

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

**POROVNÁNÍ SELEKTIVITY A RETENCE
ANALYTŮ NA DVOU HILIC STACIONÁRNÍCH
FÁZÍCH**

Autor práce: Nikola Klvanová

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

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

Hradec Králové, 2015

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Nikola Klvanová

Školitel: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Porovnání selektivity a retence na dvou HILIC stacionárních fázích

Diplomová práce se zabývá vlivem koncentrace acetonitrilu, pH a koncentrace pufru v mobilní fázi na retenci a selektivitu dvou analytických kolon Luna HILIC (diol) (3 μm , 100 x 3,0 mm) a Ascentis ES Cyano (3 μm , 100 x 2,1 mm). Pro studii bylo vybráno celkem 28 analytů ze zástupců kyselých, neutrálních a bazických látek. Detekce byla provedena pomocí PDA detektoru při vlnové délce 245 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vodné složky (pufr nebo kyselina octová) za izokratické eluce s průtokem mobilní fáze 0,7 ml/min a 0,3 ml/min. Teplota na koloně byla nastavena na 30°C a teplota v autosampleru na 4°C. Nástřik byl 5 μl nebo 3 μl .

Pro snazší hodnocení byly naměřené hodnoty shrnuty v tabulkách a následně sestrojeny grafy. Vliv procentuálního obsahu acetonitrilu v mobilní fázi byl hodnocen na základě grafické závislosti $k' = f(\%W)$, ze které je patrná zvyšující se retence se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi (typické HILIC chování), především v oblasti od 85%) pro všechny analyty na koloně Luna HILIC (diol). Na koloně Ascentis ES Cyano bylo pozorováno totéž chování pro bazické a kyselé látky. Látky neutrální povahy vykazovaly snižující retenci v oblasti od 5 do 30% ACN (typické RP chování) a slabé HILIC chování v oblasti od 80% ACN v mobilní fázi. Byl pozorován vliv koncentrace pufru na retenci látek. Se zvyšující se koncentrací pufru se na obou kolonách zvyšovala retence hlavně u kyseliny šikimové a u ostatních kyselých látek byl vliv minimální. Naopak se snižovala retence bazických látek, atenololu a propranololu. U látek neutrální povahy byl vliv koncentrace pufru na obou kolonách minimální. Rozdíly v selektivitě kolon při pH 3,8 a 6,8 nebyly výrazné. Největší rozdíly selektivity se projevíly při analýze bazických látek. Na základě lin-log a log-log grafů byl hodnocen retenční mechanismus, nicméně výsledky neprokázaly příspěvek adsorpčního či rozdělovacího mechanismu, byl tedy potvrzen smíšený retenční mechanismus.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Nikola Klvanová

Supervisor: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Title of Diploma thesis: Comparison of selectivity and retention of the analytes on two HILIC stationary phases

This diploma thesis deals with an influence of ACN concentration, pH and buffer concentration in mobile phase on the retention of tested analytes and selectivity of two analytical columns Luna HILIC (diol) column (3 μm , 3 mm x 100 mm) and Ascentis ES Cyano column (3 μm , 2.1 mm x 100 mm). A set of 28 analytes including neutral, basic and acidic compounds was chosen for this study. Detection was performed by PDA detector at the wave-length of 245 nm. Measurement was performed isocratically at the mobile phase flow rate of 0.7 ml/min and 0.3 ml/min. Mobile phase was consisted of a mixture of acetonitrile and water component (buffer or acetic acid). The column temperature was set up to 30 °C, autosampler temperature to 4 °C. Injection volume was 5 μl or 3 μl .

For easier evaluation of results, measured data are presented in the charts and tables. The influence of the ACN content in mobile phase was evaluated based on the plots of the retention factor that showed increasing retention with increasing ACN content (typical HILIC behavior) in mobile phase (mainly > 85%) for all analytes on Luna HILIC (diol) column. The same behavior was observed for both basic and acidic compounds on Ascentis ES Cyano column. Neutral compounds observed decreasing retention in the range from 5 to 30% of ACN (typical RP behavior) and weak HILIC behavior in the range from 80 to 95% of ACN in mobile phase. The influence of buffer concentration on the retention of compounds was detected. The retention of shikimic acid was increased with the increasing buffer concentration on both columns. Other acidic compounds were influenced minimally. On the other hand, the retention of basic compounds, such as atenolol and propranolol, was decreased. The influence of buffer concentration on the retention of neutral compounds was minimal on both columns. The differences selectivity of tested columns at pH 3.8 and 6.8 were insignificant. The most significant

differences of selectivity were observed for the basic compounds. Retention mechanism was evaluated based on the lin-log and log-log plots. However, the results have not confirmed a contribution of adsorption or partitioning mechanism, therefore a complex retention mechanism was showed.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala při zpracování, 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 2015

.....
Nikola Klvanová

Poděkování

Děkuji své školitelce doktorce Haně Vlčkové za odborné vedení a rady při zpracování mé diplomové práce. Děkuji též všem pracovníkům KACH za vstřícný přístup a příjemné pracovní prostředí. Velké poděkování samozřejmě patří i rodičům, prarodičům a příteli za bezmeznou psychickou i finanční podporu a trpělivost, kterou mi poskytovali během studia.

Seznam použitých zkratek

AcAc	kyselina octová
AcAm	octan amonný
ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
BEH	hybridní stacionární fáze
CNS	centrální nervový systém
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	normální fáze
PVA	polyvinylacetát
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní fáze
SP	stacionární fáze
SPP	stacionární fáze s částicemi s pevným jádrem
S-DVB	sulfonovaná divinylbenzenová stacionární fáze
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ZIC-HILIC	zwitteriontová hydrofilní interakční chromatografie

Obsah

1. ÚVOD.....	- 9 -
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	- 10 -
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	- 11 -
3.1. HILIC stacionární fáze	- 11 -
3.2. Mobilní fáze pro HILIC.....	- 13 -
3.3. Rozpouštědlo vzorku a dávkovaný objem	- 14 -
3.4. Přehled jednotlivých typů HILIC stacionárních fází	- 14 -
3.5. Hodnocení výsledků a retenčního mechanismu.....	- 27 -
3.6. Vlastnosti použitých analytů.....	- 29 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 32 -
4.1. Použité chemikálie.....	- 32 -
4.2. Přístrojové vybavení	- 32 -
4.3. Příprava zásobních roztoků.....	- 33 -
4.4. Příprava pracovních roztoků.....	- 33 -
4.5. Příprava vodných složek mobilních fází.....	- 34 -
4.6. Vlastní měření	- 35 -
4.7. Použité kolony	- 35 -
4.8. Schéma experimentů.....	- 35 -
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	- 36 -
5.1. Vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci ACN v mobilní fázi.....	- 36 -
5.2. Vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci pufru v mobilní fázi	- 41 -
5.3. Vyhodnocení retenčního HILIC mechanismu	- 46 -
5.4. Vyhodnocení selektivity	- 53 -
6. ZÁVĚR	- 60 -
LITERATURA.....	- 61 -

1. Úvod

Chromatografické metody jsou nejrozšířenější a nejpoužívanější separační technikou. V posledních letech velmi rychle vzrostl zájem o hydrofilní interakční chromatografii (HILIC), což s největší pravděpodobností souvisí se vznikem široké škály nových HILIC stacionárních fází (SP). Hydrofilní interakční chromatografie je typ kapalinové chromatografie, vhodný pro analýzu polárních analytů. Kombinuje polární stacionární fáze typické pro chromatografii na normální fázi (NP LC) a méně polární, většinou organickou mobilní fázi, typickou pro chromatografii na reverzní fázi (RP LC). Tento mód kapalinové chromatografie významně usnadňuje analýzu polárních sloučenin, které je velmi obtížné stanovit pomocí NP LC a RP LC. Příčinou problematické analýzy je špatná rozpustnost polárních sloučenin v nepolárních rozpouštědlech při NP LC, nízká retence analytů a nevhodné tvary chromatografických piků při RP LC. V HILIC módu se analyty eluují v pořadí zvyšující se polarity (hydrofilicity). Jako mobilní fáze se používá směs vodné složky a organického rozpouštědla (většinou acetonitrilu >70%), kdy voda je silnější eluční rozpouštědlo. Na povrchu polární stacionární fáze je imobilizována vodná vrstva a předpokládá se, že primárním mechanismem je právě rozdělování mezi vodnou a organickou částí mobilní fáze. Nicméně ostatní interakce jako je adsorpce, iontová výměna, vodíkové vazby, dipól-dipól interakce a slabé hydrofobní interakce přispívají k HILIC separačnímu mechanismu. HILIC stacionární fáze jsou více polární a jsou tvořeny buď nemodifikovaným silikagelem, silikagelem modifikovaným různými funkčními skupinami (amin, amid, zwitterionty, polyoly, včetně sacharidů a jiných polárních skupin) nebo modifikovaným polymerním či hybridním materiálem. Vlivem dostupnosti široké škály typů HILIC stacionárních fází se HILIC mód začal aplikovat v širokém spektru vědních oborů. Využívá se pro separaci vysoce polárních látek, včetně biologicky aktivních látek, jako jsou například farmaceutické drogy, neurotransmitery, nukleosidy, nukleotidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny, sacharidy, oligosacharidy atd. [1][2][5][9][10][11][12].

2. Cíl a zadání práce

Cílem diplomové práce bylo studium vlivu složení mobilní fáze, zejména procentuálního obsahu acetonitrilu, pH a koncentrace pufru na retenci analytů a selektivitu analyzovaných kolon. Byla hodnocena selektivita při dvou různých hodnotách pH mobilní fáze pro dvě HILIC kolony.

Pro studii bylo vybráno celkem 28 analytů zahrnující kyselé, neutrální a bazické látky. Testovány byly dvě analytické kolony Luna HILIC (diol) (3 μ m, 100 x 3,0 mm) a Ascentis ES Cyano (3 μ m, 100 x 2,1 mm).

3. Teoretická část

Počátky HILIC chromatografie sahají do roku 1967, kdy byla prokázána tvorba vodou obohacené vrstvy na povrchu vysoce polárních stacionárních fází. Základním a přijatým mechanismem HILIC chromatografie je existence vodou obohacené vrstvy na polární stacionární fázi ve vodném prostředí a rozdělování analytů mezi mobilní fázi a "mokrou" stacionární fázi. Alpert a kol. navrhl tento mechanismus s odkazem na výzkum Ortha a Engelhardta. V poslední době je rozdělovací mechanismus postupně dokládán, i když stále ještě není zcela objasněn [1].

3.1. HILIC stacionární fáze

HILIC stacionární fáze jsou polární za HILIC podmínek, patří mezi ně nejen nemodifikovaný silikagel a silikagel modifikovaný polárními funkčními skupinami, ale také SP na bázi polymeru či hybridu. HILIC SP lze rozdělit do tří skupin: 1) *neutrální* stacionární fáze (amid, diol, cyklodextrin, cyanopropyl, PVA) nevykazují elektrostatické interakce, 2) *nabitě* SP poskytující silné elektrostatické interakce a 3) *zwitteriontové* SP poskytující slabé elektrostatické interakce. Nabitě SP mohou být kladné, nebo záporné. Mezi *kladně nabitě* SP patří silikagel modifikovaný amino skupinou či poměrně nové fáze obsahující imidazolovou nebo triazolovou skupinu. Mezi *záporně nabitě* navázané skupiny patří poly(aspartová kyselina), poly(2-sulfoethylaspartamid) nebo sulfatovaná S-DVB fáze. Za určitých okolností (nízké pH mobilní fáze) může být do této skupiny zahrnut i nemodifikovaný silikagel [1][2][3][5].

První generaci SP objevil v roce 1975 Linden a kol., když začal oddělovat sacharidy pomocí silikagelové kolony s navázanou amino skupinou a použil směs ACN a vody v poměru 75:25 jako mobilní fázi. Kromě amino SP patří do první generace i SP na bázi nemodifikovaného silikagelu. Druhá generace SP byla uvedena na trh roku 1980 a zahrnovala silikagelové SP s diolovou a amidovou funkční skupinou. Silikagelová SP s navázanou diol skupinou se používá hlavně pro separaci proteinů. Zwitteriontové SP (kap. 3.4.4.) byly objeveny na konci 80. let 20. století. K silikagelu nebo polymernímu nosiči jsou připojeny krátké uhlíkové řetězce s pozitivně a negativně nabitými skupinami, což umožňuje analýzu jak kyselých, tak bazických analytů. Tento typ SP se využívá v mnoha různých aplikačních oblastech [1].

Od 70. let, kdy se v náplňových kolonách používaly částice o průměru 10 μm , došlo k ohromnému pokroku. Vývoj nových technologií přípravy náplňových kolon umožnil přípravu částic s menším průměrem. V současné době jsou v oblasti HPLC analýz využívány zejména částice s průměrem 5 μm a 3 μm . V posledních letech se stalo trendem v oblasti LC analýz využití kolon s částicemi o průměru menším než 2 μm . To s sebou však přineslo i potřebu nové LC instrumentace a to zejména mechanicky odolné vyšším tlakům (až 100 MPa). Pro tento typ chromatografické separace byl zaveden název ultra účinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography - UHPLC), která byla uvedena na trh firmou Waters v roce 2004 spolu s prvními UHPLC kolonami obsahující částice menší než 2 μm založenými na BEH technologii (z angl. bridged ethylene hybrid – *kap. 3.4.5.*). UHPLC je jedním z přístupů tzv. rychlé chromatografie. Dalším typem SP jsou monolitické stacionární fáze (*kap. 3.4.7.*) a kolony s pevným jádrem (*kap. 3.4.6.*). Monolitické SP na bázi silikagelu připravil, popsal a aplikoval např. Tanaka a kol. v roce 1996. Tento typ SP tvoří jeden kus spojitého porézního materiálu, díky čemuž je možno dosáhnout rychlejší separace za použití mírného tlaku. Původně se využívaly v RP chromatografii. Řada těchto kolon je již komerčně dostupných, např. Chromolith nebo OnyxTM. Kolony s částicemi s pevným jádrem se skládají z pevného jádra o průměru asi 1,7 μm a porézní silikagelové slupky o hloubce asi 0,5 μm . Tento typ kolon je na pomezí částicových a monolitických SP [22].

3.2. Mobilní fáze pro HILIC

Složení mobilní fáze je jeden z dalších faktorů výrazně ovlivňující účinnost HILIC separace polárních látek. Mobilní fáze v HILIC módu je tvořena směsí vodné a organické složky s výraznou převahou organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilu. Retence je ovlivněna polaritou mobilní fáze a analytů. Retence se zvyšuje se zvyšující polaritou analytu a snižující polaritou mobilní fáze, tedy se snižujícím se podílem vodné složky. Výběr organického rozpouštědla má také vliv na retenci analytů. Eluční síla organického rozpouštědla se zvyšuje s rostoucí polaritou a schopností poskytovat proto-donor/ proton-akceptorové interakce, což vyjadřuje tzv. eluotropická řada [52]:

ACETONITRIL > ETHANOL > DIOXAN > METHANOL > VODA

Teoreticky je možné použít jako mobilní fázi všechny vodno-organické fáze, ale preferuje se především acetonitril, který má malou viskozitu a díky své chemické struktuře nevytváří vodíkové můstky, čímž nevzniká kompetice rozpouštědla a vody na úrovni SP. Acetonitril tedy poskytuje vysokou účinnost HILIC separace s relativně nízkým zpětným tlakem na chromatografické koloně. Koncentrace acetonitrilu v HILIC módu se pohybuje v rozmezí od 70% do 99% [53].

K ovlivnění retence analytů se často používá také přídavek pufru do mobilní fáze (jako náhrada vodné složky). Retence analytů obvykle klesá se zvyšující koncentrací pufru, nicméně může tomu být i naopak. Závisí to zejména na typu SP a vlastnostech analytu. Jako vhodné pufrы pro HILIC separaci se používají chloristany a fosforečnany triethylaminu a sodné soli kyseliny methylfosforečné. Při spojení HILIC s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí mohou být použity pouze těkavé pufrы, nejčastěji amonné soli kyseliny mravenčí nebo octové. Tyto těkavé pufrы jsou vhodné také při použití vysokých koncentrací ACN v mobilní fázi, kdy již dochází ke srážení konvenčních pufrů. Obvyklá koncentrace pufru je 5 – 50 mM, při vyšší koncentraci může docházet k jejich srážení v chromatografickém systému. Při spojení s MS detekcí jsou užívány podstatně nižší koncentrace pufru (0,5 – 5 mM). pH pufru je další z faktorů ovlivňující retenci a selektivitu, nicméně pouze u disociovatelných analytů. Výběr vhodného pH mobilní fáze tedy závisí zejména na vlastnostech analytu [3][7][12].

3.3. Rozpouštědlo vzorku a dávkovaný objem

Dávkovaný objem má významný vliv na tvar chromatografického píku. Pro HILIC separaci je zcela klíčové dávkovat do systému co nejmenší objem vzorku (jednotky μl) s ohledem na separační účinnost a tvar chromatografických píků, které jsou při vyšších dávkovaných objemech výrazně zhoršeny.

Rozpouštědlo vzorku také velmi výrazně ovlivňuje separační účinnost a selektivitu v HILIC módu. Vzorek by měl být rozpuštěn v rozpouštědle o stejném nebo podobném složení jako mobilní fáze. Vyšší podíl vody vede ke snížení separační účinnosti, snížení retence, štěpení a distorzi chromatografických píků [54].

3.4. Přehled jednotlivých typů HILIC stacionárních fází

Společně s rozvojem hydrofilní interakční chromatografie v posledních 10 letech, se stále více zvyšuje potřeba po nových stacionárních fázích. Stejně jako ve všech druzích chromatografie je i v HILIC výběr stacionární fáze jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňující separační účinnost. Protože se v posledních několika letech na vývoj nových typů SP zaměřilo mnoho výzkumných skupin a to zejména ve spolupráci s komerčními výrobci analytických kolon, je v současné době dostupných mnoho typů SP s širokou paletou funkčních skupin [2].

Tato kapitola zahrnuje tabulky obsahující přehled většiny komerčně dostupných HILIC kolon, rozdělených do třech základních skupin (neutrální, nabitě a zwitteriontové SP) a zároveň poskytují základní specifikace těchto kolon.

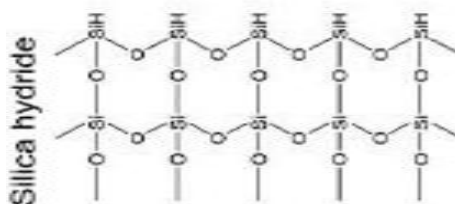
Nejčastějším „nosičem“ stacionárních fází je *silikagel* (*viz dále*). Silikagel může být v kolonách buď *nemodifikovaný*, nebo je na něm *navázána funkční skupina*, která ovlivní jeho elektrostatické interakce resp. výsledný náboj stacionární fáze. Většina stacionárních fází je vázána na silikagelovém základu a jsou připraveny jako monomerní, nebo polymerní, tedy s povlakem kovalentně vázaným na silikagel. Základní nemodifikované silikagelové fáze zůstávají populární zejména v bio-analytické oblasti. Dalším používaným „nosičem“ jsou *polymerní materiály*, které poskytují vyšší pH stabilitu jak v kyselém ($\text{pH} < 2,5$) tak i v zásaditém prostředí ($\text{pH} \geq 6,5$). Na druhou stranu polymerní nosiče oproti silikagelu poskytují nižší separační účinnost pro malé molekuly a zároveň nižší fyzikální stabilitu. Tento typ stacionární fáze je vhodný tedy zejména pro velké molekuly (proteiny

nebo syntetické polymery). Dalším „nosičem“ SP může být také *hybridní materiál*, o kterém se více pojednává v kapitole 3.4.5. [2][3][4][8].

3.4.1. Stacionární fáze s nemodifikovaným silikagelem

Výhodou silikagelu je především vysoká fyzikální stabilita a snadná modifikovatelnost jeho povrchu funkčními skupinami. Hlavní nevýhodou silikagelu je nerozpustnost ve vodě při $\text{pH} \geq 8$ a nestabilita kyseliny křemičité při $\text{pH} \leq 2,5$.

Existují tři typy nemodifikovaného silikagelu: typ A, typ B a typ C. *Typ A* je původní univerzální chromatografický materiál, vyráběný srážením z roztoků křemičitanů alkalických kovů. Bývá obvykle znečištěn kovy a není vhodný pro HILIC mód. *Typ B* je tvořen sférickými částicemi silikagelu a obsahuje jen velmi nízké množství kovových nečistot. Je relativně stabilní při středních a vyšších hodnotách pH (až 9). *Typ C* je "hydrid silikagelu". Velká část (až z 95%) Si-OH povrchových skupin je zde nahrazena Si-H skupinami. Vlivem této modifikace se zásadně mění vlastnosti silikagelu, povrch se stává méně polární, (obsahuje pouze zbytkové Si-OH skupiny), zvětšuje se rozsah pH stability (2 – 10 i více) a snižuje se vliv pH mobilní fáze na retenci a selektivitu. Takový materiál je ideálním „nosičem“ pro výrobu kolon speciálně pro HILIC mód. Díky existenci těchto tří typů silikagelu se mohou lišit vlastnosti kolon od různých výrobců (uchovávání, účinnost, retenční vlastnosti a tvar píků). Kolony s nemodifikovaným silikagelem se používají k separaci malých polárních částic hlavně ve farmaceutické analýze. Pro separaci sacharidů, peptidů a proteinů je jejich použití limitováno [1][2][5][24].



