

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Zuzana Kadlecová

**CHARAKTERIZACE NOVÉ STACIONÁRNÍ FÁZE V HYDROFILNÍ
INTERAKČNÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAPHII**

Characterization of novel stationary phase in hydrophilic interaction liquid
chromatography

Diplomová práce

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

Konzultantka: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

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

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

V Praze dne 25. dubna 2019

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá podrobnou charakterizací nové diolové kolony, tj. Torus DIOL určené pro superkritickou fluidní chromatografii, v podmínkách hydrofilní interakční kapalinové chromatografie. Tato stacionární fáze má diolové ligandy vázané na tzv. BEH („bridged ethylene hybrid“) částicích, které umožňují používat stacionární fázi při vysokých teplotách, tlacích a v širokém rozsahu pH, což je výhoda oproti klasickým kolonám se silikagelovým nosičem.

Na koloně Torus DIOL byla úspěšně provedena separace směsi pěti fluorovaných pesticidů. Retenční mechanismus a vliv různých parametrů na retenci byl testován analýzou malých polárních látek (nukleobáze, uridin a jeho deriváty, kyselá, neutrální a bazická látka).

Testováním vlivu množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování analytu mezi hydratovanou stacionární fázi a mobilní fázi, tak i adsorpce analytu na povrch stacionární fáze. Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenci a separaci analytů byl testován s následujícími pufrujícími roztoky: kyselina mravenčí, pH = 2,1; 10mM octan amonný, pH = 4,7 a pH = 9,5. Získané výsledky ukázaly, že hodnota pH vodné složky mobilní fáze výrazně ovlivňuje retenci pouze kyselých látek v závislosti na jejich hodnotě pK_A . S rostoucí iontovou silou vodné složky mobilní fáze se retence všech analytů na koloně Torus DIOL mírně zvyšuje. Retenční mechanismus se v závislosti na teplotě nemění, což bylo potvrzeno použitím van't Hoffových závislostí.

K bližšímu popisu interakcí analytů se stacionární fází byly použity testy selektivity pro různé dvojice strukturálně odlišných látek. Získané výsledky byly dále využity pro porovnání Torus DIOL kolony s ostatními komerčně dostupnými kolonami z hlediska jejich potenciálu pro různé typy interakcí.

Na základě získaných výsledků lze říct, že Torus DIOL kolona je vhodná pro separace polárních látek v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii.

Klíčová slova: HILIC, pesticidy, retenční mechanismus

Abstract

The aim of this diploma thesis is detailed characterization of new diol-based column, i.e. Torus DIOL designed for supercritical fluid chromatography, in hydrophilic interaction liquid chromatography. This stationary phase contains diol ligands bonded on BEH (“bridged ethylene hybrid“) particles. The BEH sorbent is more stable at high pH, pressure and temperature than conventional silica sorbents.

Five fluorinated pesticides were successfully separated on Torus DIOL column. Retention mechanism and effect of different parameters were tested by analysis of small polar compounds (nucleobases, uridine and its derivatives, acidic, neutral and basic compounds).

Both partitioning of analytes between an aqueous layer deposited on the surface of the stationary phase and the mobile phase and adsorption of analytes on the stationary phase participate in the retention mechanism. Effect of the mobile phase aqueous part pH was investigated with the following buffering solutions: formic acid (pH = 2.1), 10mM ammonium acetate (pH = 4.7 and pH = 9.5). Obtained results showed that aqueous part pH significantly affects retention of acidic compounds according to their pK_A values. Retention of all tested analytes on Torus DIOL column slightly increased with increasing ionic strength of mobile phase. The retention mechanism did not change within temperature range tested which was confirmed by van't Hoff plots.

Group selectivity tests for structurally different pairs of compounds were used for more detailed description of interactions between analytes and stationary phase. Results were used for comparison of Torus DIOL column with other columns applicable in hydrophilic interaction liquid chromatography in terms of their interaction potential.

Obtained results showed that Torus DIOL column is suitable for the separation of polar compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography.

Key words: HILIC, pesticides, retention mechanism

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za její vynikající rady, připomínky, odborné vedení a milý přístup. Poděkování patří i firmě Waters za poskytnutí kolony Torus DIOL. Dále bych ráda poděkovala rodičům, příteli Petrovi a spolubydlící Zuzce za podporu a trpělivost během mého studia.

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	10
2.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie.....	11
2.1.1.1 Historie.....	11
2.1.1.2 Separační mechanismus.....	12
2.1.1.3 Stacionární fáze.....	13
2.1.1.3.1 Diolové stacionární fáze.....	17
2.1.1.4 Mobilní fáze	18
2.1.1.5 Vliv teploty	19
2.2 Analyzované látky.....	20
2.2.1 Pesticidy	20
3 Experimentální část.....	23
3.1 Použité přístroje a pomůcky.....	23
3.2 Použité chemikálie	23
3.3 Příprava vzorků	25
3.4 Použité mobilní fáze.....	25
3.5 Experimentální podmínky	26
3.6 Chromatografické parametry	26
4 Výsledky a diskuze	28
4.1 Separace pesticidů.....	28
4.2 Vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci.....	30
4.3 Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenci.....	33
4.4 Vliv iontové síly vodné složky mobilní fáze na retenci	36
4.5 Vliv teploty na retenci	39
4.6 Testy selektivity	43
4.7 Porovnání s ostatními komerčně dostupnými kolonami	45
5 Závěr	50
6 Použitá literatura	51

Seznam použitých zkratk a symbolů

ACN	acetonitril
A_s	plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami analytu
BEH	„bridged ethylene hybrid“
Boc	butyloxykarbonyl
BTMA	benzyltrimethylamonium chlorid
C8	oktylová skupina
C18	oktadecylová skupina
f_p	šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	iontová síla
IEC	iontově-výměnná chromatografie
k	retenční faktor
k_w	hypotetický retenční faktor v čistě vodné mobilní fázi
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NPLC	normální mód kapalinové chromatografie
n_w	plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami vody
N_w	molární frakce vodné složky v mobilní fázi
p_c	kritický tlak
PFP	pentafluorofenyl
pK_A	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PTFE	polytetrafluorethylen
R	univerzální plynová konstanta
RPLC	reverzní mód kapalinové chromatografie
R^2	koeficient determinace
R_s	rozlišení
S	faktor symetrie
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
T	termodynamická teplota

t_c	kritická teplota
t_M	mrtvý čas
t_R	retenční čas
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
V_M	objem mobilní fáze
V_S	objem stacionární fáze
v/v	objemový poměr
w	šířka píku při základně
$w_{5\%}$	šířka píku v 5 % jeho výšky
ZIC	zwitterionický
α	selektivita
ΔH°	změna standardní entalpie přenosu
ΔS°	změna standardní entropie přenosu
ϕ	objemový podíl vodné složky v mobilní fázi

1 Úvod

Využití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) v posledních letech roste především z důvodu aplikace v oblasti analýzy polárních léčiv, metabolitů a různých biologicky aktivních látek. HILIC je komplementární metodou k reverznímu módu kapalinové chromatografie (RPLC), který lze bez problémů použít pro analýzy nepolárních a středně polárních látek. Pro separaci polárních látek byl dříve běžně využíván tzv. normální mód kapalinové chromatografie (NPLC), který s sebou ale přináší i řadu problémů. Z toho důvodu je HILIC v současné době žádanou alternativou pro analýzu velmi polárních látek.

Výskyt biologicky aktivních látek v životním prostředí se stále zvyšuje a spolu s tím rostou i požadavky na jejich efektivní analýzu. Většina pesticidů používaných v zemědělství má nepříznivý vliv na přirozené fungování ekosystému, a proto je důležité sledovat jejich množství. Pro analýzu polárních pesticidů je HILIC vhodnou metodou.

Cílem této práce bylo testování nové kolony s diolovou stacionární fází (SF) navržené pro superkritickou fluidní chromatografii (SFC) v podmínkách HILIC. Byla provedena optimalizace separace sady fluorovaných pesticidů. Separční systém byl dále charakterizován analýzou malých polárních látek (nukleobází, uridinu a jeho derivátů a několika kyselých, neutrálních a bazických látek) v různých podmínkách. Testován byl mimo jiné vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi (MF), vliv pH a iontové síly vodné složky mobilní fáze a vliv teploty na retenci strukturně odlišných analytů.

2 Teoretická část

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z chromatografických technik sloužící k separaci složek směsi za účelem jejich kvalitativní i kvantitativní analýzy. Principem kapalinové chromatografie je distribuce analyzovaných látek mezi dvě fáze – stacionární fází (sorbent) a mobilní fází (eluent) – na základě jejich různé schopnosti s nimi interagovat. Při distribuci dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů analytů mezi mobilní a stacionární fází. Vzhledem k velkému množství kombinací stacionárních a mobilních fází je HPLC jednou z nejpoužívanějších analytických metod pro široké spektrum látek. Kvůli zvyšujícím se nárokům na rychlost analýzy byla v roce 2004 uvedena do praxe tzv. ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která umožňuje rychlejší a levnější analýzy s velmi vysokou účinností. V UHPLC se využívají kratší kolony naplněné částicemi menšími než 2 μm a separace pak probíhá za vyššího tlaku¹.

V současné době se v HPLC využívá několik separačních módů. Systém, kde je polární stacionární fáze v kombinaci s méně polární (nevodnou) mobilní fází, se nazývá normální mód kapalinové chromatografie. Používá se především pro separaci polárních látek, jejichž retence je při tomto uspořádání vyšší. Naopak nepolární látky mají retenci nižší nebo žádnou. NPLC se také s výhodou využívá při analýze látek, které nejsou dobře rozpustné ve vodě. Stacionární fází bývá nejčastěji nemodifikovaný silikagel nebo silikagel modifikovaný polárními skupinami, mobilní fází bývá například hexan nebo chloroform². Další možností je tzv. reverzní mód kapalinové chromatografie, kde je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Reverzní mód se tak používá především pro nepolární látky, které mají při tomto uspořádání vyšší retenci než látky polární. Stacionární fází bývá většinou silikagel modifikovaný oktadecylovými (C18) nebo oktylovými (C8) skupinami. Mobilní fází je nejčastěji směs vody (nebo pufru) s organickým rozpouštědlem (nejčastěji acetonitril, methanol). RPLC je v současné době nejvíce rozšířeným módem kapalinové chromatografie, a to zejména z důvodu dobré reprodukovatelnosti, široké selektivity a možnosti použití hmotnostní detekce³. Dalšími používanými módy je například polárně-organický mód, iontově-výměnná chromatografie (IEC) nebo

hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, která je podrobněji popsána v následujících kapitolách.

2.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie je používána jako alternativa pro separaci látek, které jsou obtížně separovatelné nebo mají velmi nízkou retenci v reverzním módu. Pro HILIC je charakteristické použití polární stacionární fáze typické pro NPLC a méně polární mobilní fáze, která je svým složením podobná MF používaným v RPLC. Stacionární fází může být čistý silikagel, silikagel modifikovaný polárními skupinami (například diolovými, amino- nebo kyano-skupinami) nebo silikagel modifikovaný polárními molekulami (například cyklodextriny)⁴. Mobilní fází tvoří směs vodné složky (minimálně 2,5 obj. %) a méně polárního rozpouštědla, obvykle acetonitrilu (více než 70 obj. %)⁵. Vodná složka MF má v tomto uspořádání vyšší eluční sílu. HILIC byla použita například pro separaci sacharidů, aminokyselin a některých léčiv, obecně polárních, hydrofilních či nabitých látek⁶.

HILIC má oproti klasické NPLC i RPLC mnoho výhod. Jednou z nich je například možnost použití pro separaci látek, které mají v RPLC nízkou nebo žádnou retenci a zároveň na rozdíl od NPLC jsou polární látky v mobilní fázi dobře rozpustné. V HILIC se obvykle nepoužívají drahá iontově-párová činidla a spojení s hmotnostní detekcí (MS) je bezproblémové^{7,8}. Nevýhodou je nutnost relativně dlouhé ekvilibrace systému.

2.1.1.1 Historie

Z historického hlediska je HILIC variantou normálního módu kapalinové chromatografie, ale retenční mechanismus je komplikovanější. V tomto uspořádání provedli již v roce 1975 Linden a Lawhead⁹ separaci sacharidů. Jako stacionární fází použili silikagel modifikovaný aminoskupinami, mobilní fází byla směs acetonitrilu (ACN) s vodou (ACN/H₂O: 75/25, 77/23, 80/20, 85/15, 90/10 (v/v)). Pojem hydrofilní interakční kapalinová chromatografie ale poprvé použil až v roce 1990 Alpert¹⁰. Alpert mimo jiné popsal i separaci aminokyselin na hydrofilní polymerní stacionární fází s využitím méně polární mobilní fáze složené z acetonitrilu a triethylamonium fosforečnanového pufru (ACN/pufr: 80/20 (v/v)). V této práci

bylo ukázáno, že retenční pořadí aminokyselin v HILIC je opačné než při použití RPLC.

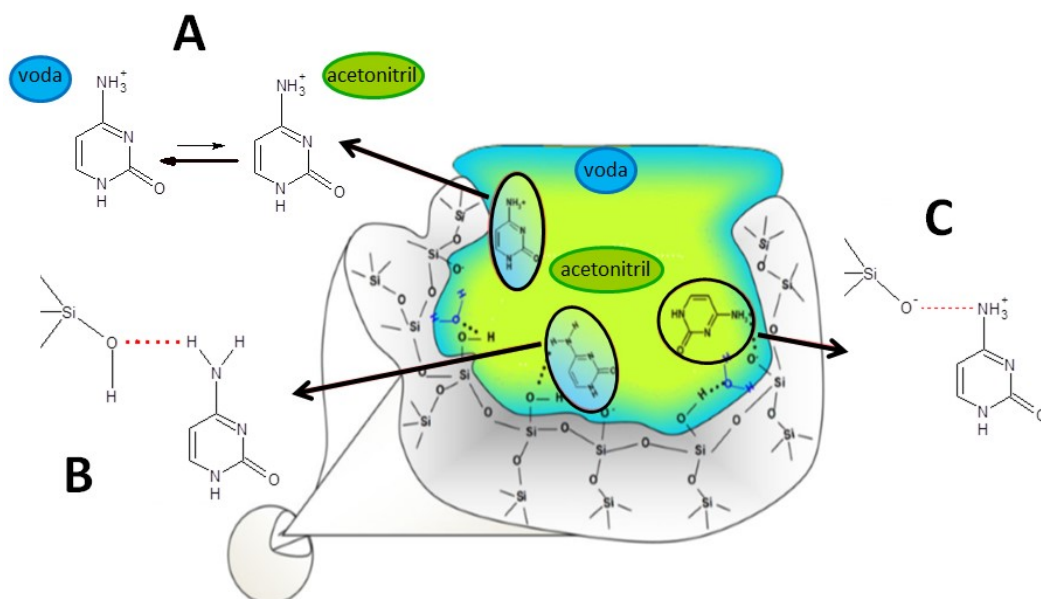
Počet publikací zabývajících se hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií začal značně růst až od roku 2003. Relativně dlouhou dobu trvala i aplikace HILIC na jiné látky než sacharidy¹¹.

2.1.1.2 Separační mechanismus

První studie separačního mechanismu byly provedeny ještě před zavedením pojmu hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. Separace polárních látek, v té době většinou sacharidů, byla vysvětlena pomocí interakcí hydroxylových skupin analytů s polárními skupinami na povrchu stacionární fáze. Předpokládalo se, že stejně jako v NPLC je separace řízena adsorpcí. Tato teorie byla omezena pouze na analyty s hydroxylovými skupinami ve své struktuře¹².

