

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Dominika Machová

CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ ZWITTERIONTOVÝCH
STACIONÁRNÍCH FÁZÍ V HPLC

Characterization and application of zwitterionic stationary phases
in HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Zuzana Vosáhlová

Praha 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2024.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací a porovnáním dvou zwitteriontových stacionárních fází kolon SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC. Analýzy byly prováděny v separačním módu hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC). Ligand navázaný na stacionární fázi obou kolon je totožný, sulfoalkylbetain. Hlavním rozdílem mezi těmito stacionárními fázemi jsou částice, na kterých jsou ligandy navázané. Typ částic významně přispívá k odlišným interakčním a separačním vlastnostem těchto stacionárních fází.

Pro základní charakterizaci stacionárních fází byl nejprve proveden Tanakův test. Z výsledků tohoto testu bylo patrné, že kolona SeQuant ZIC-HILIC vykazuje větší kationtově-výměnný charakter než kolona Atlantis Premier BEH Z-HILIC, která má naopak větší aniontově-výměnný charakter. Obě stacionární fáze vykazovaly vyšší hodnotu parametru popisujícího hydrofilitu než hydrofobicitu, což potvrzuje jejich polární charakter. Vlastnosti stacionárních fází byly dále zkoumány a porovnávány na základě analýz modelových analytů, kterými byla řada malých polárních analytů, kyselin, bází, amfoterních a neutrálních analytů a jejich směsí. Analýzy byly prováděny v různých poměrech acetonitrilu s 10mM acetátovým pufrům o pH = 4,7. Z počátku byl testován 5mM acetátový pufr o pH = 6,8, který se ukázal jako méně vhodný. Při analýze většiny modelových analytů byla separační teplota 25 °C. Pro analýzu krátkých oligonukleotidů byla separační teplota zvýšena na 40 °C.

Výsledky analýz modelových analytů korelovaly s výsledky Tanakova testu. Rostoucí retence polárních analytů se stoupajícím množstvím acetonitrilu v mobilní fázi potvrdila uplatnění retenčního mechanismu HILIC. V rámci této práce byly nalezeny vhodné podmínky pro separaci většiny modelových směsí analytů.

Klíčová slova

zwitteriontové stacionární fáze, HILIC, retence

Abstract

This diploma thesis deals with the characterization and comparison of two zwitterionic stationary phases of SeQuant ZIC-HILIC and Atlantis Premier BEH Z-HILIC columns. Analyses were performed in the hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation mode. The ligand bound to both stationary phases of these columns is identical, sulfoalkylbetaine. The main difference between these stationary phases is in the particles to which the ligands are bound. The type of the particles significantly contributes to different interaction and separation properties of the stationary phases.

Firstly, for the basic characterization of these stationary phases, a Tanaka's test was performed. The results of this test showed that the SeQuant ZIC-HILIC column has greater cation-exchange properties than the Atlantis Premier BEH Z-HILIC column, which, has on the other hand greater anion-exchange properties. Both stationary phases showed a higher value of the parameter describing hydrophilicity than hydrophobicity, confirming their polar nature. The properties of the stationary phases were further examined and compared based on the analysis of model analytes. These analytes included a range of small polar analytes, acids, bases, ampholytes, neutral analytes, and their mixtures. Analyses were performed at various ratios of acetonitrile to 10mM acetate buffer of pH = 4,7. Initially, a 5mM acetate buffer of pH = 6,8 was tested, but it has turned out to be less suitable for our analyses. During the separation of most of the model analytes, the separation temperature was set to 25 °C. For the analysis of short oligonucleotides, the separation temperature was increased to 40 °C.

The results of the analyses of model analytes correlated with the results of the Tanaka's test. Increasing retention of polar analytes with increasing acetonitrile content in the mobile phase confirmed the presence of the HILIC retention mechanism. There were found suitable chromatographic conditions for the separation of most model analyte's mixtures within this work.

Keywords

zwitterionic stationary phases, HILIC, retention

Poděkování

Na tomto místě bych moc ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce, paní doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., za její odborné vedení, trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Zuzaně Vosáhlové za její milý přístup a za všestrannou pomoc při vypracování experimentální části práce.

Také bych ráda poděkovala celé své rodině za jejich velikou podporu, povzbuzení a trpělivost během mého studia.

Obsah

Úvod.....	10
1 Teoretická část	11
1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	11
1.1.1 Instrumentace HPLC	12
1.1.2 Separační módy v HPLC	12
1.1.3 Isokratická a gradientová eluce	13
1.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	14
1.2.1 Zwitteriontové stacionární fáze	16
1.2.2 Mobilní fáze v HILIC	20
1.3 Modelové analyty používané v této práci	21
1.3.1 Nukleové báze.....	21
1.3.2 Nukleosidy	22
1.3.3 Oligonukleotidy.....	22
1.3.4 Aminokyseliny.....	22
1.3.5 Profeny.....	23
1.3.6 β -blokátory	23
1.3.7 Kyseliny, báze a neutrální analyty.....	24
1.4 Tanakův test.....	24
1.4.1 Modelové analyty pro Tanakův test	24
2 Experimentální část	25
2.1 Použité přístroje a počítačové programy	25
2.2 Testované kolony	26
2.3 Použité chemikálie.....	27
2.4 Strukturní vzorce modelových analytů.....	28
2.5 Příprava vzorků	29
2.6 Příprava mobilních fází	31
2.7 Separační podmínky	31
2.8 Chromatografické parametry.....	32
2.9 Parametry Tanakova testu	33
3 Výsledky a diskuze	34

3.1	Tanakův test.....	34
3.2	Vliv složení pufru na retenci a tvar chromatografického píku	38
3.3	Separace nukleových bází a nukleosidů	39
3.4	Retenční chování kyselin, bází a neutrálních látek	43
3.5	Retence a separace profenů a β -blokátorů	48
3.6	Analýza krátkých oligonukleotidů.....	53
4	Závěr	59
5	Literatura	61

Seznam zkratek a symbolů

α	selektivita
ACN	acetonitril
BEH	„bridged ethylene hybrid“
BTMA	benzyltrimethylamonium chlorid
CoA	koenzym A
DAD	detektor diodového pole
f	šířka v 5 % vzestupné části chromatografického píku
FAD	flavinadenindinukleotid
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (angl. hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high-performance liquid chromatography)
k	retenční faktor
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NP	normální fáze (angl. normal phase)
MF	mobilní fáze
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
Pa	Pascal, značka jednotky tlaku
PTFE	polytetrafluorethylen
QqQ	trojitý kvadrupól
$R_{1,2}$	rozlišení dvou sousedních chromatografických píků
RP	reverzní fáze (angl. reverse phase)
SAM	S-adenosyl-methionin
SF	stacionární fáze
T_f	faktor chvostování chromatografického píku
THF	tetrahydrofuran
t_M	mrtvý čas, (min)

TMFA *N,N,N*-trimethylfenylamonium chlorid

t_R retenční čas, (min)

UHPLC ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. ultra-high-performance liquid chromatography)

UV-VIS ultrafialovo-viditelná spektroskopie (angl. ultraviolet-visible spectroscopy)

w šířka chromatografického píku v 50 % výšky píku

$w_{0,05}$ šířka chromatografického píku v 5 % jeho výšky

Úvod

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je dnes často využívanou metodou pro analýzu polárních a ionizovatelných analytů, jako jsou různá polární léčiva, metabolity nebo biologicky aktivní látky. Při analýze polárních analytů je HILIC vhodnou alternativou pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) na reverzních i normálních fázích. Na reverzních stacionárních fázích mají některé velmi polární analyty nedostačující retence, tyto fáze jsou naopak vhodnější pro analýzu nepolárních a slabě polárních analytů. Při chromatografii na normálních fázích, která byla dříve metodou první volby pro analýzu polárních látek, se setkáváme s nízkou rozpustností některých polárních analytů v mobilní fázi a špatnou reprodukovatelností výsledků.

Pro analýzu v módu HILIC je možné využít mnoho různých druhů polárních stacionárních fází, kterých na trhu stále přibývá. Mezi stacionární fáze vhodné pro HILIC patří zwitteriontové stacionární fáze, které mají na svém povrchu navázaný ligand obsahující kladně i záporně nabitě funkční skupiny v poměru 1:1.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat a porovnat dvě zwitteriontové stacionární fáze kolon SeQuant ZIC-HILIC (Merck) a novější Atlantis Premier BEH Z-HILIC (Waters) z hlediska interakčních/retenčních vlastností a separačního potenciálu pro vybrané skupiny modelových analytů. Skupiny modelových analytů zahrnují neutrální, kyselé, bazické a amfoterní analyty lišící se polaritou. Obě stacionární fáze těchto kolon obsahují jako ligand sulfoalkylbetain, hlavním rozdílem jsou částice stacionární fáze, na kterých je tento ligand navázaný. Kolona SeQuant ZIC-HILIC obsahuje silikagelové částice a kolona Atlantis Premier BEH Z-HILIC obsahuje hybridní částice (BEH, „ethylene bridged hybrid“).

1 Teoretická část

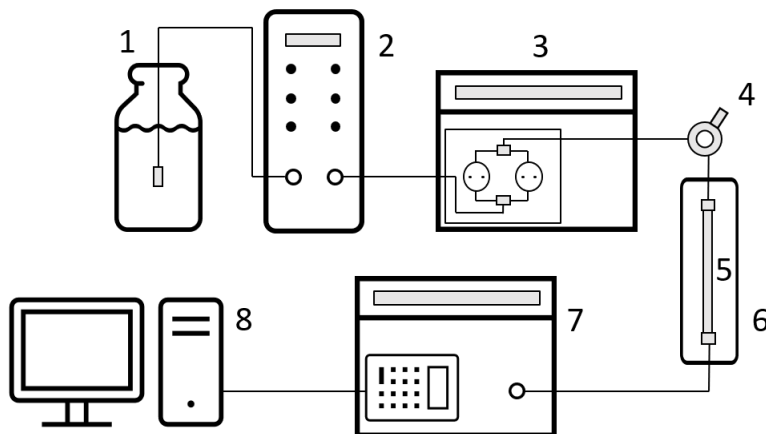
1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je dnes jednou z nejčastěji používaných separačních metod v analytické chemii. Tato metoda byla vyvinuta na konci 60. let 20. století. [1] HPLC se využívá pro kvantitativní i kvalitativní analýzu a je vhodná pro analýzu komplexních vzorků. Výhodou je její použitelnost pro sloučeniny s velkým rozsahem relativních molekulových hmotností ($M_r = 3-10^6$). Pomocí HPLC lze analyzovat látky polární i nepolární, látky iontové, nízkomolekulární i polymery. [2] Princip HPLC spočívá v distribuci analytů mezi stacionární a mobilní fází. Během chromatografického procesu dochází k interakcím analytu se stacionární fází (SF), mobilní fází (MF) i mezi oběma fázemi navzájem. Při tomto procesu dochází k mnoha typům interakcí. Mohou se uplatňovat disperzní síly, interakce dipól-dipól, vodíkové vazby, iontové interakce nebo například π - π interakce v závislosti na vlastnostech analytu a separačního systému. Analyty jsou ve stacionární fázi různě zadržovány a zpoždovány. Vytvářejí se zóny analytů, které poté z chromatografické kolony eluují odděleně. [1, 3]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se od běžné kapalinové chromatografie odlišuje, mimo jiné, malou velikostí částic (mezi 3-10 μm). [1, 3] Pokud mají částice velikost menší než 2 μm , mluvíme o ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC). Tvar částic stacionární fáze by měl být co nejpravidelnější a chromatografická kolona by měla být homogenně naplněna. To zajišťuje její vysokou separační účinnost. [1, 2] Malá velikost částic způsobuje růst tlaku v systému. To přispívá k náročnosti instrumentace, jako jsou nároky na vhodná čerpadla, a s tím spojená cena přístroje. Tlak v HPLC dosahuje hodnot v řádu jednotek až desítek MPa. [1] Pro většinu analytických aplikací není třeba velké množství vzorků, dávkovaný objem se v HPLC pohybuje v řádu jednotek až desítek mikrolitrů. Pro HPLC je vhodné využití detektorů, které umožňují kontinuální monitoring eluátu. [2] Mezi vhodné detektory pro HPLC patří: UV/VIS spektrofotometrický detektor, fluorescenční, elektrochemický, vodivostní nebo také hmotnostní detektor. [1]

1.1.1 Instrumentace HPLC

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Obrázek 1) se skládá ze zásobníku mobilní fáze (1), odplyňovače mobilní fáze (2), vysokotlakého čerpadla (3), dávkovače vzorků (4), kterým je často automatický dávkovač nebo vícecestný ventil se smyčkou, chromatografické kolony (5), termostatu (6), detektoru (7) a záznamového zařízení (8), kterým je počítač obsahující vhodný chromatografický software pro zpracování dat. [1, 4] Základní schéma instrumentace HPLC je uvedeno na Obrázku 1.



Obrázek 1: Základní schéma instrumentace HPLC (převzato a upraveno podle prezentace o HPLC programu INCHEBIO, Univerzita Pardubice [5]).

1.1.2 Separační módy v HPLC

V HPLC je možné využívat různé separační módy. V počátcích HPLC byl populární mód s normálními fázemi (NP), který obsahuje polární stacionární fázi a mobilní fázi s polaritou nižší, tj. nepolární. [6] Stacionární fáze v tomto módu může být např. alumina, silikagel a silikagel modifikovaný polárními diolovými, nitrilovými nebo např. aminopropylovými skupinami [6, 7]. Povrch těchto fází je tvořen polárními skupinami, které jsou schopné interagovat s různými skupinami analytu. Mobilní fáze bývá obvykle směs dvou a více organických rozpouštědel. Majoritní složkou je nepolární rozpouštědlo (hexan, heptan), ve kterém je přídavek malého množství polárnější složky (chloroform, propan-2-ol). [6, 8] Z tohoto systému eluují jako první nejméně polární složky vzorku. Při zvyšování polarity mobilní fáze se zrychluje eluce. [9] Hlavním retenčním mechanismem na silikagelu je v NP-HPLC adsorpce. [4, 6, 7] Běžnými interakcemi, které se uplatňují na čistě silikagelových stacionárních fázích jsou

elektrostatické a vodíkové interakce, nebo také sterické efekty, uplatňující se při separaci izomerů. Mód normálních fází je vhodný pro analýzu např. lipofilních sloučenin, uhlovodíků a dalších sloučenin málo rozpustných ve vodě. [9]

Dnes se pro většinu HPLC aplikací používá mód s reverzními fázemi (RP). [10] Stacionární fáze je v tomto případě méně polární než mobilní fáze. Stacionární fázi obvykle tvoří silikagel modifikovaný nepolárními skupinami. Na silikagel mohou být navázány např. uhlovodíkové skupiny, jako jsou oktadecylové (C18) a oktylové (C8) nebo alkylnitrilové skupiny, či fenylové skupiny. [7] Mobilní fáze v RP-HPLC je polárního charakteru a nejčastěji dvousložková. Jedna složka je na vodné bázi, tedy voda, pufr nebo zředěný roztok kyseliny nebo zásady. Druhá složka je tvořena organickými rozpouštědly, např. acetonitrilem (ACN), methanolem nebo tetrahydrofuranem (THF), které jsou dobře mísitelné s vodou. [3] S klesající polaritou analytů se v RP-HPLC zvyšuje jejich retence. Retenční mechanismus u RP-HPLC je kombinace adsorpce a rozdělování analytu mezi vnější a vnitřní část hydrofobní vrstvy stacionární fáze. [11] Využívá se pro analýzu analytů s různou polaritou, jako jsou různé léky, rostlinné extrakty, směsi proteinů nebo směsi oligosacharidů [6, 12, 13].

Dalšími možnými systémy mimo adsorpční chromatografii jsou iontově výměnná chromatografie, rozdělovací chromatografie, chirální chromatografie, afinitní chromatografie nebo např. hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. [1]

1.1.3 Isokratická a gradientová eluce

Kromě různých separačních módů je v HPLC možné využít různé typy eluce. Eluce může být provedena buď isokraticky nebo gradientově (popř. složení mobilní fáze lze měnit i skokově). [2]

Pokud se při analýze složení mobilní fáze nemění, jedná se o eluci isokratickou. Při eluci gradientové se složení mobilní fáze mění. A to tak, aby eluční síla mobilní fáze postupně rostla. Eluční sílu zvyšujeme u NP-HPLC tak, že do mobilní fáze postupně přidáváme více polárnější složky, u RP-HPLC přidáváním složky organické. K výběru vhodného rozpouštědla slouží tzv. eluotropní řada rozpouštědel. V této řadě jsou rozpouštědla seřazena podle jejich rostoucí polarity. Eluotropní řada se často uvádí v podobě tabulky, kde jsou obvykle uvedeny také vlastnosti těchto rozpouštědel,

například viskozita, relativní permitivita, teplota varu, mísitelnost s vodou, nebo absorpční hrana rozpouštědel. Eluotropní řada je definovaná pro mód s normálními fázemi. Pro mód s reverzními fázemi platí obráceně.

Eluční síla roste u vybraných rozpouštědel následovně:

PENTAN < HEXAN < TOLUEN < BENZEN < DIETHYLETHER < CHLOROFORM < ACETON < THF < ACN < ETHANOL < METHANOL < VODA. [3]

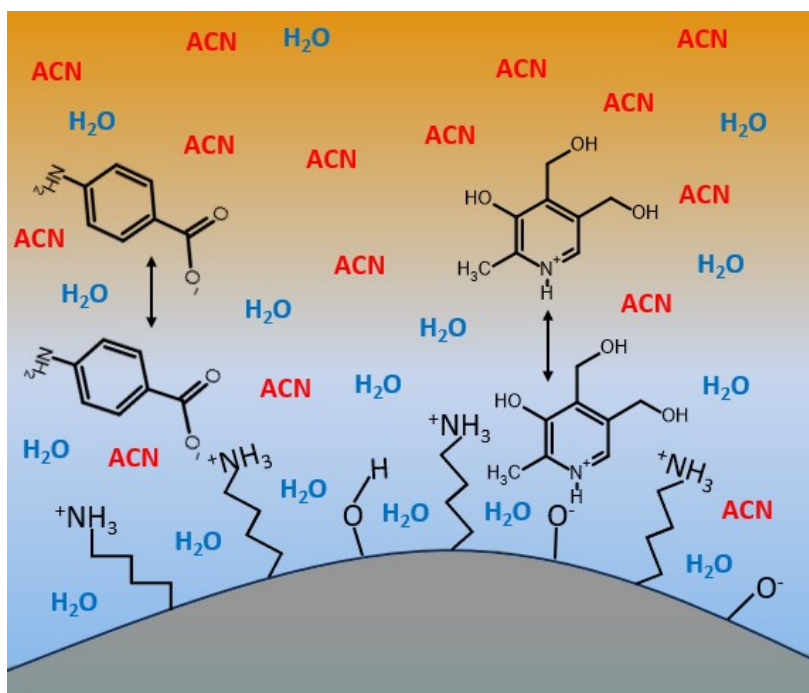
Gradientové eluce lze využít při separaci směsí pro zkrácení celkové doby analýzy nebo optimalizaci rozlišení píků. Nevýhodou gradientové eluce je časová náročnost, kvůli nutné ekvilibraci chromatografického systému po každé provedené analýze.

