

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Markéta Voborná

**SEPARACE CYTOSTATICKY AKTIVNÍCH SLOUČENIN
METODOU HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRFIE**

**Hydrophilic interaction liquid chromatography
for separation of cytostatically active compounds**

Diplomová práce

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

Praha 2017

Prohlášení

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

V Praze dne

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro separaci čtyř skupin analytů odvozených od 7-deazaadenosinu (každá skupina obsahovala 4 derivatizované nukleosidy) pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie. Všech 16 studovaných analytů bylo syntetizováno jako potenciální cytostatika. Byl testován vliv typu stacionární fáze chromatografické kolony, poměru organické a vodné složky mobilní fáze, pH použitého pufru v mobilní fázi a koncentrace octanu amonného v tomto pufru v rozsahu 5 – 50 mM.

Pro separace těchto analytů byly testovány tři různé stacionární fáze, a to čistě silikagelová (kolona Spherisorb® Silica), amidová (kolona TSKgel Amide-80) a nativní cyklofruktanová (kolona Frulic-N). Rozměry všech kolon byly stejné, tj. 250×4,6 mm s velikostí částic 5 μm. Během optimalizace separace byl studován i retenční a separační mechanismus v HILIC. Bylo zjištěno, že ve všech testovaných chromatografických systémech se na mechanismu separace podílí jak rozdělování analytů mezi vodnou vrstvu částečně ukotvenou na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, tak i adsorpce analytů na stacionární fázi. Tři skupiny analytů (SK1, SK3, SK4) se podařilo separovat do 3 píků pouze částečně. Náznak separace do 4 píků byl zaznamenán pouze u směsi analytů SK1 a SK2 na koloně Frulic-N při použití MF acetonitril/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), avšak s nedostatečným rozlišením. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u směsi analytů SK2 na koloně Frulic-N při použití MF acetonitril/50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), kdy došlo k separaci do 3 píků až na základní linii.

Klíčová slova:

HILIC, 7-deazaadenosin, separace, cytostatika

Abstract

This diploma thesis deals with optimization of separation conditions for the four groups of analytes related to 7-deazaadenosine (each group was composed of four derivatized nucleosides) using hydrophilic interaction liquid chromatography. All the sixteen analytes were synthesized as potentially cytostatically active compounds. The effect of the type of stationary phase in the chromatographic column, the ratio of organic and aqueous parts of the mobile phase, pH of the buffer used as the mobile phase component and the concentration of ammonium acetate in the buffer in the range of 5-50 mM were tested during the optimization process.

Three stationary phases were tested - bare silica (Spherisorb® Silica column), silica-bonded amide (TSKgel Amide-80 column) and silica-bonded native cyclofructan 6 (Fruhic-N column). The dimensions of all columns were 250×4.6 mm i.d.; particle size 5 µm. During the optimization of separation the mechanism of HILIC was studied. It was found that the distribution of analytes between the aqueous layer partially coated on the surface of the stationary phase and the mobile phase and also the adsorption of analytes on the stationary phase participated in the retention and separation mechanism in all tested chromatographic systems. The three groups of analytes (SK1, SK3, SK4) were only partially separated into three peaks. The indication of separation into four peaks was observed only for the mixtures of analytes SK1 and SK2 on the Fruhic-N column using mobile phase composed of acetonitrile/5mM ammonium acetate pH 7,5 95/5 (v/v). However, the analyses showed low resolutions. The mixture of analytes SK2 were baseline separated into three peaks on the Fruhic-N column using mobile phase composed of acetonitrile/50mM ammonium acetate pH 7,5 95/5 (v/v).

Keywords:

HILIC, 7-deazaadenosine, separation, cytostatics

Chtěla bych tímto poděkovat své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za její pomoc a trpělivost, nové nápady pro zlepšení této práce, rady při práci v laboratoři, ochotu a vstřícnost, kterou ke mně projevovala po celou dobu vytváření této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala všem členům skupiny za pomoc při nenadálých situacích v laboratoři. Poděkování patří i doc. RNDr. Jindřichovi Jindřichovi, CSc. za pomoc s pojmenováním separovaných sloučenin.

OBSAH

1. Seznam použitých zkratk a symbolů	8
2. ÚVOD	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její možnosti	10
3.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	10
3.1.1.1 Princip separace v HILIC módu	12
3.1.1.2 Popis mechanismu separace v HILIC	13
3.2 Stacionární fáze pro použití v HILIC módu	14
3.2.1 Silikagelové stacionární fáze	15
3.2.1.1 Kolona Spherisorb® Silica	16
3.2.2 Amidové stacionární fáze	17
3.2.2.1 Kolona TSKgel Amide-80	17
3.2.3 Cyklofruktanové stacionární fáze	18
3.2.3.1 Kolona Frulic-N	19
3.3 Cytostatika	20
3.3.1 Potenciálně cytostaticky aktivní sloučeniny	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Přístroje a pomůcky	24
4.2 Použité chemikálie	24
4.3 Vzorky	25
4.3.1 Příprava vzorků	27
4.4 Příprava pufrů	28
4.5 Podmínky separace	29
4.6 Mobilní fáze	29
4.6.1 Použité pufrы	29
4.6.2 HILIC mód	29

4.7 Použité vzorce a výpočty	31
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně Spherisorb® Silica	32
5.1.1 Popis mechanismu separace	32
5.1.2 Použití mobilní fáze obsahující deionizovanou vodu	33
5.1.3 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi	33
5.2 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně TSKgel Amide-80	36
5.2.1 Popis mechanismu separace	36
5.2.2 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi	38
5.2.3 Vliv koncentrace pufru o pH 7,5 na separaci skupin analytů	41
5.3 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně Frulic-N	44
5.3.1 Popis mechanismu separace	44
5.3.2 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi	46
5.3.3 Vliv koncentrace pufru o pH 7,5 na separaci skupin analytů	50
5.4 Srovnání separací na kolonách s různým typem stacionární fáze	55
6. ZÁVĚR	58
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

1. Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN.....	acetonitril
CF6	cyklofruktan 6
DMSO.....	dimethylsulfoxid
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC.....	iontově-výměnná chromatografie
MeOH.....	methanol
MF	mobilní fáze
NPLC	normální mód kapalinové chromatografie
PO	polárně organický
RPLC	reverzní mód kapalinové chromatografie
SF.....	stacionární fáze
UV	ultrafialová
α	separační faktor
k	retenční faktor
k_w	hypotetický retenční faktor v čistě vodné MF
n_w	molekuly vodné složky na povrchu SF
N_w	molární podíl vodné složky v eluentu
R	rozlišení
R^2	koeficient determinace
t_M	mrtvý čas
t_R	retenční čas
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky

2. ÚVOD

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) v posledních letech získává na významu v oblasti analýz polárních léčiv, metabolitů a biologicky aktivních sloučenin¹. Tato metoda není tak univerzální, z důvodu velmi nízké, popř. žádné retence nepolárních analytů, jako reverzní mód kapalinové chromatografie (RPLC), ale přesto se ukazuje být žádanou alternativou pro separace polárních látek². Velmi polární látky mohou být v RPLC nedostatečně zadržovány na stacionární fázi, a právě v tomto případě je vhodné použít metodu HILIC, která nabízí lepší podmínky pro separaci těchto sloučenin³.

I přes rozsáhlý výzkum cytostaticky aktivních látek v posledních pěti letech zůstává prostor pro vývoj nových nukleosidových analogů, které by byly schopné působit i na nádorové tkáně vykazující rezistenci k již používaným cytostatikům⁴. Tyto látky jsou vhodné pro analýzu v HILIC módu.

Cílem této diplomové práce je optimalizace podmínek pro separaci několika skupin nově syntetizovaných derivatizovaných endogenních nukleosidů považovaných za potenciální cytostatika metodou HILIC. Pro tyto účely byly testovány a porovnány tři HILIC kolony tj. s čistě silikagelovou, amidovou a cyklofruktanovou stacionární fází (SF). Optimalizovanými parametry pro každou kolonu bylo složení mobilní fáze (MF), pH použitého pufru jako složky MF a koncentrace tohoto pufru.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její možnosti

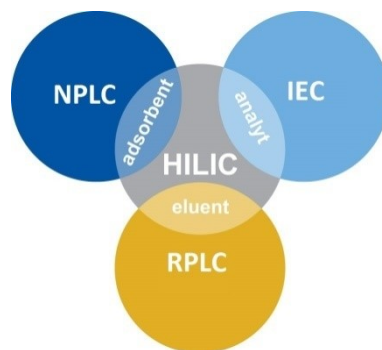
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří v současnosti mezi nejrozšířenější separační techniky používané k analýze obsáhlé skupiny látek s odlišnými chemickými vlastnostmi. Podle typu analyzované látky lze volit mezi několika separačními módy této metody.

Nejdéle známý používaný mód HPLC se nazývá kapalinová chromatografie na normálních fázích (NPLC), který pracuje s polární SF a apolární MF. Retence analytů se zvyšuje s jejich rostoucí polaritou. Další možností je kapalinová chromatografie na reverzních fázích, jejímž principem je obrácení polarity SF a MF oproti NPLC. V důsledku toho je i eluční pořadí analytů s různou polaritou opačné⁵. Mód polárně-organický (PO) užívá MF složenou majoritně z methanolu (MeOH) nebo acetonitrilu (ACN) s minoritními přísadkami báze a/nebo kyseliny⁶. Nejnovější možností metody HPLC je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie používaná primárně pro polární analyty⁷. Touto metodou lze dobře analyzovat i nabitě sloučeniny, stejně jako s použitím iontové výměnné chromatografie (IEC)⁸.

3.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Jako poslední z módů HPLC byla v roce 1990 definována hydrofilní interakční kapalinová chromatografie s použitím polární SF a binární MF^{9,10}.

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie může kombinovat vlastnosti NPLC, RPLC a IEC (Obr. 1). Charakteristickým rysem metody HILIC je použití polární SF, v kombinaci s MF s vysokým obsahem organické složky, nejčastěji ACN a menším podílem vodné složky, která má vyšší eluční sílu⁷.



Obr. 1: Charakteristická kombinace vlastností tří metod LC⁸

Stacionární fázi může být přímo čistý silikagel nebo modifikovaný silikagel např. polárními diolovými, kyanovými, amidovými nebo amino- skupinami¹¹. V případě cyklodextrinových⁸ nebo cyklofruktanových¹² SF, také používaných v tomto módu HPLC, jde o modifikaci silikagelu celými molekulami, což může zlepšit separační schopnosti SF.

Mobilní fáze používaná v HILIC obsahuje vodnou složku a s vodou mísitelné organické rozpouštědlo, nejčastěji ACN, méně často alkoholy a cyklické ethery. Eluční síla organických rozpouštědel roste v pořadí: MeOH>tetrahydrofuran>ACN¹³. Organická složka MF by měla vždy tvořit majoritní většinu, tedy více než 60-70 objemových %^{7,14}. Vodná složka by měla být zastoupena minimálně z 2-3 objemových %. Tvoří ji buď voda, nebo pufr, velmi často se používá octan nebo mravenčan amonný. Eluční pořadí analytů v HILIC módu je stejné jako u NPLC, tedy se vzrůstající polaritou analytů se prodlužují retence¹³.

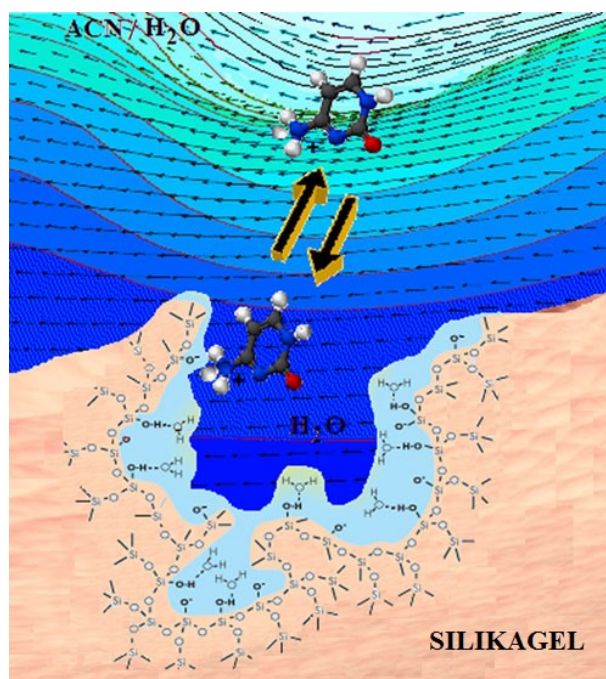
Tuto metodu je vhodné použít pro separaci hydrofilních analytů, které obvykle vykazují krátké retence v reverzním módu a nízkou separační účinnost v normálním módu¹⁵. Velmi polární analyty je nutné při analýze v RPLC módu derivatizovat pro prodloužení retence, naopak v HILIC módu lze provádět analýzy těchto látek bez derivatizace^{16,17}. Další výhodou HILIC systému je schopnost analýzy vzorků zcela rozpuštěných v organických rozpouštědlech a použití MF kompatibilních s detekcí hmotnostním spektrometrem, jenž poskytuje výsledky analýz s vysokou selektivitou¹⁸. Z důvodu nízké viskozity MF lze pozorovat nižší tlakové pozadí kolony, což dovoluje použití vyššího průtoku MF¹⁹. Tato metoda ve spojení s UV detekcí poskytuje relativně rychlé a levné analýzy sloučenin²⁰. Dostupnost širokého spektra komerčně vyráběných kolon je další pozitivní aspekt této metody²¹.

HILIC umožňuje separovat malé i velké hydrofilní analyty, mezi které patří sacharidy, aminokyseliny, proteiny a peptidy, vitamíny, fenoly, pesticidy, toxiny, nukleosidy, nukleotidy a mnoho dalších sloučenin vyskytujících se v potravinách nebo v tělních tekutinách a tkáních^{13,22}.

3.1.1.1 Princip separace v HILIC módu

Mechanismus separace v HILIC není dodnes zcela přesně objasněn a stále se o něm diskutuje²¹. Tato metoda je často prezentována jako varianta NPLC kvůli podobnostem ohledně typu SF a elučního pořadí. Na druhou stranu MF je více podobná té, která se používá v RPLC. Zatímco mechanismus separace v RPLC módu je popisován pomocí modelů pro rozdělování mezi dvě fáze, pro popis mechanismu separace v NPLC módu se užívá zejména adsorpce na povrchu SF¹³.

Navzdory všem podobnostem by mělo být o módu HILIC uvažováno jako o novém typu chromatografie, jehož retenční a separační mechanismus je komplexní souhrou obou dříve zmíněných mechanismů. Uplatňuje se zde jak rozdělování analytů mezi MF bohatou na organickou složku a vodnou vrstvou částečně ukotvenou na povrchu SF, které je považováno za primární retenční mechanismus, tak adsorpce analytů na povrchu SF (Obr. 2), která může být zapříčiněna různými typy interakcí¹⁹. Polární analyty mohou interagovat s povrchem SF prostřednictvím elektrostatických interakcí, vodíkových můstků, někdy i přes dipólové a další interakce podle typu SF a analytu. Retenční mechanismus HILIC módu může být označován jako smíšený²³. Převládající mechanismus obvykle nelze jednoduše předvídat²⁴.