Základní princip separace v HILIC módu, který je uznávaný dodnes, navrhl Alpert¹⁰ ve své práci v roce 1990. Hlavní separační mechanismus je založen na rozdělování analytu mezi vodnou vrstvu sorbovanou na povrch stacionární fáze a mobilní fázi. Polární analyty mají velkou afinitu k vrstvě vody adsorbované na povrchu SF, proto s rostoucí polaritou roste i retence těchto analytů. Na retenci má tedy vliv nejen polarita látek, ale také stupeň solvatace stacionární fáze¹³. Během solvatace povrchu SF se předpokládá tvorba gradientu – u povrchu SF je zastoupení vodné složky MF největší a s rostoucí vzdáleností od povrchu SF roste podíl organické složky MF¹⁴. S rostoucím obsahem organické složky v MF je voda na povrch SF adsorbována silněji. Pro tvorbu vrstvy obohacené vodnou složkou na povrchu SF je ale nutné, aby mobilní fáze obsahovala minimálně 2,5–5 obj. % vodné složky¹⁵. S rostoucím obsahem vodné složky v MF klesá retence analytů. To je způsobeno zvyšující se podobností imobilizované vrstvy obohacené vodnou složkou s okolní mobilní fází¹¹.

Rozdělování analytů není jediným mechanismem, který přispívá k retenci a separaci látek v HILIC (obrázek 1). V závislosti na zvolených podmínkách se mohou uplatňovat i interakce přímo mezi analytem a SF, jako například vodíkové interakce, interakce dipól-dipól nebo elektrostatické interakce^{16,17}.



Obrázek 1: Schéma separačního mechanismu v HILIC, převzato z cit.¹⁸; A: rozdělování analytu mezi vrstvu obohacenou vodnou složkou a okolní mobilní fázi bohatou na organické rozpouštědlo; B: vodíkové interakce; C: elektrostatické interakce.

Přesný retenční mechanismus v HILIC je stále předmětem diskuzí. Pravděpodobně jde o kombinaci rozdělování analytu mezi dvě různé složky MF a adsorpce analytu na povrch stacionární fáze. Převládající mechanismus závisí na konkrétním analytu a použité stacionární fázi¹⁹.

Chromatografické chování látek v HILIC lze ovlivnit zejména třemi základními způsoby: výběrem stacionární fáze, složením mobilní fáze a změnou teploty.

2.1.1.3 Stacionární fáze

Pro separace v HILIC může být použita téměř jakákoliv stacionární fáze s polárním povrchem. Typickou SF je nemodifikovaný silikagel nebo silikagel modifikovaný polárními skupinami (nejčastěji amino-, amido-, kyano- nebo diolovými skupinami). Lze použít i silikagel modifikovaný hydrofilním polymerem (například polyhydroxyethylem či polysulfoethylem)²⁰. Mezi velmi používané SF patří zwitterionické stacionární fáze (ZIC-HILIC, ZIC = zwitterionic). Tyto fáze mají na povrchu chemicky vázané funkční skupiny nesoucí kladný a záporný náboj, které

se vyznačují vysokou polaritou a afinitou k vodě. Existují i stacionární fáze s duálním charakterem (tzv. mixed-mode), které lze v závislosti na složení mobilní fáze použít například pro HILIC nebo RPLC^{21,22}.

Počet komerčně dostupných kolon navržených speciálně pro HILIC stále roste, dosud však neexistuje žádná univerzální stacionární fáze, jako je například C18 typická pro RPLC¹⁴. V tabulce 1 jsou uvedeny příklady stacionárních fází používaných v HILIC, jejich struktury a možné aplikace. Diolová stacionární fáze použitá v experimentální části této práce bude podrobněji popsána v samostatné kapitole.

Velmi často používanou stacionární fází v HILIC je nemodifikovaný silikagel. Komerčně dostupné silikagelové SF se v závislosti na technologii přípravy liší ve své čistotě. To má za následek různou retenci, účinnost a tvar píků na „stejných“ stacionárních fázích od jiných výrobců. Při vyšších hodnotách pH vodné složky MF dochází k ionizaci silanolových skupin na povrchu SF a následně roste vliv kationtově-výměnných interakcí. To ovlivňuje retenci především kladně nabitých bazických látek, které jsou na silikagelových SF obecně silně zadržovány²³.

Aminopropyl vázaný na silikagel je nejstarším typem aminové stacionární fáze, který je dodnes často využíván pro separaci sacharidů, aminokyselin, peptidů, karboxylových kyselin a nukleosidů. Na retenci analytů se mimo jiné podílí i aniontová výměna. Aminové stacionární fáze tedy vykazují při určitých hodnotách pH vodné složky MF zvýšenou retenci kyselých látek²⁴.

Amidové SF obsahují karbamoylovou nebo amidovou skupinu vázanou na silikagel prostřednictvím krátkého uhlovodíkového řetězce. Na rozdíl od aminových SF nevykazují amidové SF bazické vlastnosti a retence ionizovatelných analytů není významně ovlivněna iontovou výměnou. Amidové SF se využívají pro separace peptidů, oligosacharidů, glykoproteinů, glykosidů² apod.

Kyanoethylem nebo kyanopropylem modifikovaný silikagel postrádá možnost tvorby vodíkových vazeb. Použití takovýchto stacionárních fází je většinou omezeno na speciální případy.

Tabulka 1: Příklady stacionárních fází pro HILIC.

Materiál stacionární fáze	Schematická struktura stacionární fáze	Aplikace
nemodifikovaný silikagel		nikotin a albuterol v biologických tekutinách ²⁵
silikagel modifikovaný diolovými skupinami		vitamíny rozpustné ve vodě ²⁶
silikagel modifikovaný aminoskupinami		tetracyklinová antibiotika ²⁷
silikagel modifikovaný amidovými skupinami		sacharidy, cukerné deriváty, peptidy, aminokyseliny ²⁸
silikagel modifikovaný kyanoskupinami		denaturáty v alkoholu ²⁹
zwitterionická SF sulfobetain (ZIC-HILIC)		melamin ³⁰
β-cyklodextrinová stacionární fáze		monosacharidy, oligosacharidy, cukerné alkoholy ³¹

Zwitterionické stacionární fáze byly původně určeny pro iontově-výměnnou chromatografii. Jiang a Irgum poprvé představili sulfoalkylbetain jako vhodný modifikátor silikagelu pro separace anorganických solí a malých organických nabitých látek³². Povrch stacionární fáze je tvořen kyselou záporně nabitou sulfoskupinou a zároveň bazickým kladně nabitým kvarterním aminem. To umožňuje současnou separaci kladně i záporně nabitých látek³³.

β -cyklodextrin je cyklický oligosacharid obsahující sedm glukózových jednotek uspořádaných do prstencové struktury s relativně hydrofobní kavitou. Silikagel s navázanými cyklodextriny se obecně používá pro separace chirálních látek. V HILIC se využívá polaritu cyklodextrinu z důvodu velkého množství hydroxylových skupin na jeho povrchu³⁴.

Většinu polárních stacionárních fází používaných pro NPLC nebo HILIC lze v principu použít i pro superkritickou fluidní chromatografii. Popsáno bylo mimo jiné testování diolové a amidové SF původně určené pro HILIC v podmínkách SFC³⁵. V experimentální části této práce byl zvolen postup opačný – v HILIC podmínkách byla testována SF určená pro SFC.

Superkritická fluidní chromatografie byla poprvé představena v šedesátých letech minulého století jako kombinace HPLC a plynové chromatografie (GC). Mobilní fázi v SFC je tekutina v superkritickém stavu, nejčastěji oxid uhličitý, a to především vzhledem ke své nízké toxicitě, nízké hořlavosti a snadno dosažitelným kritickým hodnotám teploty a tlaku ($t_c = 31\text{ °C}$ a $p_c = 73,8\text{ bar}$). K mobilní fázi se z důvodu zvýšení její polaritu přidává organický modifikátor (například methanol, ethanol, propanol, acetonitril). Většina SF určená pro HPLC je použitelná i v SFC. Hlavními výhodami SFC jsou rychlé analýzy, vysoká účinnost a snížení spotřeby organických rozpouštědel^{36,37}.

V devadesátých letech dvacátého století bylo uvedeno na trh několik kolon specifických pro SFC. Ve skutečnosti se jednalo o běžné HPLC kolony s nemodifikovaným silikagelem. Do roku 2000 byla většina stacionárních fází používaných v SFC původně určena pro NPLC (silikagelové, diolové a nitrilem modifikované stacionární fáze). V roce 2001 byly vyvinuty první 2-ethyl-pyridinové SF speciálně pro SFC³⁸.

Z důvodu rostoucí popularity HILIC stoupá i počet komerčně dostupných kolon určených speciálně pro HILIC. Někteří výrobci pouze prodávají kolony

původně určené pro NPLC, jiní se snaží vyvinout nové stacionární fáze použitelné například v širším rozsahu hodnot pH vodné složky mobilní fáze³⁵.

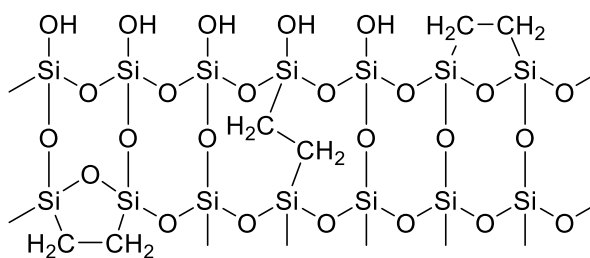
2.1.1.3.1 Diolové stacionární fáze

Diolová SF obvykle obsahuje hydrofilní neutrální 2,3-dihydroxypropyl chemicky navázaný na silikagelový nosič. Připravuje se navázáním (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilanu na povrch silikagelu s následnou hydrolyzou epoxidové skupiny³⁹. Stejně jako nemodifikovaný silikagel vykazují i diolové SF velkou polaritu a schopnost účastnit se vodíkových interakcí⁴⁰. Na rozdíl od nemodifikovaného silikagelu neobsahují ionizovatelné skupiny – pouze zbytkové nezreagované silanolové skupiny silikagelu, které mohou být částečně blokovány⁴¹.

Dostupné jsou i stacionární fáze s diolovou skupinou navázanou na konci dlouhého hydrofobního uhlovodíkového řetězce (např. undekan-1,2-diol), které vykazují duální RPLC/HILIC retenční mechanismus v závislosti na složení mobilní fáze. Při nízkém podílu organického rozpouštědla v MF probíhá separace v RPLC módu, při vysokém podílu pak v HILIC podmínkách⁴².

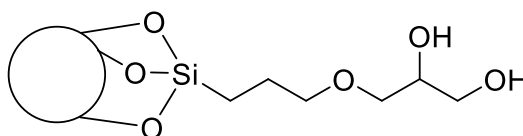
Další možností je tzv. „cross-linked“ diolová SF. Na rozdíl od klasické diolové SF se vyznačuje zvýšenou stabilitou proti hydrolyze, silnějšími „hydrofobními“ interakcemi, lepší symetrií píků a lepším rozlišením⁴³.

Torus DIOL kolona, použitá v experimentální části této práce, má ligand vázaný na tzv. BEH („bridged ethylene hybrid“) částicích (obrázek 2). V silikagelovém nosiči jsou vmezeřeny ethylenové můstky, které zpevňují celou strukturu. BEH částice jsou proto vysoce mechanicky i chemicky odolné. Vydrží extrémní teploty i tlaky a jsou stabilní v širokém rozsahu pH⁴⁴. Ethylenové můstky také snižují kyselost okolních silanolových skupin a potlačují tak rozmývání píků bazických látek.



Obrázek 2: Schematická struktura BEH částic.

Pro Torus DIOL kolony je také specifické, že ligand je na silikagelový nosič navázán přes křemík, který je s nosičem spojen třemi vazbami přes kyslík. Schematická struktura stacionární fáze Torus DIOL kolony je uvedena na obrázku 3.

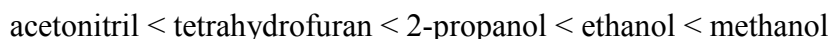


Obrázek 3: Schematická struktura stacionární fáze Torus DIOL kolony.

2.1.1.4 Mobilní fáze

Jak již bylo zmíněno výše, mobilní fáze při HILIC separacích musí obsahovat minimálně 2,5 obj. % vodné složky, aby mohlo dojít k vytvoření hydratované vrstvy na povrchu stacionární fáze. Vodnou složkou nejčastěji bývá vodný roztok kyseliny mravenčí, mravenčanu nebo octanu amonného. Důvodem je jejich dobrá rozpustnost v organicky bohaté MF, těkavost a s tím spojená možnost kombinace s MS^{41,45}. Amonné soli organických kyselin jsou také schopny omezit elektrostatické odpuzování separovaných složek od negativně nabitého silikagelového nosiče stacionární fáze⁴⁶.

Velký vliv na retenci analytů má i výběr organického rozpouštědla. Eluční síla rozpouštědla roste s jeho rostoucí polaritou a schopností účastnit se proton-donorových/proton-akceptorových interakcí v tomto pořadí⁴⁷:



Nejčastěji používaným organickým rozpouštědlem je acetonitril, naopak methanol se z důvodu své podobnosti s vodou používá v HILIC jen zřídka. Methanol i voda jsou protická rozpouštědla, která spolu soupeří v solvataci polární stacionární fáze a vytváří mezi sebou silné vodíkové interakce. V menší míře platí to samé i pro

ostatní alkoholy. Oproti tomu acetonitril nevykazuje žádné proton-donorové interakce, a tak je i přes svou toxicitu pro HILIC nejvhodnější⁴⁸. Pro separaci látek v HILIC módu lze využít izokratickou i gradientovou eluci. Gradientová eluce začíná vysokým podílem organického rozpouštědla v MF a s časem roste zastoupení vodné složky¹⁰.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím chování látek v HILIC je pH vodné složky mobilní fáze, které ovlivňuje náboj ionizovatelných skupin stacionární fáze i analytů. Slabé kyseliny a slabé báze se mohou běžně vyskytovat v ionizované i neutrální formě, převládající formu při určité hodnotě pH vodné složky MF určují disociační konstanty (pK_A) jednotlivých ionizovatelných funkčních skupin. Obecně lze říci, že nabitě částice jsou hydrofilnější, mají větší afinitu k polární hydratované stacionární fázi, a proto mají vyšší retenci^{49,50}. Naopak v RPLC je snaha případnou ionizaci potlačit, aby byly látky na nepolární stacionární fázi více zadržovány.

Vliv na retenci látek má i iontová síla (I) vodné složky MF (pufru), která ovlivňuje elektrostatické interakce mezi nabitými analyty a stacionární fází. Také bylo popsáno, že iontová síla ovlivňuje tloušťku vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. Konkrétní chromatografické chování však závisí na vlastnostech analyzované látky a na typu stacionární fáze. Neutrální SF a SF s ionizovatelnými skupinami obvykle vykazují rozdílné trendy v retenčním chování v závislosti na iontové síle pufru⁵¹.

2.1.1.5 Vliv teploty

Retenci analytů ovlivňuje i teplota, na kterou je stacionární fáze termostatována. Teplota má vliv na difúzi analytů, viskozitu mobilní fáze a souvisí s entalpií přenosu analytu mezi stacionární a mobilní fází. S rostoucí teplotou také klesá polarita mobilní fáze⁵². Platí, že retence analytů v HILIC s rostoucí teplotou obvykle klesá. Tento vztah popisuje van' t Hoffova rovnice⁵³:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} = -\frac{A}{T} + B \quad (1)$$

kde k je retenční faktor, T je termodynamická teplota, R je univerzální plynová konstanta, V_S je objem stacionární fáze, V_M je objem mobilní fáze, ΔH° je změna standardní entalpie přenosu a ΔS° je změna standardní entropie přenosu.