1.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je varianta kapalinové chromatografie s normálními fázemi. Jako separační systém pro kapalinovou chromatografii ji navrhl v roce 1990 Andrew Alpert. [14] Její popularita postupně vzrůstá od počátku 21. století. Toho si lze povšimnout z rostoucího počtu publikací v informačních zdrojích, jako je SciFinder nebo Pub Med. Tento mód byl vyvinut pro analýzu polárních sloučenin, jelikož jejich analýza byla problematická při použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s normálními i reverzními fázemi. Při použití módu s NP se potýkáme s problémem nízké reprodukovatelnosti výsledků při měření polárních analytů a také špatnou rozpustností těchto sloučenin v mobilní fázi. [6] Dále je metoda s NP velmi citlivá na přítomnost vody v systému z rozpouštědel a analytů. I stopová množství vody se mohou vázat na povrch polárního adsorbentu a tím snižovat retenci separovaných analytů a zhoršovat selektivitu separace. [6, 15] V módu s RP je problémem nedostačující retence velmi polárních analytů, které často eluují s mrtvým časem kolony. [15] Separační systém HILIC obsahuje stacionární fázi polárního charakteru, jako je tomu u NP-HPLC. Stacionárními fázemi pro HILIC mohou být například nemodifikovaný silikagel, modifikovaný silikagel (diolovými, aminovými, amidovými skupinami, také vázanými cyklodextriny, polyethylenglykoly a další) nebo iontoměnič/zwitteriontové stacionární fáze. [5, 16]

Mobilní fáze v HILIC je méně polární než stacionární fáze. Složením je podobná mobilní fázi používané v RP-HPLC, tedy vodně-organická. [6] Kvůli nízké viskozitě se pro

většinu aplikací ukázalo jako vhodné organické rozpouštědlo ACN. Obvyklé množství ACN v HILIC je > 50 objemových %. [3] Polárnější látky mají v tomto systému větší retenci. Retenční mechanismus v HILIC dosud nebyl zcela objasněn. Jedním z navrhovaných principů retence v HILIC je rozdělení analytu mezi imobilizovanou vodnou vrstvou tvořící se na povrchu stacionární fáze a mobilní fází, která obsahuje vody méně. Velikost zmíněné adsorbované vodné vrstvy je obtížné přesně určit, ale experimentální metody pro to již existují. [6, 17] Znalost velikosti vodné vrstvy nám napomáhá lépe porozumět retenčnímu mechanismu analytů. [18] Také se předpokládá, že voda od stacionární fáze difunduje a tvoří koncentrační gradient směrem do mobilní fáze. [3] Retenční mechanismus v HILIC je komplexní. Může se například uplatňovat jak již zmíněná rozdělovací rovnováha, tak adsorpce. Dále se na rozdělovacího mechanismu mohou podílet interakce dipól-dipól, vodíkové vazby nebo mezi nabitými skupinami i elektrostatické interakce. [5, 19] Pokud je stacionární fáze na bázi silikagelu, uplatňují se často interakce s volnými silanolovými skupinami. U rozdělovací rovnováhy platí, že čím je analyt polárnější, tím víc se rovnováha posune k imobilizované vodné vrstvě. Na Obrázku 2 je zjednodušeně ukázán předpokládaný mechanismus retence analytu v HILIC módu.



Obrázek 2: Schéma komplexního retenčního mechanismus v HILIC. (převzato a přepracováno [20]).

Při gradientové eluci se eluční síla zvyšuje navyšováním množství vodné složky mobilní fáze. Je tomu tedy naopak oproti RP-HPLC, kde eluci zvyšuje organická složka. [6] Minimální množství vodné složky v systému pro HILIC jsou 2-3 obj. %, jinak by se na povrchu stacionární fáze nemohla tvořit vodná vrstva důležitá pro retenci analytů. [6, 21] Experimentálně bylo prověřeno, že monovrstva je úplná při mobilní fázi, která obsahuje 5 obj. % vodné složky v acetonitrilu. [3] Časté je využití pufrů obsahujících amonné soli, které slouží jako protiionty usnadňující tvorbu vodné dvojvrstvy. [22] Dále je možné retenci analytů v HILIC ovlivnit úpravou poměru organického modifikátoru vůči vodné složce nebo změnou separační teploty. Vliv teploty kolony je v HILIC z výše uvedených parametrů nejméně významný, ale samozřejmě záleží na konkrétním analytu, resp. separačním systému. [23, 24] Pro některé analyty je vhodné v HILIC použít stacionární fáze na bázi iontoměničů, proto se může uplatňovat i mechanismus iontové výměny. [25] V tomto případě je možné ovlivnit retenci nabitých analytů volbou vlastností mobilní fáze. Náboj slabých elektrolytů lze upravit volbou pH pufru v mobilní fázi. Retenci nabitých analytů lze ovlivnit změnou koncentrace solí ve vodné složce mobilní fáze. [6, 16]

Před měřením v systému HILIC je nutné dodržet dostatečný čas pro ekvilibraci systému, aby se na stacionární fázi vytvořila stabilní výše zmíněná imobilizovaná vodná vrstva.

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se využívá pro řadu aplikací, jako je analýza oligonukleotidů [26, 27], aminokyselin [19], proteinů, peptidů [28], glykanů [27], různých farmak a metabolitů [29, 30]. [25] V HILIC lze tedy analyzovat jak sloučeniny velmi malých rozměrů, tak i makromolekuly.

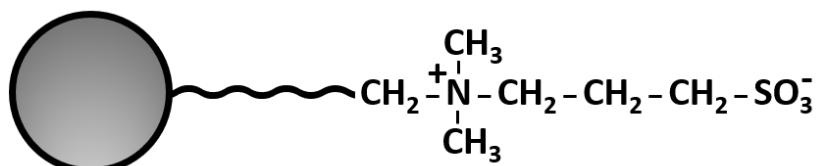
1.2.1 Zwitteriontové stacionární fáze

Zwitteriontové stacionární fáze jsou jedny ze stacionárních fází používaných v HILIC. Původně byly tyto fáze navrženy pro iontově-výměnnou chromatografii, ale našly své uplatnění i v módu HILIC. [16] Zwitteriontové stacionární fáze se obvykle používají pro analýzu polárních a nabitých analytů, jako jsou různé peptidy, nukleotidy a jiné biomolekuly. [21] V této diplomové práci se zaměříme na charakterizaci a využití některých stacionárních fází právě tohoto druhu. Zwitteriontové stacionární fáze mají

jako základ silikagel, který má na svém povrchu navázané kyselé (záporně nabitě) i bazické (kladně nabitě) funkční skupiny. Na povrchu silikagelu by měly být zastoupeny v poměru 1:1. To umožňuje dělit kladně i záporně nabitě analyty během jedné analýzy. [31] Celkový náboj stacionární fáze je teoreticky nulový, ale bylo zjištěno, že zwitteriontové stacionární fáze vykazují smíšený HILIC-iontově výměnný mechanismus. [16, 25]

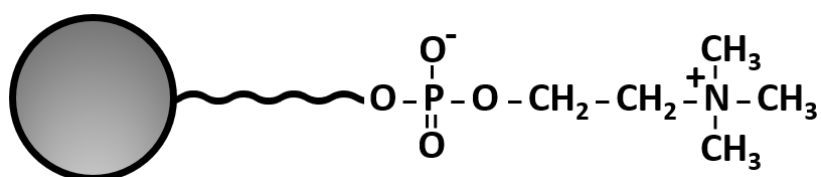
Zwitteriontové kolony jsou na trhu rozděleny do několika druhů, které se odlišují svými chromatografickými vlastnostmi. Mezi ně patří ZIC-HILIC, ZIC-CHILIC a Z-pHILIC nebo například BEH Z-HILIC.

ZIC-HILIC kolony mají na stacionární fázi navázané sulfoalkylbetainové skupiny. Tyto skupiny obsahují zbytek záporně nabitě kyseliny sulfonové a kladně nabitě kvartérní amoniové skupiny. Sulfoalkylbetainové skupiny jsou ukotveny na nosiči, kterým je silikagel. Výhodou této kolony je, že náboj ligandu není ovlivněn pH mobilní fáze. [32] Kolona ZIC-HILIC je vhodná pro práci v rozsahu pH 2-8. [33] Na Obrázku 3 je znázorněno schéma ZIC-HILIC stacionární fáze.



Obrázek 3: Schéma sulfoalkylbetainové stacionární fáze (převzato a přepracováno [21]).

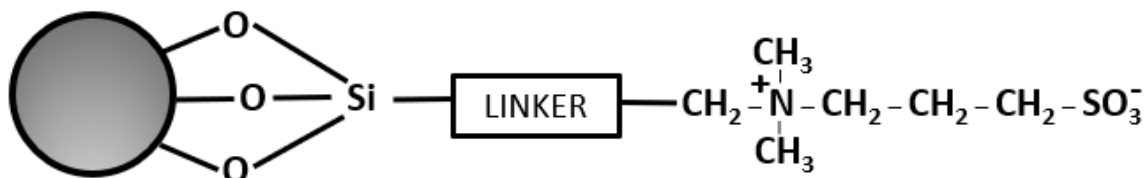
Stacionární fáze ZIC-CHILIC kolony má jako nosič silikagel, na kterém je navázán fosforylcholin. Tato molekula má ve stacionární fázi opačně orientované náboje než sulfoalkylbetain, proto kolona ZIC-CHILIC může být použita k vylepšení nebo umožnění analýzy sloučenin, pro které kolona ZIC-HILIC není úplně vhodná. [32] Kolona ZIC-CHILIC má stejný pracovní rozsah pH jako kolona ZIC-HILIC (2-8). [32] Na Obrázku 4 je znázorněno schéma ZIC-CHILIC stacionární fáze.



Obrázek 4: Schéma fosforylcholinové stacionární fáze (převzato a přepracováno [32]).

Stacionární fáze ZIC-pHILIC kolony obsahuje stejné funkční skupiny jako kolona ZIC-HILIC, sulfoalkylbetain. Od sebe je odlišuje polymerní stacionární fáze (proto pHILIC), respektive polymerní částice. Tuto kolonu je možné použít ve vyšším rozsahu pH mobilní fáze, tj. 2-10. [34] Stacionární fáze ZIC-pHILIC vykazuje lepší separační vlastnosti a je více odolná pro vyšší průtoky mobilní fáze. [32]

Atlantis Premier BEH Z-HILIC je nový typ kolony od společnosti Waters, který se řadí mezi hybridní stacionární fáze, „bridged ethylene hybrid“ (BEH). Obsahuje částice smíšeného organicko-anorganického původu (organický polymer a anorganický silikagel). [3] Tento typ částic zajišťuje stabilitu stacionární fáze ve větším rozmezí pH, tj. 2-10 a větší mechanickou, chemickou a teplotní odolnost. [35] Atlantis BEH Z-HILIC obsahuje sulfoalkylbetainové funkční skupiny navázané pomocí linkerů na nosič. [35] Vzhledem k tomu, že částice této stacionární fáze byly vyrobeny polymerizační reakcí, dochází k eliminaci části volných silanolových skupin na povrchu stacionární fáze. To by mělo vylepšit symetrii pík při analýze bazických látek. [3] Výrobce též udává, že na BEH kolonách jsou vyšší retence neutrálních a polárních látek, než na amidových nebo dalších „HILIC“ kolonách. [36] Schéma stacionární fáze Atlantis Premier BEH Z-HILIC kolony je ukázáno na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schéma stacionární fáze u kolony Atlantis Premier BEH Z-HILIC (převzato a upraveno [35]).

Zwitteriontových stacionárních fází o různém složení byla připravena již řada. V Tabulce 1 jsou uvedeny příklady analýz využívající různé zwitteriontové stacionární fáze, se kterými se můžeme na trhu setkat.

Tabulka 1: Příklady aplikací zwitteriontových stacionárních fází.

analyty	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	citace
acenaften thymin kys. ftalová adenin cytosin kys. 5-fluoroorotová	sférické hybridní částice s ethylenovými můstky (sulfoalkylbetain)	ACN/100mM octan amonný, pH = 3,0, 90:10 (v/v) Isokratická eluce	UV	[37]
karboxylové kyseliny	silikagelové částice (fosforylcholin)	ACN/10mM hydrogenfosforečnan draselný/dihydrogenfosforečnan draselný, pH = 6,0, 75:25 (v/v) Isokratická eluce	UV	[38]
1) vitamíny rozpustné ve vodě 2) nukleové báze a nukleosidy 3) benzoové kyseliny	APS kolona (amino-fosfátová stacionární fáze)	1) ACN/40mM octan amonný, pH = 7,9, 70:30 (v/v) 2) ACN/50mM octan amonný, pH = 4,5, 85:15 (v/v) 3) ACN/50mM octan amonný, pH = 4,5, 90:10 (v/v) Isokratická eluce	UV	[39]
vybrané opioidy a jejich glukuronidy	silikagelové částice (sulfoalkylbetain)	ACN/1mM octan amonný, pH = 4, 80:20 (v/v) Isokratická eluce	MS/MS	[40]
separace oligonukleotidů dt15- 30	silikagelové částice (sulfoalkylbetain)	A: H ₂ O B: ACN C: 100mM octan amonný, pH = 5,8 Gradientová eluce ^{a)}	MS	[26]
nikotinamid pyridoxin riboflavin kys. nikotinová thiamin hydrochlorid kys. askorbová	imidazolová stacionární fáze	A: H ₂ O, 10mM octan amonný B: ACN/H ₂ O, 10mM octan amonný, 95:5 (v/v) Gradientová eluce ^{b)}	DAD	[41]
cefalosporiny ^{c)} karbapenemy ^{d)}	lysinová stacionární fáze	A: ACN/100mM mravenčan amonný, pH = 4,5, 90:10 (v/v) B: ACN/10mM mravenčan amonný, pH = 4,5 Gradientová eluce ^{c) d)}	UV	[27]

β-blokátory nukleosidy nukleové kyseliny kys. 3,4- dihydroxyfenyloctová nikotinamid benzen	HZI stacionární fáze (obsahuje ethyl-3-P,P'- difenyfosfonium- propylsulfát triethoxy silan)	ACN/20mM octan amonný, pH = 4,1, 90:10 (v/v) Isokratická eluce	UV	[42]
separace standardů peptidů	glutathionová stacionární fáze	A: ACN B: 500mM chloristan sodný C: 20mM dihydrogenfosforečnan sodný pH = 3,0 HILIC/CEX mix-mód Gradientová eluce ^{e)}	UV	[24]
separace enantiomerů aminokyseliny	chirální stacionární fáze na bázi alkaloidů z chinovníku	MeOH, 50mM kys. mravenčí, 25mM diethylamin Isokratická eluce	UV	[44]
neurotransmitery a jejich prekurzory a metabolity	silikagelové částice (fosforylcholin)	A: 10mM mravenčan amonným, pH = 2,8 B: ACN/10mM mravenčan amonným, pH = 2,8, 90:10 (v/v) Gradientová eluce ^{f)}	QqQ MS	[45]
uracil uridin cytosin cytidin guanosin	fenylglycinová stacionární fáze	ACN/H ₂ O, 95:5 (v/v) Isokratická eluce	DAD	[46]

^{a)}Gradient: 15 min, 70-30 % B, s konstantním C 15 %.

^{b)}Gradient: 3 min, 5 % A, 5 min, 5-20 % A.

^{c)}Gradient: 0-8 min, 88 % A, 8-15 min, 88-70 % A, 15-30 min, 70-30 % A.

^{d)}Gradient: 0-5 min, 87 % A, 5-10 min, 87-20 % A.

^{e)}Gradient: 0-20 min, 70-40 % A, 0-30 % B, 30 % C.

^{f)}Gradient: 0-2min , 0 % A, 2-10 min, 40 % A, 10-20 min, 40 % A

1.2.2 Mobilní fáze v HILIC

Mobilní fáze v HILIC uspořádání je organická s přidavkem vodné složky. HILIC systém funguje nejlépe, pokud je v systému velké množství organického modifikátoru. Jako modifikátor se pro nejvíce aplikací používá ACN, ale v některých případech lze použít i např. THF, methanol, ethanol nebo isopropanol. [47, 16] Vzhledem k jeho nízké

viskozitě, ACN nezpůsobuje příliš velký nárůst tlaku v systému. Vhodné množství ACN v HILIC je > 50 obj. %. [3] Například využití methanolu je v tomto módu méně obvyklé, protože je stejně jako voda polárním rozpouštědlem. Methanol a další alkoholy kompetují vodě při tvorbě vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. [16] Methanol se používá v ternárních mobilních fázích pro specifické aplikace. Eluční síla rozpouštědel v HILIC klesá v řadě: VODA > METHANOL > ETHANOL > ISOPROPANOL > THF > ACN. [16, 48] Nevýhodou používání ACN je jeho značná toxicita a vysoká cena. Je snaha nahradit ACN jiným rozpouštědlem. Dosavadní pokusy o nalezení jiného rozpouštědla nebyly příliš úspěšné s výjimkou několika aplikací, kde lze ACN nahradit THF. [16]

Vodnou fázi nejčastěji tvoří vodný pufr, ale je možné použít i deionizovanou vodu. Vzhledem k dobré rozpustnosti v organických rozpouštědlech se běžně používají hlavně pufrы z octanu amonného nebo mravenčanu amonného. [16]

Při gradientové eluci se v HILIC zvyšuje eluční síla přidavkem vodné složky mobilní fáze. Nevyužívá se celé rozmezí polarity, ale množství ACN se v mobilní fázi při gradientové eluci pohybuje od 98 obj. % do max. 50 obj. %. Ekvilibrace kolony je u HILIC velmi časově náročná. Uvádí se, že ustálení vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze může trvat i 60 min. Bylo však zjištěno, že pro reprodukovatelné výsledky postačí i kratší čas a není nutná úplná ekvilibrace kolony. Tedy mezi experimenty můžeme provádět tzv. částečnou ekvilibraci. [3]

1.3 Modelové analyty používané v této práci

1.3.1 Nukleové báze

Nukleové báze se vyskytují ve struktuře nukleových kyselin (DNA nebo RNA). Dělíme je na deriváty purinu (adenin a guanin) a pyrimidinu (thymin, cytosin a uracil). Purin a pyrimidin jsou heterocyklické sloučeniny obsahující alespoň jeden atom dusíku jako heteroatom. Pořadí nukleových bází kóduje sekvenci nukleových kyselin. Nukleové báze jsou aromatického charakteru, jsou proto schopny vytvářet π - π interakce a absorbují v UV-oblasti s absorpčním maximem při 260 nm. Každá nukleová báze má ve struktuře specifické funkční skupiny, kterými mohou dále interagovat s jinými molekulami. Tyto skupiny jim například umožňují tvořit vodíkové vazby, kterými se k sobě váží komplementární báze. Tyto jejich vlastnosti jsou důležité pro udržení

struktury nukleových kyselin. Nukleové báze vykazují tautomerii. U aminoskupiny to je mezi aminem/iminem a u oxo- skupiny keto/enol tautomerie. Na ionizaci funkčních skupin, které nukleové báze obsahují, má vliv pH prostředí. [49] V této práci byly tyto sloučeniny vybrány jako zástupci slabých bází.

1.3.2 Nukleosidy

Spojením nukleové báze a pentózy (2'-deoxy-D-ribózy nebo D-ribózy) *N*-glykosidickou vazbou vzniká v nukleových kyselinách nukleosid. Názvy jednotlivých nukleosidů jsou odvozeny od příslušné báze. [49] Vykazují také interakce jako samotné nukleové báze (vodíkové můstky, π - π interakce). Přítomností pentózy se mohou nacházet v různých konformačních stavech, např. rozdílné rotace vazeb v pentózové části a konformace nukleové báze (*syn*-/*anti*-). [50] Nukleosidy mohou být i různě modifikované, např. methylovány. V této práci byly využity jako analyty: uridin, 2'-deoxyuridin a 3-methyluridin. Nukleosidy se mimo nukleové kyseliny vyskytují dále i jako součást koenzymů v organismu (např. nikotinamidadeninukleotid (NAD^+), flavinadeninukleotid (FAD), koenzym A (CoA), S-adenosyl-methionin (SAM)). [49]

1.3.3 Oligonukleotidy

Jedná se o krátké nukleotidové řetězce DNA nebo RNA. Lze je vyrobit synteticky nebo pomocí enzymů. Hojně se využívají např. jako primery při sekvenování DNA/RNA, k amplifikaci DNA, jako genové sondy, nebo k výrobě léčiv pro genovou terapii. Oligonukleotidy jsou řetězce nukleotidů, které jsou na sebe vázány fosfodiesterovou vazbou a řetězec má 3'-konec (hydroxy skupina pentózy) a 5'-konec (navázaný fosfátový zbytek). [51] V této práci byly měřeny oligonukleotidy: 2 až 6mer allPO a 2 až 6mer allPS. V těchto jednotlivých nukleotidech byla jako báze vždy thymin. Označení allPS znamená náhradu všech atomů kyslíku ve fosfodiesterové vazbě atomem síry.