Obr. 2: Schéma separačního mechanismu v HILIC⁸

Polární skupiny vyskytující se na povrchu SF užívané v HILIC mají tendenci zadržovat vodnou složku MF²⁵. V přítomnosti MF bohaté na organické rozpouštědlo s vodnou složkou se vytvoří spektrum postupných pásem odstupňovaných dle obsahu vodné složky tak, že se ve středu kolony nachází vrstvy s nejvyšším obsahem organické složky a u povrchu hydrofilní SF se vytvoří vrstva obsahující vysoký podíl vodné složky. Polární analyty preferují vodnou vrstvu a jsou silně zadržovány na SF. Retence analytů se prodlužuje s úbytkem vodné složky v MF. Čím větší je podíl vodné složky v MF, tím více se toto prostředí podobá vodné vrstvě ukotvené na SF, což způsobí zkrácení retence²⁶.

Mnoho faktorů ovlivňuje separaci v HILIC módu významněji než v RPLC. Patří mezi ně např. koncentrace pufru, pH pufru, množství organického rozpouštědla a teplota. Vliv těchto podmínek je zcela nepředvídatelný a silně záleží na chemických vlastnostech daného analytu a SF²⁷.

3.1.1.2 Popis mechanismu separace v HILIC

Rozdělování a adsorpci, které se uplatňují v HILIC, lze popsat pomocí modelů odvozených pro RPLC a NPLC^{28,29}. Závislost logaritmu retenčního faktoru ($\log k$) na objemovém podílu vodné složky ϕ v MF popisující rozdělování odvodil Schoenmakers původně pro RPLC (Rovnice 1)²⁹.

$$\log k = A\phi^2 + B\phi + C \quad (1)$$

kde A, B, C..... konstanty

Snyder a Soczewinski odvodili lineární závislost popisující adsorpci, která je typická pro NPLC (Rovnice 2)^{29,30}.

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (2)$$

kde k retenční faktor
 k_w hypotetický retenční faktor v čistě vodné MF
 A_s oblasti obsazené molekulami rozpouštědla
 n_w molekuly vodné složky na povrchu SF
 N_w molární frakce vodné složky v eluentu

Obě závislosti celkově popisují retenční chování, avšak ani jedna nepodává detailnější poznatky o druzích interakcí, které se v daném separačním systému uplatňují²⁹.

3.2 Stacionární fáze pro použití v HILIC módu

Možnosti výběru SF pro HILIC jsou velmi široké, neboť kterákoli polární SF, která je schopna zadržovat vodu na svém povrchu, může být použita³¹. Charakter SF představuje možnost největšího vlivu na separační účinnost systému HILIC. Vývoj nových SF hraje zásadní roli v používání a zlepšování podmínek v HILIC. Pro tuto metodu se používají jednak SF určené původně pro použití v NPLC, nebo kolony se SF vyvinutou speciálně pro HILIC³² jako např. SF na bázi polyimidu kyseliny jantarové⁹ nebo polymerní kolony s chemicky vázanými zwitteriontovými sulfoalkylbetainovými skupinami³³.

Stacionární fáze kolon pro HILIC můžeme rozdělit do několika základních skupin: prostý silikagel, neutrální polární chemicky vázané SF, iontově výměnné a zwitteriontové SF. SF jsou obvykle připravovány chemickou modifikací povrchu silikagelu. Tímto způsobem vznikají aminové, amidové, diolové, cyklodextrinové, ale i speciální SF, které jsou vyvinuty přímo pro HILIC jako např. sulfoalkylbetainové SF²⁶ nebo SF s povrchem derivatizovaným thiomocovinou¹⁵. Některé ze zmiňovaných SF lze aplikovat jak v systému HILIC, tak v RPLC i NPLC²⁶.

Příklady aplikací různých druhů SF v HILIC jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Příklady SF aplikovaných v HILIC módu

Stacionární fáze	Analyt
Amin vázaný na silikagelovém nosiči	Mastné kyseliny ¹⁸
Sulfoalkylbetainové zwitteriontové skupiny vázané na silikagelovém nosiči	Posttranslačně modifikované peptidy ²¹
Aminopropyl vázaný na silikagelovém nosiči	Oligosacharidy ³³
Čistě silikagelová	Fosfolipidy ³⁴

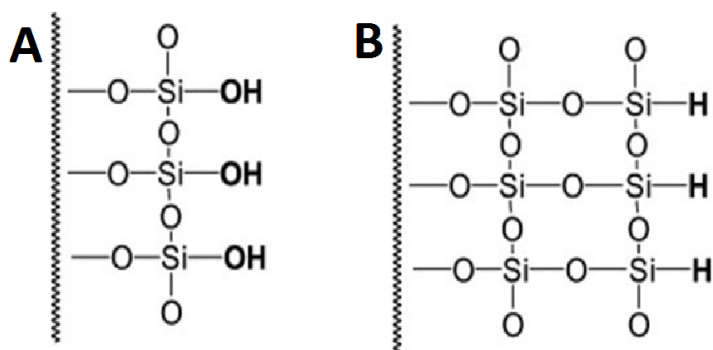
Nadále se bude teoretická část práce podrobněji věnovat pouze SF použitým v rámci experimentální části této práce, tedy čistě silikagelovým, amidovým a cyklofruktanovým SF.

3.2.1 Silikagelové stacionární fáze

Čistě silikagelové SF patří spolu se SF s vázanými aminopropylými zbytky do první, tedy nejstarší generace SF pro použití v HILIC³⁵. Již dříve byly tyto SF velmi často používány³⁶ a i v současnosti se používají pro různé aplikace²⁶.

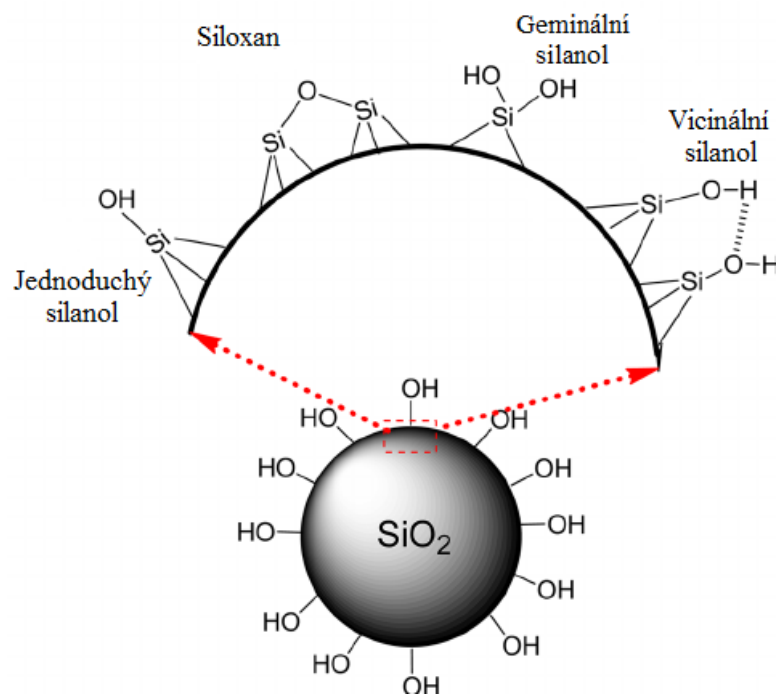
Existuje více druhů čistě silikagelových SF, které se liší retenčními vlastnostmi, účinností a selektivitou, což může být zapříčiněno různou čistotou silikagelového materiálu z důvodu odlišné technologie přípravy. Mnoho výrobců vyvinulo silikagelové kolony (Atlantis HILIC, Zorbax HILIC plus) prvotně určené pro použití v HILIC, které jsou uchovávány ve vodně-organických rozpouštědlech např. ve směsi vody a ACN³⁷.

Čistě silikagelové SF můžeme rozdělit do tří základních skupin: první z nich, silikagel typu A, je původní univerzální chromatografický materiál, získaný vysrážením alkalických křemičitanů z roztoku. Obvykle je silně kontaminován kovy, a proto tedy není vhodný pro použití v HILIC. Sférické částice oxidu křemičitého v silikagelu typu B vznikají agregací solí tohoto křemičitanu na vzduchu, a tudíž obsahují jen velmi malé množství kovových příměsí. Silikagel typu C se vyznačuje tím, že má velkou část povrchových Si-OH skupin nahrazenou skupinami Si-H (Obr. 3)²⁶.



Obr. 3: Odlišnost silikagelu typu C (B) oproti běžným silikagelovým SF (A)³⁸

Na povrchu nederivatizovaných silikagelových SF se nachází siloxanové a silanolové funkční skupiny (Obr. 4) a nepatrné množství kovů. Tyto funkční skupiny mohou být na povrchu SF přítomny v jednoduché, geminální (v případě navázání dvou skupin -OH na stejný atom) nebo vicinální formě (v případě navázání dvou skupin -OH na dva sousedící atomy). Každý z typů silanolových skupin má odlišnou reaktivitu a adsorpční aktivitu³⁹.



Obr. 4: Schéma uspořádání funkčních skupin na povrchu silikagelové SF⁴⁰

Čistě silikagelové SF mající na svém povrchu pouze jednoduché silanoly vykazují menší schopnost adsorpce vody na svém povrchu než SF složené z diolových nebo hydroxylových skupin vázaných na silikagelovém nosiči. Na druhou stranu SF se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin mají menší schopnost vytvoření vodné vrstvy na povrchu SF než běžné silikagelové SF. Z toho důvodu se u nich může více uplatňovat adsorpce v rámci retenčního mechanismu, než u SF s širší vodnou vrstvou, u kterých převládá rozdělování⁴¹.

3.2.1.1 Kolona Spherisorb® Silica

Tato kolona obsahuje silikagel typu B. Kvůli vysoké čistotě sférických částic silikagelu tohoto typu poskytuje kolona lepší separace zejména analytů zásaditého charakteru, než jaké vykazují kolony se silikagelovými SF jiného typu. Při vyšších hodnotách pH dochází k ionizaci silanolových skupin⁸.

Tato kolona je jedna z těch, které byly prvotně používány v NPLC módu. Je doporučeno užívat ji v rozsahu pH 2-8, teplotním rozmezí 20-45 °C a tlak by neměl přesáhnout 4000-5000 psi⁴².

3.2.2 Amidové stacionární fáze

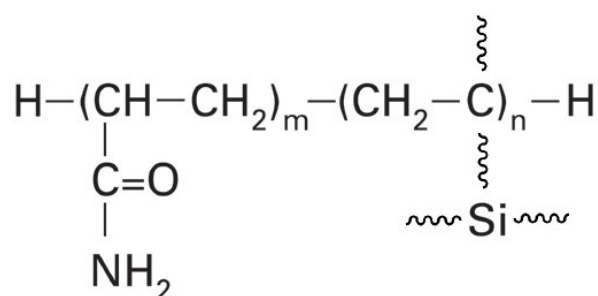
Amidové SF patří spolu s diolovými do skupiny SF druhé generace a jsou komerčně dostupné již od roku 1985. Primárně byly tyto SF určeny pro analýzu proteinů a peptidů³⁵. Vedle aminových, diolových a silikagelových SF jsou amidové jedny z nejpoužívanějších⁴³.

Tyto fáze jsou tvořeny karbamoylovými nebo amidovými skupinami navázanými na povrch silikagelového nosiče pomocí krátkých alkylových řetězců¹³. Jelikož funkční skupiny na jejich povrchu nemohou být nabitě v rozmezí pH typického pro MF používané v HILIC módu, jedná se o neutrální SF³⁷.

Na rozdíl od amino- funkčních skupin nemají amidové skupiny bazický charakter a jsou méně reaktivní. Z tohoto důvodu není retenční ionizovaných analytů ovlivněna iontově výměnnými interakcemi s amidovými skupinami⁴⁴ a zároveň ani změna pH eluentu nemá tak velký vliv jako u aminových SF²⁵. Retenční bazických sloučenin vykazují nižší závislost na pH MF než je tomu u čistě silikagelových SF, naopak u analytů kyselého charakteru je tato závislost silnější³⁵. Ireverzibilní adsorpce analytu je méně pravděpodobná než u aminových SF, což zajišťuje lepší stabilitu kolony v průběhu delšího časového období. Metoda HILIC ve spojení s amidovými kolonami je vhodná např. pro separace hydrofilních a amfifilních polymerů tj. oligosacharidů, glykoproteinů apod²⁶. Pro separace derivátů oligosacharidů vykazují amidové SF lepší selektivitu ve srovnání s čistě silikagelovými SF³³.

3.2.2.1 Kolona TSKgel Amide-80

TSKgel Amide-80 je jedna z neznámějších amidových kolon (Obr. 5). Vykazuje extrémně hydrofilní vlastnosti a neutrální sloučeniny jsou na ní zadržovány mnohem silněji než na jiných nenabitých i nabitých SF. Elektrostatické interakce se nepodílejí na retenčním mechanismu. Funkční skupiny této SF mohou fungovat jako donor i akceptor v rámci vodíkové vazby¹³.



Obr. 5: Struktura SF kolony TSKgel Amide-80⁴⁵

SF se skládá z neionizovaných karbamoylových skupin kovalentně vázaných na sférické silikagelové částice. Vysokou stabilitu kolony potvrzuje nepatrný rozdíl v první a poslední analýze z tisíce nástřiků vzorku, přičemž účinnost kolony (počet teoretických pater kolony) se sníží pouze o 5 %⁴⁵.

Dlouhá použitelnost kolony, chemická stabilita a vynikající reprodukovatelnost výsledků jsou hlavními přednostmi této kolony⁴⁵.

3.2.3 Cyklofruktanové stacionární fáze

Cyklofruktany patří do relativně malé skupiny makrocyclických oligosacharidů, jejichž známějším zástupcem jsou cyklodextriny, které se však od cyklofruktanů odlišují jak strukturou, tak i vlastnostmi.

Molekuly cyklofruktanů se skládají z 6 a více β -(2 \rightarrow 1) D-fruktofuranosových jednotek vzájemně propojených vazbami. Tyto sloučeniny bývají běžně označovány zkratkami CF6, CF7, CF8 atd. dle počtu fruktofuranosových jednotek tvořících makrocyclický kruh⁴⁶. Každá jednotka obsahuje jednu primární a dvě sekundární hydroxylové skupiny, které jsou zodpovědné za hydrofilní charakter molekuly⁴⁷. Kvůli této unikátní struktuře lze cyklofruktany považovat za vhodné selektory pro HILIC³².