Po sestavení van't Hoffovy závislosti $\ln k$ na $1/T$ můžeme spočítat entalpický příspěvek k retenci ΔH° ze směrnice (A) a entropický příspěvek ΔS° z hodnoty průsečíku funkce s osou y (B). Experimentálně zjištěné hodnoty průsečíku funkce s osou y v sobě zahrnují i podíl objemu fází v koloně.

2.2 Analyzované látky

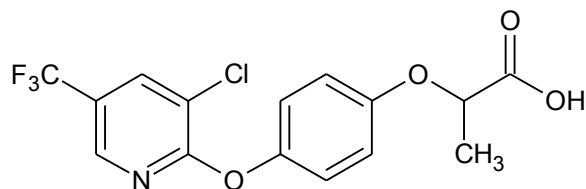
Se zvyšujícím se výskytem antropogenních biologicky aktivních látek v životním prostředí rostou i požadavky na jejich analýzu. V experimentální části této práce je popsána optimalizace separace pěti fluorovaných pesticidů metodou HILIC. Jejich struktury a základní vlastnosti jsou popsány níže. Pro podrobnější charakterizaci nové stacionární fáze v HILIC podmínkách byly provedeny analýzy malých polárních látek, jejichž struktury a hodnoty pK_A jejich funkčních skupin jsou uvedeny v příloze.

2.2.1 Pesticidy

Stejně jako všechny pesticidy studované v experimentální části této práce, patří i většina fluorovaných biologicky aktivních látek využívaných v zemědělství do skupiny trifluoromethyl- substituovaných aromátů⁵⁴.

Haloxyfop

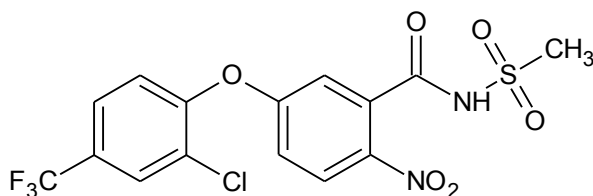
Haloxyfop patří do skupiny aryloxyfenoxypropionátových herbicidů (struktura viz obrázek 4). Již v nanomolárních koncentracích působí inhibicí acetyl-koenzym A karboxylázy, která se účastní prvního kroku biosyntézy mastných kyselin⁵⁵. Jako herbicid se používá především jeho methyl ester⁵⁶. Chirální herbicid haloxyfop-methyl byl nejdříve představen jako racemát. Později byl dostupný jako haloxyfop-P-methyl, s převažujícím obsahem *R*-enantiomeru s herbicidním účinkem⁵⁷.



Obrázek 4: Struktura haloxyfopu, systematický název: 2-[4-[[3-chlor-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]oxy]fenoxy]propanová kyselina.

Fomesafen

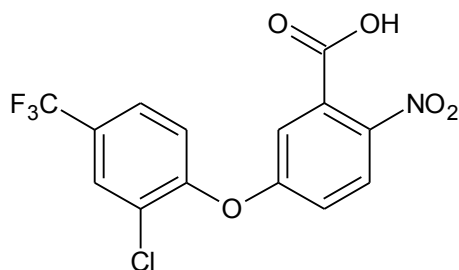
Fomesafen patří do skupiny difenyletherových herbicidů (struktura viz obrázek 5). Působí jako inhibitor protoporphyrinogen oxidázy v chloroplastech. V rostlině pak nedochází k tvorbě chlorofylu a fotosyntéza je blokována⁵⁸.



Obrázek 5: Struktura fomesafenu, systematický název: 5-[2-chlor-4-(trifluoromethyl) fenoxy]-*N*-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzamid.

Acifluorfen

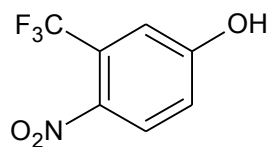
Acifluorfen patří stejně jako fomesafen mezi difenyletherové herbicidy (struktura viz obrázek 6) používané především proti širokolistým plevelům⁵⁹. Jako herbicid se používá i methylovaný acifluorfen, mechanismus působení na rostliny je stejný jako v případě fomesafenu⁶⁰.



Obrázek 6: Struktura acifluorfenu, systematický název: 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl) fenoxy]-2-nitrobenzoová kyselina.

3-nitro-4-(trifluormethyl)fenol

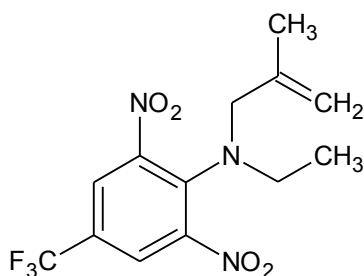
3-nitro-4-(trifluormethyl)fenol je typickým zástupcem piscicidů, tedy látek používajících se k hubení parazitických a invazivních druhů ryb. V současné době se používá například ke kontrole populace mihulí v oblasti Velkých jezer (Great Lakes) v Severní Americe⁶¹. Struktura je uvedena na obrázku 7.



Obrázek 7: Struktura 3-nitro-4-(trifluormethyl)fenolu.

Ethalfluralin

Ethalfluralin (struktura viz obrázek 8) je selektivní herbicid používaný k preventivní ochraně potravinářských a krmných plodin proti některým druhům trav a širokolistým plevelům⁶².



Obrázek 8: Struktura ethalfluralinu, systematický název: *N*-ethyl-*N*-(2-methyl-2-propenyl)- 2,6-dinitro-4-(trifluormethyl)benzenamin.

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf

- separační modul Waters 2690, Alliance HPLC Systém (Waters, Milford, USA)
- detektor Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector (Waters, Milford, USA)
- autosampler 717 Plus (Waters, Milford, USA)
- kolonový termostat, Waters Alliance series column heater (Waters, Milford, USA)
- kolona TorusTM DIOL, rozměry 150 × 4.6 mm, velikost částic 5 μm , velikost pórů 130 Å (Waters, Milford, USA)
- kolona TorusTM DEA, rozměry 150 × 4.6 mm, velikost částic 5 μm , velikost pórů 130 Å (Waters, Milford, USA)

Ostatní

- pH metr PHM 240, Radiometer Analytical SAS (Villeurbanne Cedex, Francie)
- váhy Mettler AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)
- filtry Minisart syringe 0,2 μm a 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Německo)
- zařízení Ultrapur a Rowapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací (Watrex®, Praha, Česká republika)

Programy

- program Empower 2
- počítačový program Origin, verze 6.1
- PeakMaster, verze 5.1
- ChemSketch, verze 12.01
- ChemDraw Professional, verze 17.0.0.206
- Marvin software (ChemAxon Company)

3.2 Použité chemikálie

- acetonitril, Chromasolv® gradient grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- octan amonný (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina octová (čistota $> 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- kyselina mravenčí (čistota $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- roztok hydroxidu amonného (28.0-30.0% NH_3 , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- toluen p.a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- hydroxid sodný (koncentrace: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- haloxyfop (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- fomesafen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 3-nitro-4-(trifluormethyl)fenol (čistota 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- acifluorfen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ethalfluralin (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- adenin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- cytosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- guanin (čistota 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- uracil (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- thymin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- uridin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 5-methyluridin (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-deoxyuridin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- L-tryptofan (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N-terc*-butyloxykarbonyl-L-tryptofan (*N-terc*-Boc-L-tryptofan) (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- L-tyrosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N-terc*-butyloxykarbonyl-L-tyrosin (čistota 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DL-fenylalanin (čistota 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N-terc*-butyloxykarbonyl-D-fenylalanin (čistota ≥ 99 , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- benzensulfonová kyselina (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- benzyltrimethylamonium chlorid (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- anilin (čistota $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 1,2-dichlorbezen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- chlorbenzen (analytický standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N*-benzylmethylamin (čistota 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- chinolin (čistota $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-fenylethylamin (pro syntézu, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 4-methoxybenzoová kyselina (čistota 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 4-bifenylylsulfonová kyselina (Aldrich^{CPR}, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kofein (ReagentPlus®, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- adenosin (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

3.3 Příprava vzorků

Vzorky z pevných standardů byly připraveny rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml acetonitrilu tak, aby výsledná koncentrace byla $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Guanin byl kvůli své malé rozpustnosti v acetonitrilu rozpuštěn v 0,1M vodném roztoku hydroxidu sodného. Připravené vzorky byly filtrovány přes polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr s velikostí pórů $0,2 \text{ } \mu\text{m}$. Vzorky připravené z kapalných standardů byly připraveny tak, aby jejich výsledná koncentrace byla $10 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Některé vzorky byly v závislosti na odezvě detektoru dále ředěny. Mrtvý čas byl určen nadávkováním toluenu ($10 \text{ } \mu\text{l}$ 99% toluenu v $990 \text{ } \mu\text{l}$ acetonitrilu).

3.4 Použité mobilní fáze

Všechna měření byla provedena v mobilních fázích acetonitril/vodná složka v poměrech od 75/25 (v/v) do 95/5 (v/v) se změnou poměru po 5 objemových procentech. Vodnou složkou mobilní fáze byla kyselina mravenčí, pH = 2,1 nebo octan amonný, pH = 4,7 nebo pH = 9,5. Většina experimentů byla provedena s 10mM koncentrací octanu amonného ve vodné složce MF. Při studiu vlivu iontové síly na retenci byly koncentrace v rozmezí od 10 mM do 50 mM se změnou po 10 mM. Pro porovnání testované kolony s jinými komerčně dostupnými kolonami byl na základě literatury vybrán 5mM a 25mM octan amonný, pH = 6,8.

Roztok octanu amonného byl připraven rozpuštěním příslušného množství octanu amonného v deionizované vodě. pH roztoku bylo upraveno přidávkem kyseliny octové na pH = 4,7 nebo roztoku amoniaku na pH = 9,5. Roztoky octanu amonného byly filtrovány přes PTFE filtr s velikostí pórů $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Vodný roztok kyseliny mravenčí (pH = 2,1) byl připraven smícháním příslušného objemu kyseliny mravenčí s deionizovanou vodou.

3.5 Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna v HILIC módu. Pro detekci analytů byly zvoleny vlnové délky 254 nm a 280 nm. Průtok byl nastaven na 1 ml·min⁻¹; pro srovnání selektivity různých HILIC kolon byl průtok nastaven na 0,5 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 5 μl. Kolona byla termostatována na 25 °C, teplota v karuselu byla nastavena rovněž na 25 °C. Při studiu vlivu teploty na retenci byla kolona termostatována na teploty od 10 °C do 60 °C se změnou po 10 °C. Pro všechny analýzy byla zvolena izokratická eluce.

3.6 Chromatografické parametry

V kapitole „Výsledky a diskuze“ jsou uvedeny následující chromatografické parametry, které byly využity ke zpracování naměřených dat.

Retenční faktor udává, kolikrát delší dobu stráví látka ve stacionární fázi než ve fázi mobilní. Pro retenční faktor (k) platí:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

t_R (min) retenční čas daného analytu a t_M (min) mrtvý čas kolony, tj. eluční čas látky, která neinteraguje se stacionární fází.

Rozlišení charakterizuje míru separace dvou sousedních píků. Pro rozlišení (R_S) platí:

$$R_S = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2} \quad (3)$$

$t_{R,1}$ (min) a $t_{R,2}$ (min) jsou retenční časy dříve, respektive později eluující složky, w_1 a w_2 jsou šířky daných píků při základně.

Separční faktor (selektivita) udává vzájemnou retenci dvou analytů. Pro selektivitu (α) platí:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

k je retenční faktor.

Parametr sloužící k posouzení tvaru (symetrie) píku se nazývá faktor symetrie.
Pro faktor asymetrie (S) platí:

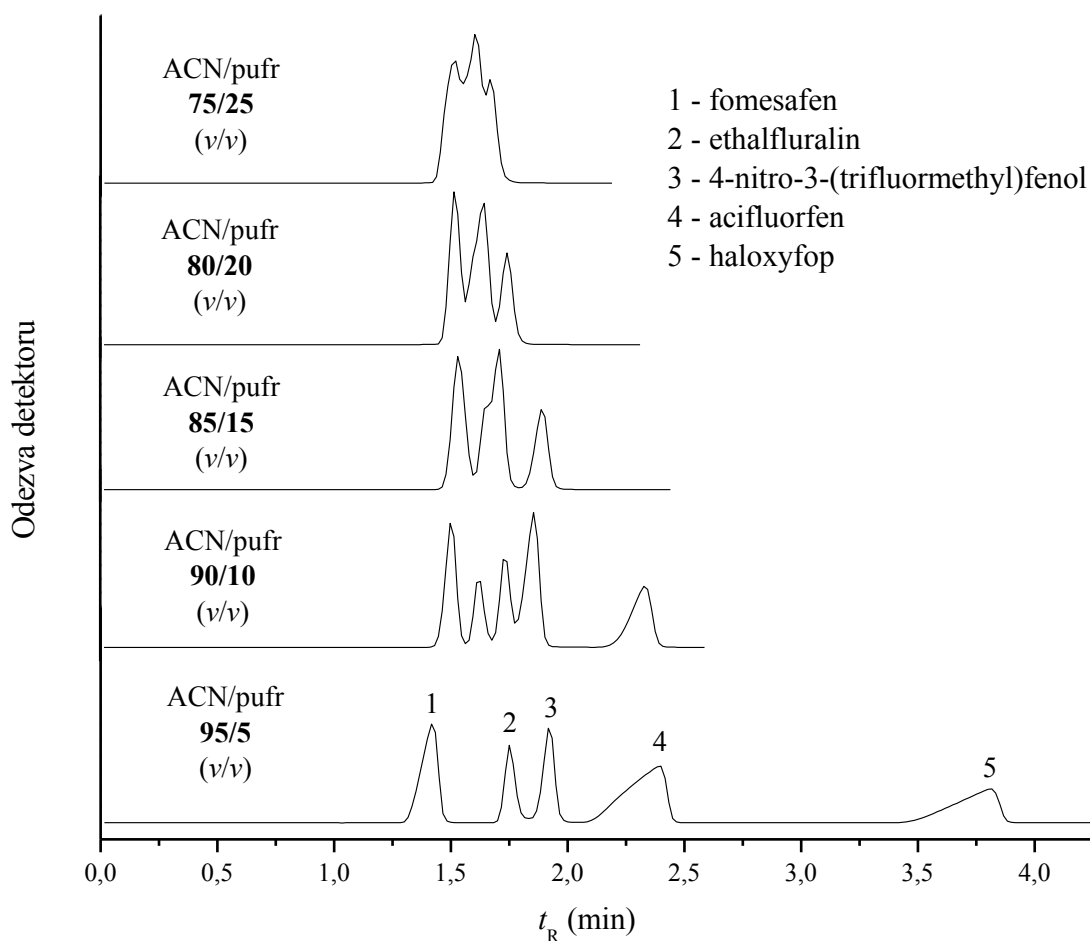
$$S = \frac{w_{5\%}}{2 f_p} \quad (5)$$

$w_{5\%}$ je šířka píku v 5 % jeho výšky a f_p je šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky.