1.3.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou substituční deriváty karboxylových kyselin. Ve své struktuře obsahují jednu nebo více aminoskupin. Dělíme je na esenciální a neesenciální, podle toho, zda si je tělo zvládne samo syntetizovat nebo ne. Aminokyseliny tvoří základní složky proteinů. Proteinogenních aminokyselin je 20, popř. 21, pokud mezi ně řadíme selenocystein. V živých organismech se primárně nachází jako L-formy. Při tvorbě

peptidů a proteinů se na sebe váží peptidickou vazbou. Dělíme je do několika skupin, podle charakteru jejich postranního řetězce, který má velký vliv na jejich chemické vlastnosti. Příkladem může být dělení dle typu postranního řetězce: nepolární, neutrální s polárním postranním řetězcem, polární kyselá a polární bazické. [49] V této práci byly použity jako analyty: *N*-BOC-D,L-fenylalanin, D,L-fenylalanin, *N*-BOC-L-tryptofan, L-tryptofan, *N*-BOC-L-tyrosin a D,L-tyrosin. Všechny tyto vybrané aminokyseliny obsahují v postranním řetězci aromatické jádro, proto lze využít pro jejich detekci UV-VIS detektor. Označení BOC (tert-butoxykarbonyl) vyjadřuje u aminokyselin protektivní skupinu, která chrání aminoskupinu před tím, aby reagovala např. s dalšími aminokyselinami a tvořila peptidický řetězec. Ochranná skupina slouží i jako důležitý prvek při syntéze peptidů. [52] Metody analýzy aminokyselin se hojně využívají v potravinářství [53], diagnostice v medicíně [54], nebo farmaceutickém průmyslu [55].

1.3.5 Profeny

Analyzované profeny: ibuprofen, ketoprofen a flurbiprofen, se řadí mezi nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva (NSAID). Jsou to polární látky, deriváty kyseliny propionové. V těle působí jako neselektivní inhibitory enzymů cyklooxygenáz (COX-1 a COX-2). [56] Tyto enzymy v těle umožňují tvorbu prostaglandinů, které způsobují větší citlivost neuronů k bolestným podnětům, také zvýšení tělesné teploty a podporují zánětlivé pochody. [57] Profeny se používají k terapeutickým účelům ve farmacii. V této práci byly tyto sloučeniny vybrány jako zástupci slabých kyselin.

1.3.6 β -blokátory

Antagonisté β -adrenergních receptorů, neboli β -blokátory, jsou skupina farmak, které se používají např. při léčbě srdečních arytmií, jako prevence u pacientů po infarktu myokardu, nebo při léčbě hypertenze. Jsou to antagonisté hormonů adrenalinu a noradrenalinu na adrenergních β -receptorech v srdeční a hladké svalovině. [57] Jako analyty byly v této práci využity: labetalol, pindolol a nadolol. Všechny tři patří mezi neselektivní β -blokátory, blokují β_1 i β_2 adrenergní receptory. [58] V této práci byly tyto sloučeniny vybrány jako zástupci slabých bází.

1.3.7 Kyseliny, báze a neutrální analyty

Dále byly použity pro testování vlastností stacionárních fází v HILIC vybrané kyseliny, báze a neutrální analyty. Jejich retenci lze ovlivnit typem a koncentrací mobilní fáze a druhem stacionární fáze a teplotou. Hodnota pH mobilní fáze má také velký vliv na retenci ionizovaných analytů (kyselin a bází). Zvolené byly následující analyty: kys. benzensulfonová, kys. toluensulfonová, kys. tropová, kys. benzoová, kys. 4-aminobenzoová, kofein, BTMA, anilin, *N,N*-diethylanilin, 2-fenylethylamin, *N*-benzylmethylamin a chinolin.

1.4 Tanakův test

Tanakův test patří mezi jednoduché chromatografické testy, kterými je možné charakterizovat chromatografické stacionární fáze a porovnat je mezi sebou. Zaměřuje se na retentivní a selektivní chování stacionárních fází. V rámci Tanakova testu jsou sledovány parametry stacionárních fází jako je jejich hydrofobicita, hydrofilita, sterická selektivita, vodíkové interakce, iontové interakce a acidobazické vlastnosti. [59]

1.4.1 Modelové analyty pro Tanakův test

Mezi analyty, které byly použity pro Tanakův test patří uridin, 3'-methyluridin, 2'-deoxyuridin, adenosin, 2'-deoxyguanosin, 3'-deoxyguanosin a kys. toluensulfonová. Tyto látky byly již zmíněné v předchozích kapitolách. Dále byly použity tyto analyty: TMFA (*N,N,N*-trimethylfenylamonium chlorid), theobromin, theofylin a vidarabin.

TMFA je kvartérní amoniová sůl, která se používá např. jako metylační agens, katalyzátor/inhibitor nebo reagens v chemických syntézách. [60, 61] Theobromin a theofylin patří společně s např. kofeinem mezi deriváty alkaloidu xantinu. [62] Theobromin se vyskytuje v kakaovníku, a tak ho můžeme najít například v čokoládě a jiných kakaových výrobcích. [63] Theobromin je antagonistou adeninu na adeninových receptorech a používá se jako vasodilatátor nebo srdeční stimulátor. [63] Theofylin je izomerem theobrominu, využívá se jako léčivo u respiračních onemocnění jako je astma nebo chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), a také jako diuretikum. [62] Vidarabin neboli adenin arabinóza je syntetický nukleosid. Ve farmacii se používá jako antivirotikum např. proti neštovicím, herpetické encefalitidě, nebo herpetické

keratitidě. Působí tak, že inhibuje virovou DNA polymerázu. [64] Jako léčivo je dnes často nahrazován např. aciklovirem. [65]

2 Experimentální část

2.1 Použité přístroje a počítačové programy

Přístroje a pomůcky

- separační modul Waters 2690 D, Alliance HPLC system (Waters, Milford, USA)
- detektor Waters 2487, dual λ Absorbance Detector (Waters, Milford, USA)
- kolonový termostat Waters, Alliance series column heater (Waters, Milford, USA)
- autosampler 717 Plus (Waters, Milford, USA)
- analytické váhy Mettler Toledo AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)
- pH metr MeterLab PHM 240, Radiometer Analytical SAS (Villeurbanne Cedex, Francie)
- zařízení pro přípravu ultra čisté vody deionizací Ultrapur a Rowapur (Watrex®, Praha, Česká republika)
- třepačka/vortex MS 3 basic (IKA, Německo)
- filtry Minisart syringe s velikostí pórů 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Německo)
- filtry Nylon filtr membranes s velikostí pórů 0,45 μm a diametrem 47 mm (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Počítačové programy

- Empower 2
- Origin, verze 6.1
- ChemSketch freeware
- PeakMaster, verze 5.1.
- MarvinSketch

2.2 Testované kolony

Informace o testovaných kolonách jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam chromatografických kolon a jejich charakteristické parametry.

zkratka názvu kolony	separační mód	název	výrobce	struktura SF	typ částic SF	hardware kolony	rozměry kolony (mm)	velikost částic (μm)	velikost póru (Å)	rozsah pH
ZIC-HILIC	HILIC	SeQuant ZIC-HILIC	Merck	zwitteriontová (sulfoalkylbetain)	silikagel	nerezová ocel s povrchovou úpravou PEEK	150 × 4,6	3,5	100	2-8
BEH Z-HILIC	HILIC	Atlantis™ Premier BEH Z-HILIC	Waters	zwitteriontová (sulfoalkylbetain)	sférické hybridní částice s ethylenovým můstkem	MaxPeak High Performance Surface	150 × 4,6	2,5	95	2-10

2.3 Použité chemikálie

- acetonitril (čistota $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- adenin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- adenosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- benzyltrimethylamonium chlorid (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- cytosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2'-deoxyguanosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 3'-deoxyguanosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2'-deoxyuridin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- D,L-fenylalanin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- D,L-tyrosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- flurbiprofen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- guanin (čistota 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- chinolin (analytický standard, Lachema, Brno, Česká republika)
- ibuprofen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- labetalol hydrochlorid (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- L-tryptofan (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ketoprofen (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kofein (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina benzensulfonová (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina toluensulfonová (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2mer PO (5'-TT-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 3mer PO (5'-TTT-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 4mer PO (5'-TTT T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 5mer PO (5'-TTT TT-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 6mer PO (5'-TTT TTT-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 2mer PS (5'-T^{*}T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 3mer PS (5'-T^{*}T^{*}T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)

- 4mer PS (5'-T*T*T* T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 5mer PS (5'-T*T*T* T* T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 6mer PS (5'-T*T*T* T* T* T-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA)
- 5-methyluridin (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- nadolol (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N*-benzylmethylamin (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N*_α-BOC-L-tryptofan (čistota > 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N*-BOC-D,L-fenylalanin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N*-BOC-L-tyrosin (čistota 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N,N*-diethylanilin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- octan amonný (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina octová (čistota ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-fenylethylamin hydrochlorid (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- pindolol (čistota ≥ 98, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- roztok hydroxidu sodného (o koncentraci 1 mol/l, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- theobromin (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- theofylin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- thymin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- TMFA (čistota ≥ 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- toluen (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- uracil (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- uridin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- vidarabin (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2.4 Strukturní vzorce modelových analytů

Strukturní vzorce, hodnoty pKa a log*D* sady modelových analytů a analytů pro Tanakův test jsou uvedeny v Příloze A.

2.5 Příprava vzorků

Toluen

Pro měření mrtvého času kolony byl použit toluen. Vzorek byl připraven napipetováním 10 μ l toluenu do 990 μ l ACN.

Nukleové báze a nukleosidy

Byl navážen 1 mg standardu a rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla. Navážky uridinu, 2'-deoxyuridinu, 5-methyluridinu, uracilu a cytosinu byly rozpuštěny v ACN. Pokud se vzorek nerozpustil, bylo postupně přidáváno po 100 μ l deionizované vody, dokud nebyl vzorek rozpuštěn. Adenin a thymin byly nejprve rozpuštěny v ACN. Protože se vzorek nerozpustil, bylo množství 1 mg/ml dále naředěno ACN a poté přidáno po 2 kapkách 0,1 M vodného roztoku hydroxidu sodného. Navážka guaninu byla rozpuštěna ve vhodném množství 0,1 M vodného roztoku hydroxidu sodného. **Směs uridinů** se skládá z uridinu, 2'-deoxyuridinu a 3-methyluridinu. **Směs nukleových bází** obsahovala thymin, uracil, adenin, cytosin a guanin.

Kyseliny, báze a neutrální látky

U těchto vzorků bylo také naváženo takové množství, aby výsledná koncentrace vzorku po rozpuštění byla 1 mg/ml. Navážka kofeinu byla rozpuštěna v 80:20 (ACN/H₂O, v/v). Navážky: kys. benzensulfonové, kys. toluensulfonové, kys. tropové, kys. 4-aminobenzoové a 2-fenylethylamin hydrochloridu byly rozpuštěny v poměru 85:15 (ACN/H₂O, v/v). Kyselina benzoová byla rozpuštěna v poměru 90:10 (ACN/H₂O, v/v) za účelem vylepšení tvaru píku. Pro přípravu vzorku *N,N*-diethylanilinu, anilinu, *N*-benzylmethylaminu a chinolinu bylo napipetováno vždy 10 μ l vzorku a k tomuto množství bylo přidáno 990 μ l ACN.

I z této skupiny látek byla připravena směs, byla označena jako **směs X**. Směs X byla připravena z kys. 4-aminobenzoové, kys. benzoové, kofeinu, anilinu a *N,N*-diethylanilinu.

Aminokyseliny

Vzorky aminokyselin byly připraveny rozpuštěním standardů tak, aby měl výsledný roztok koncentraci 1 mg/ml. Vzorky BTMA, D,L-fenylalaninu, *N*-BOC-D,L-fenylalaninu, *N*-BOC-L-tyrosinu, L-tryptofanu a *N*-BOC-L-tryptofanu byly rozpuštěny

v ACN. U L-tryptofanu byl nutný k rozpuštění přídavek 200 μ l deionizované vody. D,L-tyrosin není v koncentraci 1 mg/ml rozpustný v ACN, proto byl připraven o koncentraci 0,5 mg/ml v ACN.

Profeny a β -blokátory

Navážky profenů a β -blokátorů (ibuprofenu, ketoprofenu, flurbiprofenu, labetalol hydrochloridu, pindololu a nadololu) byly rozpuštěny v poměru 80:20 (ACN/H₂O, v/v), tak aby výsledné koncentrace vzorků byly 1 mg/ml.

Byla připravena směs těchto látek, označena jako **směs Y**. Směs Y obsahovala ibuprofen, nadolol, labetalol, flurbiprofen, ketoprofen, pindolol a kofein.

Oligonukleotidy

Oligonukleotidy o délce 6mer 5mer a 4mer allPO a allPS byly rozpouštěny v roztoku se složením 90:10 (ACN/H₂O, v/v). Zásobní roztoky oligonukleotidů byly ředěny tímto roztokem na výslednou koncentraci 0,250 nmol/ μ l. Po prvních měřeních byly společně s 3mer a 2mer allPO a allPS připraveny nové vzorky. Tyto vzorky byly rozpuštěny v roztoku o složení 70:30 (ACN/10mM acetátový pufr o pH= 4,7, v/v) a měly koncentraci 0,125 nmol/ μ l. Z těchto vzorků byly připraveny **směs allPO** 2mer až 6mer a **směs allPS** 2mer až 6mer. Také byly připraveny směsi obsahující oligonukleotidy jen do délky 4merů, **směs 2-4mer allPO** a **směs 2-4mer allPS**.

Analyty pro Tanakův test

Všechny analyty pro Tanakův test (uridin, 3-methyluridin, 2'-deoxyuridin, adenosin, vidarabin, 2'-deoxyguanosin, 3'-deoxyguanosin, kys. toluensulfonová, TMFA, theobromin a theofylin) byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml. Navážka standardu příslušného analytu byla rozpuštěna v mobilní fázi: 90:10 (ACN/20mM acetátový pufr, pH= 4,7, v/v).

S ohledem na typ jednotlivých vzorků, byl pro rozpouštění vzorků využit vortex. Všechny vzorky byly po rozpuštění přefiltrovány přes 0,45 μ m polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr. V závislosti na velikost odezvy detektoru byly ještě následně některé vzorky ředěny. Vzorky byly takto připraveny do plastových mikrozkušavek. Z nich bylo poté vhodné množství vzorku převedeno do vialek, ze kterých byl vzorek dávkován pomocí

autosampleru. Všechny směsi z modelových analytů byly připraveny tak, aby jednotlivé analyty poskytovaly podobné odezvy detektoru.

2.6 Příprava mobilních fází

Pro testování kolon byly připraveny acetátové pufrů o pH = 4,7 (koncentrace 10 a 20mM) a pH = 6,8 (koncentrace 5mM). Pufrů byly připraveny navážením vhodného množství octanu amonného a rozpuštěním navážky v deionizované vodě v odměrné baňce. Před doplněním odměrné baňky po rysku bylo přidáno odpovídající množství kyseliny octové (v případě acetátového pufru o pH = 4,7). Zda má pufr odpovídající pH bylo zkontrolováno pomocí pH-metru. Pokud bylo třeba, bylo pH pufru upraveno přidáním ředěného roztoku amoniaku nebo kyseliny octové. Takto připravený roztok byl přefiltrován přes 0,45 µm nylonový filtr. Pro výpočet množství složek pufru bylo využito počítačového programu PeakMaster 5.1.

Všechna měření v této práci byla provedena s mobilní fází, která byla složena z ACN jako organického modifikátoru a vodné složky (acetátového pufru) v různých poměrech.

2.7 Separační podmínky

Všechna měření byla provedena v separačním módu HILIC. Rychlost průtoku mobilní fáze byla pro modelové analyty 1 ml/min. Při provedení Tanakova testu byl průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Modelové analyty byly měřeny za použití nejprve 5mM acetátového pufru (pH = 6,8), a poté 10mM acetátového pufru (pH = 4,7) a analyty Tanakova testu za použití 20mM acetátového pufru (pH = 4,7). Všechna měření byla provedena v mobilní fázi obsahující ACN/pufr (v/v) o různém poměru, nejčastěji se jednalo o poměry: 70:30, 80:20, 85:15, 90:10 (v/v). V Tanakově testu byl poměr ACN/pufr, 90:10 (v/v). Dávkové množství všech analytů bylo 5 µl, u některých analytů bylo následně nadávkováno 10 µl. Všechny analýzy byly, pro kontrolu opakovatelnosti měření, provedeny minimálně dvakrát. Teplota kolony u modelových analytů byla 25 °C a teplota autosampleru 20 °C. Pro oligonukleotidy byla zvolena jako vhodnější teplota kolony 40 °C a teploty autosampleru 10 °C. Při měření analytů Tanakova testu měla kolona teplotu 30 °C a autosampler byl nastavený na 20 °C. Většina modelových analytů byla měřena při dvou vlnových délkách: 254 a 280 nm, jen oligonukleotidy byly

měřeny při 260 nm. Pro měření mrtvého času byl zvolen toluen. Před měřením modelových analytů nebo při změně poměrů mobilní fáze byla provedena vždy ekvilibrace kolony minimálně 30 min. U Tanakova testu byla ekvilibrace minimálně 1 hod.

2.8 Chromatografické parametry

Zde jsou uvedeny základní chromatografické parametry, které byly použity při zpracování naměřených chromatografických dat. Jedním z těchto parametrů je **retenční čas t_R (min)**. Retenčním časem se označuje doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima na křivce chromatografického píku. Retenční čas při chromatografické separaci poskytuje kvalitativní charakteristiku látky.

Mrtvý čas t_M (min) je retenční čas látky, která se na dané chromatografické koloně nezadržuje a pohybuje se v chromatografickém systému stejně rychle jako mobilní fáze.

Retenční faktor k neboli kapacitní poměr, popisuje velikost retence analytu ve stacionární fázi dle rovnice (2.1). Udává, kolikrát delší dobu stráví analyt ve stacionární fázi než v té mobilní. Jeho hodnota narůstá s rostoucím retenčním časem analytu:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.1)$$

Selektivita α je vyjádřena jako poměr retenčních faktorů dvou analytů. Lze ji vyjádřit například jako:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.2)$$

V rovnici (2.2) jsou k_1 a k_2 retenčními faktory dříve a později eluujícího analytu. Selektivitu můžeme označit jako míru schopnosti chromatografického systému rozlišovat mezi jednotlivými složkami vzorku.

Rozlišení $R_{1,2}$ udává míru separace dvou sousedních chromatografických píků (píku 1 a 2) a lze ho definovat dle rovnice (2.3):

$$R_{1,2} = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)} \quad (2.3)$$

V rovnici w_1 a w_2 značí šířku píku v 50 % výšky píku. Hodnota rozlišení by pro dostatečnou separaci píků měla být $R_{1,2} > 1,5$.

Symetrii chromatografického píku popisuje například **faktor chvostování píku T_f** který je popsán rovnicí (2.4).:

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (2.4)$$

Symbol $w_{0,05}$ značí **šířku píku v 5% výšky** a f je **šířka v 5% vzestupné části píku**. Při chvostování píku má faktor chvostování hodnotu > 1 a při frontování píku má hodnotu < 1 . [3]

2.9 Parametry Tanakova testu

K charakterizaci stacionárních fází pomocí Tanakova testu byly zjištěny následující parametry.:

$k(u) = \frac{t_u - t_M}{t_M}$ (3.1), retenční faktor uridinu, (hydrofilní interakce uridinu se stacionární fází)

$\alpha(CH_3) = \frac{k(\text{uridin})}{k(5\text{-methyluridin})}$ (3.2), vyjadřuje „hydrofobní“ charakter stacionární fáze, (selektivitu pro methylové skupiny)

$\alpha(OH) = \frac{k(\text{uridin})}{k(2'\text{-deoxyuridin})}$ (3.3), vyjadřuje „hydrofilní“ charakter stacionární fáze, (selektivitu pro hydroxylové skupiny)

$\alpha(V/A) = \frac{k(\text{vidarabin})}{k(\text{adenosin})}$ (3.4), vyjadřuje selektivitu pro konfigurační izomery

$\alpha(2D/3D) = \frac{k(2'\text{-deoxyguanosin})}{k(3'\text{-deoxyguanosin})}$ (3.5), vyjadřuje selektivitu pro poziční-izomery (regioizomery)

$\alpha(AX) = \frac{k(\text{kys. toluensulfonová})}{k(\text{uridin})}$ (3.6), vyjadřuje aniontově-výměnný charakter stacionární fáze

$\alpha(CX) = \frac{k(\text{TMFA})}{k(\text{uridin})}$ (3.7), vyjadřuje kationtově-výměnný charakter stacionární fáze

$\alpha(Tb/Tf) = \frac{k(\text{theobromin})}{k(\text{theofylin})}$ (3.8), vyjadřuje acidobazické vlastnosti stacionární fáze

3 Výsledky a diskuze

3.1 Tanakův test

V Tabulkách 3.1.1 a 3.1.2 jsou uvedeny naměřené a vypočtené hodnoty retenčních časů a retenčních faktorů analytů použitých pro Tanakův test. V Tabulce 3.1.3 jsou shrnuty vypočtené parametry Tanakova testu charakterizující obě stacionární fáze.

