

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

**STUDIUM VLIVU SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE  
NA SELEKTIVITU A RETENCI ANALYTŮ  
NA HILIC STACIONÁRNÍCH FÁZÍCH**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, Csc.

Hradec Králové, 2014

Kateřina Štětková

## Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Kateřina Štětková

**Školitel:** RNDr. Hana Vlčková, Ph. D.

**Název diplomové práce:** Studium vlivu složení mobilní fáze na selektivitu a retenci analytů na HILIC stacionárních fázích

Tato diplomová práce se zabývá vlivem koncentrace ACN, pH a koncentrace pufru v mobilní fázi na retenci a selektivitu kolon Atlantis HILIC Silica (3  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm) a Luna NH<sub>2</sub> (3  $\mu\text{m}$ , 2,0 mm x 100 mm). Ke studii bylo vybráno celkem 35 analytů, které zahrnují látky neutrální, bazické a kyselé. Detekce byla provedena pomocí PDA detektoru při vlnové délce 245 nm. Všechna měření probíhala za podmínek izokratické eluce při průtoku 0,4 ml.min<sup>-1</sup> s využitím směsi acetonitril/voda (pufr) jako mobilní fáze. Teplota na koloně byla nastavena na 30 °C, teplota autosampleru na 4 °C a použitý nastříkovaný objem byl 2  $\mu\text{l}$ . Pro vyhodnocení výsledků byly z naměřených hodnot sestrojeny grafy a tabulky, které sloužily k hodnocení kolon z hlediska selektivity a retence jednotlivých skupin analytů.

Kolona Atlantis HILIC Silica vykazovala chování typické pro HILIC chromatografii, tj. retence stoupala se zvyšující se koncentrací ACN v mobilní fázi a to především od >85% ACN. Kolona Luna NH<sub>2</sub> kromě HILIC chování navíc vykazovala silnou retenci kyselých látek v RP módu. Nicméně naprosto opačný efekt byl pozorován pro testované stacionární fáze při zvyšující se koncentraci pufru v mobilní fázi. Na koloně Atlantis HILIC Silica retence bazických látek klesala a retence kyselých látek stoupala, naproti tomu na koloně Luna NH<sub>2</sub> retence bazických látek stoupala a retence kyselých látek klesala. Na retenci neutrální látek a nukleových bazí měla změna koncentrace pufru zanedbatelný vliv. Rozdíly v selektivitě byly u kolon Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> výraznější při pH = 3,8 než při pH = 6,8. Největší rozdíly selektivity se projevíly při analýze kyselých látek.

## **Abstract**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Kateřina Štětková

**Supervisor:** RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

**Title of Diploma thesis:** Study of influence of mobile phase composition on selectivity and retention of the analytes on HILIC stationary phases

This graduation thesis deals with an influence of concentration of ACN, pH and buffer concentration in mobile phase on retention of selected analytes and on selectivity of Atlantis HILIC Silica column (3  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm) and Luna NH<sub>2</sub> column (3  $\mu\text{m}$ , 2,0 mm x 100 mm). A set of 35 analytes including neutral, basic and acidic compounds were chosen for this study. Detection was performed by PDA detector at the wave-length of 245 nm. Measurements were carried out using isocratic flow 0.4 ml.min<sup>-1</sup> of mobile phase ACN/water (buffer). The column temperature was set up to 30 °C, auto sampler temperature to 4 °C and injection volume to 2  $\mu\text{l}$ . For easier evaluation of results, measured data are presented in charts and tables. These were used to evaluation of columns in terms of selectivity and retention of the individual groups of analytes.

The typical HILIC behavior, an increasing retention of analytes with increasing ACN concentration in mobile phase, was observed for Atlantis HILIC Silica column. The most intensive effect was shown at more than 85% of ACN. Luna NH<sub>2</sub> column except for HILIC behavior shown an extremely strong retention of acidic compounds in RP mode. Absolutely opposite effect was observed with increasing concentration of buffer in mobile phase, while retention of basic compounds was decreasing and retention of acidic compounds was increasing on Atlantis HILIC Silica column, the retention of basic compounds was increasing and retention of acidic compounds was decreasing on Luna NH<sub>2</sub> column. A change of buffer concentration had an insignificant effect on retention of neutral compounds and nucleotide bases. The differences in selectivity of Atlantis HILIC Silica and Luna NH<sub>2</sub> were more significant at pH = 3.8 than pH = 6.8. The most significant differences in selectivity were shown for acidic compounds.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. května 2014

.....

Kateřina Štětková

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Haně Vlčkové, Ph. D. za pomoc, odborné rady a trpělivost při zpracování diplomové práce. Taktéž děkuji veškerému personálu Katedry analytické chemie za zajištění příjemných podmínek pro praktickou část práce. V neposlední řadě vedení i všem zaměstnancům Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za pět let studia na vysoké úrovni.

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Cíl a zadání práce .....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Stacionární fáze.....	11
3.2. Mobilní fáze.....	20
3.3. Výhody metody HILIC .....	23
3.4. Vyhodnocení výsledků.....	24
3.5. Použité analyty.....	25
4. Experimentální část .....	31
4.1. Přístrojové vybavení .....	31
4.2. Testované analytické kolony .....	31
4.3. Použité chemikálie .....	32
4.4. Příprava zásobních roztoků .....	32
4.5. Příprava pracovních roztoků.....	33
4.6. Příprava mobilních fází .....	33
4.7. Vlastní měření.....	34
4.8. Schéma experimentů .....	34
5. Výsledky a diskuze.....	36
5.1. Vyhodnocení retence v závislosti na procent. zastoupení ACN v mobilní fázi ...	36
5.2. Vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci pufru .....	43
5.3. Vyhodnocení selektivity.....	56
6. Závěr .....	65

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril, acetonitrile
AmAc	octan amonný, ammonium acetate
ATP	adenosintrifosfát, adenosine triphosphate
CD	cyklodextrin, cyclodextrin
CNS	centrální nervový systém, central nervous system
DNA	deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid
ESI	ionizace elektrosprejem, electrospray ionization
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie, hydrophilic interaction chromatography
ISA	částečná sympatomimetická aktivita, intrinsic sympathomimetic activity
LC	kapalinová chromatografie, liquid chromatography
MS	hmotnostní spektrometrie, mass spectrometry
NP	normální fáze, normal phase
RNA	ribonukleová kyselina, ribonucleic acid
RP	reverzní fáze, reverse phase
SP	stacionární fáze, stationary phase
SPE	extrakce na tuhou fázi, solid phase extraction
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, ultra high performance liquid chromatography
ZIC-HILIC	zwitteriontová hydrofilní interakční chromatografie, zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography

## 1. Úvod

Kapalinová chromatografie je metoda využívaná k analýze netěkavých organických látek už více než sto let. Původní systém s normálními fázemi (NP) byl postupně nahrazen systémem s reverzními fázemi (RP), čímž došlo k výraznému zvýšení separační účinnosti metody. Problém s sebou ovšem přinesla analýza polárních látek, protože v systému NP se potýkáme se špatnou reprodukovatelností výsledků a špatnou rozpustností polárních látek v mobilní fázi a na druhou stranu v systému RP je retence polárních látek velmi nízká.

V roce 1990 navrhl Andrew Alpert metodu označovanou jako hydrofilní interakční chromatografie, která využívá polární stacionární fáze typické pro NP ve spojení s vodně-organickou mobilní fází typickou pro RP. Díky této kombinaci dochází ke značnému zvýšení retence polárních látek a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků. Vlivem vhodného složení HILIC mobilní fáze s vysokým obsahem organického rozpouštědla je tento mód vhodný také pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Navíc je mód HILIC vhodný i pro analýzu bazických látek, které ve srovnání s RP vykazují lepší tvary píků. Metoda našla široké uplatnění ve farmaceutických a biologických vědách, ale také v oblasti životního prostředí, potravinářském a chemickém průmyslu a mnoha dalších odvětvích. Po roce 2003 došlo k výraznému rozmachu HILIC především vlivem rozsáhlého rozvoje v oblasti nových typů HILIC stacionárních fází. V současné době existuje již celá řada komerčně dostupných HILIC stacionárních fází, které zahrnují kolony s různými povrchy (silikagel, polymery, hybrid) modifikované různými funkčními skupinami (amino, amido, diol, kyano atd.). Kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  a s částicemi s pevným jádrem jsou již také dostupné pro HILIC chromatografii.



## **2. Cíl a zadání práce**

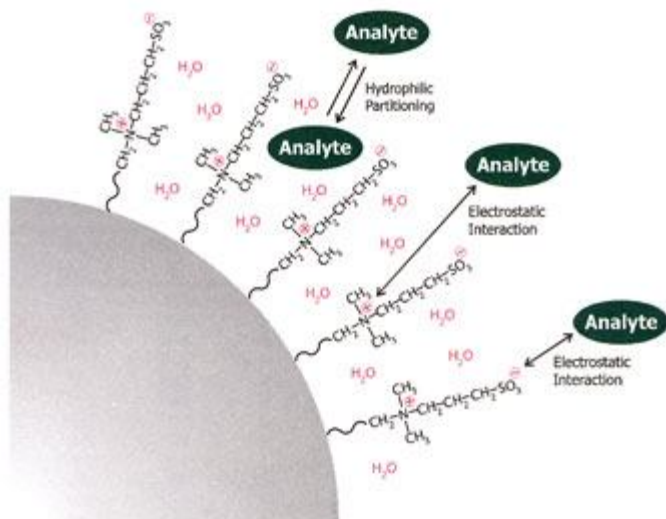
Cílem této diplomové práce bylo studium vlivu složení mobilní fáze, zejména procentuálního zastoupení acetonitrilu, pH a koncentrace pufru, na selektivitu a retenci analytů. Byla hodnocena změna selektivity při dvou různých hodnotách pH mobilní fáze. Pro práci byla vybrána skupina 35 analytů zahrnujících kyselé, neutrální a bazické látky. Testovány byly kolony Atlantis HILIC Silica (3  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm, Waters) a Luna NH<sub>2</sub> (3  $\mu\text{m}$ , 2,0 mm x 100 mm, Phenomenex).

### 3. Teoretická část

Kapalinová chromatografie je metoda používaná pro separaci látek více než sto let. Původní separace na normální fázi byla časem nahrazena kapalinovou chromatografií na fázi reverzní, čímž se výrazně zvýšila separační účinnost především pro nepolární látky [1]. Roku 2004 byla do praxe zavedena technika ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), která s sebou přinesla mnoho výhod jako například zkrácení času analýzy, snížení spotřeby rozpouštědel a snížení nastříkovaného objemu, ale především výrazně zvýšila účinnost chromatografické separace [2][3]. Problematická však stále zůstala analýza polárních látek, které jsou v systému RP velmi špatně zadržovány a tudíž většinou eluovány v mrtvém retenčním čase. V systému NP, který byl k analýze polárních látek užíván, se velmi často setkáváme se špatnou rozpustností polárních látek v mobilní fázi. V roce 1990 Andrew Alpert představil metodu označovanou jako hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), při které dochází k interakci analytu s hydrofilní stacionární fází (SP) (např. nemodifikovaný silikagel, silikagel modifikovaný různými polárními skupinami - amino, diol, amido atd.) a eluce se provádí pomocí relativně hydrofobní mobilní fáze. Ve většině případů mobilní fáze obsahuje vysoké procento polárního organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilu (ACN), a 5-30% vody, která je v případě HILIC módu silným elučním činidlem. HILIC se v posledních letech hojně rozšířila a je využívána zejména k separaci sacharidů, peptidů a aminokyselin, ale také v oblasti analýzy léčiv, životního prostředí, či potravinářském průmyslu [1][4][5].

Přestože se studiem retenčního mechanismu zabývalo mnoho studií, podrobný mechanismus není stále zcela objasněn [1]. První studie hovořily o interakcích mezi hydroxylovými skupinami analytů a polárními skupinami na povrchu SP [6][7]. Ovšem tato myšlenka se omezuje pouze na analyty obsahující ve své struktuře OH skupiny. Současná teorie předpokládá, že polární skupiny SP přitahují molekuly vody a dochází k vytváření vodné vrstvy na povrchu této fáze. Polární analyt, který je rozpouštěn v mobilní fázi, je tedy rozdělován mezi vodnou vrstvu imobilizovanou na SP a mobilní fázi (Obrázek 1). Na základě afinity analytu k částečně imobilizované vodné vrstvě a organické mobilní fázi dochází k ovlivnění retence analytu. Jestliže analyt má vyšší afinitu k vodné vrstvě než k organické mobilní fázi, dochází ke zvýšení interakcí mezi analytem a vodnou vrstvou, tedy ke zvýšené retenci [8]. Kromě zmíněného mechanismu

se při HILIC módu uplatňují v určité míře také vodíkové vazby, iontové a hydrofobní interakce. Mechanismus je tedy komplexní, a ne ještě zcela známý, což významně limituje předpověď retence analyzovaných látek [9].



Obrázek 1: HILIC rozdělovací proces. Obrázek převzat ze zdroje [10].

### 3.1. Stacionární fáze

První generací SP používaných v HILIC módu byly polární fáze určené pro NP LC (kapalinová chromatografie) (zejména nemodifikovaný silikagel a silikagel modifikovaný amino skupinou), které byly použity především při separaci karbohydrátů v roce 1975. Po roce 1985 byla vyvinuta druhá generace SP, která zahrnovala silikagel modifikovaný amidovou a diolovou funkční skupinou [11][12]. Dodnes nejužívanější SP je klasický, tedy nemodifikovaný, silikagel. Jednotlivé silikagelové kolony od různých výrobců vykazují značné rozdíly v retenčních vlastnostech, což pravděpodobně souvisí s různými výrobními postupy a rozdílnou pórovitostí SP. V současné době je již komerčně dostupné větší množství kolon na bázi nemodifikovaného silikagelu, které byly vyvinuty přímo pro HILIC mód (např. Atlantis HILIC Silica). Zároveň jsou ale používány nejen SP na bázi silikagelu, ale také polymerní či hybridní SP. Dokonce jsou již dostupné i UHPLC HILIC kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  a kolony s částicemi s pevným jádrem [13].

Jednotlivé HILIC stacionární fáze lze rozdělit na neutrální, nabitě (pozitivně, negativně) a zwitteriontové fáze [14].

**Neutrální stacionární fáze** - polární funkční skupiny těchto SP (amido, kyano, diol a cykloextrin) jsou neutrální a pH mobilní fáze tedy významně neovlivňuje jejich náboj. Nicméně v rozmezí pH 4 - 5 mohou vykazovat částečný negativní náboj a to vlivem deprotonizace zbytkových Si-OH skupin na povrchu silikagelu [14].

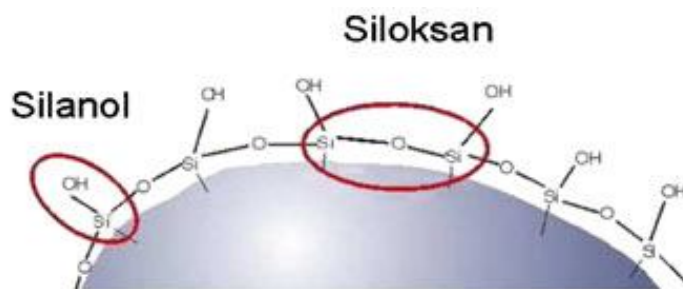
**Negativně nabitě stacionární fáze** - do této skupiny SP patří například poly(asparagová kyselina), poly(2-sulfoethylaspartamid), sulfatovaná S-DVB fáze. V porovnání s neutrálními SP mají iontové interakce vyšší vliv na retenci a selektivitu. Jsou využívány zejména pro analýzu bazických analytů a peptidů. Mezi negativně nabitě SP může být počítán i nemodifikovaný silikagel [14].

**Pozitivně nabitě stacionární fáze** - nejčastěji používanou pozitivně nabitou SP je silikagel modifikovaný pomocí amino skupiny. Nicméně patří sem také například poměrně nové SP obsahující imidazolovou či triazolovou funkční skupinu [14].

**Zwitteriontové stacionární fáze** - zwitteriontové (sulfoalkylbetainové) fáze (ZIC-HILIC) obsahují na povrchu aktivní vrstvu s navázanou silně kyselou sulfonovou kyselinou i silně bazickou kvartérní amoniovou solí v poměru 1:1. Tento typ SP umožňuje analyzovat látky obsahující jak kyselé, tak bazické skupiny [14].

### **3.1.1. Stacionární fáze s nemodifikovaným silikagelem**

Nemodifikovaná silikagelová SP je zlatým standardem v oblasti HILIC SP. Rozeznáváme tři typy nemodifikovaného silikagelu. Typ A je původním materiálem získávaným srážením bazického roztoku oxidu křemičitého. Velmi často je však kontaminován kovovými částicemi, a proto není vhodný k použití v HILIC módu. Silikagel typu B obsahuje sférické částice a je připravován agregací z křemičitých solí. Obsah kovových částic je minimální. Typ B je relativně stabilní i při středních a vyšších hodnotách pH, maximálně však do pH 9. Silikagel typu C obsahuje velké množství Si-H skupin, které nahrazují skupiny Si-OH na povrchu fáze a to až z 95%. Tato modifikace významně mění základní vlastnosti silikagelu. Povrch je méně polární, obsahuje pouze zbytkové Si-OH, které mohou nést záporný náboj, a proto je závislost analýzy na pH mobilní fáze nižší. Z takovýchto materiálů s nižším obsahem Si-OH skupin byly připraveny kolony speciálně určené pro HILIC mód jako například Atlantis HILIC Silica [3][15]. Struktura silikagelu je zobrazena na Obrázku 2.



Obrázek 2: Stacionární fáze tvořená nemodifikovaným silikagelem [16].

### 3.1.2. Stacionární fáze s navázanou amino skupinou

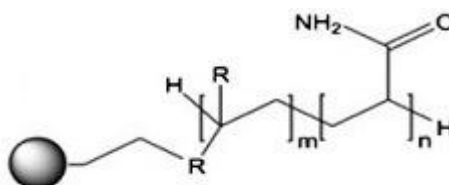
V roce 1975 byla připravena silikagelová SP s navázanou aminopropylovou skupinou (Obrázek 3). Nicméně amino skupiny vytvářejí v pórech silikagelu alkalické prostředí, což vede k rozpouštění silikagelu a hydrolyze chemicky vázané fáze. Během analýzy se to projevuje především deformací chromatografických píků a zároveň nižší životností kolon. Z těchto důvodů byl vyvinut silikagel dynamicky pokrytý polyamidy, který se připravuje za použití N-(3-butynyl)ftalylimidu a následné hydrazinolýzy [12][17]. Nicméně i přes nevýhody jsou SP modifikované aminopropylovou skupinou i dnes velmi často využívány např. při separaci cukrů, bílkovin, nukleotidů apod. Amino SP vykazuje zvýšenou afinitu ke kyselým analytům. Jejich retence probíhá za přispění jak rozdělovacího tak iontově výměnného mechanismu, kvůli čemuž může být analýza poměrně málo efektivní. Může docházet zejména k nevratné adsorpci kyselých analytů na SP nebo naopak k rozkladu SP. Problémová je například analýza karbohydrátů, jelikož primární aminoskupina tvoří tzv. Schiffovy baze s aldehydy. Naopak silikagel modifikovaný aminopropylovou skupinou výrazně přispívá k mutarotaci a tím snižuje tvorbu dvojítek píků při analýze monosacharidů [15].



Obrázek 3: Struktura amino- silikagelu. Převzato a upraveno z [16].

### 3.1.3. Stacionární fáze s navázanou amido skupinou

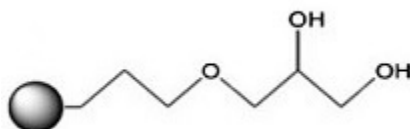
Amido SP obsahuje molekuly karbamoylu nebo amidu vázané na silikagelový povrch pomocí krátkých alkylů (Obrázek 4). Retence není tak ovlivněna iontovou výměnou jako je tomu u SP s navázanou amino skupinou. Nedochází k riziku nevratné adsorpce analyzovaných látek, což souvisí s jejich delší životností [18]. Jsou používány zejména k separaci oligosacharidů, glykoproteidů, peptidů a jsou vhodné obecně pro analýzu bazických látek [15].



Obrázek 4: Struktura amido- silikagelu. Převzato a upraveno z [16].

### 3.1.4. Stacionární fáze s navázanou diol skupinou

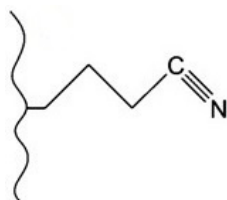
Ve většině případů diol SP obsahuje dlouhý alkylový řetězec, na jehož konci je navázána neutrální hydrofilní 2,3-dihydroxypropylová skupina (Obrázek 5). Tyto fáze jsou charakterizovány smíšeným RP/HILIC retenčním mechanismem, vysokou polaritou a schopností vytvářet vodíkové vazby stejně jako nemodifikovaný silikagel. Na druhou stranu nemají na svém povrchu ionizovatelné skupiny, tudíž nedochází k adsorpci polárních analytů na SP a poskytují výbornou stabilitu [9]. Jsou využívány v analýze bílkovin, nízkomolekulárních fenolických látek a také v oblasti kvantitativní analýzy polárních léčiv[15].



Obrázek 5: Struktura diol- silikagelu. Převzato a upraveno z [16].

### 3.1.5. Stacionární fáze s navázanou kyano skupinou

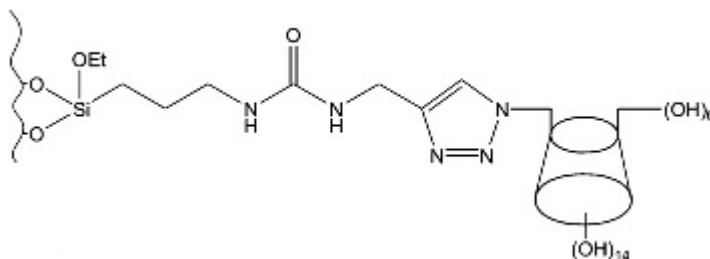
Kyano SP má funkční skupinu vázanou k silikagelu pomocí propylového řetězce. Původně byla tato SP používaná v NP módu. Na rozdíl od ostatních HILIC SP kyano SP postrádá schopnost vytvářet vodíkové vazby a je méně hydrofilní, což vede k nízké retenci mnoha polárních analytů. Například peptidy nejsou touto SP vůbec zadržovány. Navíc tato SP vykazuje značnou nestabilitu při analýze středně polárních látek způsobenou poklesem přitažlivých sil mezi částicemi fáze. Z těchto důvodů je použití kyano SP v HILIC módu značně omezeno [15][16][18]. Struktura kyano-silikagelu je zobrazena na Obrázku 6.



Obrázek 6: Struktura kyano- silikagelu. Převzato a upraveno z [15].

### 3.1.6. Stacionární fáze na bázi cyklodextrinu

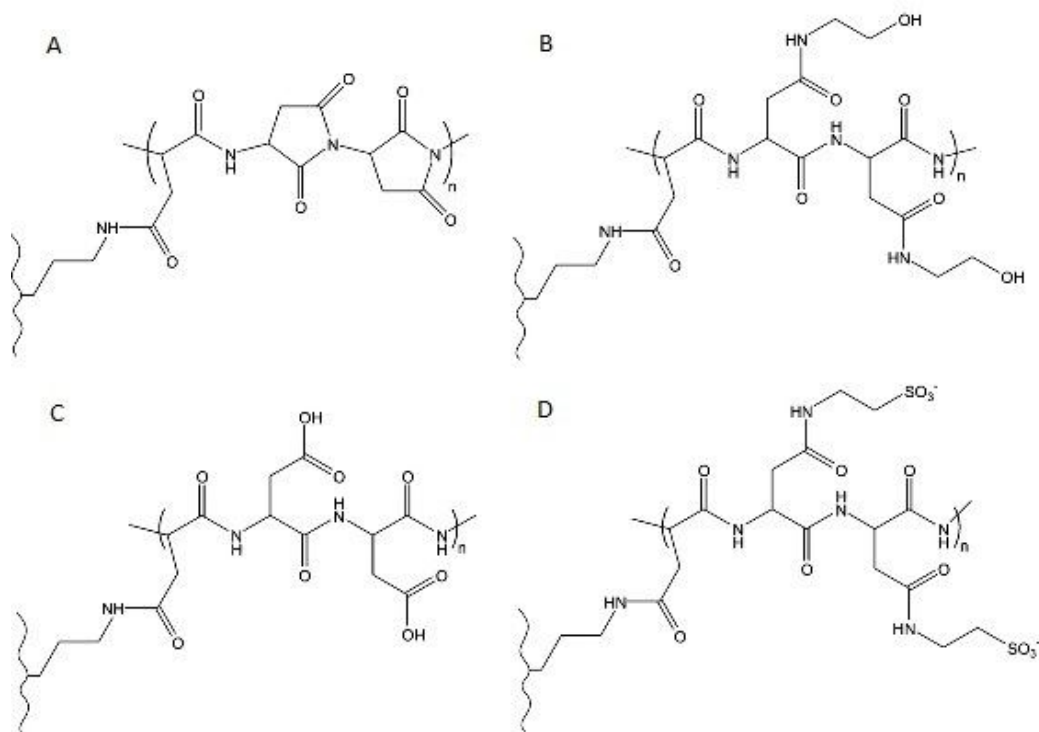
Zajímavou strukturou použitou k modifikaci HILIC SP je cyklodextrin (CD). Jedná se o cyklické oligosacharidy obsahující 6, 7, nebo 8 jednotek D-glukózy (Obrázek 7). Tyto jednotky vykazují schopnost rozlišovat různá chirální uspořádání, a proto jsou přidávány jako tzv. chirální rozlišovače do mobilní fáze nebo jsou navázané na SP a použité při chirální chromatografické separaci. Využívají se zejména k separaci cukerných alkoholů či sacharidů obsahujících 1-8 monosacharidových jednotek. Se zvyšujícím se počtem jednotek se retenční schopnosti zvyšují, což je dáno interakcemi analytu s hydrofilní vodnou vrstvou na povrchu CD [19].