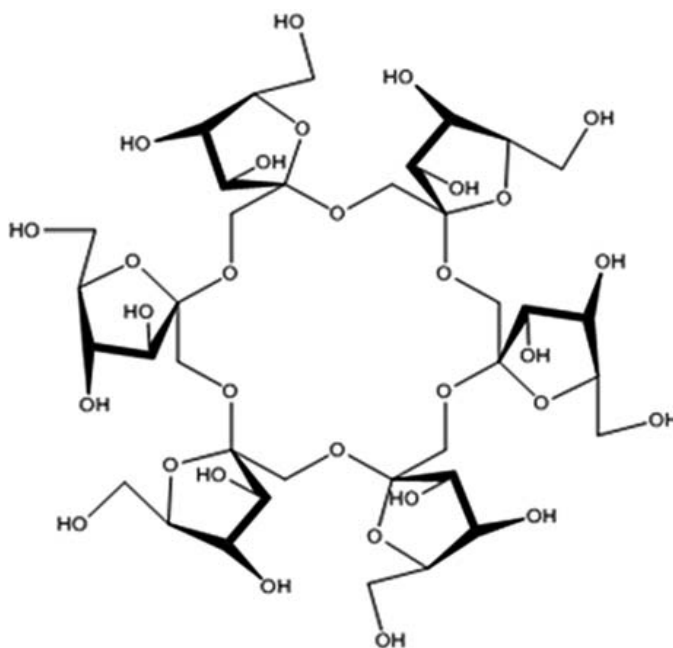
Derivatizací hydroxylových skupin cyklofruktanů vznikají další SF, které lze použít pro HILIC. Mezi tyto fáze patří např. isopropylový derivát cyklofruktanu 6 nebo sulfatovaný cyklofruktan 6^{12,48}.

Jelikož každá fruktofuranosová jednotka obsahuje také 4 stereogenní centra, používají se cyklofruktanové SF i pro enantioseparace⁴⁶. Nativní cyklofruktany mají nízkou enantioselektivitu, ale vykazují mimořádnou selektivitu pro separace achirálních analytů v HILIC módu⁴⁹.

3.2.3.1 Kolona Frulic-N

SF kolony Frulic-N se skládá z nativního cyklofruktanu 6 (CF6), který obsahuje ve své molekule crown-etherové jádro (Obr. 6). Tento selektor je vázán na silikagelový nosič. Vnitřní průměr kavity CF6 je 2,30 Å, což usnadňuje komplexaci s amonnými kationty o velikosti 1,75 Å. Nativní cyklofruktan 6 je neutrální molekula, která může komplexovat např. s amonnými ionty obsaženými v MF za vzniku pozitivně nabitě SF⁴⁹.

V současnosti je tato kolona komerčně dostupná a představuje nadějně možnosti v separaci nukleotidů a terapeutických peptidů³².



Obr. 6: Struktura cyklofruktanu 6⁵⁰

3.3 Cytostatika

Cytostatika lze popsat jako cytotoxické látky, které různými mechanismy zpomalují růst nádorových buněk nebo vyvolávají apoptózu, tedy řízenou smrt buňky. Nádorové buňky se vyznačují nekontrolovanou proliferací, tedy hyperplazií, a ztrátou buněčné regulace, tedy anaplazií. Tyto buňky vytváří sekundární nádory nazývané metastáze. Obvykle prorůstají i do zdravých tkání. Tento proces se nazývá invazivita⁵¹.

Cytostatika přednostně poškozují rychle se dělící maligní buňky. U většiny fyziologických tkání člověka probíhá dělení buněk pomaleji, a proto nejsou poškozeny cytostatikami. Bohužel cytostatika nepůsobí ani na maligní tumory složené z pomalu se dělících buněk. Naopak i některé fyziologické tkáně člověka (např. kostní dřeň, gastrointestinální epitelie, vlasové folikuly) se vyznačují rychlým buněčným dělením, na které cytostatika působí a vyvolávají tak nežádoucí účinky léčby. Mezi nežádoucí účinky patří vypadávání vlasů v důsledku poškození vlasových folikul, poruchy trávicího ústrojí způsobené nedostatečným nahrazováním epitelových buněk, oslabení imunitního systému, nedostatek krevních destiček a erytrocytů z důvodu útlumu kostní dřeně, neplodnost u mužů následkem útlumu spermatogeneze a mnoho dalších⁵².

Existuje několik mechanismů účinku cytostatik. Cytostatika náležící do skupiny antimetabolitů inhibují biosyntézu nukleových kyselin. Do této skupiny patří analogy kyseliny listové (metotrexát), analogy purinů (adeninový analog 6-merkaptopurin), analogy pyrimidinů (fluorouracil) a inhibitory ribonukleotidreduktasy (hydroxymocovina). Jako alkylační a interkalační látky označujeme cytostatika poškozující strukturu a funkci již přítomných nukleových kyselin. Antimitotika způsobují poškození mikrotubulů, a tím zabraňují buněčnému dělení. Některá cytostatika mohou mechanismy účinků kombinovat^{51,53}.

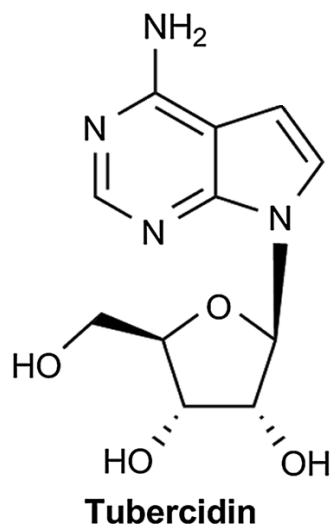
Antimetabolity jsou nejpoužívanějšími cytostatickými sloučeninami a jejich struktura má polární charakter⁵⁴.

3.3.1 Potenciálně cytostaticky aktivní sloučeniny

Purinové nukleosidy a jejich analogy patří do velmi důležité skupiny biologicky aktivních sloučenin, které v posledních desetiletích budily velký zájem kvůli zkoumání jejich antivirových a protinádorových účinků. Mnoho aktivních sloučenin z této skupiny je již používaných k léčbě virových infekcí (HIV) nebo hepatitidy typu B. Řada derivátů purinu (např. fludarabin, klofarabin) a dalších nukleosidů se využívá jako terapeutika různých hematologických poruch. I přes již uskutečněné studie modifikovaných purinových nukleosidů, zůstává prostor pro vývoj nových analogů. Stále se hledají nová cytostatika k léčbě tumorů rezistentních k dosud používaným preparátům a antivirotika účinná proti infekcím RNA virů, zejména viru hepatitidy typu C⁵⁵.

Nukleosidová cytostatika jsou klinicky používána k léčbě tkáňových nebo hematologických nádorů. Nedávno byly objeveny dva nové typy nukleosidových cytostatik: 6-hetaryl-7-deazapurinribonukleosidy a 7-hetaryl-7-deazaadenosiny. Oba typy sloučenin vykazují nanomolární cytostatickou aktivitu vůči leukemickým a nádorovým buňkám, přičemž největší cytostatickou aktivitou disponují sloučeniny substituované furylovou nebo thienylovou skupinou na pozici 6 nebo 7 molekuly 7-deazapurinu⁵⁶.

7-deazaadenosin, také nazýván tubercidin (Obr. 7), je přírodní cytostatické antibiotikum. Mnoho derivátů této sloučeniny substituovaných na pozici 7 vykazuje významnou cytotoxickou, antiparazitickou a antivirotickou aktivitu, ve většině případů prostřednictvím inhibice adenosinkinasy⁴.

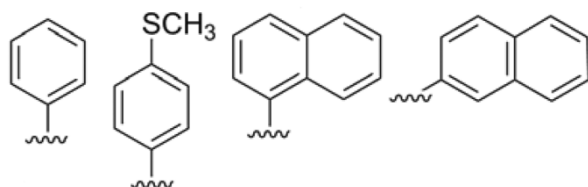


Obr. 7: Struktura 7-deazaadenosinu⁵⁷

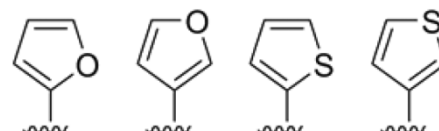
Všechny analyty použité v této diplomové práci jsou odvozeny od 7-deazaadenosinu.

Cytotoxicita použitých analytů silně závisí na velikosti substituentu na pozici 7. Většina derivátů 7-deazaadenosinu substituovaných malým, pětičlenným kruhem, má silné cytostatické až cytotoxické účinky⁵⁸.

Směsi analytů ve skupině 1 (SK1) a také ve skupině 3 (SK3) obsahovaly 4 analyty přímo odvozené od tubercidinu, odlišujících se pouze substituenty v poloze 7 (Obr. 8, Obr. 9).



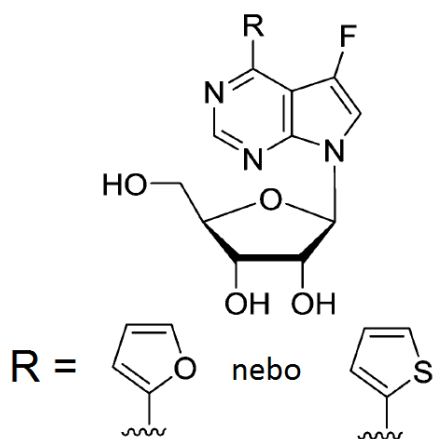
Obr. 8: Substituenty analytů v SK1⁵⁸



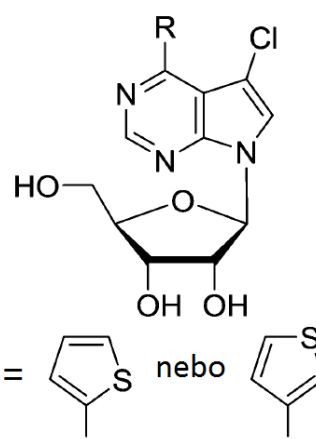
Obr. 9: Substituenty analytů v SK3⁵⁸

Analyty ze skupiny SK1 vykazují minimální nebo žádnou cytostatickou aktivitu vůči nádorovým buňkám plic, prostaty, tlustého střeva a prsu. Na rozdíl od SK1, analyty ze skupiny SK3 obsahující ve své struktuře pětičlenný heterocyklický zbytek vázaný v pozici 7 vykazují potenciální cytostatický efekt již v nanomolárních koncentracích srovnatelný s tubercidinem a lepší než jaký je pozorován u klofarabinu. Obě skupiny lze řadit k slabým inhibitorům lidské adenosinkinasy⁴. Nejslibnějším analytem ze skupiny SK3 se zdá být 7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin, který nejen že působí cytostaticky při nanomolárních koncentracích, ale zároveň vykazuje pouze mírnou mikromolární aktivitu vůči normálním lidským fibroblastům⁵⁷.

Společným znakem 4 analytů skupiny 2 (SK2) je struktura 6-hetaryl-7-deazaadenosinu halogenovaného v pozici 7. U dvou analytů je halogenem atom fluoru (Obr. 10), u dalších dvou atom chloru (Obr. 11).



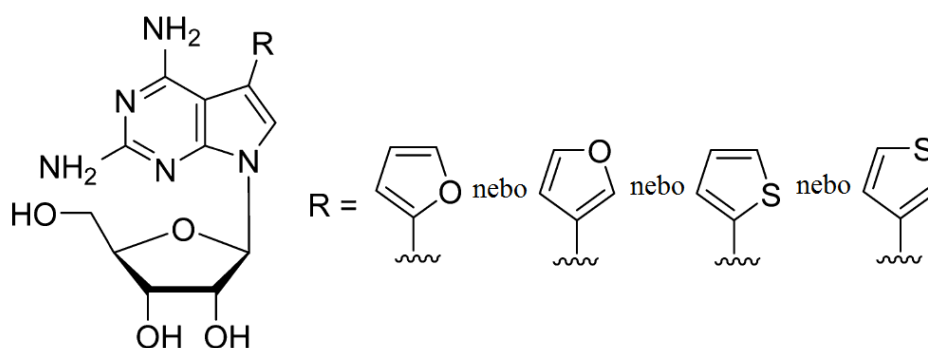
Obr. 10: Struktury F derivátů⁵⁹



Obr. 11: Struktury Cl derivátů⁵⁹

Obě fluorované sloučeniny vykazují stejnou cytostatickou účinnost jako jejich analogy bez substituce na pozici 7. Tyto fluorované deriváty mají tendenci být cytostaticky aktivnější než chlorované sloučeniny. Z důvodu cytostatického efektu těchto sloučenin při nízkých, nanomolárních koncentracích lze uvažovat potenciální srovnatelnost s již používaným klofarabinem. 6-furyl- a 6-thienyl- substituované deriváty jsou jedny z cytostaticky nejaktivnějších derivátů 7-dezaadenosinu⁵⁵.

Všechny 4 analyty poslední separované směsi, skupiny 4 (SK4), se strukturou podobají analytům SK1 a SK3, mají ovšem navíc jednu amino- skupinu na pozici 2 (Obr. 12). Substituenty na pozici 7 se shodují s těmi, které se vyskytují u analytů ze skupiny SK3.



Obr. 12: Struktury analytů SK4⁶⁰

Na rozdíl od analytů ze skupiny SK3, které obsahují pětičlenný heterocyklický kruh a vykazují podobné účinky, dominuje mezi analyty ze skupiny SK4 derivát se substituentem 2-furyl na pozici 7. Ostatní analyty této skupiny postrádají významnější cytotoxický účinek⁶⁰.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf:

Pumpa: Waters 1525 Binary HPLC pump (Milford, USA)

Detektor: Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Milford, USA)

Autosampler: Waters 717_{plus} Autosampler (Milford, USA)

Software: Empower 3

Použité kolony:

WATERS SPHERISORB® SILICA SUPELCO, Waters, Milford, USA (čistě silikagelová SF), 250×4,6 mm, velikost částic 5 μ m

TSKGEL AMIDE-80, Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany (SF – karbamoylové skupiny navázané na silikagelovém nosiči), 250×4,6 mm, velikost částic 5 μ m

FRULIC-N, Azyp, Arlington, USA (SF – cyklofruktan 6 navázaný na silikagelový nosič), 250×4,6 mm, velikost částic 5 μ m

Váhy: METTLER AE 240, Greifensee, Švýcarsko

pH-metr: PHM240 pH/ION METER, MeterLab®, Radiometer analytical, SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

Software: ChemSketch; PeakMaster 5.1; Origin 6.1

4.2 Použité chemikálie

ACN: Acetonitrile, CHROMASOLV®, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Deionizovaná voda: deionizovaná voda byla upravena pomocí zařízení Rowapur 100 a Ultrapur pro přípravu ultračisté vody deionizací (Watrex, Praha, ČR)

Octan amonný: Ammonium acetate, $\geq 99,0 \%$, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Kyselina octová: Acetic acid, ReagentPlus[®], $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

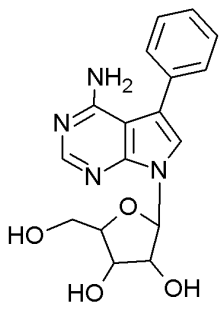
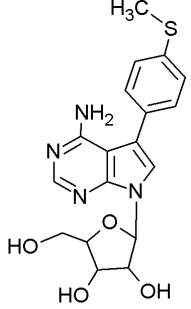
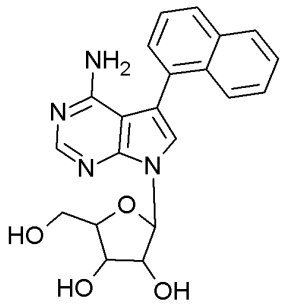
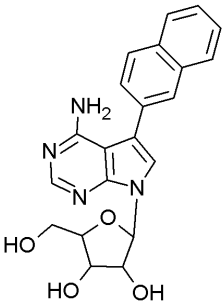
Amoniak: Ammonium hydroxide solution, 28,0–30,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Toluen: Toluene, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

DMSO: Dimethyl sulfoxide, 99,9%, A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

4.3 Vzorky

Vzorky byly rozděleny do 4 skupin v souvislosti s podobností jejich chemických struktur. Každá skupina obsahovala 4 vzorky. Odlišné části v názvu jednotlivých analytů jsou vyznačeny kurzívou.