Tabulka 3.1.1: Naměřené retenčních časy a z nich vypočítané retenční faktory pro Tanakův test, kolona SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	t_R (min)	t_R (min)	t_R průměr (min)	k
uridin	13,25	13,27	13,26	3,39
5-methyluridin	9,20	9,26	9,23	2,06
2'-deoxyuridin	8,21	8,23	8,22	1,72
adenosin	11,05	11,07	11,06	2,66
vidarabin	15,27	15,24	15,25	4,05
2'-deoxyguanosin	28,66	28,67	28,66	8,49
3'-deoxyguanosin	25,55	25,57	25,56	7,46
kys. toluensulfonová	5,35	5,36	5,35	0,77
TMFA	30,16	30,18	30,17	8,99
theobromin	4,68	4,67	4,68	0,55
theofylin	4,44	4,44	4,44	0,47

Marker mrtvého času byl toluen, $t_M = 3,02$ min.

Tabulka 3.1.2: Naměřené retenčních časy a z nich vypočítané retenční faktory pro Tanakův test, kolona Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

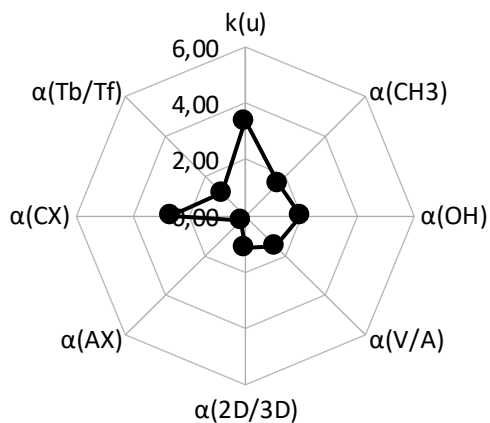
analyt	t_R (min)	t_R (min)	t_R průměr (min)	k
uridin	15,16	15,16	15,16	4,80
5-methyluridin	10,89	10,89	10,89	3,17
2'-deoxyuridin	9,16	9,17	9,165	2,51
adenosin	13,86	13,85	13,86	4,30
vidarabin	20,39	20,39	20,39	6,80
2'-deoxyguanosin	35,89	35,89	35,89	12,74
3'-deoxyguanosin	32,75	32,73	32,74	11,53
kys. toluensulfonová	10,03	10,04	10,03	2,84
TMFA	11,69	11,67	11,68	3,47
theobromin	4,44	4,44	4,44	0,70
theofylin	4,31	4,31	4,31	0,65

Marker mrtvého času byl toluen, $t_M = 2,61$ min.

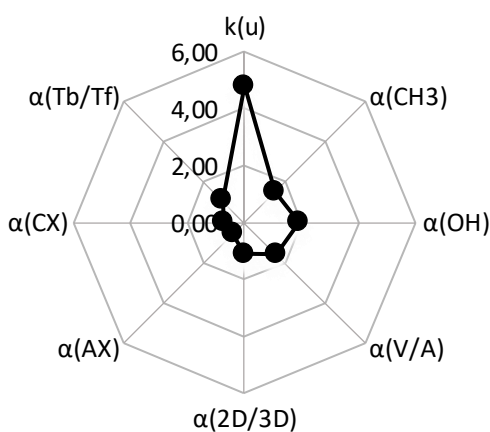
Tabulka 3.1.3: Charakteristické parametry kolon (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC.

parametr	A	B
$k(u)$	4,80	3,39
$\alpha(CH_3)$	1,52	1,65
$\alpha(OH)$	1,92	1,97
$\alpha(V/A)$	1,58	1,52
$\alpha(2D/3D)$	1,10	1,14
$\alpha(AX)$	0,59	0,23
$\alpha(CX)$	0,72	2,65
$\alpha(Tb/Tf)$	1,08	1,17

Pro lepší vizualizaci rozdílů mezi jednotlivými stacionárními fázemi byly vytvořeny paprskové grafy (Obrázky 3.1.1 a 3.1.2).



Obrázek 3.1.1: Paprskový graf parametrů Tanakova testu získaných na koloně SeQuant ZIC-HILIC.



Obrázek 3.1.2: Paprskový graf parametrů Tanakova testu získaných na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

Acidobazické vlastnosti stacionárních fází byly hodnoceny pomocí dat z retencí theobrominu a theofylinu. Čím vyšší je hodnota $\alpha(Tb/Tf)$, tím je větší kyselost stacionární fáze. Obě stacionární fáze měly hodnotu tohoto parametru mírně vyšší než 1. Větší kyselost vykazovala kolona ZIC-HILIC a to $\alpha(Tb/Tf) = 1,17$. Obě stacionární fáze obsahují ve své struktuře sulfonovou skupinu, která je dále od nosiče než kvartérní amoniová skupina.

Retenční faktor uridinu $k(u)$ značí hydrofilní interakce uridinu se stacionární fází. Hodnotu tohoto parametru měla větší kolona BEH Z-HILIC, $k(u) = 4,80$ oproti

$k(u) = 3,39$ kolony ZIC-HILIC. U kolony BEH-Z-HILIC lze tedy předpokládat vyšší retenci hydrofilních analytů v porovnání s kolonou ZIC-HILIC.

Parametr $\alpha(\text{OH})$ vyjadřuje selektivitu k hydroxylovým skupinám, jak moc se stacionární fáze účastní hydrofilních interakcí. Tento parametr může být dále použit pro stanovení velikosti vodné vrstvy na stacionární fázi v HILIC systému a může přispět ke studiu retenčního mechanismu v HILIC. [66] U obou kolon byla výsledná hodnota $\alpha(\text{OH})$ blízko 1,9, což naznačuje, že kolony budou vhodné pro dělení polárních látek a v tomto ohledu budou jejich selektivity velmi podobné. Mírně vyšší hodnotu $\alpha(\text{OH})$ poskytovala kolona ZIC-HILIC: 1,97.

Faktor selektivity pro methylové skupiny $\alpha(\text{CH}_3)$ popisuje jednak selektivitu fází pro $-\text{CH}_3$ skupiny a dále charakterizuje hydrofobní vlastnosti stacionárních fází. Stacionární fáze kolony ZIC-HILIC vykazuje mírně vyšší hodnotu tohoto parametru v porovnání se stacionární fází BEH Z-HILIC (Tabulka 3.1.3). Stacionární fáze ZIC-HILIC je více hydrofobní. Stacionární fáze budou tedy od sebe schopné odlišit dva strukturně podobné analyty, z nichž jeden bude např. methylovaný. Toho lze využít např. při studiu nukleových kyselin, kde je modifikace methylovou skupinou velmi běžná. [67] Z výsledků parametrů $k(u)$, $\alpha(\text{OH})$ a $\alpha(\text{CH}_3)$ je vidět, že se obě stacionární fáze chovají jako polární stacionární fáze vhodné pro HILIC, což potvrzuje vyšší hodnota $\alpha(\text{OH})$ v porovnání s hodnotou $\alpha(\text{CH}_3)$.

Při porovnání selektivity pro regioizomery, kterou charakterizuje parametr $\alpha(2\text{D}/3\text{D})$, mají výsledné hodnoty obě stacionární fáze vyšší než 1,1. Je tedy možné regioizomery dělit na obou stacionárních fázích.

Kationtově-výměnný charakter v Tanakově testu charakterizuje parametr $\alpha(\text{CX})$. V tomto parametru se stacionární fáze od sebe velmi odlišují, jelikož výsledná hodnota pro kolonu ZIC-HILIC byla 2,60 a pro BEH Z-HILIC 0,72. U kolony ZIC-HILIC lze tedy očekávat, že bude poskytovat vyšší retenci kladně nabitých analytů, jako jsou bazické látky (pokud jsou v daném prostředí ionizované), než kolona BEH Z-HILIC. Základem ZIC-HILIC stacionárních fází je silikagel, na jehož povrchu jsou silanolové skupiny. Některé ze silanolových skupin jsou volné a nemají na sobě, ze sterických důvodů, navázaný ligand. Tyto volné silanolové skupiny mohou disociovat a přispívat

k zápornému náboji stacionární fáze, a tak i k retenci kladně nabitých analytů. Volné silanolové skupiny také přispívají ke kyselému charakteru stacionární fáze. [6] S kolonou BEH Z-HILIC se od sebe liší v typu nosiče, ten je zhotovený z hybridních anorganicko-organických částic (BEH). Při výrobě těchto částic dojde k eliminaci povrchových silanolových skupin až na třetinu. Proto se stacionární fáze v hodnotě parametru $\alpha(CX)$ výrazně odlišují.

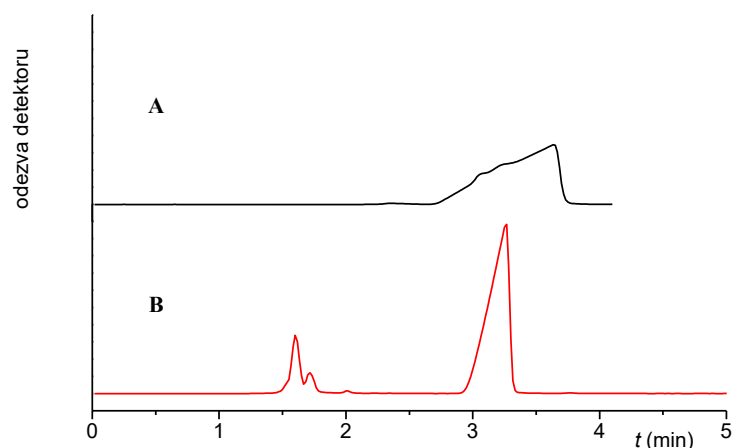
Aniontově-výměnný charakter lze hodnotit podle hodnoty parametru $\alpha(AX)$. Obě stacionární fáze vykazovaly hodnotu tohoto parametru nižší než 1. Výrazně vyšší hodnotu $\alpha(AX)$ má kolona BEH Z-HILIC: 0,72 oproti koloně ZIC-HILIC: 0,23, což odpovídá vyšší hodnotě $\alpha(CX)$ ZIC-HILIC kolony. Kolona BEH Z-HILIC by měla mít větší potenciál pro retenci a dělení záporně nabitých analytů, tedy kyselých analytů (pokud jsou v daném prostředí disociované).

Podobnost stacionárních fází je patrná u parametru $\alpha(V/A)$, který vyjadřuje selektivitu pro konformační izomery. Hodnota tohoto parametru se pohybuje mezi 1,52-1,58. Stacionární fáze tedy poskytují podobnou selektivitu pro separaci konformačních izomerů.

Největší rozdíly mezi stacionárními fázemi dle parametrů získaných prostřednictvím Tanakova testu jsou: vyšší aniontově-výměnný charakter a hydrofilní interakce uridinu $k(u)$ stacionární fáze kolony BEH Z-HILIC a vyšší kationtově-výměnný charakter stacionární fáze kolony ZIC-HILIC. I přes to, že kolony obsahují stejný ligand (sulfoalkylbetain), rozdílné částice stacionární fáze ovlivňují interakční vlastnosti těchto stacionárních fází.

3.2 Vliv složení pufru na retenci a tvar chromatografického píku

Z počátku měření modelových analytů na koloně SeQuant ZIC-HILIC byl použit 5mM acetátový pufr o pH = 6,8. Kvůli špatné opakovatelnosti měření, nevyhovujícímu tvaru píků některých analytů a malé pufrační kapacitě byl nahrazen 10mM acetátovým pufrem o pH = 4,7. Příklad takového měření je na Obrázku 3.2.1, kde je vidět vylepšení tvaru chromatografického píku kyseliny tropové při použití 10mM acetátového pufru o pH = 4,7.



Obrázek 3.2.1: Chromatogramy *kys. tropové* (A) 5mM acetátový pufr o pH = 6,8 (B) 10mM acetátový pufr o pH = 4,7.

Pro měření na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC byl již používán jen 10mM acetátový pufr o pH = 4,7.

3.3 Separace nukleových bází a nukleosidů

Na kolonách SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC byly proměřeny vzorky nukleových bází a nukleosidů. Tyto analyty jsou často používány jako modelové analyty pro HILIC stacionární fáze. [68, 69] Byl sledován vliv poměru ACN a 10mM acetátového pufru o pH = 4,7 v mobilní fázi na retenci analytů. Poměry mobilní fáze byly 80:20, 85:15 a 90:10 (ACN/pufr, v/v). Ostatní separační podmínky byly konstantní (uvedené v sekci 2.7). V Tabulkách (Tabulky 3.3.1 a 3.3.2) jsou uvedeny naměřené hodnoty této skupiny modelových analytů.

V poměru mobilní fáze ACN/pufr 80:20 (v/v) vykazovaly všechny vzorky nukleových bází a nukleosidů dostatečné retence na obou kolonách a žádný analyt neeluoval s mrtvým časem. Kolona ZIC-HILIC vykazovala u všech analytů v této skupině mírně vyšší retence než kolona BEH Z-HILIC (Tabulky 3.3.1 a 3.3.2). U směsi uridinů bylo na obou kolonách za těchto podmínek nedostačující rozlišení mezi prvním a druhým eluujícím píkem (2'-deoxyuridinem a 5-methyluridinem), viz. Obrázek 3.3.1. Směs nukleových bází byla za uvedených podmínek rozdělena na základní linii na obou kolonách, viz. Obrázek 3.3.4.

Tabulka 3.3.1: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory nukleových bází a nukleosidů v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
uridin	3,44	1,24	4,48	1,83	6,70	3,37
2'-deoxyuridin	2,70	0,76	3,20	1,02	4,08	1,63
5-methyluridin	2,80	0,82	3,39	1,14	4,58	1,95
uracil	2,69	0,76	3,04	0,92	3,54	1,28
cytosin	4,56	1,97	6,25	2,95	10,03	5,46
adenin	3,07	0,10	3,77	1,38	5,11	2,29
thymin	2,28	0,49	2,51	0,59	2,76	0,78
guanin	4,78	2,12	7,13	3,50	13,92	7,96

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,53$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,58$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,55$ min (90:10, v/v).

Tabulka 3.3.2: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory nukleových bází a nukleosidů v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

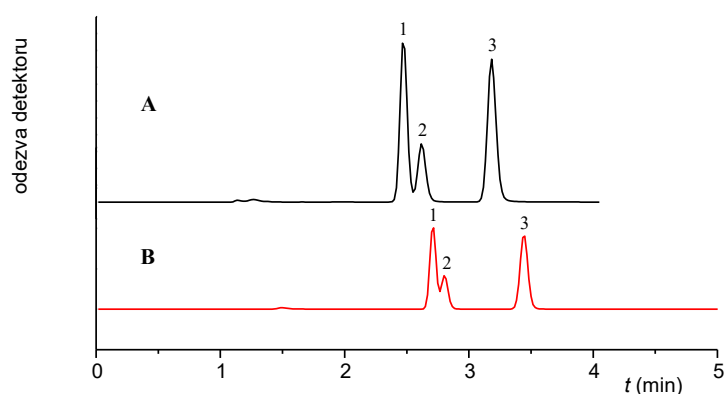
analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
uridin	3,18	1,52	4,70	2,61	8,78	5,28
2'-deoxyuridin	2,47	0,95	3,27	1,51	5,18	2,70
5-methyluridin	2,47	0,95	3,62	1,78	6,28	3,49
uracil	2,38	0,88	2,89	1,22	3,92	1,81
cytosin	4,13	2,27	6,45	3,96	12,99	8,29
adenin	2,95	1,33	4,15	2,19	7,20	4,15
thymin	2,03	0,61	2,38	0,83	3,08	1,20
guanin	4,55	2,60	8,07	5,20	20,14	13,41

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,26$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,30$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,40$ min (90:10, v/v).

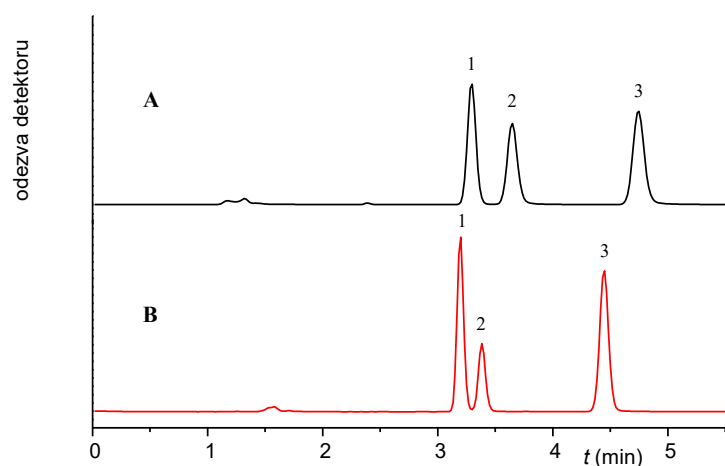
Při zvýšení množství ACN v mobilní fázi na 85 obj. %, bylo dosaženo zvýšení retence všech analytů na obou kolonách. Všechny analyty, kromě uracilu a thyminu, měly v tomto poměru mobilní fáze mírně nižší retenci na koloně ZIC-HILIC oproti koloně

BEH Z-HILIC (viz. Tabulky 3.3.1 a 3.3.2). V tomto složení mobilních fází byly separovány všechny analyty obou směsí na základní linii na obou testovaných kolonách. Chromatogramy separace směsí jsou zobrazeny na Obrázku 3.3.2 a Obrázku 3.3.5.

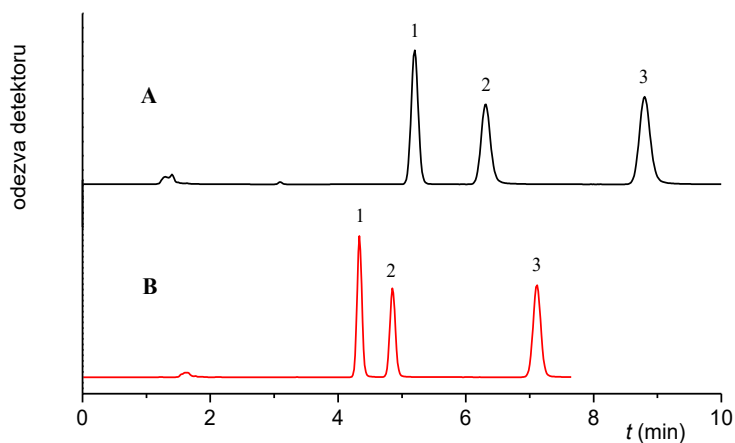
Při použití mobilní fáze ACN/pufr 90:10 (v/v) došlo opět k zvýšení retence všech analytů doprovázené vyšší hodnotou rozlišení (Příloha B), což potvrzuje uplatnění HILIC retenčního mechanismu. Směs uridinů byla separovaná na základní linii na obou kolonách (Obrázek 3.3.3). Na koloně ZIC-HILIC byla tato směs separována do 7 min a na koloně BEH Z-HILIC do 10 min. Tyto výsledky korelují s výsledky Tanakova testu, tj. vyšší hodnota $k(u)$ a zároveň nižší hodnota $\alpha(\text{CH}_3)$ pro kolonu BEH-Z-HILIC. Při analýze nukleových bází byla doba analýzy na koloně BEH Z-HILIC 21 min, zatímco na koloně ZIC-HILIC byla doba analýzy kratší, tj. 16 min (Obrázek 3.3.6).