Obr. 1 - Struktura silikagelu typu C¹

¹ Převzato a upraveno ze zdroje [5]

NEMODIFIKOVANÝ SILIKAGEL			PÓRY	POVRCH	ČÁSTICE	PRŮMĚR	DÉLKA
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	[Å]	[m ² /g]	[µm]	[mm]	[mm]
Acclaim Mixed-Mode WAX-1	Thermo Scientific	2,5-7,5	120	300	3/5	2,1/3/4,6	50/100/150/250
Acclaim Mixed-Mode WCX-1							
Altima HP HILIC	Altech / Grace	1-10	120	230	1,5/3/5	2,1/4,6/7	10/20/33/50/53/150/250
Ascentis Express HILIC (Si)	Sigma-Aldrich	-	100	450	3/5/10	2,1/3/4,6	20/30/50/75/100/150/250
Atlantis Silica HILIC	Waters	1-5	100	330	3/5	1/2,1/3/4,6	30/50/100/150/250
BlueOrchid	Knauer	2-8	175	-	1,8	2	30/50/100/150
Epic Silica HILIC	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250
Hypersil GOLD Silica	Thermo Scientific	2-8	175	220	1,9/3/5/	1/2,1/3/4/4,6	20/30/50/100/150/250
Kitenex HILIC	Phenomenex	2-7,5	100	200	1,7/2,6	2,1/3/4,6	30/50/100/150/200/250
Pinnacle DB Silica	Restek	2,5-8	140	-	1,9/3/5	2,1/3/4,6	30/50/75/100/150
Poly GLYCOPEX	PolyLC	-	-	-	3/5/12	2,1/4,6/9,4/21	35/100/200/250
UHP HILIC	BonnaAgela Tech.	2-8	100	240	1,9	2,1/3/4,6	30/50/75/100/150
Ultra Silica	Restek	2,5-8	100	-	3/5	2,1/3/4,6	30/50/100/150/200/250
VisionHT HILIC	Altech / Grace	1-8	120	220	1,5/3/5	1/2/2,1/3/4,6/7	20/30/33/50/53/100/150/250
Viva Silica	Restek	2,5-8	300	-	5	1/2,1/3/4,6	30/50/100/150/200/250
Zorbax HILIC Plus	Agilent	0-8	95	160	1,8/3,5	2,1/3/4,6	50/100/150
Zorbax Rx-SIL			80	180	5	2,1/4,6	150/250

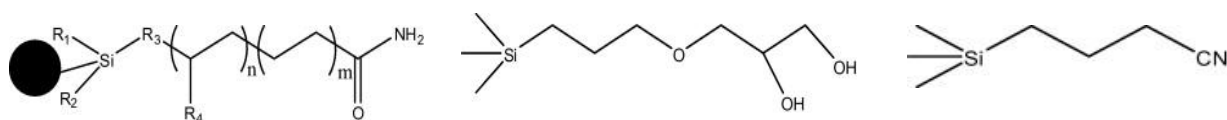
Tab. 1 - Vlastnosti HILIC kolon s nemodifikovaným silikagelem.²

² Data převzata ze zdrojů [24][25][27][29][30][31][36][41][42][43][46][47][49]

3.4.2. Stacionární fáze se silikagelem modifikovaným neutrálními funkčními skupinami

Neutrální funkční skupiny nevykazují kladný ani záporný náboj v rozmezí hodnot pH. Tato kategorie zahrnuje širokou škálu funkčně vázaných HILIC stacionárních fází (amid, kyano, diol= dihydroxypropyl, cyklodextrin aj.). I když jsou tyto skupiny neutrální, při pH 4 – 5, v důsledku deprotonace zbytkových silanolových skupin, mohou vykazovat slabý negativní náboj. Nejpoužívanější je SP s navázanou *amidovou skupinou*. Používá se k separaci monosacharidů, oligosacharidů, peptidů, amoniaku, aminokyselin aj. Obsahuje molekuly karbamoylu nebo amidu vázaných na svůj povrch prostřednictvím krátkých alkylů. Nejčastěji používanou kolonou této skupiny je například Acquity BEH Amide kolona, která má funkční skupinu navázanou přes ethylenový můstek na hybridním „nosiči“, nebo TSK-gel Amide 80 kolona obsahující karbamoylovou funkční skupinu navázanou na silikagelovém „nosiči“. SP s *kyano* a *diol* skupinami jsou velmi rozšířené v NP chromatografii, ale jejich použití v HILIC módu je stále ještě omezené. Obě skupiny jsou monomerní a jsou přímo připojeny k povrchu silikagelu přes alkylový řetězec (propyl), na jehož konci je buď hydrofilní 2,3-dihydroxypropylová skupina nebo kyano skupina. Diol SP našla vyšší využití v HILIC módu než SP s kyano skupinou, pravděpodobně z důvodu většího počtu hydrofilních dihydroxylových skupin a možnosti vzniku vodíkových můstků. I přes fakt, že vykazují smíšený RP/HILIC retenční mechanismus, diol SP našly uplatnění spíše v NP módu a jen několik málo diolových kolon je přímo k dispozici pro HILIC. Kyano SP je méně hydrofilní, postrádá schopnost tvořit vodíkové můstky, což má za následek nízkou retenci mnoha polárních látek a tedy i nižší využití v HILIC módu [2][5][7].

Polyhydroxylové a polyvinylalkoholové fáze se připraví potažením povrchu silikagelu vrstvou hydrofilního polymeru, který je chráněný výrobním tajemstvím výrobce. Výhodou polymeru je lepší stabilita při extrémním pH a nižší vliv sekundárních interakcí se zbytkovými silanolovými skupinami [2][5][7].



Obr. 2 - Struktura amid, diol, cyano³

³ Převzato a upraveno ze zdroje [2]

MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - AMID							
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	PÓRY [Å]	POVRCH [m²/g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DĚLKA [mm]
Inertsil Amide	GL Science	2-7,5	100	450	3/5	1/1,5/2,1/ 3/4/4,6	30/33/50/75/ 100/150/250
SunShell HILIC Amide	ChromaNik Tech.Inc.	2-9	90	150	2,6/5	2,1/3/4,6	30/50/75/100/150
TSKgel Amide-80	Tosoh Bioscience	2-7,5	100	450	3/5	2/4,6	50/100/150/250
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - KYANO							
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	PÓRY [Å]	POVRCH [m²/g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DĚLKA [mm]
Ascentis Express ES Cyano	Sigma-Aldrich	-	100	450	3/5	2,1/3/4,6	20/30/50/75/ 100/150/250
Epic Cyano	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250
Luna CN	Phenomenex	1,5-7	100	400	3/5/10	2/3/4,6	30/50/75/100/ 125/150/200/250
Pinnacle DB Cyano	Restek	2,5-8	140	-	1,9/5	2,1/3/4,6	30/50/100/150/200/250
Ultra Cyano			100		3/5		
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - DIOL							
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	PÓRY [Å]	POVRCH [m²/g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DĚLKA [mm]
Acclaim Mixed-Mode HILIC-1	Thermo Scientific	2,5-7,5	120	300	3/5	2,1/3/4,6	50/100/150/250
Epic Diol	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250
Fortis HILIC Diol	Fortis	2-8	100	380	1,7/3/5	2,1/3/4/4,6	20/30/50/75/ 100/125/150/250
Inertsil HILIC	GL Science	2-7,5	100	450	3/5	1/1,5/2,1/ 3/4/4,6	30/33/50/75/ 100/150/250
Kromasil HILIC-D	Akzo Nobel	-	60	540	5	2,1/3/4,6/ 10/21,2/30	50/100/150/250
Luna HILIC	Phenomenex	2-7,5	200	200	3/5	2/3/4,6	30/50/100/150/250
Sepax Polar-DIOL	Sepax	-	120	300	1,8/2,2/ 3/5/10	2/2,1/4,6	30/50/100/150/250
YMC-Triart Diol-HILIC	YMC	2-10	120	-	1,9/3/5	2/3/4,6	20/30/50/100/150/250

Tab. 2 - Vlastnosti HILIC kolon se silikagelem modifikovaným neutrálními funkčními skupinami⁴

⁴ Data převzata ze zdrojů [24][25][28][31-33][35][41][43-44][46-48][51]

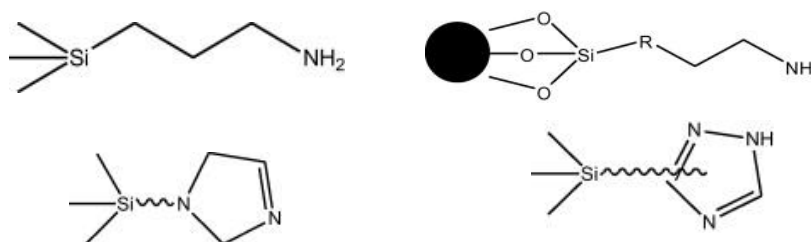
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - OSTATNÍ								
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	PÓRY [Å]	POVRCH [m ² /g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DÉLKA [mm]	
Acclaim HILIC-10 /polární sk./	Thermo Scientific	2-8	120	300	3	2,1/3/4,6	50/100/150/250	
Ascentis Express OH5 /pentahydroxyl/	Sigma-Aldrich	-	90	-	2,7	2,1/3/4,6	20/30/50/75/ 100/150/250	
Epic HILIC-HC /polyhydroxyl/	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250	
Epic HILIC-RP /polyhydroxyl C18/								
Fortis HILIC /hydroxyl/	Fortis	2-8	100	380	1,7/3/5	2,1/3/4/4,6	20/30/50/75/ 100/125/150/250	
Pinnacle DB IBD /patentalkyl/	Restek	2,5-8	140	-	1,9	2,1	30/50/100	
Sepax Polar-100 /PEG/	Sepax	-	120	300	1,8/2,2/ 3/5/10	2/2,1/4,6	30/50/100/150/250	
Sepax Polar-SILICA /hydroxyl/			60- 2000					
Ultra IBD /patentalkyl/	Restek	2,5-8	100	-	3/5	2,1/3/4,6	30/50/100/150/200/250	

Tab. 3 - Vlastnosti HILIC kolon se silikagelem modifikovaným neutrálními funkčními skupinami
(pokračování)⁵

⁵ Data převzata ze zdrojů [24][25][31][32][43][44][46][47]

3.4.3. Stacionární fáze se silikagelem modifikovaným funkčními skupinami s nábojem

Silikagel takto modifikovaný vykazuje silné elektrostatické interakce a dle druhu funkční skupiny je náboj buď *kladný* (modifikace silikagelu amino, imidazolovou popř. triazolovou skupinou), nebo *záporný* (modifikace poly(aspartovou kyselinou), poly(2-sulfoethylaspartamidem) nebo sulfatovanou S-DVB fází. Mezi negativně nabitě SP může být zahrnut i nemodifikovaný silikagel. Typickým příkladem kladně nabitých SP je *amino* SP (3-aminopropyl), která se široce používá pro HILIC separace sacharidů, aminokyselin, peptidů, karboxylových kyselin, nukleotidů, tetracyklinových antibiotik aj. Novější fáze mají navázanou *imidazolovou* či *triazolovou* skupinu a jsou monomerní. Imidazol je připevněn k povrchu silikagelu přes sekundární amin. Triazol fáze používají 1,2,4-triazol jako funkční skupinu, ale není zveřejněno, přes kterou část aromatického kruhu je spojen se silikagelem. Tyto fáze jsou relativně nové, a proto je jejich použití v literatuře velmi omezeno. Dalšími typy nabitých funkčních skupin používaných v HILIC je například poly(2-sulfoethylaspartamid), *poly(aspartová kyselina)* a *sulfonované S-DVB fáze*. Tyto fáze se obvykle používají jako katexy v iontově-výměnné chromatografii. Separace je založena na kombinaci hydrofilní interakce a iontové výměny. Ve srovnání s pozitivně nabitými fázemi (amino a polyamin) jsou negativně nabitě v HILIC módu mnohem méně používány [1][2][5][7].



Obr. 3 - Struktura amino,amino, imidazol, triazol⁶

⁶ Převzato a upraveno ze zdroje [2]

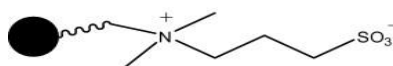
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - AMIN			PÓRY [Å]	POVRCH [m ² /g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DĚLKA [mm]
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH					
Epic Amine HD							
Epic DEAP	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250
Epic HILIC-PI							
Hypersil GOLD Amino	Thermo Scientific	2-8	175	220	1,9/3/5	1/2,1/3/4/4,6	20/30/50/100/ 150/200/250
Inertsil NH ₂	GL Science	2-7,5	100	450	3/5	1/1,5/2,1/ 3/4/4,6	30/33/50/75/100/150/250
InertSustain NH ₂				350			20/30/50/75/100/150/250
Luna NH ₂	Phenomenex	1,5-11	100	400	3/5/10	1/2/3/4/4,6	30/50/75/100/125/150/250
Synchronis Amino	Thermo Scientific	2-8	100	320	1,7/3/5	2,1/3/4/4,6	30/50/100/150/250
TSKgel NH ₂ -100	Tosoh Bioscience	2-7,5	100	450	3	2/4,6	50/100/150/250
Ultra Amino	Restek	2,5-8	100	-	3/5	3/4,6	30/50/100/150/200/250
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL -OSTATNÍ			PÓRY [Å]	POVRCH [m ² /g]	ČÁSTICE [µm]	PRŮMĚR [mm]	DĚLKA [mm]
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH					
BioBasic AX /polyethylenimin/	Thermo Scientific	-	300	100	5	1/2,1/3/4/4,6	50/100/150/250
Cosmosil HILIC /triazol/	Nacalai Tesque	-	130	330	2,5	1/2/3/4,6	30/50/100/150/250
			120	300	5		
Epic HILIC-FL /fluor/	ES Industries	1-10	120	350	3/5	2,1/3,2/4/4,6	50/100/150/250
Hypersil GOLD HILIC /polyethylenimin/	Thermo Scientific	2-8	175	220	1,9/3/5	1/2,1/3/4/4,6	20/30/50/100/ 150/200/250
PolyHydroxyEthyl A /hydroxyethylaspartát/	PolyLC	-	60- 1500	-	5/12	2,1/4,6/9,4/21	35/100/200/250
Sepax Polar-IMIDAZOL /imidazol/	Sepax	-	120	300	1,8/2,2/3 /5/10	2/2,1/4,6/ 10/21,2/30	30/50/100/150/250

Tab. 4 - Vlastnosti HILIC kolon se silikagelem modifikovaným funkčními skupinami s nábojem⁷

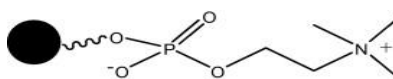
⁷ Data převzata ze zdrojů [24][25][31][33][35][39][41-44][47][48]

3.4.4. HILIC stacionární fáze se silikagelem modifikovaným zwitteriontovými skupinami

Zwitteriontové (ZIC) SP vykazují slabé elektrostatické interakce, jelikož obsahují na svém povrchu aktivní vrstvu s navázanou silně kyselou sulfonovou kyselinou a silně bazickou kvartérní amoniovou solí (1:1). Díky této stacionární fázi je možno analyzovat kyselé i bazické látky. Typickým příkladem je *sulfobetainová* skupina, která byla původně vyvinuta pro separaci anorganických solí a malých iontových sloučenin, díky čemuž bylo zjištěno, že sulfobetain na povrchu polymeru silně váže vodu. Jedná se o polymer s 3-sulfopropyl-dimethylalkylammoniovou skupinou na porézním či polymerním silikagelu. Vyváženost kyselých a zásaditých skupin způsobuje, že povrchový náboj je zdánlivě nulový. Vlivem záporného náboje sulfonové kyseliny na spodním konci řetězce, může vznikat interakce s kladně nabitými látkami a vlivem kladně nabité kvartérní amoniové skupiny na horním konci řetězce interakce se záporně nabitými látkami. Druhým typem zwitteriontové funkční skupiny je skupina *fosforylcholinová*. Opět je tento typ stacionární fáze založen na polymeru s obojetnou skupinou fosforylcholinu na jeho povrchu. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami je v poloze náboje. U sulfobetainu se negativně nabitá sulfonátová skupina nachází na spodním konci řetězce a u fosfocholinu je na spodním konci řetězce kladně nabitá kvartérní amoniová skupina. Někteří výrobci vyrábí i kolony s vlastní zwitteriontovou modifikací a to pomocí směsi polárních skupin [1][2][5][7][24].



Obr. 4 - Struktura sulfobetain⁸



Obr. 5 - Struktura fosfocholin⁸



Obr. 6 - Struktura Obelisc N⁸

⁸ Převzato a upraveno ze zdroje [2]

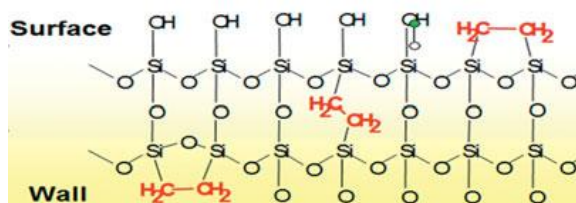
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL - Sulfoalkylbetain			PÓRY	POVRCH	ČÁSTICE	PRŮMĚR	DÉLKA
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	[Å]	[m ² /g]	[µm]	[mm]	[mm]
BlueSphere II	Knauer	2-8,5	100	320	2	2	30/50/60/100/
EuroSphere II					3/5	2/3/4/4,6/8	120/125/150/250/300
Nucleodur HILIC	Macherry-Nagel	2-8,5	110	340	1,8/3/5	2/3/4/4,6	30/50/75/100/ 125/150/250
MODIFIKOVANÝ SILIKAGEL -OSTATNÍ			PÓRY	POVRCH	ČÁSTICE	PRŮMĚR	DÉLKA
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	[Å]	[m ² /g]	[µm]	[mm]	[mm]
Obelisc N /patent/	SIELC	3-5	100	-	2/5/10	0,25/0,5/1/2,1/ 3,2/4,6/10/22	10/25/50/100/150/250
Reprospher HILIC A /ZIC/	Watrex	-	100	350	5/10	2/3/4/4,6	75/100/125/150/ 200/250/300
SeQuant ZIC-HILIC /směs polar.látek/	Merc	3-8	100/200	180	3,5/5	2,1/4,6	20/50/100/150/250
SeQuant ZIC-cHILIC /fosforylcholin/		-	100	-	3	2/4,6	
Synchronis HILIC /ZIC/	Thermo Scientific	2-8	100	320	1,7/3/5	2,1/3/4/4,6	30/50/100/150/250
POLYMERNÍ FÁZE			PÓRY	POVRCH	ČÁSTICE	PRŮMĚR	DÉLKA
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	[Å]	[m ² /g]	[µm]	[mm]	[mm]
Reprospher HILIC P /ZIC/	Watrex	-	100	350	5/10	2/3/4/4,6	75/100/125/150/ 200/250/300
SeQuant ZIC-pHILIC /sulfoalkylbetain/	Merc	2-10	-	-	5	2/4,6	20/50/100/150/250

Tab. 5 - Vlastnosti HILIC kolon se silikagelem modifikovaným zwitteriontovými funkčními skupinami⁹

⁹ Data převzata ze zdrojů [24][25][36-38][45][47][50]

3.4.5. Hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky (BEH – Ethylen Bridged Hybrid)

BEH stacionární fáze byly první komerčně dostupné SP pro UHPLC. Mezi silanolové skupiny jsou vloženy hybridní ethylenové můstky (viz Obr. 7), které zvyšují mechanickou (max. zpětný tlak 15000 PSI) a chemickou odolnost (široký rozsah pH). pH stabilita těchto SP v alkalické oblasti je cca do pH 12, v kyselé oblasti mají tyto kolony stabilitu závislou na použitém ligandu (nejčastěji v oblasti pH 1-2). Další nespornou výhodou je jejich odolnost vůči jevu zvanému „krvácení kolony“ (angl. bleeding), neboli vymývání ligandu z nosné fáze. V současné době je již na trhu celá škála HILIC UHPLC kolon se všemi obvyklými ligandy [4].



