

**UNIVERSITETI I PRISHTINËS “HASAN  
PRISHTINA”**

**FSHMN – Departamenti i Kimisë**



**Punimi i diplomës MASTER**

**Zhvillimi i metodës analitike për përcaktimin e disa  
acideve karboksilike përmes kromatografisë me  
përjashtim të joneve**

Kandidati:  
Petrit Hadergjonaj

Mentori:  
Prof Dr. Avni Berisha

Prishtinë, Korrik 2024

## Abstrakt

Kromatografia me përjashtim jonik është një teknikë relativisht e vjetër e cila ende përdoret gjerësisht në shumë laboratorë, veçanërisht në kontekstin e analizave bioteknike dhe farmaceutike. 16 Acidet organik që kemi përdorur në këtë studim janë lloje që mund t'i gjejmë në trupin e njeriut, në përditshmërin tone dhe në ilaqe farmaceutike. Kromatografia me përjashtim jonik është veçanërisht e dobishme për ndarjen e specieve molekulare me veti hidrofiliqe ose hidrofobike nga njëra-tjetra dhe nga sasi të mëdha specimesh tjera jonike. Parimet bazë dhe metodologjia e kromatografisë me përjashtim jonik janë paraqitur dhe ilustruar me shembuj tipikë. Përkundër që përdoret prej kohësh si teknikë analitike edhe kohëve të fundit ka pas zhvillime mbresëlënëse në kromatografinë e përjashtimit jonik. Këto përfshijnë metoda të reja me ndjeshmëri të lartë të përqeshmërisë së substancave që janë pak të jonizuara dhe një metodë të re për ndarjen dhe detektim kromatografik të ujit.

Kromatografia me përjashtim jonik në të vërtetë përfshin ndarjen kromatografike të llojeve molekulare neutrale në vend të joneve. Natyrisht, jonet shpesh mund të shndërrohen lehtësisht në lloje molekulare siç është rasti kur anionet e acidit të dobët acidifikohen. Një arsye tjetër e mundshme për përfshirjen e kromatografisë me përjashtim jonik në këtë projekt është se kolona e shkëmbimit të joneve përdoret përgjithësisht për ndarjet e kryera nga kromatografia me përjashtim jonik. Shpjegimi gjerësisht i pranuar i kromatografisë me përjashtim jonik është se ndarja ndodh për shkak të dallimeve në ndarjen e substancave të tretshme molekulare midis eluentit në lëvizje dhe eluentit që është imobilizuar brenda fazës së rrëshirës. Aftësia për të ndarë substancat molekulare nga sasi shumë më të mëdha jonesh është një nga avantazhet tërheqëse të kromatografisë me përjashtim jonik.

Mekanizmi i procesit të ndarjes është padyshim më kompleks se sa shpjegimi i sapodhënë. Pjesërisht për këtë arsye, kromatografisë me përjashtim jonik ndonjëherë i janë dhënë emra të tjerë si kromatografia e përjashtimit jonik Donnan, kromatografia e ndarjes me përjashtim jonik dhe kromatografia e moderuar e përjashtimit me jone. Mekanizmi i dytë është për speciet neutrale përshkak të neutralitetit të tyre egziston mundësia që të hyjnë në poret e grimcave të kolonës dhe të qëndrojnë aty gjatë levizjes së tyre në kolonë gjë që e bën rrugën e tyre më të gjatë drejt detektorit që korrespondon me Retencion më të gjatë.

Në projektin tonë ne kemi punuar me kromatografi me përjashtim jonik për të ndarë acidet organike dhe duke u bazuar në detektor të konduktivitetit dhe detektor të absorbimit të dritës ultraviollcë-UV. Bazuar në kërkesat nga kompanitë farmaceutike dhe molekulat përkatëse të lidhura me struktura kimike të ngjashme ne kemi zgjedhur 16 acide organike të ndryshme për

të studiuar se si parametrat e ndryshëm kromatografikë ndikojnë në ndarjen e tyre me synimin e përgjithshëm për të arritur ndarjen më të mirë të mundshme. Teknika që kemi përdorur për ta realizuar këtë quhet kromatografia e përjashtimit të joneve e cila mund të kryhet në instrumente që janë zakonisht të pranishëm në laboratorët farmaceutikë. E gjithë puna eksperimentale e këtij projekti u realizuan në temperaturën e ambientit ( $22 \pm 1$  °C) duke përdorur njërin prej dy sistemeve të ndryshme të kromatografisë jonike, të cilat kontrolloheshin nga softueri IC Net 2.3 SR6 (Metrohm AG, Herisau, Zvicër).

Gjatë punës eksperimentale janë përdorur këta reagjentë :

Tretësira e hidrosidit tetrabutylamonium 40%, kloruri i litiumi 99%, metanoli 99,8%, acid laktik dhe acid propionik 99,5%, acidi glioksilik, acid piruvik, dhe acid heptafluorobutirik 98%, acid sulfurik 95-98%, acetonitril 99.5%, acidi tartronik 97% , acidi acetik, acidi maleik, acidi fumarik, acidi akrilik, acidi glikolik dhe acidi oksalik 99% nga Sigma-Aldrich (Steinheim, Gjermani). Acidi formik 99% nga Scharlau (Sentmenat, Spanjë), DL-acidi malik 98% nga Alfa Aesar (Lund, Suedi), acidi malonik 99,5% nga Supelco (Bellefonte, SHBA), kurse acidi succinic 99,5% dhe acidi tartaric  $\geq 99.5\%$  nga Merck (Darmstadt, Gjermani).