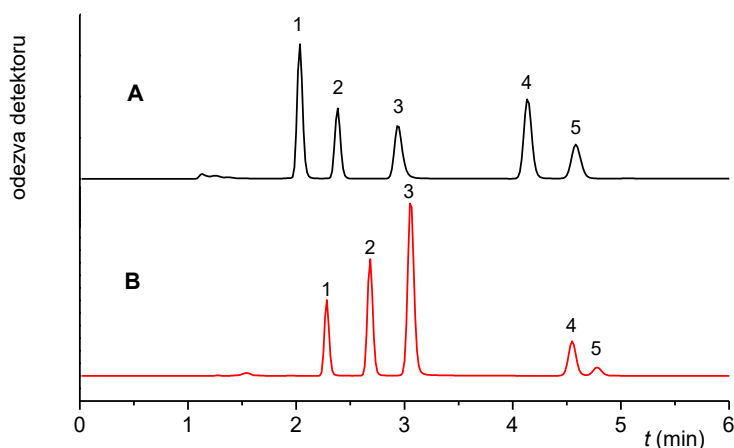
Obrázek 3.3.1: Chromatogramy separace směsi uridinů na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Oznáčení analytů: 1 (2'-deoxyuridin), 2 (5-methyluridin), 3 (uridin). Mobilní fáze ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7, 80:20 (v/v).



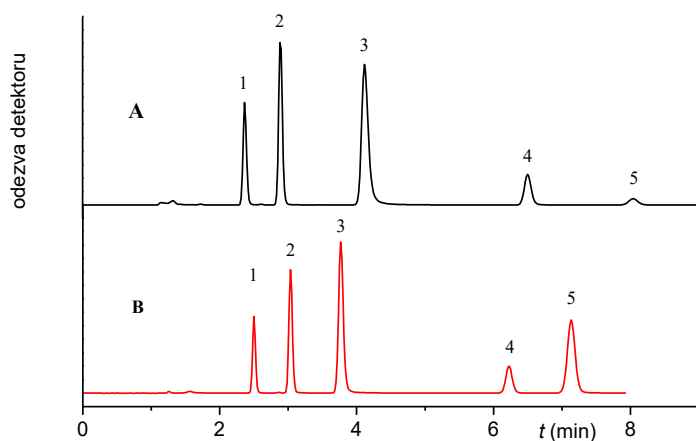
Obrázek 3.3.2: Chromatogramy separace směsi uridinů na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Oznáčení analytů: 1 (2'-deoxyuridin), 2 (5-methyluridin), 3 (uridin). MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7, 85:15 (v/v).



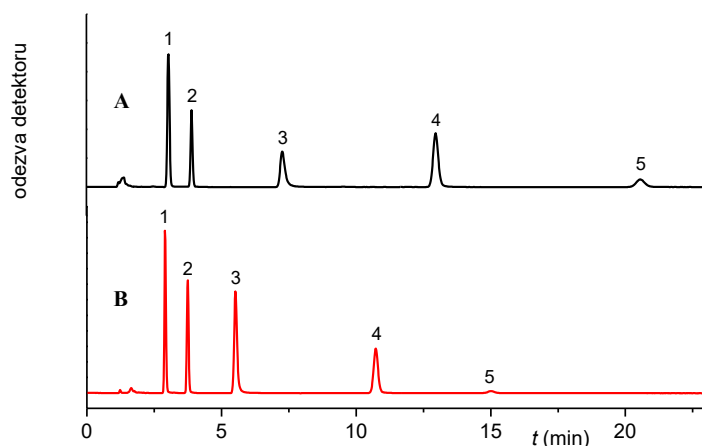
Obrázek 3.3.3: Chromatogramy separace směsi uridinů na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Označení analytů: 1 (2'-deoxyuridin), 2 (5-methyluridin), 3 (uridin). MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7, 90:10 (v/v).



Obrázek 3.3.4: Chromatogramy separace směsi nukleových bází na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Označení analytů: 1 (thymín), 2 (uracil), 3 (adenin), 4 (cytosin), 5 (guanin). MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7, 80:20 (v/v).



Obrázek 3.3.5: Chromatogramy separace směsi nukleových bází na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Označení analytů: 1 (thymín), 2 (uracil), 3 (adenin), 4 (cytosin), 5 (guanin). MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 85:15, (v/v).



Obrázek 3.3.6: Chromatogramy separace směsi nukleových bází na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC. Označení analytů: 1 (thymín), 2 (uracil), 3 (adenin), 4 (cytosin), 5 (guanin). MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7, 90:10 (v/v).

Z uvedených chromatogramů směsi uridinů a směsi nukleových bází je vidět, že kolona BEH Z-HILIC vykazuje větší retentivitu a obě kolony vykazují dobrou selektivitu pro většinu testovaných analytů (Příloha B). Obě kolony vykazují dobrý separační potenciál pro obě směsi. Lze si povšimnout, že pořadí eluce analytů ze směsi odpovídá hodnotám $\log D$, tedy jejich lipofilitě/polaritě ($\log D$ modelových analytů viz. Příloha A). Nejvyšší hodnotu tohoto parametru, a proto nejnižší polaritu má 2'-deoxyuridin ($\log D = -1,51$) a eluuje ze směsi uridinů jako první. Polárnější analyty se budou na stacionární fázi zdržovat déle. 5-methyluridin ($\log D = -2,02$) bude eluovat před uridinem, který je z těchto analytů nejpolárnější ($\log D = -2,42$). Pro směsi nukleových bází tento trend úplně neplatí. Ze směsi nukleových bází eluuje jako první thymín, který má nejnižší polaritu ze všech analytů ve směsi, $\log D = -0,46$. Následně eluuje uracil, který má až třetí nejvyšší polaritu, $\log D = -0,86$. Po uracilu eluují adenin ($\log D = -0,76$) a následně cytosin ($\log D = -1,3$) a guanin ($\log D = -1,11$). Je tedy patrný trend zvyšující se polarity společně s delšími retencemi analytů, ale kvůli velmi podobným hodnotám $\log D$ dvojic analytů uracil-adenin a cytosin-guanin a uplatňování dalších typů interakcí, nevykazují analyty eluci přesně v pořadí jejich vzrůstající polarity.

3.4 Retenční chování kyselin, bází a neutrálních látek

Na kolonách SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC byly proměřeny modelové analyty kyselin, bází a neutrálních látek. Byl sledován vliv poměru mobilní fáze ACN a 10mM acetátového pufru o pH = 4,7 na retenci analytů. Poměry mobilní

fáze byly 80:20, 85:15 a 90:10 (ACN/pufr, v/v). Ostatní separační podmínky byly konstantní (uvedené v sekci 2.7). V Tabulkách 3.4.1 a 3.4.2 jsou uvedeny naměřené hodnoty této skupiny modelových analytů.

Tabulka 3.4.1: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory kyselin, bází a neutrálních látek v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
BTMA	7,86	4,13	9,41	5,33	17,71	10,38
BOC-D,L-fenylalanin	1,54	0,01	1,63	0,10	2,06	0,32
N_α -BOC-L-tryptofan	1,55	0,01	1,66	0,12	2,26	0,45
<i>N</i> -BOC-L-tyrosin	1,66	0,08	1,96	0,32	2,79	0,79
D,L-fenylalanin
L-tryptofan	.	.	8,57	4,77	26,78	16,20
D,L-tyrosin	-	-	15,36	9,33	52,79	32,91
kys. benzensulfonová	1,98	0,29	2,23	0,45	-	-
kys. toluensulfonová	1,76	0,15	-	-	2,51	0,61
kys. tropová	2,36	0,54	3,25	1,05	6,31	3,05
kys. benzoová	2,06	0,34	2,59	0,64	4,26	1,73
kys. 4-aminobenzoová	2,28	0,49	2,95	0,86	5,10	2,27
kofein	1,88	0,22	1,97	0,24	1,98	0,27
<i>N,N</i> -diethylanilin	1,55	0,01	1,58	*	1,55	*
anilin	1,67	0,09	1,71	0,08	1,67	0,07
2-fenylethylamin	16,83	9,81
<i>N</i> -benzylmethylamin	1,59	0,04	1,64	0,03	1,60	*
chinolin	1,68	0,10	1,73	0,09	1,71	0,10

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. (*) eluce před markerem mrtvého času, eluce se systémovým píkem (-), nevyhodnotitelný pík např. více vrcholů (·). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,53$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,58$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,65$ min (90:10, v/v).

Tabulka 3.4.2: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory kyselin, bází a neutrálních látek v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
BTMA	2,91	1,29	3,99	2,05	5,94	3,30
BOC-D,L-fenylalanin	-	-	1,83	0,40	.	.
N_α -BOC-L-tryptofan	1,77	0,39	2,17	0,66	4,10	1,93
<i>N</i> -BOC-L-tyrosin	2,09	0,65	2,91	1,23	6,18	3,41
D,L-fenylalanin	4,34	2,42	8,51	5,51	15,92	10,65
L-tryptofan	5,23	3,13	11,74	7,98	44,96	31,90
D,L-tyrosin	7,85	5,19	20,07	0,14	62,61	44,80
kys. benzonsulfonová	3,27	1,58	3,99	2,05	6,51	3,65
kys. toluensulfonová	2,71	1,13	3,24	1,47	5,00	2,60
kys. tropová	3,52	1,78	5,84	3,47	11,25	7,15
kys. benzoová	2,78	1,19	4,16	2,18	7,06	4,11
kys. 4-aminobenzoová	3,07	1,42	4,89	2,73	8,56	5,21
kofoin	1,53	0,21	1,64	0,25	1,74	0,26
<i>N,N</i> -diethylanilin	1,24	*	1,29	*	1,35	*
anilin	1,40	0,10	1,45	0,11	1,51	0,09
2-fenylethylamin	.	.	5,34	3,09	9,11	5,60
<i>N</i> -benzylmethylamin	1,34	0,05	1,37	0,04	1,41	0,02
chinolin	1,45	0,14	1,52	0,16	1,58	0,15

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. (*) eluce před markerem mrtvého času, eluce se systémovým píkem (-), nevyhodnotitelný pík např. více vrcholů (·). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,27$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,31$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,40$ min (90:10, v/v).

Z Tabulek 3.4.1 a 3.4.2 lze vyčíst, že ve všech poměrech mobilní fáze, ve kterých byly analyty měřeny mají bazické a neutrální analyty vyšší retence na koloně ZIC-HILIC. Na druhou stranu kyselý analyty dosahují vyšších retencí na koloně BEH Z-HILIC. Získané výsledky odpovídají charakterizačním parametrům kolon z Tanakova testu, kde kolona ZIC-HILIC vykazovala větší kationtově-výměnný charakter a kolona BEH Z-HILIC naopak vyšší aniontově-výměnný charakter.

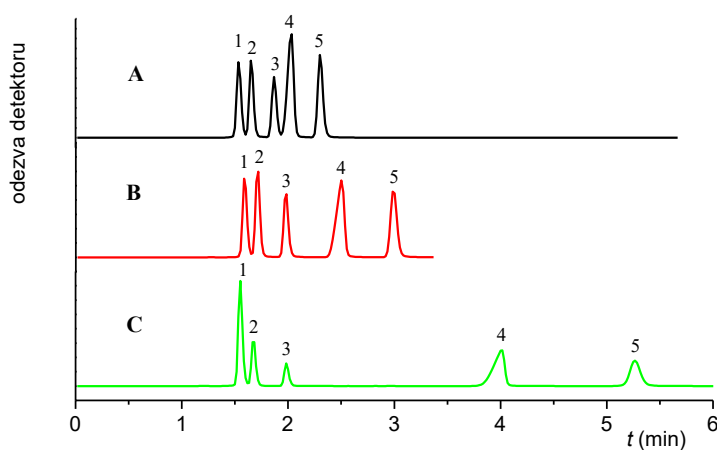
BOC-aminokyseliny měly na koloně ZIC-HILIC nízké retenční časy a při zvyšování obj. % ACN v mobilní fázi se výrazně nezvyšovaly. To lze vysvětlit tím, že se nemohou uplatňovat kationtově-výměnné interakce z důvodu blokové amino skupiny. Na koloně BEH Z-HILIC měly BOC-aminokyseliny retence vyšší a se zvětšujícím se poměrem ACN v mobilní fázi se i retence BOC-aminokyselin plynule navyšovaly. V tomto případě se na retenci významně podílí aniontově-výměnný mechanismus.

Na koloně ZIC-HILIC retenční časy nechráněných aminokyselin (D,L-fenylalanin, L-tryptofan, D,L-tyrosin) v poměru 80:20 ACN/pufr (v/v) nešly vyhodnotit. V případě D,L-fenylalaninu to nebylo možné ani při použití mobilních fází s vyšším množstvím ACN. Na koloně BEH Z-HILIC měly aminokyseliny vyšší retence, než na koloně ZIC-HILIC a jejich retence bylo možné vyhodnotit ve všech poměrech mobilní fáze.

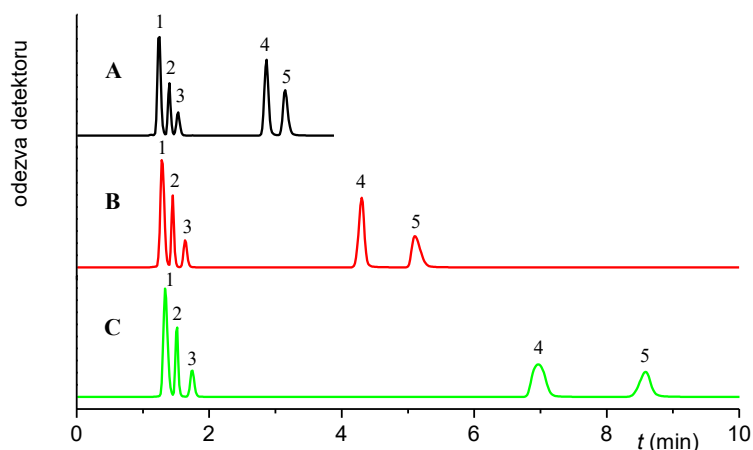
Zástupci slabých kyselin měli na koloně ZIC-HILIC nízké retence, které však plynule rostly navyšováním obj. % ACN v mobilní fázi. Na koloně BEH Z-HILIC vykazovali zástupci kyselin vyšší retence, které se zvyšovaly se stoupajícím množstvím ACN v mobilní fázi.

Zástupci slabých bazických analytů vykazovaly na koloně ZIC-HILIC nízké retence, které se se zvyšováním obj. % ACN v mobilní fázi příliš nenavyšovaly. *N,N*-diethylanilin eluoval vždy s markerem mrtvého času nebo blízko mrtvého času kolony. Důvodem by mohlo být to, že v pH = 4,7 *N,N*-diethylanilin není ionizovaný a jeho $\log D = 1,88$, takže nemá velkou polaritu a nebude mít vysoké retence v módu HILIC. Anilin ($\log D = 0,99$) vykazoval mírně vyšší retenční časy než *N,N*-diethylanilin. Anilin je za podmínek analýzy částečně ionizovaný ($pK_a = 4,64$). Porovnání retence 2-fenylethylaminu a *N*-benzylmethylaminu v mobilní fázi s 90 obj. % ACN ukazuje na významnou roli $-NH_2$ skupiny na retenci. Přestože oba analyty mají hodnotu $\log D$ velmi podobnou, 2-fenylethylamin s volnou NH_2 skupinou vykazuje výrazně vyšší retenci ($t_R = 16,83$ min) než *N*-benzylmethylamin, který eluuje s mrtvým časem kolony na koloně ZIC-HILIC. Stejný trend byl pozorován i na koloně BEH-Z-HILIC. Retence silné báze, BTMA, roste s rostoucím množstvím ACN v mobilní fázi na obou kolonách. Vyšší retence za stejných podmínek poskytovala kolona ZIC-HILIC, která vykazuje vyšší kationtově-výměnný charakter dle výsledků Tanakova testu.

Na obou analyzovaných kolonách byla následně proměřena směs X (kys. 4-aminobenzoová, kys. benzoová, kofein, anilin a *N,N*-diethylanilin) za poměrů mobilní fáze: 80:20, 85:15 a 90:10 ACN/puf. Cílem bylo zjištění separačního potenciálu stacionárních fází pro neutrální, kyselé a bazické analyty. Na obou kolonách se podařilo všechny analyty tvořící směs X rozdělit na základní linii (Obrázky 3.4.1 a 3.4.2). Z chromatogramů je vidět, jak jsou kyselé analyty (kys. benzoová a kys. 4-aminobenzoová) na koloně BEH Z-HILIC více zadržovány, než na koloně ZIC-HILIC, protože vykazuje větší aniontově-výměnný charakter. Na chromatogramech je vidět retenční mechanismus HILIC, kdy se zvyšujícím se množstvím ACN v MF roste retence analytů. U kolony BEH Z-HILIC je patrná dobrá selektivita pro kyselé analyty již v poměru složek mobilní fáze 80:20 (v/v) ACN/puf. a se zvyšujícím se obj. % ACN v MF se selektivita dále navyšuje (Příloha C). U kolony ZIC-HILIC je vidět výrazná změna v selektivitě až s 90 obj. % ACN v mobilní fázi. Proto se jako vhodnější stacionární fáze pro dělení této směsi analytů ukázala kolony BEH Z-HILIC.



Obrázek 3.4.1: Chromatogramy separace směsi X na koloně SeQuant ZIC-HILIC. Označení analytů: 1 (*N,N*-diethylanilin), 2 (anilin), 3 (kofein), 4 (kys. benzoová), 5 (kys. 4-aminobenzoová). Poměry MF: 80:20 (A) 85:15 (B) a 90:10 (C), ACN/10mM acetátový puf. pH = 4,7 (v/v).



Obrázek 3.4.2: Chromatogramy separace směsi X na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC. Označení analytů: 1 (*N,N*-diethylanilin), 2 (anilin), 3 (kofein), 4 (kys. benzoová), 5 (kys. 4-aminobenzoová). Poměry MF: 80:20 (A) 85:15 (B) a 90:10 (C), ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v).

I přes nízké retence slabých bází (*N,N*-diethylanilin, anilin) na obou stacionárních fázích bylo možné tyto analyty rozdělit na základní linii.

3.5 Retence a separace profenů a β -blokátorů

Na kolonách SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC byly proměřeny modelové analyty profeny (slabé kyseliny) a β -blokátory (slabé báze). Byl sledován vliv poměru složek mobilní fáze ACN a 10mM acetátového pufru o pH = 4,7 na retenci a rozlišení analytů. Poměry mobilní fáze při isokratické eluci byly 80:20, 85:15 a 90:10 (ACN/pufr, v/v). Ostatní separační podmínky byly konstantní (uvedené v sekci 2.7). V Tabulkách 3.5.1 a 3.5.2 a v Tabulkách D1-D3 (Příloha D) jsou uvedeny naměřené a vypočítané chromatografické parametry těchto modelových analytů. Dále byla proměřena směs Y obsahující ibuprofen, flurbiprofen, labetalol, pindolol, nadolol a kofein. Kvůli koeluci profenů a kofeinu za podmínek isokratické eluce bylo nutné se pokusit tuto směs lépe separovat pomocí gradientové eluce.

Tabulka 3.5.1: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory profenů a β -blokátorů na koloně SeQuant ZIC-HILIC

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R [min]	k
ibuprofen	1,53	0,01	1,56	0,05	1,90	0,14
flurbiprofen	1,53	0,01	1,55	0,04	2,06	0,24
ketoprofen	1,57	0,03	1,66	0,12	2,17	0,30
labetalol	3,85	1,54	4,81	2,23	10,39	5,23
pindolol	5,26	2,47	.	.	15,61	8,36
nadolol	7,88	4,20	11,55	6,75	32,73	0,19

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Nevýhodnotitelný pík např. více vrcholů (·). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,52$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,49$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,67$ min (90:10, v/v).