Obr. 7 - Struktura BEH¹⁰

BEH			PÓRY	POVRCH	ČÁSTICE	PRŮMĚR	DÉLKA
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	[Å]	[m ² /g]	[µm]	[mm]	[mm]
Aquity BEH Amide	Waters	2-11	130	185	1,7	1/2,1/3/4,6	30/50/100/150/250
Aquity BEH HILIC		1-9			3,5		
Xbridge Amide		2-11			2,5/3,5/5		
Xbridge HILIC		1-9					

Tab. 6 - Vlastnosti kolon s BEH¹¹

¹⁰ Převzato ze zdroje [22]

¹¹ Data převzata ze zdroje [49]

3.4.6. HILIC stacionární fáze s částicemi s pevným jádrem

Povrchově porézní částice (syn. Core shell, Fused-Core, SPP, Core Enhanced Technology) se skládají z pevného jádra o průměru asi 1,7 μm a porézní silikagelové slupky o hloubce asi 0,5 μm (tyto rozměry se liší podle výrobce). Obvykle mají kolony průměr 2,7 μm a pracují při běžných tlacích (max. asi 6000 PSI), jsou tedy kompatibilní s většinou HPLC systémů. V jejich pórech dochází k difuzi analytů a přenosu hmoty. Jelikož celkový průměr částic je 2,6 μm , negenerují tyto částice v koloně tak veliký odpor jako „sub-2 částice“. Přitom je hloubka porézní slupky srovnatelná s průměrem „sub-2 částic“. To se projeví ve srovnatelných separačních vlastnostech nebo-li ve srovnatelné účinnosti a rozlišení v porovnání s UHPLC. To, že analyzovaná látka nedifunduje díky rigidnímu jádru skrz celou částici, způsobí rychlejší analýzu při zachování parametrů separace. Proto je tento druh SP oblíbenou alternativou UHPLC. Od roku 2010 bylo vydáno mnoho prací, které potvrzují, že kolony s povrchově porézními částicemi našly v praxi vysoké uplatnění, a že jsou jejich separační účinnost téměř srovnatelné se „sub-2 částicemi“ [22][23].

CORE SHELL							
NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	pH	PÓRY [Å]	POVRCH [m ² /g]	ČÁSTICE [μm]	PRŮMĚR [mm]	DÉLKA [mm]
Accucore 150-Amide HILIC	Thermo Scientific	2-8	80	130	2,6	2,1/3/4,6	30/50/100/150/250
Accucore HILIC				150			
Accucore Urea HILIC	Knauer	2-8	80	130	2,6	2	30/50/100/150
Brownlee SPP HILIC	Perkin Elmer	2-9	90	-	2,7	2,1/4,6	50/100/150
HALO HILIC	Advanced Materials Technology	2-9	90	150	2,7/5	1/2,1/3/4,6	20/30/50/75/ 100/150/250
HALO Penta-HILIC							
HALO-5 HILIC							
HALO-5 Penta HILIC							
NucleoShell HILIC /sulfoalkylbetain/	Macherry- Nagel	2-8,5	90	-	2,7	2/3/4/4,6	50/100/150
SpeedCore	Fortis	-	80	140	2,6	2,1/3/4,6	30/50/100/150

Tab. 7 - Vlastnosti kolon s povrchově porézními částicemi¹²

3.4.7. Kolony s monolitickou stacionární fází

¹² Data převzata ze zdrojů [24][25][32][34][36][37][40][47]

Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které jsou tvořeny jednotlivými částicemi sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu (silikagelu nebo polymeru), který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Monolity tedy neobsahují prostory mezi částicemi, kterými by protékala mobilní fáze, ale mobilní fáze protéká póry monolitu, které jsou mnohem větší než běžné prostory mezi naplněnými částicemi. Generovaný zpětný tlak těchto kolon je tedy podstatně nižší [22].

Existují dva typy monolitických SP. Prvním typem jsou kolony s obsahem materiálu odvozeného od silikagelu. Tyto SP mají dva typy pórů: a) *velké póry* (makropory) mající velikost 2 μm zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze monolitem a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází; b) *středně velké póry* (mezopory) o velikosti 2 - 50 nm poskytují monolitu dostatečně velký povrch a tím vysokou separační kapacitu. V HILIC se používají k separaci malých organických iontů a léčiv. Modifikací silikagelu polyakrylamidem získávají kolony vyšší stabilitu a vyšší retenční schopnosti. Jsou používány pro separaci nukleových bazí [5][22].

Druhý typ SP monolitických kolon je založen na organických polymerních strukturách, které obsahují *makropóry* a velmi malé množství *mezopórů*. Z toho důvodu se hmota přesouvá hlavně prouděním a méně difuzí. Tato struktura umožňuje provozování monolitů při značně vysokých průtokových rychlostech mobilních fází bez značného zvýšení zpětného tlaku a bez ztráty separační účinnosti. Tento typ SP se spíše užívá pro separaci makromolekul (bílkovin, syntetických polymerů) než pro separaci malých molekul [23][27].

3.5. Hodnocení výsledků a retenčního mechanismu

Retenční faktor k'

Je jednou ze základních chromatografických veličin. 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, tj. časový interval od začátku nástřiku vzorku, do okamžiku detekce

Vyhodnocení retence v závislosti na různém složení mobilní fáze

K vyhodnocení retence se vychází z experimentálně naměřených hodnot retenčního času resp. retenčního faktoru a používá se závislost

$$k' = f(\%W) \text{ nebo } k' = f(c)$$

$\%W$ = objemový podíl ACN v mobilní fázi

c = koncentrace pufru

Vyhodnocení selektivity

Rozdíl v selektivitě se vyjadřuje jako závislost retenčního faktoru dané látky, při dvou různých podmínkách (různé analytické kolony a různé pH). S použitím lineární regrese se získává korelační koeficient r^2 . Rozdíl se pak počítá pomocí vzorce:

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

Pokud se hodnoty s^2 blíží nule, pak je při obou testovaných podmínkách shodná selektivita. Pokud se naopak hodnoty blíží jedné, pak je selektivita odlišná. Selektivita byla porovnávána buď pro jednu kolonu s použitím dvou různých typů mobilní fáze, nebo pro dvě různé stacionární fáze.

Vyhodnocení retenčního mechanismu

K hodnocení HILIC retenčního mechanismu se používají dvě rovnice, které popisují čistě absorpční nebo rozdělovací proces. Lin-log grafy se používají při hodnocení procesu dělení a log-log grafy při hodnocení adsorpčního procesu.

Retence v RP módu je založena na rozdělovacím procesu a je popisována rovnicí:

$$\log k' = f(\% W)$$

%W = objemový podíl vodné složky v mobilní fázi

Adsorpční mechanismus je vztah mezi retenčním faktorem a objemovou frakcí silnějšího rozpouštědla v mobilní fázi. Tento mechanismus je typický pro NP chromatografii a je popsána následovně:

$$\log k' = f \log(\% W)$$

%W = objemový podíl vodné složky v mobilní fázi

Na základě těchto dvou rovnic, jsou sestrojeny grafy závislosti, které pomáhají popisovat HILIC retenční mechanismy. Oba mechanismy jsou hodnoceny pomocí křivek lineární regrese [6][7].

3.6. Vlastnosti použitých analytů

Atenolol - kardioselektivní β -blokátor používaný jako antihypertenzivum, také se uplatňuje v léčbě ischemické choroby srdeční (angina pectoris, prevence infarktu myokardu) a poruch srdečního rytmu [15][16].

Metoprolol - kardioselektivní β -blokátor používaný jako antihypertenzivum, také se uplatňuje v léčbě ischemické choroby srdeční (angina pectoris, prevence infarktu myokardu) a poruch srdečního rytmu [15][16].

Propranolol - neselektivní β -blokátor používaný jako antihypertenzivum. Má také mírné anxiolytické účinky [15][20].

Adenin – heterocyklická sloučenina purinového skeletu. Dusíkatá nukleová báze. Je základem pro syntézu ATP. Při syntéze DNA je komplementární s thyminem a při syntéze RNA s uracilem [15][16].

Cytosin – 2-hydroxy-4-aminopyridin. Je to druh pyrimidinové nukleové báze obsažené v nukleotidech a nukleových kyselinách [15].

Guanin – 2-amino-6-hydroxypurin. Druh purinové báze obsažené v nukleotidech a nukleových kyselinách [15].

Uracil – 2,4-dihydroxypyrimidin. Pyrimidinová báze v nukleotidech a RNA [15].

Farnesol - seskviterpenický alkohol přítomný v silicích květů lípy, jasmínu nebo pomeranče [15].

Kofein - methylxantin obsažený v kávě a čaji. Má stimulační účinky na CNS. Ve farmacii je používán jako adjuvantní složka ve vícesložkových léčivých přípravcích k léčbě bolestí a migrén [15].

Kreatinin - látka vznikající ve svalech z kreatinu. Vyšetřením clearance kreatininu stanovíme glomerulární filtraci. Tímto testem se zjišťuje míra funkčnosti ledvin, jelikož koncentrace kreatininu se odráží v krvi [15].

Nikotinamid - amid kyseliny nikotinové, který se též nazývá vitamín B₃ (nebo niacin, popř. vitamin PP). Je součástí řady enzymů. Ve vyšších dávkách jako lék rozšiřuje cévy a snižuje hladinu cholesterolu v krvi [15][16].

Paracetamol - je derivát fenacetinu. Chemický název je acetaminofen. Běžně se používá jako mírné analgetikum a antipyretikum [15].

Pyridoxin - synonymum vitamin B₆. Účinná forma je pyridoxalfosfát. Důležitý pro řadu enzymů a krvetvorbu- koenzym klíčového enzymu pro syntézu hemu. Podílí se na metabolismu homocysteinu. Dalšími deriváty jsou pyridoxal a pyridoxamin [15].

Theophyllin – 1,3-dimethylxanthin. Alkaloid obsažený v listech čaje. Má podobné účinky jako kofein. Stimulant CNS. Léčebně se využívá jeho účinek na uvolnění bronchů v terapii astma bronchiale [15].

Tyrosol - fenolická sloučenina přirozeně se vyskytující ve víně a panenském olivovém oleji. Při studiích in vitro vykazuje výrazný antioxidační účinek [14][18].

Askorbová kyselina - synonymum vitamin C. Důležitý pro správnou funkci a stavbu pojivových tkání (vaziva), činnost řady enzymů a metabolismus látek. Je silným antioxidantem, jehož zdrojem je ovoce a zelenina. Je esenciální pro primáty a morčata [15].

p-Anisová kyselina – 4-metoxybenzoová kyselina přirozeně se vyskytující v anýzu s antiseptickým účinkem. Při syntéze složitějších organických molekul se často objevuje jako meziproduct [15].

2,3-dihydroxybenzoová kyselina - látka chemicky blízká kyselině salicylové [15].

p-hydroxybenzoová kyselina - izomer kyseliny salicylové. Její estery jsou označovány jako parabeny (methyl-, ethyl-) a používají se jako protiplísňové konzervanty ve farmacii a potravinářství [15].

Ferulová kyselina - tzv. hydroxyskořicová kyselina. Pomocí esterové vazby je vázána k hemicelulóze jako součást potravinové vlákniny [15][19].

Gallová kyselina- s glukózou tvoří tanin (ester), který má adstringentní účinek a je využíván v terapii nespecifických průjmů či na lokální poranění [15].

Gentisová kyselina - látka chemicky blízká kyselině salicylové. Její sodná sůl se používá v terapii bolesti jako analgetikum, antipyretikum a antirevmatikum [15].

Kávová kyselina – tzv. hydroxyskořicová kyselina s fenolickou a akrylovou skupinou. Přítomna ve všech rostlinách. Důležitá složka biosyntézy ligninu, jakožto nejdůležitějšího zdroje biomasy [17].

Salicylová kyselina – prekurzor syntézy kyseliny acetylsalicylové. V kožním lékařství se využívá jejích keratolytických a keratoplastických vlastností [20].

Sinapová kyselina - tzv. hydroxyskořicová kyselina. Alkaloid sinapin obsažený v semenech hořčice je ester cholinu a kyseliny sinapové [19].

Syringová kyselina - jednoduchá fenolická kyselina obsažena např. v hroznech a v oleji palmy Acai [19].

Šikimová kyselina - je charakteristický meziprodukt biosyntézy mnoha aromatických látek, zejména aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu [15].

Vanilová kyselina - fenolická kyselina, která je meziproduktem v procesu syntézy vanilinu z kyseliny ferulové. Obsažena v hroznech a ve víně [19].

triviální název	log P	pKa (kys)	pKa (baz)	M _r [g.mol ⁻¹]	triviální název	log P	pKa (kys)	pKa (baz)	M _r [g.mol ⁻¹]
Atenolol	0,34	13,88	9,43	266,34	Tyrosol	0,85	10,17	-	138,16
Metoprolol	1,63	13,89	9,43	267,36	Askorbová k.	-2,78	4,09	-	176,12
Propranolol	2,90	13,84	9,50	259,34	p-Anisová k.	1,78	4,47	-	152,15
Adenin	-2,13	9,42	-	135,13	2,3-Dihydroxy benzoová k.	1,62	2,96	-	154,12
Cytosin	-1,96	9,00	4,18	111,10	p-Hydroxy benzoová k.	1,40	4,57	-	138,12
Guanin	-0,96	9,63	3,40	151,13	Ferulová k.	0,96	4,58	-	194,18
Uracil	-1,04	8,95	-4,19	112,09	Gallová k.	0,53	4,33	-	170,12
Farnesol	4,83	14,69	-	222,37	Gentisová k.	1,39	3,01	-	154,12
Kofein	-0,63	0,52	-	194,19	Kávoová k.	0,66	4,58	-	180,16
Kreatinin	-0,80	6,89	-	113,12	Salicylová k.	2,01	3,01	-	138,12
Nikotinamid	-0,37	14,83	3,54	122,12	Sinapová k.	1,00	4,53	-	224,21
Paracetamol	0,48	9,86	1,72	151,16	Syringová k.	1,28	4,33	-	198,17
Pyridoxin	-0,83	9,63	5,01	169,18	Šikimová k.	-2,22	4,48	-	174,15
Theophylin	-0,28	8,60	1,64	180,16	Vanilová k.	1,30	4,45	-	168,15

Tab. 8 - Vlastnosti testovaných analytů¹³

¹³ Data převzata ze zdroje [21]

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

atenolol (99%), metoprolol ($\geq 98\%$), propranolol ($\geq 99\%$), adenosin ($>99\%$), cytosin ($>99\%$), guanin ($>99\%$), uracil ($>99\%$), farnesol (směs izomerů- 95%), kofein ($>98\%$), kreatinin ($>98\%$), nikotinamid ($>98\%$), paracetamol ($>97\%$), pyridoxin ($>98\%$), theophylin ($>97\%$), tyrosol ($>98\%$), askorbová kyselina ($>99\%$), p-anisová kyselina ($>99\%$), 2,3-dihydroxybenzoová kyselina ($>99\%$), p-hydroxybenzoová kyselina ($\geq 99\%$), ferulová kyselina ($>99\%$), gallová kyselina ($>98\%$), gentisová kyselina ($>98\%$), kávová kyselina ($>98\%$), salicylová kyselina ($>99\%$), sinapová kyselina ($>98\%$), syringová kyselina ($>95\%$), šikimová kyselina ($>99\%$), vanilová kyselina ($>97\%$).

Všechny standardy byly zakoupeny u společnosti Sigma- Aldrich, ČR

Chemikálie:

- Acetonitril Chromasolv for HPLC – Sigma- Aldrich, ČR
- Hydroxid amonný ($>25\%$) – Sigma- Aldrich, ČR
- Kyselina octová ($>99\%$) – Sigma- Aldrich, ČR
- Methanol Chromasolv for HPLC – Sigma- Aldrich, ČR
- Octan amonný ($>98\%$) – Sigma- Aldrich, ČR
- Ultračistá voda z Millipore MilliOrg – Millipore Corp., USA

4.2. Přístrojové vybavení

- UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) složený z:
 - o UltiMate 3000 RS Pump
 - o UltiMate 3000 RS Autosampler
 - o UltiMate 3000 RS Diode Array Detektor
 - o UltiMate 3000 RS Column Compartment
- Analytické váhy Santorius 2004 MP, Santorius, Německo
- Vakuová pumpa a filtrační zařízení Millipore, MilliporeCorp., USA
- Automatické pipety se špičkami Biohit, Fischer Scientific, ČR
- Laboratorní pH metr Hanna, Fischer Scientific, ČR

4.3. Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky byly připravovány rozpuštěním 5 mg standardu v 5 ml rozpouštědla (ACN, voda, nebo jejich směs 1:1- viz Tab. 9) s výjimkou standardu guaninu, jehož zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,5 mg v 5 ml vody s přidavkem 100 μ l NH_4OH .

analyt	rozpuštědlo	analyt	rozpuštědlo
Atenolol	ACN	Tyrosol	ACN
Metoprolol	ACN	Askorbová k.	ACN : VODA
Propranolol	ACN	p-Anisová k.	ACN
Adenosin	ACN : VODA	2,3-Dihydroxy benzoová k.	ACN
Cytosin	ACN	p-Hydroxy benzoová k.	ACN
Guanin	5 ml VODA + 100 μ l NH_4OH	Ferulová k.	ACN
Uracil	ACN : VODA	Gallová k.	ACN
Farnesol	ACN	Gentisová k.	ACN
Kofein	ACN	Kávová k.	ACN
Kreatinin	ACN : VODA	Salicylová k.	ACN
Nikotinamid	ACN	Sinapová k.	ACN
Paracetamol	ACN	Syringová k.	ACN
Pyridoxin	VODA	Šikimová k.	ACN : VODA
Theophylin	ACN	Vanilová k.	ACN

Tab. 9 – Rozpouštědla použitá pro přípravu zásobních roztoků jednotlivých analytů

4.4. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky byly připravovány v čas potřeby postupným ředěním zásobních roztoků na koncentraci 10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l nebo 10^{-6} mol/l.

Koncentrace 10^{-4} mol/l byla použita pro měření u analytů: atenolol, askorbová kyselina, farnesol, kreatinin, metoprolol, propranolol a pyridoxin.

Koncentrace 10^{-5} mol/l byla použita pro měření u analytů: adenosin, cytosin, dihydroxybenzoová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, ferulová kyselina, gallová kyselina, gentisová kyselina, guanin, kávová kyselina, kofein, nikotinamid, paracetamol, salicylová kyselina, sinapová kyselina, syringová kyselina, šikimová kyselina, theophylin, tyrosol, uracil, vanilová kyselina.

Koncentrace 10^{-6} mol/l byla použita pro měření u kyseliny p-anisové.

4.5. Příprava vodných složek mobilních fází

0,5 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován desetinasobným zředěním připraveného 5 mM roztoku octanu amonného o pH = 4,8. Do 250 ml odměrné baňky bylo napipetováno 25 ml 5 mM roztoku octanu amonného a doplněno 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 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH 4,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

50 mM roztok octanu amonného o pH = 3,8 byl připravován napipetováním 713 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH 3,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

50 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 713 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH 4,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

50 mM roztok octanu amonného o pH = 6,8 byl připravován napipetováním 713 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH 6,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

200 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 2,852 ml koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH 4,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

4.6. Vlastní měření

Měření bylo provedeno za izokratické eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,7 ml/min pro kolonu Luna HILIC (diol) a 0,3 ml/min pro kolonu Ascentis ES Cyano. Teplota na koloně byla nastavena 30°C a v autosampleru na 4 °C. Nástřik na kolonu Luna HILIC (diol) byl 5 µl a na kolonu Ascentis ES Cyano 3 µl. Detekce byla prováděna pomocí PDA detektoru při vlnové délce 245 nm.