Obrázek 7: Struktura  $\beta$ -cyklodextrin- silikagelu. Převzato a upraveno z [15].

### 3.1.7. Stacionární fáze na bázi poly(sukcinimid)u a od něj odvozené stacionární fáze PolyGlycoplex

Další modifikací aminopropylové silikagelové SP byla připravena poly(sukcinimid) SP a z její struktury pak byla odvozena celá série nových SP známých pod obchodním názvem PolyGlycoplex (Obrázek 8). Poly Hydroxyethyl A je vhodný pro separaci aminokyselin, proteinů, glykoproteidů, karbohydrátů, oligosacharidů a malých polárních analytů. Poly Sulfoethyl A vykazuje smíšený HILIC mechanismus retence a zároveň velký podíl iontově výměnných interakcí, díky nimž může být použit pro analýzu hydrofilních peptidů [2][15].



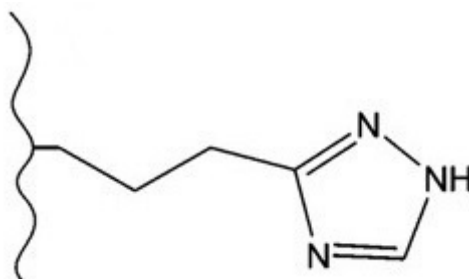
Obrázek 8: Struktura stacionárních fází na bázi poly(sukcinimid)-silikagelu. (A) Poly(sukcinimid)silikagel – PolyGlycoplex A. (B) Poly(2-hydroxyethyl)aspartamid silikagel – Poly Hydroxyethyl A. (C) Poly(asparagová kyselina)silikagel – Poly CAT A. (D) Poly(2-sulfoethyl)aspartamid silikagel – Poly Sulfoethyl A. Převzato a upraveno z [15].

### 3.1.8. Ostatní typy chemicky vázaných stacionárních fází

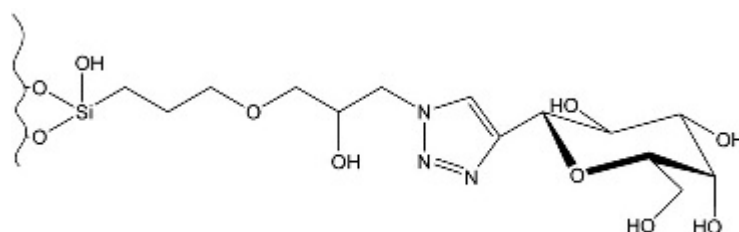
Z ostatních SP na bázi modifikovaného silikagelu stojí za zmínku fluorovaný silikagel. Takováto SP je určena k separaci aromatických aminů a halogenovaných aromatických analytů. SP s navázanou triazolovou skupinou (Obrázek 9) se používají



k analýze vitamínů rozpustných ve vodě, aminokyselin a bílkovin [12]. Dalším typem SP je silikagel obsahující na svém povrchu přes triazolový cyklus kovalentně vázaný cukr (Obrázek 10). Takto modifikovaný silikagelu se používá k separaci vysoce polárních aminokyselin a flavonoidů [15].



Obrázek 9: Struktura triazol- silikagelu. Převzato a upraveno z [15].



Obrázek 10: Struktura galaktoza- silikagelu. Převzato a upraveno z [15].

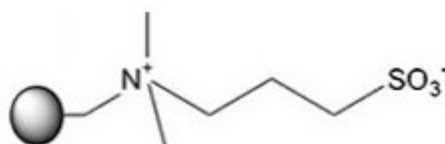
### 3.1.9. Stacionární fáze na bázi polymeru

Již velmi dávno jsou známé separační vlastnosti částečně organických polymerních materiálů jako je tomu například u styrendivinylbenzenové pryskyřice, která slouží jako iontoměnič. Jejich separační účinnost v HILIC módu je však poměrně malá, a proto se využívají jen v případech, kdy silikagelové materiály nejsou stabilní (např. při separaci vysoce bazických, nebo naopak kyselých analytů) [2][15].

### 3.1.10. Zwitteriontové (sulfoalkylbetainové) stacionární fáze

Po roce 1980 se na trhu objevují zwitteriontové (sulfoalkylbetainové) SP označované jako ZIC-HILIC. Na povrchu pórů silikagelu nebo polymerního nosiče je obsažena aktivní vrstva obsahující zbytky jak silně kyselých sulfonových kyselin, tak i silně bazické kvartérní amoniové soli, oddělené krátkým alkylovým řetězcem (Obrázek 11). Díky této struktuře dochází ke vzniku pouze slabých elektrostatických interakcí, jelikož

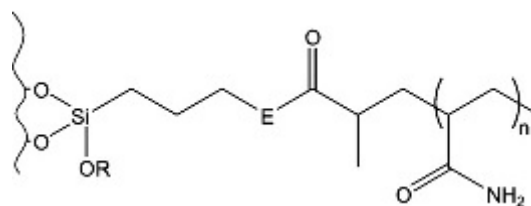
elektrické síly každého náboje jsou částečně vyvážené blízkostí opačně nabitého iontu [20]. Vzhledem ke struktuře SP je možné analyzovat látky obsahující kladně i záporně nabitě skupiny současně. Sulfoalkylbetainové skupiny na povrchu fáze velmi silně váží vodu, takže i přes silné elektrostatické interakce převažuje tvorba vodíkových vazeb a vazeb dipól-dipól. Kolony ZIC-HILIC jsou využívány při separaci malých polárních analytů, aminoglykosidů a peptidů. V dnešní době jsou ZIC-HILIC kolony v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) užívány k separaci stovek glykopeptidů. Polymerizací 2-methakryloyloxyethyl fosforylcholinu a jeho vazbou na silikagel vznikly fosforylcholin zwitteriontové SP označované jako ZIC-cHILIC. Ty se od ZIC-HILIC neliší jen původem, ale zejména selektivitou [2][15].



Obrázek 11: Zwitteriontová stacionární fáze (ZIC-HILIC).  
Převzato a upraveno z [16].

### 3.1.11. Monolitické stacionární fáze

Dalším typem HILIC SP jsou monolitické SP původně využívané v RP LC. Jedná se o SP tvořené jedním kusem spojitého porézního materiálu, což umožňuje rychlejší separaci za použití mírného tlaku. Rozlišují se dva typy takových fází. Za první se jedná o materiál odvozený od silikagelu, který vytváří celistvou strukturu. Obsahuje makropóry o velikosti 2  $\mu\text{m}$  a navíc mezopóry o velikosti 2-50 nm. Při analýze je využíváno kombinace vysoké permeability makropórů s retenčními vlastnostmi mezopórů. Takovéto kolony jsou využívány v HILIC módu k separaci malých organických iontů a léčiv jako je např. warfarin. Modifikace monolitických kolon byla umožněna zavedením polymerních struktur. Například monolitický silikagel prodloužený polyakrylamidem (Obrázek 12) vykazuje vyšší stabilitu a vyšší retenční schopnosti a je využíván při separaci nukleových bází [17].

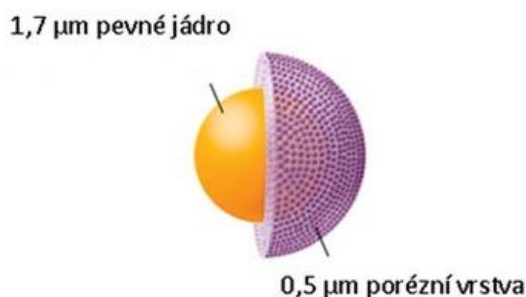


Obrázek 12: Silikagel pokrytý polyakrylamidem. Převzato a upraveno z [15].

Druhou variantou monolitických SP jsou organické polymerní struktury. Ty obsahují makropóry, ale jen velmi malé množství mezopórů. Tím pádem dochází v mnohem menší míře k difúzi a převládá přesun hmoty prouděním. Organické monolitické kolony jsou vhodné pro rychlou separaci velkých molekul, především proteinů, ale nemají dostatečnou efektivitu při separaci malých molekul [15].

### 3.1.12. Stacionární fáze s částicemi s pevným jádrem

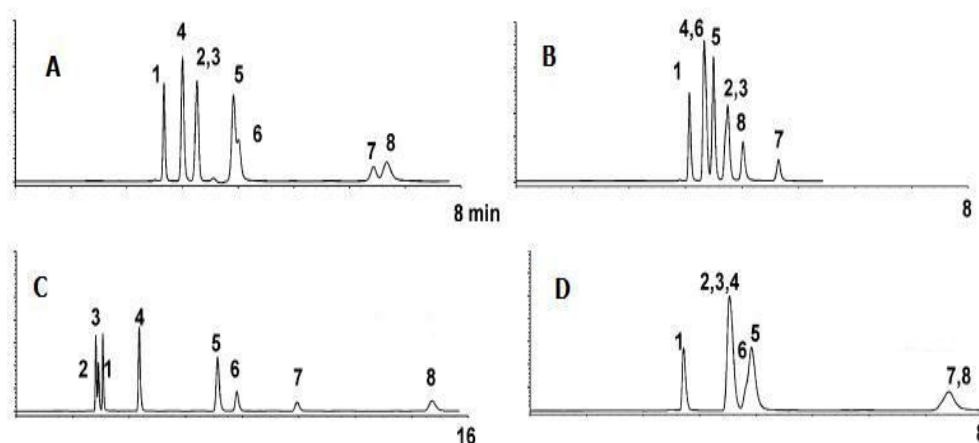
Jakýsi kompromis mezi částicovou a monolitickou SP tvoří fáze s částicemi s pevným jádrem. Tyto SP dosahují účinnosti plně porézních částic velikosti 3  $\mu\text{m}$  za použití tlaku odpovídajícímu analýze částic o velikosti 5  $\mu\text{m}$ . Nejčastěji používané částice o velikosti 2,7  $\mu\text{m}$  jsou tvořené vnitřním jádrem o průměru 1,7  $\mu\text{m}$  a porézním silikagelovým obalem o tloušťce 0,5  $\mu\text{m}$  (Obrázek 13). Vlivem většího celkového průměru částice nekladou tak vysoký odpor, nicméně separační vlastnosti zůstávají vlivem struktury částice zachovány. K difúzi jednotlivých látek dochází v porézní vrstvě částice, tudíž analyzovaná látka nemusí prostupovat celou částicí, což vede k výraznému zkrácení dráhy a tím k urychlení analýzy. Dnes je tento typ kolon hojně využíván jako alternativa UHPLC separace a spektrum uplatnění se bude zcela jistě nadále rozšiřovat v závislosti na vývoji nových typů kolon. V současné době je již dostupná i kolona s částicemi o celkové velikosti 1,7  $\mu\text{m}$  [21].



Obrázek 13: Struktura částice s pevným jádrem. Převzato a upraveno z [21].

## Výběr vhodné stacionární fáze

Výběr vhodné stacionární fáze je závislý zejména na typu analyzovaných látek. Nejčastěji používanou HILIC SP je nemodifikovaný silikagel, který je zlatým standardem pro analýzu polárních látek. Zároveň je nejběžněji komerčně dostupnou SP existující v mnoha provedeních (kolony s částicemi s pevným jádrem o velikosti 2,7  $\mu\text{m}$  a 1,7  $\mu\text{m}$ , UHPLC kolony či hybridní HILIC kolony) a také je dostupná od mnoha různých výrobců. Nicméně pro bazické analyty je vhodnější silikagel modifikovaný amidovou nebo zwitteriontovou skupinou. Oproti tomu pro kyselé látky lze použít silikagel modifikovaný amino skupinou, i když je analýza obtížná, protože hrozí vznik kovalentních vazeb mezi molekulami SP a analytem nebo naopak destrukce SP. Z toho vyplývá, že volba správné SP je jedním z nejdůležitějších faktorů při vývoji HILIC chromatografické separace [9]. Rozdílná selektivita HILIC stacionárních fází je uvedena na Obrázku 14.



Obrázek 14: Separace analytů za použití čtyř rozdílných stacionárních fází. (A) zwitteriontová SP, (B) diol SP, (C) silikagel, (D) amido SP. Mobilní fáze: 85:15 ACN:amonium fosfát (5 mmol/L, pH 3.0). Vzorky: (1) fenol, (2) kyselina naftalensulfonová, (3) kyselina p-xylensulfonová, (4) kofein, (5) nortriptylin, (6) difenylhydramin, (7) benzylamin, (8) prokainamid. Převzato a upraveno z [22].

### 3.2. Mobilní fáze

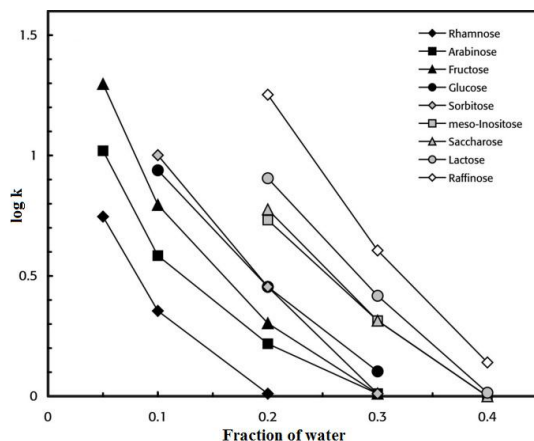
Velmi důležitým faktorem pro úspěšnou analýzu je výběr vhodné mobilní fáze včetně pH a také koncentrace pufru. HILIC mobilní fáze typicky obsahuje s vodou mísitelné polární organické rozpouštědlo a menší množství vodné fáze. Nicméně

ne každé organické rozpouštědlo je pro HILIC separaci vhodné. Pro volbu optimální mobilní fáze je užitečná tzv. eluotropická řada. Eluční síla organických rozpouštědel se zvyšuje s rostoucí polaritou rozpouštědla [16]:

**ACETONITRIL > ETHANOL > DIOXAN > METHANOL > VODA**

V HILIC módu je nejpoužívanějším organickým rozpouštědlem acetonitril, který díky své chemické struktuře nevytváří vodíkové vazby a tudíž nedochází ke konkurenci rozpouštědla a vody na úrovni SP jako je tomu například u methanolu a ostatních alkoholů, které jsou v HILIC módu používány velmi vzácně. Několik studií se zaměřilo na náhradu ACN za látky s menší toxicitou (např. aceton), ovšem ani to nebylo příliš úspěšné s výjimkou několika málo případů, kde byl ACN nahrazen tetrahydrofuranem [2][15][23].

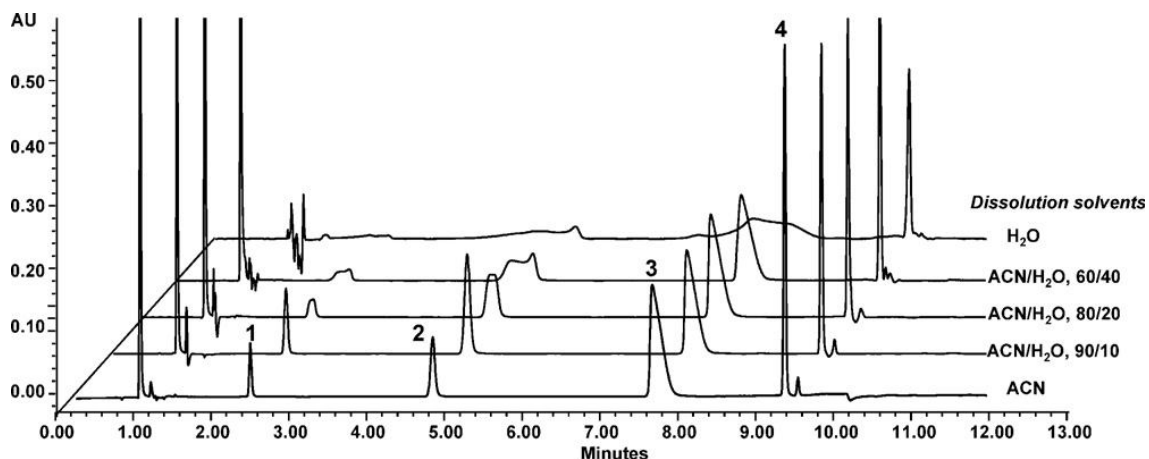
Největší vliv na retenci analytů má procentuální zastoupení vody v mobilní fázi, které se pro HILIC mód obvykle pohybuje v rozmezí 5-30%. Snížení obsahu vody pod 5% se používá pro zvýšení retence látek s nízkou retencí. Pro vytvoření vodné vrstvy poskytující prostředí pro HILIC mechanismus je nezbytné zastoupení vody alespoň 2%. Na druhou stranu, větší množství vodné složky může dramaticky snížit retenci hydrofilních analytů a způsobit tak eluci v mrtvém objemu kolony [8]. Závislost poměru vody v mobilní fázi na retenčním faktoru je znázorněna na Obrázku 15. U některých typů SP se při nízkém zastoupení ACN v mobilní fázi mění mechanismus retence na mechanismus odpovídající RP LC, tj. retence stoupá s rostoucím podílem vody v mobilní fázi. Takové kolony vykazují smíšený RP/HILIC mechanismus. Příkladem takového jevu je separace kyselých látek na koloně Luna NH<sub>2</sub>, které jsou silně zadržovány v obou, tedy RP i HILIC módu [4].



Obrázek 15: Závislost obsahu vody v mobilní fázi na retenčním faktoru  $k'$  pro vybranou skupinu karbohydrátů. Obrázek převzat ze zdroje [18].

Vliv pH mobilní fáze závisí především na povaze analyzovaných látek a typu HILIC SP. K ovlivnění retence jsou často využívány pufrů, nejčastěji octan a mravenčan amonný. Přidáním pufru do mobilní fáze dochází k redukci elektrostatických sil mezi analyzovanou látkou a SP a to jak přitažlivých, tak odpudivých. Platí, že se zvyšující se koncentrací pufru se snižuje retence analyzovaných látek s opačným nábojem než má SP a to vlivem redukce přitažlivých sil. Naopak retence látek se stejným nábojem vzhledem ke SP je vyšší [1][9].

V neposlední řadě je významná také volba rozpouštědla při přípravě vzorku. Obecně ve všech LC aplikacích by mělo být použito rozpouštědlo stejné nebo vlastnostmi velmi blízké složení mobilní fáze [11]. V porovnání s ostatními typy separací je v HILIC výběr rozpouštědla vzorku pro tvar píku a separační účinnost kritický (Obrázek 16). Například při 95% zastoupení ACN v mobilní fázi by množství ACN v rozpouštědle vzorku nemělo klesnout pod 90% [24].



Obrázek 16: Vliv zastoupení vody v rozpouštědle vzorku na tvar píku. Kolona Acquity BEH HILIC. (1) hypoxantin, (2) cytosin, (3) kyselina nikotinová, (4) prokainamid.

Obrázek převzat ze zdroje [24].

HILIC mód, stejně jako RP, může probíhat za izokratické nebo gradientové eluce. Nicméně na rozdíl od RP je izokratická eluce s vysokým obsahem ACN v mobilní fázi častěji využívána. Gradientová eluce se aplikuje s počáteční vysokou koncentrací ACN, obvykle 95%, a postupně se zvyšuje zastoupení vody v mobilní fázi. Průběh gradientové eluce umožňuje eluci silně zadržovaných látek [8][15].

### 3.3. Výhody metody HILIC

HILIC představuje vhodnou alternativu pro kapalinovou chromatografii na normálních fázích a odstraňuje nevýhody spojené s její aplikací, jako je například užívání toxických organických rozpouštědel, špatná rozpustnost polárních analytů v nepolárních mobilních fázích a špatná reprodukovatelnost analýzy [9].

Mobilní fáze s vysokým obsahem organického rozpouštědla typická pro HILIC má nižší povrchové napětí, čímž zvyšuje intenzitu signálu a citlivost detekce při spojení s ionizací elektrosprejem (ESI) a následnou detekci MS. Navíc je HILIC mód vhodný i pro analýzu bazických látek, které ve srovnání s RP vykazují lepší tvary píků. Vlivem vysokému podílu organické složky v mobilní fázi je také generován nižší zpětný tlak na koloně, a proto je možné použití vyšších průtoků mobilní fáze a získání vyšší separační účinnosti. [5][9]. Složení HILIC mobilní fáze je také velmi často plně

kompatibilní s elučním činidlem použitým při extrakci na tuhou fázi (SPE) a tudíž je možné vynechat krok odpaření a znovu rozpuštění před LC separací [25].

Vzhledem k selektivitě je HILIC SP také vhodnou druhou dimenzí ve spojení s RP SP v 2D chromatografii. Použití 2D chromatografie významně zvyšuje píkovou kapacitu a separační účinnost chromatografického systému [15].

### 3.4. Vyhodnocení výsledků

#### Retenční faktor

Jednou ze základních veličin chromatografického systému je retenční faktor  $k'$ . Kvalitní separace je zajištěna, je-li  $k' > 1$ .

$$k' = (t_{R,i} - t_M) / t_M$$

$t_{R,i}$  - retenční čas analytu  $i$ ;  $t_M$  - mrtvý čas systému (časový interval od začátku nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální koncentrace složky, která není stacionární fází zadržována).

#### Vyhodnocení retence v závislosti na různém složení mobilní fáze

Z experimentálně naměřených hodnot se sestrojí křivky vyjadřující funkci  $k' = f(\%W)$ , kdy  $\%W$  vyjadřuje objemový podíl ACN v mobilní fázi, nebo  $k' = f(c)$ , kde  $c$  je koncentrace pufru, čímž se usnadní jejich vyhodnocení.

#### Vyhodnocení selektivity

Rozdíl v selektivitě se vyjadřuje jako závislost retenčního faktoru dané sloučeniny při dvou různých podmínkách. Za použití lineární regrese se získá korelační koeficient  $r$ . Rozdíl selektivity dané látky při dvou různých podmínkách se pak vypočítá podle vztahu:

$$s^2 = 1 - r^2$$

Pokud je  $s^2$  rovno nule, znamená to, že za dvou testovaných podmínek nedochází ke změně selektivity. Naopak je-li tato hodnota rovna 1, selektivita je zcela odlišná. Selektivitu můžeme porovnávat buď pro dvě různé stacionární fáze, nebo jednu kolonu při použití dvou různých typů mobilní fáze.



### 3.5. Použité analyty

**Atenolol a metoprolol** jsou látky ze skupiny  $\beta$ -sympatolytik, jinak označované jako kardioselektivní betablokátory, používané nejčastěji k léčbě arteriální hypertenze, všech forem ischemické choroby srdeční a srdečních arytmií [26][27].

**Pindolol** je zástupce se skupiny neselektivních  $\beta$ -blokátorů s částečnou sympatomimetickou aktivitou (ISA), díky níž nedochází k tak výraznému snížení tlaku krve. Pindolol také působí antiarytmicky. [26][27].

**Acebutolol** je  $\beta$ -blokátor používaný terapii arteriální hypertenze a srdečních arytmií [27].

**Propranolol** - další zástupce neselektivních  $\beta$ -sympatolytik, který se díky svým účinkům používá v terapii arteriální hypertenze, ale také jako mírné anxiolytikum [27].

**Cytosin** je heterocyklická pyrimidinová nukleová báze. Nukleotidy, v nichž je obsažen, jsou důležitým kofaktorem při fosforylačních reakcích [28].

**Uracil** – heterocyklická sloučenina odvozená od pyrimidinu. Derivát uracilu fluorouracil se používá jako cytostatikum v terapii celé řady maligních tumorů [26][29].

**Adenin** – heterocyklická purinová dusíkatá báze. Je součástí DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina) [28].

**Guanin** je heterocyklická purinová dusíkatá báze. Je součástí DNA i RNA a jako součást guanosintrifosfátu je alternativou ATP (adenosintrifosfát) v některých biochemických dějích. Je používán jako přídatek do šampónů, laků na nehty a podobně [26].

**Adenosin** je nukleosid skládající se z nukleové báze adeninu a cukerné složky ribózy. Je přítomen ve všech lidských buňkách a ovlivňuje celou řadu fyziologických procesů. Funguje jako neuromodulátor a regulátor homeostázy. Používán je jako antiarytmikum [26][30].

**Guanosin** – nukleosid složený z nukleové báze guaninu a cukerné složky ribózy spojených vzájemně glykosidickou vazbou. Z jeho struktury je odvozeno antivirotikum acyklovir [29].