Tabulka 3.5.2: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory profenů a β -blokátorů na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
ibuprofen	1,36	0,07	1,53	0,18	1,89	0,37
flurbiprofen	1,37	0,08	1,67	0,28	2,23	0,61
ketoprofen	1,54	0,21	1,85	0,42	2,44	0,76
labetalol	2,10	0,65	2,90	1,22	4,74	2,44
pindolol	2,58	1,03	3,72	1,86	6,69	3,85
nadolol	3,89	2,06	6,87	4,27	15,64	10,33

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,27$ min (80:20, v/v), $t_M = 1,30$ min (85:15, v/v), $t_M = 1,40$ min (90:10, v/v).

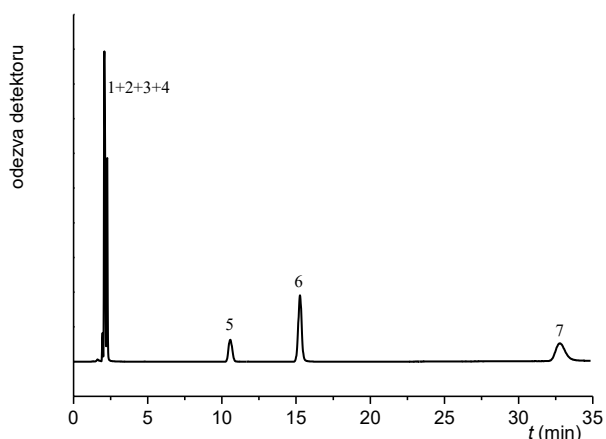
Z naměřených hodnot retenčních časů profenů a β -blokátorů je vidět, že vyšší retence v poměru mobilní fáze 80:20 ACN/pufr (v/v) měly analyty na koloně ZIC-HILIC. Slabě kyselé analyty (profeny) vykazovaly na obou kolonách nízké retence. Slabě bazické analyty (β -blokátory) dosahovaly vyšších retencí na obou kolonách.

Po zvýšení množství ACN v mobilní fázi na 85 obj. % se retence profenů na obou kolonách zvýšily jen nepatrně. Profeny na kolonách eluují za poměru mobilní fáze 80:20

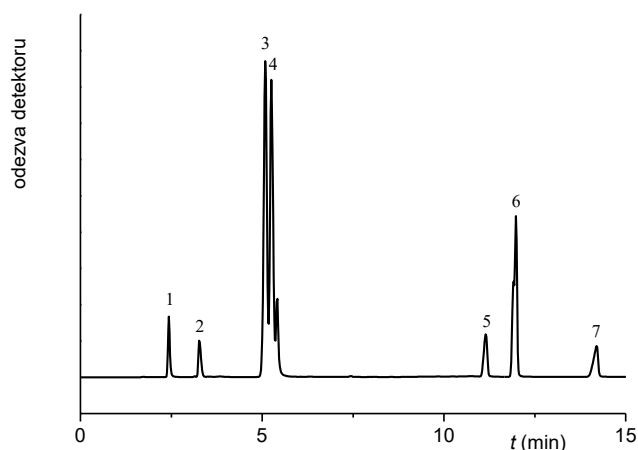
i 85:15 ACN/pufr (v/v) v blízkosti mrtvého času. Retence β -blokátorů se na obou kolonách zvýšila.

Po dalším navýšení množství ACN v mobilní fázi na 90 obj. % se podařilo retence všech analytů opět prodloužit na obou kolonách, u profenů přibližně o půl minuty. Retence β -blokátorů se za tohoto poměru mobilní fáze zvýšily výrazně na obou kolonách, přibližně dvojnásobně (od 85 obj. % ACN). Retenční čas nadololu na koloně ZIC-HILIC se zvýšil dokonce na trojnásobek (z $t_{\text{nadolol}} = 11,55$ min 85:15 (v/v) na $t_{\text{nadolol}} = 32,73$ min 90:10 (v/v), ACN/pufr). Celkově vyšší retence bazických látek na koloně ZIC-HILIC lze vysvětlit jejím větším kationtově-výměnným charakterem v porovnání s kolonou BEH Z-HILIC.

Na obou kolonách byla taky proměřena směs Y. Při všech poměrech mobilní fáze docházelo ke koeluci prvních 3 až 4 analytů ve směsi (ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu a neutrálního kofeinu) na koloně ZIC-HILIC. Na chromatogramech naměřených na koloně ZIC-HILIC (Obrázky 3.5.1 a 3.5.2) je vidět separace bazických analytů na základní linii. Profeny a kofein za podmínek isokratické eluce koeluovaly. Využitím gradientové eluce se podařilo separovat kofein a ibuprofen od flurbiprofenu s ketoprofenem, které byly separovány pouze částečně (Tabulka D3 v Příloze D). Celkovou dobu analýzy se pomocí gradientové eluce podařilo snížit přibližně na polovinu a zároveň došlo ke zvýšení rozlišení koeluuujících analytů.



Obrázek 3.5.1 Chromatogram separace směsi Y na koloně SeQuant ZIC-HILIC za isokratické eluce. Označení analytů: 1 (ibuprofen), 2 (kofein), 3 (flurbiprofen), 4 (ketoprofen), 5 (labetalol), 6 (pindolol), 7 (nadolol). MF: 90:10 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v).



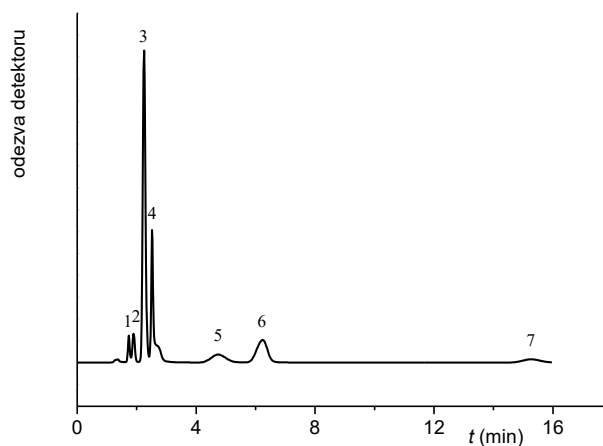
Obrázek 3.5.2: Chromatogram separace směsi Y na koloně SeQuant ZIC-HILIC. Gradientová eluce: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (t_0 : 97:3 (v/v), t_{10} : 80:20 (v/v)). Označení analytů: 1 (kofein), 2 (ibuprofen), 3 (flurbiprofen), 4 (ketoprofen), 5 (labetalol), 6 (pindolol), 7 (nadolol).

Kolona BEH Z-HILIC vykazuje vyšší selektivitu v porovnání s kolonou ZIC-HILIC za podmínek isokratické eluce. Na koloně BEH Z-HILIC se částečně separovaly profeny a kofein již při isokratické eluci ve složení mobilní fáze ACN/pufr 90:10 (v/v), viz. Obrázek 3.5.3, což lze přisuzovat jejímu vyššímu aniontově-výměnnému charakteru. Při použití gradientové eluce se podařilo celkovou dobu analýzy zkrátit a vylepšit tvary píků některých β -blokátorů (Tabulka 3.5.3). Stejně jako na koloně ZIC-HILIC, i na koloně BEH-Z-HILIC byly flurbiprofen a ketoprofen separovány pouze částečně (Obrázek 3.5.4).

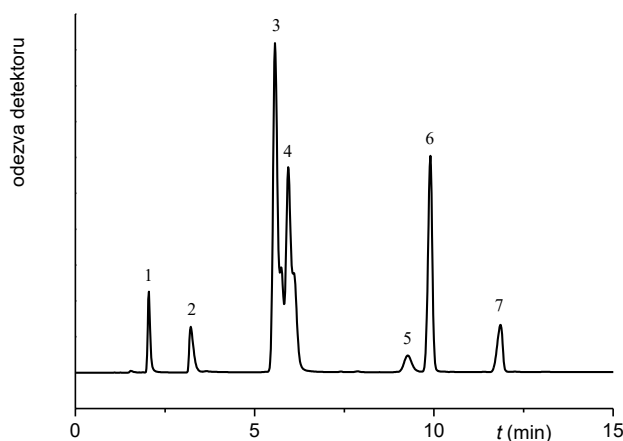
Tabulka 3.5.3: Naměřené hodnoty symetrie (T_f) za isokratické (ACN/pufr 90:10, v/v) a gradientové eluce (ACN/pufr t_0 : 97:3 (v/v), t_{10} : 80:20 (v/v) při analýze směsi Y na kolonách (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	A		B	
	T_f		T_f	
	isokratická eluce	gradientová eluce	isokratická eluce	gradientová eluce
kofein	1,09	1,32	.	1,18
ibuprofen	.	1,64	.	1,46
flurbiprofen	1,11	.	.	.
ketoprofen	2,30	.	.	.
labetalol	1,06	1,13	1,10	1,01
pindolol	0,94	0,94	1,03	1,02
nadolol	1,08	0,82	1,18	0,83

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,38$ min (isokratická eluce, A), $t_M = 1,56$ min (gradientová eluce, A), $t_M = 1,67$ min (isokratická eluce, B), $t_M = 1,72$ min (gradientová eluce, B). Parametr nelze vyhodnotit (·).



Obrázek 3.5.3: Chromatogram separace směsi Y na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC za isokratické eluce. Označení analytů: 1 (ibuprofen), 2 (kofein), 3 (flurbiprofen), 4 (ketoprofen), 5 (labetalol), 6 (pindolol), 7 (nadolol). MF: 90:10 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v).



Obrázek 3.5.4: Chromatogram separace směsi Y na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC. Gradientová eluce: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (t_0 : 97:3 (v/v), t_{10} : 80:20 (v/v)). Označení analytů: 1 (kofein), 2 (ibuprofen), 3 (flurbiprofen), 4 (ketoprofen), 5 (labetalol), 6 (pindolol), 7 (nadolol).

3.6 Analýza krátkých oligonukleotidů

Na kolonách SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC byly proměřeny modelové krátké oligonukleotidy s délkou řetězce 2 až 6mer allPO a allPS.

Při počátečních měřeních na koloně ZIC-HILIC byla nastavena teplota kolony na 25 °C a teplota autosampleru byla vždy nastavena na 10 °C. Jako mobilní fáze byl opět použit ACN v různém poměru s 10mM acetátovým pufrém o pH = 4,7. Také byl testován 5mM acetátový pufr o pH = 6,8. Ostatní separační podmínky byly konstantní (uvedené v sekci 2.7). V Tabulce 3.6.1 jsou uvedeny naměřené hodnoty retenčních časů a retenční faktory pík oligonukleotidů, které bylo možné vyhodnotit.

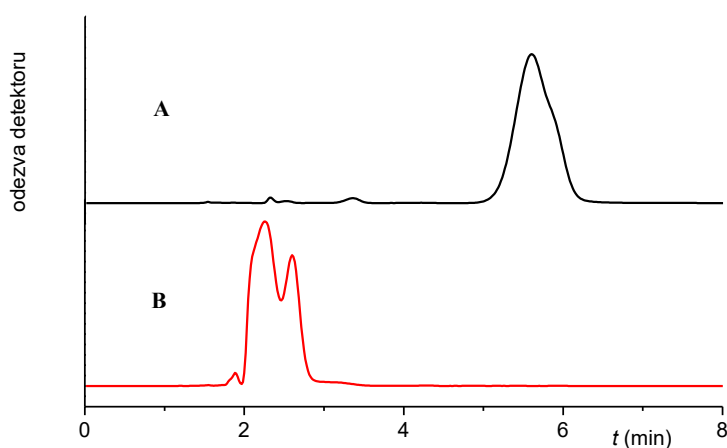
Tabulka 3.6.1: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory (4 až 6mer allPO a allPS) oligonukleotidů na koloně SeQuant ZIC-HILIC při teplotě kolony 25 °C.

analyt	70:30 (v/v)		80:20 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k
5mer allPO	1,61	0,09	11,06	6,14
4mer allPO	1,59	0,07	5,62	2,62
6mer allPS	1,53	0,03	10,10	5,52
5mer allPS	1,45	*	.	.
4mer allPS	1,42	*	-	-

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Eluce před markerem mrtvého času (*), eluce se systémovým píkem (-), nevyhodnotitelný pík např. více vrcholů (·). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,48$ min (70:30, v/v), $t_M = 1,55$ min (80:20, v/v).

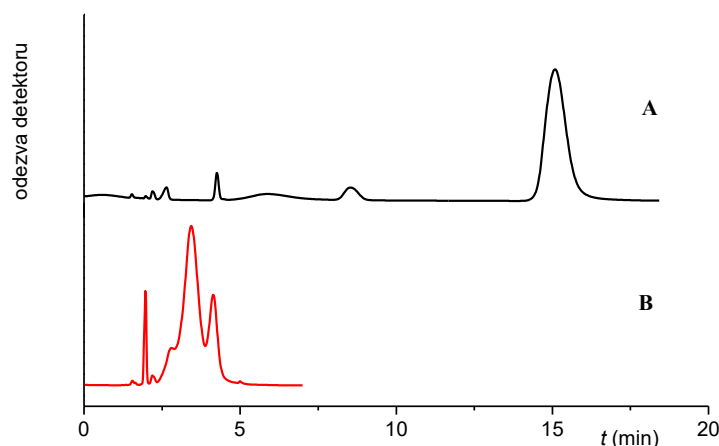
Při teplotě 25 °C mají oligonukleotidy nízké retence, u kratších oligonukleotidů 2mer a 3mer byla předpokládaná eluce s mrtvým časem, proto byla navýšena teplota kolony na 40 °C. V Tabulce 3.6.1 nejsou hodnoty pro analyt 6mer allPO, protože se tento analyt rozkládal a eluoval před kratšími oligonukleotidy. Po prvních měřeních byl 6mer allPO připraven znovu, měřen byl až při teplotě kolony 40 °C.

Na Obrázku 3.6.1 je vidět rozdíl chromatogramů oligonukleotidů 4mer allPO a 4mer allPS na koloně ZIC-HILIC. Dle předpokladů má polárnější 4mer allPO za těchto podmínek vyšší retenci.



Obrázek 3.6.1: Chromatogramy (A) 4mer allPO a (B) 4mer allPS v mobilní fázi 80:20 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v) na koloně SeQuant ZIC-HILIC. Teplota kolony 25°C.

Dále byly oligonukleotidy měřeny i v 5mM acetátovém pufru o pH = 6,8. Výsledné chromatografické píky byly většinou s několika vrcholy, což může odpovídat separaci nečistot, a vykazovaly kratší retence. Na Obrázku 3.6.2 jsou ukázány příklady chromatogramů analýzy 5meru allPO za použití 5mM acetátového pufru o pH = 6,8 a 10mM acetátového pufru o pH = 4,7.



Obrázek 3.6.2: Chromatogramy měření oligonukleotidu 5mer allPO v mobilní fázi ACN/pufr 80:20 (v/v), kde (A) 10mM acetátový pufr, pH = 4,7 a (B) 5mM acetátový pufr, pH = 6,8 na koloně SeQuant ZIC-HILIC. Teplota kolony 40°C.

V Tabulce 3.6.2 jsou uvedeny retenční časy a retenční faktory oligonukleotidů měřených na koloně ZIC-HILIC v 80 obj. % ACN v mobilní fázi. Z retenčních časů analytů vyplývá, že oligonukleotidy allPO vykazují vyšší retence než jejich analogy allPS. Jak už bylo naznačeno u Obrázku 3.6.1, je to způsobeno snížením polaritity nahrazením kyslíkových atomů atomy síry v oligonukleotidech. Některé z analytů vykazovaly zdvojený chromatografický pík. V případě allPO oligonukleotidů pravděpodobně dochází k separaci nečistot. V případě allPS oligonukleotidů může docházet k částečné separaci diastereomerů, jak bylo popsáno v literatuře. [70]

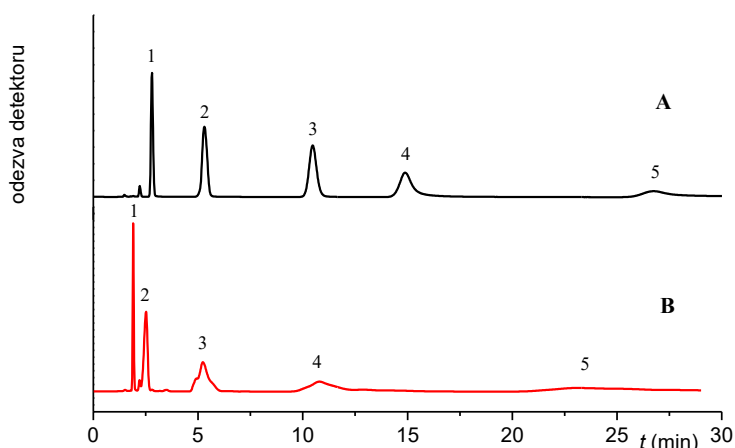
Tabulka 3.6.2: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory směsí allPO a allPS na koloně SeQuant ZIC-HILIC v poměru mobilní fáze 80:20 ACN/pufr (v/v). Teplota kolony 40 °C.

analyty	t_R (min)	k	analyty	t_R (min)	k
2mer allPO	2,71	0,82	2mer allPS	1,90	0,25
3mer allPO	5,30	2,46	3mer allPS	2,51	0,65
4mer allPO	10,47	5,83	4mer allPS	5,23	2,44
5mer allPO	14,89	8,71	5mer allPS	10,79	6,10
6mer allPO	26,71	16,43	6mer allPS	22,98	14,13

MF: 80:20 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,52$ min (80:20, v/v).

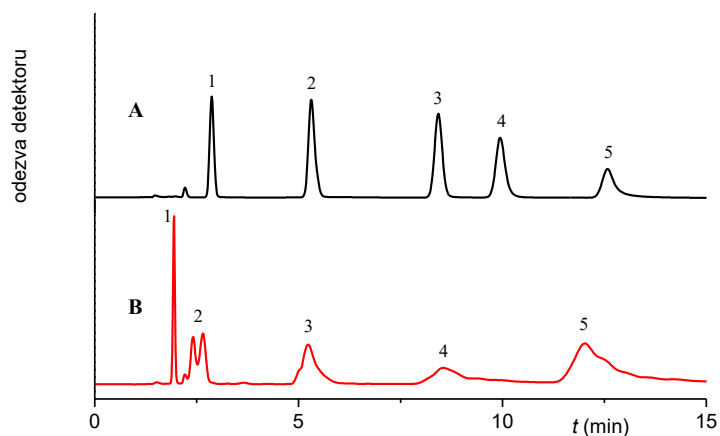
Na následujících chromatogramech (Obrázek 3.6.3) jsou ukázány výsledky měření směsí (směs allPO a směs allPS) na koloně ZIC-HILIC za podmínek isokratické eluce. Z chromatogramů je patrné vyšší rozlišení píků pro směs allPO.

Delší oligonukleotidy, tj. 6mer allPO a 6mer allPS mají velmi široké píky a skoro nejsou v chromatogramech patrné z důvodu jejich dlouhé retence.



Obrázek 3.6.3: Chromatogramy separace směsí oligonukleotidů (A: směs allPO a B: směs allPS) na koloně SeQuant ZIC-HILIC. MF: 80:20 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Analyty: 1 (2mer allPO/allPS), 2 (3mer allPO/allPS), 3 (4mer allPO/PS), 4 (5mer allPO/PS), 5 (6mer allPO/PS).

Za účelem zlepšení tvarů chromatografických píků a zkrácení doby analýzy byla testována gradientová eluce (Obr. 3.6.4).



Obrázek 3.6.4: Chromatogramy separace směsí oligonukleotidů (A: směs allPO a B: směs allPS) na koloně SeQuant ZIC-HILIC měřené v gradientu. Gradientová eluce: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (t₀: 80:20 (v/v), t₂₀: 70:30 (v/v)). Analyty: 1 (2mer allPO/allPS), 2 (3mer allPO/allPS), 3 (4mer allPO/PS), 4 (5mer allPO/PS), 5 (6mer allPO/PS).

Celkovou dobu analýzy obou směsí se podařilo snížit na 15 min. Došlo k vylepšení tvarů většiny píků ve směsi allPS a některých píků ve směsi allPO (Tabulka E1 v Příloze E). Analyt 3mer allPS tvoří zdvojený pík. Mnohem širší píky u allPS oligonukleotidů pravděpodobně souvisí s částečnou separací jejich diastereomerů.