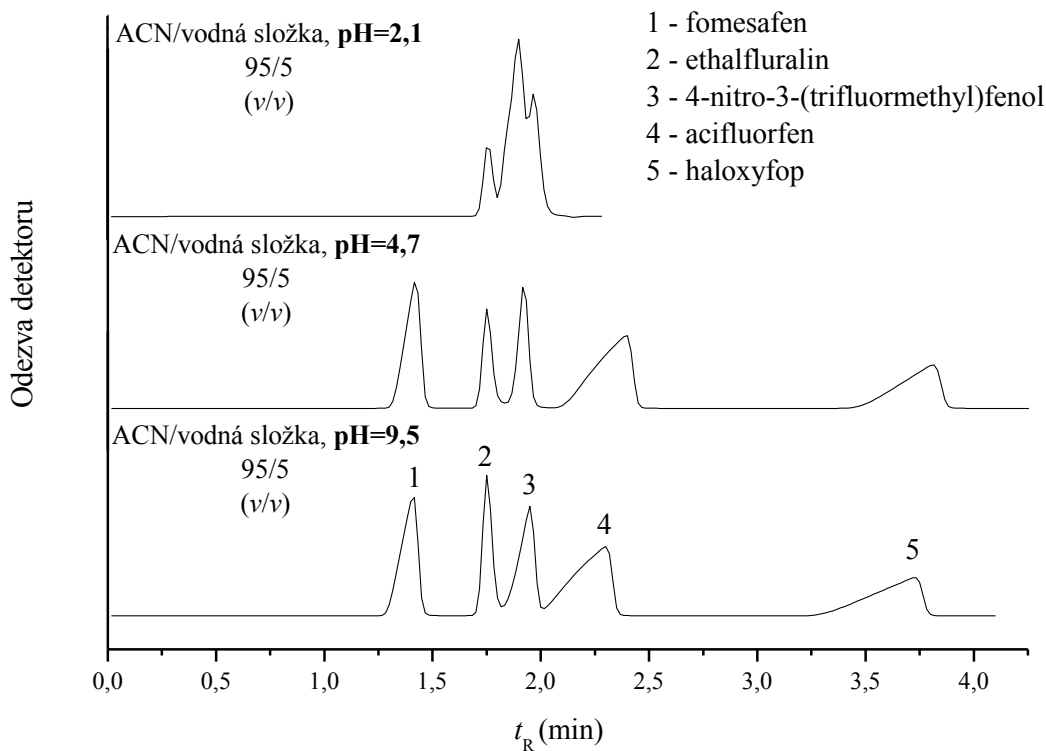
4 Výsledky a diskuze

4.1 Separace směsi pesticidů

Na testované koloně Torus DIOL byly nejprve hledány optimální podmínky pro separaci směsi pěti fluorovaných pesticidů. Separaci významně ovlivňuje množství acetonitrilu a vodné složky v mobilní fázi (viz obrázek 9). S rostoucím množstvím acetonitrilu v mobilní fázi roste retence většiny pesticidů a dochází tak k jejich separaci. Z obrázku 10 je vidět, že i hodnota pH vodné složky mobilní fáze má na separaci pesticidů výrazný vliv. Některé pesticidy eluovaly ve všech testovaných podmínkách před markerem mrtvého času. Eluční pořadí se nezměnilo v rámci testovaného rozsahu množství ACN v mobilní fázi ani při změně hodnoty pH vodné složky mobilní fáze.



Obrázek 9: Vliv množství acetonitrilu a vodné složky v mobilní fázi na separaci pesticidů. Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7.



Obrázek 10: Vliv hodnoty pH vodné složky mobilní fáze na separaci pesticidů. Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka, tj. vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1; 10 mM octan amonný, pH = 4,7 nebo pH = 9,5; 95/5 (v/v).

Oba výše zmíněné parametry (množství acetonitrilu v mobilní fázi i hodnota pH vodné složky mobilní fáze) mají vliv také na symetrii píků. V tabulce 2 jsou uvedeny získané hodnoty faktoru symetrie pro všechny testované pesticidy za podmínek, kdy byly všechny pesticidy rozděleny na základní linii.

Tabulka 2: Hodnoty faktoru symetrie (*S*) pro všechny pesticidy ve směsi.

Analyt	<i>S</i>
ethalfluralin	1,27
4-nitro-3-(trifluormethyl)fenol	0,88
fomesafen	0,81
acifluorfen	0,62
haloxyfop	0,62

Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7; 95/5 (v/v).

Z tabulky 2 je zřejmé, že nejvíce asymetrické píky mají acifluorfen a haloxyfop. Oba pesticidy mají ve své struktuře volnou karboxylovou skupinu, která je při pH = 4,7 částečně nebo úplně nabitá. To je pravděpodobně důvod frontování píků acifluorfenu a haloxyfopu. Vliv hodnoty pH vodné složky mobilní fáze a poměru acetonitrilu a vodné složky v mobilní fázi na symetrii píku pro haloxyfop ukazuje tabulka 3.

Tabulka 3: Faktory symetrie (*S*) pro haloxyfop ve všech testovaných mobilních fázích.

Složení mobilní fáze ACN/vodná složka (v/v)	<i>S</i>		
	Hodnota pH vodné složky mobilní fáze		
	pH = 2,1	pH = 4,7	pH = 9,5
75/25	1,11	0,93	0,84
80/20	1,13	0,85	0,78
85/15	1,11	0,79	0,77
90/10	1,10	0,60	0,60
95/5	1,11	0,56	0,54

Haloxyfop ($pK_A = 2,97$) je při pH = 2,1 v neutrální formě, tomu také odpovídají relativně symetrické píky (faktor symetrie je blízký jedné) ve všech poměrech acetonitrilu a vodné složky v mobilní fázi. Ve vyšších hodnotách pH vodné složky mobilní fáze se symetrie haloxyfopu zhoršuje a faktor symetrie výrazně klesá i se zvyšujícím se podílem acetonitrilu v mobilní fázi. Podobné chování vykazuje i acifluorfen ($pK_A = 3,69$). 4-nitro-3-(trifluormethyl)fenol má ve své struktuře hydroxyskupinu ($pK_A = 10,47$) a z toho důvodu se zhoršená symetrie píku objevuje při pH = 9,5 (obrázek 10).

4.2 Vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci

Vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci pesticidů, nukleobází a uridinu a jeho derivátů byl studován v rozmezí 75-95 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi se změnou po 5 obj. %. Vodnou složkou mobilní fáze byl vodný roztok kyseliny mravenčí (pH = 2,1) nebo 10mM octan amonný (pH = 4,7 nebo pH = 9,5). Retence všech sledovaných látek se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi rostla, což odpovídá typickému retenčnímu chování v HILIC. Tento efekt však nebyl tak výrazný pro pesticidy, jejichž retence byla velmi nízká ve všech sledovaných mobilních fázích.

Retenční mechanismus v HILIC lze popsat pomocí dvou empirických rovnic popisujících rozdělování a adsorpci analytů, které vycházejí z modelů odvozených pro RPLC a NPLC^{63,64}.

Závislost logaritmu retenčního faktoru ($\log k$) na objemovém podílu vodné složky v mobilní fázi (ϕ) popisující rozdělování odvodil Schoenmakers⁶⁴ a kol. původně pro RPLC:

$$\log k = A\phi^2 + B\phi + C \quad (6)$$

kde A, B, C jsou konstanty.

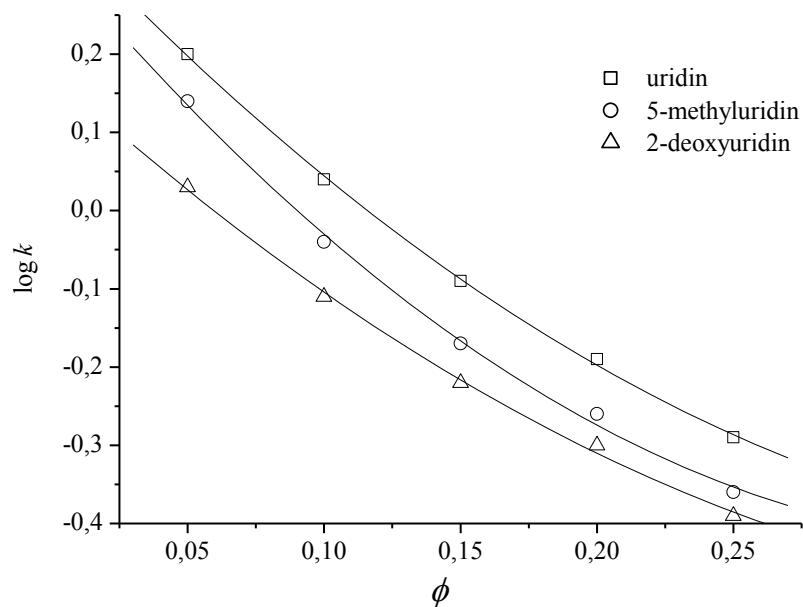
Proces adsorpce analytu je popisován lineární závislostí, kterou odvodili Snyder⁶³ a Soczewinski pro NPLC:

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (7)$$

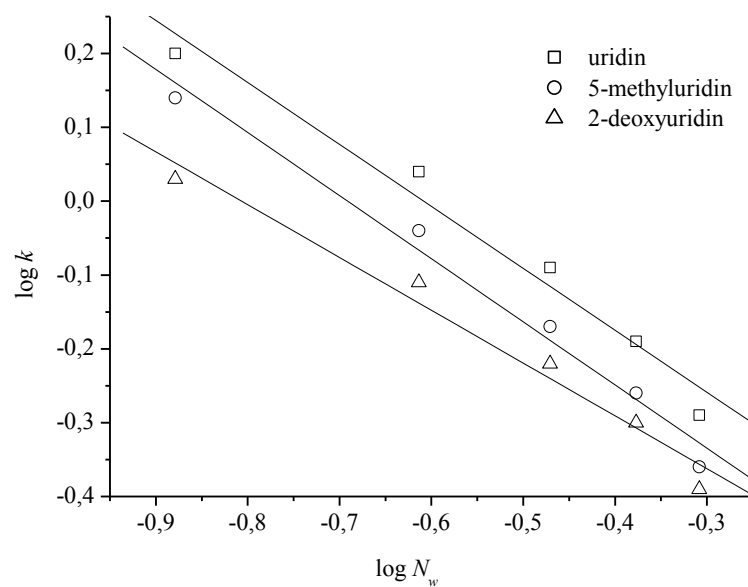
kde k je retenční faktor, k_w je hypotetický retenční faktor v čistě vodné mobilní fázi, A_s je plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami analytu, n_w je plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami vody a N_w je molární frakce vodné složky v mobilní fázi.

Obrázek 11 ukazuje závislosti logaritmu retenčního faktoru uridinu a jeho derivátů na objemovém podílu vodné složky v mobilní fázi. Na obrázku 12 je ukázána závislost logaritmu retenčního faktoru na logaritmu molární frakce vodné složky v mobilní fázi. Koeficienty determinace získané pro obě závislosti jsou uvedeny v tabulce 4.

Z hodnot koeficientů determinace pro obě výše zmíněné závislosti lze usoudit, že se na retenčním mechanismu sledovaných látek podílí jak rozdělování analytu mezi mobilní fázi a hydratovanou stacionární fázi, tak i adsorpce analytu na povrch stacionární fáze.



Obrázek 11: Závislosti logaritmu retenčního faktoru uridinu a jeho derivátů na objemovém podílu vodné složky v mobilní fázi (ϕ). Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7.



Obrázek 12: Závislosti logaritmu retenčního faktoru uridinu a jeho derivátů na logaritmu molární frakce vodné složky v mobilní fázi (N_w). Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7.

Tabulka 4: Přehled koeficientů determinace R^2 pro závislost $\log k$ na objemovém podílu vodné složky v mobilní fázi (rovnice 6, polynom druhého stupně) a pro závislost $\log k$ na logaritmu molární frakce vodné složky v mobilní fázi (rovnice 7, lineární závislost) pro vybrané analyty.

Analyt	R^2 (z rovnice 6)			R^2 (z rovnice 7)		
	pH=2,1	pH=4,7	pH=9,5	pH=2,1	pH=4,7	pH=9,5
adenin	0,987	0,995	0,996	0,971	1,000	1,000
cytosin	0,929	0,995	0,996	0,884	0,999	0,998
guanin	0,997	0,995	0,996	1,000	1,000	0,999
uracil	0,995	0,991	0,997	0,994	0,991	0,986
thymin	0,998	0,942	0,990	0,998	0,876	0,996
uridin	0,999	0,999	1,000	0,977	0,975	0,971
5-methyluridin	0,999	0,998	0,999	0,984	0,985	0,981
2-deoxyuridin	0,999	0,998	0,999	0,975	0,977	0,971

Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka, tj. vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1; 10mM octan amonný, pH = 4,7 nebo pH = 9,5.

4.3 Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenci

Hodnota pH vodné složky mobilní fáze ovlivňuje náboj stacionární fáze i analytů. Sada pesticidů, nukleobází, uridin a jeho deriváty, aminokyseliny a jejich blokované deriváty a několik dalších kyselých, bazických a neutrálních látek bylo testováno ve třech vodných složkách s různými hodnotami pH: vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1; 10mM octan amonný, pH = 4,7 a pH = 9,5. Všechny výše zmíněné analyty byly testovány při složení mobilní fáze: ACN/vodná složka; 80/20, 90/10 a 95/5 (v/v). Sada pesticidů, nukleobází a uridinu a jeho derivátů i při složení mobilní fáze ACN/vodná složka; 75/25 a 85/15 (v/v). V tabulce 5 jsou uvedeny získané výsledky pro všechny testované analyty v poměru ACN/pufr; 90/10 (v/v).

Tabulka 5: Vliv hodnoty pH vodné složky mobilní fáze na retenci.

Analyt	pH = 2,1		pH = 4,7		pH = 9,5	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
haloxyfop	1,73	*	2,51	0,45	2,43	0,40
fomesafen	1,70	*	1,58	*	1,55	*
4-nitro-3-(trifluormethyl)fenol	1,76	0,01	1,79	0,03	1,84	0,06
acifluorfen	1,74	*	1,96	0,13	1,91	0,10
ethalfluralin	1,66	*	1,66	*	1,65	*
adenin	5,19	1,98	5,10	1,95	5,12	1,95
cytosin	5,78	2,32	5,60	2,24	5,61	2,23
guanin	6,99	3,01	7,12	3,16	7,18	3,13
uracil	2,76	0,59	2,80	0,62	2,79	0,61
thymin	2,59	0,49	2,61	0,51	2,59	0,49
uridin	3,60	1,07	3,67	1,12	3,66	1,11
5-methyluridin	3,32	0,91	3,35	0,94	3,35	0,93
2-deoxyuridin	3,08	0,77	3,10	0,79	3,10	0,78
L-tryptofan	5,85	2,36	12,07	5,97	11,77	5,78
N-Boc-L-tryptofan	1,86	0,06	3,06	0,77	3,02	0,74
L-tyrosin	6,41	2,68	16,57	8,58	16,05	8,24
N-Boc-L-tyrosin	-	-	3,51	1,03	3,44	0,98
DL-fenylalanin	6,09	2,50	10,73	5,20	10,46	5,02
Boc-D-fenylalanin	-	-	2,79	0,61	2,76	0,59
anilin	1,89	0,09	1,85	0,07	1,83	0,05
1,2-dichlorbenzen	1,75	0,01	1,74	0,01	1,75	0,01
chlorbenzen	1,75	0,01	1,75	0,01	1,75	0,01
N-benzylmethylamin	1,79	0,03	1,85	0,07	1,78	0,02
chinolin	2,05	0,17	1,97	0,14	1,97	0,13
2-fenylethylamin	3,85	1,21	4,96	1,87	4,58	1,64
benzensulfonová kyselina	7,66	3,40	2,00	0,16	1,96	0,13
4-methoxybenzoová kyselina	1,90	0,09	3,16	0,82	3,86	1,22
4-bifenylsulfonová kyselina	9,42	4,41	2,37	0,37	2,29	0,32
kofein	2,07	0,19	2,06	0,19	2,07	0,19

Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka; 90/10 (v/v). (*) Eluce před markerem mrtvého času, (-) eluce se systéovým píkem, $t_M = 1,74$ min (pro vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1 a octan amonný, pH = 4,7), $t_M = 1,77$ min (pro octan amonný, pH = 9,5).