**Cytidin** je nukleosid tvořený pyrimidinovou nukleovou bází cytosinem a ribózou. Je základní složkou nukleových kyselin a z jeho molekuly je odvozeno cytostatikum cytarabin [27].

**Uridin** – nukleosid tvořený uracilem a ribózou vzájemně spojených glykosidickou vazbou. Tvoří důležitý stavební kámen nukleových kyselin [28].

**Thymin** – heterocyklická pyrimidinová sloučenina, která je základní stavební složkou nukleových kyselin [29].

**Pyridoxin** (vitamín B<sub>6</sub>) je označení pro tři pyridinové deriváty – pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Aktivní formu pak tvoří pyridoxal-5-fosfát, který je důležitým kofaktorem enzymů [27].

**Kreatinin** vzniká ve svalech z dusíkaté organické kyseliny kreatinu. Koncentrace kreatininu v krvi vypovídá o funkci ledvin a vyšetření jeho clearance se používá pro stanovení správné funkce glomerulární filtrace [26].

**Tyrosol** je obsažen v olivovém oleji. Zároveň je silným oxidantem [26].

**Nikotinamid** je amid kyseliny nikotinové, která je součástí řady enzymů a ve vysokých dávkách je používána k rozšiřování cév a snižování hladiny cholesterolu v krvi. Je považován za nejstarší hypolipidemikum [26][27].

**Kofein** – methylxantin obsažený v čaji a kávě. Má stimulační účinky na CNS (centrální nervový systém). Ve farmacii je přidáván do vícesložkových léčivých přípravků pro léčbu bolesti a migrény [27].

**Paracetamol** je aktivním metabolitem fenacetinu. Používá se jako bezpečné analgetikum a antipyretikum [27].

**Theophyllin** je methylxantinový derivát obsažený v čaji a kávě. Stimuluje CNS a díky svým bronchodilatačním účinkům je používán v terapii astma bronchiale [27].

**Thiamin** je ve vodě rozpustný vitamín označovaný také jako B<sub>1</sub>. Zdrojem tohoto vitamínu jsou především obiloviny, maso, pivovarské kvasnice, med a ořechy. Thiamin příznivě ovlivňuje nervový systém a působí proti únavě [28].

**Kyselina p-anisová** je přirozenou součástí anýzu a má antiseptické účinky. Je častým meziproduktem při přípravě složitějších organických molekul [26].

**Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina gentisová** jsou po chemické stránce blízké kyselině salicylové. Ve farmacii je používána především sodná sůl kyseliny gentisové pro své analgetické, antipyretické a také antirevmatické účinky [26].

**Kyselina p-hydroxybenzoová** je izomerem kyseliny salicylové. Její estery označované jako parabeny (methylparaben, ethylparaben apod.) jsou využívány v potravinářství a farmacii jako protiplísňové konzervanty [26][30].

**Kyselina salicylová** je výchozí látkou kyseliny acetylsalicylové. Využívá se v kožním lékařství pro své keratoplastické a keratolytické vlastnosti [30].

**Kyselina gallová** s glukózou vytváří ester tanin. Ten se díky svým vlastnostem využívá v lokální adstringenční terapii [26].

**Kyselina vanilová** je fenolická kyselina obsažená v hroznech. Je meziproduktem v procesu syntézy vanilinu z kyseliny ferulové [26].

**Kyselina kávová** je organická sloučenina obsahující fenolickou a akrylovou funkční skupinu, řadí se mezi tzv. hydroxyskořicové kyseliny. Nachází se ve všech rostlinách, tvoří hlavní složku v biosyntéze ligninu, který je jedním z nejdůležitějších zdrojů biomasy [31][32].

**Kyselina ferulová** je tzv. hydroxyskořicovou kyselinou. Esterovou vazbou je vázána k hemicelulose jako součást potravinové vlákniny [26][32].

**Kyselina sinapová** je dalším zástupcem hydroxyskořicových kyselin. Ester cholinu a kyseliny sinapové je alkaloid sinapin obsažený v hořčičných semenech [32].

**Kyselina syringová** je jednoduchou fenolickou kyselinou. Je součástí oleje palmy Acai a také obsažena v hroznech [32].

**Kyselina askorbová** (vitamín C) je důležitým antioxidantem, kofaktorem, podílí se na syntéze kolagenu a karnitinu. Hraje důležitou roli při růstu kostí, zubů, vazů, cév. Podílí se na funkci imunitního systému a hojení ran [27].

**Kyselina šikimová** tvoří meziprodukt biosyntézy aromatických látek, především aminokyselin tyrosinu a fenylalaninu [26].

Fyzikálně chemické vlastnosti analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 1.

<b>Analyt</b>	<b>Chemický název</b>	<b>log P</b>	<b>pKa1</b> (kys)	<b>pKa2</b> (baz)	<b>M<sub>r</sub></b> [g.mol <sup>-1</sup> ]
<b>Atenolol</b>	2-{4-(2RS)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxyfenyl}acetamid	0,335	13,88	9,43	266,34
<b>Metoprolol</b>	(RS)-1-(isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]propan-2-ol	1,632	13,89	9,43	267,36
<b>Pindolol</b>	(RS)-1-(1H-indol-4-yloxy)-3-(isopropylamino)propan-2-ol	1,680	13,94	3,77	248,32
<b>Acebutolol</b>	(RS)-N-{3-acetyl-4-[2-hydroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]fenyl}butanamid	1,769	13,78	9,40	336,43
<b>Propranolol</b>	(RS)-1-(1-methylethylamino)-3-(1-nafthoxy)propan-2-ol	2,900	13,84	9,50	259,34
<b>Cytosin</b>	4-aminopyrimidin-2(1H)-on	-1,962	9,00	4,18	111,10
<b>Uracil</b>	pyrimidin-2,4,(1H,3H)-dion	-1,037	8,95	-4,19	112,09
<b>Adenin</b>	9H-Purin-6-amin	-1,581	9,36	-	244,20
<b>Guanin</b>	2-amino-1H-purin-6(9H)-on	-0,960	9,63	3,40	150,13
<b>Adenosin</b>	9-(β-D-ribofuranosyl)-9H-purin-6-ylamin	-0,775	13,11	3,82	267,24
<b>Guanosin</b>	2-amino-9-[3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-3H-purin-6-on	-1,466	13,24	3,12	283,24
<b>Cytidin</b>	4-amino-1-[3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]pyrimidin-2-on	-1,808	13,48	4,26	243,22
<b>Uridin</b>	1-[(3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]pyrimidine-2,4-dion	-1,581	9,39	-	244,20

*Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti použitých analytů.*

Analyt	Chemický název	log P	pKa1 (kys)	pKa2 (baz)	M <sub>r</sub> [g.mol <sup>-1</sup> ]
Thymin	5-methylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	-0,621	9,24	-4,15	126,11
Pyridoxin	2-methyl-3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)pyridin	-0,831	9,63	5,01	169,2
Kreatinin	2-amino-1,5-dihydro-1-methyl-4H-imidazol-4-on, 2-amino-1-methyl-4-imidazolidinon	-0,802	-	6,89	113,12
Tyrosol	4-(2-hydroxyethyl)fenol	0,851	10,17	-	138,16
Nikotinamid	Pyridin-3-karboxamid	-0,368	14,83	3,54	122,13
Kofein	1,3,7-trimethylxanthin	-0,628	-	0,52	194,19
Paracetamol	N-acetyl-p-aminofenol	0,475	9,86	1,72	151,16
Theophylin	1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dion	-0,276	8,60	1,64	180,16
Thiamin	3-[4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-5-(2-hydroxy-ethyl)-4-methylthiazoliniumchlorid	-	-	-	-
Kyselina p-anisová	4-methoxybenzoová kyselina	1,776	4,47	-	152,15
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	3,5-dihydroxybenzoová kyselina	0,808	3,96	-	154,12
Kyselina p-hydroxybenzoová	4-hydroxybenzoová kyselina	1,401	4,57	-	138,12
Kyselina gentisová	2,5-dihydroxybenzoová kyselina	1,396	3,01	-	154,12
Kyselina salicylová	2-hydroxybenzoová kyselina	2,011	3,01	-	138,12
Kyselina gallová	3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina	0,531	4,33	-	170,12
Kyselina vanilová	4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina	1,304	4,45	-	168,14
Kyselina ferulová	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-anová kyselina	0,963	4,58	-	194,18

Tabulka 1 (pokračování): Fyzikálně chemické vlastnosti použitých analytů.

<b>Analyt</b>	<b>Chemický název</b>	<b>log P</b>	<b>pKa1 (kys)</b>	<b>pKa2 (baz)</b>	<b>M<sub>r</sub> [g.mol<sup>-1</sup>]</b>
<b>Kyselina kávová</b>	3,4-dihydroxyskořicová kyselina	0,663	4,58	-	180,16
<b>Kyselina sinapová</b>	3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-anová kyselina	0,997	4,53	-	224,21
<b>Kyselina syringová</b>	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová kyselina	1,283	4,33	-	198,17
<b>Kyselina askorbová</b>	(5R)-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2-(5H)-on	-2,410	4,37	-	176,13
<b>Kyselina šikimová</b>	trihydroxycyklohexenkarboxylová kyselina	-2,220	4,48	-	174,15

*Tabulka 1 (pokračování): Fyzikálně chemické vlastnosti použitých analytů.*

## 4. Experimentální část

### 4.1. Přístrojové vybavení

- UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) složený z:
  - UltiMate 3000 RS Pump
  - UltiMate 3000 RS Autosampler
  - UltiMate 3000 RS Diode Array Detektor
  - UltiMate 3000 RS Column Compartment
- ACQUITY Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, USA) složený z:
  - ACQ-binary solvent manager
  - ACQ-sample manager
  - ACQ-column manager
  - ACQ-PDA detektor
- Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Sartorius, Německo
- Vakuová pumpa a filtrační zařízení Millipore, Millipore Corp., USA
- Automatické pipety se špičkami Biohit, Fischer Scientific, ČR
- Laboratorní pH metr Hanna, Fischer Scientific, ČR

### 4.2. Testované analytické kolony

Specifikace testovaných HILIC kolon je uvedena v Tabulce 2.

Název	Výrobce	Typ fáze	Navázaná skupina	Rozměry (mm)	Velikost částic (μm)	Velikost pórů (Å)
Atlantis Silica HILIC	Waters	Silikagel	-	2,1 x 100	3	100
Luna NH <sub>2</sub>	Phenomenex	Silikagel	Aminopropyl-	2,0 x 100	3	100

*Tabulka 2: Specifikace testovaných HILIC kolon.*

### 4.3. Použité chemikálie

#### Standardy:

acebutolol (>98%), adenin (>99%), adenosin (>99%), askorbová kyselina (>99%), atenolol (>98%), cytidin (>99%), cytosin (>99%), dihydroxybenzoová kyselina (>99%), ferulová kyselina (>99%), gallová kyselina (>98%), gentisová kyselina (>98%), guanin (>99%), guanosin (>99%), kávová kyselina (>98%), kofein (>98%), kreatinin (>98%), metoprolol (>98%), nikotinamid (>98%), p-anisová kyselina (>99%), p-OH-benzoová kyselina (>99%), paracetamol (>97%), pindolol (>98%), propranolol (>99%), pyridoxin (>98%), salicylová kyselina (>99%), sinapová kyselina (>98%), syringová kyselina (>95%), šikimová kyselina (>99%), theophyllin (>97%), thiamin (>99%), thymin (>99%), tyrosol (>98%), vanilová kyselina (>97%), uracil (>99%), uridin (>99%).

Všechny standardy – Sigma-Aldrich, ČR.

#### Chemikálie:

- Acetonitril (HPLC gradient grade), Sigma-Aldrich, ČR
- Hydroxid amonný (>25%), Sigma-Aldrich, ČR
- Kyselina octová (>99%), Sigma-Aldrich, ČR
- Octan amonný (>98%), Sigma-Aldrich, ČR
- Ultračistá voda z Millipore MilliOrg, Millipore Corp., USA

### 4.4. Příprava zásobních roztoků

Většina zásobních roztoků byla připravena v koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním 5 mg standardu v 5 ml acetonitrilu. Výjimkou jsou pindolol, acebutolol, propranolol, kreatinin, thiamin, askorbová kyselina, šikimová kyselina, adenin, guanosin, cytosin, cytidin, uridin, uracil, thymin a adenosin, které byly rozpouštěny ve směsi acetonitrilu a vody (50:50); a pyridoxin, který byl rozpouštěn ve vodě. Zásobní roztok guaninu byl připraven v koncentraci 100 µg/ml a to rozpuštěním 0,5 mg standardu ve směsi 5 ml vody a 100 µl hydroxidu amonného (50:1).



#### 4.5. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky byly připravovány v den potřeby postupným ředěním zásobních roztoků. Koncentrace většiny pracovních roztoků použitých k měření byla 10 µg/ml s výjimkou atenololu, metoprololu, pyridoxinu, kreatininu a kyseliny askorbové, které byly použity v koncentraci 100 µg/ml.

Složení ředícího činidla bylo zvoleno v závislosti na složení mobilní fáze s odchylkou maximálně 10% ACN. Jako ředící směsi byly použity roztoky ACN:voda v různém poměru - 10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10.

#### 4.6. Příprava mobilních fází

- 0,5 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován nepipetováním 25 ml 5 mM roztoku octanu amonného (AmAc) o pH = 4,8 do vody v 250 ml odměrné baňce a doplněn vodou po rysku. V případě potřeby bylo pH upraveno roztokem amoniaku nebo kyselinou octovou.
- 5 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 71,3 µl koncentrované kyseliny octové do přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, až bylo dosaženo pH = 4,8. Následně byl tento roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky o obsahu 250 ml a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 713 µl koncentrované kyseliny octové do přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, až bylo dosaženo pH = 4,8. Následně byl tento roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky o obsahu 250 ml a doplněn vodou po rysku.
- 200 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 2,852 ml koncentrované kyseliny octové do přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, až bylo dosaženo pH = 4,8. Následně byl tento roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky o obsahu 250 ml a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o pH = 3,8 byl připravován napipetováním 713 µl koncentrované kyseliny octové do přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, až bylo dosaženo

pH = 3,8. Následně byl tento roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky o obsahu 250 ml a doplněn vodou po rysku.

- 50 mM roztok octanu amonného o pH = 6,8 byl připravován rozpuštěním 0,1927 g čistého octanu amonného ve vodě a doplněn v 250 ml odměrné baňce vodou po rysku. V případě potřeby bylo pH upraveno roztokem amoniaku nebo kyselinou octovou.

#### 4.7. Vlastní měření

Všechna měření probíhala za stejných podmínek pro obě kolony. Byla použita izokratická eluce, teplota na koloně 30 °C, teplota v autosampleru 4 °C a nastříkovaný objem vzorku 2 µl. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a octanu amonného o různé koncentraci a pH se stabilním průtokem 0,4 ml.min<sup>-1</sup>. Detekce byla provedena pomocí PDA detektoru při vlnové délce 254 nm.

#### 4.8. Schéma experimentů

**Použité chromatografické HILIC kolony:**

- **Kolona Atlantis HILIC Silica** (3 µm, 2,1 mm x 100 mm, Waters)
- **Kolona Luna NH<sub>2</sub>** (3 µm, 2,0 mm x 100 mm, Phenomenex)

Bližší specifikace kolon viz Tabulka 2.

**Testované analyty:**

- acebutolol, adenin, adenosin, askorbová kyselina, atenolol, cytidin, cytosin, dihydroxybenzoová kyselina, ferulová kyselina, gallová kyselina, gentisová kyselina, guanin, guanosin, kávová kyselina, kofein, kreatinin, metoprolol, nikotinamid, p-anisová kyselina, p-OH-benzoová kyselina, paracetamol, pindolol, propranolol, pyridoxin, salicylová kyselina, sinapová kyselina, syringová kyselina, šikimová kyselina, theophyllin, thiamin, thymin, tyrosol, vanilová kyselina, uracil, uridin.

**Použité vodné složky mobilní fáze:**

- 50 mM AmAc pH = 3,8
- 0,5 mM AmAc pH = 4,8
- 5 mM AmAc pH = 4,8
- 50 mM AmAc pH = 4,8
- 200 mM AmAc pH = 4,8
- 50 mM AmAc pH = 6,8

## 5. Výsledky a diskuze

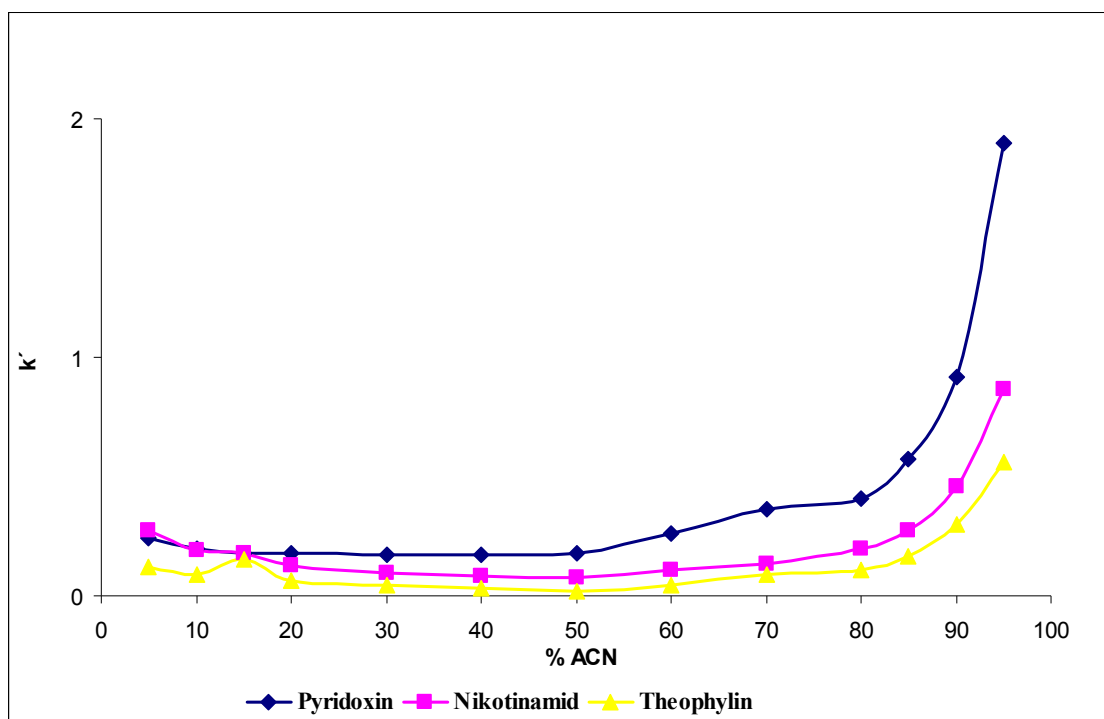
### 5.1. Vyhodnocení retence v závislosti na koncentraci ACN v mobilní fázi

Pro hodnocení retence byla využita jako mobilní fáze směs 50 mM AmAc a acetonitrilu, pH = 4,8. Z experimentálně naměřených hodnot byly sestrojeny lin-lin křivky závislosti  $k' = f(\%W)$ , kdy %W vyjadřuje objemový podíl ACN v mobilní fázi a  $k'$  retenční faktor. Pro tuto analýzu bylo vybráno deset analytů, zahrnujících zástupce neutrálních, bazických, kyselých látek a nukleových bází. Křivky byly sestrojeny zvlášť pro každou kolonu a skupinu látek.

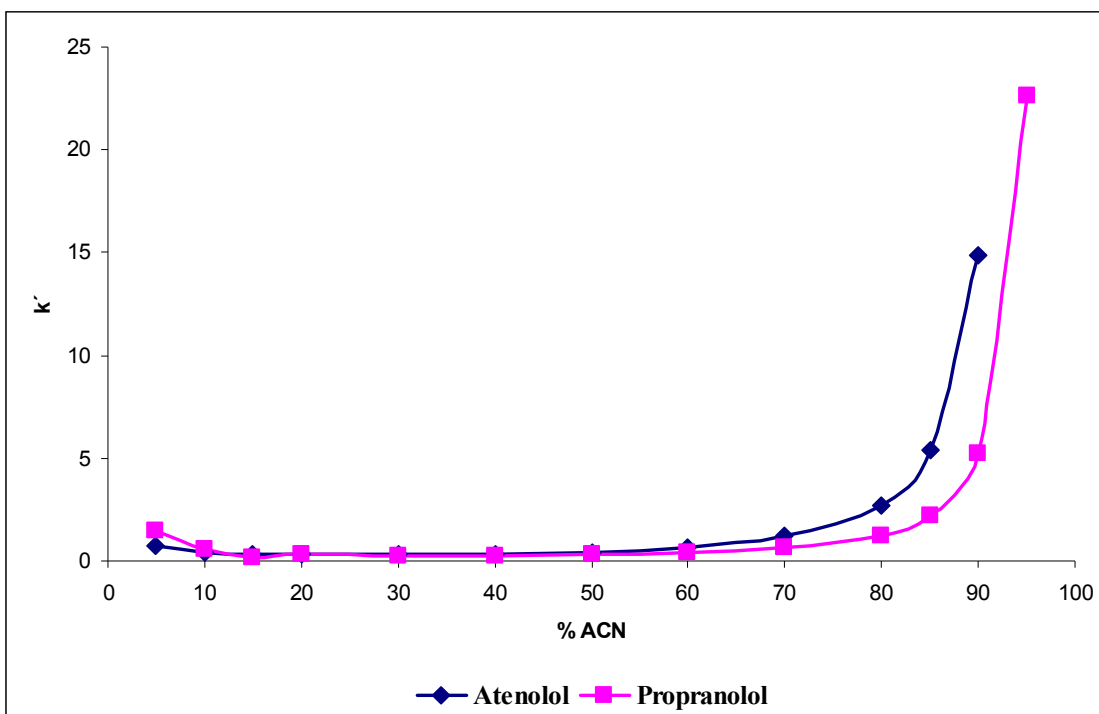
### 5.1.1. Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8)

Látka	5% ACN	10% ACN	15% ACN	20% ACN	30% ACN	40% ACN	50% ACN	60% ACN	70% ACN	80% ACN	85% ACN	90% ACN	95% ACN
Pyridoxin	0,244	0,197	0,178	0,178	0,172	0,174	0,176	0,261	0,362	0,408	0,576	0,917	1,899
Nikotinamid	0,277	0,192	0,177	0,127	0,098	0,080	0,074	0,106	0,136	0,198	0,276	0,460	0,864
Theophyllin	0,124	0,090	0,151	0,065	0,047	0,032	0,022	0,046	0,089	0,108	0,163	0,301	0,563
Atenolol	0,732	0,402	0,322	0,297	0,290	0,343	0,443	0,669	1,185	2,727	5,390	14,841	-
Propranolol	1,470	0,549	0,141	0,311	0,272	0,268	0,287	0,369	0,656	1,200	2,182	5,245	22,641
Cytosin	0,126	0,101	0,322	0,084	0,078	0,080	0,099	0,175	0,352	0,556	0,901	1,819	6,016
Adenin	0,212	0,168	0,089	0,127	0,113	0,095	0,106	0,163	0,308	0,429	0,650	1,191	3,316
Gentisová kys.	-0,089	-0,097	0,073	-0,109	-0,130	-0,153	-0,175	-0,197	-0,230	-0,218	-0,207	-0,156	0,109
Vanilová kys	-0,039	-0,049	-0,102	-0,055	-0,066	-0,075	-0,088	-0,068	-0,013	0,035	0,202	0,726	2,154
Šikimová kys	-0,074	-0,078	-0,053	-0,081	-0,093	-0,095	-0,083	-0,013	0,149	0,742	1,932	6,357	29,514

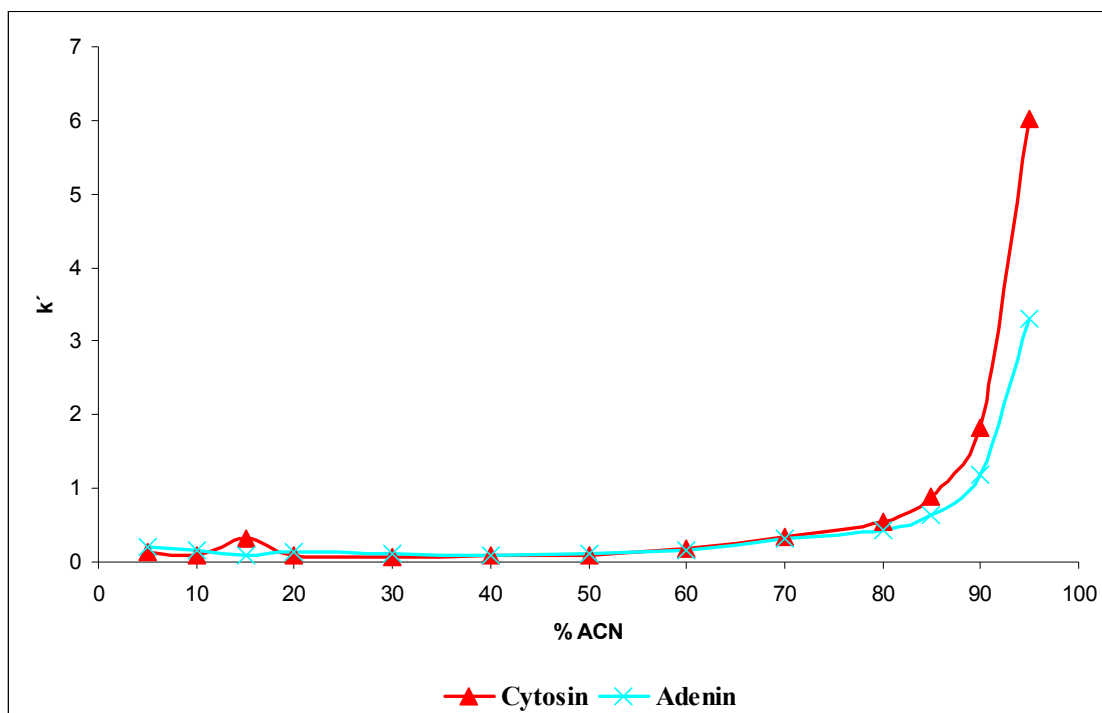
Tabulka 3: Hodnoty  $k'$  pro analyzované látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8).



