų analizių smailių efektyvumą (teorinės lėkštelės aukščių) priklausomybių nuo judrios fazės tūrinio tekėjimo greičio matyti, kad esant didesniems už 0,5 ml/min greičiams pradeda blogėti efektyvumas. Be to, padidinus judrios fazės tekėjimo greitį iki 0,8 ml/min, silpniausiai sulaikomos analitės (Sudanas I) sulaikymo trukmė sumažėja iki 0,6 min ir, dėl aukščiau paminėtų priežasčių, tai apsunkina realių mėginių analizę.



3.23 pav. Sudano dažiklių standartinio mišinio (10 mg/l) atskyrimas izokratinės eliuacijos režime. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm, 100 × 2,1 mm. Judri fazė –CH₃CN/H₂O (80:20 v/v); Tėkmės greitis – 0,5 ml/min. λ=500 nm.

Galiausiai išbandėme atskyrimą gradientinės eliuacijos sąlygomis. 3.7 lentelėje pateikta optimizuota gradientinės Sudano dažiklių eliuacijos programa. Pradine judria faze pasirinkome vandens-acetonitrilo mišinį, kuriame atskyrimo eigoje didiname acetonitrilo koncentraciją. Sudanų atskyrimą gradientiniu režimu iliustruoja 3.25 pav. pateikta chromatograma. Šiuo atveju analizių atskyrimo trukmė sumažėjo iki 2 min, atskyrimo atrankumas išliko puikus, o smailių efektyvumas dar pagerėjo. Būtina pažymėti, kad tradiciniu

ESCh metodu Sudano dažikliai paprastai atskiriami per 15-25 min [154, 164, 166].

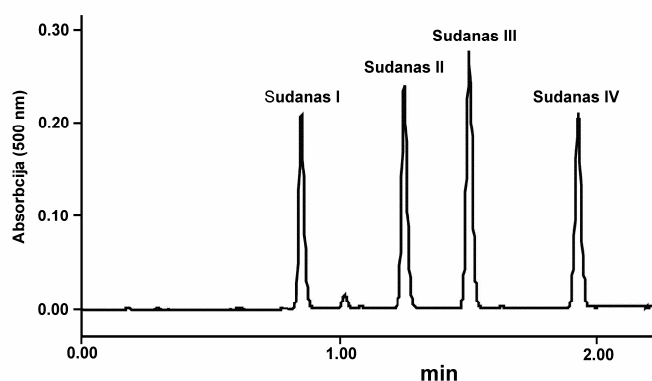


3.24 pav. Sudano dažiklių smailių efektyvumo priklausomybės nuo judrios fazės tėkmės greičio. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 100 $\times$ 2,1 mm. Judri fazė –CH₃CN/H₂O (80:20 v/v).

3.7 lentelė

Judrios fazės gradiento formavimo lentelė

Trukmė, min	% CH ₃ CN
0	75
1,5	100
2	100
2,5	75



3.25 pav. Sudano dažiklių standartinio mišinio (2,5 mg/l) atskyrimas optimizuotose sąlygose naudojant gradientinę eliaciją. Kolonėlė: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 100 $\times$ 2,1 mm. Tėkmės greitis – 0,5 ml/min. λ =500 nm.

Sudano dažikliai – hidrofobiniai junginiai, linę papildomai adsorbuotis mėginio įleidimo sistemos komponentuose (švirkšto adatoje, sujungimuose, mėginio kilpoje). Tai sukelia taip vadinamą mėginio pernašos (*sample carry-over*) efektą, kai įleidžiant kitą mėginį iš sistemos išsiplauna analičių likučiai iš anksčiau leisto mėginio. UESCh prietaise yra trys automatinio mėginio įleidimo būdai:

1. Dalinis kilpos užpildymas.
2. Dalinis kilpos užpildymas su adatos perpildymu.
3. Pilnas kilpos užpildymas.

Pirmiausiai palyginome jų atsikartojamumą Sudano dažikliams standartinėse UESCh sąlygose. Standartinį analičių tirpalą (10 µl) leidome trimis būdais po 6 kartus ir matavome analičių smailių plotų santykinius standartinius nuokrypius. Iš 3.8 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad visais trim būdais atsikartojamumas nėra geras (pagal prietaiso techninius duomenis turėtų būti apie 0,75-1,25%). Truputį geriau atsikartoja dalinis kilpos užpildymas su adatos perpildymu.

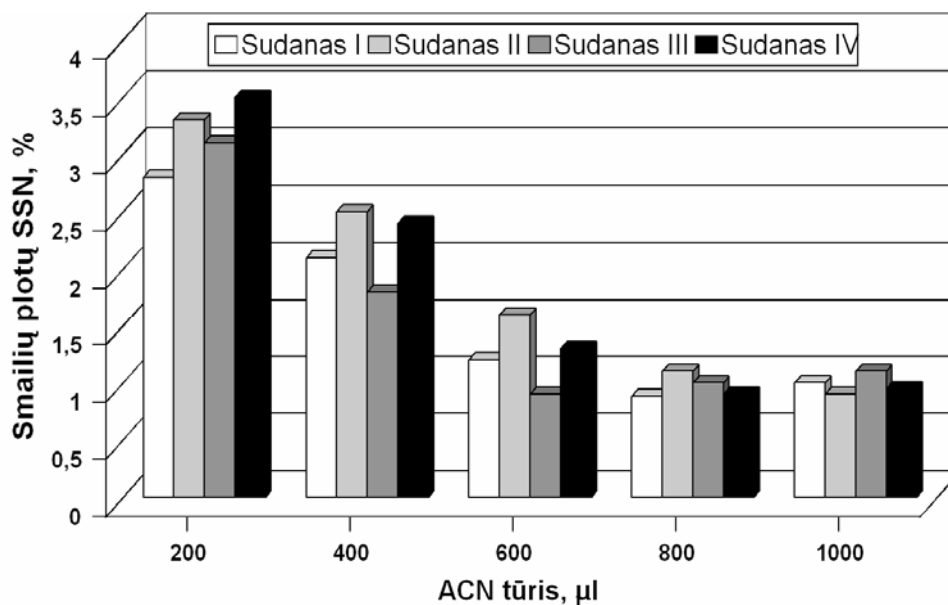
3.8 lentelė

Mėginio įleidimo atsikartojamumo (n=6) palyginimas Sudano dažikliams (10 mg/l)

Įleidimo būdas	Sudano dažiklių smailių plotų SSN, %
Dalinis kilpos užpildymas	4,3-5,2
Dalinis kilpos užpildymas su adatos perpildymu	2,8-4,0
Pilnas kilpos užpildymas	5,6-6,8

Visiems mėginio įleidimo būdams buvo fiksuojamas mėginio pernašos efektas: po Sudanų standartinio tirpalo analizės įleidus gryno ACN porciją, jo chromatogramoje taip pat buvo registruojamos analičių smailės. Šio efekto įtakos pašalinimui būtinas efektyvus mėginio įleidimo sistemos praplovimas tarp atskyrimo ciklų. Jis atliekamas automatiškai, tačiau galime keisti

praplovimo tirpiklio prigimtį ir jo tūrį. Praplovimo tirpikliu naudojome acetonitrilą. 3.26 pav. pateikta acetonitrilo tūrio įtaka Sudano dažiklių smailių plotų atsikartojamumui. Matome, kad praplaunant mėginio įleidimo sistemą didesniu tirpiklio tūriu, atsikartojamumas gerėja ir kai tūris >600 µl, mėginio pernašos efekto įtaka panaikinama.



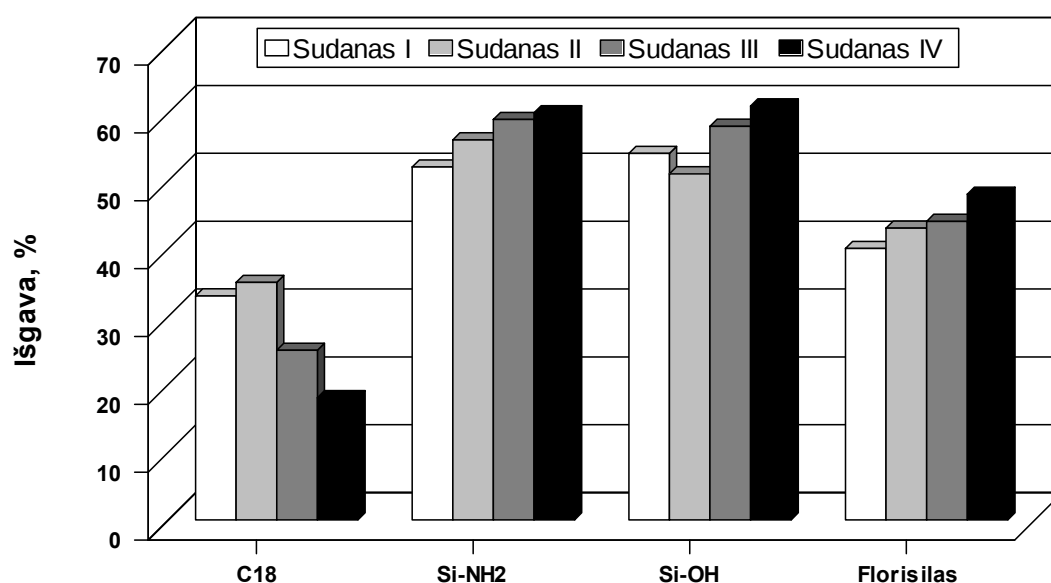
3.26 pav. Mėginio įleidimo sistemos praplovimo tirpiklio (ACN) tūrio įtaka Sudano dažiklių (10 mg/l) smailių plotų atsikartojamumui (n=6). Mėginio įleidimo būdas - dalinis kilpos užpildymas su adatos perpildymu. Mėginio tūris - 10 µl.