SK1	
AB38t 	AB62 
AB47 	AB44 

AB38t: 7-*fenyl*-7-dezaadenosin

AB62: 7-(4-(*methylsulfanyl*)*fenyl*)-7-dezaadenosin

AB47: 7-(1-*naftyl*)-7-dezaadenosin

AB44: 7-(2-*naftyl*)-7-dezaadenosin

SK2	
PNH193	PNH192
PNH168	PNH259

PNH193: 7-fluor-6-(2-furyl)-7-deazaadenosin

PNH192: 7-fluor-6-(2-thienyl)-7-deazaadenosin

PNH168: 7-chlor-6-(2-thienyl)-7-deazaadenosin

PNH259: 7-chlor-6-(3-thienyl)-7-deazaadenosin

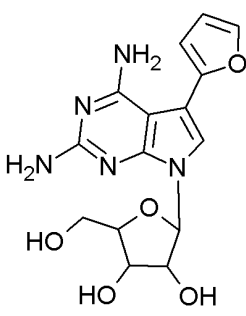
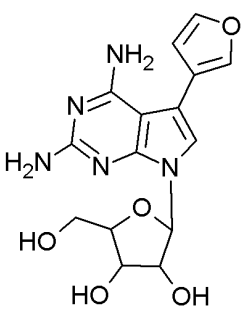
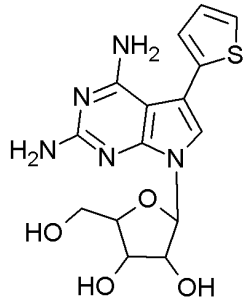
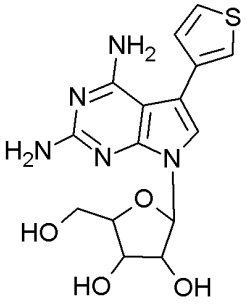
SK3	
AB43-2	AB58
AB61	AB59

AB43-2: 7-(2-furyl)-7-deazaadenosin

AB58: 7-(3-furyl)-7-deazaadenosin

AB61: 7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin

AB59: 7-(3-thienyl)-7-deazaadenosin

SK4	
PNH590	PNH592
	
PNH591	PNH593
	

PNH590: 7-(2-furyl)-2-amino-7-deazaadenosin

PNH592: 7-(3-furyl)-2-amino-7-deazaadenosin

PNH591: 7-(2-thienyl)-2-amino-7-deazaadenosin

PNH593: 7-(3-thienyl)-2-amino-7-deazaadenosin

Všechny vzorky byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR Mgr. et Mgr. Pavlou Perlíkovou, Ph.D. pod vedením Prof. Michala Hocka, Ph.D., DSc.

4.3.1 Příprava vzorků

Zásobní roztoky vzorků byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml ACN. Do roztoků vzorků, ve kterých se pevný vzorek nerozpustil beze zbytku, byl za průběžného míchání na vortexu opakovaně přidáván DMSO v množství 5 μ l až do úplného rozpuštění. Po získání

dat z několika prvních měření byly vzorky zředěny na poloviční koncentraci z důvodu příliš velké odezvy analytů. U několika vzorků (AB38t, AB62, AB61, AB59) byly odezvy i nadále příliš velké, a proto došlo ještě k dalšímu ředění v poměru 1:1 (v:v) s ACN. Roztoky směsí analytů byly připravovány ze zásobních roztoků jednotlivých vzorků v poměru 1:1:1:1 (v:v:v:v). Všechny roztoky vzorků byly přefiltrovány přes 0,2 μ m filtr pro maximální čistotu vzorků.

4.4 Příprava pufrů

Pro separaci analytů byly použity pufrы o pH 4,70 a 7,50 obsahující 10mM octan amonný a proměnné množství kyseliny octové či amoniaku. Následně byly připraveny pufrы o pH 7,50 o různé koncentraci amoniaku a octanu amonného, konkrétně 5mM, 20mM, 30mM a 50mM octan amonný.

Jednotlivé pufrы byly připravovány standardním způsobem: nejprve bylo naváženo příslušné množství octanu amonného, navážka byla poté kvantitativně převedena do 1000ml odměrné baňky a rozpuštěna v přibližně polovině objemu deionizované vody. Následně bylo přidáno vypočtené množství koncentrované kyseliny octové (v případě pufru o pH 4,70 viz Tab. 2) nebo 30% roztoku amoniaku (v případě pufru o pH 7,50 viz Tab. 3). Nakonec byla baňka doplněna deionizovanou vodou po rysku. Na výpočet koncentrací jednotlivých složek pufrů byl použit software PeakMaster 5.1. Použitím pH-metru bylo ověřeno správné pH připravovaných pufrů. Před použitím byly pufrы zfiltrовány přes 0,45 μ m filtry.

Tab. 2: Složení pufru o pH 4,70 a objemu 1l

Koncentrace CH ₃ COONH ₄ [mM]	Navážka CH ₃ COONH ₄ [g]	Objem CH ₃ COOH [ml]
10	0,7708	0,592

Tab. 3: Složení pufrů o pH 7,50 a objemu 1l

Koncentrace CH ₃ COONH ₄ [mM]	Navážka CH ₃ COONH ₄ [g]	Objem 30% roztoku NH ₄ OH [μ l]
5	0,3854	9,74
10	0,7708	18,80
20	1,5416	36,34
30	2,3124	51,90
50	3,8540	84,38

4.5 Podmínky separace

Kolona v chromatografickém systému byla termostatována na teplotu 25 °C. Tlak se pohyboval v rozmezí 800 – 1100 psi v závislosti na použité mobilní fázi a chromatografické koloně. Průtoková rychlost během všech měření byla 1 ml/min. Dávkovaný objem vzorků byl 5 µl. Použití duálního UV detektoru umožnilo zaznamenávat chromatogramy při vlnových délkách 210 a 280 nm.

4.6 Mobilní fáze

Mobilní fáze použité během měření v HILIC módu se nejprve skládaly z ACN a deionizované vody, která byla následně nahrazena vodnými pufry, v různých objemových poměrech.

4.6.1 Použité pufry

Octanový pufr: Pufr 1: pH = 4,70; 10mM octan amonný

Amonné pufry: Pufr 2: pH = 7,50; 5mM octan amonný

Pufr 3: pH = 7,50; 10mM octan amonný

Pufr 4: pH = 7,50; 20mM octan amonný

Pufr 5: pH = 7,50; 30mM octan amonný

Pufr 6: pH = 7,50; 50mM octan amonný

4.6.2 HILIC mód

Pro měření v HILIC módu byly použity všechny tři již zmíněné chromatografické kolony.

WATERS SPHERISORB® SILICA SUPELCO

Na koloně se SF na bázi čistého silikagelu byla nejprve použita MF složená z ACN a deionizované vody v poměrech 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10, 95/5 a 97/3 (v/v). Poté byla deionizovaná voda v MF s ACN nahrazena pufrem 1 v poměrech 80/20, 85/15, 90/10 a 95/5 (v/v). Pro následující měření byla použita MF skládající se z ACN a pufru 3 v poměrech 80/20, 85/15, 90/10, 95/5 a 97/3 (v/v).

Po měření s použitím MF složené z ACN s deionizovanou vodou v poměru 65/35 (v/v) byly kvůli příliš dlouhým retencím pro další poměry analyzovány pouze analyty SK2.

Při každém jednotlivém složení MF obsahující pufr byly proměřeny všechny vzorky, včetně DMSO v ACN jako složky přidávané do roztoku vzorků. Toluén byl použit jako marker mrtvého času (t_M).

TSKGEL AMIDE-80

Pro měření na koloně se SF na bázi amidových zbytků vázaných na silikagelovém nosiči byla nejprve použita MF složená z ACN a pufru 1 v poměrech 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10, 95/5 a 97/3 (v/v). Poté byl pro vytvoření MF použit ACN s pufrem 3 místo pufru 1 a proběhlo měření se stejnými objemovými poměry těchto dvou složek MF jako u předchozího pufru. Dále byly postupně použity MF obsahující ACN s pufrem 2, pufrem 4, pufrem 5 a pufrem 6 v poměru 95/5 (v/v).

V rámci každého složení MF byly proměřeny všechny vzorky, včetně DMSO v ACN. Toluén byl použit jako marker mrtvého času. U poměrů s vysokým podílem organické složky v MF (95/5 a 97/3 (v/v) s výjimkou ACN s pufrem 1 v poměru 97/3 (v/v)) byly měřeny i směsi analytů v rámci jednotlivých skupin.

FRULIC-N

Na koloně se SF na bázi cyklofruktanu byly proměřeny vzorky s použitím MF složené z ACN a pufru 1 v poměrech 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10, 95/5 a 97/3 (v/v). Následně probíhala stejná měření s použitím MF, ve které byl ACN smísen s pufrem 3. Dále byly také použity MF obsahující ACN s pufrem 2, pufrem 4, pufrem 5 a pufrem 6 v poměru 95/5 (v/v).

V rámci každého složení MF byly opět proměřeny všechny vzorky, včetně DMSO v ACN. Toluén byl použit jako marker mrtvého času. Také na této koloně byly měřeny i směsi analytů v rámci jednotlivých skupin u poměrů s vysokým podílem organické složky, tedy ACN/pufr 95/5 a 97/3 (v/v).

4.7 Použité vzorce a výpočty

Hodnoty rozlišení (R , rovnice 3), retenčního faktoru (k , rovnice 4) a separačního faktoru (α , rovnice 5) byly vypočteny v softwaru Empower dle následujících rovnic:

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{1/2} - w_{2/2}} \quad (3)$$

kde t_Rretenční čas

$w_{1/2}$šířka píku v polovině výšky

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4)$$

kde t_Mmrtvý čas

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (5)$$

kde k_1retenční faktor 1. eluujícího analytu

k_2retenční faktor 2. eluujícího analytu

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně Spherisorb® Silica

5.1.1 Popis mechanismu separace

V rámci optimalizace chromatografických podmínek byl studován i mechanismus separace v HILIC použitím rovnic 1 (popisující rozdělování) a 2 (popisující adsorpci). V případě čistě silikagelové SF byl pro tento účel použit 10mM octan amonný pH 7,5 (pufr 3) jako složka MF. Koeficienty determinace (R^2) rovnic popisujících uplatnění rozdělování (Tab. 4) jako součásti mechanismu separace v HILIC pro jednotlivé analyty s použitím pufru 3 se pohybovaly v rozmezí 0,940 – 0,997. Hodnoty R^2 rostly v řadě SK2<SK4<SK3<SK1.

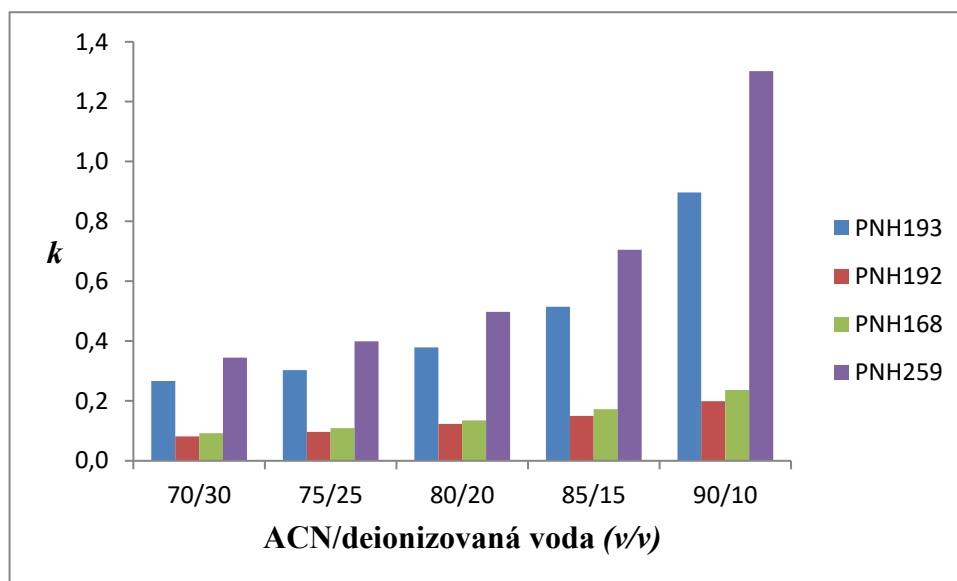
Lineární závislosti $\log k$ na $\log N_W$ sloužící pro popis adsorpce (Tab. 4) byly získány pro všechny analyty. Hodnoty R^2 byly v rozmezí 0,952 – 0,996. Nejvyšších hodnot R^2 bylo dosaženo pro analyty SK1 a SK4. Z těchto výsledků je patrné, že se v tomto separačním systému uplatňuje jak rozdělování mezi MF a vodnou vrstvou částečně sorbovanou na SF, tak i adsorpce analytů na SF.