4.7. Použité kolony

- Luna HILIC (diol) (3 µm, 100 x 3,0 mm)
- Ascentis ES Cyano (3µm, 100 x 2,1 mm)

4.8. Schéma experimentů

UHPLC SYSTÉM UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Kolona Luna HILIC (diol) / Kolona Ascentis ES Cyano

Testované analyty:

atenolol, metoprolol, propranolol, adenosin, cytosin, guanin, uracil, farnesol, kofein, kreatinin, nikotinamid, paracetamol, pyridoxin, theophylin, tyrosol, askorbová kyselina, p-anisová kyselina, dihydroxybenzoová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, ferulová kyselina, gallová kyselina, gentisová kyselina, kávová kyselina, salicylová kyselina, sinapová kyselina, syringová kyselina, šikimová kyselina, vanilová kyselina

Použité mobilní fáze:

0,5 mM AcAm pH = 4,8

5 mM AcAm pH = 4,8

50 mM AcAm pH = 3,8

50 mM AcAm pH = 4,8

50 mM AcAm pH = 6,8

200 mM AcAm pH= 4,8

Koncentrace acetonitrilu 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95%

Ultračistá voda

5. Výsledky a diskuze

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

Retence byla hodnocena u deseti vybraných analytů (viz Tab. 10). Mobilní fáze obsahovala různé množství acetonitrilu v rozsahu 5 – 95% a konstantní koncentraci pufru. Jako pufr byl použit 50 mM octan amonný o pH 4,8. K vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci byla použita *lin-lin* závislost - $k' = f(\%W)$ (kapitola 3.5.). Grafy byly sestrojeny pro skupiny analytů rozdělených dle jejich acidobazických vlastností. Retenční faktor k' je uveden v tabulkách.

látko / % ACN	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
atenolol	0,164	0,141	0,133	0,124	0,124	0,146	0,178	0,244	0,383	0,777	1,277	2,619	9,756
propranolol	1,900	1,105	0,711	0,476	0,265	0,182	0,142	0,133	0,177	0,343	0,549	1,079	3,440
adenin	0,350	0,285	0,236	0,197	0,157	0,153	0,168	0,211	0,308	0,518	0,727	1,195	2,661
cytosin	0,115	0,106	0,107	0,099	0,099	0,111	0,139	0,195	0,309	0,559	0,801	1,339	3,149
nikotinamid	0,246	0,193	0,160	0,133	0,106	0,096	0,098	0,108	0,145	0,207	0,253	0,325	0,474
pyridoxin	0,351	0,358	0,355	0,355	0,342	0,335	0,339	0,332	0,360	0,456	0,551	0,760	1,347
theophyllin	0,134	0,112	0,098	0,077	0,061	0,054	0,052	0,058	0,084	0,130	0,166	0,223	0,360
gentisová k.	0,196	0,138	0,096	0,056	0,013	-0,005	-0,012	-0,002	0,031	0,091	0,160	0,276	0,575
šikimová k.	-0,006	-0,008	-0,009	-0,014	-0,010	0,004	0,034	0,119	0,351	1,113	2,294	5,739	-
vanilová k.	0,286	0,224	0,177	0,134	0,085	0,057	0,044	0,052	0,102	0,259	0,437	0,881	1,840

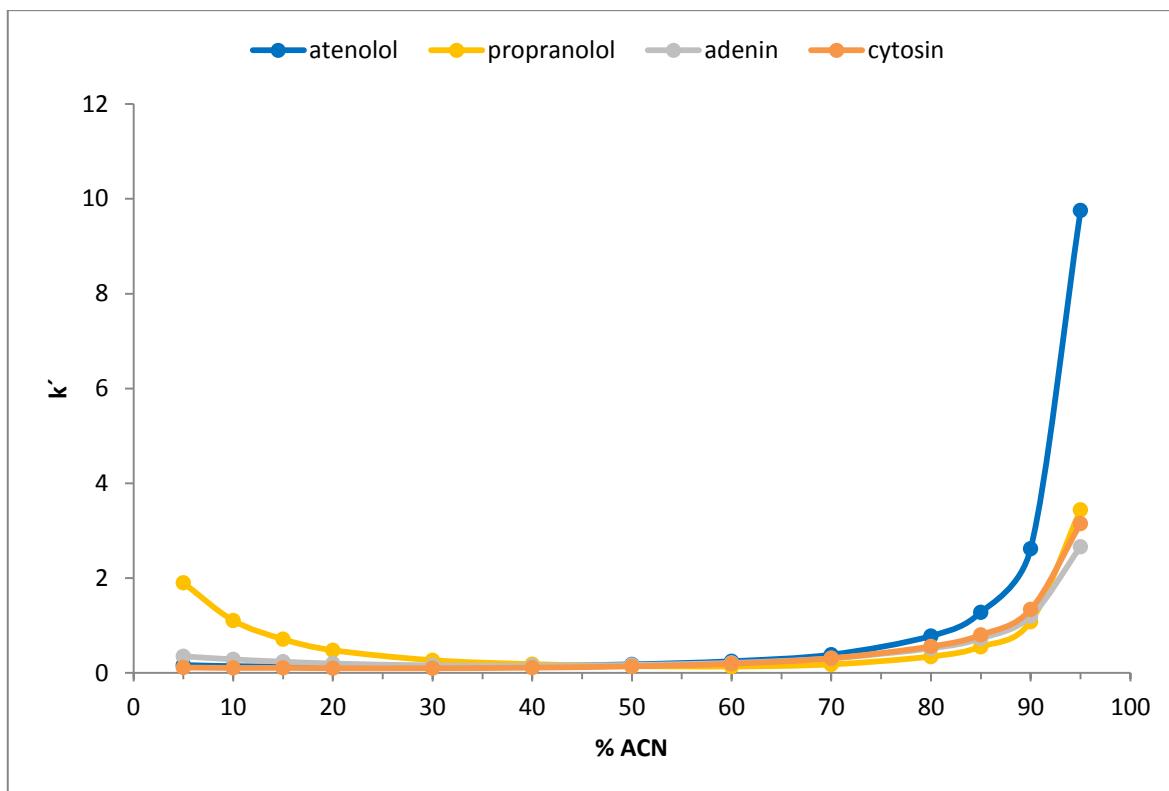
Tab. 10 – Hodnoty retenčních faktorů (k') v závislosti na koncentraci acetonitrilu

kolona Luna HILIC (diol)

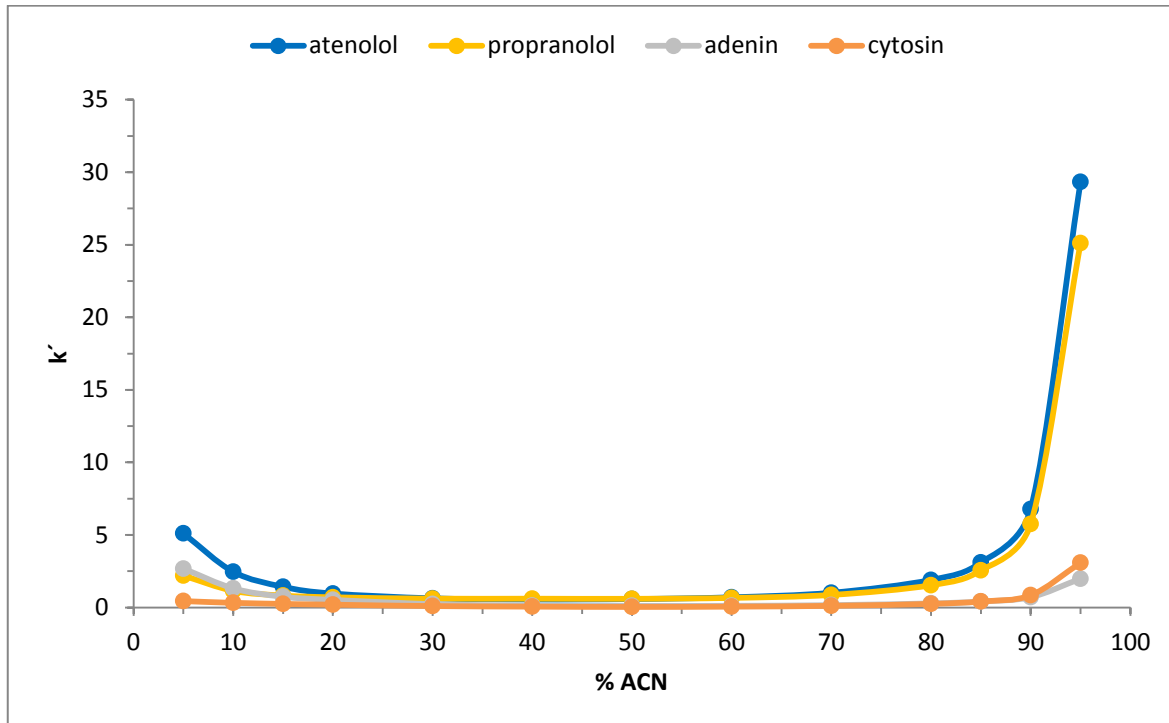
látko / % ACN	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
atenolol	5,114	2,470	1,431	0,964	0,634	0,556	0,584	0,705	1,017	1,901	3,109	6,783	29,333
propranolol	2,202	1,150	0,825	0,707	0,613	0,610	0,601	0,664	0,869	1,537	2,564	5,760	25,112
adenin	2,678	1,322	0,747	0,532	0,243	0,134	0,123	0,126	0,172	0,291	0,420	0,717	1,984
cytosin	0,451	0,332	0,258	0,204	0,109	0,069	0,048	0,068	0,123	0,259	0,424	0,854	3,094
nikotinamid	1,817	1,079	0,721	0,491	0,267	0,202	0,142	0,155	0,169	0,217	0,259	0,326	0,501
pyridoxin	1,035	0,718	0,520	0,349	0,253	0,188	0,158	0,154	0,180	0,239	0,332	0,436	0,903
theophyllin	4,382	2,075	1,113	0,696	0,348	0,226	0,156	0,142	0,160	0,177	0,204	0,247	0,342
gentisová k.	1,465	0,782	0,454	0,291	0,169	-0,042	-0,109	-0,145	-0,157	-0,163	-0,162	-0,154	0,006
šikimová k.	0,131	0,073	0,029	-0,006	-0,067	-0,122	-0,158	-0,168	-0,153	-0,083	0,102	1,076	11,102
vanilová k.	3,965	2,182	1,349	0,911	0,518	0,266	0,167	0,109	0,088	0,125	0,217	0,478	1,291

Tab. 11 – Hodnoty retenčních faktorů (k') v závislosti na koncentraci acetonitrilu

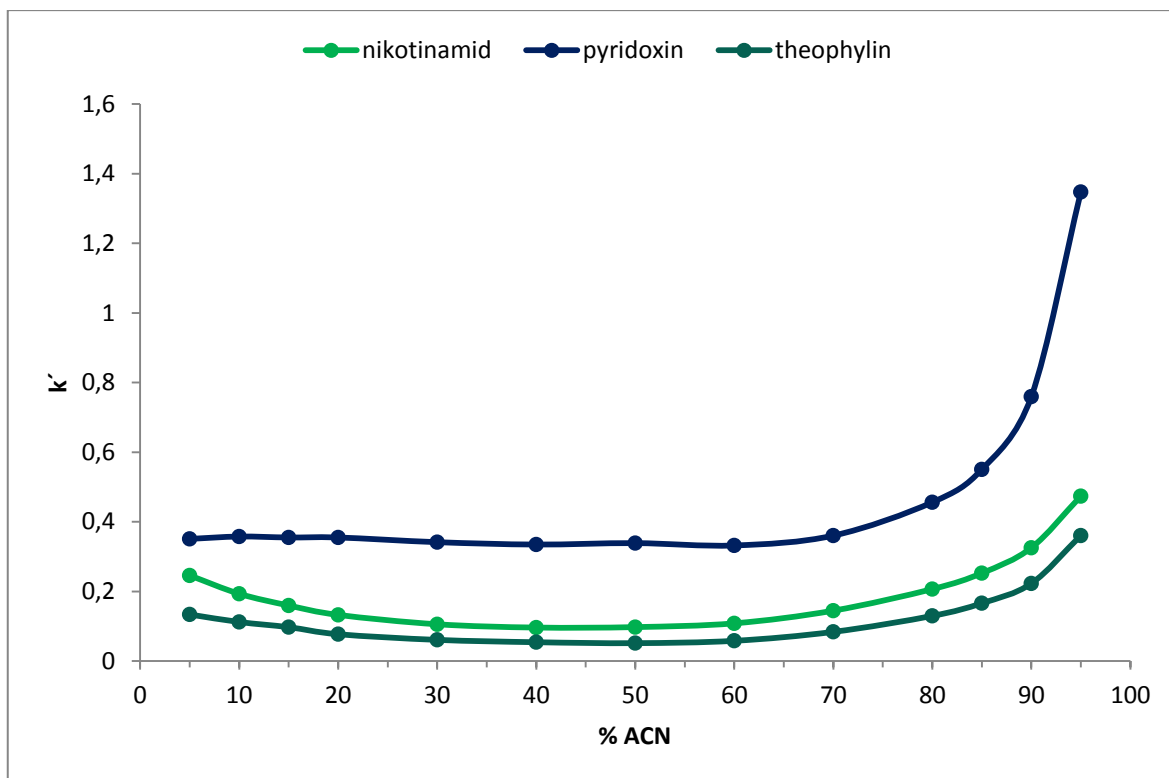
kolona Ascentis ES Cyano



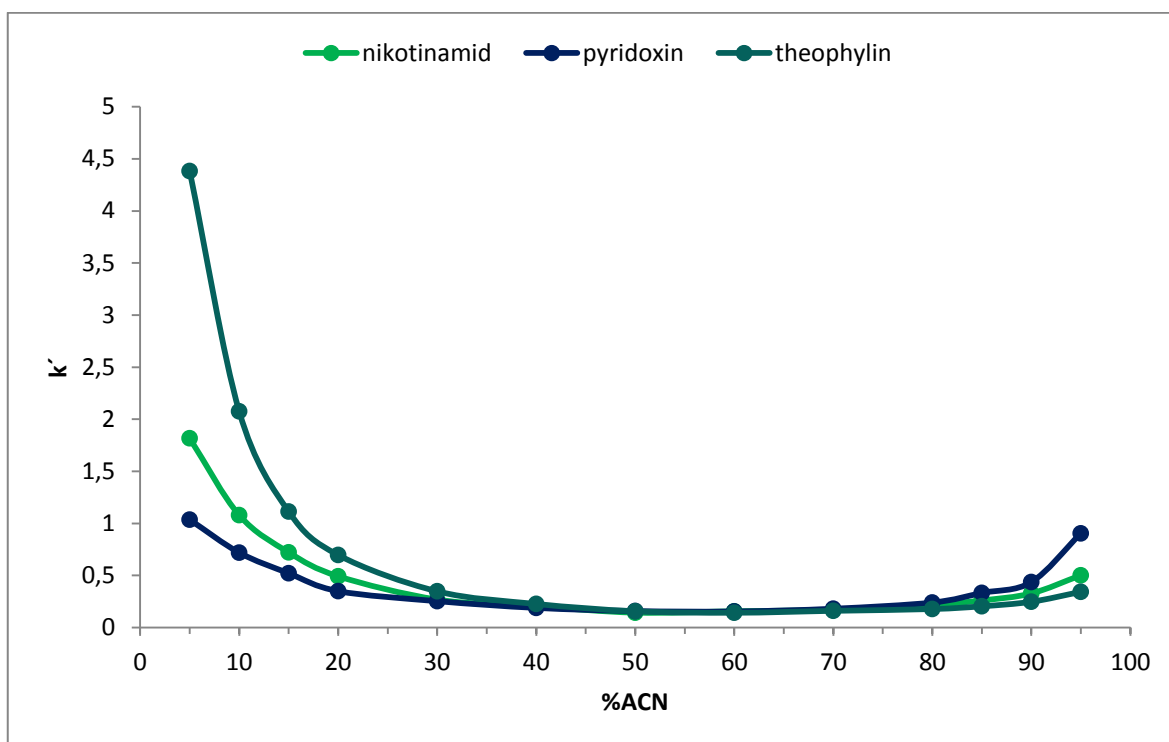
Graf 1 - Závislost retenčního faktoru (k') *bazických látek* na koncentraci acetonitrilu
kolona Luna HILIC (diol)



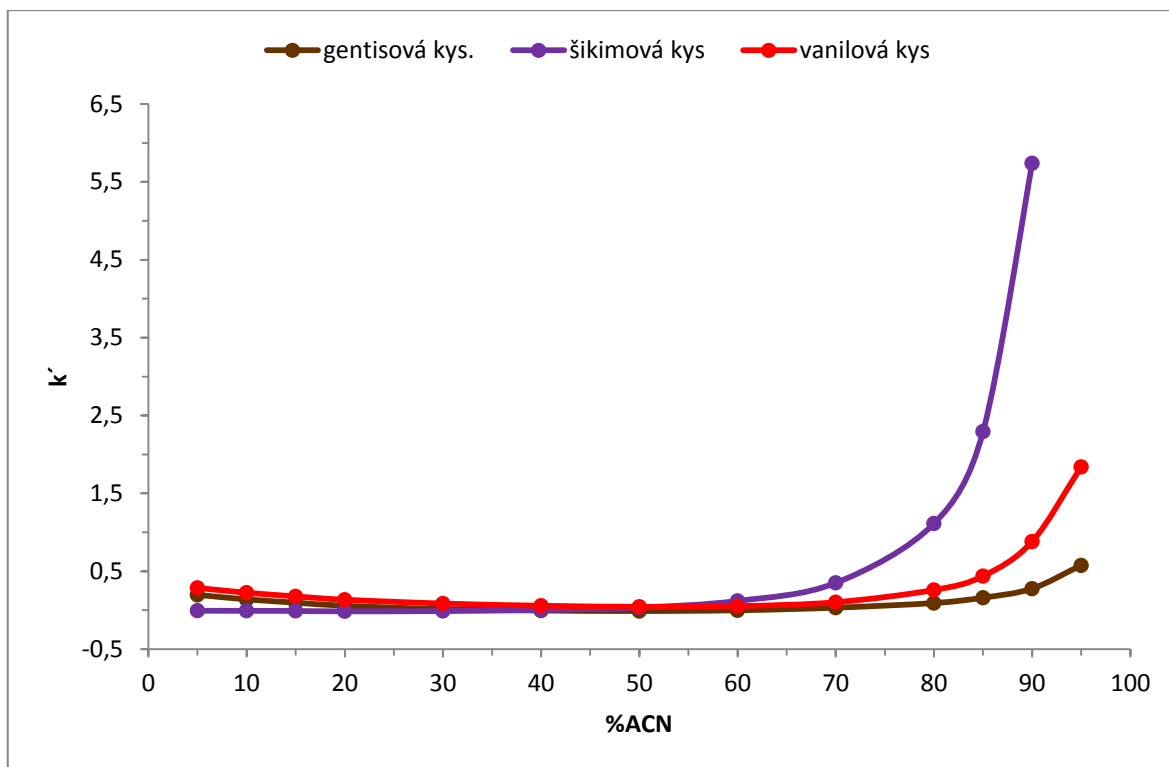
Graf 2 - Závislost retenčního faktoru (k') *bazických látek* na koncentraci acetonitrilu
kolona Ascentis ES Cyano



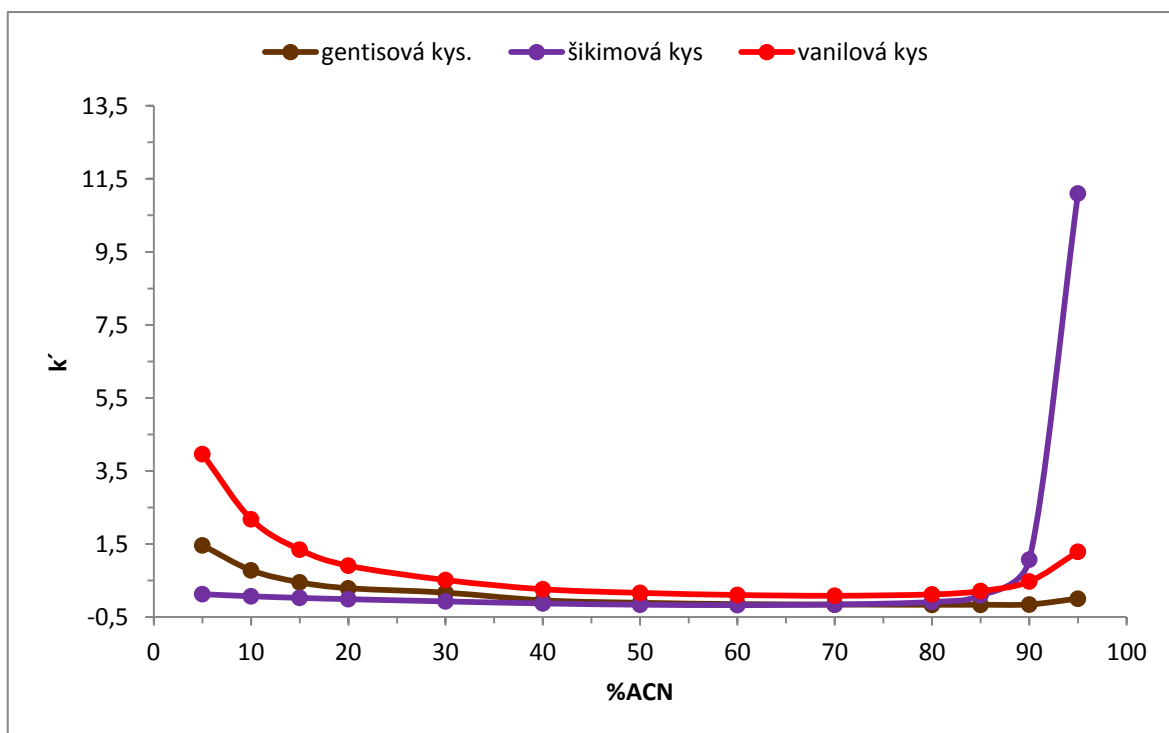
Graf 3- Závislost retenčního faktoru (k') **neutrálních látek** na koncentraci acetonitrilu
kolona Luna HILIC (diol)



Graf 4- Závislost retenčního faktoru (k') **neutrálních látek** na koncentraci acetonitrilu
kolona Ascentis ES Cyano



Graf 5 - Závislost retenčního faktoru (k') kyselých látek na koncentraci acetonitrilu
kolona Luna HILIC (diol)



Graf 6 - Závislost retenčního faktoru (k') kyselých látek na koncentraci acetonitrilu
kolona Ascentis ES Cyano

Z výše uvedených grafů je patrné, že bazické analyty na obou kolonách vykazovaly typické HILIC chování, retence rostla se zvyšujícím se procentuálním obsahem ACN v mobilní fázi. Výrazný vzestup retence byl patrný od 85% ACN. U kolony Luna HILIC (diol) bylo u propranololu ($\log P = 2,90$) pozorováno též typické RP chování, zvýšení retence se snižujícím se obsahem ACN v rozsahu 5 - 30%. U kolony Ascentis ES Cyano se RP chování prokázalo v nižší intenzitě u všech analytů s výjimkou cytosinu a bylo patrné v rozmezí 5 - 15% ACN.