3.2.2. Sudano dažiklių ekstrakcija

Sorbentų palyginimas. Sudano dažiklių KDE ekstrakcijai iš čili pipirų miltelių buvo pasirinkti keturi skirtingos prigimtės komerciniai sorbentai: oktadecilsilikagelis C₁₈, aminopropilsilikagelis, silikagelis, ir florisilas (Mg silikatas). Pirmasis sorbentas visiškai nepolinis, o kiti trys – poliniai. Be to, aminopropilsilikagelis rūgščiose terpėse pasižymi dar ir anijonų mainų savybėmis.

Preliminariuose tyrimuose 0,25 g pipirų miltelių su Sudano dažiklių standartiniu priedu 2 min buvo disperguojami su 0,5 g atitinkamo sorbento. Kaip ir karbadokso bei olakvindokso atveju, pradiniu tirpikliu dažiklių ekstrakcijai pasirinkome acetonitrilą, kuris yra pagrindinis judrios fazės

komponentas UESCh analizėje, todėl galima analizuoti ekstraktus tiesiogiai be nugarinimo/pertirpinimo. Tyrimų metu buvo atsižvelgiama į du pagrindinius kriterijus: analičių išgavas ir gaunamų ekstraktų grynumą. Ekstraktų grynumas buvo vertinamas ir vizualiai (drumstumas, spalvos intensyvumas), ir lyginant pašalinių smailių skaičių ir jų intensyvumą skenuojančiu fotometriniu detektoriumi 200-500 nm bangos ilgių intervale registruojamose ekstraktų chromatogramose.



3.27 pav. Sudano dažiklių išgavos ($n=3$), išmatuotos skirtingais sorbentais disperguojant pipirų miltelių mėginius su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu. Desorbcija - acetonitrilu (5 ml).

Pirmiausiai buvo palygintos Sudano dažiklių išgavos skirtingais sorbentais disperguojant čili pipirų miltelius su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu. Iš 3.27 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad Sudano dažikliai efektyviau acetonitrilu išsiekstrahuoja iš mėginių disperguotų su poliniais silikagelio ir aminopropilsilikagelio sorbentais. Tokie rezultatai patvirtina literatūros duomenis apie tai, kad augalų mėginiai žymiai efektyviau disperguojasi su poliniais sorbentais [72, 73]. Taip pat polinis florisilo sorbentas pasižymi blogesniu efektyvumu, kadangi šio sorbento dalelių dydis bemaž dvigubai didesnis ($120 \mu\text{m}$) nei likusiųjų. Palyginę ekstraktų grynumą, nustatėme, kad su silikageliu ir aminopropilsilikageliu gaunami gryniausi ekstraktai. Tai

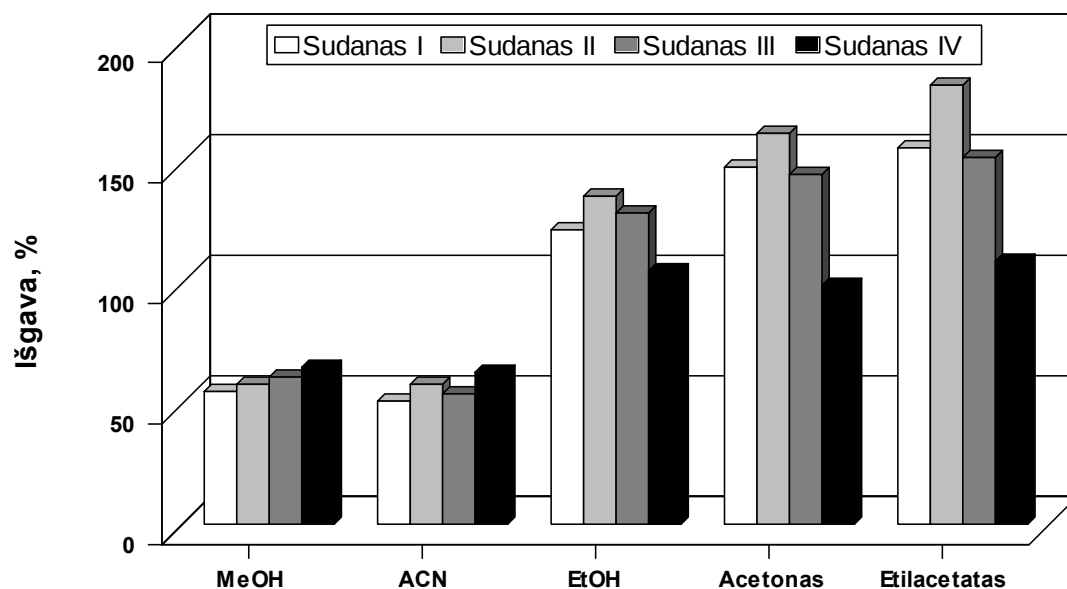
greičiausiai susiję su tuo, kad augalų matricoje dominuojantys pašaliniai junginiai yra poliškesni už tiriamus dažiklius, todėl didesnė jų dalis yra stipriau adsorbuojama poliniais sorbentais. Tolimesniems tyrimams pasirinkome silikagelio ir aminopropilsilikagelio sorbentus.

Tirpiklių palyginimas. Kadangi tiriamos analitės pasižymi nemenku hidrofobiškumu, efektyviausiai iš mėginio matricos jas turėtų desorbuoti/tirpinti nepoliniai tirpikliai, tokie kaip heksanas, chloroformas, toluenas ir pan. Tačiau tokie, labai stipriomis tirpinančiomis savybėmis pasižymintys tirpikliai ne mažiau efektyviai ekstrahuos ir pašalinius matricos komponentus, todėl nukentės ekstrakcijos atrankumas. Be to, minėti tirpikliai pasižymi silpna analičių išstūmimo iš polinių sorbentų jėga bei yra nesuderinami su chromatografinėi analizei naudojama judria faze. Dėl šių priežasčių tyrimams pasirinkome penkis pakankamai polinius, tačiau gerai tirpinančius analites ir suderinamus su judria faze tirpiklius: metanolį, jau išbandytą acetonitrilą, etanolį, acetoną ir etilacetatą. 3.28 pav. palygintos analičių išgavos, išmatuotos disperguojant pipirų miltelių mėginius su Si-OH sorbentu ir ekstrahuojant 5 ml atitinkamo tirpiklio. Analogiški tyrimai buvo atlikti ir disperguojant mėginius su aminopropilsilikageliu (3.29 pav.). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad abiem sorbentams tirtų tirpiklių ekstrakcinės/desorbcinės savybės stiprėja tokia seka:

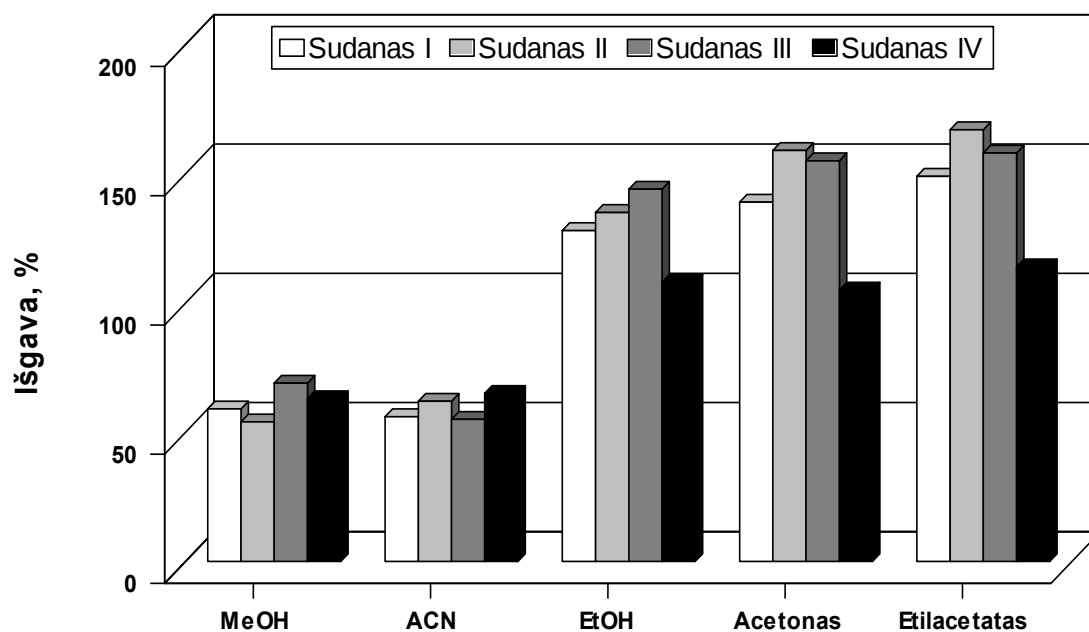
metanolis $\approx$ acetonitrilas < etanolis < acetonas < etilacetatas