Tab. 4: Rovnice závislostí popisujících rozdělování a adsorpci s použitím MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 v různých objemových poměrech s koeficienty determinace (R^2)

SK	VZ	Rozdělování				Adsorpce		
		R^2	Rovnice: $\log k = A\phi^2 + B\phi + C$			R^2	Rovnice: $y = bx + a$	
			A	B	úsek		b	a
1	AB38t	0,993	54,058	-18,979	1,324	0,989	-1,712	-1,037
	AB62	0,997	43,470	-17,045	1,218	0,994	-1,783	-1,147
	AB47	0,997	59,360	-20,589	1,363	0,985	-1,816	-1,158
	AB44	0,993	51,680	-19,352	1,339	0,996	-1,916	-1,237
2	PNH193	0,991	53,582	-17,100	0,913	0,954	-1,298	-0,973
	PNH192	0,940	42,290	-14,155	0,548	0,952	-1,196	-1,128
	PNH168	0,953	45,052	-15,115	0,626	0,959	-1,277	-1,165
	PNH259	0,957	43,218	-15,433	0,851	0,973	-1,441	-1,114
3	AB43-2	0,991	59,580	-19,635	1,323	0,973	-1,591	-0,941
	AB58	0,981	44,886	-16,662	1,229	0,992	-1,637	-0,974
	AB61	0,977	46,224	-16,960	1,170	0,988	-1,641	-1,047
	AB59	0,982	46,751	-17,240	1,246	0,991	-1,679	-1,019
4	PNH590	0,986	46,375	-15,969	1,068	0,985	-1,401	-0,878
	PNH592	0,978	41,220	-15,596	1,112	0,994	-1,576	-0,992
	PNH591	0,973	43,995	-15,952	1,031	0,988	-1,521	-1,031
	PNH593	0,979	43,642	-16,149	1,099	0,992	-1,583	-1,032

5.1.2 Použití mobilní fáze obsahující deionizovanou vodu

Nejprve byly pro separace testovány MF složené z ACN a deionizované vody. Počáteční složení MF bylo ACN/deionizovaná voda 65/35 (v/v). Vzhledem k dlouhým retencím většiny analytů při použití této MF byly dále měřeny pouze analyty SK2. S rostoucím obsahem ACN v MF se retence analytů této skupiny prodlužovaly (Obr. 13). Ve většině měřených poměrů těchto dvou složek MF byly retence analytů PNH193 a PNH259 téměř shodné. Stejně tomu bylo i u analytů PNH192 a PNH168.



Obr. 13: Závislost retenčních faktorů k analytů SK2 na složení MF na koloně Spherisorb® Silica

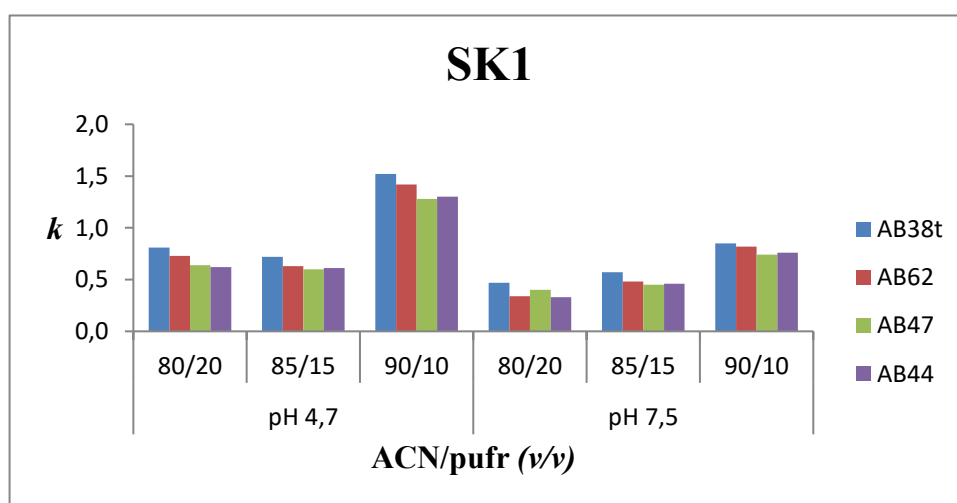
Vzhledem k podobným retencím dvojic analytů za použití MF ACN/deionizovaná voda byly dále testovány různé pufrů jako složky MF.

5.1.3 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi

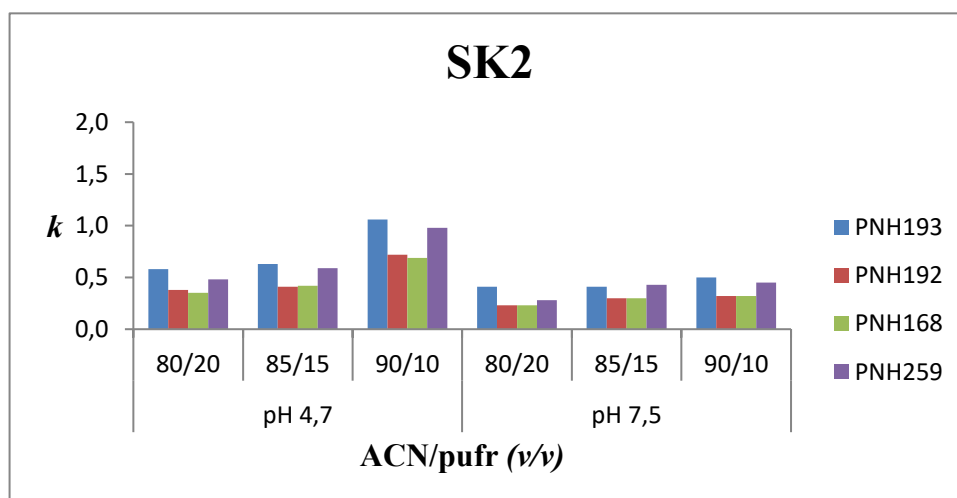
Nejprve byl testován 10mM octan amonný pH 4,70 (pufr 1) jako složka MF. Počáteční složení MF bylo ACN/pufr 1 80/20 (v/v). Při zvýšení obsahu ACN v MF s pufr 1 z poměru 80/20 na 85/15 (v/v) došlo k prodloužení retence u všech skupin analytů kromě SK1. Analyty SK1 vykazovaly téměř shodné retence v obou testovaných poměrech MF. S dalším zvyšováním obsahu ACN v MF se prodlužovaly retence všech analytů včetně analytů SK1. Při použití MF ACN/pufr 1 95/5 (v/v) se retence většiny analytů blížily k 60 min. Protože pufr 1 nebyl zcela vhodný pro separace analytů na koloně Spherisorb® Silica, byl následně zvolen pufr o vyšší hodnotě pH.

Použití MF složené z ACN a 10mM octanu amonného pH 7,5 (pufr 3) umožnilo pozorovat pozvolný nárůst retencí všech analytů se zvyšujícím se obsahem ACN v MF. K výraznému nárůstu retence došlo při změně poměru složek MF ACN/pufr 3 z 90/10 na 95/5 (v/v), kdy retenční faktor k všech analytů dosáhl dvojnásobné až trojnásobné hodnoty. Při použití MF ACN/pufr 3 95/5 (v/v) byly doby všech analýz do 13 min.

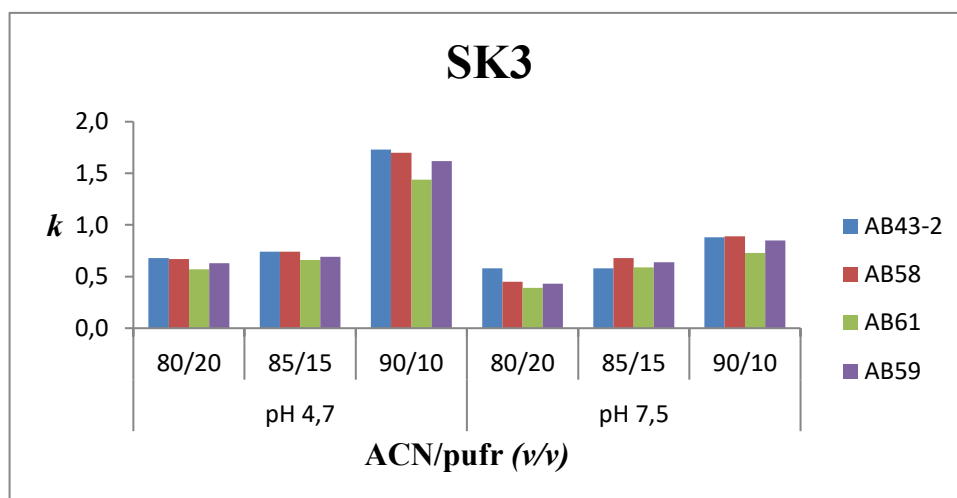
Použití MF obsahující pufr 3 zapříčinilo snížení retencí všech analytů oproti měřením s pufr 1 ve stejných poměrech obou složek MF (Obr. 14-17). Retence analytů v rámci jednotlivých skupin se za použití kterékoli z výše uvedených MF lišily jen málo, a proto nebyly měřeny směsi analytů.



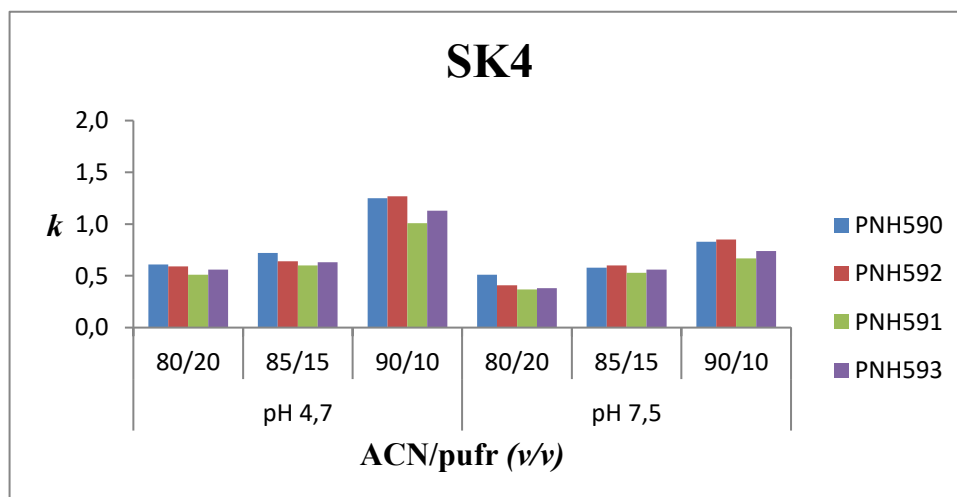
Obr. 14: Závislost retenčních faktorů k analytů SK1 na složení MF na koloně Spherisorb® Silica



Obr. 15: Závislost retenčních faktorů k analytů SK2 na složení MF na koloně Spherisorb® Silica



Obr. 16: Závislost retenčních faktorů k analytů SK3 na složení MF na koloně Spherisorb® Silica



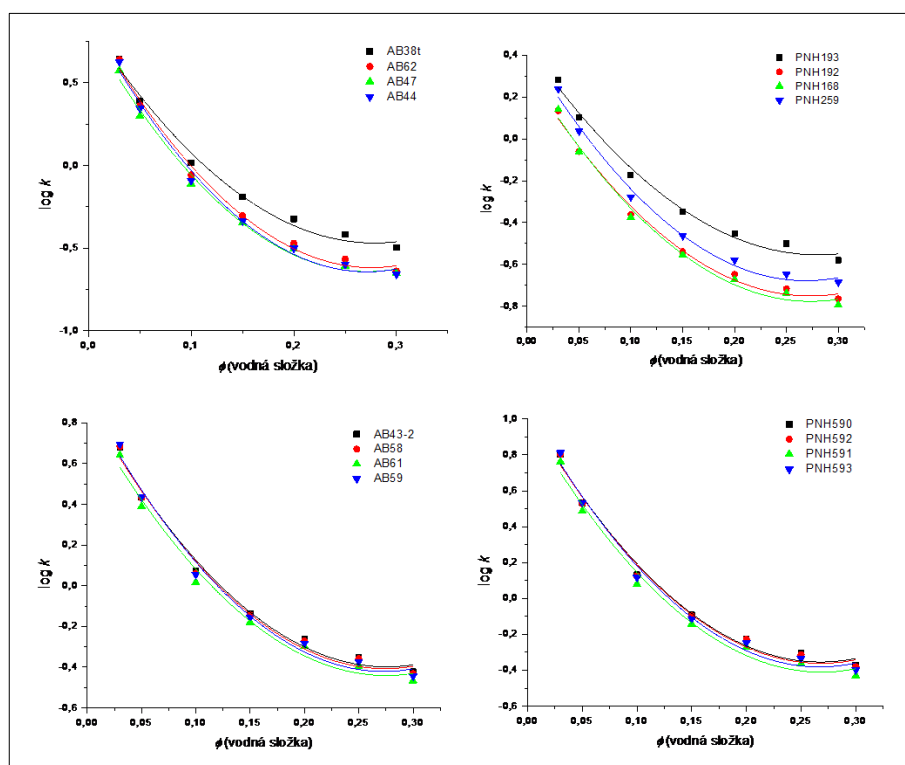
Obr. 17: Závislost retenčních faktorů k analytů SK4 na složení MF na koloně Spherisorb® Silica

Protože kolona Spherisorb® Silica neumožnila separovat analyty z jednotlivých skupin v žádné z testovaných MF a tvary píků byly velmi nesymetrické, byla následně vybrána kolona TSKgel Amide-80, která může poskytovat jiné možnosti interakcí než čistě silikagelová kolona.