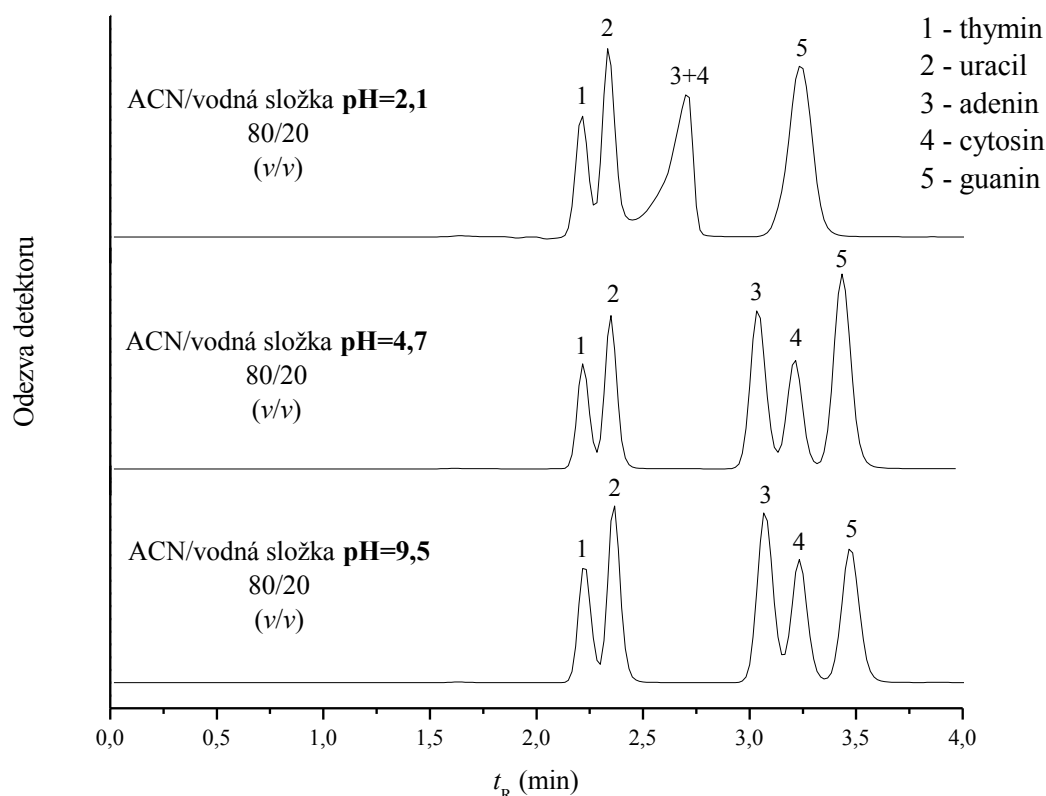
Z tabulky 5 je vidět, že retence nukleobází, uridinu a jeho derivátů, bazických látek (anilin, chinolin, *N*-benzylmethylamin, 2-fenylethylamin) a neutrálních látek (1,2-dichlorbenzen, chlorbenzen, kofein) se se změnou hodnoty pH vodné složky mobilní fáze téměř nemění. Retence některých bazických a neutrálních látek jsou pro všechny sledované hodnoty pH vodné složky mobilní fáze velmi nízké, pravděpodobně kvůli jejich nízké polaritě.

Retence slabých kyselých látek závisí na hodnotě jejich pK_A (hodnoty pK_A testovaných látek byly vypočítány v Marvin softwaru). Analyty s hodnotou pK_A blízkou 2,1 nebo vyšší, jako je L-tryptofan ($pK_A = 2,54$), L-tyrosin ($pK_A = 2,00$), DL-fenylalanin ($pK_A = 2,47$) a 4-methoxybenzoová kyselina ($pK_A = 4,37$), vykazují nižší retenci v případě, že hodnota pH vodné složky mobilní fáze je 2,1 v porovnání s hodnotami 4,7 a 9,5. Stejně retenční chování vykazuje i jeden z pesticidů, haloxyfop, jehož hodnota $pK_A = 2,97$. Zvýšení retence s rostoucí hodnotou pH je vysvětlováno na základě existence nabitých funkčních skupin v závislosti na hodnotě pH. Pokud je pH vodné složky mobilní fáze vyšší než hodnota pK_A kyselých látek, budou tyto látky zcela disociované. To vede k jejich vyšší polaritě, silnější „hydrofilní interakci“ a následně vyšší retenci.

Silné kyseliny, jako je benzensulfonová kyselina ($pK_A = -2,36$) a 4-bifenylylsulfonová kyselina ($pK_A = -1,67$), vykazují trend přesně opačný – při nejnižší hodnotě pH vodné složky mobilní fáze je jejich retence nejvyšší. Při pH = 2,1 jsou tyto látky záporně nabitě, stejně jako při ostatních hodnotách pH. Jejich retence by se tedy v rámci studovaných hodnot pH neměla měnit. Vliv na retenci však může mít i typ vodné složky mobilní fáze (vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1 a octan amonný, pH = 4,7 nebo pH = 9,5). Důvodem změny retence silných kyselin je pravděpodobně i to, že pH vodné složky mobilní fáze ovlivňuje i náboj nezreagovaných zbytkových silanolových skupin na povrchu diolové stacionární fáze, která jinak neobsahuje ionizovatelné funkční skupiny pro sledovaný rozsah pH. Vyšší retence záporně nabitých kyselých látek v nízkých hodnotách pH vodné složky mobilní fáze je vysvětlována menším vlivem elektrostatických repulzí s nezreagovanými silanolovými skupinami⁶⁵. Při vyšších hodnotách pH dochází k silnější elektrostatické repulzi mezi záporně nabitými kyselinami a záporně nabitými nezreagovanými silanolovými skupinami a retence látek klesá. Retence sulfonových kyselin se při změně hodnoty pH z 4,7 na 9,5 již

nemění, což je dáno již neměnitelným stavem volných silanolových skupin a stejným typem vodné složky mobilní fáze.

Hodnota pH a typ vodné složky mobilní fáze mají vliv i na separaci látek. Na obrázku 13 je příklad separace směsi nukleobází při stejném poměru ACN/vodná složka a různém pH vodné složky mobilní fáze. Při pH = 2,1 nedošlo k separaci adeninu a cytosinu, při vyšších hodnotách pH byly tyto dvě látky částečně separovány ($R_S = 1,26$ pro pH = 4,7; $R_S = 1,14$ pro pH = 9,5).



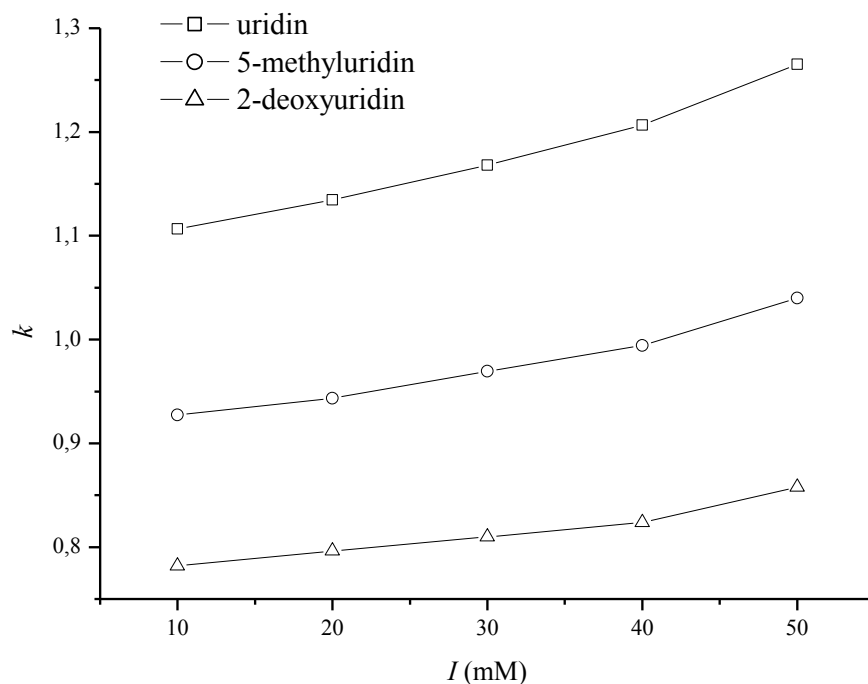
Obrázek 13: Vliv hodnoty pH vodné složky mobilní fáze na separaci směsi nukleobází. Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka; 80/20 (v/v).

4.4 Vliv iontové síly vodné složky mobilní fáze na retenci

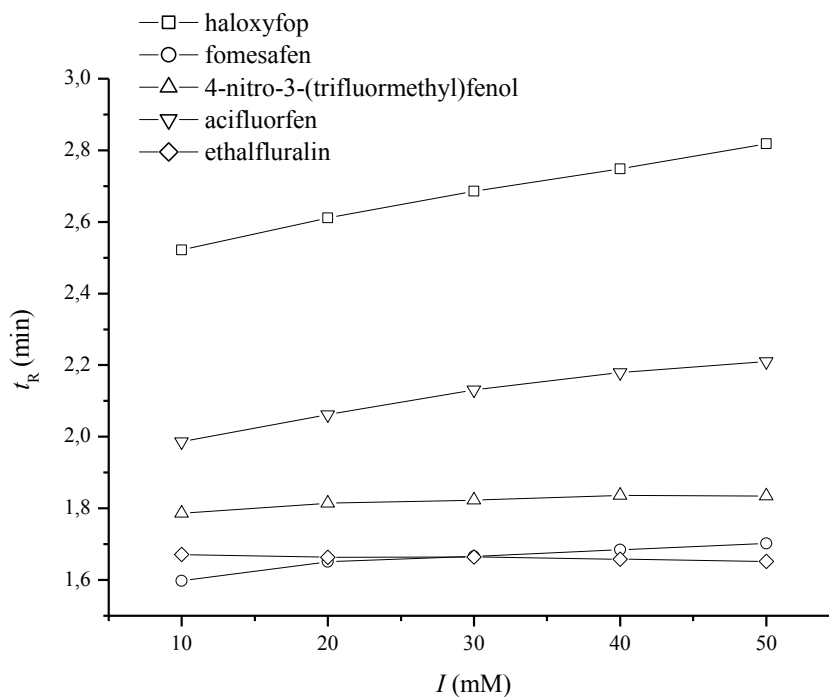
Vliv iontové síly vodné složky mobilní fáze na retenci byl testován pomocí změny koncentrace pufru v rozmezí od 10mM do 50mM se změnou po 10 mM. Jako pufr byl vybrán octan amonný, vliv iontové síly na retenci byl testován pro dvě různé hodnoty pH, pH = 4,7 a pH = 9,5. Množství acetonitrilu v mobilní fázi bylo při všech měřeních 90 obj. %. Tento efekt byl testován na sadě pesticidů a nukleobází, uridinu

a jeho derivátů a sadě látek obsahujících kyselé (benzensulfonová kyselina, 4-methoxybenzoová kyselina), neutrální (kofein) a bazické (2-fenylethylamin, chinolin) analyty.

Z obrázku 14 je vidět, že retence uridinu a jeho derivátů se s rostoucí iontovou silou mobilní fáze mírně zvyšuje. Stejný trend byl získán i pro všechny testované nukleobáze a pesticidy (obrázek 15) při obou testovaných hodnotách pH vodné složky mobilní fáze. Výjimkou byla velmi nízká nebo žádná retence ethalfluralinu, která se s iontovou silou nezměnila. To vedlo ke změně retenčního pořadí fomesafenu a ethalfluralinu během změny iontové síly mobilní fáze. Stejný jev byl pozorován pro obě testované hodnoty pH vodné složky mobilní fáze.

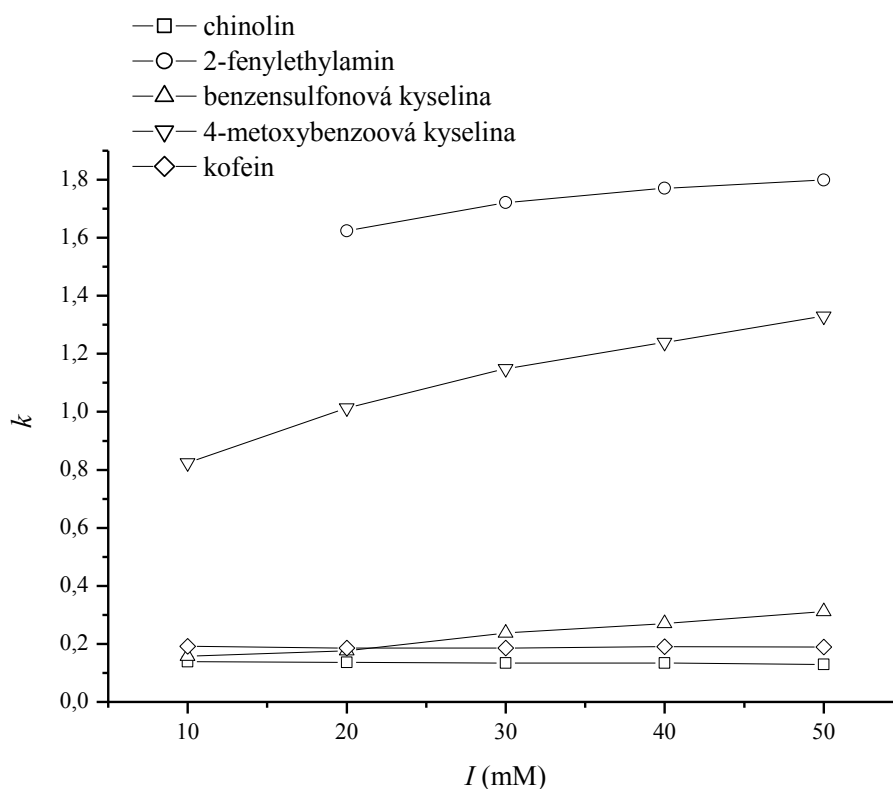


Obrázek 14: Vliv iontové síly (I) vodné složky mobilní fáze na retenci pro uridin a jeho deriváty. Složení mobilní fáze: ACN/octan amonný, pH = 9,5; 90/10 (v/v).



Obrázek 15: Vliv iontové síly (I) vodné složky mobilní fáze na retenci pesticidů. Složení mobilní fáze: ACN/octan amonný, pH = 4,7; 90/10 (v/v). Graf je sestaven z retenčních časů z důvodu eluce některých pesticidů před markerem mrtvého času.

S rostoucí iontovou silou mobilní fáze rostla retence kyselých i bazických látek (obrázek 16). Výjimku tvoří chinolin, jehož retence byla velmi nízká v celém studovaném rozsahu iontových sil. Jako zástupce neutrálních látek byl vybrán kofein, jehož retence se s iontovou silou nemění. Změna hodnoty pH vodné složky mobilní fáze z pH = 4,7 na pH = 9,5 způsobila výměnu elučního pořadí 2-fenylethylaminu a 4-methoxybenzoové kyseliny, trend zvyšující se retence s rostoucí iontovou silou mobilní fáze se nezměnil.