U neutrálních analytů bylo na koloně Luna HILIC (diol) opět pozorováno typické HILIC chování s výraznějším zvýšením retence od koncentrace 80% ACN, nejvýraznější vliv byl pozorován pro pyridoxin ($\log P = -0,83$). RP chování na koloně Luna HILIC (diol) nebylo patrné. U kolony Ascentis ES Cyano bylo pozorováno pouze u neutrálních analytů, kdy se retence snižovala se zvyšujícím se obsahem koncentrace ACN (5 - 25%). Naopak HILIC chování pro tyto analyty nebylo pozorováno.

U zástupců kyselých analytů vykazovala na obou kolonách nejvýrazněji HILIC chování kyselina šikimová ($\log P = -2,2$) a to na koloně Luna HILIC (diol) od 70 do 95% ACN a na koloně Ascentis ES Cyano až při 90 - 95% ACN. Pro kolonu Ascentis ES Cyano bylo pozorováno i RP chování a to u kyseliny gentisové ($\log P = 1,39$) a vanilové ($\log P = 1,30$) v rozmezí 5 - 20% ACN.

5.2. Vyhodnocení retence analytů v závislosti na koncentraci pufru v mobilní fázi

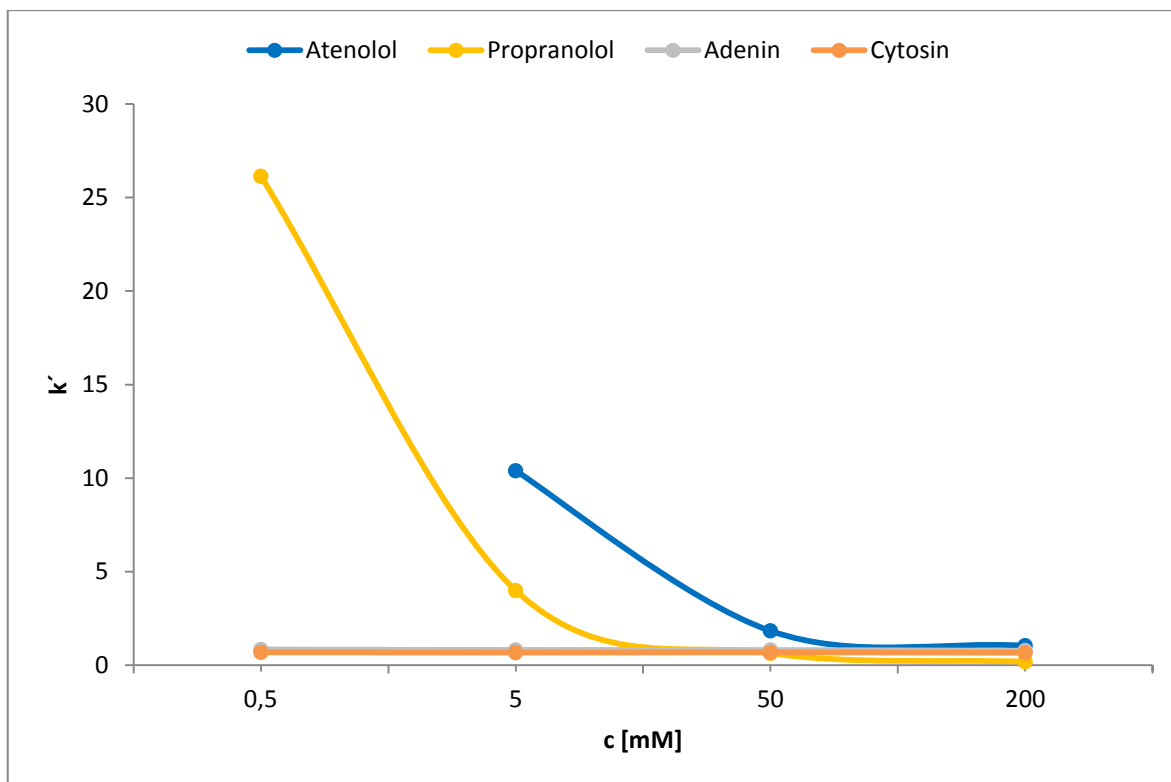
Retence byla opět hodnocena u deseti vybraných analytů. Mobilní fáze obsahovala směs acetonitrilu a pufru v poměru 90:10. Jako pufr byl použit roztok octanu amonného o pH 4,8 a koncentracích 0,5; 5; 50 a 200 mM. Grafy byly sestrojeny pro skupiny analytů rozdělených dle jejich acidobazických vlastností.

(A)	c pufru [mM]			
	0,5	5	50	200
atenolol	-	10,392	1,833	1,040
propranolol	26,135	3,988	0,629	0,177
adenin	0,836	0,813	0,810	0,776
cytosin	0,679	0,667	0,677	0,659
nikotinamid	0,100	0,093	0,083	0,027
pyridoxin	0,472	0,312	0,291	0,373
theophylin	0,003	0,006	0,004	-0,041
gentisová k.	0,090	0,080	0,088	0,422
šikimová k.	0,430	1,012	4,269	-
vanilová k.	0,140	0,580	0,513	1,099

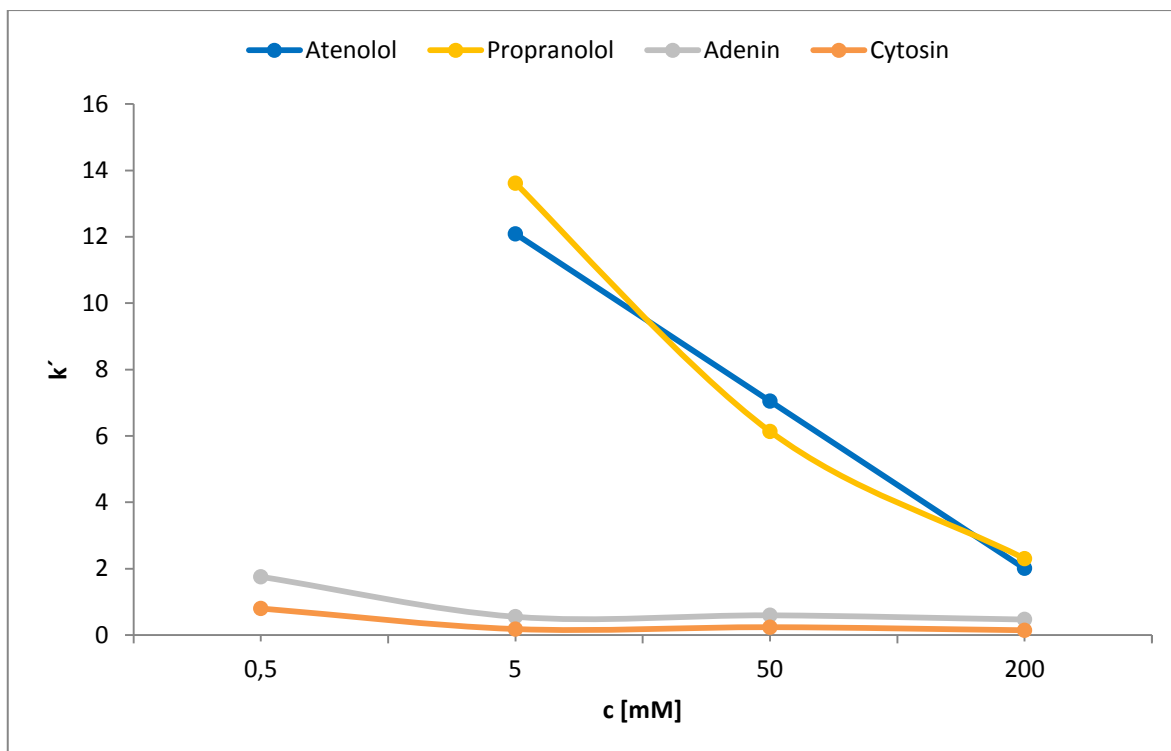
(B)	c pufru [mM]			
	0,5	5	50	200
atenolol	-	12,086	7,048	2,009
propranolol	-	13,613	6,133	2,300
adenin	1,753	0,553	0,596	0,470
cytosin	0,799	0,176	0,233	0,140
nikotinamid	0,507	0,256	0,198	0,180
pyridoxin	1,051	0,386	0,284	0,235
theophylin	0,357	0,124	0,113	0,102
gentisová k.	0,150	0,120	0,190	0,150
šikimová k.	0,373	0,197	1,013	-
vanilová k.	0,016	0,122	0,324	0,401

Tab. 12, 13 – Hodnoty retenčních faktorů (k') v závislosti na koncentraci pufru

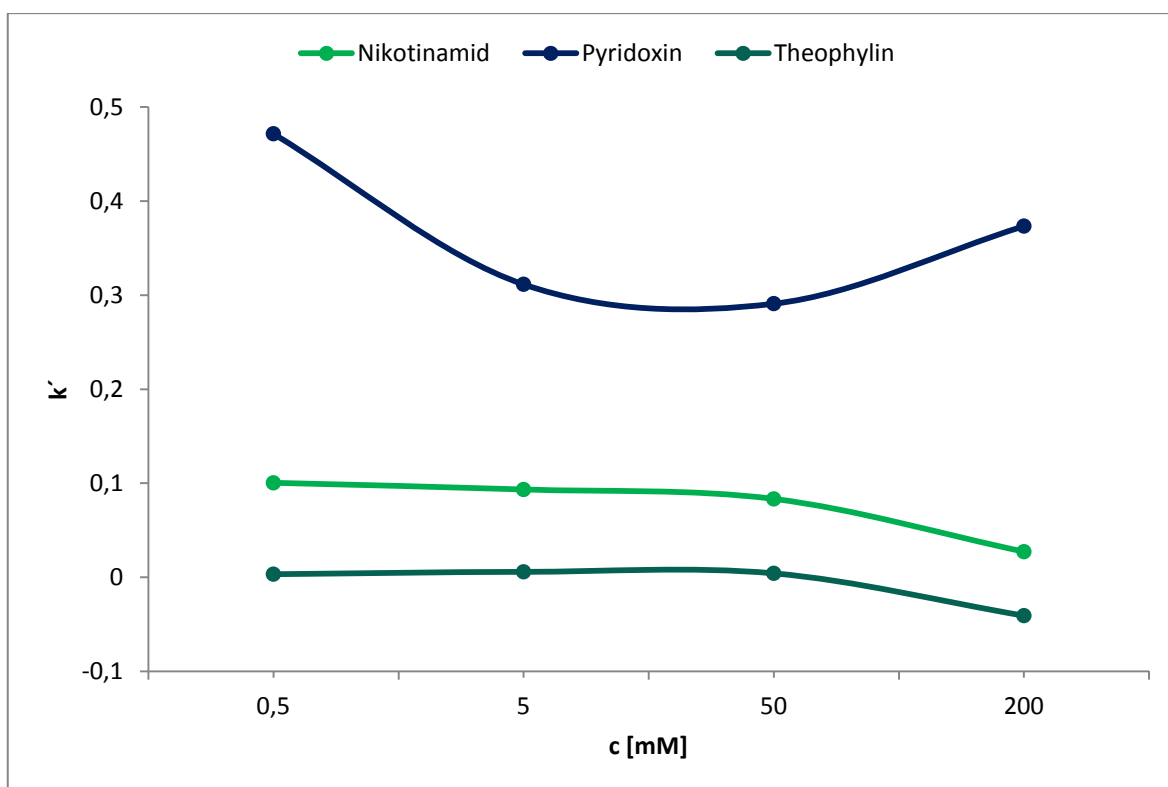
A) Kolony Luna HILIC (diol), B) Ascentis ES Cyano



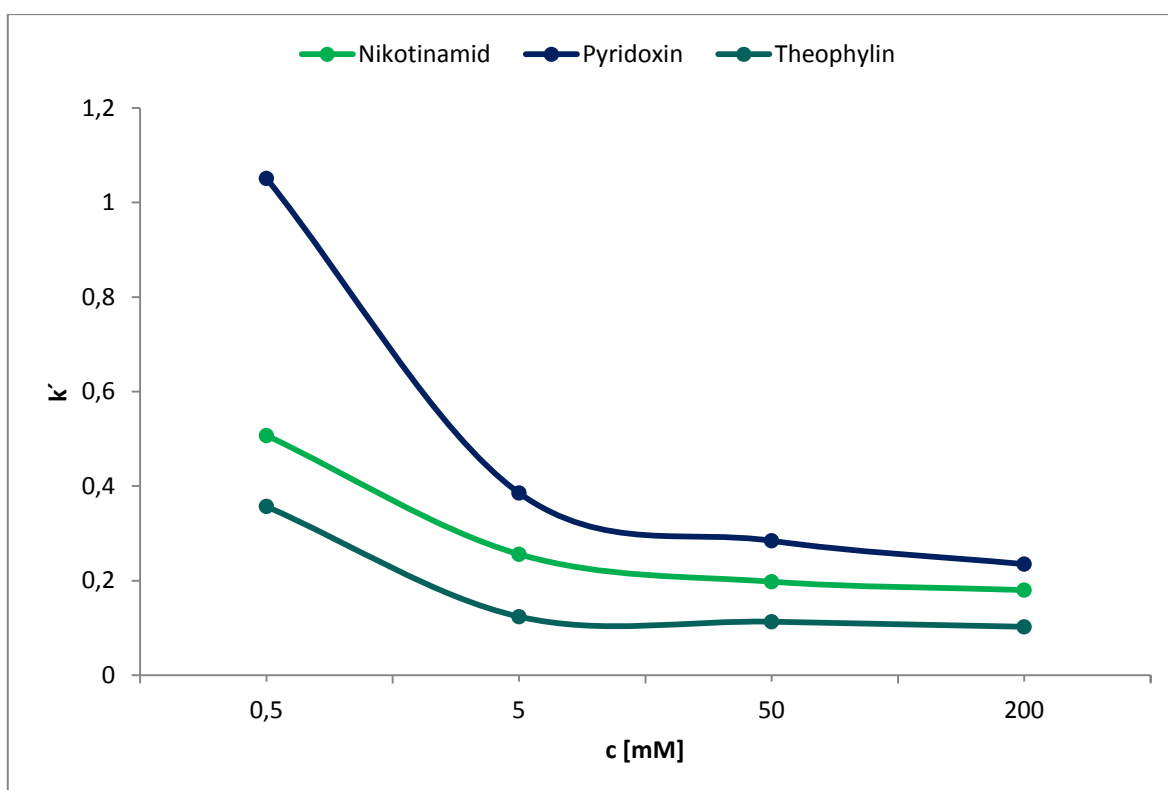
Graf 7 - Závislost k' na c pufru pro *bazické látky*
kolona Luna HILIC (diol)



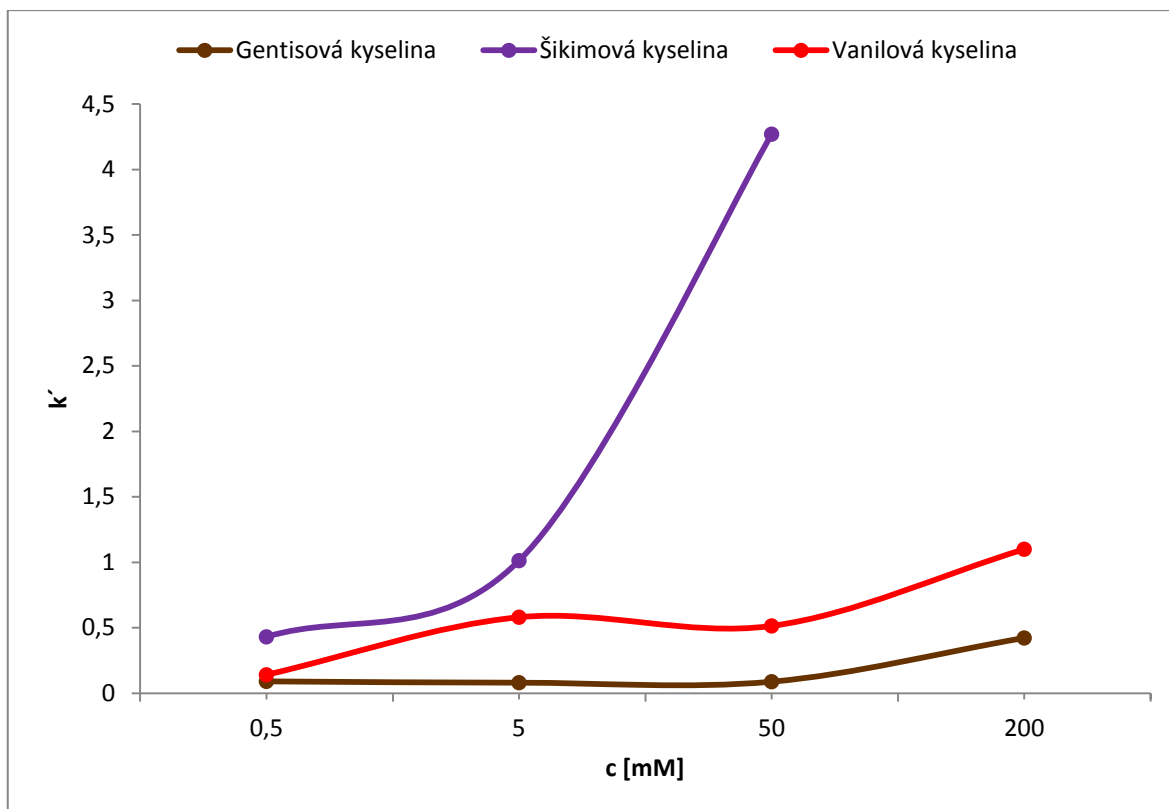
Graf 8- Závislost k' na c pufru pro *bazické látky*
kolona Ascentis ES Cyano



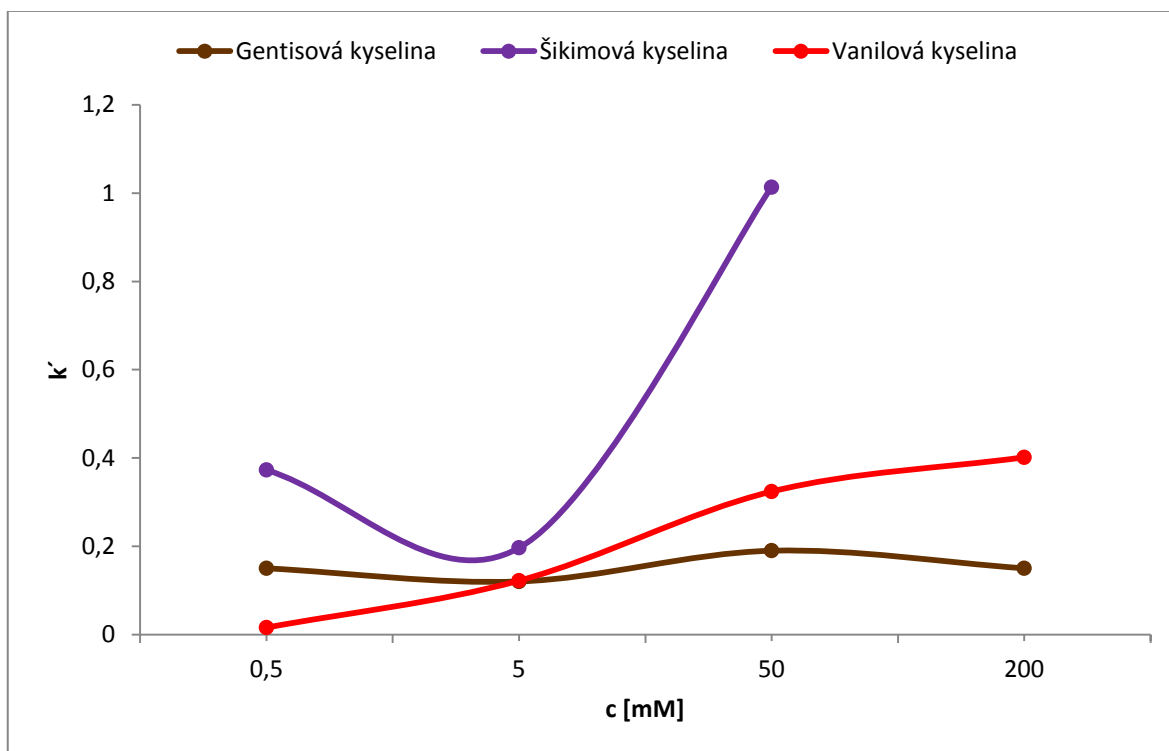
Graf 9 - Závislost k' na c pufru pro **neutrální** látky
kolona Luna HILIC (diol)



Graf 10 - Závislost k' na c pufru pro **neutrální** látky
kolona Ascentis ES Cyano



Graf 11- Závislost k' na c pufru pro *kyselé látky*
kolona Luna HILIC (diol)



Graf 12 - Závislost k' na c pufru pro *kyselé látky*
kolona Ascentis ES Cyano

Bazické látky konkrétně atenolol a propranolol, vykazovaly na obou kolonách výrazné snižování retence v závislosti na zvyšující se koncentrací pufru v mobilní fázi. Na koloně Luna HILIC (diol) při koncentraci pufru 5 mM byl retenční faktor atenololu $k' = 10,392$. Z grafu 7 je patrné, že hodnota pro 0,5 mM pufr přesáhla maximální stanovenou hodnotu (retenční čas 30 min). Na koloně Ascentis ES Cyano byl retenční faktor atenololu $k' = 12,086$; propranololu $k' = 13,613$ při koncentraci pufru 5 mM. Retenční čas obou látek pro 0,5 mM pufr byl opět vyšší než maximální stanovená hodnota.