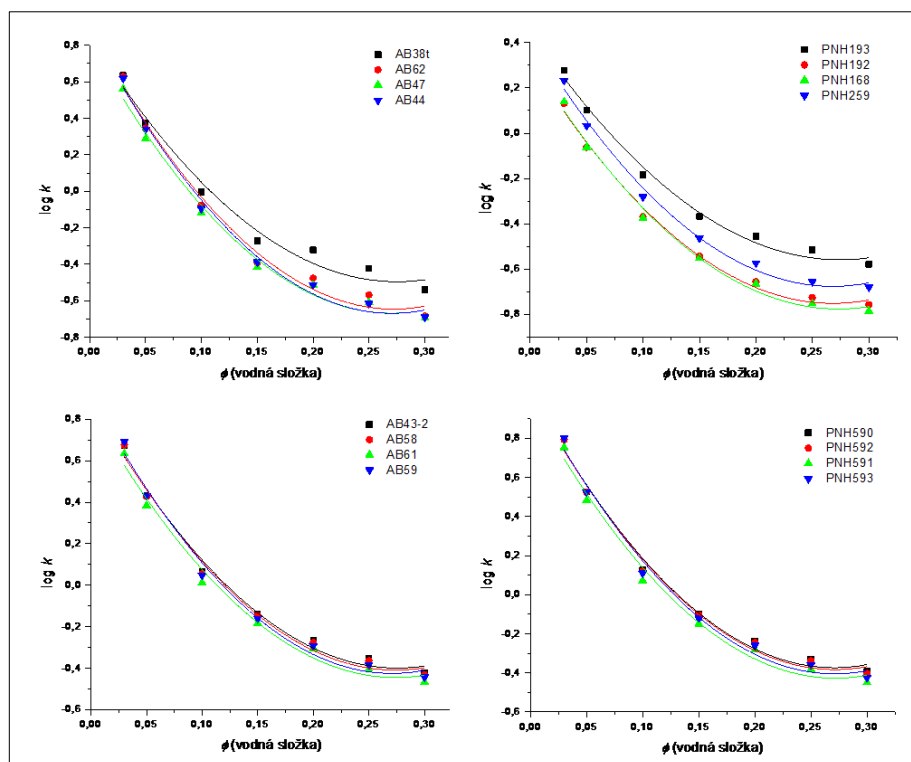
5.2 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně TSKgel Amide-80

5.2.1 Popis mechanismu separace

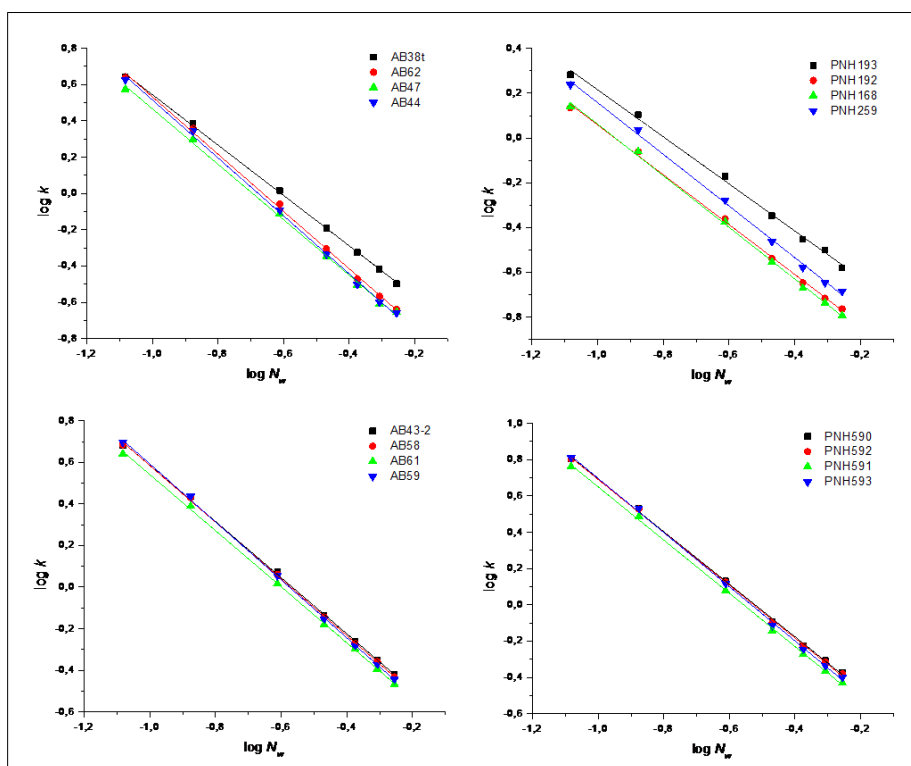
Pro popis mechanismu separace byly vybrány MF složené z ACN/pufry 1 a ACN/pufry 3 v různých objemových poměrech. U závislosti zhodnocujících rozdělování jako část mechanismu separace v HILIC bylo zaznamenáno úzké rozmezí R^2 pro všechny analyty v rámci měření s oběma pufry (tj. rozmezí 0,980-0,993). Toto zjištění potvrzuje teorii o uplatnění rozdělování při analýzách testovaných vzorků (Obr. 18, Obr. 19). Uplatnění adsorpce v mechanismu separace bylo potvrzeno vynesemím výše popsané závislosti popisující tento děj (Obr. 20, Obr. 21), přičemž rozmezí R^2 pro všechny analyty v rámci všech měření s použitím 10mM octanu amonného bylo ještě užší než u rozdělování a dosahovalo téměř hodnoty 1 (tj. rozmezí 0,995-1,000).



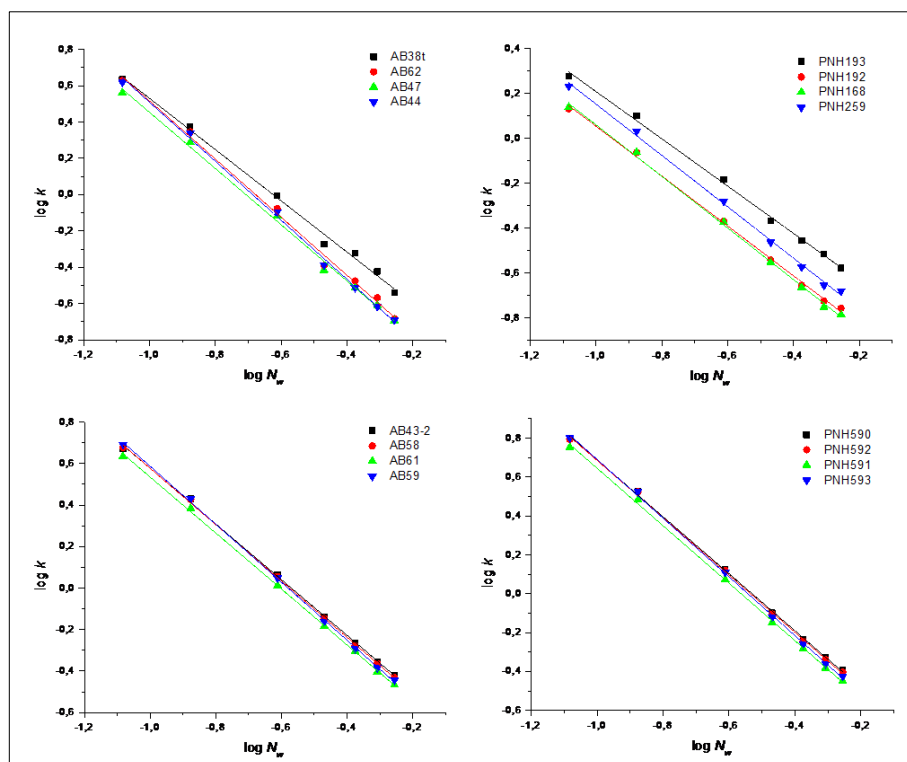
Obr. 18: Závislosti popisující rozdělování pro všechny analyty na koloně TSKgel Amide-80 při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 4,7 v různých objemových poměrech



Obr. 19: Závislosti popisující rozdělávání pro všechny analyty na koloně TSKgel Amide-80 při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 v různých objemových poměrech



Obr. 20: Závislosti popisující adsorpci pro všechny analyty na koloně TSKgel Amide-80 při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 4,7 v různých objemových poměrech

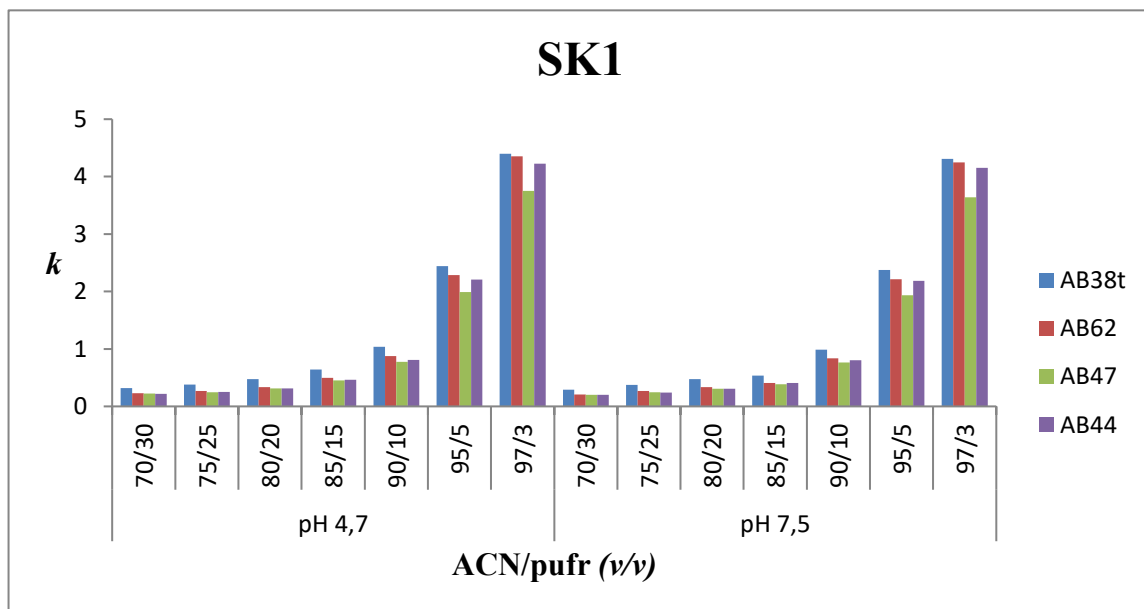


Obr. 21: Závislosti popisující adsorpci pro všechny analyty na koloně TSKgel Amide-80 při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 v různých objemových poměrech

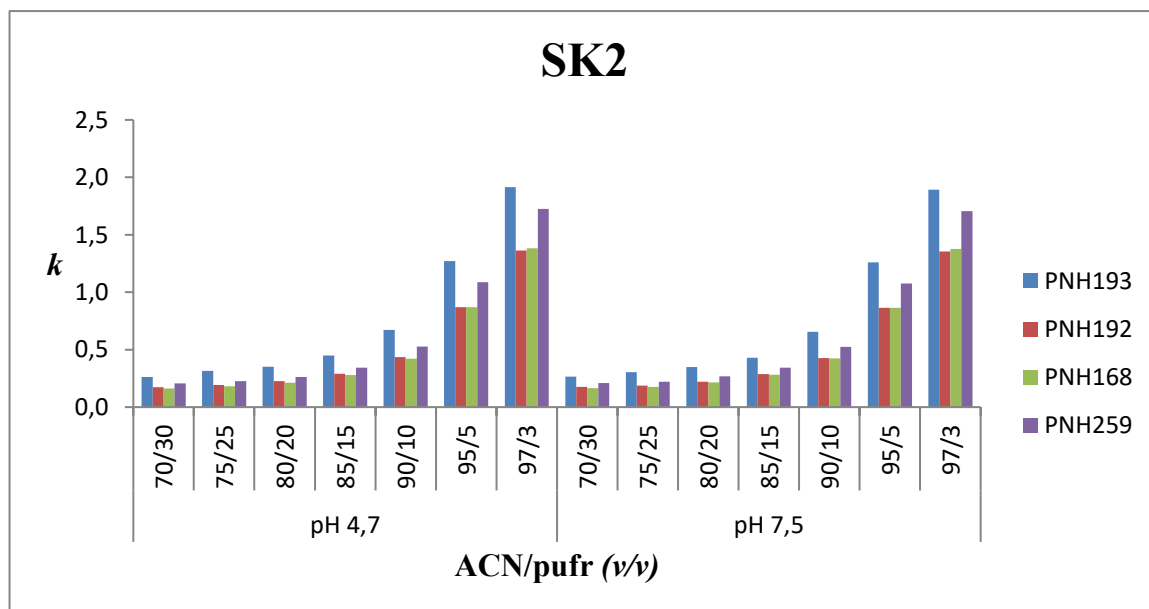
5.2.2 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi

U všech analytů bylo pozorováno kontinuální prodlužování retence se zvyšujícím se obsahem ACN v MF složené z ACN a 10mM octanu amonného bez ohledu na pH použitého pufru (Obr. 22-25). Při použití MF s vysokým obsahem ACN byly patrné větší rozdíly v retencích analytů v rámci jednotlivých skupin. Všechny analyty při měření s použitím MF ACN/pufr 3 95/5 (v/v) vykazovaly nepatrně kratší retence, než tomu bylo při měření s pufr 1. Eluční pořadí analytů bylo totožné u obou použitých pufrů. Nejkratší retenci z SK1 vykazoval analyt AB47, následovaly analyty AB44 a AB62 s téměř totožným retenčním časem. Jako poslední z této skupiny eluoval analyt AB38t. V SK2 spolu koeluovaly v prvním píku analyty PNH192 a PNH168, dále eluoval analyt PNH259 a jako poslední PNH193. V rámci SK3 se retenčně odlišoval pouze analyt AB61, zbylé tři analyty vykazovaly velmi podobné retence. Podobně tomu bylo i u SK4, kdy jako první eluoval analyt PNH591 a ostatní analyty koeluovaly v druhém píku. Z výsledků měření směsí analytů byl vybrán nejvhodnější poměr obou složek MF ACN/pufr 95/5 (v/v) a pH použitého pufru 7,5 (Tab. 5) vykazující lepší rozlišení pro následnou optimalizaci. Za těchto podmínek byl testován vliv koncentrace pufru na separaci analytů. Při použití pufru o nižším pH za stejného poměru

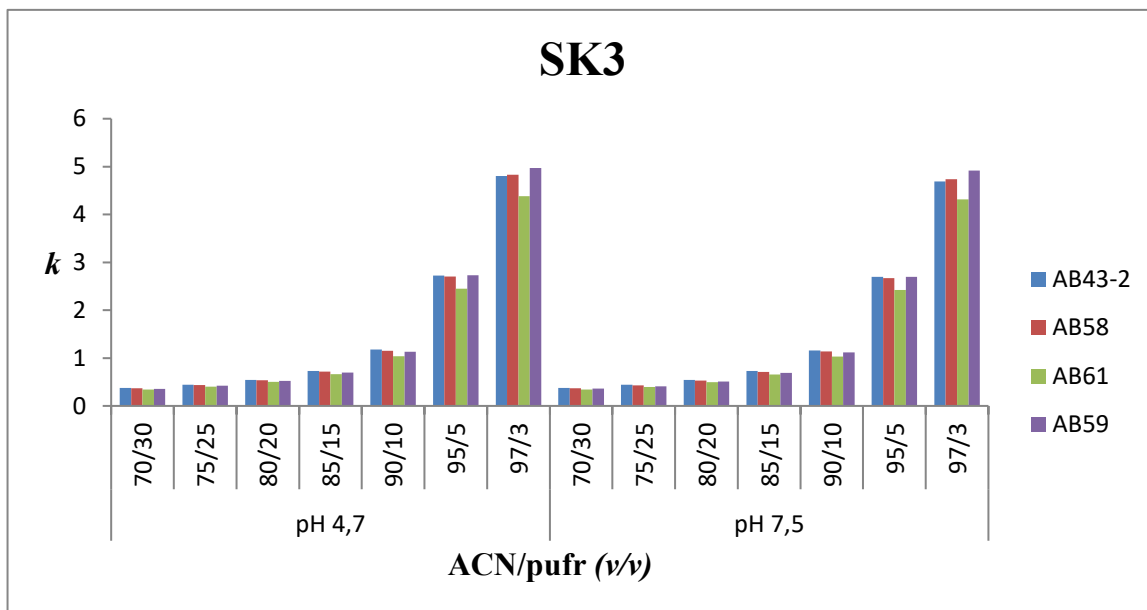
složek MF bylo zaznamenáno horší rozlišení u směsi analytů SK2, u které byl s použitím pufru o vyšší hodnotě pH zjištěn potenciál k separaci alespoň do 3 píků až na základní linii.