Tokia pačia seka didėja ir ekstraktų užterštumas pašaliniais junginiais. Ekstraktai etanoliu, acetonu ir ypač etilacetatu yra labai užteršti, t.y. analičių chromatografiniam nustatymui trukdo kartu išsiekstrahuojančios priemaišos, todėl būtina papildoma tokių ekstraktų valymo procedūra. Tai akivaizdžiai patvirtina ir tas faktas, kad analičių, išskyrus Sudaną IV, išgavos šiais tirpikliais siekia net 130-170%. Iliustracijai, 3.30 pav. palygintos pipirų miltelių mėginio su 10 $\mu\text{g/g}$ analičių priedu ekstraktų acetonitrilu ir etanoliu chromatogramos. Tiek vizualiai palyginus Sudano dažiklių smailių profilius, tiek ir palyginus smailių absorbcijos spektrų grynumą matyti, kad etanolio ekstrakto analičių smailės persikloja su pašalinių junginių smailėmis. Kadangi

kai kurie pašaliniai junginiai absorbuoja šviesą ir prie dažiklių detektavimui naudojamo bangos ilgio (500 nm), galima daryti prielaidą, jog tai augaluose esantys organiniai pigmentai (pvz. karotenoidai). Desorbuojant acetonitrilu ir metanoliu ekstraktai žymiai grynesni ir papildomas jų valymas nereikalingas, tačiau Sudanų išgavos abiem tirpikliais siekia tik 50-65%.

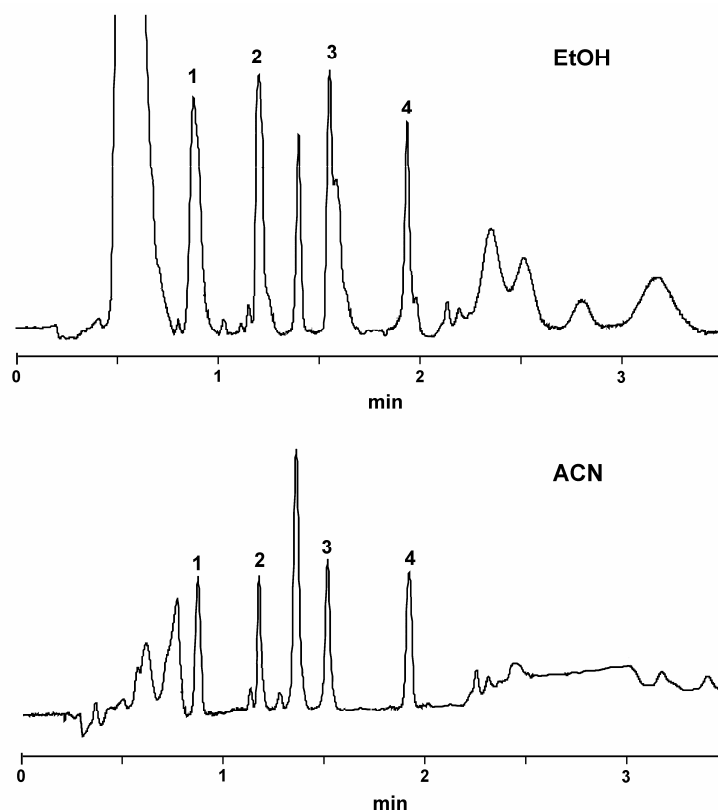


3.28 pav. Tirpiklio prigimties įtaka Sudano dažiklių išgavoms. Sorbentas – Si-OH. Desorbcija – 5 ml atitinkamo tirpiklio.



3.29 pav. Tirpiklio prigimties įtaka Sudano dažiklių išgavoms. Sorbentas – Si-NH₂. Desorbcija – 5 ml atitinkamo tirpiklio.

Nors Si-OH ir Si-NH₂ sorbentai pasižymi labai panašiomis ekstrakcinėmis savybėmis, tolimesniems tyrimams pasirinkome silikagelio sorbentą, kadangi jis žymiai pigesnis už aminopropilsilikagelį.

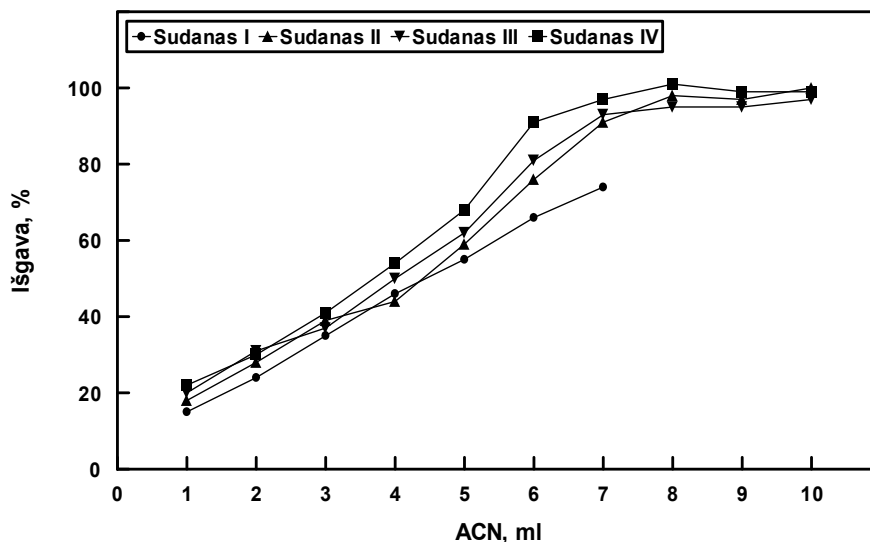


3.30 pav. Pipirų miltelių mėginio su 10 µg/g analičių priedu ekstraktų skirtingais tirpikliais (5 ml) chromatogramos. Sorbentas – Si-OH. Smailės: 1 – Sudanas I; 2 – Sudanas II; 3 – Sudanas III; 4 – Sudanas IV.

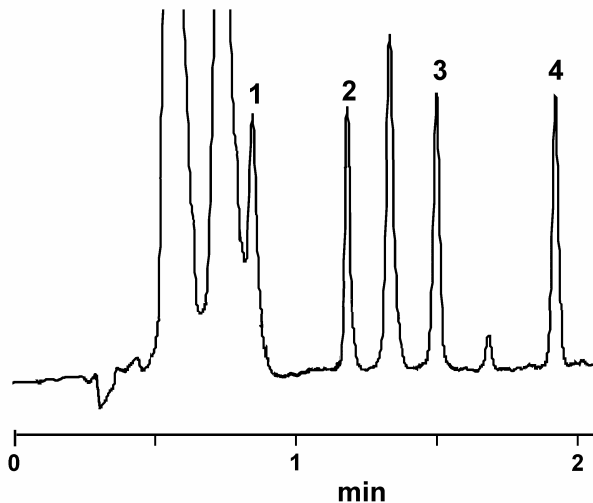
Ekstrakcijos/desorbcijos sąlygų optimizavimas. Nustatėme, kad padidinus acetonitrilo tūrį iki 8-10 ml, analičių išgavos padidėja iki 95-101% (3.31 pav.), tačiau kartu padidėja ir ekstraktų užterštumas, apsunkinantis poliškiausios analitės (Sudanas I) smailės integravimą. Naudojant ekstrakcijai 7 ml ir didesnę ACN tūrį, Sudano I smailė persikloja su silpniau sulaikomų pašalinių junginių smailėmis ir nebeintegruojama.

Taigi, tyrimų rezultatai rodo, kad acetonitrilas pakankamai efektyviai ekstrahuoja/desorbuoja analites iš pipirų miltelių matricos disperguotos su Si-OH sorbentu. Deja, Sudanui I ekstrakcijos atrankumas nėra geras. 3.32 pav.

pavaizduotoje ekstrakto chromatogramoje matome, kad šios analitės nustatymui trukdo silpniau už ją sulaikomi, t.y. poliškesni už Sudaną I, junginiai (ar junginys).



3.31 pav. Sudano dažiklių išgavų ($n=3$) iš čili pipirų miltelių su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu priklausomybė nuo acetonitrilo tūrio. Sorbentas – Si-OH.



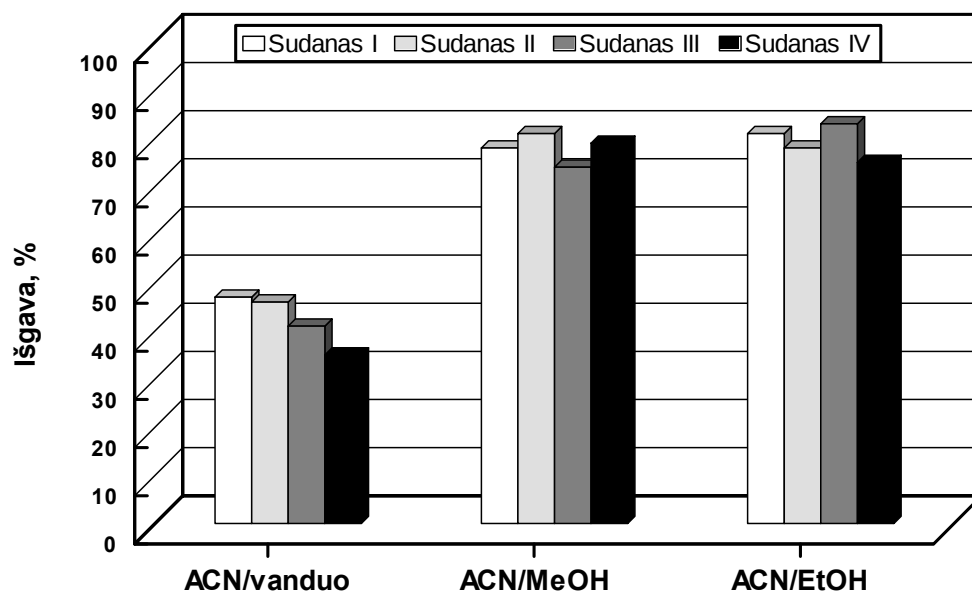
3.32 pav. Pipirų miltelių mėginio su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu ekstrakto (7 ml ACN) chromatograma. Sorbentas – Si-OH. Smailės: 1 – Sudanas I; 2 – Sudanas II; 3 – Sudanas III; 4 – Sudanas IV.