U neutrálních látek došlo ke zvýšení retence u pyridoxinu při koncentraci pufru 0,5 mM u kolony Ascentis ES Cyano. U kolony Luna HILIC (diol) nebylo zvýšení retence pozorováno.

Ze zástupců kyselých látek stojí za pozornost pouze kyselina šikimová ($\log P = -2,220$), u níž byla pozorována zvyšující se retence se zvyšující se koncentrací pufru v mobilní fázi na obou testovaných kolonách. Hodnota k' pro kyselinu šikimovou při koncentraci pufru 200 mM nebyla získána z důvodu příliš rozmytého píku.

5.3. Vyhodnocení retenčního HILIC mechanismu

Retenční mechanismus byl hodnocen opět u deseti vybraných analytů. Mobilní fáze obsahovala různé množství vodné složky v rozsahu 5 – 95% a konstantní koncentraci pufru. Jako pufr byl použit 50 mM octan amonný o pH 4,8. Pro vyhodnocení byly použity křivky závislosti *lin-log* a *log-log* (kap. 3.5.). Grafy byly sestrojeny pro skupiny analytů rozdělených dle jejich acidobazických vlastností a jejich retenční faktory k' jsou uvedeny v tabulkách.

Látka / % vod.sl.	95	90	85	80	70	60	50	40	30	20	15	10	5
atenolol	-0,786	-0,852	-0,878	-0,905	-0,905	-0,835	-0,749	-0,612	-0,416	-0,110	0,106	0,418	0,989
propranolol	0,279	0,043	-0,148	-0,322	-0,577	-0,739	-0,848	-0,878	-0,752	-0,465	-0,260	0,033	0,537
adenin	-0,456	-0,545	-0,626	-0,705	-0,805	-0,816	-0,776	-0,676	-0,512	-0,286	-0,138	0,077	0,425
cytosin	-0,939	-0,976	-0,971	-1,005	-1,005	-0,955	-0,856	-0,711	-0,510	-0,253	-0,096	0,127	0,498
nikotinamid	-0,609	-0,714	-0,797	-0,878	-0,976	-1,017	-1,011	-0,965	-0,839	-0,685	-0,598	-0,488	-0,324
pyridoxin	-0,455	-0,446	-0,450	-0,450	-0,467	-0,475	-0,470	-0,479	-0,443	-0,341	-0,259	-0,119	0,130
theophylin	-0,873	-0,949	-1,011	-1,112	-1,214	-1,265	-1,287	-1,233	-1,075	-0,886	-0,779	-0,652	-0,443
gentisová k.	-0,708	-0,860	-1,017	-1,254	-1,900	-	-	-	-1,502	-1,042	-0,797	-0,560	-0,240
šikimová k.	-	-	-	-	-	-2,347	-1,467	-0,924	-0,455	0,046	0,361	0,759	-
vanilová k.	-0,543	-0,649	-0,752	-0,873	-1,069	-1,244	-1,361	-1,287	-0,993	-0,586	-0,359	-0,055	0,265

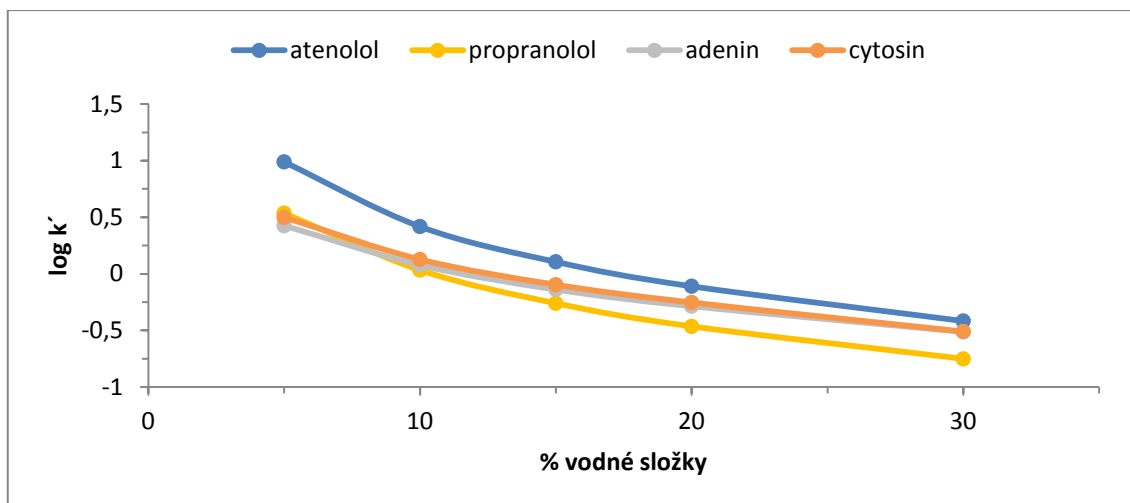
Tab. 14 – Hodnoty logaritmů retenčních faktorů (k') v závislosti na % vodné složky mobilní fáze

kolona Luna HILIC (diol)

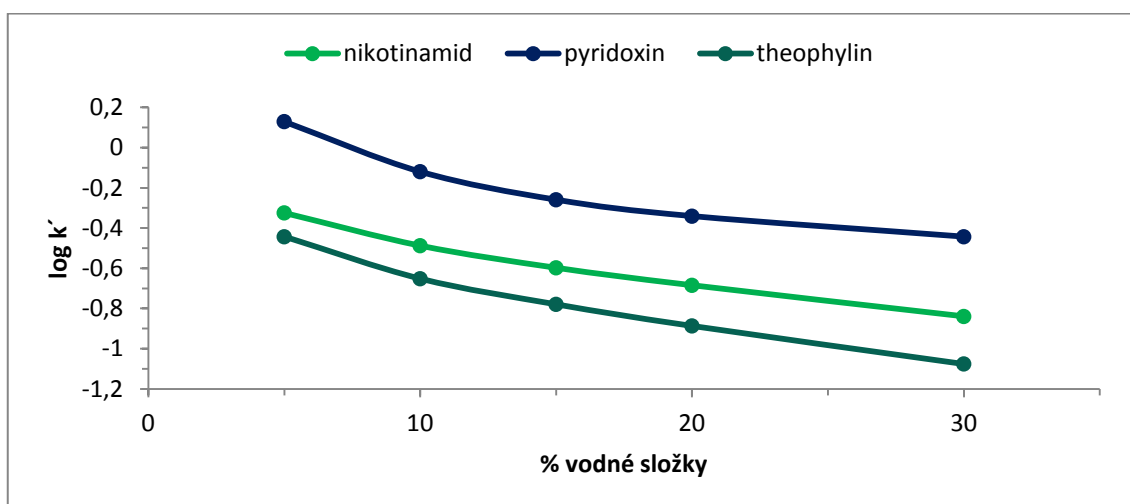
Látka / log % vod.sl.	1,978	1,954	1,929	1,903	1,845	1,778	1,699	1,602	1,477	1,301	1,176	1,000	0,699
atenolol	-0,786	-0,852	-0,878	-0,905	-0,905	-0,835	-0,749	-0,612	-0,416	-0,110	0,106	0,418	0,989
propranolol	0,279	0,043	-0,148	-0,322	-0,577	-0,739	-0,848	-0,878	-0,752	-0,465	-0,260	0,033	0,537
adenin	-0,456	-0,545	-0,626	-0,705	-0,805	-0,816	-0,776	-0,676	-0,512	-0,286	-0,138	0,077	0,425
cytosin	-0,939	-0,976	-0,971	-1,005	-1,005	-0,955	-0,856	-0,711	-0,510	-0,253	-0,096	0,127	0,498
nikotinamid	-0,609	-0,714	-0,797	-0,878	-0,976	-1,017	-1,011	-0,965	-0,839	-0,685	-0,598	-0,488	-0,324
pyridoxin	-0,455	-0,446	-0,450	-0,450	-0,467	-0,475	-0,470	-0,479	-0,443	-0,341	-0,259	-0,119	0,130
theophylin	-0,873	-0,949	-1,011	-1,112	-1,214	-1,265	-1,287	-1,233	-1,075	-0,886	-0,779	-0,652	-0,443
gentisová k.	-0,708	-0,860	-1,017	-1,254	-1,900	-	-	-	-1,502	-1,042	-0,797	-0,560	-0,240
šikimová k.	-	-	-	-	-	-2,347	-1,467	-0,924	-0,455	0,046	0,361	0,759	-
vanilová k.	-0,543	-0,649	-0,752	-0,873	-1,069	-1,244	-1,361	-1,287	-0,993	-0,586	-0,359	-0,055	0,265

Tab. 15 – Hodnoty logaritmů retenčních faktorů (k') v závislosti na log % vodné složky mobilní fáze

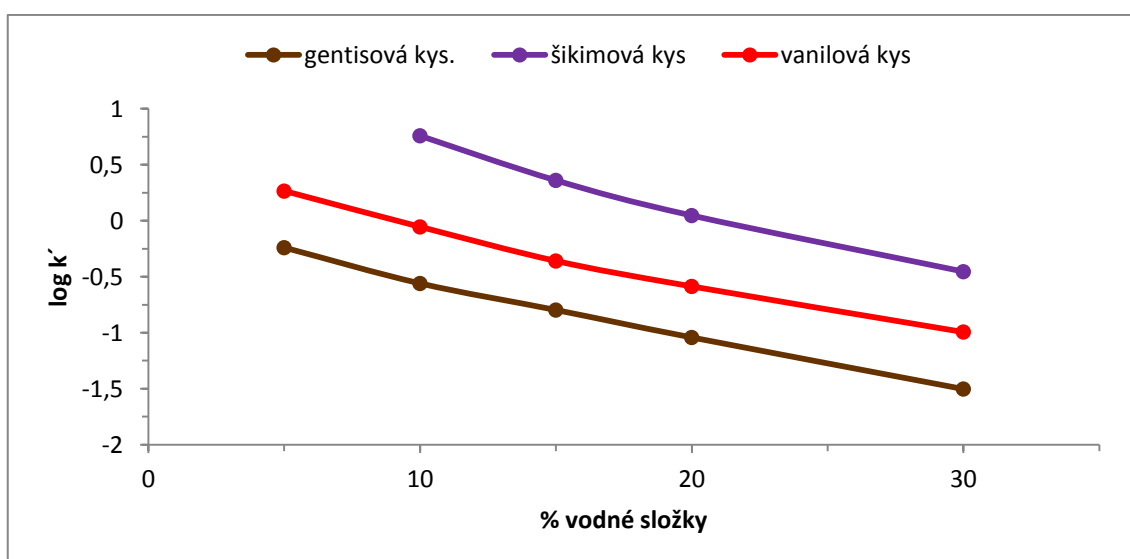
kolona Luna HILIC (diol)



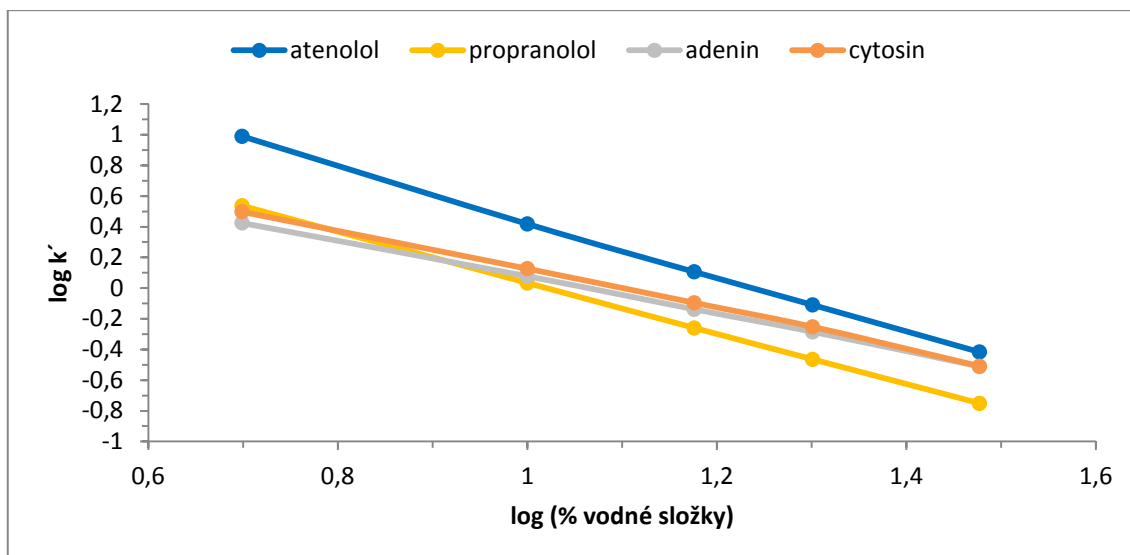
Graf 13 - Závislost lin-log pro **bazické látky**, kolona Luna HILIC (diol)



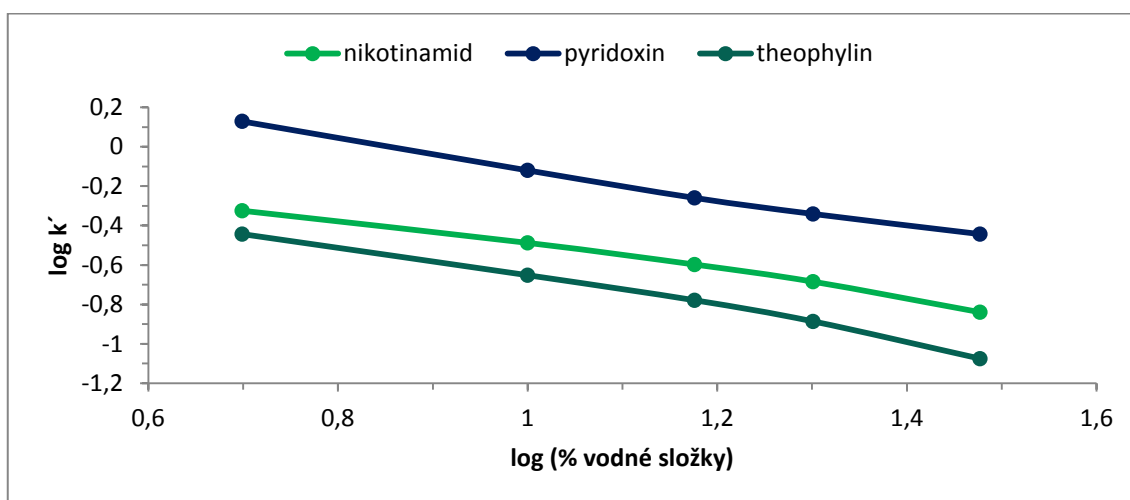
Graf 14 - Závislost lin-log pro **neutrální látky**, kolona Luna HILIC (diol)



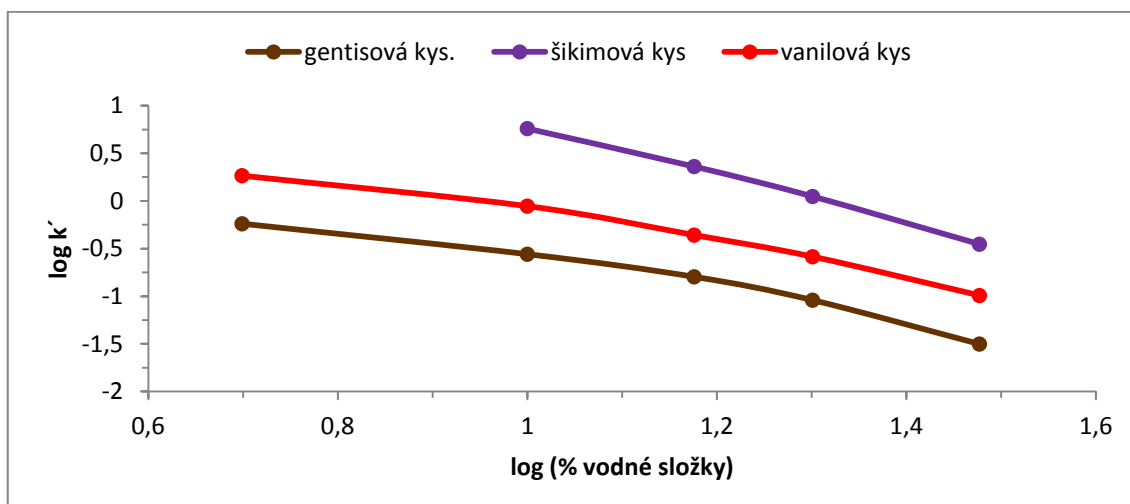
Graf 15 - Závislost lin-log pro **kyselé látky**, kolona Luna HILIC (diol)



Graf 16 - Závislost log-log pro *bazické látky*, kolona Luna HILIC (diol)



Graf 17 - Závislost log-log pro *neutrální látky*, kolona Luna HILIC (diol)



Graf 18 - Závislost log-log pro *kyselá látky*, kolona Luna HILIC (diol)

Látka /% vod.sl.	95	90	85	80	70	60	50	40	30	20	15	10	5
atenolol	0,709	0,393	0,156	-0,016	-0,198	-0,255	-0,234	-0,152	0,007	0,279	0,493	0,831	1,467
propranolol	0,343	0,061	-0,083	-0,151	-0,213	-0,215	-0,221	-0,178	-0,061	0,187	0,409	0,760	1,400
adenin	0,428	0,121	-0,126	-0,274	-0,614	-0,874	-0,909	-0,900	-0,764	-0,536	-0,377	-0,144	0,298
cytosin	-0,346	-0,479	-0,589	-0,691	-0,964	-1,161	-1,319	-1,169	-0,909	-0,586	-0,373	-0,068	0,491
nikotinamid	0,259	0,033	-0,142	-0,309	-0,573	-0,694	-0,849	-0,810	-0,771	-0,664	-0,586	-0,486	-0,300
pyridoxin	0,015	-0,144	-0,284	-0,457	-0,598	-0,726	-0,803	-0,814	-0,745	-0,621	-0,479	-0,361	-0,044
theophylin	0,642	0,317	0,047	-0,157	-0,459	-0,646	-0,806	-0,849	-0,795	-0,751	-0,691	-0,607	-0,466
gentisová k.	0,166	-0,107	-0,342	-0,536	-0,771	-	-	-	-	-	-	-	-
šikimová k.	-0,882	-1,136	-1,531	-	-	-	-	-	-	-	-0,991	0,032	1,045
vanilová k.	0,598	0,339	0,130	-0,040	-0,286	-0,576	-0,778	-0,964	-1,058	-0,905	-0,664	-0,320	0,111