Fillimisht, tretësirat e të gjithë analitëve u përgatitën në përqendrim  $1000 \pm 2$  ppm (mg/L) në ujë të destiluar nga reagjentët e pastër, dhe më pas u holluan më tej. Standardet e analitit u përgatitën në intervalin e përqendrimit nga 5 deri në 50 ppm. Të dhënat kromatografike si koha e retencionit, lartësia e pikut, sipërfaqja e pikut dhe numri i pllakave teorike janë nxjerrë të gjitha nga softueri i kromatografisë i përmendur më sipër. Vlerat e asimetrisë u llogaritën gjithashtu nga softueri sipas përkufizimit të gjerësisë së pikut pas kulmit, të ndarë me gjerësinë e pikut përpara majës, të gjitha të matura në 10% të lartësisë së pikut. Përpjekja për ndarjen e 16 acideve organike (Fig. 2) u bë duke përdorur dy kolona të ndryshme të përjashtimit të joneve: Thermo Scientific Dionex IonPac™ ICE AS6 (9x250 mm) dhe BioRad Aminex® HPX-87H. (300x7.8 mm). Hulumtimi i kolonës IonPac AS6 me eluent acidin heksafluorobutirik. Qëllimi fillestar në punën eksperimentale ishte ndarja e acideve dhe më pas përcaktimi i përqendrimit të acideve. Për përcaktimin dhe për të arritur një ndarje më të mirë të acideve, filluam të testojmë kolonat me kushte identike me kromatogramet test të prodhuesit. Të dyja kolonat u testuan me të njëjtin përqendrim të eluentit dhe shpejtësinë e rrjedhës që rekomandon prodhuesit me përqendrim eluentit 0,4 mM HFBA dhe “neutralizues” me 5 mM TBAOH. Hulumtimi i kolonës IonPac AS6 me acid sulfurik si një eluent. Për shkak të përdorimit të acidit sulfurik si eluent më i fort “neutralizimi” u bë me LiCl 5mM si një rigjenerues edhe në këtë hulumtim ne kemi ndjekur të njëjtat hapa siç

përshkruajmë për eluentin e mëparshëm që kemi punuar në një spektër të ndryshëm përqendrimi nga 0.25 mM në 0.7 mM dhe shpejtësi të rrjedhës nga 0.4 në 1.2 mL/min.

Hulumtimi i kolonës Aminex HPX-87H ku si eluent është përdor acid sulfurik. Meqenëse kolona HPX-87H kërkonte përqendrime rreth dhjetë herë më të larta të eluentit, gjë që do të rezultonte në nivele ekstreme të përçueshmërisë së sfondit pavarësisht nga neutralizimi, ne vendosëm të punonim me detektorin UV në gjatësi valore 210 nm me këtë kolonë. Si rezultat i ndjeshmëris së lartë të detektorit UV ne ishim në gjendje të detektonim edhe papastërtitë kryesisht specie neutrale jo të ngarkuara të pranishme në disa prej standardeve, dhe veçanërisht në acidin glioksilik, akrilik dhe piruvik. Në të dy metodat analitet ndjekin rrugën e pKa-s përveç acidit Fumarik dhe ati Akrilik që bëjnë përjashtim nga kjo sjellje në krahasim me analitet e tjerë. Të dyja metodat japin piqe më të mprehta kur hollohen me eluent.

Kolona HPX ka ndjeshmëri të lartë veçanërisht për acidin Fumarik, Akrilik dhe Maleik sepse kanë lidhje dyfishe të konjuguara.

Me AS6-Dionex-IonPac dhe HFBA si eluent, është e mundur të ndahet një përzierje e acidit oksalik, maleik, malonik, malik, glikolik, formik, laktik, acetik, suksinik, fumarik dhe akrilik. Qëllimi i këtij projekti është studimi i terrenit. Duke përdorur njohuritë teorike dhe eksperimentale vlerat e pKa dhe informacione të tjera dhe për të bërë krahasimin me teknikat e tjera të ndarjes, Këtu tregohet se si parametra të ndryshëm mund të ndikojnë në ndarjen në teknikën ICE. Megjithëse kjo ndarje ndikohet nga parametrat fiziko-kimikë të sorbentit, fazat stacionare dhe faza e lëvizshme në veqanti, ky studim kryesisht merret me ngjashmërinë e vetive fiziko-kimike dhe sjelljeve të analiteve tonë, shpejtësinë e rrjedhës së fazës mobile dhe përqendrimin e eluentit, fenomene të cilat nuk janë diskutuar shumë dhe për të cilat ka pasur shumë pak të dhëna në literaturë. Po ashtu qellim kishim të zhvillojm një metodë për të analizuar një përzierje të të gjitha këtyre llojeve në mënyrë që të dimë se cila nga to është e pranishme në mostër dhe sa është e pranishme në cfarë sasive.

**Fjalët kyçe:** Kromatografia me përjashtim jonik, Hidrofile, Hidrofobike, Sorbent, Fazë stacionare, Faza e lëvizshme