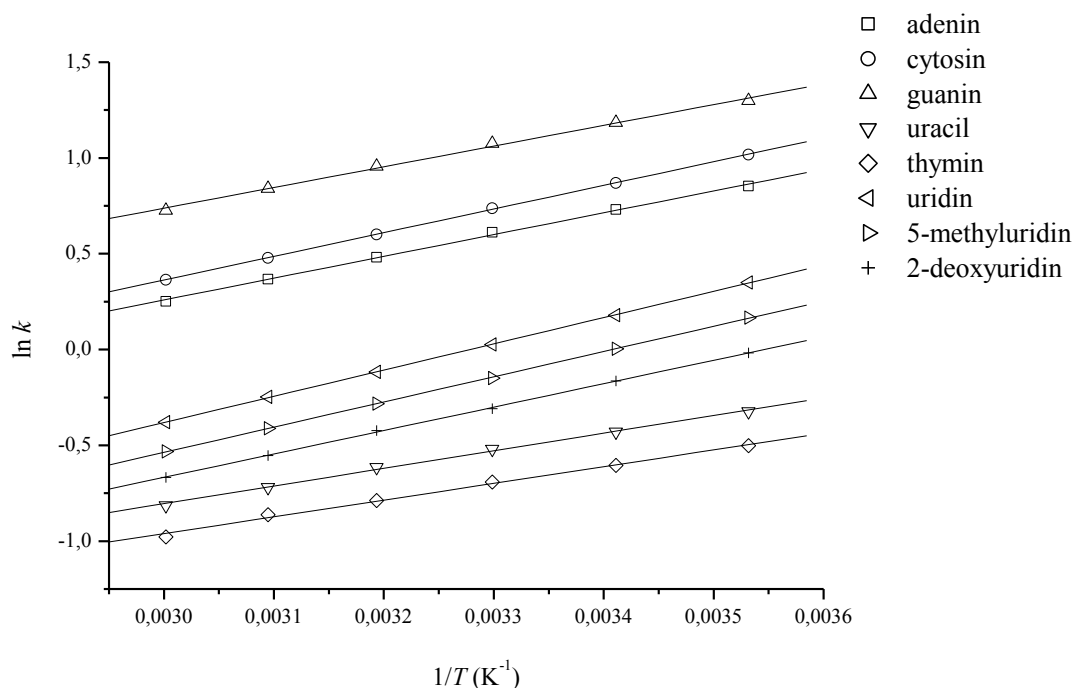


Obrázek 16: Vliv iontové síly (I) vodné složky mobilní fáze na retenci kyselých, neutrální a bazických látek. Složení mobilní fáze: ACN/octan amonný, pH = 4,7; 90/10 (v/v). Chybějící data pro 2-fenylethylamin jsou způsobena nevyhodnotitelným píkem z důvodu výrazného rozšíření zóny.

4.5 Vliv teploty na retenci

Vliv teploty kolony na retenci byl studován v rozmezí 10-60 °C (vždy s přírůstkem po 10 °C). Maximální teplota byla vybrána s ohledem na doporučené teplotní maximum od výrobce. K testování byla vybrána sada nukleobází, uridin a jeho dva deriváty. Všechna měření byla prováděna při složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný; 90/10 (v/v). Vliv teploty na retenci byl studován pro dva octanové pufry, pH = 4,7 a pH = 9,5.

Van 't Hoffova závislost $\ln k$ na $1/T$ ukázala lineární závislost pro všechny analyzované látky a obě hodnoty pH vodné složky mobilní fáze. To potvrzuje, že se ve vybraném teplotním rozmezí retenční mechanismus nemění. Na obrázku 17 je uveden získaný van 't Hoffův graf pro nukleobáze, uridin a jeho deriváty pro pH vodné složky mobilní fáze $\text{pH} = 4,7$. Získaná data se v rámci obou studovaných pH významně neliší



Obrázek 17: Van 't Hoffova závislost $\ln k$ na $1/T$ pro nukleobáze, uridin a jeho deriváty. Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, $\text{pH} = 4,7$; 90/10 (v/v). Teplotní rozmezí 10-60 °C, vždy s přírůstkem po 10 °C.

V tabulce 6 jsou uvedeny vypočítané termodynamické parametry pro obě hodnoty pH vodné složky mobilní fáze. Základní postup výpočtu z van 't Hoffovy závislosti $\ln k$ na $1/T$ (rovnice 1) je uveden v Teoretické části v kapitole 2.1.1.5.

Tabulka 6: Termodynamické parametry ΔH° , $\Delta S^{\circ\#}$ získané z van 't Hoffovy teplotní závislosti.

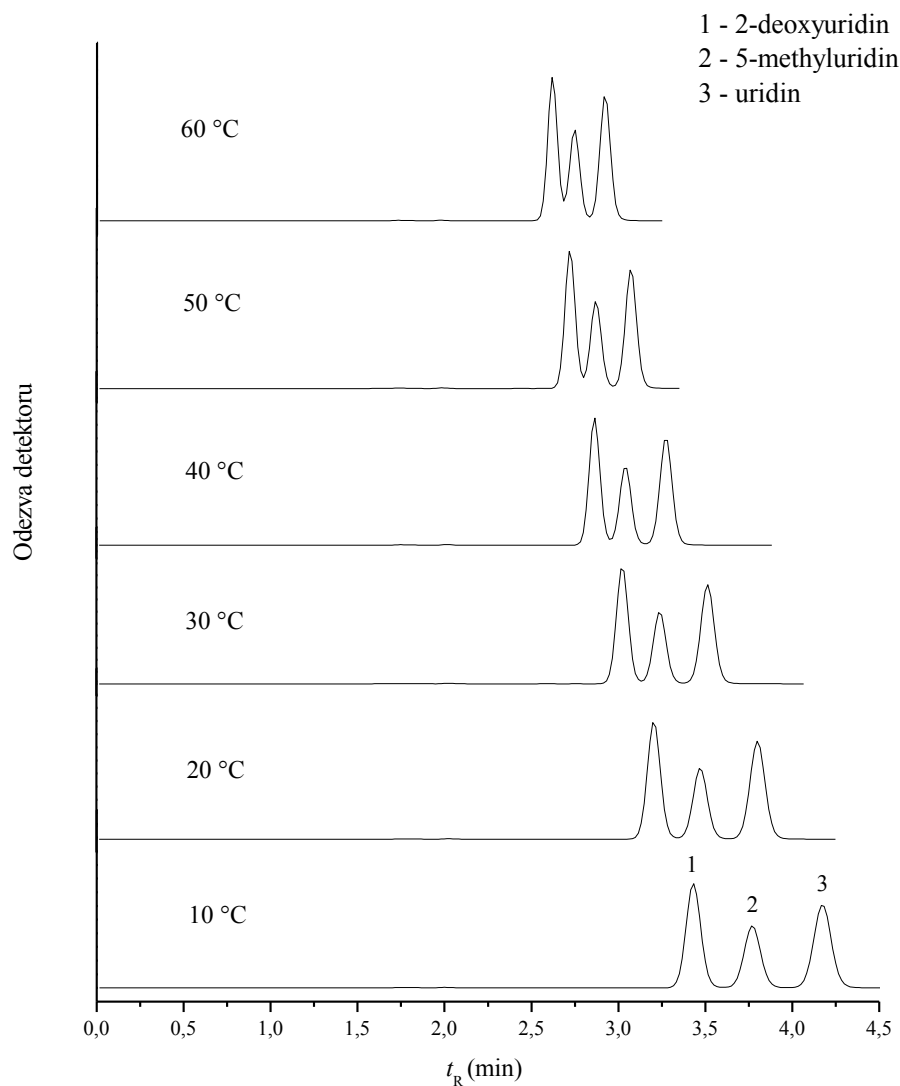
Analyt	pH = 4,7			pH = 9,5		
	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta S^{\circ\#}$ (J/mol·K)	R^2	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta S^{\circ\#}$ (J/mol·K)	R^2
adenin	9,46	26,2	0,998	9,46	26,8	0,999
cytosin	10,3	27,8	0,999	10,10	27,3	0,999
guanin	8,99	20,8	0,997	9,16	21,4	0,998
uracil	7,66	29,7	0,997	7,57	29,3	0,999
thymín	7,26	29,8	0,995	7,41	30,3	0,999
uridin	11,4	37,3	0,999	11,5	37,5	0,999
5-methyluridin	10,9	37,3	0,999	11,3	38,4	0,999
2-deoxyuridin	10,2	36,0	0,999	10,5	37,2	0,999

Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný; 90/10 (v/v). R^2 je koeficient determinace van 't Hoffovy závislosti; ΔH° je změna standardní entalpie přenosu.
 $\Delta S^{\circ\#} = \Delta S^\circ + R \ln(V_S/V_M)$

Získané výsledky potvrzují, že s rostoucí teplotou se obvykle retence látek snižuje (obrázek 18). To platí za předpokladu, že přenos analytů z mobilní fáze do hydratované stacionární fáze je exotermní proces (tomu odpovídají záporné hodnoty ΔH°) upřednostňovaný při nízkých teplotách.

Pokud by však retence byla řízena silnými elektrostatickými interakcemi mezi nabitými analyty a nabitou stacionární fází, retence by se s rostoucí teplotou zvyšovala⁶⁶. To ovšem platí pouze pro stacionární fáze poskytující iontové interakce, což není případ diolových stacionárních fází.

Obrázek 18 ukazuje, že k separaci na základní linii uridinu a jeho derivátů dochází při teplotách nižších než 40 °C. Eluční pořadí se v rámci testovaného rozsahu teplot nezměnilo. Tabulka 7 shrnuje získané hodnoty rozlišení pro testované nukleobáze. Nízké hodnoty rozlišení pro thymín a uracil jsou způsobeny koelucí nečistoty standardu s thymínem.



Obrázek 18: Vliv teploty na separaci uridinu a jeho derivátů. Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7; 90/10 (v/v).

Tabulka 7: Vliv teploty na retenci a rozlišení (R_s) pro nukleobáze.

Analyt	Teplota											
	10 °C		20 °C		30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s
thymín	2,78		2,68		2,60		2,52		2,46		2,38	
uracil	2,98	0,94	2,86	1,25	2,76	1,01	2,67	0,72	2,57	0,63	2,50	0,53
adenin	5,79	10,22	5,32	10,20	4,92	10,52	4,53	10,04	4,23	9,52	3,96	8,70
cytosin	6,52	2,52	5,86	2,13	5,35	1,89	4,89	1,70	4,52	1,59	4,22	1,51
guanin	8,07	4,69	7,39	5,30	6,80	5,68	6,23	5,71	5,74	5,67	5,31	5,53

Složení mobilní fáze: ACN/10mM octan amonný, pH = 4,7; 90/10 (v/v).

4.6 Testy selektivity

Test selektivity pro jednotlivé funkční skupiny byl prováděn pro tři různé vodné složky mobilní fáze (10mM octan amonný, pH = 4,7 a pH = 9,5 a vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1). Množství acetonitrilu v mobilní fázi bylo při všech měřeních 90 obj. %. Byly zjišťovány hodnoty selektivit pro tři různé skupiny – methylenovou (α (-CH₂-)), hydroxylovou skupinu (α (-OH)) a aminoskupinu (α (-NH₂)). Získané výsledky pro kolonu Torus DIOL jsou uvedeny v tabulce 8. Hodnoty selektivit nám umožňují například porovnávat velikost jednotlivých typů interakcí mezi různými stacionárními fázemi nebo při různém složení mobilní fáze. Kolona Torus DIOL byla v této práci porovnána s kolonou Torus DEA (diethylaminová stacionární fáze) ze stejné série SFC kolon⁶⁷. Hodnoty selektivit pro Torus DEA kolonu jsou uvedeny v tabulce 9.

Hodnota selektivity pro methylenovou skupinu je získána ze vztahu:

$$\alpha (-\text{CH}_2-) = \frac{k (\text{uridin})}{k (5\text{-methyluridin})} \quad (8)$$

kde α je selektivita a k retenční faktor. Tento test selektivity poskytuje informaci o stupni „hydrofobních“ interakcí mezi analyzovanými látkami a stacionární fází. V RPLC se používá k popisu stupně pokrytí silikagelu hydrofobními skupinami²⁰.

Podobně je počítána i selektivita pro hydroxylovou skupinu:

$$\alpha (-\text{OH}) = \frac{k (\text{uridin})}{k (2\text{-deoxyuridin})} \quad (9)$$

kde α je selektivita a k retenční faktor.

K testování selektivity pro aminoskupinu byla použita sada aminokyselin a jejich blokovaných analogů (blokovaných *tert*-butoxykarbonylovou skupinou). Hodnotu selektivity pro aminoskupinu získáme ze vztahu⁶⁸:

$$\alpha (-\text{NH}_2) = \frac{k (\text{aminokyselina})}{k (\text{Boc analog aminokyseliny})} \quad (10)$$

kde α je selektivita a k retenční faktor.

Tabulka 8: Retenční faktory a hodnoty selektivit pro kolonu Torus DIOL.

Analyt	pH = 2,1		pH = 4,7		pH = 9,5	
	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α
uridin	1,07		1,12		1,11	
5-methyluridin	0,91	1,18	0,94	1,19	0,93	1,19
2-deoxyuridin	0,77	1,39	0,79	1,41	0,78	1,42
L-tryptofan	2,36		5,97		5,78	
N-Boc-L-tryptofan	*	*	0,77	7,76	0,74	7,81
L-tyrosin	2,68		8,58		8,24	
N-Boc-L-tyrosin	*	*	1,03	8,35	0,98	8,42
DL-fenylalanin	2,50		5,20		5,02	
N-Boc-D-fenylalanin	*	*	0,61	8,50	0,59	8,54

Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka; 90/10 (v/v). Vodné složky: 10mM octan amonný, pH = 4,7 a pH = 9,5 a vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1; (*) analyt eluoval s markerem mrtvého času

$\alpha = k(\text{uridin})/k(\text{5-methyluridin})$

$\alpha = k(\text{uridin})/k(\text{2-deoxyuridin})$

$\alpha = k(\text{aminokyselina})/k(\text{Boc analog aminokyseliny})$

Tabulka 9: Retenční faktory a hodnoty selektivit pro kolonu Torus DEA.

Analyt	pH = 2,1		pH = 4,7		pH = 9,5	
	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α
uridin	1,17		1,11		1,08	
5-methyluridin	0,98	1,20	0,90	1,24	0,84	1,28
2-deoxyuridin	0,74	1,58	0,70	1,60	0,68	1,59
L-tryptofan	1,76		6,19		7,89	
N-Boc-L-tryptofan	1,00	1,77	36,06	0,17	27,83	0,28
L-tyrosin	2,41		10,50		13,45	
N-Boc-L-tyrosin	1,52	1,58	46,29	0,23	35,17	0,38
DL-fenylalanin	1,27		5,45		7,96	
N-Boc-D-fenylalanin	0,84	1,51	24,47	0,22	19,57	0,41

Složení mobilní fáze: ACN/vodná složka; 90/10 (v/v). Vodné složky: 10mM octan amonný, pH = 4,7 a pH = 9,5 a vodný roztok kyseliny mravenčí, pH = 2,1.