Kaip jau buvo minėta, KDE metode ekstrakcijos metu analitės pasiskirsto tarp trijų fazių: mėginio matricos, disperguojančiojo sorbento ir tirpiklio. Tokiu būdu, ekstrakcijos atrankumą galima pagerinti diferencijavus: 1)

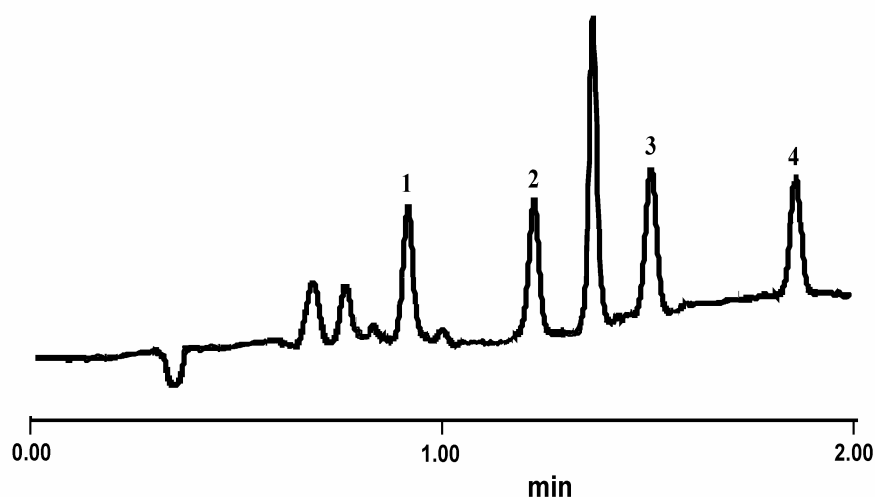
analičių/priemaišų pasiskirstymą tarp mėginio matricos ir tirpiklio; 2) jų pasiskirstymą tarp disperguojančio sorbento ir tirpiklio. Kitaip tariant, pirmu atveju būtina parinkti atrankesnę tirpiklį, kuris iš mėginio matricos efektyviai ekstrahuotų tiriamus dažiklius ir visai neekstrahuotų arba žymiai blogiau ekstrahuotų trukdančius junginius. Antruoju atveju reikėtų parinkti atrankesnę disperguojantį sorbentą/tirpiklį sistemą ir eliucijos metu atskirti analites nuo trukdančių junginių. Šiame kontekste labai perspektyvus ir paprastas sprendimas – pakeisti analičių/priemaišų sąveikos su disperguojančiu sorbentu mechanizmą panaudojus eliucijai HILIC principą. Tai iliustruoja 3.33 pav. palygintos Sudano dažiklių išgavos iš čili pipirų miltelių 5 ml acetonitrilo su 10 % (v/v) atitinkamo protoninio tirpiklio priedu. Palyginus išgavas, gautas desorbuojant 5 ml ACN, kurios siekė 50-60 % (žiūrėti 3.28 pav.), nedidelis MeOH ar EtOH priedas acetonitrile padidino dažiklių išgavas iki 70-80 %. Pridėjus į ACN nedidelį kiekį protoninio tirpiklio, išekstrahuotų iš mėginio matricos junginių sorbcijos mechanizmas iš adsorbcinio keičiasi į pasiskirstymo (HILIC). Tokiu atveju yra papildomai diferencijuojama skirtingo poliškumo junginių sąveika su disperguojančio sorbento paviršiumi (tiksliau su protoninio tirpiklio sluoksniu Si-OH paviršiuje): labai hidrofobinių junginių sąveika susilpninama, mažiau hidrofobinių – nesikeičia arba netgi sustiprinama. Taigi, galime daryti prielaidą, kad dažiklių išgavas padidino efektyvesnė jų eliucija dėl susilpnėjusios hidrofobinių dažiklių sąveikos su disperguojančiu sorbentu. Tačiau, remiantis tokia logika, ekstrakcija ACN/H₂O mišiniu turėtų būti dar efektyvesnė, kadangi dažiklių tirpumas vandenyje yra nepalyginamai blogesnis nei alkoholiuose, t.y. jų sorbcija vandeniniame Si-OH paviršiuje apskritai neturėtų vykti. Manytume, kad pastaruoju atveju ekstrakcijos efektyvumas nepagerėja dėl antrosios pusiausvyros (tarp tirpiklio ir mėginio) postūmio, t.y. dėl susilpnėjančios analičių ekstrakcijos iš mėginio matricos.

Tačiau žymiai svarbiau yra tai, kad sorbcijos mechanizmo pakeitimas akivaizdžiai pagerino ekstrakcijos atrankumą. Tai iliustruoja 3.34 pav. pavaizduota ekstrakto chromatograma. Kadangi ACN/MeOH ekstraktų

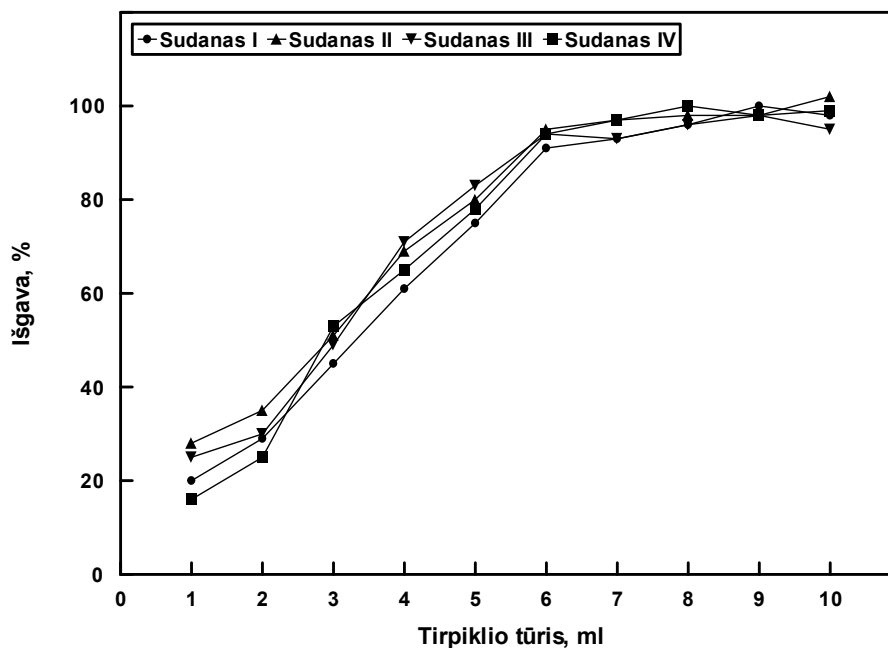
grynumas buvo geresnis nei ACN/EtOH, šis mišinys ir buvo pasirinktas galutiniam tikslui. Nustatėme (3.35 pav.), kad kiekybinei analičių ekstrakcijai iš 0,25 g masės mėginio pakanka 6-7 ml ACN/MeOH tirpiklių mišinio.



3.33 pav. Sudano dažiklių išgavos ($n=3$) iš čili pipirų miltelių su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu tirpiklių mišiniais (9:1, v/v). Bendras tirpiklio tūris – 5 ml. Sorbentas – Si-OH.



3.34 pav. Pipirų miltelių mėginio su $10 \mu\text{g/g}$ analičių priedu ekstrakto (5 ml ACN/MeOH 9:1, v/v) chromatograma. Sorbentas – Si-OH. Smailės: 1 – Sudanas I; 2 – Sudanas II; 3 – Sudanas III; 4 – Sudanas IV.



3.35 pav. Sudano dažiklių išgavų ($n=3$) iš čili pipirų miltelių su 10 $\mu\text{g/g}$ analičių priedu priklausomybė nuo tirpiklio tūrio. Tirpiklis – ACN/MeOH (9:1, v/v). Sorbentas – Si-OH.

Galiausiai ištyrėme desorbcijos greičio, dispergavimo trukmės bei mėginio masės įtaką Sudanų ekstrakcijos efektyvumui. Buvo nustatyta, kad gauti rezultatai iš esmės nesiskiria nuo analogiškų tyrimų rezultatų karbadoksui ir olakvindoksui, todėl jų nepateikėme.