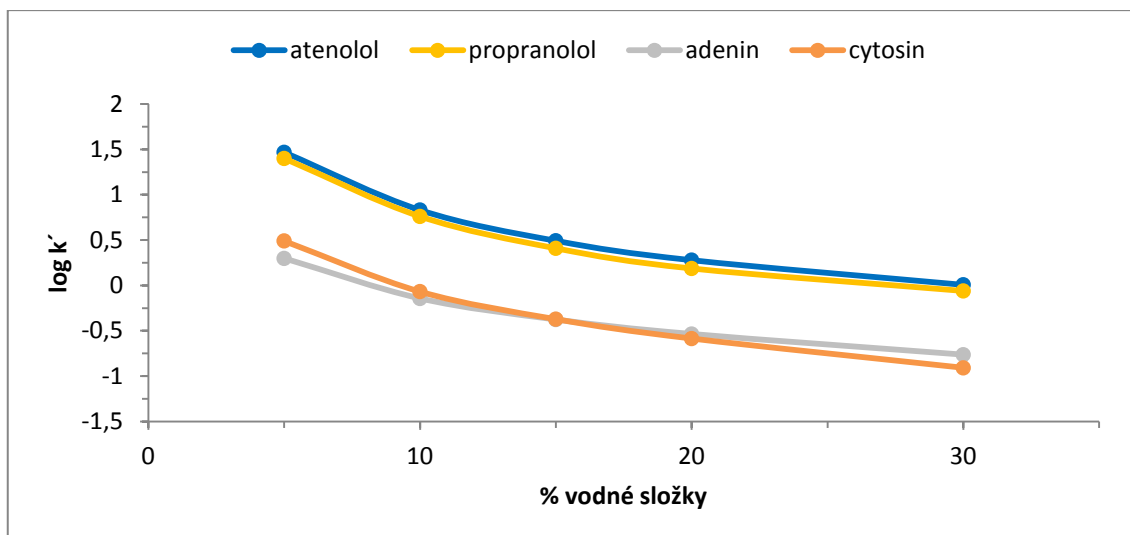
Tab. 16 - Hodnoty logaritmů retenčních faktorů (k') v závislosti na % vodné složky mobilní fáze

kolona Ascentis ES Cyano

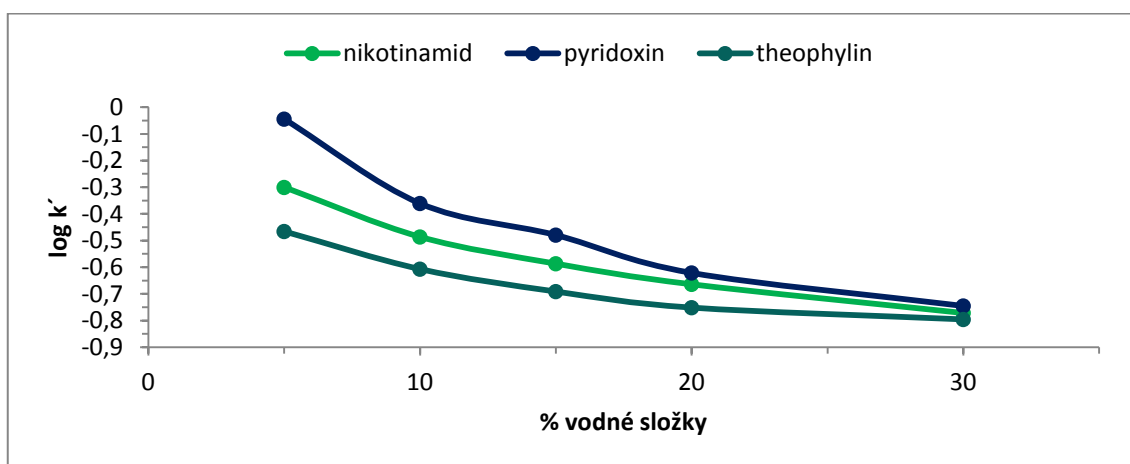
Látka / log % vod.sl.	1,978	1,954	1,929	1,903	1,845	1,778	1,699	1,602	1,477	1,301	1,176	1,000	0,699
atenolol	0,709	0,393	0,156	-0,016	-0,198	-0,255	-0,234	-0,152	0,007	0,279	0,493	0,831	1,467
propranolol	0,343	0,061	-0,083	-0,151	-0,213	-0,215	-0,221	-0,178	-0,061	0,187	0,409	0,760	1,400
adenin	0,428	0,121	-0,126	-0,274	-0,614	-0,874	-0,909	-0,900	-0,764	-0,536	-0,377	-0,144	0,298
cytosin	-0,346	-0,479	-0,589	-0,691	-0,964	-1,161	-1,319	-1,169	-0,909	-0,586	-0,373	-0,068	0,491
nikotinamid	0,259	0,033	-0,142	-0,309	-0,573	-0,694	-0,849	-0,810	-0,771	-0,664	-0,586	-0,486	-0,300
pyridoxin	0,015	-0,144	-0,284	-0,457	-0,598	-0,726	-0,803	-0,814	-0,745	-0,621	-0,479	-0,361	-0,044
theophylin	0,642	0,317	0,047	-0,157	-0,459	-0,646	-0,806	-0,849	-0,795	-0,751	-0,691	-0,607	-0,466
gentisová k.	0,166	-0,107	-0,342	-0,536	-0,771	-	-	-	-	-	-	-	-
šikimová k.	-0,882	-1,136	-1,531	-	-	-	-	-	-	-	-0,991	0,032	1,045
vanilová k.	0,598	0,339	0,130	-0,040	-0,286	-0,576	-0,778	-0,964	-1,058	-0,905	-0,664	-0,320	0,111

Tab. 17 - Hodnoty logaritmů retenčních faktorů (k') v závislosti na log % vodné složky mobilní fáze

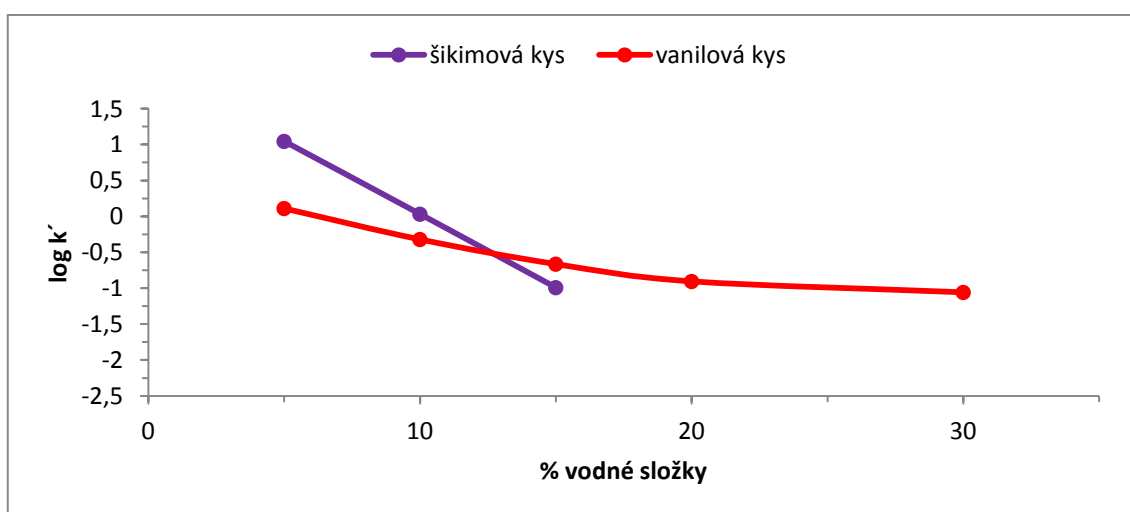
kolona Ascentis ES Cyano



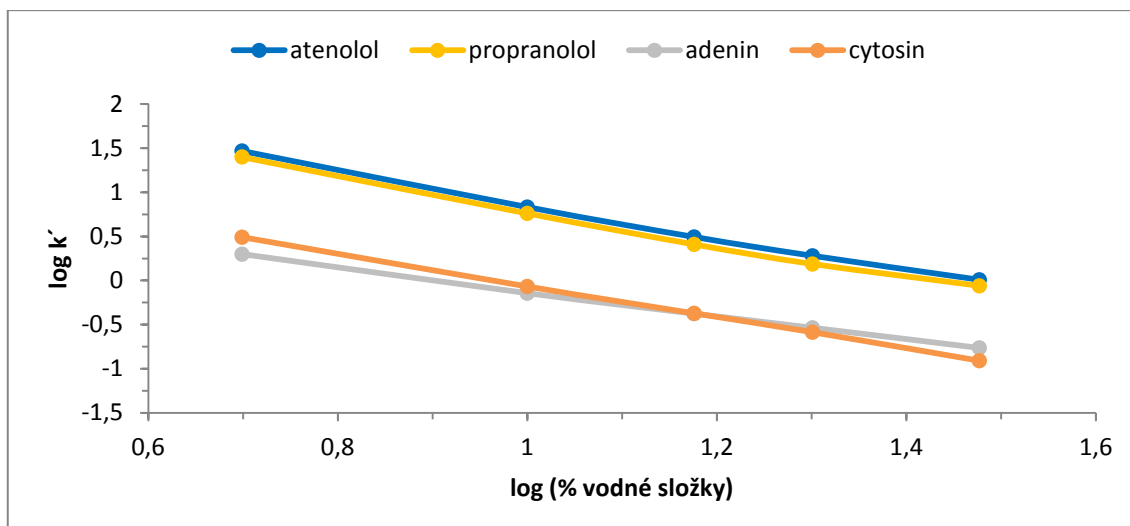
Graf 19 - Závislost lin-log pro **bazické látky**, kolona Ascentis ES Cyano



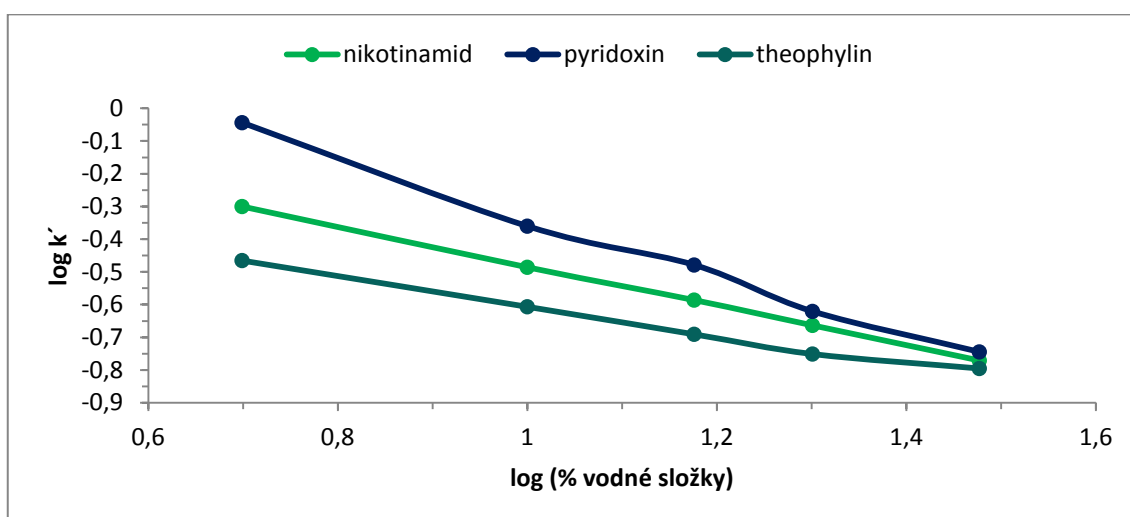
Graf 20 - Závislost lin-log pro **neutrální látky**, kolona Ascentis ES Cyano



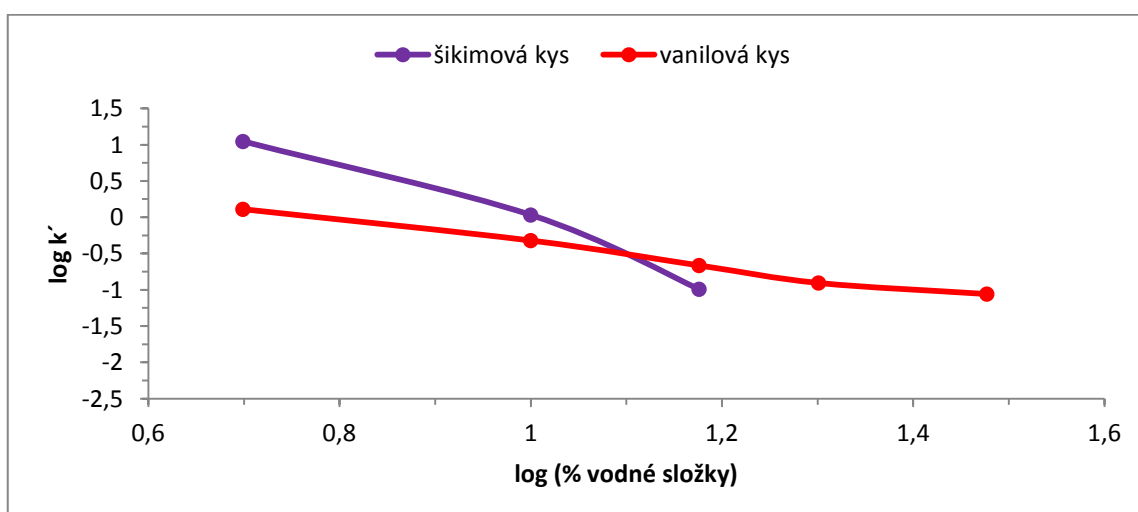
Graf 21- Závislost lin-log pro **kyselá látky**, kolona Ascentis ES Cyano



Graf 22 - Závislost log-log pro *bazické látky*, kolona Ascentis ES Cyano



Graf 23- Závislost log-log pro *neutrální látky*, kolona Ascentis ES Cyano



Graf 24 - Závislost log-log pro *kyselé látky*, kolona Ascentis ES Cyano

látka	r^2 (lin-log)	r^2 (log-log)
atenolol	0,914	0,999
propranolol	0,922	1,000
adenin	0,936	0,999
cytosin	0,942	0,999
nikotinamid	0,972	0,988
pyridoxin	0,880	0,994
theophylin	0,970	0,989
gentisová k.	0,996	0,954
šikimová k.	0,988	0,997
vanilová k.	0,987	0,972

Tab. 18 - Hodnoty r^2 hodnocené v rozsahu 5 - 30% vodné složky mobilní fáze
kolona Luna HILIC (diol)

látka	r^2 (lin-log)	r^2 (log-log)
atenolol	0,886	0,995
propranolol	0,878	0,993
adenin	0,908	0,999
cytosin	0,922	0,999
nikotinamid	0,926	0,999
pyridoxin	0,893	0,994
theophylin	0,870	0,990
gentisová k.	-	-
šikimová k.	1,000	0,977
vanilová k.	0,889	0,989

Tab. 19 - Hodnoty r^2 hodnocené v rozsahu 5 - 30% vodné složky mobilní fáze
kolona Ascentis ES Cyano

Byly sestrojeny grafy lin-log a log-log u vybraných deseti analytů a zjištěny hodnoty r^2 u obou typů závislostí v rozmezí 5 – 30 % vodné složky v mobilní fázi. Z hodnot a grafů je patrné, že linearita lin-log ani log-log není dostatečně lineární a tudíž nebyl prokázán adsorpční ani rozdělovací mechanismus. Byl pouze potvrzen smíšený retenční mechanismus na obou testovaných kolonách. Pouze u vybraných analytů (adenin, cytosin, nikotinamid pro kolonu Ascentis ES Cyano a atenolol, propranolol, adenin a cytosin pro kolonu Luna HILIC (diol)) byla hodnota korelačního koeficientu $> 0,999$ pro log-log graf a tudíž by měl převažovat adsorpční mechanismus.

Kyselina gentisová nebyla hodnocena na koloně Ascentis ES Cyano, jelikož v tomto rozmezí byla eluována s mrtvým objemem.

5.4. Vyhodnocení selektivity

K vyhodnocení selektivity byly sestrojeny křivky závislosti retenčního faktoru všech analytů při hodnotách pH 3,8 a 6,8. Bazické pH nebylo zahrnuto z důvodu omezené pH stability kolon. Dále byla vzájemně porovnána selektivita kolon, při pH 3,8 a 6,8. Jako mobilní fáze byla při obou experimentech použita směs 50 mM octanu amonného a acetonitrilu, v poměru 10:90.

Hodnoty retenčního faktoru jsou uvedeny v tabulkách a z uvedených hodnot byly sestrojeny grafy závislosti, ve kterých byl zaznamenán lineární průběh a pomocí lineární regrese byl získán korelační koeficient r^2 . Následně byl spočítán rozdíl selektivity s^2 mezi dvěma podmínkami (*kap. 3.5.*).

5.4.1. Vliv pH na selektivitu kolon

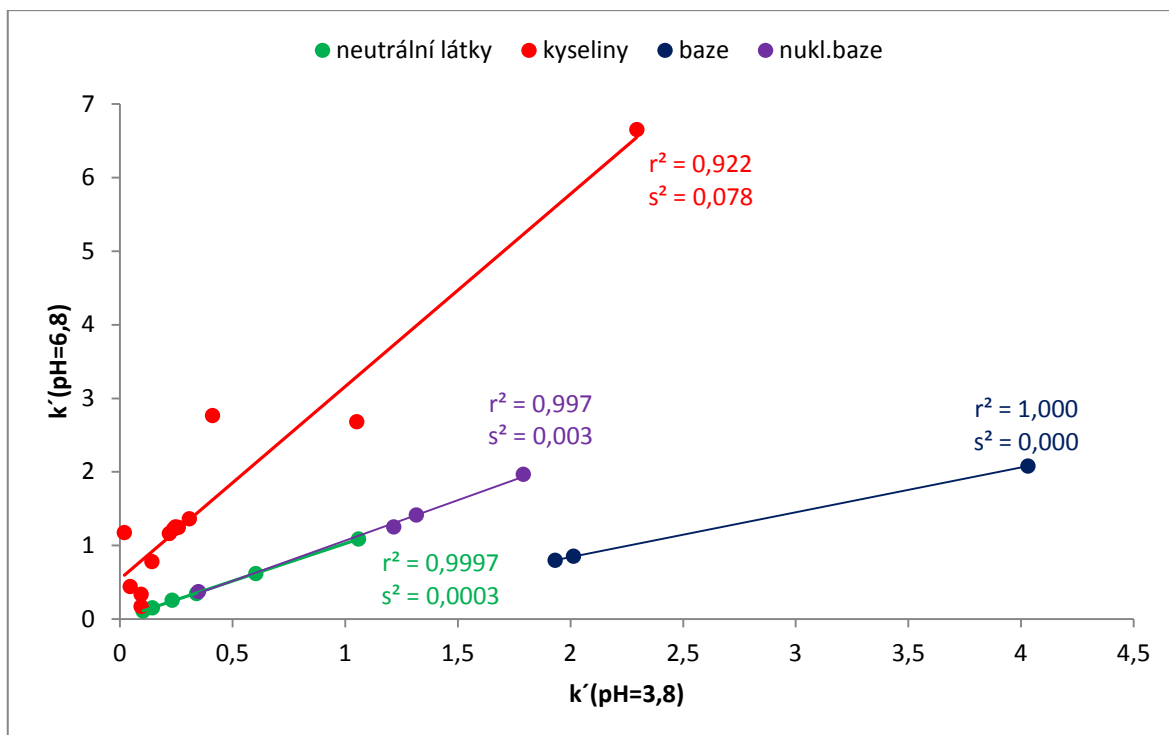
látka	pH 3.8	pH 6.8
Atenolol	4,031	2,079
Metoprolol	2,014	0,854
Propranolol	1,932	0,798
Adenin	1,216	1,252
Cytosin	1,316	1,414
Guanin	1,791	1,967
Uracil	0,349	0,372
Farnesol	-	-
Kofein	-	-
Kreatinin	1,059	1,088
Nikotinamid	0,340	0,346
Paracetamol	0,144	0,152
Pyridoxin	0,603	0,618
Theophylin	0,232	0,256
Tyrosol	0,103	0,109
Askorbová k.	1,051	2,682
p-Anisová k.	0,142	0,781
2,3-dihydroxy Benzoová k.	0,094	0,336
p-hydroxy Benzoová k.	0,247	1,253
Ferulová k.	0,220	1,163
Gallová k.	0,020	1,175
Gentisová k.	0,046	0,442
Kávová k.	0,411	2,766
Salicylová k.	0,094	0,171
Sinapová k.	0,238	1,223
Syringová k.	0,308	1,363
Šikimová k.	2,295	6,652
Vanilová k.	0,259	1,245

(A)

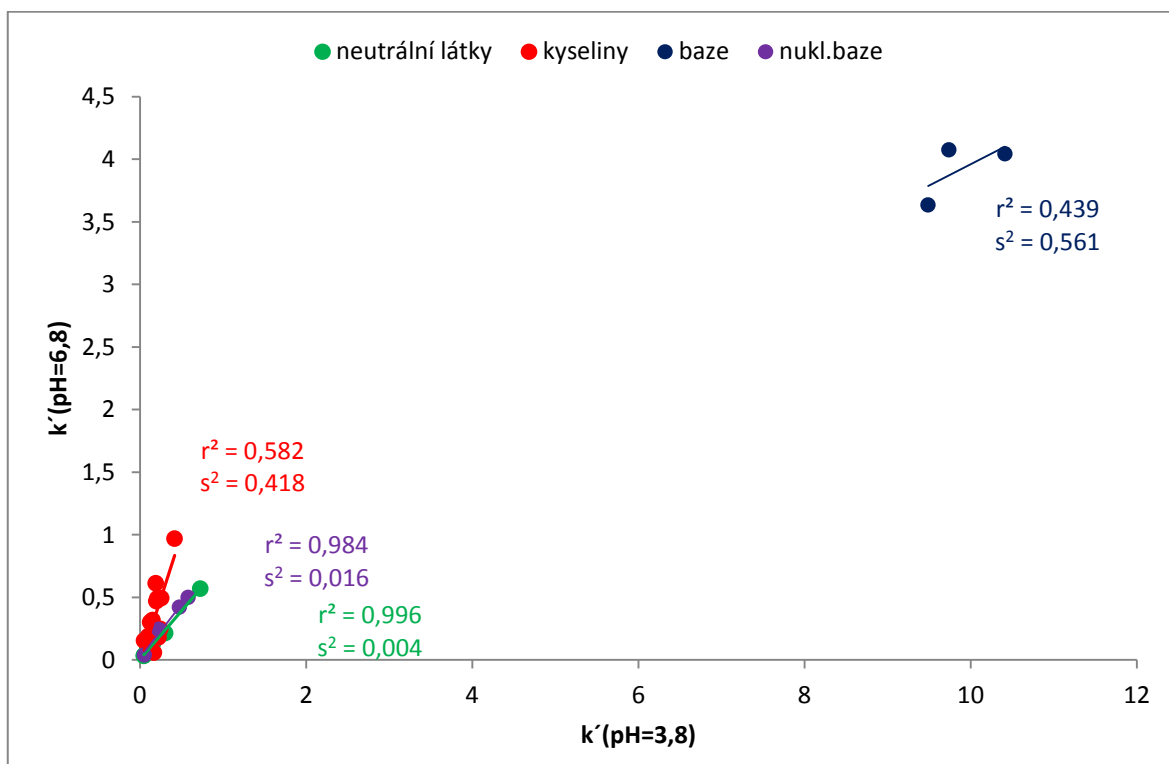
látka	pH 3.8	pH 6.8
Atenolol	9,736	4,077
Metoprolol	9,485	3,636
Propranolol	10,412	4,045
Adenin	0,472	0,423
Cytosin	0,578	0,501
Guanin	0,222	0,246
Uracil	0,051	0,041
Farnesol	-	-
Kofein	0,115	0,101
Kreatinin	0,724	0,571
Nikotinamid	0,155	0,135
Paracetamol	0,047	0,038
Pyridoxin	0,301	0,216
Theophylin	0,088	0,087
Tyrosol	0,045	0,034
Askorbová k.	0,166	0,060
p-Anisová k.	0,253	0,495
2,3-dihydroxy Benzoová k.	0,098	0,191
p-hydroxy Benzoová k.	0,122	0,303
Ferulová k.	0,195	0,471
Gallová k.	0,047	0,156
Gentisová k.	0,242	0,249
Kávová k.	0,188	0,614
Salicylová k.	0,221	0,182
Sinapová k.	0,207	0,493
Syringová k.	0,148	0,283
Šikimová k.	0,414	0,970
Vanilová k.	0,149	0,320

(B)

Tab. 20, 21 - Hodnoty retenčního faktoru (k') pro pH 3,8 a 6,8
A) kolona Luna HILIC (diol), B) kolona Ascentis ES Cyano



Graf 25 - Porovnání selektivity kolony při pH 3,8 a 6,8
kolona Luna HILIC (diol)



Graf 26 - Porovnání selektivity kolony při pH 3,8 a 6,8
kolona Ascentis ES Cyano

Z důvodu odlišného retenčního chování (odlišné hodnoty pKa) „klasických“ bazických látek (atenolol, metoprolol, propranolol) a nukleových bazí (adenin, cytosin, guanin, uracil) byly tyto dvě skupiny látek hodnoceny v rámci selektivity odděleně. Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna v grafech 25 a 26. Hodnoty retenčních faktorů analyzovaných látek jsou uvedeny v tabulkách 20 a 21.