$\alpha = k(\text{uridin})/k(\text{5-methyluridin})$

$\alpha = k(\text{uridin})/k(\text{2-deoxyuridin})$

$\alpha = k(\text{aminokyselina})/k(\text{Boc analog aminokyseliny})$

Z tabulek 8 a 9 je patrné, že hodnoty selektivit pro methylenovou skupinu pro kolonu Torus DIOL nezávisí na hodnotě pH vodné složky mobilní fáze, pro kolonu Torus DEA s rostoucím pH mírně rostou. Selektivita pro hydroxylovou skupinu se v rámci studovaných hodnot pH pro obě kolony téměř neliší. Obecně lze říci, že aminokyseliny s neblokovanými aminoskupinami jsou na koloně Torus DIOL výrazně více zadržovány v porovnání s jejich *N*-Boc-blokovanými analogy. Derivatizací aminoskupiny klesá polarita aminokyseliny a také klesá její schopnost účastnit se vodíkových interakcí (případně elektrostatických interakcí) se stacionární fází. Přesně opačný efekt vykazovala kolona Torus DEA. Selektivita pro aminoskupinu se liší mezi testovanými kolonami a pro kolonu Torus DEA silně závisí na hodnotě pH vodné složky mobilní fáze. To je způsobeno kladným nábojem na povrchu stacionární fáze Torus DEA kolony. Při nízkých hodnotách pH vodné složky mobilní fáze je karboxylová skupina aminokyselin nedisociovaná a aminoskupina aminokyselin je kladně nabitá. Ve vyšších hodnotách pH vodné složky mobilní fáze je karboxylová skupina aminokyseliny disociovaná (záporně nabitá) a stává se tak více zadržovanou na kladně nabitě stacionární fází. Při použití pufrů o pH = 4,7 a pH = 9,5 jako složek mobilní fáze vykazují *N*-Boc analogy aminokyselin významně vyšší retenci než nederivatizované aminokyseliny, i když je jejich polarita nižší. Toto chování je způsobeno iontově-výměnným charakterem Torus DEA kolony. Při pH = 4,7 a pH = 9,5 je aminoskupina aminokyseliny protonizovaná nebo částečně protonizovaná, což vede k odpuzování analytu od povrchu stacionární fáze. *N*-Boc analogy aminokyselin mají aminoskupinu blokovanou, tudíž nedochází k protonizaci v závislosti na pH a následnému odpuzování od povrchu stacionární fáze.

4.7 Porovnání s ostatními komerčně dostupnými kolonami

Na základě publikovaných dat^{69–71} byly k popisu interakcí mezi analyty a stacionární fází vybrány tři páry analytů. Poměry retenčních faktorů dvojice analytů získaných za konstantního složení mobilní fáze mohou sloužit k porovnání různých typů interakcí mezi různými kolonami. Všechna měření byla prováděna při složení mobilní fáze: ACN/25mM octan amonný, pH = 6,8; 80/20 (v/v) a průtoku mobilní fáze 0,5 ml·min⁻¹. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 10.

Poměr retenčních faktorů $k(\text{adenosin})/k(\text{adenin})$ popisuje schopnost stacionární fáze účastnit se vodíkových interakcí s analyty. Adenosin má z důvodu přítomnosti ribózy ve své struktuře vyšší schopnost se účastnit těchto interakcí než adenin⁶⁹.

Poměr retenčních faktorů $k(\text{cytosin})/k(\text{uracil})$ popisuje polaritu stacionární fáze. Cytosin je polárnější a v HILIC podmínkách více zadržovaná látka. Z toho důvodu vyšší poměr jejich retenčních faktorů značí vyšší polaritu stacionární fáze⁷⁰.

Poměr retenčních faktorů $k(\text{benzyltrimethylamonium chlorid})/k(\text{cytosin})$ se používá k popisu schopnosti stacionární fáze účastnit se kationtově-výměnných interakcí. Benzyltrimethylamonium chlorid (BTMA) je vždy kladně nabitý, náboj aminoskupiny cytosinu závisí na pH vodné složky mobilní fáze (při sledovaném pH = 6,8 je cytosin neutrální). Vyšší poměr retenčních faktorů značí silnější kationtově-výměnný charakter stacionární fáze, nižší poměr pak naopak větší aniontově-výměnný charakter⁷¹.

Tabulka 10: Retenční faktory a selektivita.

Analyt	<i>k</i>	<i>α</i>
adenosin	0,88	0,97
adenin	0,91	
cytosin	1,02	
uracil	0,46	2,22
BTMA	0,46	0,45

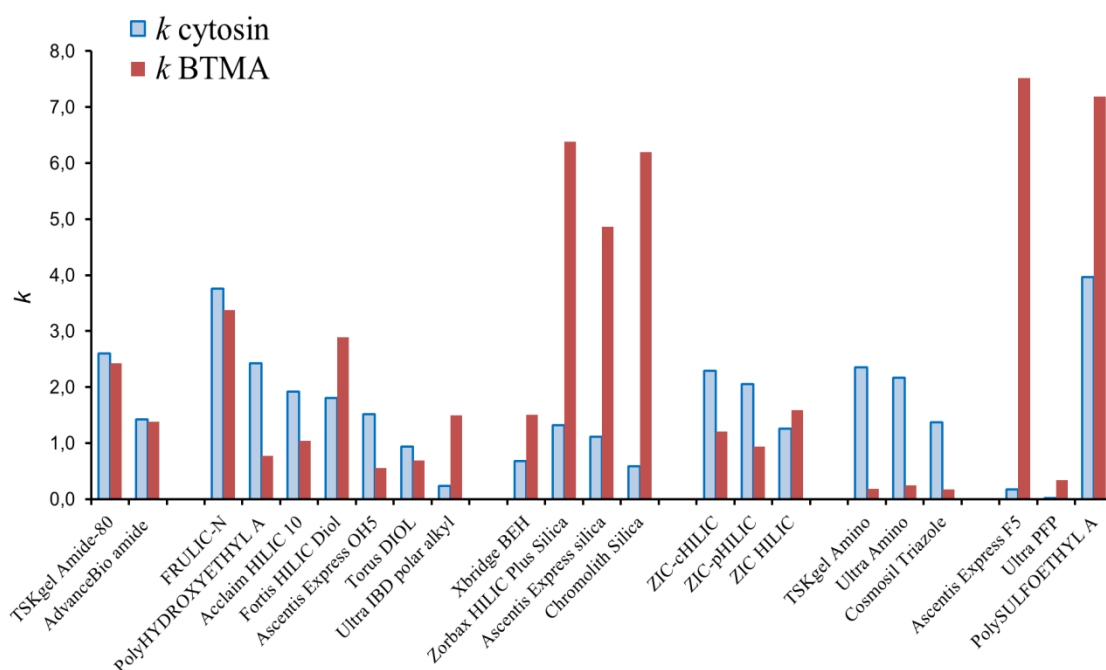
Složení mobilní fáze: ACN/25mM octan amonný, pH = 6,8; 80/20 (v/v), průtok mobilní fáze: 0,5 ml·min⁻¹.

$\alpha = k(\text{adenosin})/k(\text{adenin})$

$\alpha = k(\text{cytosin})/k(\text{uracil})$

$\alpha = k(\text{BTMA})/k(\text{cytosin})$

Obrázek 19 ukazuje porovnání retence kladně nabitého BTMA a neutrálního cytosinu na koloně Torus DIOL s dalšími 21 komerčně dostupnými kolonami. Pro toto porovnání byl vybrán 5mM octan amonný, pH = 6,8. Vliv iontové síly vodné složky mobilní fáze na retenci je tak menší než při použití 25mM octanu amonného, pH = 6,8, který byl použit pro jiný typ porovnání kolon.



Obrázek 19: Porovnání retenčních faktorů cytosinu a BTMA pro 22 různých komerčně dostupných HILIC kolon. Složení mobilní fáze: ACN/5mM octan amonný, pH = 6,8; 80/20 (v/v), průtok mobilní fáze: 0,5 ml·min⁻¹. Data pro ostatních 21 kolon byla získána z práce Iversona a kol⁷⁰.

Porovnávané kolony byly rozděleny do několika kategorií podle svých vlastností: i) neutrální stacionární fáze (amidové, diolové), ii) stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu, iii) zwitterionické stacionární fáze, iv) stacionární fáze s kladně nabitým povrchem vykazující aniontově-výměnný charakter a v) stacionární fáze, u kterých se předpokládá kationtově-výměnný charakter (polySULFOETHYL A nebo pentafluorophenyl (PFP)).

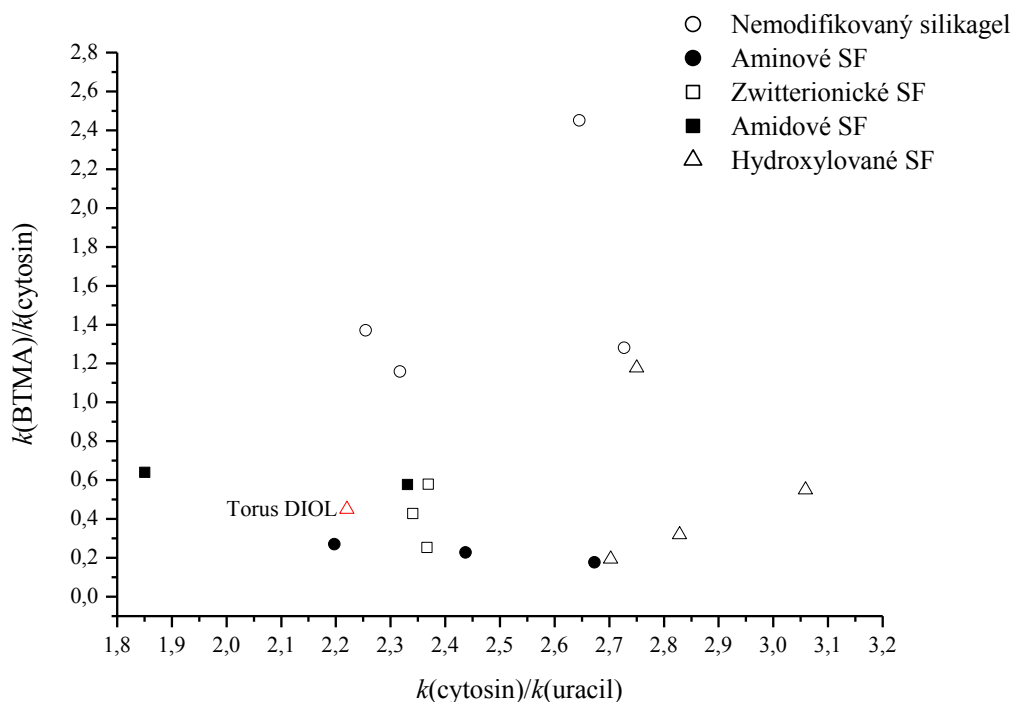
Z obrázku 19 vyplývá, že retence cytosinu i BTMA je srovnatelná pro amidové, hydroxylované a zwitterionické stacionární fáze. Největší kationtově-výměnný charakter (nejvyšší retenci BTMA) mají stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu, jedna ze dvou PFP kolon a kolona polySULFOETHYL A.

Obrázek 19 dále ukazuje, že většina HILIC stacionárních fází vykazuje alespoň nějaký stupeň iontově-výměnného charakteru. U silikagelových stacionárních fází je to pravděpodobně způsobeno záporně nabitými volnými silanolovými skupinami. Naopak aminové a triazolové kolony mají při pH = 6,8 kladně nabitý povrch SF.

Tyto kolony mají aniontově-výměnný charakter a retence kladně nabitého BTMA je proto nižší než na neutrálních stacionárních fázích.

Kolona Torus DIOL vykazuje srovnatelnou retenci BTMA s ostatními diolovými kolonami kromě Fortis HILIC Diol kolony, která za těchto podmínek zadržuje BTMA silněji. Torus DIOL vykazuje silnější retenci BTMA v porovnání s aminovými a triazolovými stacionárními fázemi, zatímco v porovnání s kolonami z nemodifikovaného silikagelu a kationtově-výměnnými kolonami je retence tohoto analytu nižší. Cytosin je na Torus DIOL koloně zadržován méně v porovnání s ostatními neutrálními kolonami. Retence cytosinu na Torus DIOL koloně je srovnatelná s retencí na nemodifikovaných silikagelových kolonách.

K dalšímu porovnání testované Torus DIOL kolony s šestnácti dalšími kolonami testovanými v HILIC podmínkách v práci Iversona a kol.⁷⁰ byl sestrojen graf, ve kterém je porovnání polarity a iontově výměnného charakteru sedmnácti stacionárních fází použitelných v HILIC (obrázek 20).



Obrázek 20: Iontově-výměnné interakce ($k(\text{BTMA})/k(\text{cytosin})$) versus polarita ($k(\text{cytosin})/k(\text{uracil})$) HILIC stacionárních fází. Složení mobilní fáze: ACN/25mM octan amonný, pH = 6,8; 80/20 (v/v), průtok mobilní fáze: 0,5 ml·min⁻¹. Data pro ostatních šestnáct kolon získána z práce Iversona a kol.⁷⁰.

Poměr retenčních faktorů $k(\text{cytosin})/k(\text{uracil})$ je na obrázku 20 vyneseno na ose x – směrem doprava roste polarita stacionárních fází. Osa y reprezentuje iontově-výměnný charakter. V dolní části grafu můžeme najít aminové stacionární fáze s aniontově-výměnným charakterem, naopak v horní části jsou stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu, které vykazují kationtově-výměnný charakter. Z obrázku 20 vyplývá, že stacionární fáze testované Torus DIOL kolony má nižší polaritu než srovnávané hydroxylované stacionární fáze a srovnatelný iontově-výměnný charakter.

Ibrahim a kol.⁷¹ využili graf potenciálu stacionární fáze účastnit se iontově-výměnných interakcí, $k(\text{BTMA})/k(\text{cytosin})$, *versus* schopnosti stacionární fáze účastnit se vodíkových interakcí $k(\text{adenosin})/k(\text{adenin})$ k porovnání HILIC stacionárních fází. Na základě srovnání publikovaných dat⁷¹ s daty pro Torus DIOL kolonu lze shrnout, že testovaná diolová kolona poskytuje srovnatelné hodnoty $\alpha = k(\text{BTMA})/k(\text{cytosin})$ jako zavedené diolové HILIC stacionární fáze.

5 Závěr

V rámci této diplomové práce byla provedena separace pěti fluorovaných pesticidů na nové koloně Torus DIOL s diolovou stacionární fází určené pro superkritickou fluidní chromatografii v HILIC podmínkách. Retenční mechanismus byl mimo jiné studován analýzou malých polárních látek (směs nukleobází, uridin a jeho deriváty, sada kyselých, neutrálních a bazických látek) v různých podmínkách.

Testováním vlivu množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci bylo potvrzeno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování analytu mezi hydratovanou stacionární fází a mobilní fází, tak i adsorpce analytu na povrch stacionární fáze. Vliv množství acetonitrilu v MF na retenci byl testován v rozsahu od 75 do 95 obj. % se změnou po 5 obj. %. V tomto rozmezí bylo potvrzeno typické retenční chování pro HILIC – se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v MF roste retence polárních analyzovaných látek.

Hodnota pH vodné složky mobilní fáze výrazně ovlivnila pouze retenci kyselých látek. Se zvyšující se hodnotou pH jejich retence rostla nebo klesala v závislosti na jejich hodnotě pK_A . Kyselé látky s hodnotou pK_A blízkou 2,1 nebo větší vykazovaly vyšší retenci v $pH = 4,7$ a v $pH = 9,5$ oproti $pH = 2,1$. Naopak retence silných kyselin byla nevyšší při $pH = 2,1$. Hodnota pH vodné složky mobilní fáze měla vliv také na tvar píků a separaci nukleobází a pesticidů. Roztok kyseliny mravenčí o $pH = 2,1$ se ukázal jako nejméně vhodný. S rostoucí iontovou silou pufru se retence většiny analyzovaných látek mírně zvyšovala.