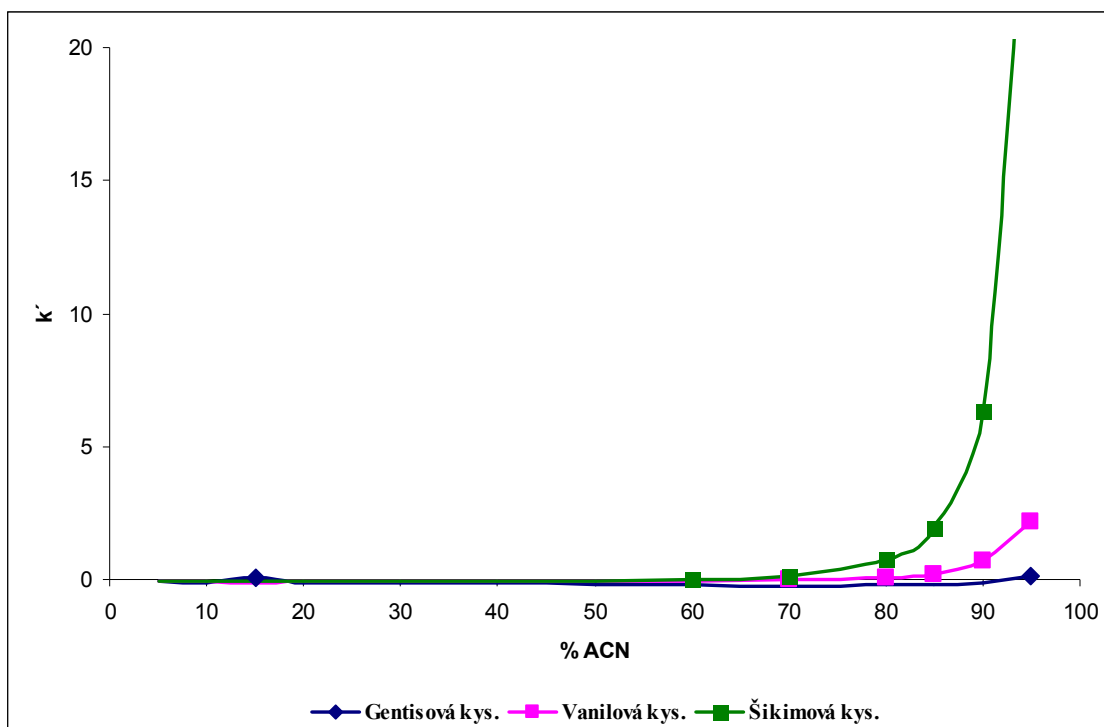
Graf 1: Závislost  $\ln$ - $\ln$  pro neutrální látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8).



Graf 2: Závislost  $k'$ - $k'$  pro bazické látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8).



Graf 3: Závislost  $k'$ - $k'$  pro nukleové baze. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8).



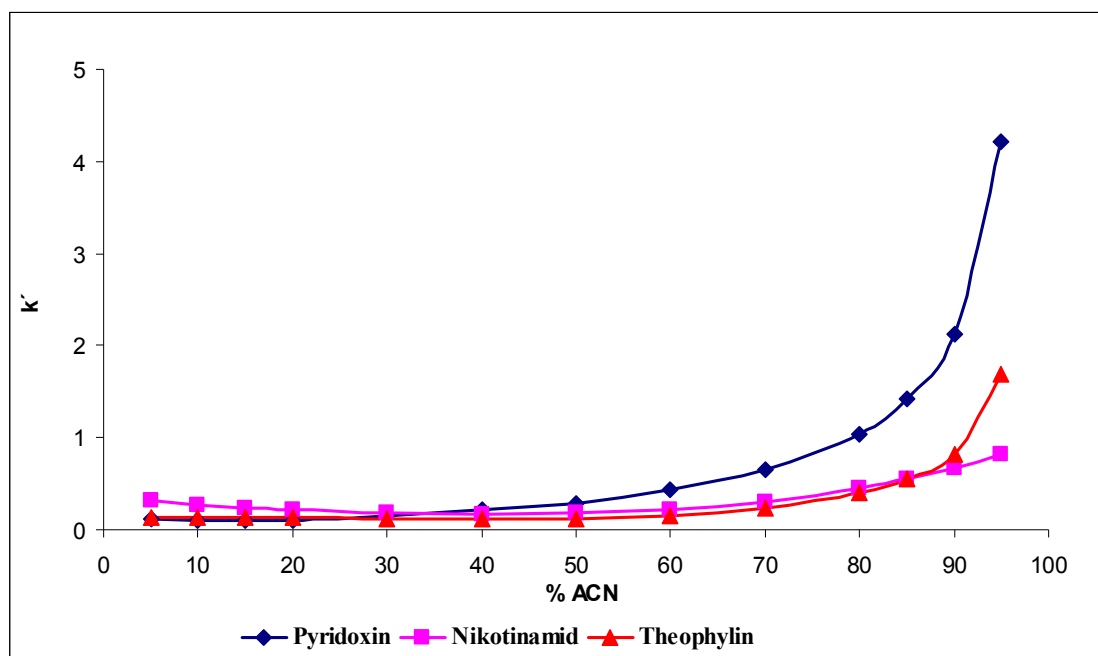
Graf 4: Závislost  $k'$  na % ACN pro kyselé látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; pH = 4,8).

U všech čtyř skupin analyzovaných látek byla pozorována retence odpovídající HILIC módu, tj. retence se zvyšovala se zvyšující se koncentrací ACN v mobilní fázi, a to především při >85% ACN. Analyt s vyšší hydrofilicitou z každé skupiny byl vždy zadržován více, např. kyselina šikimová ( $\log P = -2,220$ ). Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 3. Nízkou retenci vykazovaly kyselé analyty (Graf 4), což je způsobeno odpuzivými silami mezi negativním nábojem kyselin a částečným negativním nábojem na zbytkových Si-OH skupinách na povrchu silikagelu. Poměrně dobře byla zadržována výrazně hydrofilní kyselina šikimová. Ve většině případů, především při nižší koncentraci ACN, byly kyselé látky eluovány s mrtvým objemem kolony. Neutrální analyty (Graf 1) a nukleové baze (Graf 3), které se svými fyzikálně chemickými vlastnostmi blíží látkám neutrálním byly kolonou poměrně slabě zadržovány. Nejvýraznější retenci vykazovaly látky bazické (Graf 2), ty byly výrazněji zadržovány již při ACN >70%. Na retenci bazických látek se podílí iontové vazby mezi kladně nabitým analytem a negativně nabitými zbytkovými Si-OH skupinami na povrchu silikagelu. Kromě HILIC retence byl relativně lipofilní propranolol ( $\log P = 2,900$ ) zadržován i v RP módu.

### 5.1.2. Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; pH = 4,8)

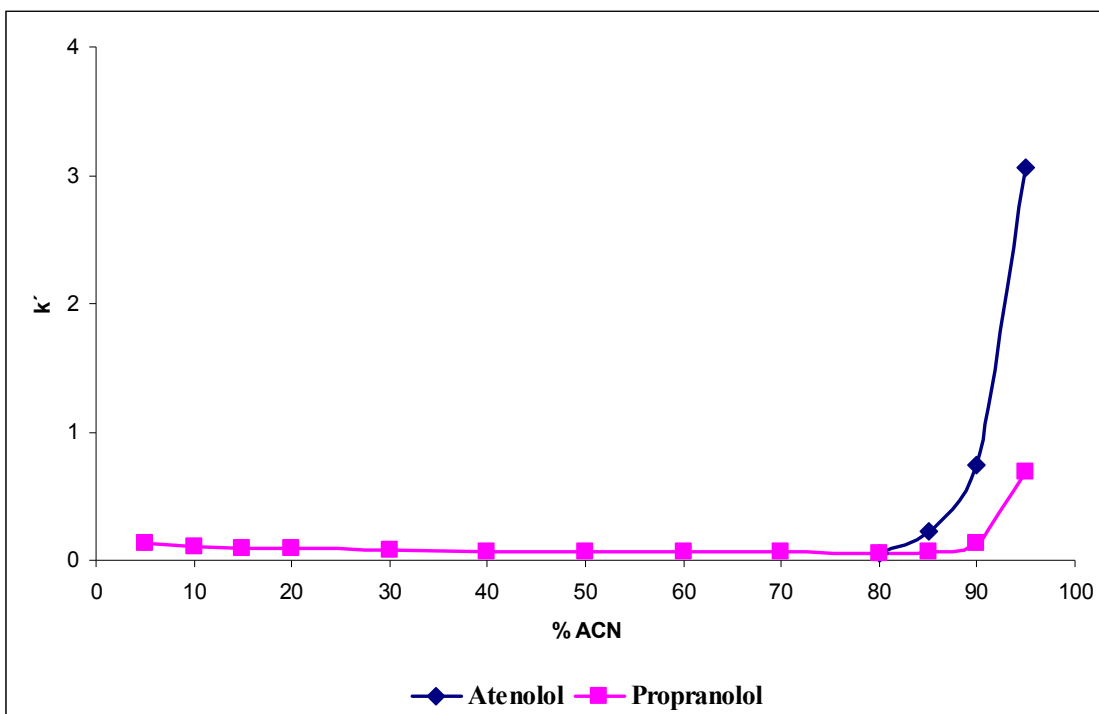
Látka	5% ACN	10% ACN	15% ACN	20% ACN	30% ACN	40% ACN	50% ACN	60% ACN	70% ACN	80% ACN	85% ACN	90% ACN	95% ACN
Pyridoxin	0,125	0,107	0,107	0,102	0,150	0,213	0,291	0,430	0,647	1,042	1,417	2,117	4,211
Nikotinamid	0,320	0,272	0,242	0,214	0,189	0,172	0,178	0,216	0,299	0,445	0,546	0,673	0,820
Theophylin	0,140	0,128	0,133	0,127	0,125	0,116	0,120	0,157	0,238	0,404	0,548	0,816	1,684
Atenolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056	0,223	0,747	3,054
Propranolol	0,133	0,108	0,092	0,086	0,078	0,072	0,068	0,066	0,063	0,060	0,068	0,132	0,694
Cytosin	0,172	0,184	0,200	0,198	0,244	0,308	0,407	0,611	0,989	1,820	2,692	4,449	10,201
Adenin	0,487	0,425	0,378	0,331	0,302	0,307	0,353	0,483	0,727	1,263	1,843	2,991	6,707
Gentisová kys.	131,592	104,435	83,073	67,126	50,222	37,819	31,114	26,656	24,106	24,652	29,720	-	-
Vanilová kys.	58,883	48,641	40,362	34,057	25,555	21,310	19,847	19,922	22,287	30,273	41,758	-	-
Šikimová kys.	11,302	11,860	12,468	13,196	16,222	20,368	27,345	39,848	65,700	-	-	-	-

Tabulka 4: Hodnoty  $k'$  pro analyzované látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; pH = 4,8).

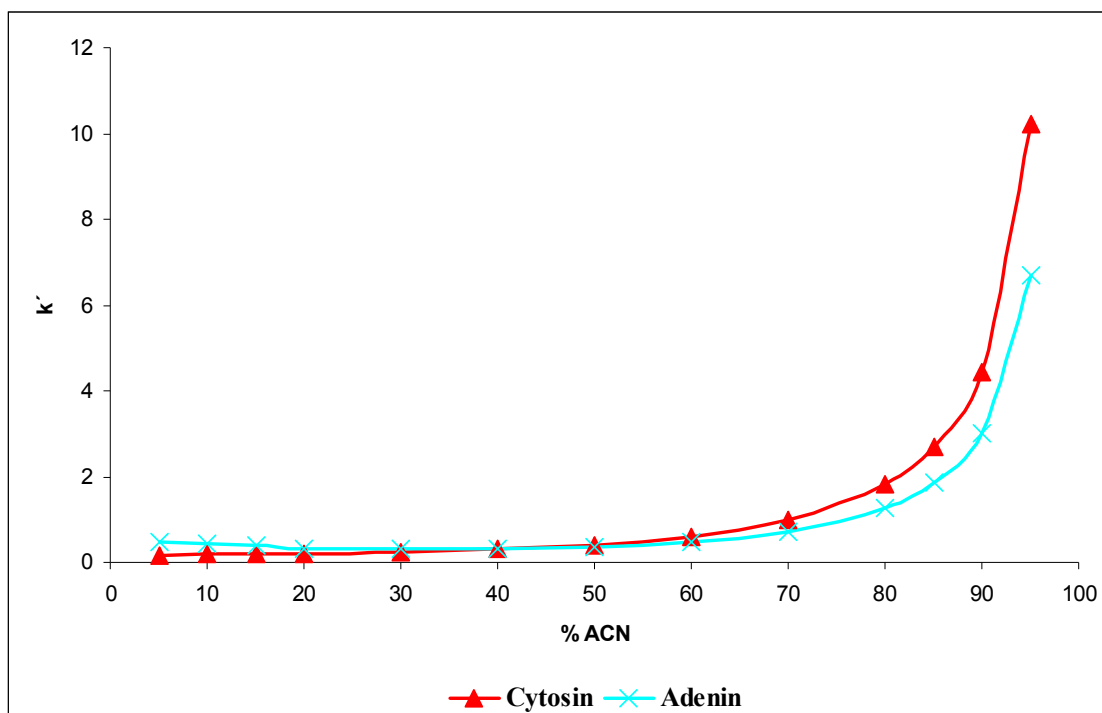


Graf 5: Závislost  $k'$  na % ACN pro neutrální látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; pH = 4,8).

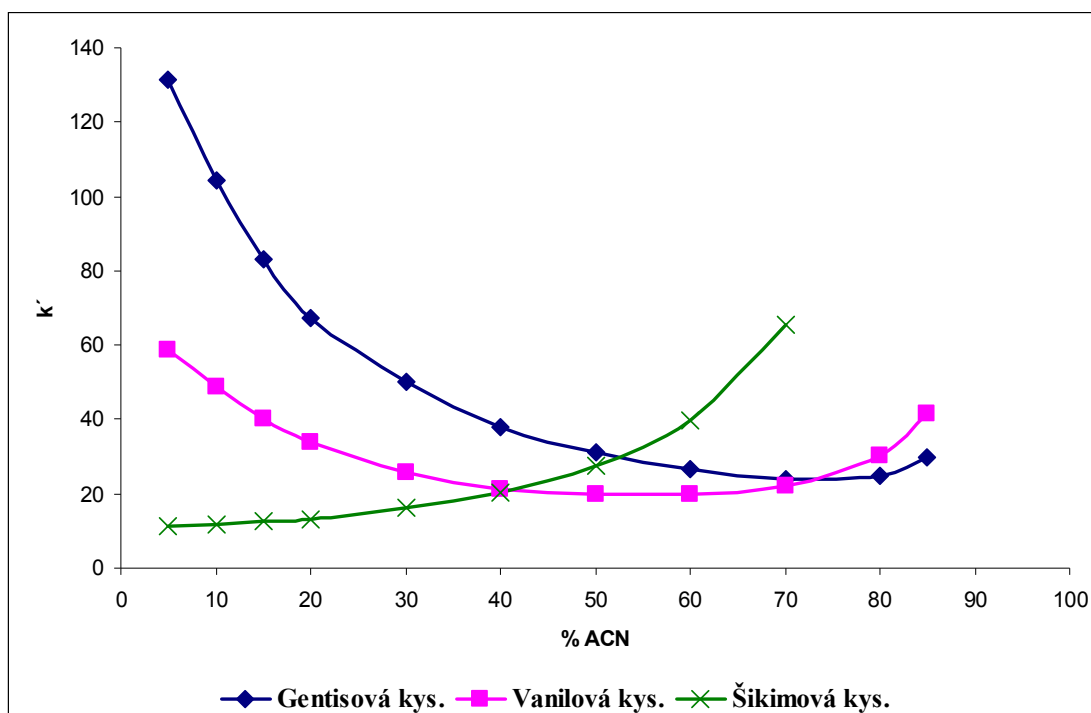




Graf 6: Závislost  $k'$ - $k'$  pro bazické látky. Kolona Luna  $NH_2$  (50 mM AmAc;  $pH = 4,8$ ).



Graf 7: Závislost  $k'$ - $k'$  pro nukleové baze. Kolona Luna  $NH_2$  (50 mM AmAc;  $pH = 4,8$ ).



Graf 8: Závislost  $k'$  pro kyselé látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; pH = 4,8).

U všech čtyř skupin analyzovaných látek byla pozorována retence odpovídající HILIC módu, tj. retence se zvyšovala se zvyšujícím se procentuálním zastoupením ACN v mobilní fázi a to především při >85% ACN. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 4. Neutrální látky (Graf 5) a nukleové baze (Graf 7) na této koloně byly zadržovány více v porovnání s kolonou Atlantis HILIC Silica, přičemž nejzadržovanější neutrální látkou byl opět nejvíce hydrofilní pyridoxin ( $\log P = -0,831$ ). Bazické látky (Graf 6) jsou stejně jako stacionární fáze za daných podmínek nabitý kladně. Vzhledem k odpuzivým elektrostatickým silám byly baze jen slabě zadržovány na rozdíl od kolony Atlantis HILIC Silica a ve většině případů eluovány s mrtvým objemem kolony. Z tohoto důvodu nebylo možné získat hodnoty  $k'$  pro atenolol při <80% ACN. Naopak při analýze kyselých látek vykazovala kolona Luna NH<sub>2</sub> velmi silnou retenci v HILIC módu (Graf 8). Jelikož retence velmi strmě stoupala se zvyšující se koncentrací ACN v mobilní fázi, nebylo možné tyto látky z časových důvodů a z důvodu rozmytí chromatografických píků hodnotit až do 95% ACN. Nicméně z naměřených hodnot je patrné, že nejvíce zadržovanou látkou je nejvíce hydrofilní kyselina šikimová ( $\log P = -2,220$ ). Kyseliny byly navíc velmi výrazně zadržovány i v RP módu, a to v opačném pořadí v porovnání s HILIC módem.

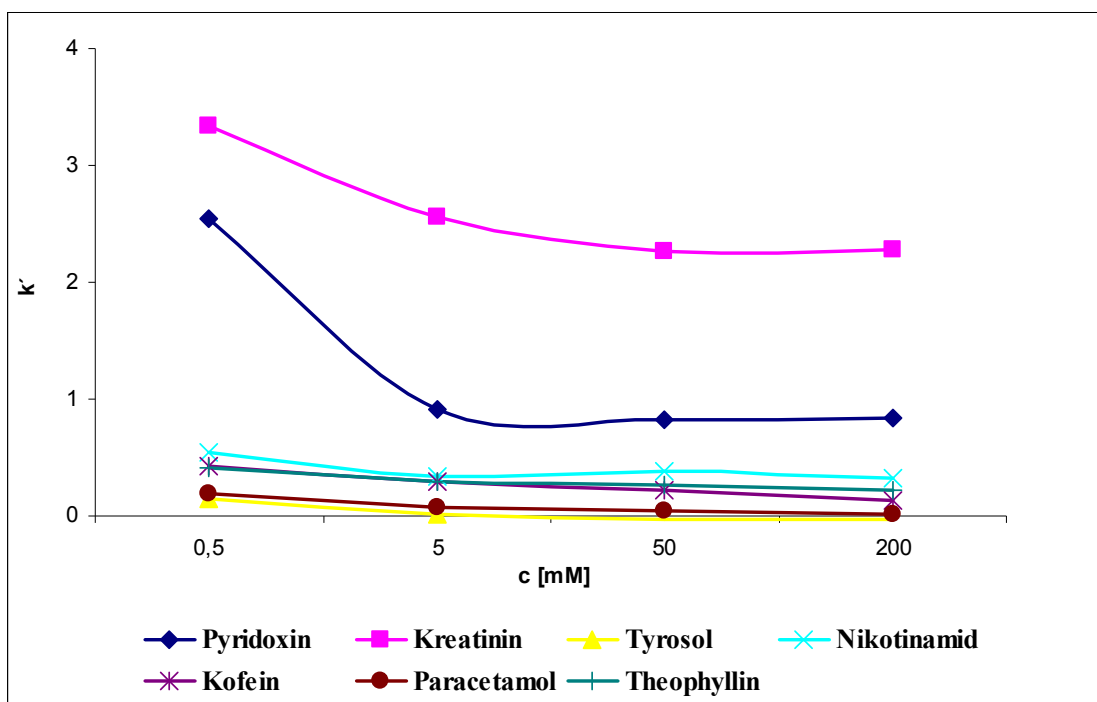
## 5.2. Vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci pufru

Pro hodnocení retence analytů byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu a octanu amonného, pH 4,8 o různých koncentracích (0,5, 5, 50 a 200 mM) v poměru 90:10. Z experimentálně naměřených hodnot za použití retenčního faktoru byly sestrojeny křivky závislosti  $k' = f(c)$ , kdy  $c$  vyjadřuje koncentraci pufru v mM. Křivky byly sestrojeny zvlášť pro neutrální, bazické, kyselé látky a nukleové baze.

### 5.2.1. Neutrální látky – Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Pyridoxin	2,540	0,915	0,829	0,842
Kreatinin	3,337	2,552	2,261	2,275
Tyrosol	0,149	0,010	-0,025	-0,027
Nikotinamid	0,551	0,338	0,387	0,323
Kofein	0,432	0,299	0,226	0,125
Paracetamol	0,191	0,080	0,045	0,019
Theophyllin	0,411	0,295	0,268	0,222

Tabulka 5: Hodnoty  $k'$  pro neutrální látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).



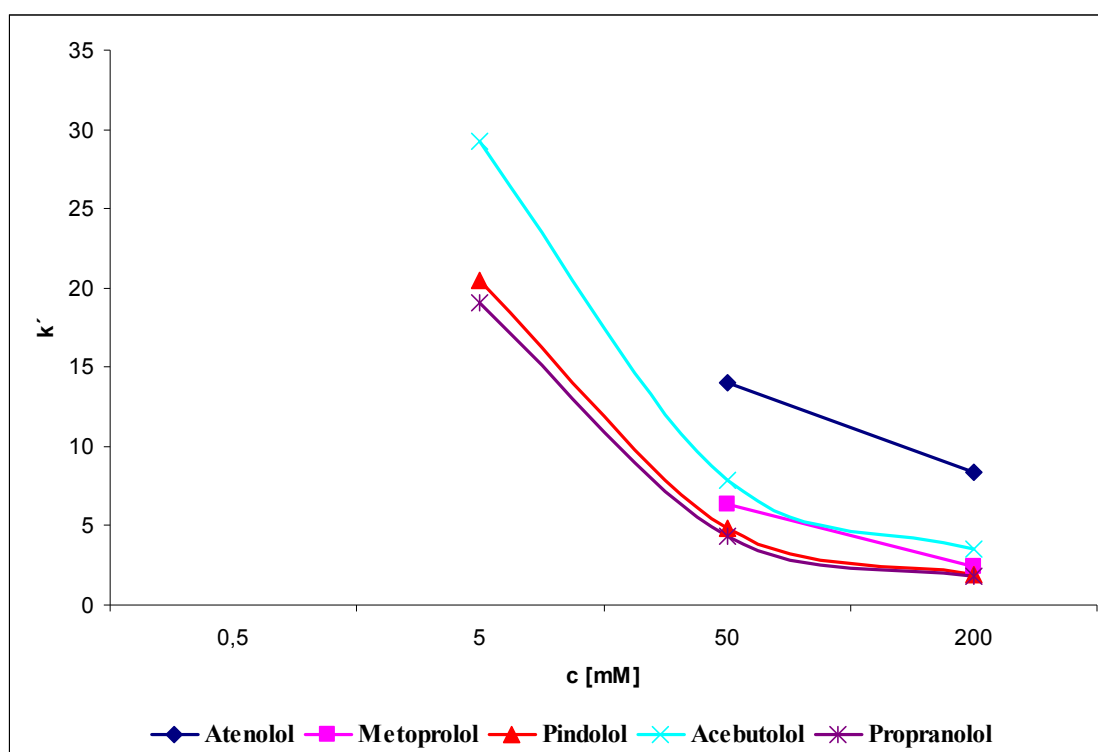
Graf 9: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro neutrální látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).