Optimizuotos Sudano dažiklių ekstrakcijos KDE metodu sąlygos: 0,5 g silikagelio sorbento agato tiglyje maždaug 2 min triname su 0,25 g mėginio, disperguotą mišinį suberiame į polipropileninį švirkšto korpusą su filtru dugne, uždengiame iš viršaus kitu filtru, lengvai supresuojame ir desorbuojame analites 7 ml ACN/MeOH (9:1 v/v; greitis ~ 2 ml/min), ekstraktą nugariname azoto sraute iki sausumo, likutį tirpiname 0,5 ml ACN, filtruojame ir analizuojame.

3.2.3. Metodo tinkamumo įvertinimas

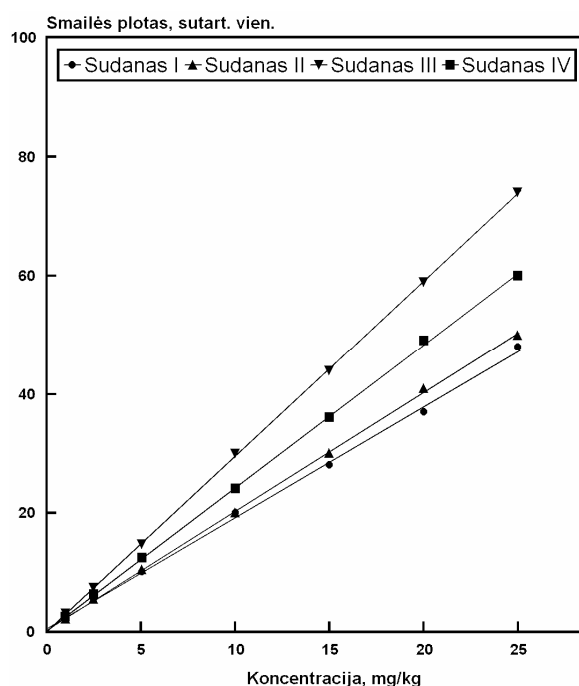
Kalibracinių kreivių teisiškumo intervalai kiekvienai analitei buvo matuojami su septyniomis skirtingomis analičių koncentracijomis. Kiekvienos koncentracijos tirpalas buvo matuojamas po 3 kartus. Aptikimo ribos buvo

nustatomos esant signalo/fono triukšmų santykiui 3, o nustatymo ribos – esant signalo/fono triukšmų santykiui 10. Šios charakteristikos surašytos 3.9 lentelėje, o 3.36 pav. pateiktos analizių kalibracinės kreivės.

3.9 lentelė

Pagrindinės analizinės charakteristikos ($n=3$)

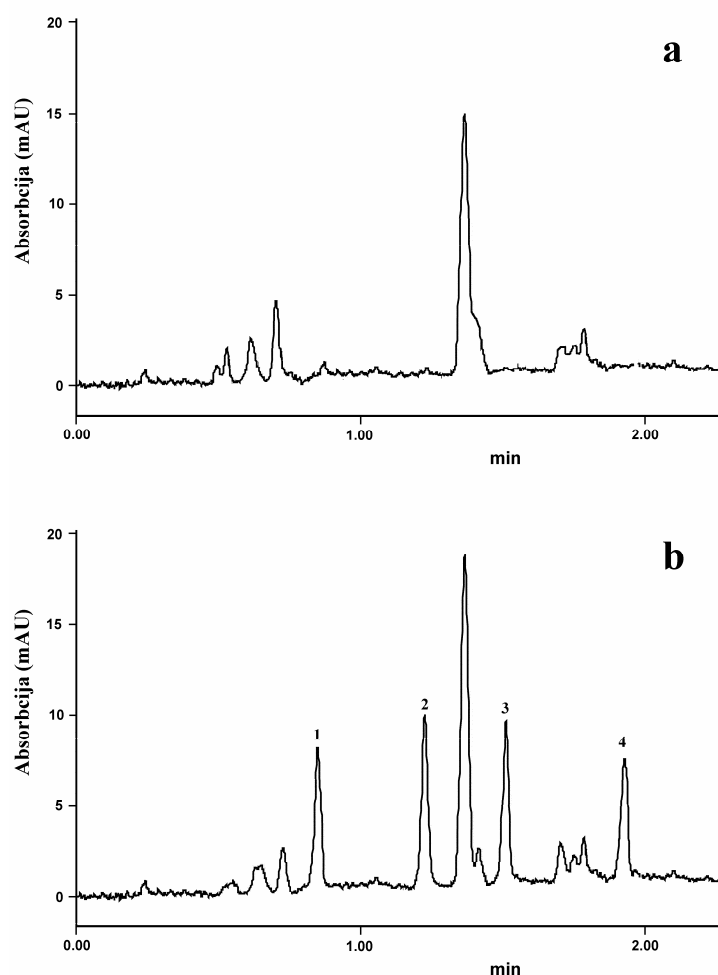
Analitė	Tiesiškumo intervalas, mg/kg	Koreliacijos koeficientas (r^2)	Aptikimo riba, mg/kg	Nustatymo riba, mg/kg
Sudanas I	1,0 - 25	0,997	0,25	0,8
Sudanas II	1,0 - 25	0,999	0,25	0,8
Sudanas III	1,0 - 25	0,998	0,30	1,0
Sudanas IV	1,0 - 25	0,998	0,40	1,3



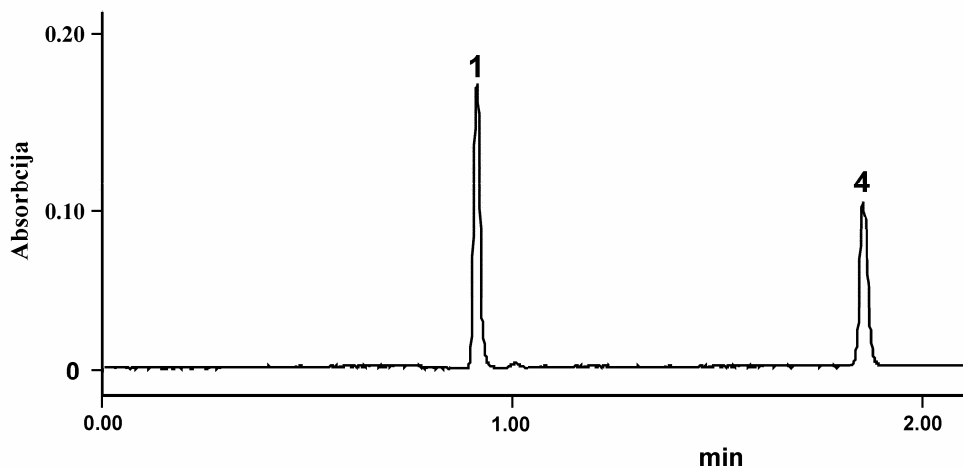
3.36 pav. Sudano dažiklių kalibracinės kreivės.

KDE-UESCh metodas buvo panaudotas Sudano dažikliams čili pipirų milteliuose nustatyti. Buvo analizuojami pipirų milteliai, įsigyti Lietuvos prekybos centre „Maxima“, bei Turkijos ir Indijos turgavietėse. Lietuvoje ir Indijoje įsigytuose pipirų milteliuose Sudano dažiklių neradome. Tai iliustruoja 3.37 pav. pateiktos Lietuvoje pirktų čili pipirų miltelių mėginio ekstrakto (a) ir

to paties mėginio su 1,0 mg/kg Sudano dažiklių standartiniu priedu ekstrakto (b) chromatogramos. Didelė smailė, registruojama tarp Sudano II ir Sudano III smailių priklauso β -karotino pigmentui (identifikavome lygindami išmatuotus absorbcijos spektrus su pateiktais literatūros šaltiniuose), kuris ekstrahuojasi kartu su Sudanais ir taip pat absorbuoja šviesą prie 500 nm. Tuo tarpu Turkijoje pirktuose čili pipirų milteliuose nustatėme nemažus Sudano I ir Sudano IV kiekius. Be to, šių pipirų miltelių ekstraktuose nėra β -karotino. Tai iliustruoja 3.38 pav. pateikta Turkijoje pirktų čili pipirų miltelių mėginio ekstrakto chromatograma. Dėl didelių dažiklių kiekių, ekstraktas analizuotas jo nenugarinus bei papildomai praskiedus ACN iki 25 ml.



3.37 pav. Lietuvoje pirktų čili pipirų miltelių mėginio ekstrakto (a) ir to paties mėginio su 1,0 mg/kg Sudano dažiklių standartiniu priedu ekstrakto (b) chromatogramos. Smailės: 1 – Sudanas I; 2 – Sudanas II; 3 – Sudanas III; 4 – Sudanas IV.



3.38 pav. Turkijoje pirktų čili pipirų miltelių mėginio (0,1 g) ekstrakto chromatograma. Ekstraktas analizuotas jo nenugarinus ir papildomai praskiedus ACN iki 25 ml. Smailės: 1 – Sudanas I; 4 – Sudanas IV.