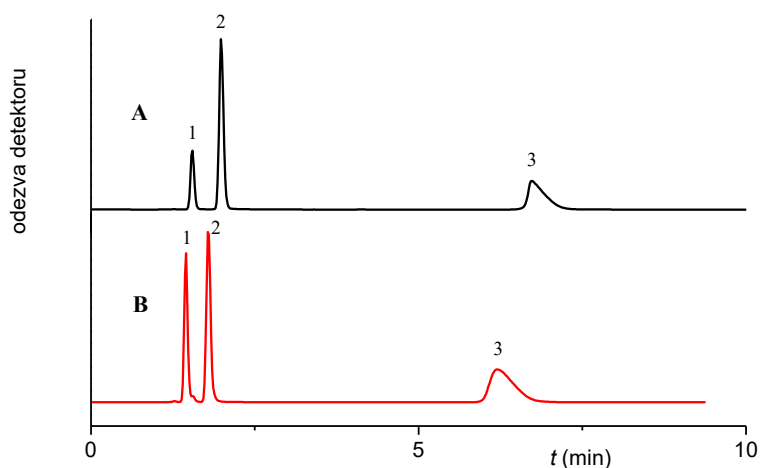
Oligonukleotidy byly měřené i na koloně BEH Z-HILIC. V poměru mobilní fáze 80:20 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v) měly 4 až 6mery allPO a allPS velmi dlouhé retence, nebo zdvojené píky a tento poměr se tedy ukázal jako nevhodný pro jejich analýzu. Byl proto zvýšen poměr vodné složky v mobilní fázi na 70:30 ACN/pufr (v/v) za účelem snížení retence analytů. Toto složení mobilní fáze umožnilo analýzu do 60 min jen 4merů allPO a allPS. Po úpravě mobilní fáze na poměr 60:40 ACN/pufr (v/v) byl již detekován 6mer allPO, ale 6mer allPS nebyl detekován do 60 minut.

Tabulka 3.6.3: Naměřené retenční časy a z nich vypočítané retenční faktory oligonukleotidů na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC. Teplota kolony 40 °C.

analyt	60:40 (v/v)		70:30 (v/v)		80:20 (v/v)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
6mer allPO	32,84	25,27	×	×	×	×
5mer allPO	·	·	×	×	×	×
4mer allPO	5,01	3,01	10,15	6,71	×	×
3mer allPO	2,02	0,62	4,08	2,10	16,17	10,83
2mer allPO	1,58	0,26	2,27	0,72	4,50	2,29
6mer allPS	×	×	×	×	×	×
5mer allPS	·	·	×	×	×	×
4mer allPS	5,02	3,02	8,74	5,64	·	·
3mer allPS	1,82	0,46	2,83	1,15	6,78	3,96
2mer allPS	1,48	1,84	1,90	0,44	2,83	1,07

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Nevýhodnotitelný pík např. více vrcholů (·), dlouhé retence, $t_R > 60$ min (×). Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,25$ min (60:40, v/v), $t_M = 1,32$ min (70:30, v/v), $t_M = 1,37$ min (80:20, v/v).

Z důvodu, že 5mery a 6mery měly na koloně BEH Z-HILIC vysoké retence, byly připraveny směsi obsahující jen 2 až 4 mery allPO a allPS. Chromatogramy separace směsi 2-4mer allPO a směsi 2-4mer allPS jsou ukázány na Obrázku 3.6.5.



Obrázek 3.6.5: Chromatogramy separace směsí oligonukleotidů (A: směs 2-4mer allPO a B: směs 2-4mer allPS) na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC. MF: 60:40 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Analyty: 1 (2mer allPO/allPS), 2 (3mer allPO/allPS), 3 (4mer allPO/PS).

Z chromatogramů (Obrázek 3.6.5) je patrná dobrá selektivita separačního systému (Tabulka E2 v Příloze E). Vyšší hodnoty rozlišení a retence vykazovaly 2mer allPO a 3mer allPO než jejich analogy obsahující atomy síry, kvůli jejich větší polaritě. Píky analytů 4mer allPO a 4mer allPS mají asymetrický tvar a vykazují tzv. chvostování.

Pro analýzu krátkých oligonukleotidů se ukázala jako vhodnější kolona ZIC-HILIC, na které byly úspěšně rozděleny směsi allPS a allPO (2-6mery). Kolona BEH Z-HILIC vykazuje větší retentivitu oligonukleotidů, to koreluje s výsledky Tanakova testu, kde kolona BEH Z-HILIC vykazuje větší interakce s hydrofilními analyty.

4 Závěr

V rámci této práce byly otestovány a porovnány dvě chromatografické kolony SeQuant ZIC-HILIC a Atlantis Premier BEH Z-HILIC z hlediska interakčních/retenčních vlastností. Základní parametry popisující retentivitu a selektivitu stacionárních fází byly zjištěny pomocí Tanakova testu. Sady strukturně odlišných modelových analytů a jejich směsi byly využity pro popis a porovnání separačního potenciálu těchto fází. Všechna měření byla provedena v módu HILIC.

Nejprve byl proveden Tanakův test. Tento test se zaměřuje na retentivní a selektivní chování stacionárních fází. Na základě vyšších hodnot parametrů $k(u)$ a $\alpha(OH)$ oproti parametru $\alpha(CH_3)$ u obou stacionárních fází bylo potvrzeno, že tyto fáze vykazují polární charakter. Obě stacionární fáze jsou proto vhodné pro použití v HILIC módu. Největší rozdíly mezi stacionárními fázemi, dle výsledků Tanakova testu, byly ve vyšším kationtově-výměnném charakteru ($\alpha(CX)$) kolony ZIC-HILIC a větším aniontově-výměnném charakteru ($\alpha(AX)$) kolony BEH Z-HILIC.

Měření byly následující sady modelových analytů a jejich směsi: uridiny a nukleové báze; jednoduché kyselé, bazické, amfoterní a neutrální analyty; profeny a β -blokátory a krátké oligonukleotidy (2-6mery allPO a allPS). Uridiny a nukleové báze vykazovaly dostatečné retence na obou stacionárních fázích a žádný analyt z této skupiny neeluoval s markerem mrtvého času kolony. Obecně vyšší retence uridinů a nukleových bází vykazovala kolona BEH Z-HILIC. Obě kolony poskytovaly dobrý separační potenciál pro tyto analyty, směs uridinů i směs nukleových bází se podařilo separovat na základní linii na obou kolonách do pěti minut.

Výsledky měření jednoduchých kyselých, bazických, amfoterních a neutrálních analytů odpovídaly poznatkům z Tanakova testu. Kyselé analyty vykazovaly vyšší retence na koloně BEH Z-HILIC a bazické analyty vykazovaly vyšší retence na koloně ZIC-HILIC za stejných chromatografických podmínek. Zástupci slabých bází, zejména *N,N*-diethylanilin a anilin, vykazovali na obou kolonách nízké retence za testovaných podmínek. Z chromatogramů měřené směsi těchto analytů (směs X: *N,N*-diethylanilin, anilin, kys. benzoová, kys. 4-aminobenzoová a kofein) byla patrná větší selektivita pro kyselé analyty na koloně BEH Z-HILIC, která se projevila již při 80 obj. % ACN v mobilní

fázi. Na koloně ZIC-HILIC bylo zvýšení selektivity patrné až od 90 obj. % ACN v mobilní fázi. Směs X byla rozdělena na základní linii na obou stacionárních fázích i přes nízké retence analytů z řady slabých bází. Na chromatogramech směsi X je patrný retenční mechanismus HILIC, kdy se zvyšujícím se množstvím ACN v MF roste retence analytů.

Při analýze analytů ze skupin profenů a β -blokátorů byl opět potvrzen vyšší kationtově-výměnný charakter stacionární fáze ZIC-HILIC kolony. β -blokátory, jako zástupci slabých bází, vykazovaly vyšší retence právě na této koloně. Při analýze směsi těchto sloučenin (směs Y: ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, labetalol, pindolol, nadolol a kofein) docházelo ke koeluci píků profenů (slabých kyselin) a neutrálního kofeinu na obou stacionárních fázích. Na stacionární fázi kolony BEH Z-HILIC byly profeny s kofeinem částečně separovány, což lze přisuzovat vyššímu aniontově-výměnnému charakteru této stacionární fáze. Použitím gradientové eluce bylo možné separovat kofein a ibuprofen na základní linii. Flurbiprofen a ketoprofen byly separovány pouze částečně.

Při analýze krátkých oligonukleotidů (2-6mery allPO a allPS) byla prokázána nižší polarita allPS oligonukleotidů nahrazením kyslíkových atomů atomy síry, kdy analogické oligonukleotidy allPO vykazovaly výrazně vyšší retence na obou stacionárních fázích. Některé oligonukleotidy vykazovaly zdvojené chromatografické píky. V případě allPO oligonukleotidů se pravděpodobně jedná o separaci nečistot. Při analýze směsí těchto oligonukleotidů byly pro analýzy na koloně BEH Z-HILIC připraveny směsi obsahující oligonukleotidy jen do délky 4mer, protože 5mery a 6mery vykazovaly retence vyšší než 60 min. Kolona ZIC-HILIC se pro separaci oligonukleotidů ukázala jako vhodnější z hlediska doby analýzy. Na této koloně byly rozděleny modelové směsi allPO a allPS všech zkoumaných oligonukleotidů na základní linii. Pro vylepšení tvaru píků a zkrácení doby analýzy byly tyto směsi proměřené i pomocí gradientové eluce.

Závěrem lze konstatovat, že obě kolony vykazují dobrý separační potenciál pro různé skupiny polárních sloučenin.

5 Literatura

- [1] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, a S. R. Crouch, *Analytická chemie*, 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.
- [2] K. Štulík, *Analytické separační metody*, 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004.
- [3] L. Nováková, M. Douša, a P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021.
- [4] L. R. Snyder, „Peer Reviewed: HPLC: Past and Present.“, *Anal. Chem.*, roč. 72, č. 11, s. 412 A-420 A, čer. 2000, doi: 10.1021/ac002846r.
- [5] „kapalinova-chromatografie.pdf“. Viděno: 26. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapalinova-chromatografie.pdf>
- [6] B. Buszewski a S. Noga, „Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique“, *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 402, č. 1, s. 231–247, led. 2012, doi: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [7] R. L. Deisenhofer a K. Ballschmiter, „New stationary phases for normal-phase high-performance liquid chromatography (NP-HPLC)“, *Fresenius J. Anal. Chem.*, roč. 360, č. 7–8, s. 763–768, dub. 1998, doi: 10.1007/s002160050802.
- [8] P. Jandera, „50 years of high performance liquid chromatography: The contribution of the Department of Analytical Chemistry in Pardubice“, *Ser A*, 2020.
- [9] S. D. Sarker a L. Nahar, „Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products“, in *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, Elsevier, 2015, s. 405–425. doi: 10.1016/B978-0-12-800874-4.00019-2.
- [10] P. Žuvela *et al.*, „Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography“, *Chem. Rev.*, roč. 119, č. 6, s. 3674–3729, bře. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00246.
- [11] F. Gritti a G. Guiochon, „Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography“,

- J. Chromatogr. A*, roč. 1099, č. 1–2, s. 1–42, pro. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.09.082.
- [12] D. Josic a S. Kovac, „Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Proteins“, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, roč. 61, č. 1, srp. 2010, doi: 10.1002/0471140864.ps0807s61.
- [13] V. Rajendiran a Z. El Rassi, „Retention behaviors of pre-column derivatized mono-, di- and oligosaccharides in various modes of high performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1682, s. 463508, říj. 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463508.
- [14] A. J. Alpert, „Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds“, *J. Chromatogr. A*, roč. 499, s. 177–196, led. 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3.
- [15] S. Moldoveanu a V. David, „Other HPLC separations performed on polar stationary phases“, in *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2022, s. 479–484. doi: 10.1016/B978-0-323-91177-1.00010-7.
- [16] P. Jandera, „Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review“, *Anal. Chim. Acta*, roč. 692, č. 1–2, s. 1–25, dub. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.02.047.
- [17] L. Redón, X. Subirats, a M. Rosés, „Volume and composition of semi-adsorbed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of water adsorption in common stationary phases and eluents“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1656, s. 462543, říj. 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462543.
- [18] Y. Guo, N. Bhalodia, B. Fattal, a I. Serris, „Evaluating the Adsorbed Water Layer on Polar Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)“, *Separations*, roč. 6, č. 2, s. 19, dub. 2019, doi: 10.3390/separations6020019.
- [19] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.-L. Finaru, a C. Elfakir, „Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1218, č. 35, s. 5939–5963, zář. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.002.

- [20] „What the HILIC is HILIC? - SCIENCE UNFILTERED". Viděno: 24. únor 2024. [Online]. Dostupné z: <https://phenomenex.blog/2016/06/23/what-the-hilic-is-hilic/>
- [21] *A practical guide to HILIC: a tutorial and application book*. Umeå: SeQuant, 2006.
- [22] „HPLC/UHPLC Technical Tip". Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://discover.phenomenex.com/0121-lc-technical-tip-cz?elqTrackId=f2285c52fa724bc9b4424960ef9416a4&elq=00000000000000000000000000000000&elqaid=1438&elqat=2&elqCampaignId=>
- [23] S. S. S. Series, „Column temperature in HILIC", *Separation Science*. Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.sepscience.com/column-temperature-in-hilic/>
- [24] „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography". Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/hilic?gclid=CjwKCAjw-KipBhBtEiwAWjgwrI8ILdGU1M58RT4CdRuWMwBN5_8atlyWOV3qovSYiQjSk1UN2XKb9hoCA00QAvD_BwE
- [25] M. Gilar, K. D. Berthelette, a T. H. Walter, „Contribution of ionic interactions to stationary phase selectivity in hydrophilic interaction chromatography", *J. Sep. Sci.*, roč. 45, č. 17, s. 3264–3275, zář. 2022, doi: 10.1002/jssc.202200165.
- [26] L. Gong a J. S. O. McCullagh, „Analysis of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative ion electrospray ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, roč. 1218, č. 32, s. 5480–5486, srp. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.044.
- [27] H. Guo, R. Liu, J. Yang, B. Yang, X. Liang, a C. Chu, „A novel click lysine zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 1223, s. 47–52, úno. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.12.033.
- [28] T. Ikegami, „Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biopharmaceutical drugs and therapeutic peptides: A review based on the

- separation characteristics of the hydrophilic interaction chromatography phases", *J. Sep. Sci.*, roč. 42, č. 1, s. 130–213, led. 2019, doi: 10.1002/jssc.201801074.
- [29] S. Cubbon, C. Antonio, J. Wilson, a J. Thomas-Oates, „Metabolomic applications of HILIC–LC–MS", *Mass Spectrom. Rev.*, roč. 29, č. 5, s. 671–684, zář. 2010, doi: 10.1002/mas.20252.
- [30] C. D. Iverson, X. Gu, a C. A. Lucy, „The hydrophilicity vs. ion interaction selectivity plot revisited: The effect of mobile phase pH and buffer concentration on hydrophilic interaction liquid chromatography selectivity behavior", *J. Chromatogr. A*, roč. 1458, s. 82–89, srp. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.061.
- [31] D. Yeung, N. Klaassen, B. Mizero, V. Spicer, a O. V. Krokhin, „Peptide retention time prediction in hydrophilic interaction liquid chromatography: Zwitter-ionic sulfoalkylbetaine and phosphorylcholine stationary phases", *J. Chromatogr. A*, roč. 1619, s. 460909, kvě. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.460909.
- [32] „SeQuant® HILIC". Viděno: 6. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/sequant-hilic>
- [33] „HPLC Column ZIC-HILIC 150x4.6mm, 3.5µm, 100Å PEEK HPLC Column SeQuant(TM)". Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.analytix-shop.com/us/mc1504440001>
- [34] „SeQuant® ZIC®-pHILIC 5µm polymer 150 x 4.6 mm PEEK-lined stainless steel column, suitable for HPLC | Sigma-Aldrich". Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [35] „Introducing Atlantis BEH Z-HILIC: A Zwitterionic Stationary Phase Based on Hybrid Organic/Inorganic Particles". Viděno: 6. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/ph/en/library/application-notes/2021/introducing-atlantis-beh-z-hilic-a-zwitterionic-stationary-phase-based-on-hybrid-organic-inorganic-particles.html>

- [36] *HPLC kolony pro polární analyty (VIZE 2021)*. Viděno: 20. duben 2024. [Online Video]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/2468>
- [37] T. H. Walter *et al.*, „Characterization of a highly stable zwitterionic hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on hybrid organic–inorganic particles”, *J. Sep. Sci.*, roč. 45, č. 8, s. 1389–1399, dub. 2022, doi: 10.1002/jssc.202100859.
- [38] G. Marrubini, A. Pedrali, P. Hemström, T. Jonsson, P. Appelblad, a G. Massolini, „Column comparison and method development for the analysis of short-chain carboxylic acids by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection: Liquid Chromatography”, *J. Sep. Sci.*, roč. 36, č. 21–22, s. 3493–3502, lis. 2013, doi: 10.1002/jssc.201300551.
- [39] X.-D. Cheng, X.-T. Peng, Q.-W. Yu, B.-F. Yuan, a Y.-Q. Feng, „Preparation of a Novel Amino-Phosphate Zwitterionic Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography”, *Chromatographia*, roč. 76, č. 23–24, s. 1569–1576, pro. 2013, doi: 10.1007/s10337-013-2534-3.
- [40] S. Vikingsson, R. Kronstrand, a M. Josefsson, „Retention of opioids and their glucuronides on a combined zwitterion and hydrophilic interaction stationary phase”, *J. Chromatogr. A*, roč. 1187, č. 1–2, s. 46–52, dub. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.070.
- [41] L. Qiao *et al.*, „Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography”, *J. Chromatogr. A*, roč. 1286, s. 137–145, dub. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.066.
- [42] H. Qiu, D. W. Armstrong, a A. Berthod, „Thermodynamic studies of a zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography”, *J. Chromatogr. A*, roč. 1272, s. 81–89, led. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.071.

- [43] A. Shen, X. Li, X. Dong, J. Wei, Z. Guo, a X. Liang, „Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 1314, s. 63–69, lis. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.002.
- [44] R. Pell, S. Sić, a W. Lindner, „Mechanistic investigations of cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A*, roč. 1269, s. 287–296, pro. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.006.
- [45] S. Tufi, M. Lamoree, J. De Boer, a P. Leonards, „Simultaneous analysis of multiple neurotransmitters by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, roč. 1395, s. 79–87, kvě. 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.03.056.
- [46] H. Peng *et al.*, „Preparation and evaluation of surface-bonded phenylglycine zwitterionic stationary phase", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 410, č. 23, s. 5941–5950, zář. 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1211-7.
- [47] A. Sentkowska, M. Biesaga, a K. Pyrzynska, „Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in *Genista tinctoria* Extract", *J. Anal. Methods Chem.*, roč. 2016, s. 1–9, 2016, doi: 10.1155/2016/3789348.
- [48] „HILIC_4.pdf". Viděno: 6. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://learning.sepscience.com/hubfs/Technical%20Blogs/HILIC_4.pdf
- [49] M. Kodíček, O. Valentová, a R. Hynek, *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*, Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015.
- [50] „Syn and anti nucleosides - Proteopedia, life in 3D". Viděno: 8. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://proteopedia.org/wiki/index.php/Syn_and_anti_nucleosides
- [51] S. Pourshahian, „THERAPEUTIC OLIGONUCLEOTIDES, IMPURITIES, DEGRADANTS, AND THEIR CHARACTERIZATION BY MASS SPECTROMETRY", *Mass Spectrom. Rev.*, roč. 40, č. 2, s. 75–109, bře. 2021, doi: 10.1002/mas.21615.