Změny retence neutrálních látek v závislosti na koncentraci pufru byly zanedbatelné (Graf 9) s výjimkou pyridoxinu a kreatininu, které mají v porovnání s ostatními látkami z této skupiny vyšší hodnotu  $pK_{a2}$  (Tabulka 1). Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 5.

### 5.2.2. Bazické látky – Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Atenolol	-	-	13,989	8,419
Metoprolol	-	-	6,378	2,452
Pindolol	-	20,518	4,827	1,957
Acebutolol	-	29,292	7,888	3,544
Propranolol	-	19,055	4,361	1,765

Tabulka 6: Hodnoty  $k'$  pro bazické látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).



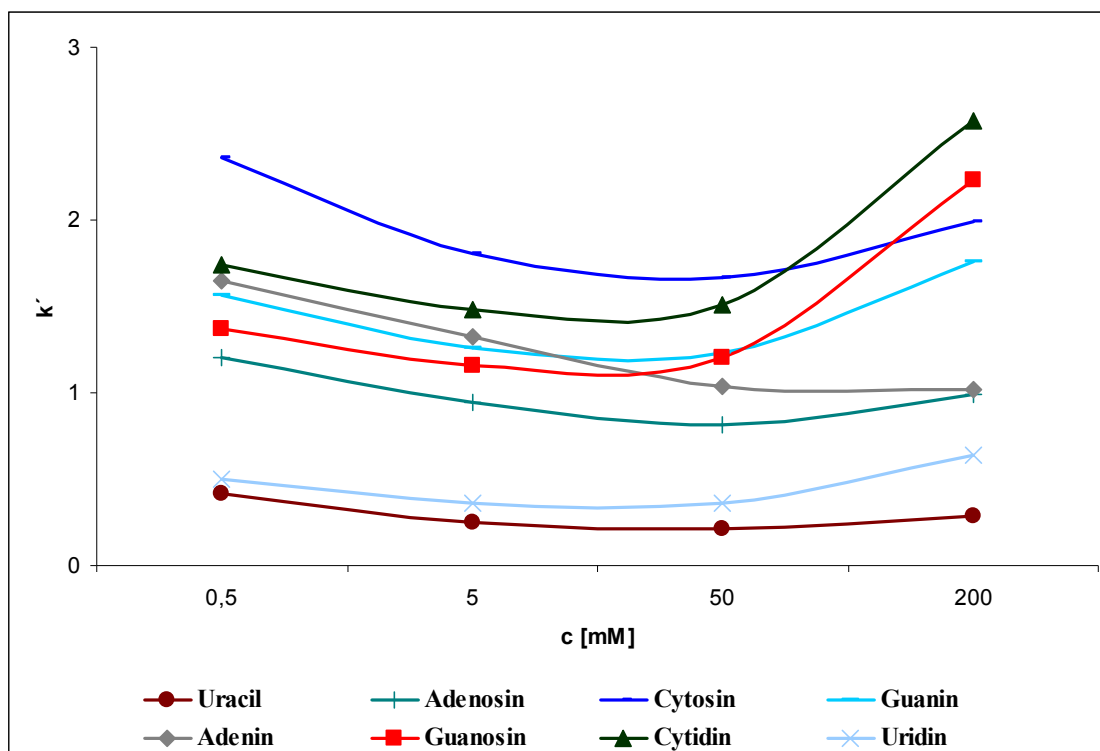
Graf 10: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro bazické látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).

Bazické látky jsou za daných podmínek kladně nabitě a stacionární fáze nese vlivem zbytkových Si-OH skupin částečně negativní náboj. Vzhledem k vzniklým přitažlivým elektrostatickým silám jsou baze touto kolonou dobře zadržovány a je pozorován značný vliv koncentrace pufru. Zvýšením koncentrace pufru v mobilní fázi dochází k redukci elektrostatických sil a snížení retence (Graf 10). Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 6. Výrazná retence bazických látek neumožnila z časových důvodů získání hodnot  $k'$  pro analyzované látky při nižší koncentraci pufru v mobilní fázi.

### 5.2.3. Nukleové baze – Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Uracil	0,418	0,253	0,209	0,291
Adenosin	1,205	0,949	0,818	0,992
Cytosin	2,363	1,805	1,668	1,990
Guanin	1,563	1,255	1,235	1,762
Adenin	1,645	1,321	1,039	1,021
Guanosin	1,366	1,158	1,206	2,227
Cytidin	1,742	1,479	1,511	2,578
Uridin	0,500	0,361	0,364	0,635

Tabulka 7: Hodnoty  $k'$  pro nukleové baze. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).



Graf 11: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro nukleové baze. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).

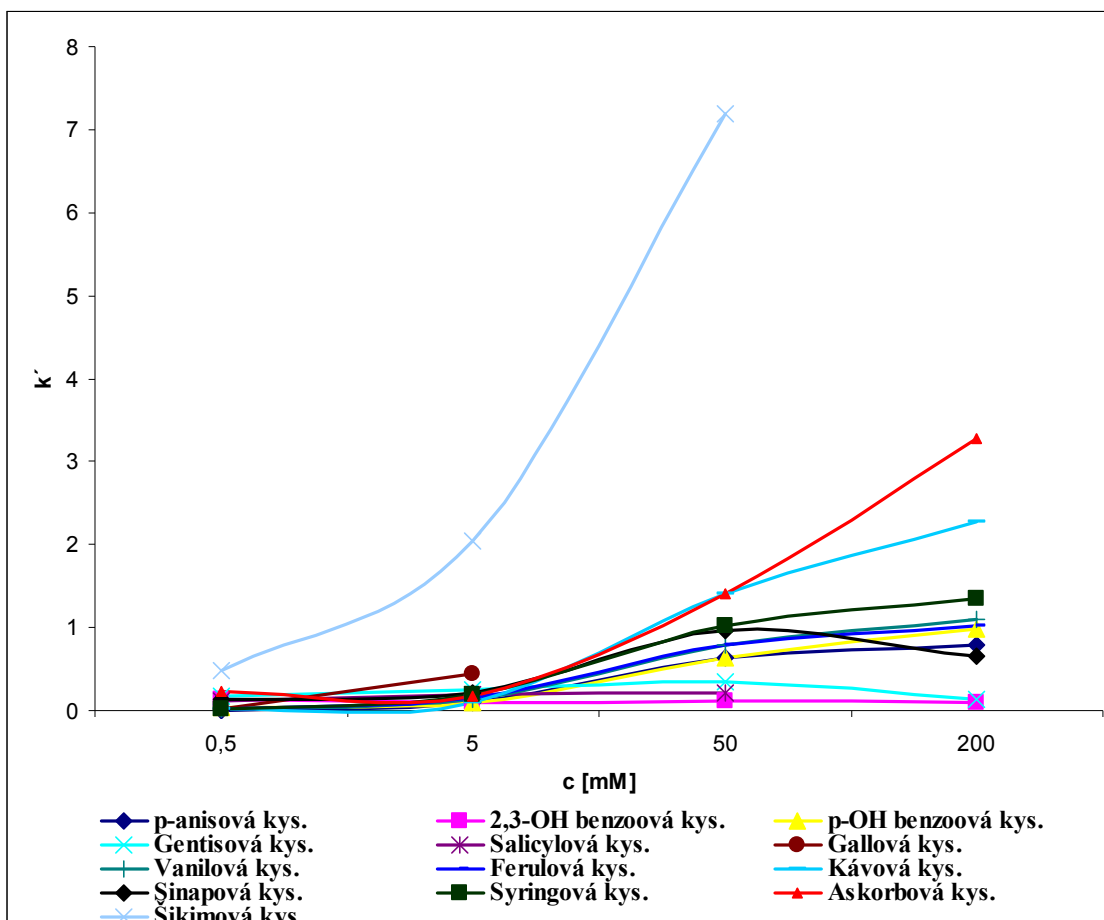
Nukleové baze mohou být za daných podmínek jen velmi slabě ionizovány, a proto jsou v tomto ohledu považovány spíše za látky neutrální. Jejich retence se se zvyšující koncentrací pufru významně nemění (Graf 11). Při analýze nukleových bází je patrný vliv hydrofilních interakcí. Např. hydrofilnější cytosin ( $\log P = -1,962$ ) je zadržován více v porovnání s lipofilnějším guaninem ( $\log P = -0,960$ ) a obdobně cytidin ( $\log P = -1,808$ ) je zase zadržován více v porovnání s guanosinem ( $\log P = -1,466$ ). Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 7.



#### 5.2.4. Kyselé látky – Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
p-anisová kys.	0,003	0,094	0,640	0,788
2,3-OH benzoová kys.	0,137	0,090	0,115	0,106
p-OH benzoová kys.	0,036	0,095	0,632	0,976
Gentisová kys.	0,170	0,260	0,340	0,130
Salicylová kys.	0,120	0,190	0,220	-
Gallová kys.	0,014	0,437	-	-
Vanilová kys.	0,013	0,137	0,788	1,099
Ferulová kys.	0,025	0,157	0,798	1,016
Kávoová kys.	0,028	0,099	1,401	2,277
Sinapová kys.	0,130	0,211	0,955	0,657
Syringová kys.	0,016	0,198	1,031	1,348
Askorbová kys.	0,230	0,169	1,400	3,286
Šikimová kys.	0,473	2,042	7,182	-

Tabulka 8: Hodnoty  $k'$  pro kyselé látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).



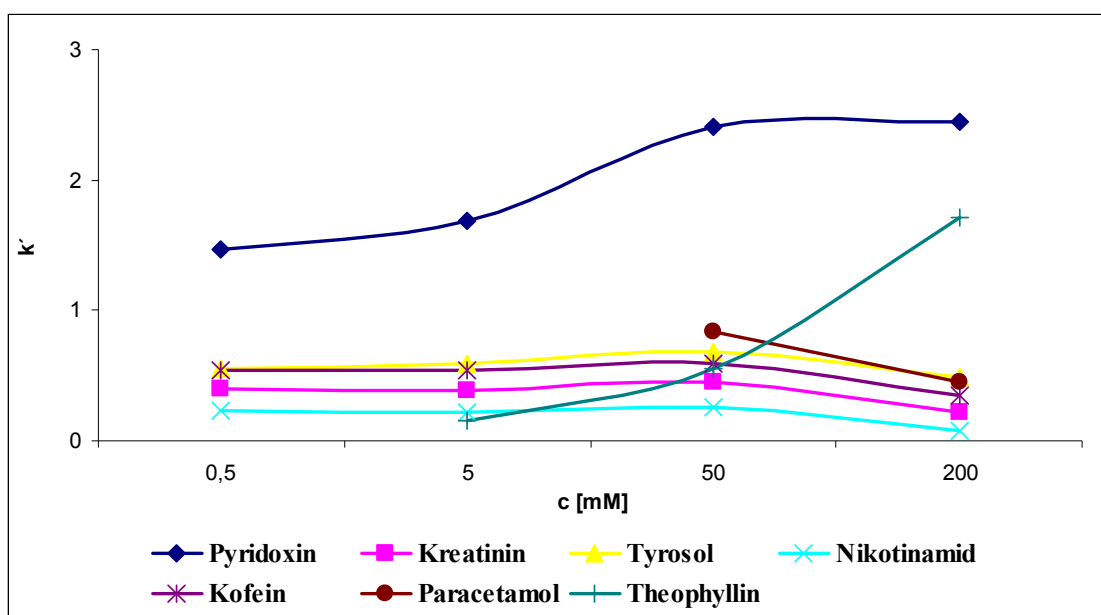
Graf 12: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro kyselé látky. Kolona Atlantis HILIC Silica (pH = 4,8; 90% ACN).

Zvýšená koncentrace pufru redukuje odpudivé síly vzniklé mezi záporně nabitými Si-OH skupinami na povrchu silikagelu a záporně nabitými kyselými analyty. Díky tomu jsou kyselé látky se zvyšující se koncentrací pufru více zadržovány (Graf 12). Největší efekt má koncentrace pufru na nejvíce hydrofilní kyselinu askorbovou ( $\log P = -2,410$ ) a kyselinu šikimovou ( $\log P = -2,220$ ). Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 8, přičemž hodnoty  $k'$  pro kyselinu salicylovou, gallovou a šikimovou při vyšší koncentraci pufru v mobilní fázi nebyly získány z důvodu příliš rozmytých píků.

### 5.2.5. Neutrální látky – Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Pyridoxin	1,469	1,688	2,413	2,450
Kreatinin	0,405	0,384	0,454	0,224
Tyrosol	0,557	0,590	0,688	0,491
Nikotinamid	0,229	0,214	0,260	0,075
Kofein	0,537	0,537	0,595	0,347
Paracetamol	-	-	0,840	0,445
Theophyllin	-	0,152	0,549	1,713

Tabulka 9: Hodnoty  $k'$  pro neutrální látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).



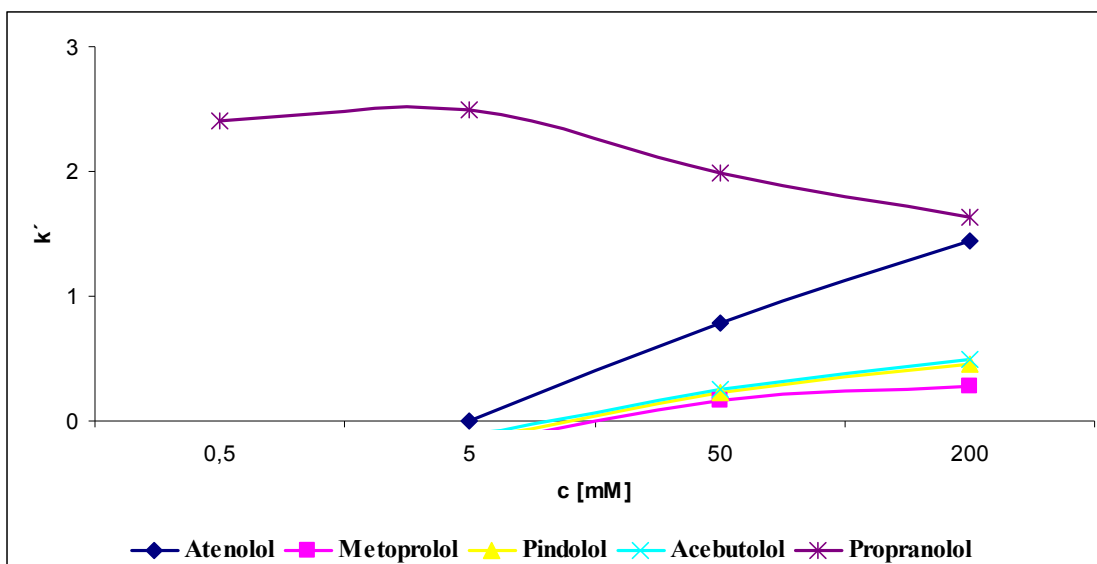
Graf 13: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro neutrální látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).

Změny retence neutrálních látek při zvyšující se koncentraci pufru byly zanedbatelné, s výjimkou theophyllinu a pyridoxinu (Graf 13), které mají nižší hodnotu  $pK_{a1}$  v porovnání s ostatními látkami (Tabulka 1). U těchto dvou analytů dochází se zvyšující se koncentrací pufru ke zvýšení retence. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 9. Paracetamol při koncentraci pufru 0,5 mM a 5 mM a theophyllin při koncentraci pufru 0,5 mM byly eluovány s mrtvým objemem kolony.

### 5.2.6. Bazické látky – Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Atenolol	-	0,003	0,782	1,443
Metoprolol	-	-0,206	0,167	0,282
Pindolol	-0,145	-0,126	0,229	0,459
Acebutolol	-0,152	-0,099	0,254	0,489
Propranolol	2,403	2,488	1,994	1,631

Tabulka 10: Hodnoty  $k'$  pro bazické látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).



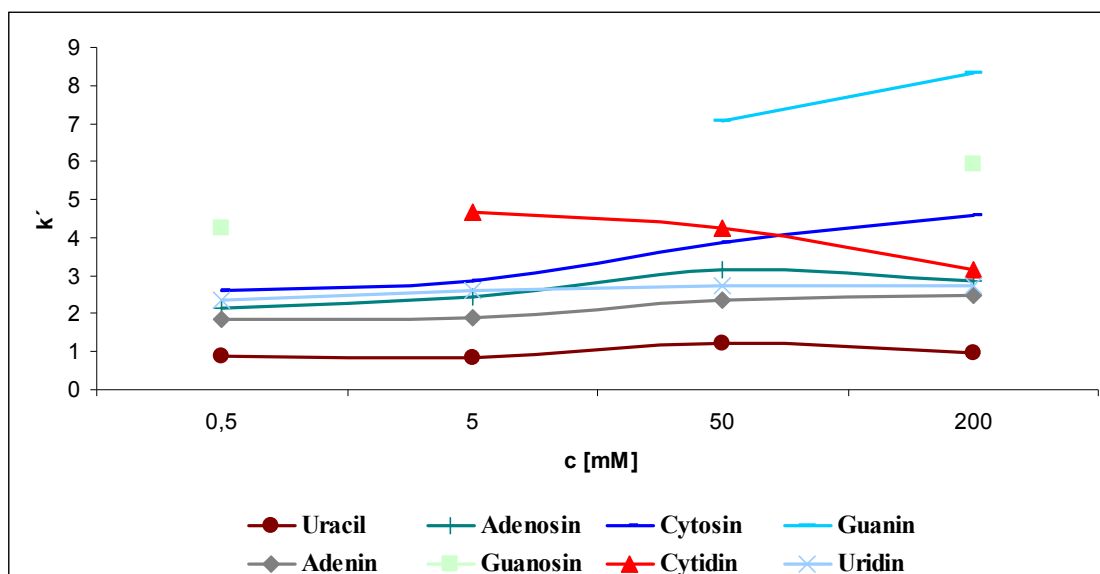
Graf 14: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro bazické látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).

Z grafu je patrné, že se zvyšující koncentrací pufru dochází ke zvýšení retence (Graf 14) z důvodu redukce odpuzivých sil mezi kladně nabitou bazickou látkou a kladně nabitým povrchem amino stacionární fáze. Je tedy pozorován opačný efekt koncentrace pufru než na koloně Atlantis HILIC Silica. Většina bazických látek byla během analýzy při nižší koncentraci pufru eluována s mrtvým objemem kolony. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 10.

### 5.2.7. Nukleové baze – Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN)

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
Uracil	0,863	0,828	1,202	0,972
Adenosin	2,160	2,437	3,153	2,860
Cytosin	2,614	2,863	3,879	4,586
Guanin	-	-	7,080	8,335
Adenin	1,860	1,895	2,364	2,497
Guanosin	4,268	-	-	5,929
Cytidin	-	4,683	4,264	3,160
Uridin	2,349	2,596	2,745	2,740

Tabulka 11: Hodnoty  $k'$  pro nukleové baze. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).



Graf 15: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro nukleové baze. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 90% ACN).

Retence nukleových bazí, které mají spíše neutrální charakter, se se změnou koncentrace pufru nijak výrazně nezměnila (Graf 15). Analýza guaninu, cytidinu a guanosinu byla problematická. Především při nižším zastoupení pufru v mobilní fázi nebyly tyto látky zadržovány nebo byly jejich píky příliš rozmyté. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 11.

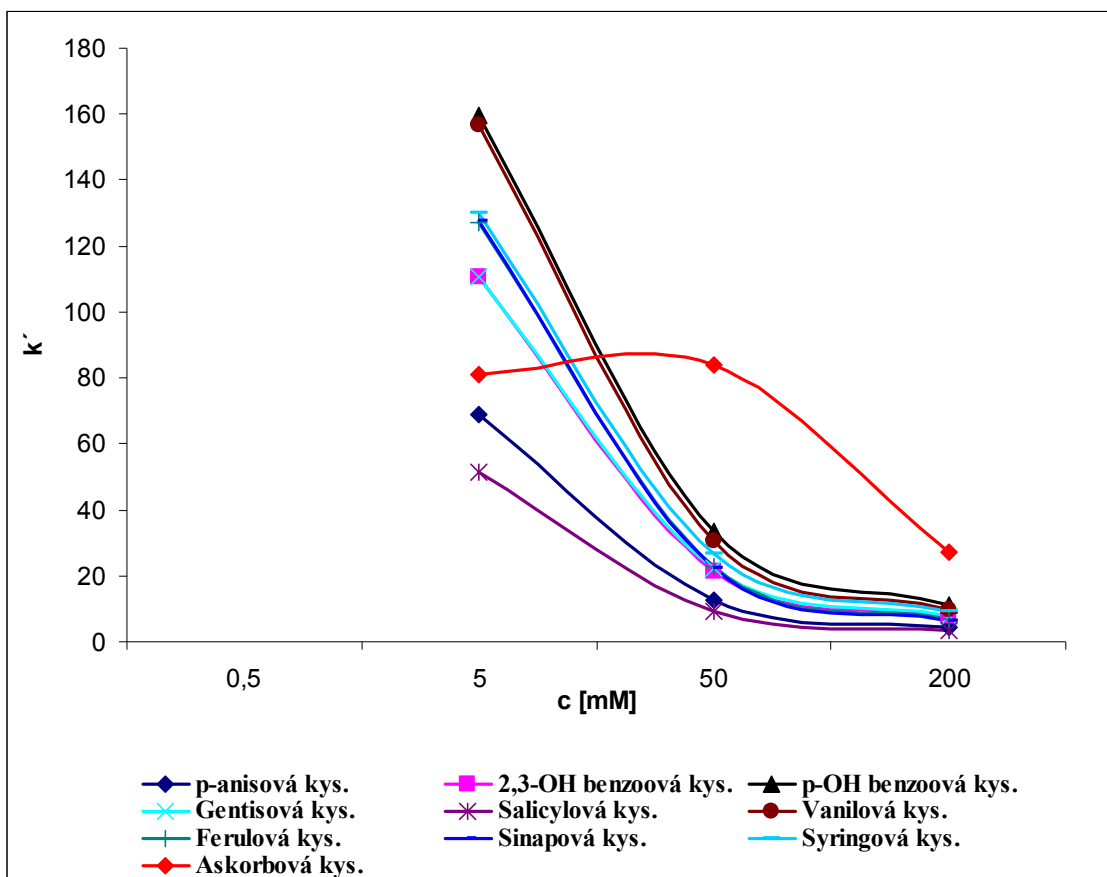
### 5.2.8. Kyselé látky – Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 80% ACN)<sup>1</sup>

Látka	0,5 mM	5 mM	50 mM	200 mM
p-anisová kys.	-	68,976	12,709	4,152
2,3-OH benzoová kys.	-	110,816	21,254	7,665
p-OH benzoová kys.	-	159,807	33,442	10,943
Gentisová kys.	-	110,542	22,200	7,794
Salicylová kys.	-	51,631	9,436	3,344
Vanilová kys.	-	156,592	30,734	9,549
Ferulová kys.	-	126,950	22,884	6,622
Sinapová kys.	-	127,667	22,086	6,295
Syringová kys.	-	130,000	26,806	8,979
Askorbová kys.	-	81,060	83,832	27,271

Tabulka 12: Hodnoty  $k'$  pro kyselé látky. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (pH = 4,8; 80% ACN).

---

<sup>1</sup> POZN.: Retenční faktory kyselých látek byly získány při koncentraci 80% ACN, protože při 90% ACN, byly jejich retenční časy pro praktické použití příliš vysoké.



Graf 16: Závislost  $k'$  na koncentraci pufru pro kyselé látky. Kolona Luna  $\text{NH}_2$  ( $\text{pH} = 4,8$ ; 80% ACN).

Retence kyselých látek na amino stacionární fázi je obecně velmi vysoká (Graf 16). Při 0,5 mM AmAc nebyly hodnoty  $k'$  změřeny z důvodu velmi dlouhých retenčních časů, případně rozmytých píků. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 12. Z grafu je patrné, že zvyšující se koncentrace pufru výrazně snižuje retenci kyselých látek, k čemuž dochází vlivem redukce přitažlivých sil mezi záporně nabitými kyselými látkami a kladně nabitou amino stacionární fází. Byl tedy prokázán opačný efekt než u kolony Atlantis HILIC Silica.

### **5.3. Vyhodnocení selektivity**

K porovnání selektivity byly sestrojeny křivky závislosti retenčního faktoru každého analytu při různých hodnotách pH 3,8 (kyselé) a 6,8 (neutrální). Vliv bazického pH nebyl studován vzhledem k omezené stabilitě kolon. Následně byla také porovnána selektivita kolon vzájemně při pH 3,8 a 6,8. K experimentu byla využita mobilní fáze 50 mM octan amonný:ACN (10:90).