3.10 lentelėje pateikti Sudano dažiklių nustatymo pipirų milteliuose rezultatai ir standartinių priedų išgavos. Visiems mėginiams išgavos viršija 80%, o nustatymo rezultatų glaudumas (SSN) mažesnis nei 15%. Taigi, šios charakteristikos tenkina ES reikalavimus, keliamus vaistų likučių ir kitų draudžiamų medžiagų nustatymui maisto produktuose. Būtina pažymėti, kad lyginant su karbadokso ir olakvindokso nustatymu, Sudano dažiklių analizės rezultatų išgavos ir atsikartojamumas truputį blogesni. Greičiausiai tai susiję su dideliu šių dažiklių polinkiu adsorbuotis ant indų ir sienelių. Pagrindiniai KDE-UESCh metodo privalumai: nereikalingas papildomas mėginių valymas po ekstrakcijos, mėginio paruošimo trukmė sumažėja nuo 1-2 val. iki 10-15 min, o analizių atskyrimas pagreitinamas nuo 15-25 iki 4 min.

3.10 lentelė

Sudano dažiklių nustatymas čili pipirų milteliuose ($n=3$)

Įsigijimo šalis	Analitė	Rasta, mg/kg	Pridėta, mg/kg	Išgava (%)	SSN (%)
Lietuva	Sudanas I	-	1,0	89	9
	Sudanas II	-	1,0	95	11
	Sudanas III	-	1,0	85	15
	Sudanas IV	-	1,0	83	13
Turkija*	Sudanas I	760	50	96	5
	Sudanas II	-	50	96	6
	Sudanas III	-	50	96	6
	Sudanas IV	340	50	106	5
Indija	Sudanas I	-	5,0	94	7
	Sudanas II	-	5,0	99	7
	Sudanas III	-	5,0	91	9
	Sudanas IV	-	5,0	84	8

*Ekstraktas skiestas ACN iki 25 ml.

IŠVADOS

1. Ištyrus karbadokso ir olakvindokso atskyrimo UESCh metodu hidrofilinės sąveikos chromatografijos sąlygomis ypatumus nustatyta, kad protoninių tirpiklių išstūmimo jėga silpnėja tokia tvarka: vanduo > metanolis > etanolis. Protoninio tirpiklio prigimtis stipriai įtakoja analičių smailių efektyvumą: pakeitus vandenį etanolio, smailės išsiplečia apie 2 kartus bei pablogėja jų simetriškumas. Judrios fazės pH (intervale nuo 4 iki 7) bei joninės jėgos įtaka analičių sulaikymui nežymi. Atskyrimas HILIC-UESCh metodu yra 3-4 kartus efektyvesnis ir maždaug 10 kartų greitesnis už atskyrimą atvirkščių fazių ESCh metodu.
2. Mėginio tirpiklio prigimties įtaka analičių smailių efektyvumui bei jų atskyrimo atrankumui silpnėja tokia tvarka: vanduo > metanolis > etanolis > acetonitrilas. Analizuojant analičių tirpalus acetonitrilo/vandens mišinyje, jų smailių efektyvumas išlieka nepakitęs pridėjus iki 15% v/v vandens. Maksimali neįtakojanti efektyvumo metanolio koncentracija acetonitrile siekia maždaug 25% v/v, o etanolio - 40% v/v.
3. Palyginus skirtingos prigimties (oktadecilsilikagelį, silikagelį ir aminopropilsilikagelį) sorbentus karbadokso ir olakvindokso išskyrimui iš pašarų KDE metodu nustatyta, kad gryniausi ekstraktai gaunami disperguojant mėginius su oktadecilsilikageliu. Efektyviau analizės desorbuojamos poliniais protoniniais tirpikliais (MeOH, EtOH), tuo tarpu ACN yra atrankesnis. Pilna ir atranki analičių ekstrakcija/desorbcija pasiekama eliuuojant 8 ml ACN-MeOH mišinio (80:20 v/v, greitis ~2 ml/min).
4. Karbadokso ir olakvindokso nustatymo KDE-HILIC-UESCh metodu charakteristikos palygintos su alternatyvaus skysčių-skysčių ekstrakcijos-ESCh metodo charakteristikomis. Išgavos (89-98 ir 90-97%) bei analizės rezultatų atsikartojamumas (6-10 ir 5-7%) yra panašūs abiem metodams. Pagrindiniai KDE-HILIC-UESCh metodo privalumai: 10 kartų didesnis nustatymo jautris bei maždaug 6-7 kartus greitesnė analizės procedūra.

5. Palyginus tris sorbentus (C18, C8 ir fenilo) Sudano dažiklių atskyrimui UESCh metodu nustatyta, kad truputį mažiau hidrofobinėse C8 ir fenilo kolonėlėse jie yra sulaikomi silpniau. Geriausiu efektyvumu bei smailių simetriškumu pasižymi C18 sorbentas. Naudojant H₂O/ACN judrią fazę ir gradientinę eliuciją keturi dažikliai puikiai atskiriami per 2 min, t.y. apie 10 kartų greičiau nei tradiciniu ESCh metodu.
6. Gryniausi Sudanų ekstraktai gaunami disperguojant su poliniais silikagelio ir aminopropilsilikagelio sorbentais. Su abiem sorbentais tirtų tirpiklių ekstrakcinės/desorbcinės savybės stiprėja tokia seka: metanolis $\approx$ acetonitrilas < etanolis < acetonas < etilacetatas. Tokia pačia seka didėja ir ekstraktų užterštumas pašaliniais junginiais.
7. Pridėjus į ACN nedidelį kiekį protoninio tirpiklio (MeOH), t.y. pakeitus analičių sorbcijos mechanizmą iš adsorbcinio į HILIC, papildomai diferencijuojama skirtingo poliškumo junginių sąveiką su sorbentu: labai hidrofobinių junginių sąveika susilpninama, mažiau hidrofobinių – nesikeičia arba netgi sustiprinama. HILIC principo panaudojimas KDE metode pagreitino hidrofobinių junginių ekstrakciją bei pagerino ekstrakcijos atrankumą. Pilna (išgavos >90%) analičių ekstrakcija/desorbcija pasiekama su 7 ml ACN/MeOH (9:1, v/v; greitis ~2 ml/min).
8. Įvertinus KDE-UESCh metodo analizines charakteristikas nustatyta, kad visiems dažikliams gaunami ES reikalavimus tenkinantys išgavų (83–106%) ir glaudumo (SSN≤15%) rezultatai. Pagrindinis metodo privalumas lyginant su iki šiol publikuotais metodais – nereikalingas papildomas mėginių valymas po ekstrakcijos, žymiai mažesnė (6 kartus) analizės trukmė ir paprastesnis mėginio paruošimas.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI:

1. **G. Kesiūnaitė**, A. Padarauskas. Development of high-performance liquid chromatography for the determination of carbadox and olaquinox in animal feed. *Chemija*, Vol. 18, No 3 (2007) 30-34.
2. **G. Kesiūnaitė**, E. Naujalis, A. Padarauskas. Matrix solid-phase dispersion extraction of carbadox and olaquinox in feed followed by hydrophilic interaction ultra-high pressure liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1209 (2008) 83-87.
3. **G. Kesiūnaitė**, A. Linkevičiūtė, E. Naujalis, A. Padarauskas. Matrix solid-phase dispersion extraction and UPLC determination of Sudan dyes in chili powder. *Chromatographia*, (2009) priimtas publikavimui.

KONFERENCIJŲ MEDŽIAGOS IR TEZĖS:

1. A. Linkevičiūtė, **G. Kesiūnaitė**, E. Naujalis, A. Padarauskas. Comparison of liquid-liquid extraction and matrix solid phase dispersion for the extraction of Sudan dyes from chilli powder. Konferencijos “Neorganinių medžiagų chemija ir technologija” pranešimų medžiaga. Kaunas, 2008, p. 81-82.
2. **G. Kesiūnaitė**, A. Čiuberkytė, A. Padarauskas. Investigation of the matrix solid-phase dispersion method for the extraction of carbadox and olaquinox from animal feed. Konferencijos “Neorganinių medžiagų chemija ir technologija” pranešimų medžiaga. Kaunas, 2008, p. 79-80.
3. **G. Kesiūnaitė**, A. Linkevičiūtė, E. Naujalis, A. Padarauskas. Matrix solid-phase dispersion extraction and ultra-performance liquid chromatographic determination of Sudan dyes. Thesis of the 5th Nordic Separation Science Society International Conference, Tallinn, Estonia, 26-29 August 2009, p. 101.

PADĖKA

Dėkoju Lietuvos Valstybiniam Mokslo ir Studijų Fondui už finansinę paramą.

Literatūros sąrašas

1. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. *Practical HPLC method development. 2nd Editon*, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997.
2. P. Jandera. *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1421.
3. P. Hemstrom, K. Irgum. *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1784.
4. A. Maruška, O. Kornysova, E. Machtejevas. *Efektyviosios chromatografijos pagrindai*, Kaunas, VDU, 2005.
5. A. J. Alpert. *J. Chromatogr. A*, 499 (1990) 17.
6. B. Y. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges. *J. Chromatogr. A*, 548 (1991) 13.
7. B. A. Olsen. *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 113.
8. S. D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C. E. West, R. B. van Breemen. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5358.
9. E. S. Grumbach, D. M. Wagrowski-Diehl, J. R. Mazzeo, B. Alden, P. C. Iraneta. *LC-GC North America*, 22 (2004) 1010.
10. W. Bicker, J. Y. Wu, M. Lammerhofer, W. Lindner. *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 2971.
11. Z. Hao, B. Xiao, N. Weng. *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1449.
12. R. P. W. Scott. *Adv. Chromatogr.*, 20 (1982) 169.
13. Y. Guo, S. Gaiki. *J. Chromatogr. A*, 1074 (2005) 71.
14. A. J. Alpert. *Anal. Chem.*, 80 (2008) 62.
15. U. Neue. *HPLC Columns-Theory, Technology and Practice*, New York Wiley-VCH, 1997.
16. M. Liu, E. X. Chen, R. Ji, D. Semin. *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 255.
17. D. Guillarme, S. Heinisch. *Sep. Purif.*, 34 (2005) 181.
18. J. Bowermaster, H. McNair. *J. Chromatogr. Sci.*, 22 (1984) 165.
19. M. H. Chen, C. Horvath. *J. Chromatogr. A*, 788 (1997) 51.