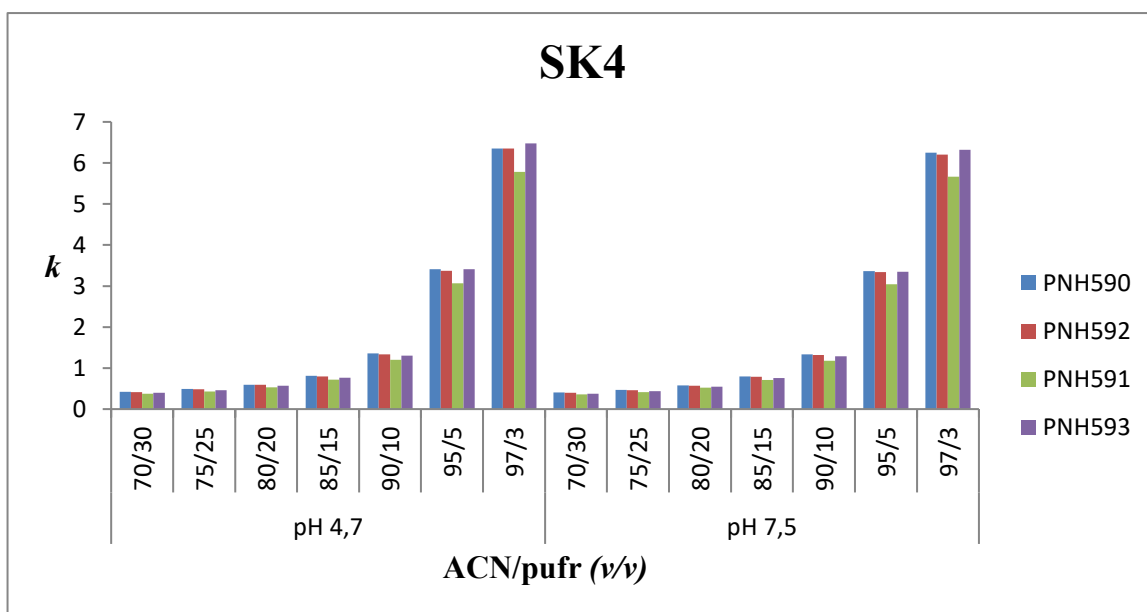
Obr. 22: Závislost retenčních faktorů k analytů SK1 na složení MF na koloně TSKgel Amide-80



Obr. 23: Závislost retenčních faktorů k analytů SK2 na složení MF na koloně TSKgel Amide-80



Obr. 24: Závislost retenčních faktorů k analytů SK3 na složení MF na koloně TSKgel Amide-80



Obr. 25: Závislost retenčních faktorů k analytů SK4 na složení MF na koloně TSKgel Amide-80

Tab. 5: Vliv pH pufru v MF ACN/10mM octan amonný 95/5 (v/v) na retenční faktory (k_1, k_2, k_3), rozlišení (R_1, R_2) a separační faktory (α_1, α_2) analytů na koloně TSKgel Amide-80

pH pufru	SK	k_1	k_2	k_3	R_1	R_2	α_1	α_2
4,7 (pufr 1)	1	1,95	2,22	2,39	1,11	0,56	1,14	1,08
	2	0,87	1,09	1,29	1,93	1,42	1,25	1,18
	3	2,45	2,72	-	1,04	-	1,11	-
	4	3,07	3,40	-	1,12	-	1,11	-
7,5 (pufr 3)	1	1,93	2,18	2,35	1,12	0,47	1,13	1,08
	2	0,86	1,08	1,26	2,02	1,45	1,25	1,17
	3	2,42	2,68	-	1,08	-	1,11	-
	4	3,04	3,35	-	1,10	-	1,10	-

SK1: k_1 : AB47; k_2 : AB44+AB62; k_3 : AB38t

SK2: k_1 : PNH192+PNH168; k_2 : PNH259; k_3 : PNH193

SK3: k_1 : AB61; k_2 : AB58+AB43-2+AB59

SK4: k_1 : PNH591; k_2 : PNH592+PNH593+PNH590

5.2.3 Vliv koncentrace pufru o pH 7,5 na separaci skupin analytů

V rámci testování vlivu koncentrace pufru o pH 7,5 na separaci byly testovány tyto koncentrace octanu amonného: 5, 10, 20, 30 a 50 mM. Retence všech analytů SK1, SK3 a SK4 se postupně zkracovaly se vzrůstající koncentrací octanu amonného v pufru MF, retence analytů SK2 se téměř neměnily.

Snížení, ani zvýšení koncentrace pufru nezpůsobilo změnu v elučním pořadí analytů v rámci skupin. Nejkratší retenci z SK1 i nadále vykazoval analyt AB47, v druhém píku spolu koeluovaly analyty AB44 a AB62 následovaný analytem AB38t. Ze směsi analytů SK2 spolu v prvním píku koeluovaly PNH192 a PNH168, dále eluoval analyt PNH259 následován analytem PNH193. První pík SK3 představoval pouze analyt AB61, ostatní analyty této skupiny eluovaly v druhém píku. Podobné chování vykazovaly analyty SK4, kdy první eluoval analyt PNH591 a ostatní analyty této skupiny koeluovaly v druhém píku.

Snížení koncentrace octanu amonného v použitém pufru z 10 na 5 mM způsobilo u většiny směsí zhoršení rozlišení (Tab. 6). Nepatrné zlepšení rozlišení bylo pozorováno u SK4, ale i přesto docházelo pouze k částečné separaci do 2 píků. S postupným zvyšováním koncentrace v rozmezí od 10 do 50 mM bylo zaznamenáno pouze velmi pozvolné zlepšení rozlišení SK1 (Obr. 26).

Tab. 6: Vliv koncentrace pufru v MF ACN/pufr pH 7,5 95/5 (v/v) na retenční faktory (k_1, k_2, k_3), rozlišení (R_1, R_2) a separační faktory (α_1, α_2) analytů na koloně TSKgel Amide-80

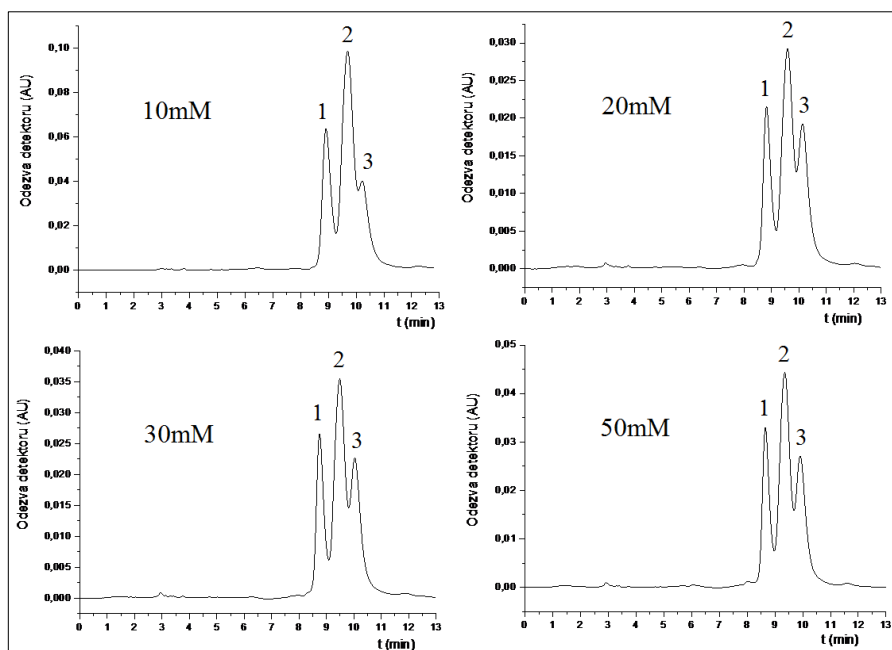
Koncentrace CH ₃ COONH ₄ [mM]	SK	k_1	k_2	k_3	R_1	R_2	α_1	α_2
5 (pufr 2)	1	1,96	2,23	2,41	1,10	0,57	1,14	1,08
	2	0,88	1,10	1,29	1,95	1,35	1,26	1,17
	3	2,46	2,73	-	1,04	-	1,11	-
	4	3,08	3,40	-	1,15	-	1,11	-
10 (pufr 3)	1	1,93	2,18	2,35	1,12	0,47	1,13	1,08
	2	0,86	1,08	1,26	2,02	1,45	1,25	1,17
	3	2,42	2,68	-	1,08	-	1,11	-
	4	3,04	3,35	-	1,10	-	1,10	-
20 (pufr 4)	1	1,93	2,19	2,37	1,14	0,65	1,13	1,08
	2	0,88	1,10	1,31	1,94	1,48	1,24	1,19
	3	2,43	2,70	-	1,09	-	1,11	-
	4	3,05	3,37	-	1,13	-	1,10	-
30 (pufr 5)	1	1,92	2,16	2,35	1,14	0,68	1,13	1,08
	2	0,89	1,10	1,31	1,94	1,52	1,23	1,19
	3	2,41	2,67	-	1,10	-	1,11	-
	4	3,05	3,36	-	1,14	-	1,10	-
50 (pufr 6)	1	1,88	2,12	2,30	1,16	0,75	1,12	1,09
	2	0,89	1,10	1,32	1,98	1,58	1,23	1,20
	3	2,38	2,63	-	1,13	-	1,11	-
	4	3,02	3,33	-	1,18	-	1,10	-

SK1: k_1 : AB47; k_2 : AB44+AB62; k_3 : AB38t

SK2: k_1 : PNH192+PNH168; k_2 : PNH259; k_3 : PNH193

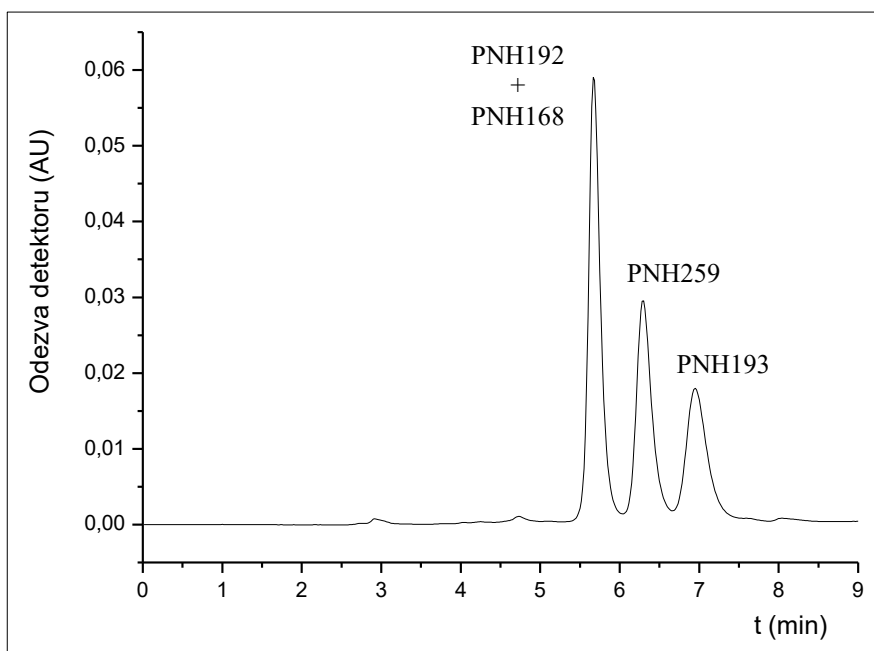
SK3: k_1 : AB61; k_2 : AB58+AB43-2+AB59

SK4: k_1 : PNH591; k_2 : PNH592+PNH593+PNH590



Obr. 26: Vliv koncentrace pufru pH 7,5 (octan amonný) na separaci analytů SK1 (1-AB47; 2-AB44+AB62; 3-AB38t)

S použitím 30mM a 50mM octanu amonného bylo u SK2 dosaženo separace až na základní linii, ovšem pouze do 3 píků. V prvním píku spolu eluovaly analyty lišící se pouze halogenovým substituentem na pozici 7 purinového kruhu (Obr. 27).



Obr. 27: Chromatogram separace analytů SK2 za použití MF ACN/50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), kolona TSKgel Amide-80, průtok 1 ml/min, UV detekce při vlnové délce (λ) 280 nm

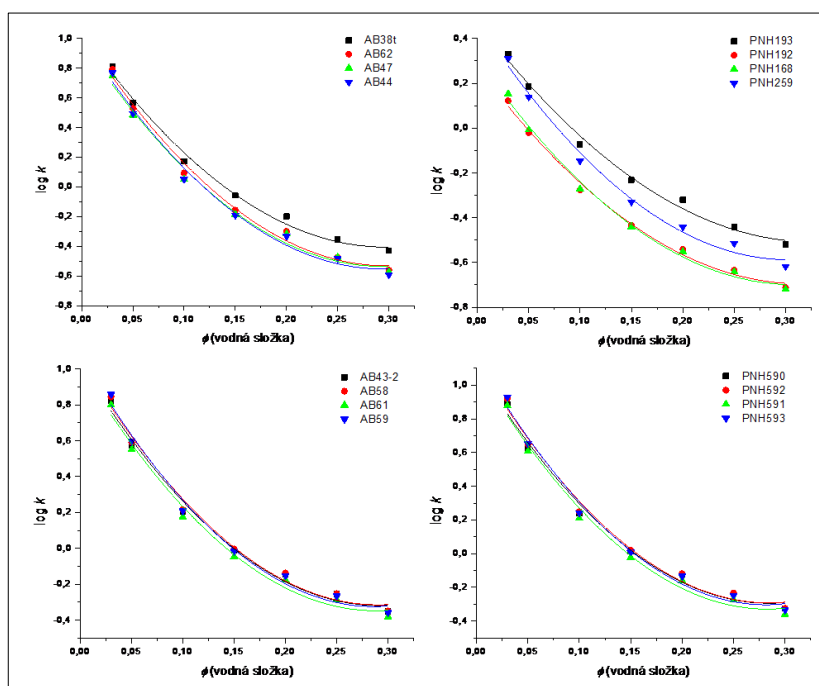
U SK3 a SK4 docházelo se zvyšující se koncentrací pufru od 10 do 50 mM rovněž k mírnému zlepšení rozlišení, stále však docházelo pouze k částečné separaci do 2 píků. Hodnoty rozlišení obou skupin analytů se za všech měření v rámci testování vlivu koncentrace pufru pohybovaly nad hodnotou 1.

Následně byla pro separace použita cyklofruktanová SF, která poskytuje další interakční možnosti.