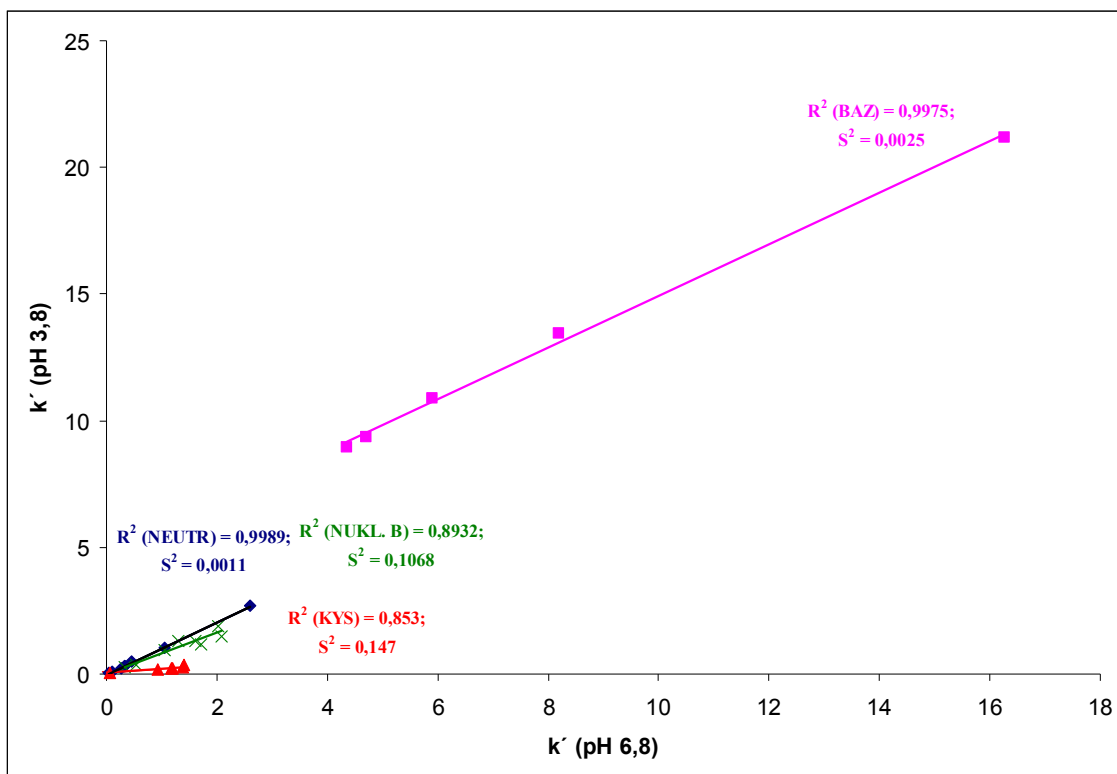
### 5.3.1. Porovnání selektivity kolony Atlantis HILIC Silica při pH 3,8 a 6,8 (50 mM AmAc; 90% ACN)

Látka	k1 (pH 3,8)	k2 (pH 6,8)
Atenolol	21,160	16,258
Metoprolol	10,879	5,895
Pindolol	9,359	4,709
Acebutolol	13,451	8,205
Propranolol	8,929	4,358
Uracil	0,255	0,325
Adenosin	0,939	1,060
Cytosin	1,906	2,033
Guanin	1,296	1,618
Adenin	1,313	1,300
Guanosin	1,166	1,714
Cytidin	1,489	2,075
Uridin	0,364	0,539
Pyridoxin	1,018	1,044

*Tabulka 13: Hodnoty  $k'$  testovaných látek při pH = 3,8 a při pH = 6,8. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; 90% ACN).*

Látka	k1 (pH 3,8)	k2 (pH 6,8)
Kreatinin	2,680	2,603
Tyrosol	0,051	0,041
Nikotinamid	0,483	0,453
Kofein	0,305	0,322
Paracetamol	0,083	0,096
Theophylin	0,300	0,341
Thiamin	0,216	0,263
p-anisová kys.	0,187	0,933
2,3-OH benzoová kys.	0,104	-0,080
Gentisová kys.	0,046	0,072
Vanilová kys.	0,232	1,172
Ferulová kys.	0,223	1,202
Sinapová kys.	0,282	1,383
Syringová kys.	0,348	1,401

*Tabulka 13 (pokračování): Hodnoty  $k'$  testovaných látek při pH = 3,8 a při pH = 6,8. Kolona Atlantis HILIC Silica (50 mM AmAc; 90% ACN).*



Graf 17: Porovnání selektivity kolony Atlantis HILIC Silica při pH = 3,8 a 6,8.

Selektivita kolony Atlantis HILIC Silica při pH 3,8 a pH 6,8 je podobná pro všechny čtyři skupiny látek, což dokazují hodnoty  $s^2$ , pro kyseliny  $s^2 = 0,147$ , baze  $s^2 = 0,0025$ , nukleové baze  $s^2 = 0,1068$  i neutrální látky  $s^2 = 0,0011$ . Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna v Grafu 17. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 13.

### 5.3.2. Porovnání selektivity kolony Luna NH<sub>2</sub> při pH 3,8 a 6,8 (50 mM AmAc; 90% ACN)<sup>2</sup>

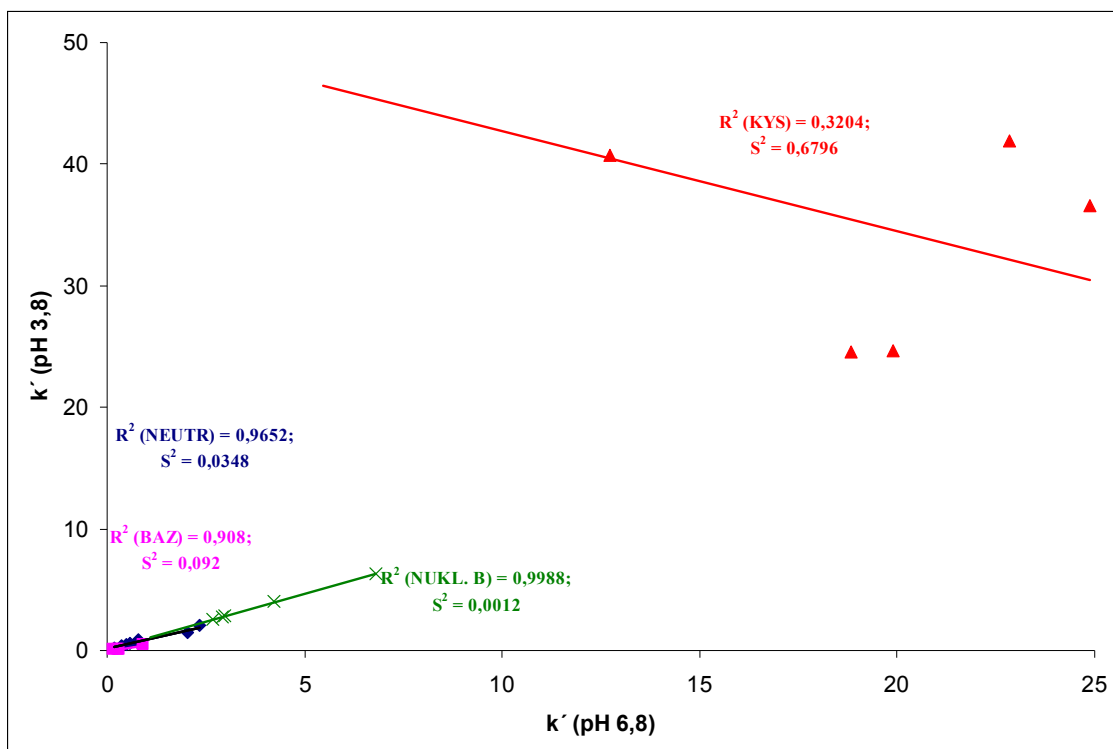
Látka	k1 (pH 3,8)	k2 (pH 6,8)
Atenolol	0,447	0,898
Metoprolol	-	0,154
Pindolol	0,070	0,281
Acebutolol	0,060	0,300
Propranolol	0,110	0,158
Uracil	-	1,079
Adenosin	2,903	2,981
Cytosin	4,067	4,229
Adenin	2,729	2,909
Cytidin	6,323	6,789
Uridin	2,564	2,679
Pyridoxin	1,513	2,034

Tabulka 14: Hodnoty  $k'$  testovaných látek při pH = 3,8 a při pH = 6,8. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; 90% ACN).

Látka	k1 (pH 3,8)	k2 (pH 6,8)
Tyrosol	0,382	0,358
Nikotinamid	0,625	0,592
Kofein	0,236	0,183
Paracetamol	0,484	0,491
Theophylin	0,567	0,803
Thiamin	0,874	0,779
Gentisová kys.	40,700	12,720
Salicylová kys.	51,294	5,469
Vanilová kys.	36,553	24,888
Ferulová kys.	24,676	19,904
Sinapová kys.	24,580	18,832
Syringová kys.	41,936	22,841

Tabulka 14 (pokračování): Hodnoty  $k'$  testovaných látek při pH = 3,8 a při pH = 6,8. Kolona Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; 90% ACN).

<sup>2</sup> POZN.: Retenční faktory kyselých látek byly hodnoceny při koncentraci ACN 80%. Při vyšším zastoupení ACN, byly retenční časy kyselin příliš vysoké.



Graf 18: Porovnání selektivity kolony Luna NH<sub>2</sub> při pH = 3,8 a 6,8.

Selektivita kolony Luna NH<sub>2</sub> se při pH = 3,8 a 6,8 neliší pro neutrální látky ( $s^2 = 0,0348$ ), nukleové baze ( $s^2 = 0,0012$ ), ani pro látky bazické ( $s^2 = 0,092$ ). Nicméně pro kyselé analyty se selektivita kolony za daných podmínek výrazně liší ( $s^2 = 0,6796$ ). Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna na Grafu 18. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 14.

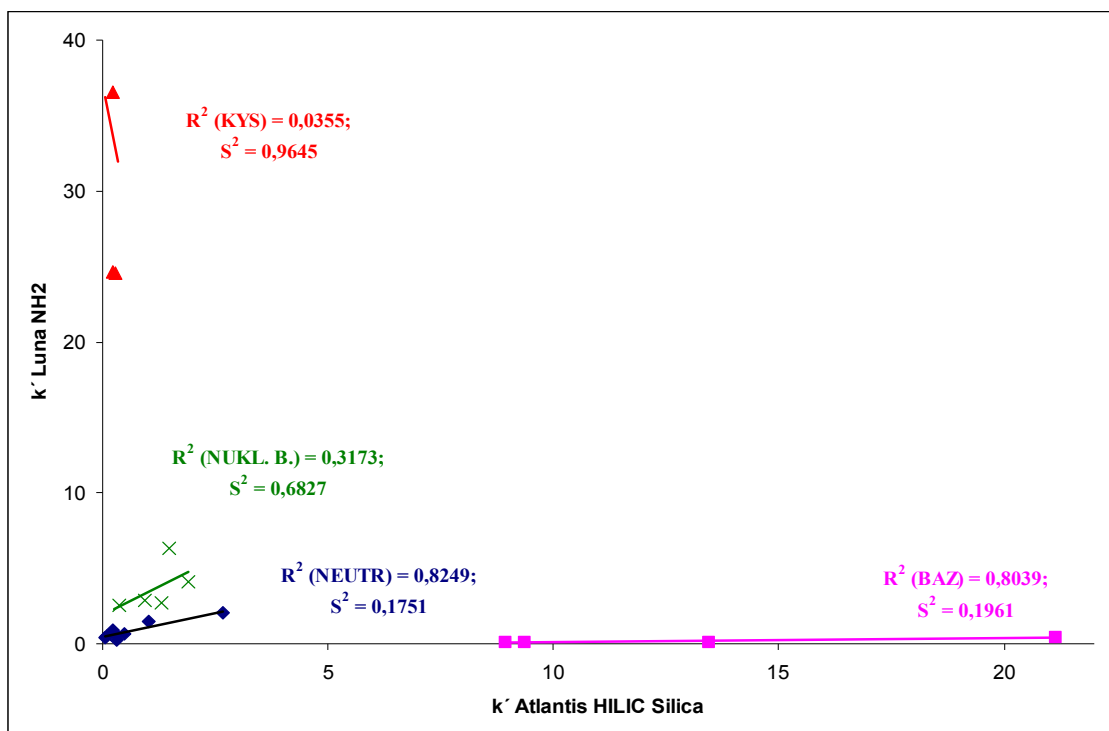
**5.3.3. Porovnání selektivity Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; 90% ACN; pH = 3,8)<sup>2</sup>**

Látka	k1 (Atlantis)	k2 (NH2)
Atenolol	21,160	0,447
Metoprolol	10,879	-
Pindolol	9,359	0,070
Acebutolol	13,451	0,060
Propranolol	8,929	0,110
Uracil	0,255	-
Adenosin	0,939	2,903
Cytosin	1,906	4,067
Guanin	1,296	-
Adenin	1,313	2,729
Guanosin	1,166	-
Cytidin	1,489	6,323
Uridin	0,364	2,564
Pyridoxin	1,018	1,513
Kreatinin	2,680	2,022

*Tabulka 15: Hodnoty k' testovaných látek pro kolony Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (90% ACN; pH = 3,8).*

Látka	k1 (Atlantis)	k2 (NH2)
Tyrosol	0,051	0,382
Nikotinamid	0,483	0,625
Kofein	0,305	0,236
Paracetamol	0,083	0,484
Theophylin	0,300	0,567
Thiamin	0,216	0,874
p-anisová kys.	0,187	-
2,3-OH benzoová kys.	0,104	-
Gentisová kys.	0,046	40,700
Salicylová kys.	-	51,294
Vanilová kys.	0,232	36,553
Ferulová kys.	0,223	24,676
Sinapová kys.	0,282	24,580
Syringová kys.	0,348	41,936

*Tabulka 15 (pokračování): Hodnoty k' testovaných látek pro kolony Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (90% ACN; pH = 3,8).*



Graf 19: Porovnání selektivity kolon Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> při pH = 3,8.

Selektivita kolon Luna NH<sub>2</sub> a Atlantis HILIC Silica se při pH = 3,8 v malé míře lišila pro látky bazické ( $s^2 = 0,1961$ ) a pro látky neutrální ( $s^2 = 0,1751$ ). Výraznější rozdíly selektivity se projevily pro nukleové baze ( $s^2 = 0,6827$ ). Pro kyseliny byla selektivita kolon zcela odlišná ( $s^2 = 0,9645$ ). Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna na Grafu 19. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 15.

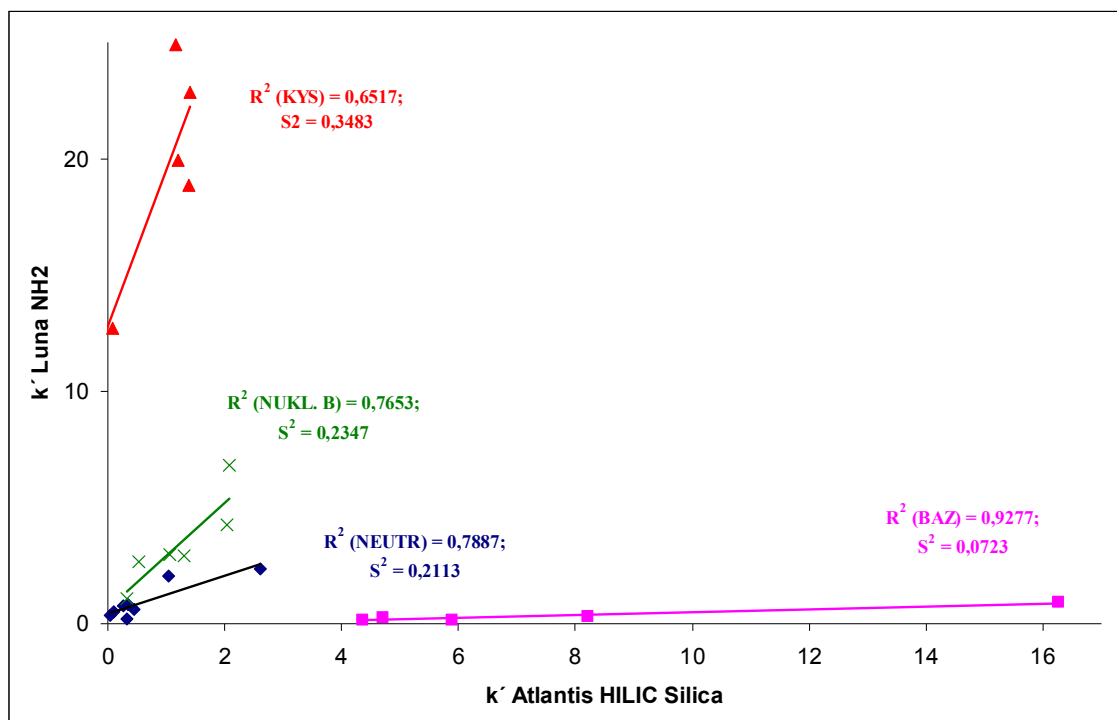
**5.3.4. Porovnání selektivity Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (50 mM AmAc; 90% ACN; pH = 6,8)<sup>2</sup>**

Látka	k1 (Atlantis)	k2 (NH2)
Atenolol	16,258	0,898
Metoprolol	5,895	0,154
Pindolol	4,709	0,281
Acebutolol	8,205	0,300
Propranolol	4,358	0,158
Uracil	0,325	1,079
Adenosin	1,060	2,981
Cytosin	2,033	4,229
Guanin	1,618	-
Adenin	1,300	2,909
Guanosin	1,714	-
Cytidin	2,075	6,789
Uridin	0,539	2,679
Pyridoxin	1,044	2,034
Kreatinin	2,603	2,353

*Tabulka 16: Hodnoty k' testovaných látek pro kolony Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (90% ACN; pH = 6,8).*

Látka	k1 (Atlantis)	k2 (NH2)
Tyrosol	0,041	0,358
Nikotinamid	0,453	0,592
Kofein	0,322	0,183
Paracetamol	0,096	0,491
Theophylin	0,341	0,803
Thiamin	0,263	0,779
p-anisová kys.	0,933	-
2,3-OH benzoová kys.	-0,080	-
Gentisová kys.	0,072	12,720
Salicylová kys.	-	5,469
Vanilová kys.	1,172	24,888
Ferulová kys.	1,202	19,904
Sinapová kys.	1,383	18,832
Syringová kys.	1,401	22,841

*Tabulka 16 (pokračování): Hodnoty k' testovaných látek pro kolony Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> (90% ACN; pH = 6,8).*



Graf 20: Porovnání selektivity kolon Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> při pH = 6,8.

Selektivita kolon Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> se při pH = 6,8 pro kyselé látky ( $s^2 = 0,3483$ ), pro nukleové baze ( $s^2 = 0,2347$ ) a pro bazické látky ( $s^2 = 0,0723$ ) lišila méně než při pH = 3,8 (Graf 19). Větší rozdíl v selektivitě se projevil při analýze neutrálních látek ( $s^2 = 0,2113$ ). Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna na Grafu 20. Hodnoty  $k'$  analyzovaných látek jsou uvedeny v Tabulce 16.

Podle očekávání nemělo pH výrazný vliv na retenci neutrálních látek. V případě ionizovatelných analytů platí, že jsou více zadržovány v nabitě formě vzhledem k jejich vyšší hydrofilitě. Při zvýšení pH je stupeň ionizace bazických analytů snížen, jsou méně hydrofilní a retence na záporně nabitěm povrchu kolony Atlantis HILIC Silica mírně klesá. Kyselé látky při pH = 6,8 deprotonizují, jsou hydrofilnější a jsou kolonou Atlantis HILIC Silica zadržovány více. Opačný efekt byl pozorován u kolony Luna NH<sub>2</sub>.



## 6. Závěr

Diplomová práce se zabývala vlivem koncentrace ACN, pH a koncentrace pufru v mobilní fázi na retenci a selektivitu kolon Atlantis HILIC Silica (3  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm) a Luna NH<sub>2</sub> (3 $\mu\text{m}$ , 2,0 mm x 100 mm).

Kolona Atlantis HILIC Silica vykazovala chování typické pro HILIC mód, tj. retence stoupala se zvyšujícím se množstvím ACN v mobilní fázi a to především od >85% ACN. Kolona Luna NH<sub>2</sub> kromě HILIC chování navíc vykazovala silnou retenci kyselých látek v RP módu, tj. retence klesala se snižujícím se množstvím vody v rozmezí 5-30% ACN. Kyseliny byly kolonou Luna NH<sub>2</sub> zadržovány velmi silně jak v RP módu, tak v HILIC módu a to již při 80% ACN v mobilní fázi.

S rostoucí koncentrací pufru na koloně Atlantis HILIC Silica retence bazických látek klesala a retence kyselin se zvyšovala. Naproti tomu na koloně Luna NH<sub>2</sub> se retence bazických látek zvyšovala a retence kyselých látek se velmi výrazně snižovala. Protože kolona Luna NH<sub>2</sub> vykazovala velmi silnou retenci kyselých látek, nebylo možné provést testování za použití 0,5 mM AmAc.

Při porovnání selektivity kolony Atlantis HILIC Silica při pH = 3,8 a pH = 6,8 nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v selektivitě ani pro jednu z testovaných skupin analytů. U kolony Luna NH<sub>2</sub> byl rozdíl v selektivitě při pH = 3,8 a pH = 6,8 výrazný pro kyselé analyty ( $s^2 = 0,6796$ ).

Při porovnávání selektivity kolon Atlantis HILIC Silica a Luna NH<sub>2</sub> při pH = 3,8 byl zaznamenán rozdíl u nukleových bazí ( $s^2 = 0,6827$ ) a výrazný rozdíl u látek kyselých, při jejichž analýze byla selektivita zcela odlišná ( $s^2 = 0,9645$ ). Při porovnávání selektivity při pH = 6,8 byl rozdíl podobný jako při pH = 3,8, přičemž rozdíl v selektivitě bazických látek ( $s^2 = 0,0723$ ) byl nižší a rozdíl v selektivitě kyselých látek byl také nižší ( $s^2 = 0,3483$ ).

Tato diplomová práce byla součástí ucelené studie testování vlivu složení mobilní fáze na retenci a selektivitu několika typů HILIC stacionárních fází a výsledky celé studie byly publikovány v mezinárodním imputovaném časopise Journal of Separation Science, viz Příloha 1.

## Literatura:

- [1] Vacek, J., Onofrejevová, L., Klejdus, B., Kubáň, V., Chem. Listy 103 (2009) 381-385.
- [2] Nguyen, D., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J., J. Sep. Sci 29 (2006) 1836-1848.
- [3] Grumbach, E. S., Wagrowski-Diehl, D., Mazuro, J. R., Alden, B., Iraneta, P. C., LCGC North Am. 22 (2004) 1010-1023.
- [4] Jandera, P., Chemagazín 2 (2011) 8-9.
- [5] Jian, W., Edom, R., Xu Y., Weng, N., J. Sep. Sci. 33 (2010) 681-697.
- [6] Majors, R. E., J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 488.
- [7] Boumahra, z M., Davidov, V.Y., Kiselev, A.V., Chromatographia 15 (1982) 751.
- [8] Alpert, A. J., J. Chromatogr. 499 (1990) 177-196.
- [9] Nováková, L., Douša, M., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I (2013) 156-164.
- [10] [http://www.infoagil.ch/hilic/zic\\_hilic.html](http://www.infoagil.ch/hilic/zic_hilic.html) (09/2013).
- [11] Gama, R. M., Gomes da Costa Silva, R., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., Trends. Analyt. Chem. 37 (2012) 48-60.
- [12] Omegami, T. et al., J. Chromatogr. A 1184 (2008) 474-503.
- [13] Grumbach, E. S., Diehl, D. M., Neue U. D., J. Sep. Sci. 31 (2008) 1511.
- [14] Guo, Y., Gaiki, S, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920-5938.
- [15] Jandera, P., Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.
- [16] Buszewski, B., Noga, S., Anal Bioanal Chem 402 (2012) 233-236.
- [17] Jandera, P., J. Sep. Sci 31 (2008) 1421-1437.
- [18] Hemström, P., Urguj, K., J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [19] Berthold, A., Chány, S.S.C., Kullman, J.P.S., Armstrong, D.W., Talanta 47 (1998) 1001.
- [20] Guo, Y, Gaiki, S, J Chromatogr A 1074 (2005) 71-80.
- [21] Olšovská, J., Jurková, M., Kvasný prům. 58 (2012) 30-35.
- [22] McCalley, D.V., J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3408.
- [23] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., J. Sep. Sci. 31 (2008) 1449.
- [24] Ruta, J., Rudaz, S., McCalley, D. V., Veuthey, J. L., Guillarme, D., J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8230-8240.

- [25] Vlčková, H., Janák, J., Gottwald, T., Trejtnar, F., Solich, P., Nováková, L.,  
J Pharm Biomed Anal. 88 (2014) 337-344.
- [26] Vokurka, M., Hugo, J. et al., Velký lékařský slovník (2007).
- [27] Štaud, F. a kol.: studijní materiály k přednáškám z Farmakologie, Faf UK, Hradec  
Králové (2012/2013).
- [28] Wsól, V. a kol.: studijní materiály k přednáškám z Obecné biochemie, Faf UK,  
Hradec Králové (2011/2012).
- [29] Hartl, J. a kol., Farmaceutická chemie IV. (2006) 140-142.
- [30] Lincová, D., Farghali, H., Základní a aplikovaná farmakologie (2007).
- [31] Liegbott, P., Amouric, A, Comte, A., Research in microbiology 160 (2009) 757-  
766.
- [32] Spilková, J. a kol.: studijní materiály k přednáškám z Farmakognozie, Faf UK,  
Hradec Králové (2011/2012).