Selektivita kolony Luna HILIC (diol) při pH 3,8 a 6,8 se výrazně nelišila ani pro jednu skupinu látek (kyselé: $s^2 = 0,078$, neutrální: $s^2 = 0,0003$, nukleové baze: $s^2 = 0,003$ a bazické látky: $s^2 = 0,000$).

Selektivita kolony Ascentis ES Cyano při pH 3,8 a 6,8 je shodná pro nukleové baze ($s^2 = 0,016$) a neutrální látky ($s^2 = 0,004$). Rozdíl v selektivitě této kolony při pH 3,8 a 6,8 je patrný pouze pro bazické ($s^2 = 0,561$) a kyselé látky ($s^2 = 0,418$).

Nicméně vliv pH na retenci byl pozorován u obou testovaných kolon pro kyselé a bazické látky (zvýšení pH způsobí zvýšení retence u kyselých látek a u bazických látek naopak. Tento fakt vyplývá ze schopnosti analytů ionizovat při určitém pH. Jsou-li analyty ionizované, jsou více zadržovány v nabitě formě z důvodu jejich vyšší hydrofilicity.

5.4.2. Selektivita kolon při pH 3,8 a 6,8

látka	cyano	diol
Atenolol	9,736	4,031
Metoprolol	9,485	2,014
Propranolol	10,412	1,932
Adenin	0,472	1,216
Cytosin	0,578	1,316
Guanin	0,222	1,791
Uracil	0,051	0,349
Farnesol	-	-
Kofein	0,115	-
Kreatinin	0,724	1,059
Nikotinamid	0,155	0,340
Paracetamol	0,047	0,144
Pyridoxin	0,301	0,603
Theophylin	0,088	0,232
Tyrosol	0,045	0,103
Askorbová k.	0,166	1,051
p-Anisová k.	0,253	0,142
2,3-dihydroxy Benzoová k.	0,098	0,094
p-hydroxy Benzoová k.	0,122	0,247
Ferulová k.	0,195	0,220
Gallová k.	0,047	0,020
Gentisová k.	0,242	0,046
Kávová k.	0,188	0,411
Salicylová k.	0,221	0,094
Sinapová k.	0,207	0,238
Syringová k.	0,148	0,308
Šikimová k.	0,414	2,295
Vanilová k.	0,149	0,259

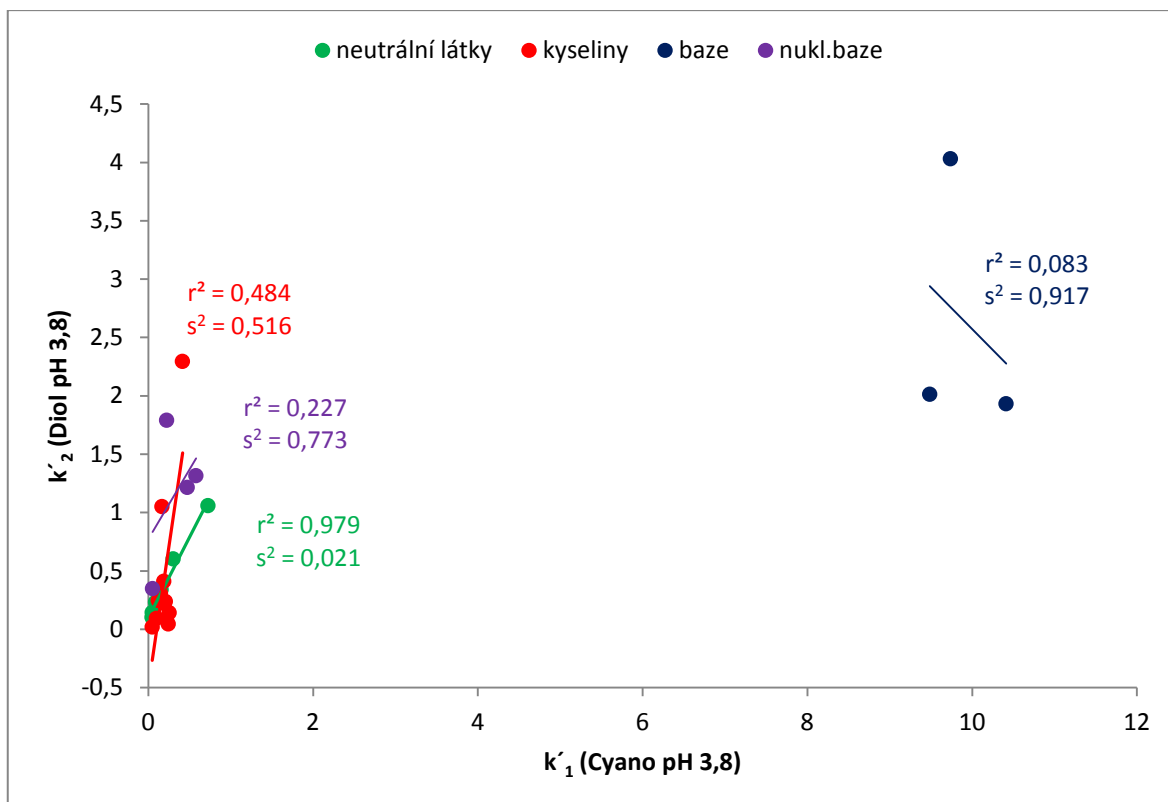
(A)

látka	cyano	diol
Atenolol	4,077	2,079
Metoprolol	3,636	0,854
Propranolol	4,045	0,798
Adenin	0,423	1,252
Cytosin	0,501	1,414
Guanin	0,246	1,967
Uracil	0,041	0,372
Farnesol	-	-
Kofein	0,101	-
Kreatinin	0,571	1,088
Nikotinamid	0,135	0,346
Paracetamol	0,038	0,152
Pyridoxin	0,216	0,618
Theophylin	0,087	0,256
Tyrosol	0,034	0,109
Askorbová k.	0,060	2,682
p-Anisová k.	0,495	0,781
2,3-dihydroxy Benzoová k.	0,191	0,336
p-hydroxy Benzoová k.	0,303	1,253
Ferulová k.	0,471	1,163
Gallová k.	0,156	1,175
Gentisová k.	0,249	0,442
Kávová k.	0,614	2,766
Salicylová k.	0,182	0,171
Sinapová k.	0,493	1,223
Syringová k.	0,283	1,363
Šikimová k.	0,970	6,652
Vanilová k.	0,320	1,245

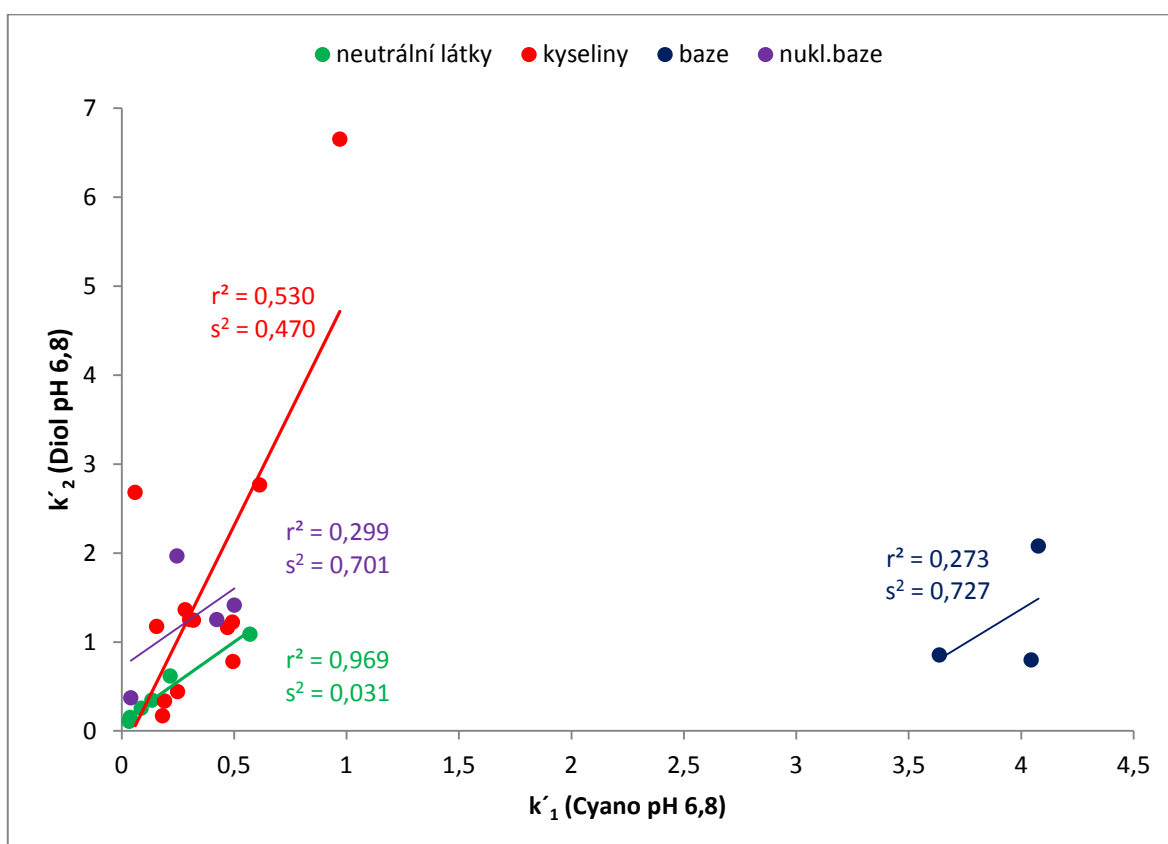
(B)

Tab. 22, 23 - Hodnoty retenčních faktorů (k') pro pH 3,8 a 6,8

A) kolona Luna HILIC (diol), B) kolona Ascentis ES Cyano



Graf 27 - Porovnání selektivity kolon při pH 3,8



Graf 28 - Porovnání selektivity kolon při pH 6,8

Z výše zmíněného důvodu (*kap. 5.4.1*) byla selektivita porovnávající dvě testované HILIC kolony hodnocena zvlášť pro „klasické“ bazické látky a nukleové baze. Selektivita pro jednotlivé skupiny látek je znázorněna v grafech 27, 28. Hodnoty k' analyzovaných látek jsou uvedeny v tabulkách 22, 23.

Selektivita kolon Luna HILIC (diol) a Ascentis ES Cyano při pH 3,8 byla pro všechny analyzované látky odlišná, s výjimkou neutrálních látek. Pro jednotlivé skupiny byly hodnoty selektivity následující: bazické látky $s^2 = 0,917$, nukleové baze $s^2 = 0,773$, kyselé látky $s^2 = 0,516$ a neutrální látky $s^2 = 0,021$.

Selektivita kolon Luna HILIC (diol) a Ascentis ES Cyano při pH 6,8 byla shodná také pro neutrální látky ($s^2 = 0,031$). Odlišná selektivita byla prokázána pro nukleové baze ($s^2 = 0,701$), kyselé ($s^2 = 0,470$) a bazické látky ($s^2 = 0,727$).

Při hodnocení rozdílů retence jednotlivých analytů na testovaných stacionárních fázích, lze konstatovat, že obecně všechny látky jsou více zadržovány na koloně Luna HILIC (diol) a to bez ohledu na hodnotu pH.

6. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem vlivu koncentrace ACN, pH a koncentrace pufru v mobilní fázi na retenci a selektivitu kolon Luna HILIC (diol) (3 μ m; 100 x 3,0 mm) a Ascentis ES Cyano (3 μ m; 100 x 2,1 mm).

Kolona Luna HILIC (diol) vykazovala typické HILIC chování, tzn. retence vzrůstala se zvyšujícím se množstvím ACN v mobilní fázi (především od koncentrace >85% ACN) a zároveň RP chování u propranololu tzn. pokles retence se snižujícím se obsahem vody v rozmezí 5 - 30%. U kolony Ascentis ES Cyano se RP chování prokázalo v nižší intenzitě u všech analytů s výjimkou cytosinu a bylo patrné v rozmezí 5 - 15% ACN.

S rostoucí koncentrací pufru na koloně Luna HILIC (diol) i Ascentis ES Cyano retence bazí klesala a retence kyselin (hlavně kyseliny šikimové) se zvyšovala. Vliv koncentrace pufru na retenci neutrálních látek byl na koloně Luna HILIC (diol) zanedbatelný a u kolony Ascentis ES Cyano se projevilo pouze RP chování nejvýrazněji u pyridoxinu.

Selektivita kolony Luna HILIC (diol) při pH 3,8 a 6,8 se výrazně nelišila ani pro jednu skupinu látek. Selektivita kolony Ascentis ES Cyano při pH 3,8 a 6,8 je shodná pro nukleové baze a neutrální látky. Rozdíl v selektivitě této kolony je patrný pouze pro bazické a kyselé látky.

Selektivita kolon Luna HILIC (diol) a Ascentis ES Cyano při pH 3,8 byla pro všechny analyzovaných látek odlišná, s výjimkou neutrálních látek. Selektivita kolon Luna HILIC (diol) a Ascentis ES Cyano při pH 6,8 byla shodná také pro neutrální látky. Odlišná selektivita byla prokázána pro nukleové baze, kyselé a bazické látky. Rozdíl selektivity obou kolon byl nezávislý na pH.

Na základě lin-log a log-log grafů byl hodnocen retenční mechanismus u vybraných deseti analytů a zjištěny hodnoty r^2 u obou typů závislostí v rozsahu 5 – 30% vodné složky mobilní fáze. Z hodnot a grafů je patrné, že linearita lin-log ani log-log není dostatečně lineární a proto nebyl prokázán příspěvek adsorpčního ani rozdělovacího mechanismu. Lze tedy konstatovat, že se jedná o smíšený retenční mechanismus.

Literatura

- [1] Ikegami, T. et al., *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474-503
- [2] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5920-5938
- [3] Gama, R. M., Gomes da Costa Silva, R., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., *Trends. Analyt. Chem.* 37 (2012) 48-60
- [4] Grumbach, E. S., Diehl, D. M., Neue U. D., *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1511-1518
- [5] Jandera, P., *Analytica Chimica Acta* 692 (2011) 1-25
- [6] Vlčková, H., Ježková, K., Štětková, K., Tomšíková, H., Solich, P., Nováková, L., *J. Sep. Sci.* (2014), 37, 1297-1307
- [7] Hemström, P., Irgum, K., *J. Sep. Sci.* (2006), 29, 1784-1821
- [8] Dejaegher, B., Heyden, Y. V., *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698-715
- [9] Ruta, J., Rudaz, S., McMalley, D. V., Veuthey, J-L., Guillarme, D., *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8230-8240
- [10] McCalley, D.V., *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 46-55
- [11] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71-80
- [12] Fountain, K.J., Xu, J., Diehl, D. M., Morrison, D., *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740-751
- [13] Karatapanis, A.E., Yiannis, F.C., Stalikas, C.D., *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2871-2879
- [14] Liegbott, P., Amouric, A., Comte, A., *Research in microbiology*, 160 (2009) 757-766
- [15] M. Vokurka, J. Hugo et al., *Velký lékařský slovník*, 8. vydání, Jessenius Maxdorf (2008)
- [16] H. Lullmann et al., *Farmakologie a toxikologie*, GRADA Publishing a.s. (2004)
- [17] Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 519-546
- [18] Covas, M., Miró-Cassas, E., Fitó, M., Parré-Albadalejo, M., Gimeno, E., Marrugat, J., De La Torre, R., *Drug Exp. Clin. Res.* 29 (5-6) (2003) 203-206
- [19] Spilková J. a kol.: *studijní materiály k přednáškám z Farmakognozie*, Faf UK, Hradec Králové (2012/2013)
- [20] Lincová, D., Farghali, H., *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galen, (2007)
- [21] <http://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (03/2015)
- [22] Olšovská, J., Jurková, M., *Kvasný prům*, 58 (2012) 30-35

- [23] Jandera, P., J. Sep. Sci. 31 (2008) 1421-1437
- [24] www.emagcloud.com/Hichrom/Hichrom_Catalogue_9/index.html#/1/ (3/2015)
- [25] www.hplcmart.com/hplc/catalog/ (3/2015)
- [26] www.mdpi.com/2227-9075/2/1/20/htm (4/2015)
- [27] www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/Pages/default.aspx (3/2015)
- [28] www.kromasil.com/products/columns/ (3/2015)
- [29] www.crawfordscientific.com/Grace_columns.htm (3/2015)
- [30] www.bonnaagela.com/product/filter/3?f=14:UHP (3/2015)
- [31] www.esind.com/pages/products/products_06_1a.tpl (3/2015)
- [32] www.fortis-technologies.com/HPLC_UHPLC_Products.html (3/2015)
- [33] www.glsiences.com/product/hplc/lc-columns/ (3/2015)
- [34] www.hplc.sk/pdf/HALO/HALO_Penta-HILIC.pdf (3/2015)
- [35] www.dichrom.com/downloads/ChromaNik/SunShell_dichrom_022013.pdf (3/2015)
- [36] www.knauer.net/en/products/product-types/lc-columns/interactive-column-finder.html (3/2015)
- [37] www.analytics-shop.com/gb/chromatography/hplc-columns/hplc-columns-by-manufacturer/macherey-nagel-hplc-columns.html#more (3/2015)
- [38] www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/PQyb.qB.qbQAAAE_VOR3.Lxi,nav (3/2015)
- [39] www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/column/08.html (3/2015)
- [40] www.perkinelmer.com/catalog/family/id/brownlee%20spp%20hilic%20columns (3/2015)
- [41] www.phenomenex.com/hplc-column/hilic-hplc-column (3/2015)
- [42] www.chromatographyshop.com/html/polylc.html (3/2015)
- [43] www.restek.com/Chromatography-Columns/HPLC-UHPLC-Columns/HPLC-UHPLC-Analytical-Columns (3/2015)
- [44] www.sepax-tech.com/HILIC.php (3/2015)
- [45] www.sielc.com/Products_Obelisc.html (3/2015)
- [46] www.sigmaaldrich.com/catalog/search?&interface=All&N=0+12693647&mode=partialmax&lang=en®ion=CZ&focus=product (3/2015)

- [47] http://thermo-fisher-scientific-publishing.com/litterature_EU/CHROMATOGRAPHY_UK#1 (3/2015)
- [48] www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/HPLCColumns/NormalHydrophilic/ (3/2015)
- [49] www.waters.com/waters/en_US/HPLCColumns/nav.htm?cid=511505&alias=Alias_obd_CHEMISTRY (3/2015)
- [50] www.watrex.cz/watrex/cz/result_columns.php?producer=WATREX&type=all&type2=all&sorbent=all&phase1=all&phase2=all&castice=all&pory=all&delka=all&prumer=all (3/2015)
- [51] www.ymc.co.jp/en/columns/#columnCategory (3/2015)
- [52] Buszewski, B., Noga, S., Anal Bioanal Chem 402 (2012) 233-236.
- [53] www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf (5/2015)
- [54] Nováková, L., Douša, M., a kol., Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., 1. vydání, Europrint (2013)