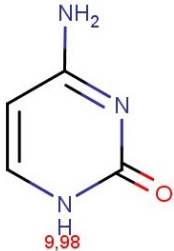
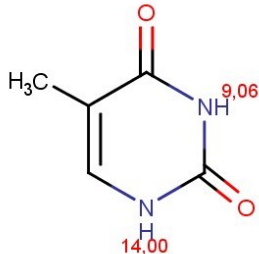
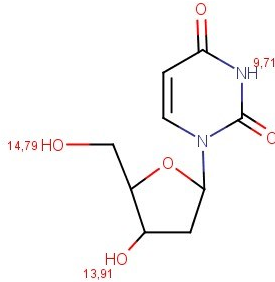
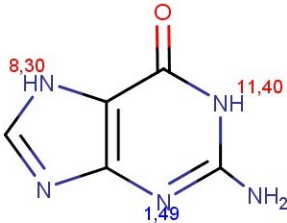
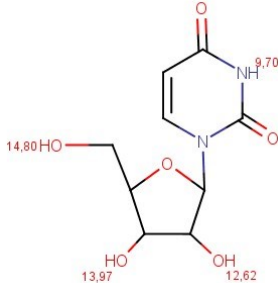
- [52] F. Jahani, M. Tajbakhsh, S. Khaksar, a M. R. Azizi, „An efficient and highly chemoselective N-Boc protection of amines, amino acids, and peptides under heterogeneous conditions", *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.*, roč. 142, č. 10, s. 1035–1043, říj. 2011, doi: 10.1007/s00706-011-0534-2.
- [53] V. Gökmen, A. Serpen, a B. A. Mogol, „Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 403, č. 10, s. 2915–2922, čvc. 2012, doi: 10.1007/s00216-012-5779-z.
- [54] D. French, „Advances in Clinical Mass Spectrometry", in *Advances in Clinical Chemistry*, roč. 79, Elsevier, 2017, s. 153–198. doi: 10.1016/bs.acc.2016.09.003.
- [55] R. Schuster, „Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, roč. 431, s. 271–284, led. 1988, doi: 10.1016/S0378-4347(00)83096-0.
- [56] A. A. Benjamine, A. A. Jacques, K. Soleymane, a B. E. H. Sawaliho, „Comparative Theoretical Study of Stability, Lypophilicity, Dipole Moments, Acidity and Spectroscopic Properties of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Ibuprofen, Ketoprofen and Flurbiprofen", *Chem. Sci. Int. J.*, s. 51–60, čvc. 2020, doi: 10.9734/CSJI/2020/v29i530180.
- [57] H. Lüllmann, K. Mohr, L. Hein, a J. Slíva, *Barevný atlas farmakologie*, 5. české vydání. Praha: Grada Publishing, 2020.
- [58] „Beta Adrenergic Blocking Agents", in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*, Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. Viděno: 9. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548127/>
- [59] H. Lardeux, D. Guillarme, a V. D'Atri, „Comprehensive evaluation of zwitterionic hydrophilic liquid chromatography stationary phases for oligonucleotide characterization", *J. Chromatogr. A*, roč. 1690, s. 463785, úno. 2023, doi: 10.1016/j.chroma.2023.463785.

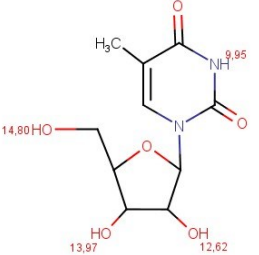
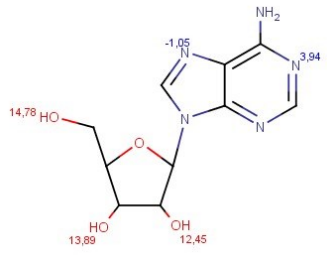
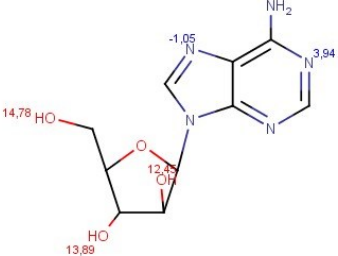
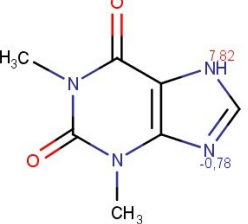
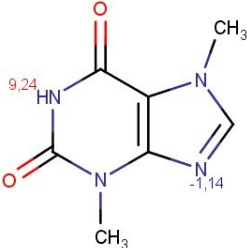
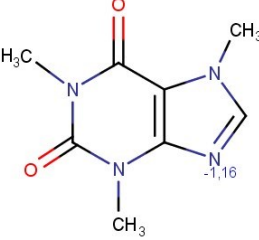
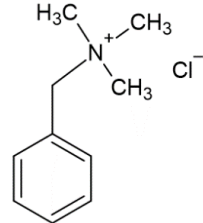
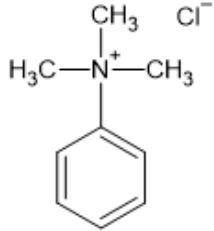
- [60] H. Gökce a S. Bahçeli, „Vibrational Analysis of Trimethylphenyl Ammonium Chloride", *Z. Für Naturforschung A*, roč. 64, č. 1–2, s. 127–131, úno. 2009, doi: 10.1515/zna-2009-1-218.
- [61] „Trimethylphenylammonium chloride 138-24-9", ChemicalBook. Viděno: 9. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8768346.htm
- [62] J. Monteiro, M. G. Alves, P. F. Oliveira, a B. M. Silva, „Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, roč. 59, č. 16, s. 2597–2625, zář. 2019, doi: 10.1080/10408398.2018.1461607.
- [63] M. J. Baggott *et al.*, „Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers", *Psychopharmacology (Berl.)*, roč. 228, č. 1, s. 109–118, čvc. 2013, doi: 10.1007/s00213-013-3021-0.
- [64] S. Sagar, M. Kaur, a K. P. Minneman, „Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges", *Mar. Drugs*, roč. 8, č. 10, s. 2619–2638, řij. 2010, doi: 10.3390/md8102619.
- [65] R. J. Whitley *et al.*, „Vidarabine versus Acyclovir Therapy in Herpes Simplex Encephalitis", *N. Engl. J. Med.*, roč. 314, č. 3, s. 144–149, led. 1986, doi: 10.1056/NEJM198601163140303.
- [66] T. Ikegami, A. Taniguchi, T. Okada, K. Horie, S. Arase, a Y. Ikegami, „Functionalization using polymer or silane? A practical test method to characterize hydrophilic interaction chromatography phases in terms of their functionalization method", *J. Chromatogr. A*, roč. 1638, s. 461850, úno. 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461850.
- [67] L. Zhang a J. Li, „Unlocking the secrets: the power of methylation-based cfDNA detection of tissue damage in organ systems", *Clin. Epigenetics*, roč. 15, č. 1, s. 168, řij. 2023, doi: 10.1186/s13148-023-01585-8.

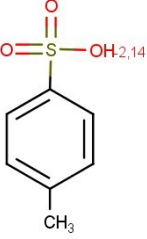
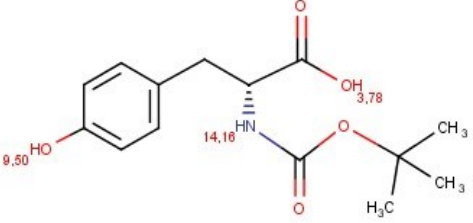
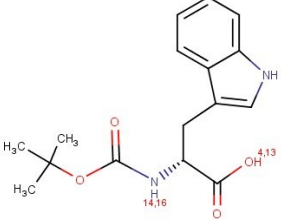
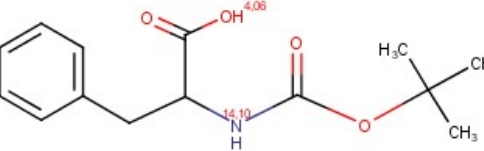
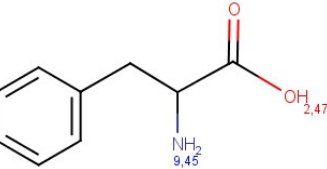
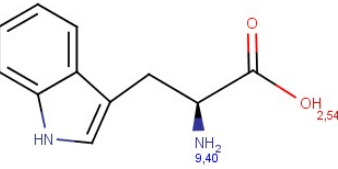
- [68] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, a N. Tanaka, „Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency", *J. Chromatogr. A*, roč. 1218, č. 35, s. 5903–5919, zář. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.048.
- [69] A. Kumar, J. C. Heaton, a D. V. McCalley, „Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 1276, s. 33–46, úno. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.037.
- [70] A. Goyon *et al.*, „Characterization of antisense oligonucleotide and guide ribonucleic acid diastereomers by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, roč. 1708, s. 464327, říj. 2023, doi: 10.1016/j.chroma.2023.464327.

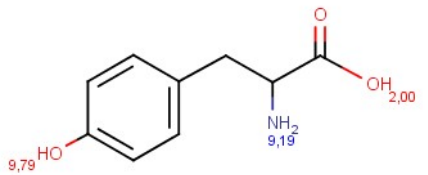
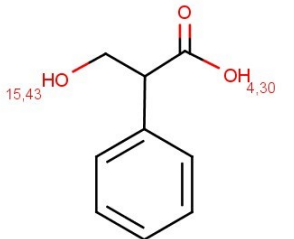
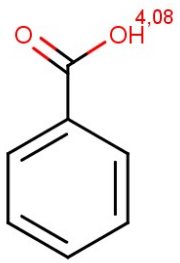
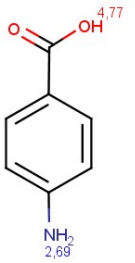
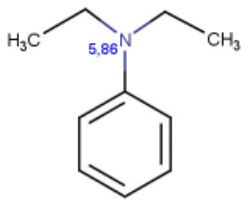
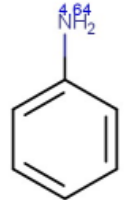
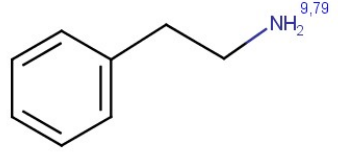
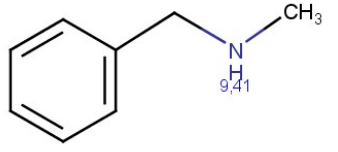
Příloha A

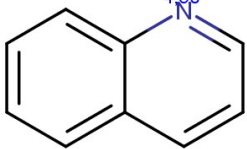
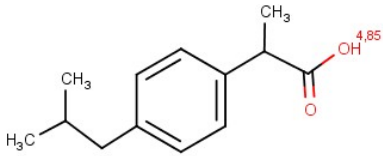
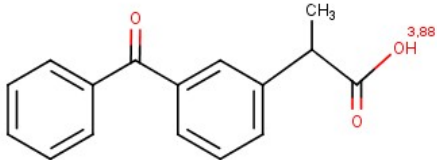
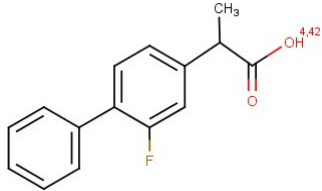
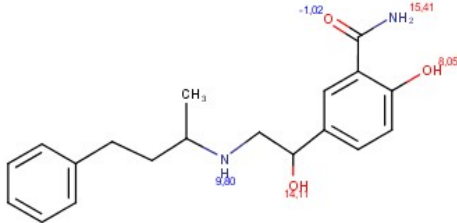
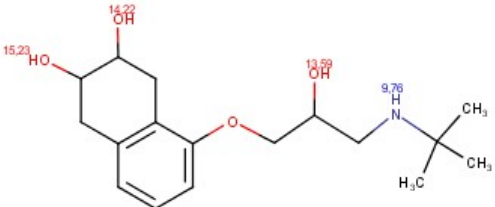
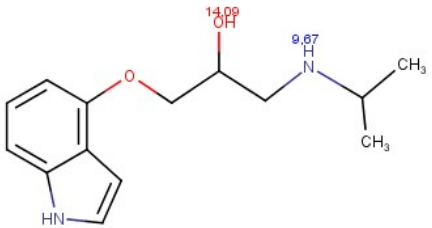
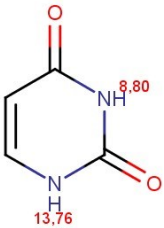
Tabulka A: Strukturní vzorce, hodnoty pKa a logD (při pH = 5) sady modelových analytů získané pomocí programu MarvinSketch.

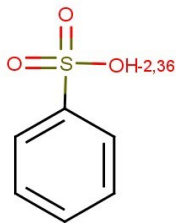
název	vzorec	logD	název	vzorec	logD
adenin		- 0,76	cytosin		- 1,3
thymin		- 0,46	2'-deoxyuridin		- 1,51
guanin		- 1,11	uridin		- 2,42

5-methyluridin		- 2,02	adenosin		- 2,09
vidarabin		- 2,09	theofylin		- 0,77
theobromin		- 0,77	kofein		- 0,55
BTMA		- 2,25	TMFA		- 1,97

<p>kys. toluensulfonová</p>		<p>- 0,71</p>	<p>N-BOC-L-tyrosin</p>		<p>1,02</p>
<p>Nα-BOC-L-tryptofan</p>		<p>1,74</p>	<p>N-BOC-D,L-fenylalanin</p>		<p>1,58</p>
<p>D,L-fenylalanin</p>		<p>- 1,19</p>	<p>L-tryptofan</p>		<p>- 1,09</p>

D,L-tyrosin		- 1,49	kys. tropová		0,11
kys. benzoová		0,66	kys. 4-aminobenzoová		0,35
N,N-diethylanilin		1,88	anilin		0,99
2-fenylethylamin		- 1,64	N-benzylmethylamin		- 1,68

chinolin		1,89	ibuprofen		3,46
ketoprofen		2,57	flurbiprofen		3,7
labetalol		- 0,21	nadolol		- 2,34
pindolol		- 1,51	uracil		- 0,86

kys. benzensulfonová		- 1,22	-	-	-
-------------------------	---	--------	---	---	---

Příloha B

Tabulka B1: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) nukleových bází a nukleosidů ze směsí v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R	α	R
uridin	-	-	-	-	-	-
2'-deoxyuridin	1,08	0,76	1,12	1,69	1,20	3,42
5-methyluridin	1,50	4,87	1,59	8,20	1,69	11,34
thymín	-	-	-	-	-	-
uracil	1,54	4,52	1,58	6,00	1,67	7,39
adenin	1,33	3,69	1,51	6,58	1,85	11,41
cytosin	1,98	12,23	2,12	16,40	2,35	21,88
guanin	1,08	1,69	1,20	4,77	.	.

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr nelze vyhodnotit (-). Parametr se nevyhodnocuje (-).

Tabulka B2: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) nukleových bází a nukleosidů ze směsí v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R	α	R
uridin	-	-	-	-	-	-
2'-deoxyuridin	1,12	1,26	1,18	2,32	1,29	4,63
5-methyluridin	1,42	4,48	1,47	6,34	1,51	8,47
thymín	-	-	-	-	-	-
uracil	1,45	3,67	1,49	4,97	1,52	6,00
adenin	1,50	4,78	1,78	8,57	2,34	15,27
cytosin	1,71	8,78	1,85	13,00	1,97	17,14
guanin	1,16	1,16	1,30	7,11	1,66	16,19

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr se nevyhodnocuje (-).

Příloha C

Tabulka C1: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) ve směsi X v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R	α	R
<i>N,N</i> -diethylanilin	-	-	-	-	-	-
anilin	43,50	1,56	24,98	1,61	- 1,63	1,64
kofein	2,76	2,75	3,07	3,33	3,63	3,91
kys. benzoová	1,48	1,70	2,32	4,66	5,72	14,48
kys. 4-aminobenzoová	1,55	2,74	1,54	3,91	1,52	6,69

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr se nevyhodnocuje (-).

Tabulka C2: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) ve směsi X v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R	α	R
<i>N,N</i> -diethylanilin	-	-	-	-	-	-
anilin	- 4,39	1,76	- 7,76	1,63	- 3,02	1,73
kofein	2,04	1,52	2,35	2,09	2,79	2,37
kys. benzoová	6,17	12,63	9,06	20,46	15,39	20,81
kys. 4-aminobenzoová	1,18	2,27	1,27	4,01	1,29	4,65

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr se nevyhodnocuje (-).

Příloha D

Tabulka D1: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) analytů ve směsi Y v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R
ibuprofen	-	-	-	-
kofein
flurbiprofen	.	.	1,46	1,10
ketoprofen	8,17	.	1,44	1,45
labetalol	6,69	15,82	15,03	29,75
pindolol	1,46	6,73	1,53	10,74
nadolol	1,79	12,74	2,29	22,91

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr nelze vyhodnotit (·). Parametr se nevyhodnocuje (-).

Tabulka D2: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) analytů ve směsi Y v různém poměru ACN a pufru v mobilní fázi na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt	80:20 (v/v)		85:15 (v/v)		90:10 (v/v)	
	α	R	α	R	α	R
ibuprofen	-	-	-	-	-	-
kofein	1,45	.
flurbiprofen	1,69	.
ketoprofen	.	.	1,56	1,32	1,32	1,86
labetalol	3,06	2,44	2,88	3,43	2,95	4,53
pindolol	1,57	1,78	1,46	1,85	1,44	1,99
nadolol	2,05	3,76	2,38	7,81	2,85	10,51

MF: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7. Parametr nelze vyhodnotit (·). Parametr se nevyhodnocuje (-).

Tabulka D3: Hodnoty selektivity (α) a rozlišení (R) analytů ve směsi Y na koloně (A) Atlantis Premier BEH Z-HILIC a (B) SeQuant ZIC-HILIC.

analyt	A		B	
	α	R	α	R
ibuprofen	-	-	-	-
kofein	1,45	.	2,18	7,45
flurbiprofen	1,69	.	2,16	12,36
ketoprofen	1,32	1,87	1,05	1,06
labetalol	2,95	4,54	2,67	34,54
pindolol	1,44	2,00	1,09	1,21
nadolol	2,85	10,40	1,22	10,59

Gradientová eluce: ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (t_0 : 97:3 (v/v), t_{10} : 80:20 (v/v)). Parametr nelze vyhodnotit (.). Parametr se nevyhodnocuje (-).

Příloha E

Tabulka E1: Hodnoty selektivity (α), rozlišení (R) a symetrie píku (T_f) analytů ve směsích allPO a allPS na koloně SeQuant ZIC-HILIC za isokratické a gradientové eluce.

analyt	isokratická eluce			gradientová eluce		
	α	R	T_f	α	R	T_f
2mer allPO	-	-	1,06	-	-	1,05
3mer allPO	2,98	7,87	1,02	2,81	10,11	1,22
4mer allPO	2,37	9,32	1,07	1,82	9,70	1,04
5mer allPO	1,49	5,33	1,28	1,22	3,91	1,17
6mer allPO	1,89	8,28	1,12	1,31	5,55	1,74
2mer allPS	-	-	1,03	-	-	0,98
3mer allPS	2,59	2,93
4mer allPS	3,74	5,12	.	3,28	6,15	1,38
5mer allPS	2,49	4,11	1,12	1,89	4,04	1,43
6mer allPS	2,32	2,89	1,32	1,50	2,81	1,56

MF: Při isokratické eluci bylo složení mobilní fáze 80:20 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Při gradientové eluci bylo složení mobilní fáze ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (t_0 : 80:20 (v/v), t_{20} : 70:30 (v/v)). Teplota kolony 40°C. Parametr nelze vyhodnotit (.). Parametr se nevyhodnocuje (-).

Tabulka E2: Hodnoty retenčních časů (t_R), retenčních faktorů (k), selektivity (α) a rozlišení (R) analytů ve směsích 2-4mer allPO a 2-4mer allPS na koloně Atlantis Premier BEH Z-HILIC.

analyt ze směsi	t_R (min)	k	T_f	α	R
2mer allPO	1,55	0,24	1,12	-	-
3mer allPO	1,99	0,59	1,14	2,50	3,57
4mer allPO	6,74	4,39	2,03	7,44	15,20
2mer allPS	1,45	0,16	1,11	-	-
3mer allPS	1,79	0,43	1,16	2,74	3,16
4mer allPS	6,21	3,97	1,65	9,23	10,80

MF: 60:40 ACN/10mM acetátový pufr, pH = 4,7 (v/v). Teplota kolony 40°C. Toluén byl marker mrtvého času: $t_M = 1,25$ min. Parametr se nevyhodnocuje (-).