Hana Vičková  
 Kateřina Ježková  
 Kateřina Štětíková  
 Helena Tomšíková  
 Petr Solich  
 Lucie Nováková

Department of Analytical  
 Chemistry, Faculty of Pharmacy,  
 Charles University in Prague,  
 Hradec Králové, Czech Republic

Received January 8, 2014  
 Revised March 10, 2014  
 Accepted March 10, 2014

## Research Article

# Study of the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases used in hydrophilic interaction liquid chromatography

The retention behavior of a large group of analytes (35) with varied properties ( $pK_a$  and  $\log P$ ) was studied on eight hydrophilic interaction LC columns with different surfaces, stationary phase chemistries, and types of particles. The acetonitrile content (5–95%), buffer concentration (0.5–200 mM), and pH of the mobile phase (3.8 and 6.8) were evaluated for their effects on the retention behavior. The type of stationary phase had a significant impact on the selectivity and retention time of the tested analytes. Completely different selectivity was observed on the aminopropyl stationary phase. In this study, the influence of the buffer concentration was similar for all tested columns, except for the aminopropyl stationary phase. Increasing the buffer concentration led to decreased retention times for the basic compounds and increased retention times for the acidic compounds, while the inverse behavior was observed on the aminopropyl stationary phase. The selectivity of the individual stationary phases was evaluated at pH 3.8 and 6.8. Much lower selectivity differences between the stationary phases were observed at pH 6.8 than pH 3.8. Bare silica stationary phases were used in the comparison of the particles (fused-core and fully porous particles of 3 and 1.7  $\mu\text{m}$ ) and the columns provided by different manufacturers.

**Keywords:** Buffer concentration effects / Hydrophilic interaction liquid chromatography / pH effects / Retention mechanisms / Stationary phases  
 DOI 10.1002/jssc.201400020

## 1 Introduction

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is an alternative to RP and normal phase (NP) systems. RP and NP systems have considerable problems when polar compounds are analyzed. In RP systems, poor retention of the polar compounds frequently results in imperfect peak shape. While NP systems offer sufficient retention, they have worse reproducibility than RP systems. Additionally, polar compounds have low solubility in NP solvents, and they are incompatible with MS detection. Therefore, HILIC mode might be considered the best method for the analysis of polar compounds [1–3].

Although the acronym HILIC was first suggested by Alpert in 1990, the number of publications on HILIC has increased since 2003, which is due to the development of many new types of HILIC stationary phase [4]. The first generation of HILIC stationary phases (especially aminopropyl

silica materials) were initially used for the separation of carbohydrates in 1975 [5]. The first and second generation of HILIC columns were developed during the 1980s. The first generation included bare silica and an aminopropyl stationary phase attached to silica surfaces. The second generation included silica chemically modified with diol and amide groups [1, 3]. The amide silica column has been available since 1985. Both types of stationary phases have been used primarily for the determination of peptides and proteins [6–8]. Another group of stationary phases include poly(succinimide) and related stationary phases, such as poly(2-sulfoethyl aspartamide) and poly(2-hydroxyethyl aspartamide). The current selection of commercially offered HILIC stationary phases is very large and includes columns with many different surfaces (e.g. silica, polymers and hybrid materials) modified with a wide range of functional groups [1, 2]. The columns with sub-2  $\mu\text{m}$  particles that are compatible with ultra high performance liquid chromatography (UHPLC), and fused-core particle technology are available in the HILIC mode as well [9–11].

The HILIC separation mode combines a polar stationary phases and a less polar, mostly organic mobile phase [2]. In most cases, the mobile phase contains an aqueous acetonitrile mixture (>70% ACN), where water is the stronger elution solvent [10, 12]. Water is immobilized on the polar stationary phase surface, and the primary mechanism is hypothesized to be partitioning between the water layer and organic-rich mobile phase. However, other interactions, such as adsorption,

**Correspondence:** Dr. Lucie Nováková, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic  
 E-mail: nol@email.cz  
 Fax: +420-495067164

**Abbreviations:** HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography; NP, normal phase; UHPLC, ultra high performance liquid chromatography

ion exchange, hydrogen bonding, dipole–dipole interactions, and weak hydrophobic interactions, contribute to the HILIC separation mechanism and depend on the experimental conditions [1]. The multimodal HILIC mechanism is influenced by both the hydrophilic and hydrophobic interactions, which is significant, especially for compounds with more than one functional group [1, 2]. The selectivity of various HILIC stationary phases is influenced by the separation mechanisms. Several studies have evaluated the retention mechanisms and selectivity of various HILIC stationary phases using different groups of compounds, such as weak and strong acids, water-soluble vitamins, and basic analytes [10, 12–19]. Four large studies testing several stationary phases and large numbers of compounds have been presented [14, 15, 19, 20]. Kawachi et al. [19] tested 15 stationary phases with respect to the degree of hydrophilicity, the separation efficiency and the selectivity for methylene and hydroxy groups with different states and configurations. Based on these results, the HILIC stationary phases were divided into the two main groups according to the degree of hydrophilicity, and the results were summarized using radar graphs, which indicated the degree of selectivity for different functional groups and structures [19]. Another large study published by Dinh et al. [20] compared the selectivity and understanding of the retention mechanisms and investigated the relationship between the functional groups of the stationary phases and their interaction modes with 22 hydrophilic and polar stationary phases. The results showed that all of the bare silica columns were grouped close together because the selectivity was determined by the adsorption, whereas the zwitterionic columns showed selectivity that was attributed to partitioning. The neutral and aminopropyl columns demonstrated a combination of the adsorption and partitioning mechanisms. The HILIC columns with various chemistries provided radically different selectivity. The phases with smaller pore diameters yielded longer retention of analytes, but reducing the pore and particle diameters did not significantly change the column selectivity [20]. A report published by Fountain et al. [15] studied the influence of the mobile phase pH and stationary phase chemistry on the retention, selectivity, and MS response. Five HILIC columns (three commercial and two prototypes) and 28 compounds were included in this study. The results demonstrated a large selectivity difference between pH 3 and 9 on the same column for both acidic and basic compounds. Out of the tested HILIC stationary phases, the greatest selectivity differences were observed for the cyanophenyl-bonded phase. Important selectivity differences were observed between acetone and ACN-containing mobile phases. However, acetone was not suitable for direct replacement of ACN in HILIC due to lower MS signals and a higher cut-off value in UV detection [15]. Guo et al. [14] presented the results from tests of four polar stationary phases (aminopropyl, amide, silica, and sulphobetaine). The effects of the ACN content, buffer type and concentration, and pH on the retention of ten polar analytes in HILIC separation were investigated. This study confirmed that nonspecific secondary and ionic interactions of the model compounds with the functional groups on the

stationary phase had an influence on the selectivity. The most significant differences in selectivity were found for the acidic compounds on the aminopropyl stationary phase and the basic analytes on the bare silica stationary phase. The bare silica phase had the lowest retention out of the four tested stationary phases. The influence of the column temperature on the retention was also investigated. A linear relationship between  $\ln k$  and  $1/T$  (temperature) was observed for all four tested HILIC columns and RP mode. In agreement with the above-mentioned studies, the different retention characteristics of the tested stationary phases were revealed. The bare silica stationary phase had the weakest retention and a different selectivity than the other three tested HILIC columns [14]. Several studies [21, 22] compared different types of organic modifiers (acetone and THF) on various HILIC stationary phases and confirmed that ACN was the most suitable organic solvent for the HILIC mode, irrespective of the type of HILIC stationary phase.

Although several studies have already tested the retention mechanisms and selectivity of HILIC columns, a complex study that includes the different types of HILIC stationary phases, hybrid stationary phases used in UHPLC and sorbents with fused core particles has not yet been performed.

The aim of this study was to provide insight into the retention mechanisms of a large group of HILIC columns, including unmodified and modified stationary phases (aminopropyl, amide, diol, and cyanopropyl) with different types of surfaces (silica and hybrid) and particle size (3  $\mu\text{m}$ , 1.7  $\mu\text{m}$  and fused-core particles). The retention behavior and selectivity were investigated under different chromatographic conditions. The influence of the mobile phase parameters, such as the ACN content, buffer concentration and pH, were studied. Unlike previous studies, the influence of ACN was tested under both the HILIC and RP conditions (in the range of 5–95% ACN), and the changes in selectivity between pH 3.8 and 6.8 were evaluated as well. Thirty five small polar compounds were selected on the basis of their physicochemical properties ( $\log P$  and  $pK_a$ ).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

Water was obtained from a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA, USA). HPLC-grade ACN, acetic acid (>99.7%), ammonium hydroxide (>25%), and ammonium acetate (>98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). All tested compounds, atenolol (>98%), metoprolol (>98%), pyridoxine (>98%), creatinine (>98%), cytosine (>99%), *p*-anisic acid (>99%), 2,3-hydroxybenzoic acid (>99%), *p*-hydroxybenzoic acid (>99%), gentisic acid (>98%), tyrosol (>98%), nicotinamide (>98%), caffeine (>98%), paracetamol (>97%), salicylic acid (>99%), theophylline (>97%), gallic acid (>98%), vanillic acid (>97%), ferullic acid (>99%), caffeic acid (>98%), sinapic acid (>98%), syringic acid (>95%), ascorbic acid (>99%),

**Table 1.** Specifications of the tested HILIC columns

Column name	Phase type	Bonded group	Dimension (mm)	Particle size ( $\mu\text{m}$ )	Pore size (Å)	Surface area ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
Atlantis Silica HILIC	Silica	Unbonded	2.1 × 100	3	100	330
Luna NH <sub>2</sub>	Silica	Aminopropyl-	2.0 × 100	3	100	400
Luna HILIC (diol)	Silica	Dihydroxypropyl-	3.0 × 100	3	200	200
Zorbax HILIC plus	Silica	Unbonded	2.1 × 100	3.5	95	160
Ascentis ES Cyano	Silica	Diisopropyl cyanopropyl-	2.1 × 100	3	100	450
Ascentis Express HILIC	Silica	Unbonded	2.1 × 100	2.7 (fused core)	90	135
Acquity BEH HILIC	hybride (BEH)	Unbonded	2.1 × 100	1.7	130	185
Acquity BEH AMIDE	hybride (BEH)	Amide	2.1 × 100	1.7	130	185

shikimic acid (>99%), uracil (>99%), adenosine (>99%), guanine (>99%), adenine (>99%), guanosine (>99%), cytidine (>99%), uridine (>99%), pindolol (>98%), acebutolol (>98%), propranolol (>99%), thiamin (>99%), and thymine (>99%) were obtained from Sigma-Aldrich.

## 2.2 Standard solutions

Stock standard solutions of the individual analytes were prepared by dissolving the appropriate amounts in ACN or in a mixture of ACN/water (50:50) to a final concentration of 1 mg/mL. Only guanine was prepared at a concentration 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by dissolving in aqueous ammonium hydroxide due to poor solubility. The working solutions of the analytes were further diluted with a mixture of ACN/water to match the composition of the mobile phase. The concentrations of the working solutions were 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with the exception of atenolol, metoprolol, creatinine, pyridoxine and ascorbic acid, which had concentrations of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 2.3 Investigation of the HILIC stationary phases and compounds

The tests were performed on eight different HILIC columns that are listed in Table 1. All tested stationary phases had polar character and were formed from silica or hybrid materials. Various modifications of the HILIC stationary phases (bare silica, aminopropyl, amide, diol, and cyanopropyl) and also the same types of stationary phases provided by various vendors were investigated in this study.

A group of 35 polar, pharmaceutically significant analytes, including acids, bases, amphoteric and neutral compounds, was chosen for this study. The choices were made with regard to the polarity and hydrophilicity ( $\log P$  and  $\text{p}K_{\text{a}}$ ). The tested compounds and their chemical properties are summarized in Table 2 (data obtained from the SciFinder Scholar database).

## 2.4 Instrumentation and chromatography

An Acquity UPLC UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA) consisting of an ACQ-binary solvent manager, ACQ-sample manager, ACQ-column thermostat maintained at

**Table 2.** Summary of the tested compounds and their physico-chemical properties

Compounds	MW	$\log P$	$\text{p}K_{\text{a}1}$ (acid)	$\text{p}K_{\text{a}2}$ (basic)
Atenolol	266.34	0.335	13.88	9.43
Metoprolol	267.36	1.632	13.89	9.43
Pindolol	248.32	1.680	13.94	3.77
Acebutolol	336.43	1.769	13.78	9.40
Propranolol	259.34	2.900	13.84	9.50
Uracil	112.09	-1.037	8.95	-4.19
Adenosine	267.24	-0.755	13.11	3.82
Cytosine	111.10	-1.962	9.00	4.18
Guanine	151.13	-0.960	9.63	3.40
Adenine	244.20	-1.581	9.36	-
Guanosine	283.24	-1.466	13.24	3.12
Cytidine	243.22	-1.808	13.48	4.26
Uridine	244.20	-1.581	9.39	-
Pyridoxine	169.18	-0.831	9.63	5.01
Creatinine	113.12	-0.802	-	6.89
Tyrosol	138.16	0.851	10.17	-
Nicotinamide	122.13	-0.368	14.83	3.54
Caffeine	194.19	-0.628	-	0.52
Paracetamol	151.16	0.475	9.86	1.72
Theophylline	180.16	-0.276	8.60	1.64
Thiamine	-	-	-	-
Thymine	126.11	-0.621	9.24	-4.15
<i>p</i> -Anisic acid	152.15	1.776	4.47	-
2,3-Dihydroxy benzoic acid	154.12	0.808	3.96	-
<i>p</i> -Hydroxy benzoic acid	138.12	1.401	4.57	-
Gentisic acid	154.12	1.396	3.01	-
Salicylic acid	138.12	2.011	3.01	-
Gallic acid	170.12	0.531	4.33	-
Vanilic acid	168.15	1.304	4.45	-
Ferulic acid	194.18	0.963	4.58	-
Caffeic acid	180.16	0.663	4.58	-
Sinapic acid	224.21	0.997	4.53	-
Syringic acid	198.17	1.283	4.33	-
Ascorbic acid	176.12	-2.410	4.37	-
Shikimic acid	174.15	-2.220	4.48	-

MW: molecular weight,  $\log P$ : partition coefficient.

30°C, and a photo diode array detector was used for the measurement. The Empower software was employed for the data acquisition and analysis. The detection wavelength was 254 nm.

The entire study was carried out with a mobile phase consisting of ACN and an aqueous component (acetic acid or ammonium acetate with different pH values). An aqueous–organic mobile phase was pumped isocratically at a flow rate of 0.3 or 0.7 mL/min based on the column dimensions. Different ACN contents (over the range of 5–95%), various buffer concentrations (0.5, 5, 50, and 200 mM) and two buffer pHs (3.8 and 6.8) were tested to determine the retention and selectivity differences. The pHs of the water components of the mobile phases were adjusted using acetic acid or ammonium hydroxide before mixing with ACN. The void retention times of the columns were determined based on the retention time of toluene and were used in the calculations of the retention factors.

The following buffers were used: 50 mM ammonium acetate at pH 4.8 for the evaluation of effect of the % of ACN, 50 mM ammonium acetate at pH 3.8 and 6.8 for the evaluation of the effect of the pH on the selectivity and 0.5, 5, 50, and 200 mM ammonium acetate at pH 4.8 for the evaluation of the effect of the buffer concentration.

## 2.5 Evaluation of the selectivity and retention mechanism

The selectivity of individual stationary phases was evaluated using linear regression and the correlation coefficient ( $r^2$ ) of the plot. The plots expressed the correlation between two values of the retention factors obtained at two different conditions. The selectivity ( $s$ ) was calculated using the following equation:

$$s^2 = 1 - r^2 \quad (1)$$

A value of 0 indicated that the two different stationary phases did not have any significant selectivity difference. A value of 1 indicated that the selectivity of both columns was completely orthogonal [23].

The HILIC retention mechanism was assessed using the two equations that describe a pure adsorptive or partitioning process. The retention in RP chromatography is based on the partitioning process described by the following equation:

$$\log k' = \log k'_w - S\varphi \quad (2)$$

where  $k'_w$  is the capacity factor for the weaker eluent component (water) as the only mobile phase component,  $\varphi$  describes the volume fraction (concentration) of the stronger member of the binary mobile phase mixture, and  $S$  is the slope of  $\log k'$  versus  $\varphi$  when fitted using a linear regression model [2, 24].

The adsorption mechanism is described by the relationship between the retention factor and volume fraction of the stronger solvent in the mobile phase. This mechanism is typical for NP chromatography and is described as follows:

$$\log k' = \log k'_B - \frac{A_S}{n_B} \log N_B \quad (3)$$

where  $k'_B$  is the solute retention factor with pure B as the eluent,  $A_S$  and  $n_B$  are the cross-sectional areas occupied by the solute molecule on the surface and B molecules, respectively, and  $N_B$  is the mole fraction of the stronger member B in the eluent [2, 25].

Based on these two equations, plots of  $\log k'$  and  $\varphi$  (lin–log plot) and  $\log k'$  and  $\log \varphi$  (log–log plot) were constructed to help describe the HILIC retention mechanisms. The lin–log plots were used in the evaluation of the partitioning process, and the log–log plots were used in the evaluation of the adsorption process. Both mechanisms were assessed via the linear regression of the plots [16].

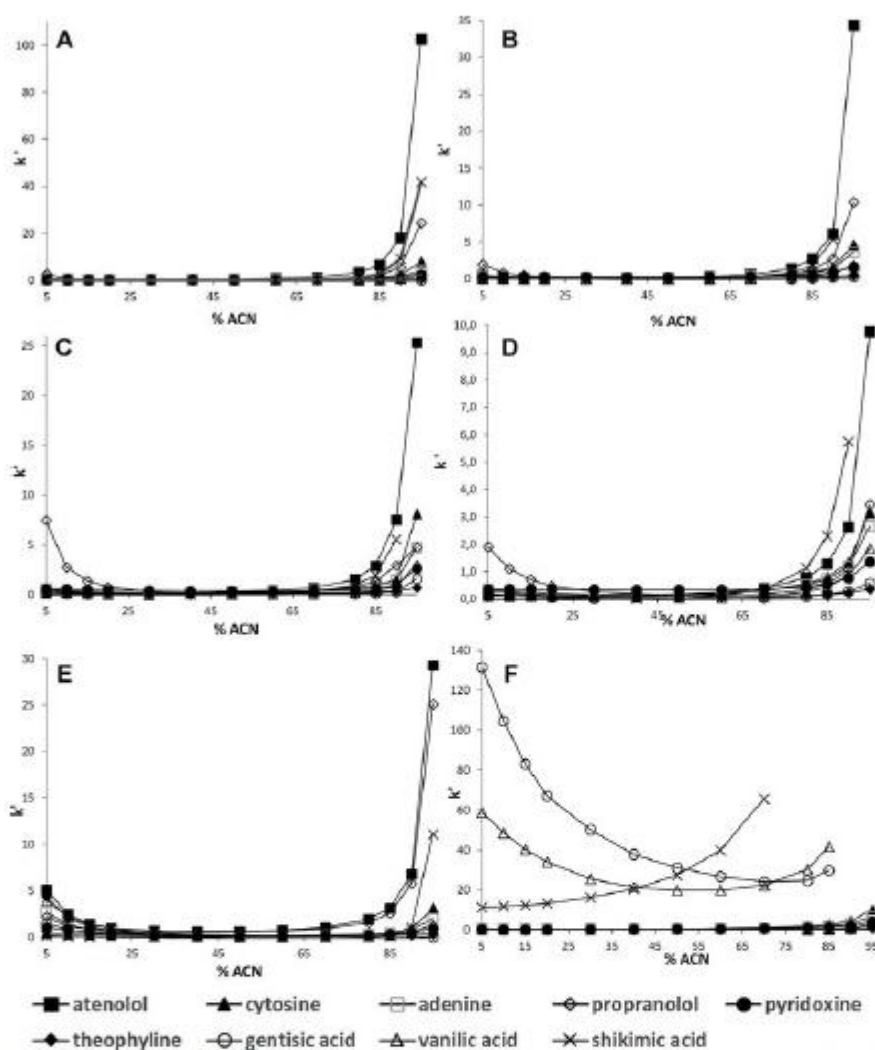
## 3 Results and discussion

### 3.1 Retention and selectivity of the HILIC stationary phases

#### 3.1.1 The effect of the acetonitrile content and the stationary phase

The content of ACN in the mobile phase is considered to be the most important factor influencing the retention in HILIC mode after the choice of stationary phase [9]. Nine typical analytes, including two bases, nucleotide bases, neutral compounds, and three acids, were chosen for the presentation of the results. Their retentions were studied over the range of 5–95% at a constant buffer concentration of 50 mM to suppress the ion-exchange interactions [26, 27]. The aqueous part of the mobile phase was adjusted to pH 4.8. Plots of the retention factor  $k' = f(\% \text{ ACN})$  as a function of the stationary phases with different chemistries were constructed and shown in Fig. 1.

When the influence of the ACN content was investigated over the range (5–95%), the typical HILIC behavior that showed decreasing retention time with decreasing ACN content (95–70%) and the typical RP behavior that showed increasing retention time with decreasing ACN content (30–5%) should be observed. However, the typical RP behavior was observed to a lesser extent for acidic and neutral compounds on all stationary phases except for cyanopropyl and aminopropyl. Only one compound, propranolol, showed intensive RP behavior on all stationary phases, which was caused by its higher hydrophobicity ( $\log P$  2.9). In agreement with the previously published studies, the typical HILIC behavior of decreasing retention time with decreasing ACN content was observed for most of the investigated compounds on all tested stationary phases. Generally, for all tested stationary phases, except for aminopropyl, the investigated neutral, acidic and basic analytes were weakly retained in the range of 50–80% ACN. A significant increase in the retention time was observed at >85% ACN where the hydrophilic interactions were dominated, which is in agreement with the previously published results [14, 19]. However, theophylline and gentisic acid were weakly retained at any concentration of ACN



**Figure 1.** Effect of the ACN content on the retention factors of selected analytes on the stationary phases with different chemistries: bare silica (A), BEH HILIC (B), diol (C), amide (D), cyanopropyl (E), aminopropyl (F). Mobile phase: ACN/50 mM ammonium acetate at pH 4.8.

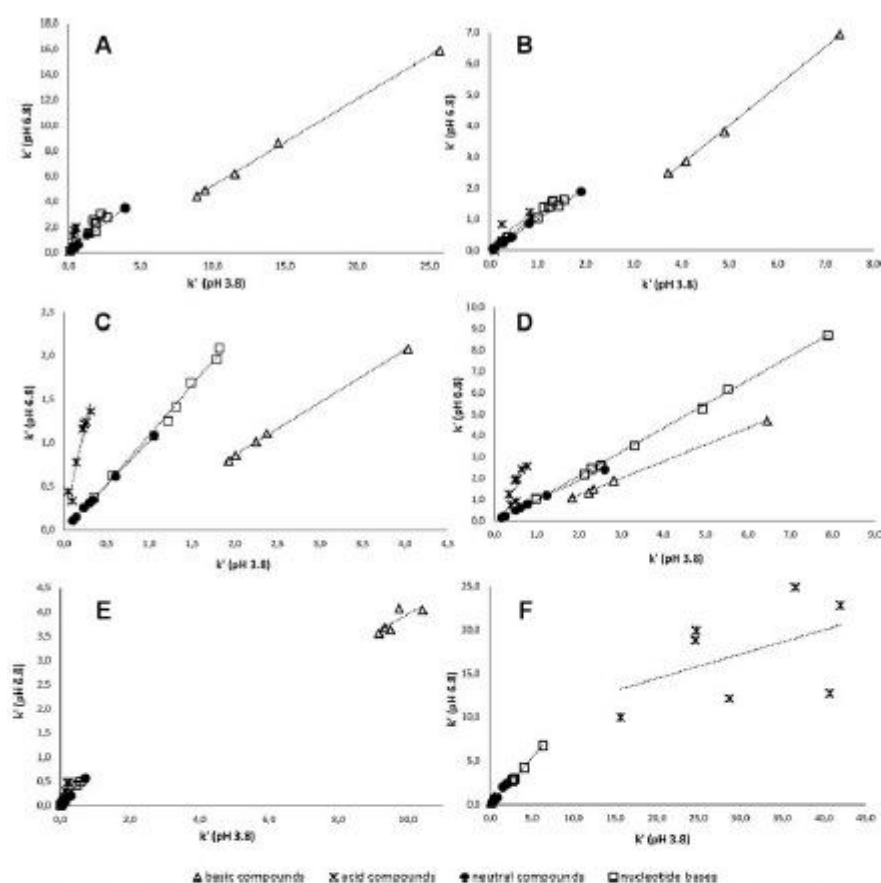
on all stationary phases except for aminopropyl. Conversely, shikimic acid, and basic compounds were the most strongly retained at >90% ACN.