20. J. V. Tran, P. Molander, T. Greibrokk, E. Lundanes. *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 930.
21. G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg. *J. Chromatogr. A*, 1092 (2005) 246.
22. A. J. Alpert, M. Shukla, A. K. Shukla, L. R. Zieske. *J. Chromatogr. A*, 676, (1994) 191.
23. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka. *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 474.
24. S. C. Lin, W. C. Lee. *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 302.
25. J. C. Valette, C. Demesmay, J. L. Rocca, E. Verdon. *Chromatographia*, 59 (2004) 55.
26. M. Lafosse, B. Herbreteau, M. Dreux, L. Morinallorym. *J. Chromatogr. A*, 472 (1989) 209.
27. M. Strege. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2439.
28. T. Yoshida. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3038.
29. M. J. Kieliszewski, M. O'Neill, J. Leykam, R. Orlando. *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 2541.
30. H. J. Fu, W. H. Jin, H. Xiao, H. W. Huang, H. F. Zou. *Electrophoresis*, 24 (2003) 2084.
31. C. Brons, C. Olieman. *J. Chromatogr. A*, 259 (1983) 79.
32. B. Herbreteau, M. Lafosse, L. Morinallory, M. Dreux. *Chromatographia*, 33 (1992) 325.
33. H. Tanaka, X. J. Zhou, O. Masayoshi. *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 119.
34. C. McClintic, D. M. Remick, J. A. Peterson, D. S. Risley. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 26 (2003) 3093.
35. T. Yoshida, T. Okada. *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 1.
36. Ž. Daunoravičius, I. Juknaitė, E. Naujalis, A. Padarauskas. *Chromatographia B*, 63 (2006) 373.
37. S. R. Needham, P. R. Brown, K. Duft, D. Bell. *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 159.

38. S. M. Han. *Biomed. Chromatogr.*, 11 (1997) 259.
39. J. Feurle, H. Jomaa, M. Wilhelm, B. Gutsche, M. Herderich. *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 111.
40. A. Berthod, S. S. C. Chang, J. P. S. Kullman, D. W. Armstrong. *Talanta*, 47 (1998) 1001.
41. Y. Liu, S. Urgaonkar, J. G. Verkade, D. W. Armstrong. *J. Chromatogr. A*, 1079 (2005) 146.
42. D. W. Armstrong, H. L. Jin. *J. Chromatogr. A*, 462 (1989) 219.
43. D. S. Risley, M. A. Strege. *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1736.
44. C. Viklund, K. Irgum. *Macromolecules*, 33 (2000) 2539.
45. C. Viklund, A. Sjogren, K. Irgum, I. Nes. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 444.
46. W. Jiang, K. Irgum. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1993.
47. W. Jiang, K. Irgum. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4682.
48. F. Svec, J. M. J. Frechet. *Anal. Chem.*, 64 (1992) 820.
49. S. Hjerten, J. L. Liao, R. Zhang. *J. Chromatogr. A*, 473 (1989) 273.
50. Z. J. Jiang, N.W. Smith, P. D. Ferguson, M. R. Taylor. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 1243.
51. Z. Jiang, J. Reilly, B. Everatt, N. W. Smith. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2439.
52. J. Lin, J. Lin, X. Lin, Z. Xie. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 801.
53. P. Holdšvendova, J. Suchankova, M. Bunček, V. Bačkovska, P. Coufal. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 23.
54. B. W. Pack, D. S. Risley. *J. Chromatogr. A*, 1073 (2005) 269.
55. T. Soga, Y. Inoue, K. Yamaguchi. *J. Chromatogr. A*, 625 (1992) 151.
56. A. S. Feste, I. Khan. *J. Chromatogr. A*, 630 (1992) 129.
57. S. C. Churms. *J. Chromatogr. A*, 720 (1996) 75.
58. X. Wang, W. Li, H. T. Rasmussen. *J. Chromatogr. A*, 1083 (2005) 58.
59. Y. Guo, A. H. Huang. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 31 (2003) 1191.
60. D. S. Risley, W. Q. Yang, J. A. Peterson. *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 256.
61. V. Gianotti, U. Chiuminatto, E. Mazzucco, F. Gosetti, M. Bottaro, P. Frascarolo, M. C. Genarro. *J. Chromatogr. A*, 1185 (2008) 296.

62. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch. *J. Chromatorgr. A*, 1058 (2004) 197.
63. C. Dell'Aversano, P. Hess, M. A. Quilliam. *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 190.
64. G. Gizzi, U. Vincent, C. Van Holst, J. De Jong, C. Genouel. *Food Addit. Contam.*, 24 (2007) 1226.
65. F. J. Dos Ramos, I. N. Da Silveira, G. De Graaf. *J. Chromatogr. A*, 558 (1991) 125.
66. S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short. *J. Chromatogr. A*, 475 (1989) 353.
67. S. A. Barker. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 151.
68. M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez. *Anal Bioanal Chem.*, 391 (2008) 963.
69. M. Koel, M. Kaljurand. *Pure Appl. Chem.*, 78 (2006) 1993.
70. J. J. Ramos, M. J. Gonzalez, L. Ramos. *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 595.
71. G. Karasova, E. Brandsteterova, M. Lachova. *Czech J. Food Sci.*, 21 (2008) 219.
72. S. A. Barker. *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 115.
73. S. A. Barker. *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 63.
74. T. F. S. Santos, A. Aquino, H. S. Dorea, S. Navickienė. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 1425.
75. L. Minuti, R. Pellegrino. *J. Chromatogr. A*, 1185 (2008) 23.
76. M. Radišič, S. Grujič, T. Vasiljevič, M. Laušević. *Food Chem.*, 113 (2009) 712.
77. X. Zhu, X. Qi, J. Wang, J. Yue, Z. D. Sun, W. J. Lei. *Chromatographia*, 65 (2007) 625.
78. M. Garcia, I. Rodriguez, R. Cela. *Anal. Chim. Acta*, 590 (2007) 17.
79. P. C. Abhilash, N. Singh. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 16 (2009) 727.
80. P. C. Abhilash, N. Singh. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 81 (2008) 604.

81. M. Fernandez-Alvarez, M. Llompart, J. P. Lamas, M. Lores, M. Lores, C. Garcia-Jares, R. Cela, T. Dagnac. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2832.
82. B. Albero, C. Sanchez-Brunete, J. L. Tadeo. *J. Chromatogr. A*, 1007 (2003) 137.
83. J. Cai, Y. Gao, X. Zhu, Q. Su. *Anal Bioanal Chem.*, 383 (2005) 869.
84. P. C. Abhilash, S. Jamil, N. Singh. *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007) 43.
85. N. Furusawa. *Anal Bioanal Chem.*, 378 (2004) 2004.
86. A. C. Manhita, D. M. Teixeira, C. T. Costa. *J. Chromatogr. A*, 1129 (2006) 14.
87. T. Visnevschi-Necrasov, S. C. Cunha, E. Nunes, M. B. P. P. Oliveira. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3720.
88. J. Sherma, B. Fried. *Handbook of Thin-Layer Chromatography. 3rd edition*, New York, Marcel Dekker Inc., 2003.
89. D. M. Teixeira, R. F. Patao, A. V. Coelho, C. Teixeira da Costa. *J. Chromatogr. A*, 1103 (2006) 22.
90. D. M. Teixeira, C. Teixeira da Costa. *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 175.
91. E. M. Kristenson, E. G. J. Haverkate, C. J. Slooten, L. Ramos, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman. *J. Chromatogr. A*, 917 (2001) 277.
92. M. Michel, B. J. Buszewski. *J. Chromatogr. B*, 800 (2004) 309.
93. J. Blesa, J. M. Soriano, J. C. Molto, R. Marin, J. Manes. *J. Chromatogr. A*, 1011 (2003) 49.
94. C. M. D. Soares, J. Oliveira Fernandes. *Food Anal. Methods*, 2 (2009) 197.
95. M. Walles, J. Borlak, K. Levsen. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002) 1179.
96. S. Wang, Y. Xu., C. Pan, S. Jiang, F. M. Liu. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 673.
97. L. Guo, M. Guan, C. Zhao, H. Zhang. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (2008) 1431.