Testování vlivu teploty na retenci ukázalo, že s rostoucí teplotou se retence snižuje. Van 't Hoffova lineární závislost $\ln k$ na $1/T$ ukázala, že retenční mechanismus se u testovaných látek v rámci sledovaného rozsahu teplot nemění. Přenos analytů z mobilní fáze do hydratované stacionární fáze je entalpicky řízený proces.

Dále byly provedeny testy selektivity pro různé dvojice látek sloužící k bližšímu popisu interakcí analytu se stacionární fází. Bylo zjištěno, že selektivita pro hydroxy-, amino- a methylenovou skupinu nezávisí na pH vodné složky mobilní fáze. Získané výsledky byly použity k porovnání Torus DIOL kolony s ostatními komerčně dostupnými kolonami určenými pro HILIC.

Výsledky této práce ukazují, že Torus DIOL kolona je vhodná pro použití v kapalinové chromatografii v HILIC módu.

6 Použitá literatura

- (1) Nguyen, D. T.-T.; Guillarme, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Fast Analysis in Liquid Chromatography Using Small Particle Size and High Pressure. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29* (12), 1836–1848.
- (2) Yoshida, T. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (15), 3038–3043.
- (3) Wang, C.; Jiang, C.; Armstrong, D. W. Considerations on HILIC and Polar Organic Solvent Based Separations: Use of Cyclodextrin and Macrocyclic Glycopeptide Stationary Phases. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (11), 1980–1990.
- (4) Gama, M. R.; da Costa Silva, R. G.; Collins, C. H.; Bottoli, C. B. Hydrophilic Interaction Chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 48–60.
- (5) McCalley, D. V. Is Hydrophilic Interaction Chromatography with Silica Columns a Viable Alternative to Reversed-Phase Liquid Chromatography for the Analysis of Ionisable Compounds? *J. Chromatogr. A* **2007**, *1171* (1–2), 46–55.
- (6) Heaton, J. C.; Wang, X.; Barber, W. E.; Buckenmaier, S. M. C.; McCalley, D. V. Practical Observations on the Performance of Bare Silica in Hydrophilic Interaction Compared with C18 Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1328*, 7–15.
- (7) Cubbon, S.; Bradbury, T.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J. Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (23), 8911–8918.
- (8) Cífková, E.; Hájek, R.; Lísa, M.; Holčapek, M. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-mass Spectrometry of (Lyso)Phosphatidic Acids, (Lyso)Phosphatidylserines and Other Lipid Classes. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1439*, 65–73.
- (9) Linden, J. C.; Lawhead, C. L. Liquid Chromatography of Saccharides. *J. Chromatogr. A* **1975**, *105* (1), 125–133.
- (10) Alpert, A. J. Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds. *J. Chromatogr. A* **1990**, *499*, 177–196.
- (11) Hemstrom, P.; Irgum, K. Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29* (12), 1784–1821.

- (12) Boumahraz, M.; Davydov, V. Y.; Kiselev, A. V. Separation of Carbohydrates by Liquid Chromatography on Silica Gel, Adding Adsorption Modifiers to the Eluent. *Chromatographia* **1982**, *15* (12), 751–756.
- (13) Guo, Y.; Bhalodia, N.; Fattal, B.; Serris, I. Evaluating the Adsorbed Water Layer on Polar Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Separations* **2019**, *6* (2), 19.
- (14) Buszewski, B.; Noga, S. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)-a Powerful Separation Technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402* (1), 231–247.
- (15) McCalley, D. V.; Neue, U. D. Estimation of the Extent of the Water-Rich Layer Associated with the Silica Surface in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1192* (2), 225–229.
- (16) McCalley, D. V. Study of the Selectivity, Retention Mechanisms and Performance of Alternative Silica-Based Stationary Phases for Separation of Ionised Solutes in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (20), 3408–3417.
- (17) Guo, Y. Recent Progress in the Fundamental Understanding of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Analyst* **2015**, *140* (19), 6452–6466.
- (18) Corporation, W. *Comprehensive Guide to HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography*; Wiley, 2014.
- (19) McCalley, D. V. Understanding and Manipulating the Separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-a Review. *J. Chromatogr. A* **2017**.
- (20) Kawachi, Y.; Ikegami, T.; Takubo, H.; Ikegami, Y.; Miyamoto, M.; Tanaka, N. Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phases: Hydrophilicity, Charge Effects, Structural Selectivity, and Separation Efficiency. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (35), 5903–5919.
- (21) Wang, Q.; Ye, M.; Xu, L.; Shi, Z. A Reversed-Phase/Hydrophilic Interaction Mixed-Mode C18-Diol Stationary Phase for Multiple Applications. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *888*, 182–190.
- (22) Bäurer, S.; Guo, W.; Polnick, S.; Lämmerhofer, M. Simultaneous Separation of Water- and Fat-Soluble Vitamins by Selective Comprehensive HILIC × RPLC

- (High-Resolution Sampling) and Active Solvent Modulation. *Chromatographia* **2019**, *82* (1), 167–180.
- (23) Jandera, P. Chapter 2 - Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. In *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*; Holčapek, M., Byrdwell, W. C., Eds.; AOCS Press, **2017**; pp 39–87.
- (24) Olsen, B. A. Hydrophilic Interaction Chromatography Using Amino and Silica Columns for the Determination of Polar Pharmaceuticals and Impurities. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913* (1), 113–122.
- (25) Naidong, W.; Shou, W.; Chen, Y.-L.; Jiang, X. Novel Liquid Chromatographic–Tandem Mass Spectrometric Methods Using Silica Columns and Aqueous–Organic Mobile Phases for Quantitative Analysis of Polar Ionic Analytes in Biological Fluids. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2001**, *754* (2), 387–399.
- (26) Karatapanis, A. E.; Fiamegos, Y. C.; Stalikas, C. D. Study of the Behavior of Water-Soluble Vitamins in HILIC on a Diol Column. *Chromatographia* **2010**, *71* (9), 751–759.
- (27) Valette, J. C.; Demesmay, C.; Rocca, J. L.; Verdon, E. Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase. *Chromatographia* **2004**, *59* (1), 55–60.
- (28) Karlsson, G.; Winge, S.; Sandberg, H. Separation of Monosaccharides by Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1092* (2), 246–249.
- (29) Daunoravičius, Ž.; Juknaitė, I.; Naujalis, E.; Padarauskas, A. Simple and Rapid Determination of Denaturants in Alcohol Formulations by Hydrophilic Interaction Chromatography. *Chromatographia* **2006**, *63* (7), 373–377.
- (30) Ihunegbo, F. N.; Tesfalidet, S.; Jiang, W. Determination of Melamine in Milk Powder Using Zwitterionic HILIC Stationary Phase with UV Detection. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6–7), 988–995.
- (31) Armstrong, D. W.; Jin, H. L. Evaluation of the Liquid Chromatographic Separation of Monosaccharides, Disaccharides, Trisaccharides, Tetrasaccharides, Deoxysaccharides and Sugar Alcohols with Stable Cyclodextrin Bonded Phase Columns. *J. Chromatogr. A* **1989**, *462*, 219–232.

- (32) Jiang, W.; Irgum, K. Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (2), 333–344.
- (33) Boháčová, I.; Halko, R.; Jandera, P. The Effects of Temperature and Mobile Phase on the Retention of Aliphatic Carboxylic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography on Zwitterionic Stationary Phases. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39* (24), 4732–4739.
- (34) Guo, Z.; Jin, Y.; Liang, T.; Liu, Y.; Xu, Q.; Liang, X.; Lei, A. Synthesis, Chromatographic Evaluation and Hydrophilic Interaction/Reversed-Phase Mixed-Mode Behavior of a “Click β -Cyclodextrin” Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (2), 257–263.
- (35) West, C.; Khater, S.; Lesellier, E. Characterization and Use of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Type Stationary Phases in Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1250*, 182–195.
- (36) Wasen, U. van; Swaid, I.; Schneider, G. M. Physicochemical Principles and Applications of Supercritical Fluid Chromatography (SFC). New Analytical Methods (19). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19* (8), 575–587.
- (37) Taylor, L. T. Supercritical Fluid Chromatography for the 21st Century. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47* (3), 566–573.
- (38) Galea, C.; Mangelings, D.; Vander Heyden, Y. Characterization and Classification of Stationary Phases in HPLC and SFC – a Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *886*, 1–15.
- (39) Regnier, F. E.; Noel, R. Glycerolpropylsilane Bonded Phases in the Steric Exclusion Chromatography of Biological Macromolecules. *J. Chromatogr. Sci.* **1976**, *14* (7), 316–320.
- (40) Jandera, P.; Janás, P.; Škeříková, V.; Urban, J. Effect of Water on the Retention on Diol and Amide Columns in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (7), 1434–1448.
- (41) Jandera, P. Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *692* (1–2), 1–25.
- (42) Liu, X.; Pohl, C. New Hydrophilic Interaction/Reversed-Phase Mixed-Mode Stationary Phase and Its Application for Analysis of Nonionic Ethoxylated Surfactants. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191* (1), 83–89.

- (43) de la Puente, M. L.; Soto-Yarritu, P. L.; Anta, C. Placing Supercritical Fluid Chromatography One Step Ahead of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography in the Achiral Purification Arena: A Hydrophilic Interaction Chromatography Cross-Linked Diol Chemistry as a New Generic Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1250*, 172–181.
- (44) Olšovská, J.; Jurková, M. Nové Trendy v Kapalinové Chromatografii a Jejich Využití v Analýze Piva a Pivovarských Surovin. Část 1. Teoretický Úvod. *Kvas. Prům.* **2012**, *58* (2), 30–35.
- (45) Marrubini, G.; Appelblad, P.; Maietta, M.; Papetti, A. Hydrophilic Interaction Chromatography in Food Matrices Analysis: An Updated Review. *Food Chem.* **2018**, *257*, 53–66.
- (46) Vacek, J.; Onofrejova, L.; Klejdus, B.; Kuban, V. Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in Separation of Polar Compounds. *Chem. Listy* **2009**, *103* (5), 381–385.
- (47) Quiming, N. S.; Denola, N. L.; Soliev, A. B.; Saito, Y.; Jinno, K. Retention Behavior of Ginsenosides on a Poly(Vinyl Alcohol)-Bonded Stationary Phase in Hydrophilic Interaction Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389* (5), 1477–1488.
- (48) Fountain, K. J.; Xu, J.; Diehl, D. M.; Morrison, D. Influence of Stationary Phase Chemistry and Mobile-Phase Composition on Retention, Selectivity, and MS Response in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6–7), 740–751.
- (49) McCalley, D. V. Effect of Mobile Phase Additives on Solute Retention at Low Aqueous PH in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1483*, 71–79.
- (50) Guo, Y.; Gaiki, S. Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (35), 5920–5938.
- (51) Kalíková, K.; Boublík, M.; Kučerová, G.; Kozlík, P. The Effect of Buffer Concentration and Cation Type in the Mobile Phase on Retention of Amino Acids and Dipeptides in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Chem. Pap.* **2018**, *72* (1), 139–147.

- (52) Hao, Z.; Xiao, B.; Weng, N. Impact of Column Temperature and Mobile Phase Components on Selectivity of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (9), 1449–1464.
- (53) Chester, T. L.; Coym, J. W. Effect of Phase Ratio on van't Hoff Analysis in Reversed-Phase Liquid Chromatography, and Phase-Ratio-Independent Estimation of Transfer Enthalpy. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1003* (1), 101–111.
- (54) Key, B. D.; Howell, R. D.; Criddle, C. S. Fluorinated Organics in the Biosphere. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 2445–2454.
- (55) Secor, J.; Cséke, C. Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Activity by Haloxyfop and Tralkoxydim. *Plant Physiol.* **1988**, *86* (1), 10–12.
- (56) Buhler, D. D.; Burnside, O. C. Herbicidal Activity of Fluazifop-Butyl, Haloxyfop-Methyl, and Sethoxydim in Soil. *Weed Sci.* **1984**, *32* (6), 824–831.
- (57) Poiger, T.; Müller, M. D.; Buser, H.-R.; Buerge, I. J. Environmental Behavior of the Chiral Herbicide Haloxyfop. 1. Rapid and Preferential Interconversion of the Enantiomers in Soil. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (10), 2583–2590.
- (58) Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Sherman, T. D.; Duke, S. O. Effect of Diphenyl Ether Herbicides on Oxidation of Protoporphyrinogen to Protoporphyrin in Organellar and Plasma Membrane Enriched Fractions of Barley. *Plant Physiol.* **1991**, *97* (1), 197–203.
- (59) Lee, S. D.; Oliver, L. R. Efficacy of Acifluorfen on Broadleaf Weeds. Times and Methods for Application. *Weed Sci.* **1982**, *30* (5), 520–526.
- (60) Witkowski, D. A.; Halling, B. P. Inhibition of Plant Protoporphyrinogen Oxidase by the Herbicide Acifluorfen-Methyl. *Plant Physiol.* **1989**, *90* (4), 1239–1242.
- (61) Birceanu, O.; Sorensen, L. A.; Henry, M.; McClelland, G. B.; Wang, Y. S.; Wilkie, M. P. The Effects of the Lampricide 3-Trifluoromethyl-4-Nitrophenol (TFM) on Fuel Stores and Ion Balance in a Non-Target Fish, the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *160*, 30–41.
- (62) Waldrep, T. W.; Porter, H. D. Ethalfluralin, a New Selective Preplant Incorporated Herbicide. In *Proceedings Southern Weed Science Society*; **1977**.
- (63) Snyder, L. R.; Poppe, H. Mechanism of Solute Retention in Liquid—Solid Chromatography and the Role of the Mobile Phase in Affecting Separation: Competition versus “Sorption.” *J. Chromatogr. A* **1980**, *184* (4), 363–413.

- (64) Schoenmakers, P. J.; Billiet, H. A. H.; De Galan, L. Systematic Study of Ternary Solvent Behaviour in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1981**, *218*, 261–284.
- (65) Greco, G.; Grosse, S.; Letzel, T. Study of the Retention Behavior in Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography of Isomeric Hydroxy- and Aminobenzoic Acids. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1235*, 60–67.
- (66) Greco, G.; Letzel, T. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51* (7), 684–693.
- (67) Kozlov, O.; Kadlecová, Z.; Gilar, M.; Gondová, T.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Systematic Evaluation of Selected Supercritical Fluid Chromatography Diol- and Diethylamine-Based Columns for Application in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Sep. Sci. PLUS* **2019**, *2* (3), 81–88.
- (68) Kalíková, K.; Kozlík, P.; Gilar, M.; Tesařová, E. Properties of Two Amide-Based Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Columns. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36* (15), 2421–2429.
- (69) Dinh, N. P.; Jonsson, T.; Irgum, K. Probing the Interaction Mode in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (35), 5880–5891.
- (70) Iverson, C. D.; Gu, X.; Lucy, C. A. The Hydrophilicity vs. Ion Interaction Selectivity Plot Revisited: The Effect of Mobile Phase PH and Buffer Concentration on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Selectivity Behavior. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1458*, 82–89.
- (71) Ibrahim, M. E. A.; Liu, Y.; Lucy, C. A. A Simple Graphical Representation of Selectivity in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1260*, 126–131.