Atypical behavior was observed on the cyanopropyl stationary phase. Except for shikimic acid, a lower retention of the investigated neutral and acidic analytes was observed in the range of 80–95% ACN (HILIC behavior) compared to the range from 20 to 5% ACN (RP behavior). Most investigated acidic and neutral compounds experienced greater retention ( $k'$  2–9) at RP conditions than HILIC conditions ( $k'$  approximately 1). Only the beta-blockers included in this study,

that is, atenolol and propranolol, had both typical HILIC and RP behavior. These compounds showed distinctive U-shaped plots (Fig. 1).

The aminopropyl stationary phase showed typical HILIC and RP behavior as well (Fig. 1). However, RP behavior was observed only for the acidic compounds (except shikimic acid), and HILIC behavior was observed for all of the investigated compounds. The acids were retained extremely strongly on the aminopropyl stationary phase in both modes (HILIC and RP). Most of investigated acidic compounds were impossible to analyze at >85% ACN, as their retention times were





**Figure 2.** Influence of the pH on the retention time of the tested analytes on the different stationary phases: bare silica (A), BEH HILIC (B), diol (C), amide (D), cyanopropyl (E), and aminopropyl (F). Mobile phase: ACN/50 mM ammonium acetate (90:10) at pH 3.8 and 6.8.

longer than 2 h. Compared with the other stationary phases, the basic compounds were much more weakly retained, even at high ACN concentrations.

### 3.1.2 The effect of the mobile phase pH

The effect of the pH on the retention behavior in HILIC was investigated at acidic and neutral pH (3.8 and 6.8) using 50 mM ammonium acetate. A basic pH was not possible due to the stability limitations of most of the stationary phases. A constant concentration of the buffer (50 mM) and a constant content of ACN (90%) were used. The pH of the water component was adjusted using ammonium hydroxide or acetic acid prior to mixing with ACN. The results for all of the stationary phases are shown in Fig. 2. Table 3 depicts the correlation coefficients and slopes of the linear regression plots, comparing the retention factors of the nucleotide bases, neutral, basic, and acidic compounds at pH 3.8 and 6.8.

As expected, the pH of mobile phase did not influence the retention of any investigated nucleotide base or neutral com-

pound as the analytes occurred in neutral state at the both pH values (3.8 and 6.8). For ionizable compounds, the retention time was influenced by the pH, and generally favored the charged state due to its higher hydrophilicity. Thus, as the pH increased, the retention times of the basic compounds decreased, and the retention times of the acidic compounds increased (Fig. 2). The acids occurred in their deprotonated states at pH 6.8; therefore, their hydrophilicity was higher than at pH 3.8.

Bare silica stationary phases were much more retentive for the basic compounds, especially the beta-blockers, including atenolol, metoprolol, pindolol, acebutolol, and propranolol (analytes with  $pK_a > 9$ ), than the other stationary phases. The long retention times may be attributed to the ionic interactions between the positively charged basic analytes, negatively charged ionized silanol groups, and high hydrophilicity of these analytes. While the acidic compounds were weakly retained at pH 3.8, the most intensive influence of pH was observed for these compounds on the bare silica stationary phases (the linear plots of the acidic compounds are shown

**Table 3.** Correlation coefficients and slopes from the plots comparing the retention factors of the nucleotide bases, neutral, basic, and acidic compounds at pH 3.8 and 6.8

Stationary phase	Neutral compounds		Nucleotide bases		Basic compounds		Acid compounds	
	Slope	$r^2$	Slope	$r^2$	Slope	$r^2$	Slope	$r^2$
Diol	1.018	0.999	1.141	0.992	0.6051	0.999	4.217	0.928
Cyanopropyl	0.773	0.996	0.861	0.983	0.4086	0.689	1.386	0.373
Amide	0.912	0.998	1.123	0.999	1.072	0.901	4.014	0.669
Aminopropyl	1.271	0.965	2.688	0.941	1.712	0.908	0.277	0.219
BEH HILIC	0.998	0.999	1.065	0.963	1.255	0.999	1.124	0.728
Silica HILIC (ZDBRAX)	0.884	0.994	1.096	0.852	0.682	0.999	4.190	0.958
Silica HILIC (ATLANTIS)	0.966	0.999	1.109	0.893	0.978	0.998	5.563	0.901
Silica HILIC (fused core)	0.951	0.997	1.134	0.872	0.615	0.999	5.470	0.950

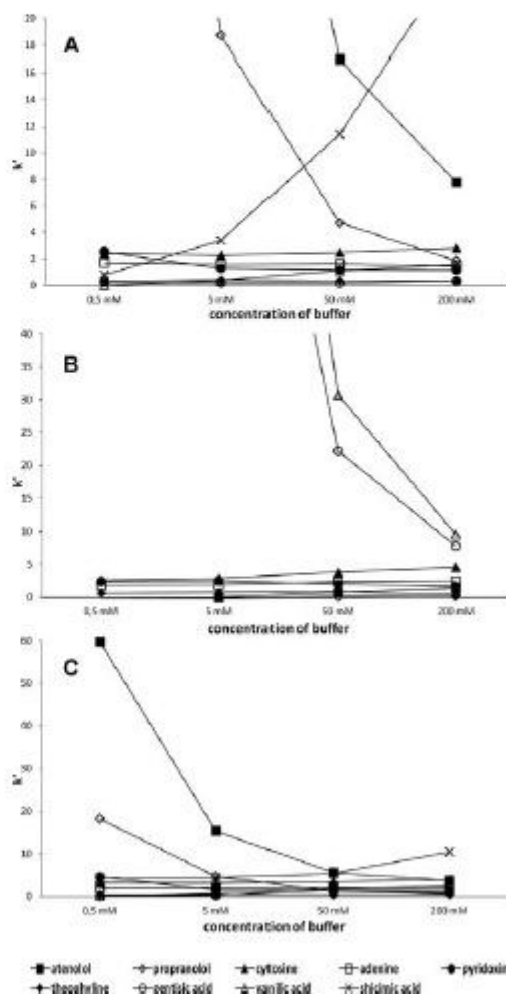
in Fig. 2A and the slopes from the linear plots, which were between 4 and 5.5 for all three bare silica stationary phases, are shown in Table 3).

Similar retention behavior and pH effects for the acidic analytes were observed on the diol stationary phase. However, the diol stationary phase was much less retentive for the basic compounds than the bare silica stationary phase (e.g. the retention factor of atenolol was 4.1 on the diol stationary phase and 21.1 on the bare silica stationary phase at pH 3.8). The effect of the pH on the basic compounds was similar (the linear plots of the basic compounds are shown in Fig. 2 for the bare silica and diol stationary phases and the slopes from the linear plots, which were approximately 0.6, are shown in Table 3).

The basic compounds showed a lower dependence on the pH when using the amide stationary phase. Nonetheless, a stronger dependence on the pH was observed for the acidic compounds compared to bare silica stationary phase. Compared to the other stationary phases, different retention behaviors for the nucleotide bases were observed on the amide stationary phase; they were retained twice as long. It could be concluded that the amide stationary phase provided enhanced selectivity for this group of compounds.

Completely different behavior was observed on the aminopropyl stationary phase. Short retention times and insignificant changes in the retention time were observed for the basic and neutral compounds. This behavior can be attributed to the existence of electrostatic repulsion between the ionized basic compounds and the positively charged amino groups of the stationary phase. The influence of the pH and the long retention times on the aminopropyl stationary phase were significant for the investigated acids. Because the acids ( $pK_a < 4.5$ ) were deprotonated at pH 6.8, they were more strongly retained due to the ionic interactions with the positively charged aminopropyl groups.

The influence of the pH was compared for the different types of bare silica columns (various manufacturers) and for different particle types (fused core and fully porous particles). As expected, no influence of the particle type for similar materials was found. The hybrid and silica-based stationary phases were compared with respect to pH as well. The results



**Figure 3.** Influence of the buffer concentration on the retention time of the tested analytes on bare silica (A), aminopropyl (B) and amide (C) stationary phases. Mobile phase: ACN/ammonium acetate at pH 4.8 (90:10)

**Table 4.** (A) the comparison of the selectivity of the bare silica and other stationary phases for nucleotide bases, neutral, basic, and acidic compounds, and (B) the comparison of the selectivity of the aminopropyl and other stationary phases for the nucleotide bases, neutral, basic, and acidic compounds

Stationary phase	Neutral compounds		Nucleotide bases		Basic compounds		Acid compounds	
	$s^2$ (pH 3.8)	$s^2$ (pH 6.8)	$s^2$ (pH 3.8)	$s^2$ (pH 6.8)	$s^2$ (pH 3.8)	$s^2$ (pH 6.8)	$s^2$ (pH 3.8)	$s^2$ (pH 6.8)
<b>(A)</b>								
Diol	0.0287	0.0246	0.1502	0.0888	0.1207	0.1171	0.0897	0.1559
Cyanopropyl	0.0893	0.1053	0.3259	0.4086	0.9657	0.9107	0.7754	0.831
Amide	0.0689	0.0534	0.499	0.3271	0.0626	0.0647	0.8377	0.3371
Aminopropyl	0.1608	0.1311	0.6284	0.8709	0.4315	0.2150	0.9616	0.5971
BEH HILIC	0.0006	0.0023	0.0163	0.0352	0.0025	0.0023	0.0172	0.0009
Silica HILIC (ZORBAX)	0.0041	0.0017	0.0007	0.0057	0.0005	0.0019	0.0875	0.0013
Silica HILIC (fused core)	0.0119	0.0092	0.0007	0.0021	0.0013	0.005	0.0045	0.0049
<b>(B)</b>								
Diol	0.0720	0.1054	0.9751	0.9852	0.2842	0.0203	0.6304	0.5340
Cyanopropyl	0.5069	0.3251	0.9472	0.8778	0.8577	0.8708	0.8671	0.7622
Amide	0.0715	0.0294	0.9928	0.2387	0.3254	0.0153	0.7228	0.0119
BEH HILIC	0.4110	0.4125	0.7425	0.2804	0.2171	0.2197	0.9202	0.4490
Silica HILIC (ZORBAX)	0.5312	0.3973	0.6026	0.2670	0.4194	0.1779	0.9455	0.2123
Silica HILIC (ATLANTIS)	0.1608	0.1311	0.6284	0.1723	0.4315	0.2150	0.9616	0.5971
Silica HILIC (fused core)	0.4034	0.5385	0.6021	0.1480	0.4491	0.2439	0.9993	0.6925

demonstrated a smaller pH effect on the hybrid stationary phase than on the silica-based stationary phases (Fig. 2A and B).

### 3.1.3 The effect of the buffer concentration

The effect of buffer concentration was tested in the range of 0.5–200 mM. A mixture of ACN/ammonium acetate at pH 4.8 and a ratio of 90:10 was used as the mobile phase for all tested columns, except for the aminopropyl stationary phase, where a ratio of 80:20 was used. The influence of the buffer concentration on the retention times of the selected compounds on bare silica, aminopropyl and amide stationary phases is shown in Fig. 3.

The changes in the retention times for the nucleotide bases and neutral analytes (except for creatinine and pyridoxine) were negligible. All tested stationary phases showed nearly the same behavior. The retention times for most acidic compounds on most modified and bare silica stationary phases were slightly longer as the buffer concentration increased. A higher concentration of the buffer weakened the electrostatic repulsion between the negatively charged acid and the negatively charged stationary phase due to the deprotonation of the silanol groups. The smallest influence of the buffer concentration was observed on the cyanopropyl stationary phase. The largest changes in the retention times for the tested acids were shown on the aminopropyl stationary phase. The effect of the buffer concentration was even more significant and inverse for the basic compounds. Thus, with increasing buffer concentration, the retention time decreased for the bare silica stationary phase, as shown in Fig. 3A. A similar behavior was observed for the other stationary phases, except for the aminopropyl stationary phase.

The fact that, on all of the stationary phases despite the different functional groups (including cyanopropyl and the hybrid stationary phases), the buffer concentration influenced the retention of both the acidic and basic compounds indicated that the increased retention time could be due to the hydrophilic partitioning process, which is affected by the increased volume and hydrophilicity of the immobilized liquid layer, leading to stronger retention of the analytes [9, 14].

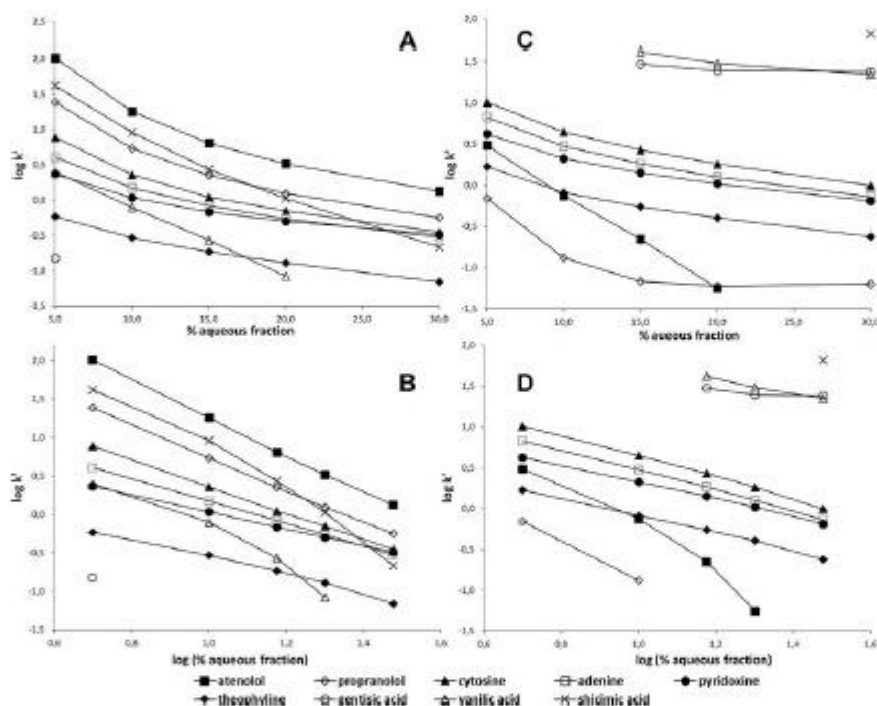
A completely different effect of the buffer concentration was observed on the aminopropyl stationary phase (Fig. 3B). The retention increased with increasing buffer concentration for the basic compounds and decreased significantly for acidic compounds. A very long retention time (> 120 min) and strong dependence on the buffer concentration was observed for the acidic compounds; therefore, ACN/ammonium acetate at pH 4.8 and a ratio of 80:20 was used as the mobile phase. The retention factors for most of the acidic compounds were > 120 in 5 mM ammonium acetate; therefore, it was impossible to include the lowest buffer concentration (0.5 mM ammonium acetate) in this study.

### 3.2 The selectivity and retention mechanism of the stationary phases

Eight HILIC columns were chosen for this study: bare silica and modified silica-based stationary phases (aminopropyl, amide, diol, and cyanopropyl) with different types of surfaces (silica and hybrid) and particles (fully porous particles of 3  $\mu\text{m}$  and 1.7  $\mu\text{m}$  and fused core particles). Columns with the same stationary phase were provided by two different vendors. The selectivity of these columns was compared at both acidic and

**Table 5.** Summary of the correlation coefficients of the lin–log and log–log plots for all of the tested columns and selected compounds

Compounds	Bare silica HILIC		Diol		Amide		Cyanopropyl		Aminopropyl		BEH HILIC		Ascentis express	
	lin–log	log–log	lin–log	log–log	lin–log	log–log	lin–log	log–log	lin–log	log–log	lin–log	log–log	lin–log	log–log
Atenolol	0.9528	0.9998	0.9141	0.9995	0.9400	0.9844	0.8856	0.9983	0.9992	0.9637	0.9733	0.9990	0.9650	0.9999
Propranolol	0.8917	0.9999	0.9223	0.9999	0.9749	0.9335	0.8777	0.9989	—	—	0.9310	0.9998	0.8885	0.9993
Cytosine	0.9474	0.9999	0.9416	0.9999	0.8346	0.9772	0.9219	0.9996	0.9506	0.9972	0.9144	0.9996	0.9098	0.9996
Adenine	0.8698	0.9999	0.9355	0.9998	—	—	0.9083	0.9989	0.9441	0.9985	0.9161	0.9997	0.9066	0.9991
Pyridoxine	0.8364	0.9991	0.8802	0.9983	0.7810	0.9791	0.8929	0.9935	0.9441	0.9985	0.8956	0.9972	0.8531	0.9979
Theophylline	0.8799	0.9996	0.9694	0.9982	0.8807	0.9822	0.8704	0.9999	0.9474	0.9972	0.9401	0.9990	0.9442	0.9997
Gentisic acid	—	—	0.9961	0.9824	0.8577	0.9905	—	—	0.6662	0.7499	0.9091	0.7686	0.9896	0.9606
Vanillic acid	0.9877	0.9094	0.9870	0.9815	0.9366	0.9988	0.8893	0.9933	0.9588	0.9875	0.9887	0.9704	0.9979	0.9753
Shikimic acid	0.979	0.9910	0.9875	0.9991	0.9792	0.9999	0.9999	0.9769	—	—	0.9739	0.9997	0.9889	0.9995



**Figure 4.** Plots of log *k* versus volume fraction of water in the mobile phase for the bare silica (A) and aminopropyl stationary phases (C). Plots of log *k* versus log volume fraction of water in the mobile phase for the bare silica (B) and aminopropyl stationary phases (D). Mobile phase: ACN/50 mM ammonium acetate at pH 4.8.

neutral pH (3.8 and 6.8). The differences in the selectivity were evaluated on bare silica (the column of first choice and the gold standard for HILIC) and all other columns separately for the nucleotide bases and the neutral, basic and acidic compounds. The values of *s*<sup>2</sup> (selectivity differences) are shown in Table 4A.

The results indicated that, in most cases, much higher selectivity differences were obtained at pH 3.8 than pH 6.8. The most important changes in selectivity between pH 3.8 and 6.8 were found for the acidic compounds on the aminopropyl

(*s*<sup>2</sup> = 0.962 and 0.597) and amide stationary phases (*s*<sup>2</sup> = 0.838 and 0.337). Insignificant changes in selectivity were observed on the diol and cyanopropyl columns between pH 3.8 and 6.8. When compared to the bare silica stationary phase, no differences in selectivity were observed for the neutral compounds on any column. Very similar selectivity were found on the bare silica and diol stationary phases for the nucleotide bases, neutral, acidic, and basic analytes. The cyanopropyl column had a completely different selectivity for the basic compounds at both pH values (*s*<sup>2</sup> = 0.966 for pH 3.8 and 0.911 for pH 6.8).

The amide stationary phase differed from the other stationary phases in selectivity for the acidic compounds at pH 3.8 (Table 4A). In agreement with the previous study [14], the largest differences in selectivity for all compounds were observed on the aminopropyl stationary phase. Therefore, the values of  $s^2$  for the aminopropyl stationary phase were calculated and compared to the other stationary phases; they are shown in Table 4B.

Three bare silica stationary phases (Atlantis silica HILIC, BEH HILIC, and Ascentis Express HILIC) were used in the comparison of the selectivity of columns with different surfaces (silica and hybrid) and different types of particles (fused core and fully porous materials). As expected, the selectivity of these columns were similar at both pH values. Therefore, the influence of the hybrid material and fused core material on the selectivity of individual columns was negligible. The selectivity of the two bare silica stationary phases provided by two different vendors were found to be the same (Table 4A).

The experiments used for the estimation of the retention mechanisms were conducted under the same conditions as in section 3.1. The evaluation of the retention mechanism was performed over an aqueous fraction range from 5 to 30%. The log–lin and log–log plots were constructed for the evaluation of the influence of the concentration of the aqueous fraction on the overall retention mechanism. The correlation coefficients of the lin–log and log–log plots are shown in Table 5. The lin–log and log–log plots for the bare-silica and aminopropyl stationary phases are shown in Fig. 4. However, based on the results in Table 5, very poor linearity for both the lin–log and log–log plots was observed for most stationary phases. Sufficient linearity in the log–log plots was obtained only for a few compounds: atenolol, propranolol, cytosine, and adenine on the bare silica and diol stationary phases. For these reasons, the determination of the retention mechanisms, especially the contribution of the adsorption and partitioning mechanisms, was difficult to perform. In conclusion, the HILIC retention behavior for all of the investigated stationary phases was influenced by the mixed-mode retention mechanisms, which is in agreement with the previously published studies [15, 19, 28–32].

#### 4 Concluding remarks

This study was focused on an investigation of the retention behavior and HILIC mechanisms of 35 analytes depending on the ACN%, pH, and concentration of a buffer. HILIC stationary phases with various chemistries provided different retention times and selectivity for the tested analytes. Completely different retention times and selectivity were found, especially for the aminopropyl stationary phase. Very strong retention was found for the acidic compounds due to the ion-exchange effect. Conversely, the bare silica stationary phase was much more retentive for the basic compounds compared to the other tested stationary phases due to the interactions between the surface silanols and ionized analytes. With the exception of the aminopropyl stationary phase, the influence

of the buffer concentration was similar for all of the tested columns. As the buffer concentration increased, retention of the basic compounds decreased, and retention of the acidic compounds increased. The pH of the mobile phase did not influence the retention of the neutral compounds or nucleotide bases. However, for the ionizable compounds, the retention was significantly influenced by the pH. Generally, as the pH increased, retention time of the basic compounds decreased, and retention time of the acidic compounds increased on all stationary phases except for aminopropyl, where an opposite effect was observed. The selectivity of the individual stationary phases was evaluated at pH 3.8 and 6.8. In this study, a lower selectivity for all of the tested stationary phases was observed at pH 6.8 compared to pH 3.8. Bare silica stationary phases were used in the comparison of the fused core column and the fully porous stationary phases with a particle size of 3 and 1.7  $\mu\text{m}$ . The retention of analytes on the same stationary phase provided by two different vendors was also compared and a similar behavior was observed.

*The authors wish to thank Prof. Jandera from the University of Pardubice for valuable discussion and help. The authors also acknowledge the financial support of the research projects of Charles University in Prague UNCE 17/2013, SVV/2014/260063 and GAUK 385 311/2011. This publication is a result of the project implementation of "Support of the establishment, development and mobility of quality research teams at the Charles University", project number CZ.1.07/2.3.00/30.0022, supported by The Education for Competitiveness Operational Programme (ECOP), and cofinanced by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

#### 5 References

- [1] Gama, R. M., Gomes da Costa Silva, R., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2012, 37, 48–60.
- [2] Hermstöm, P., Irgum, K., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1784–1821.
- [3] Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 474–503.
- [4] Alpert, J. A., *J. Chromatogr. A* 1990, 499, 177–196.
- [5] Linden, J. C., Lawhead, C. L., *J. Chromatogr.* 1975, 105, 125–133.
- [6] Regnier, F. E., Noel, R., *J. Chromatogr. Sci.* 1976, 14, 316–320.
- [7] Rubinstein, M., *Anal. Biochem.* 1979, 98, 1–7.
- [8] Yoshida, T., *J. Chromatogr. A* 1998, 911, 61–97.
- [9] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5920–5938.
- [10] Chauve, B., Guillame, D., Cléon, P., Veuthey, J.-L., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 752–764.
- [11] Buszewski, B., Noga, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 231–247.
- [12] Jandera, P., Hájek, T., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 3603–3619.

- [13] Dejaegher, B., Heyden, Y. V., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 698–715.
- [14] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 2005, 1074, 71–80.
- [15] Fountain, K. J., Xu, J., Diehl, D. M., Morrison, D., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 740–751.
- [16] McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 3408–3417.
- [17] Karatapanis, A. E., Fiamegos Y. C., Stalikas, C. D., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 2871–2879.
- [18] Greco, G., Grosse, S., Letzel, T., *J. Chromatogr. A* 2012, 1235, 60–67.
- [19] Kawachi, Y., Ikegami, T., Takubo, H., Kegami, Y., Miyamoto, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5903–5919.
- [20] Dinh, N. P., Jonsson, T., Irgum, K., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5880–5891.
- [21] Li, R., Huang, J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1041, 163–169.
- [22] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1449–1464.
- [23] Neue, U. D., O’Gara, J. E., Mendez, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1127, 161–174.
- [24] Jandera, P., Churáček, J., Svoboda, L., *J. Chromatogr.* 1979, 174, 35–50.
- [25] Snyder, L. R., Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1980, 184, 363–413.
- [26] Karatapanis, A. E., Fiamegos Y. C., Stalikas, C. D., *Chromatographia* 2010, 71, 751–759.
- [27] Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S., *Chromatographia* 2007, 66, 223–229.
- [28] Olsen, B. A., *J. Chromatogr. A* 2001, 913, 113–122.
- [29] Jin, G., Guo, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Y., Liang, X., *Talanta* 2008, 76, 522–527.
- [30] Liu, M., Chen E. X., Ji, R., Semin D., *J. Chromatogr. A* 2008, 1188, 255–263.
- [31] Nguyen, H. P., Yang, S. H., Wigginton J. G., Simpkins, J. W., Schug, K. A., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 793–802.
- [32] Kaliková, K., Kozlik, P., Gilar, M., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2421–2429.