98. M. P. Garcka de Lasera, M. L. Reyes-Reyes. *Food Chem.*, 114 (2009) 1510.
99. C. M. Torres, Y. Pico, J. Manes. *Chromatographia*, 41 (1995) 685.
100. P. Campins-Falco, J. Verdu-Andres, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herraiez-Hernandez. *J. Chromatogr. A*, 1211 (2008) 13.
101. E. Brandšteterova, P. Kubalec, L. Bovanova P. Simko, A. Bednarikova, L. Machackova. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 205 (1997) 311.
102. M. Sergi, A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, S. Materazzi, R. Curini.. *Chromatographia*, 65 (2007) 757.
103. M. S. Dopico-Garcia, P. Valentao, A. Jagodzinska, J. Klepczynska, L. Guerra, P. B. Andrade, R. M. Seabra. *Talanta*, 74 (2007) 20.
104. M. S. S. Curren, J. W. King. *J. Agric. Food. Chem.*, 49 (2001) 2175.
105. R. N. Wu, F. L. Han, J. Shang, H. Hu. *Eur. Food. Res. Technol.*, 228 (2009) 1009.
106. J. J. Ramos, R. Rial-Otero, L. Ramos, J. L. Capelo. *J. Chromatogr. A*, 1212 (2008) 145.
107. E. M. Kristenson, S. Shahmiri, C. J. Slooten, R. J. J. Vreuls, U. A. T. Brinkman. *Chromatographia*, 59 (2004) 315.
108. T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert. *Chromatographia*, 57 (2003) 5.
109. M. Moreno, E. Bermejo, A. Sanchez, M. Chicharro, A. Zapardiel. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 867.
110. H. Yan, F. Qiao, K. Ho Row. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 8242.
111. C. Crescenzi, S. Bayouth, P. A. G. Cormack, T. Klein, K. Ensing. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2171.
112. F. C. Stenger, V. Cechinel-Filho, C. Meyre-Silva, T. M. B. Bresolin, C. A. Rodrigues. *Chromatographia*, 69 (2009) 183.
113. M. Fernandez, Y. Pico, J. Manes. *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 43.
114. M. Navaro, Y. Pico, R. Martin, J. Manes. *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 201.

115. Y. Y. Hu, P. Zheng, Z. X. Zhang, Y. Z. He. *J. Agric. Food. Chem.*, 54 (2006) 4126.
116. A. M. Carro, R. A. Lorenzo, F. Fernandez, R. Rodil, R. Cela. *J. Chromatogr. A*, 1071 (2005) 93.
117. A. I. Valenzuela, R. Lorenzini, M. J. Redondo, G. Font. *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 101.
118. J. Tolls, R. Samperi, A. Di Corcia. *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 314.
119. J. Tolls, M. Haller, D. T. H. M. Sjim. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 5242.
120. Prieiga per internetą: <http://www.chemicalbook.com>
121. G.Y. Miller, K. Algozin, P. McNamara, E. J. Bush. *J. Agric. Appl. Econom.*, 35 (2003) 469.
122. H. De Vries, J. Bojarski, A. A. Donker, A. Bakri, G. M. J. B. Van Henegouwen. *Toxicology*, 63 (1990) 85.
123. *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: Prepared by the sixtieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Geneva, World Health Organization, 2003.
124. H. Yoshimura, M. Nakamura, T. Koeda, K. Yoshikawa. *Mutat. Res.*, 90 (1981) 49.
125. T. Nunoshiba, H. Nishioka, *Mutat. Res.*, 217 (1989) 203.
126. J. Zou, Q. Chen, S. Tang, X. Jin, K. P. Chen, T. Zhang, X. L. Xiao. *Mutat. Res.*, 676 (2009) 27.
127. Commission Regulation No. 2788/98. *Official J. Eur. Commun.*, L347 (1998) 3.
128. Official Methods of Analysis. *Drugs in Feeds Chapter 5*. AOAC International: Arlington, VA, 1995.
129. D. Zhao, L. He, C. Pu, A. Deng. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 2653.
130. Prieiga per internetą: http://gentaur.com/olaquinox_elisa_test_kit.htm.

131. M. J. Lynch, F. R. Mosher, R. P. Schneider, H. G. Fouda, J. A. Risk. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 74 (1991) 611.
132. M. Horie, M. Muryama. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 37 (1996) 8.
133. M. M. Aerts, W. M. Beek, H. J. Keukens, U. A. Brinkman. *J. Chromatogr.*, 456 (1988) 105.
134. M. J. Hutchinson, P. B. Young, D. G. Kennedy. *Food Addit. Contam.*, 21 (2004) 538.
135. F. J. Dos Ramos, I. N. Da Silveira, G. De Graaf. *J. Chromatogr. A*, 558 (1991) 125.
136. S. Y. Lin, S. L. Jeng. *J. Food Protect.*, 64 (2001) 1231.
137. R. G. Luchterfeld. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 60 (1977) 279.
138. F.J. Dos Ramos, I.N. Da Silveira, G. De Graaf. *J. Chromatogr.*, 456 (1988) 105.
139. C. Van Poucke, K. De Keyser, A. Baltusnikiene, J. D. G. McEvoy, C. Van Peteghem. *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 99.
140. C. Van Poucke, F. Dumoulin, C. Van Peteghem. *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 211.
141. C. Van Poucke, F. Dumoulin, S.Yakkundi, C. Situ, C. T. Elliott, E. M. Grutters, R. Verheijen, R. Schilt, S. Eriksson, C. Van Peteghem. *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 204.
142. M. J. Hutchinson, P. B. Young, D. G. Kennedy. *Food Addit. Contam.*, 22 (2005) 113.
143. G. Gizzi, U. Vincent, C. Van Holst, J. De Jong, C. Genouel. *Food Addit. Contam.*, 24 (2007) 1226.
144. WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 8: Some Aromatic Azo Compounds. Summary of Data Reported and Evaluation.
145. *Aldrich chemical catalogue*, Milwaukee, WI, 1992.
146. R. D. Lillie. *Conn's Biological Stains*. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1969.

147. D. E. Bowyer. *Atherosclerosis*, 26 (1977) 387.
148. Q. M. Ali, P.K. Palanisamy, S. Manickasundarram, P.Kannan. *Optics Commun.*, 267 (2006) 236.
149. Council Directive No. 67/548/EEC.
150. M. Stiborova, V. Martinek, H. Rydlova. *Cancer Letters*, 220 (2005) 145.
151. *Sudano I, Sudano II, Sudano III ir Sudano IV dažiklių įvertinimas vartotojams*, Vilnius, Rizikos vertinimo ir visuomenės informavimo centras, 2005.
152. L. He, Y. Su, B. Fang, X. Shen, Z. L. Zeng, Y. H. Liu. *Anal. Chim. Acta*, 594 (2007) 139.
153. Y. Chang, H. Wu, A. Xia, Q. Han, H. Cui, R. Q. Yu. *Talanta*, 72 (2007) 926.
154. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistara, I. Zagnoni. *J. Chromatogr. A*, 1042 (2004) 123.
155. J. Yuan, L. Liao, Y. Lin, C. Deng, B. He. *Anal. Chim. Acta*, 607 (2008) 160.
156. Y. Fan, M. Chen, C. Shentu, F. El-Sepai. *Anal. Chim. Acta*, 650 (2009) 65.
157. E. Ertas, H. Ozer, C. Alasalvar. *Food Chem.*, 105 (2007) 756.
158. C. V. Di Anibal, M. Odena, I. Ruisanchez, M. Pilar Callao. *Talanta*, 79 (2009) 887.
159. Ch. Yu, Q. Liu, L. Lan, B. Hu. *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 124.
160. O. Pardo, V. Yusa, N. Leon, A. Pastor. *Talanta*, 78 (2009) 178.
161. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni. *J. Chromatogr. A*, 1058 (2004) 127.
162. M. R. V. S. Murty, N. S. Chary, S. Prabhakar, N. P. Raju, M. Vairamani. *Food Chem.*, 115 (2009) 1556.
163. H. Sun, F. Wang, L. Feng. *J. Chromatogr. A*, 1164 (2007) 120.
164. C. Yu, Q. Liu, L. Lan, B. Hu. *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 124.

165. F. Puoci, C. Garreffa, F. Iemma, R. Muzzalupo, U. G. Spizzirri, N. Picci. *Food Chem.*, 93 (2005) 349.
166. W. Liu, W. Zhao, J. Chen, M. Yang. *Anal. Chim. Acta*, 605 (2007) 41.
167. E. Mejia, Y. Ding, M. F. Mora, C. D. Garcia. *Food Chem.*, 102 (2007) 1027.
168. S. Liu, X. Zhang, X. Lin, X. Wu. *Electrophoresis*, 28 (2007) 1696.
169. Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Sun. *J. Chromatogr. A*, 1129 (2006) 34.
170. O. Chailapakul, W. Wonsawat, W. Siangproh, K. Grudpan, Y. F. Zhao, Z. W. Zhu. *Food Chem.*, 109 (2008) 876.
171. M. Du, H. X. Han, Zh. Zhou, S. Wu. *Food Chem.*, 105 (2007) 883.
172. L. Ming, X. Xi, T. Chen, J. Liu. *Sensor*, 8 (2008) 1890.
173. T. Gan, K. Li, K. Wu. *Sensors and Actuators B*, 132 (2008) 134.
174. H. Lin, G. Li, K. Wu. *Food Chem.*, 107 (2008) 531.
175. Y. Wang, D. Wei, H. Yang, Y. Yang, et al. *Talanta*, 77 (2009) 1783.
176. C. Ju, Y. Tang, H. Fan, J. Chen. *Anal. Chim. Acta*, 621 (2008) 200.
177. A. J. Alpert. *Anal. Chem.*, 80 (2008) 62.