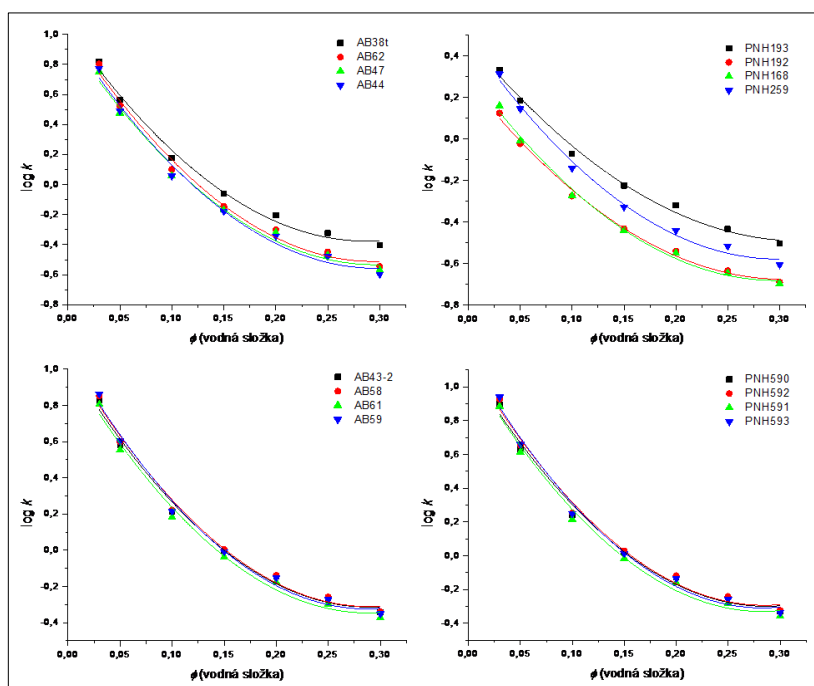
5.3 Separace derivatizovaných nukleosidů na koloně Frulic-N

5.3.1 Popis mechanismu separace

Pro popis mechanismu separace s použitím cyklofruktanové kolony byly použity MF složené z ACN/pufr 1 a ACN/pufr 3 v různých objemových poměrech. Nejvyšší hodnoty R^2 závislostí popisujících rozdělování (Obr. 28, Obr. 29) na koloně Frulic-N byly zaznamenány u analytů SK2 při použití obou pufrů. Celkově v rámci všech měření na této koloně byly hodnoty R^2 v rozmezí 0,989-0,996.

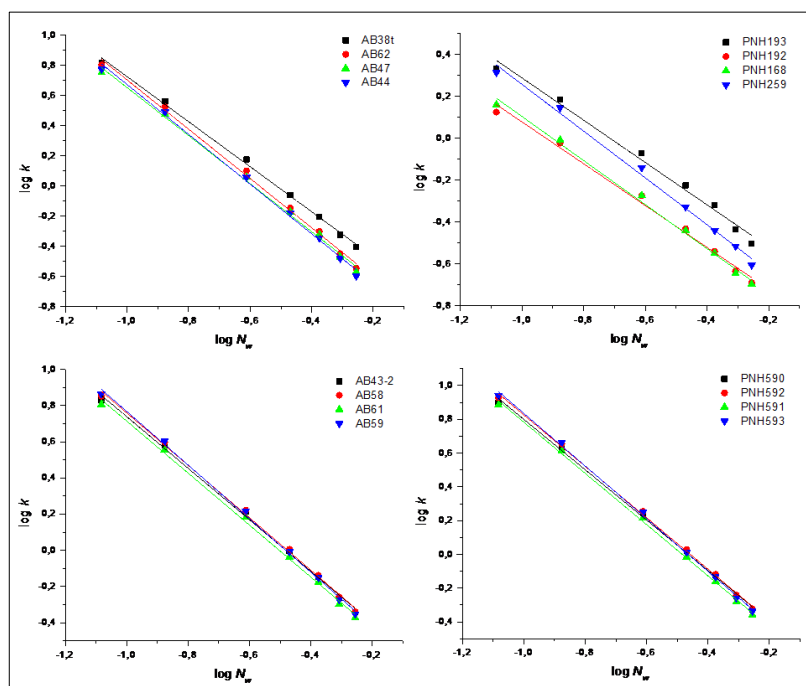


Obr. 28: Závislosti popisující rozdělování pro všechny analyty na koloně Frulic-N při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 4,7 v různých objemových poměrech

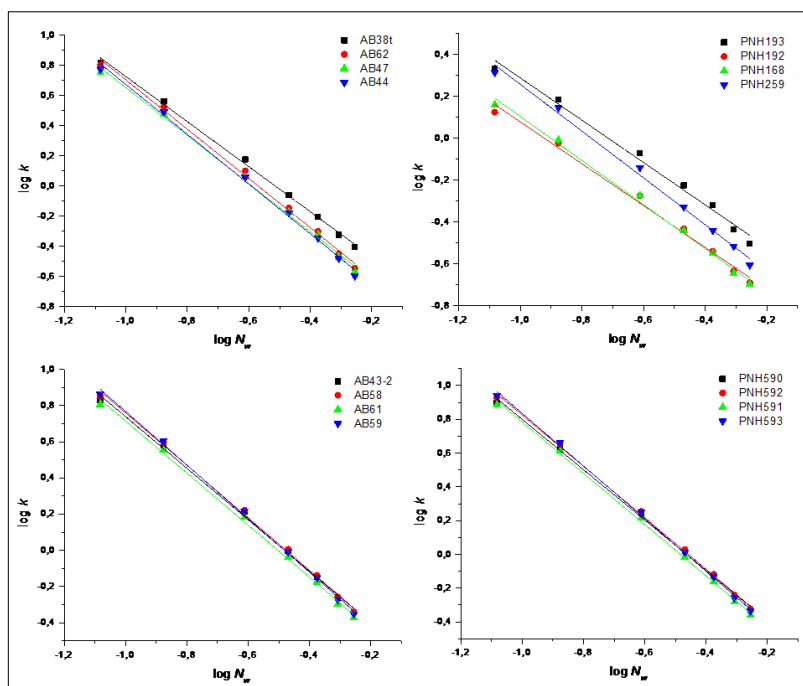


Obr. 29: Závislosti popisující rozdělování pro všechny analyty na koloně Frulic-N při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 v různých objemových poměrech

Adsorpce se na této koloně uplatňovala dle lineární závislosti pro všechny analyty (Obr. 30, Obr. 31). Hodnoty R^2 se pohybovaly v rozmezí 0,987-0,999. U všech analytů SK3 byly zaznamenány hodnoty R^2 s použitím pufru o nižším i vyšším pH totožné (hodnoty R^2 byly ve všech případech rovny hodnotě 0,998).



Obr. 30: Závislosti popisující adsorpci pro všechny analyty na koloně Frulic-N při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 4,7 v různých objemových poměrech



Obr. 31: Závislosti popisující adsorpci pro všechny analyty na koloně Frulic-N při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 v různých objemových poměrech

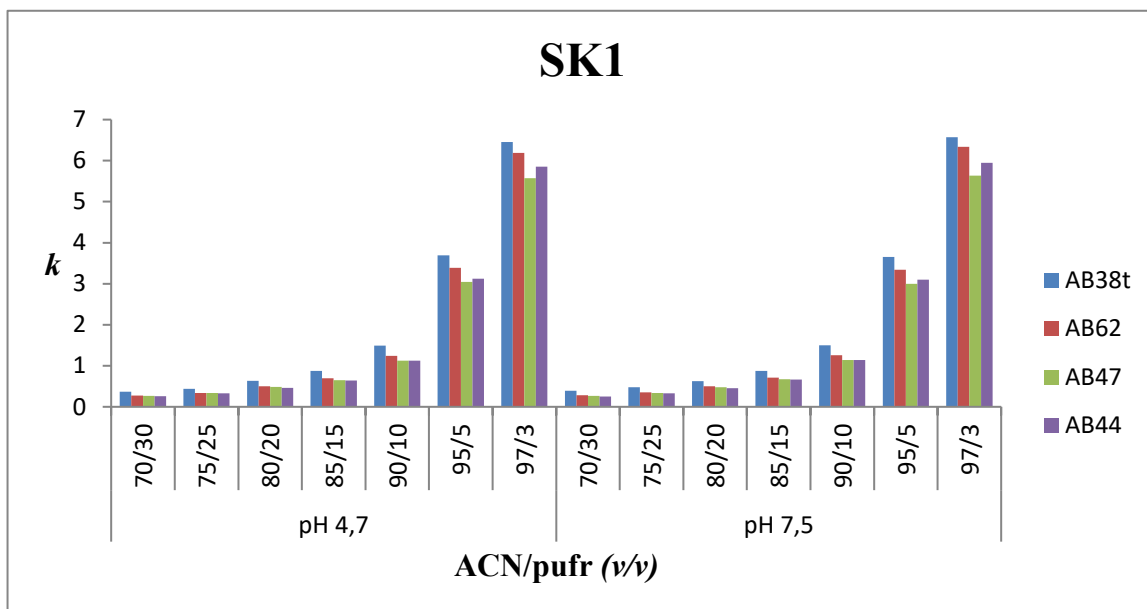
Na základě těchto dat bylo zjištěno, že se na mechanismu separace za výše uvedených podmínek uplatňuje adsorpce i rozdělování analytů mezi MF a vodnou vrstvou částečně sorbovanou na SF.

5.3.2 Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi

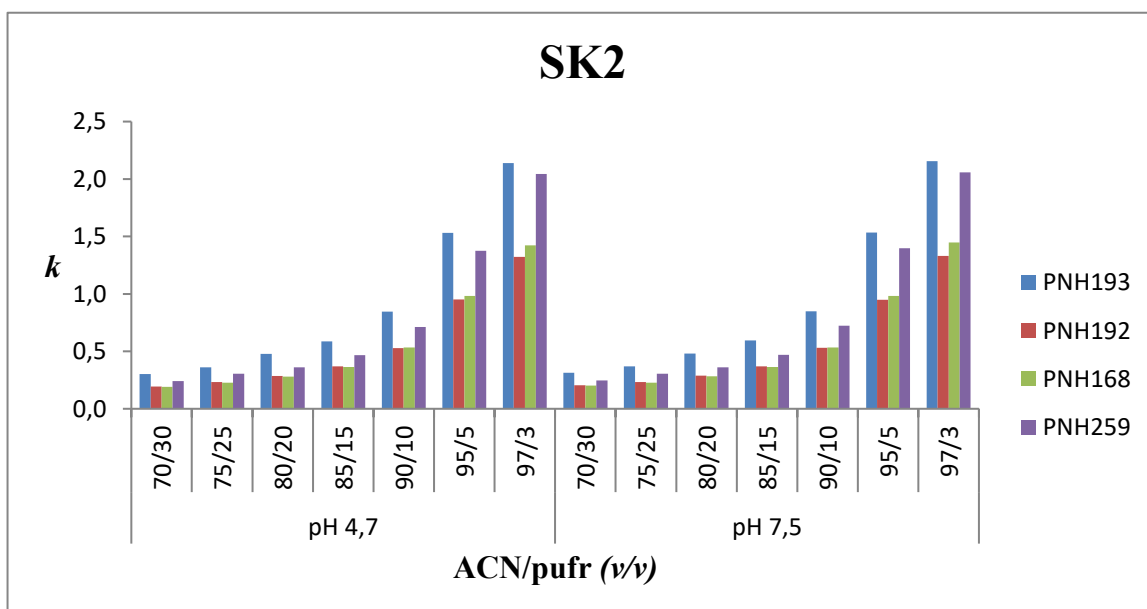
Při použití pufru 1 došlo se zvyšujícím se obsahem ACN v MF u všech analytů k nárůstu retence (Obr. 32-35) úměrně počáteční retenci (počáteční MF obsahovala ACN/10mM octan amonný pH 4,7 70/30 (v/v)). Stejný vývoj byl zaznamenán i při použití pufru 3. Při měření směsí analytů s MF ACN/pufre 3 95/5 (v/v) bylo zaznamenáno prodloužení retence u SK1-SK3 oproti měření s pufrem 1 ve stejném poměru s ACN, u směsi SK4 došlo ke vzrůstu pouze u jedné ze dvou hodnot retencí (Tab. 7).

Ze směsi analytů SK1 spolu v prvním píku koeluovaly AB47 a AB44, v druhém píku eluoval analyt AB62 a jako poslední analyt AB38t. Eluční pořadí analytů SK2 bylo stejné jako u amidové kolony, tedy v prvním píku koeluovaly analyty PNH192 a PNH168, poté eluoval analyt PNH259 a jako poslední analyt PNH193. První z analytů SK3 eluoval analyt AB61, poté AB43-2 a v posledním píku spolu koeluovaly analyty AB58 a AB59. Ze směsi analytů SK4 spolu koeluovaly v prvním píku analyty PNH591 a PNH590, v druhém pak zbylé dva analyty, PNH592 a PNH593.

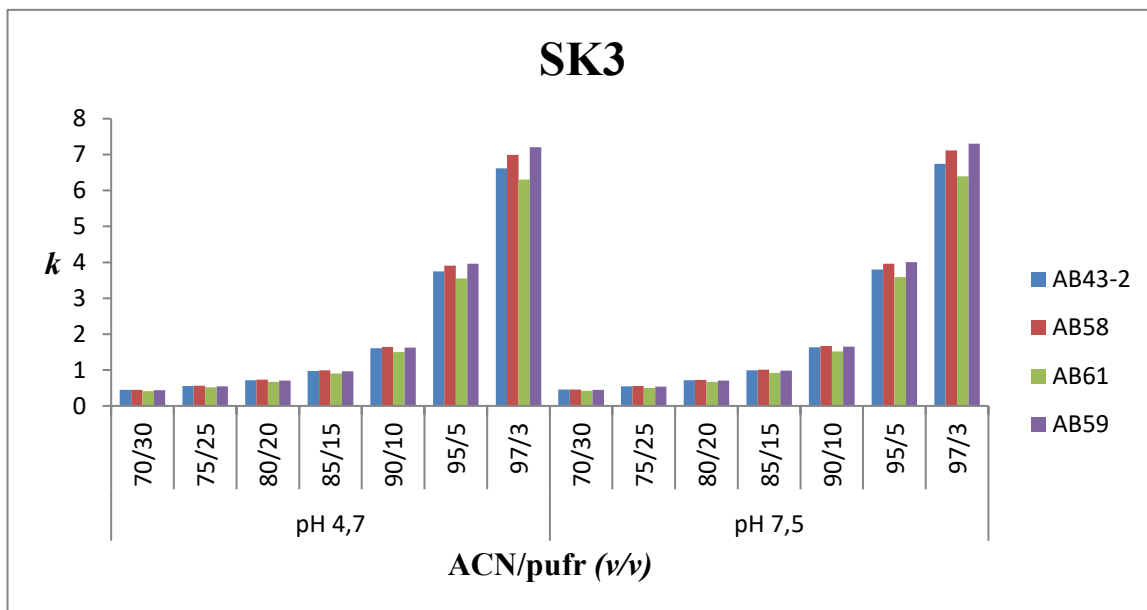
U směsi analytů SK2 byl pozorován nejvyšší nárůst retence zvýšením pH použitého pufru u analytu PNH259. Rozlišení všech směsí analytů mělo vyšší hodnoty při použití pufru 3 (Tab. 7, Obr. 36, Obr. 37), a proto byl za těchto podmínek dále testován vliv koncentrace pufru na separace skupin analytů.



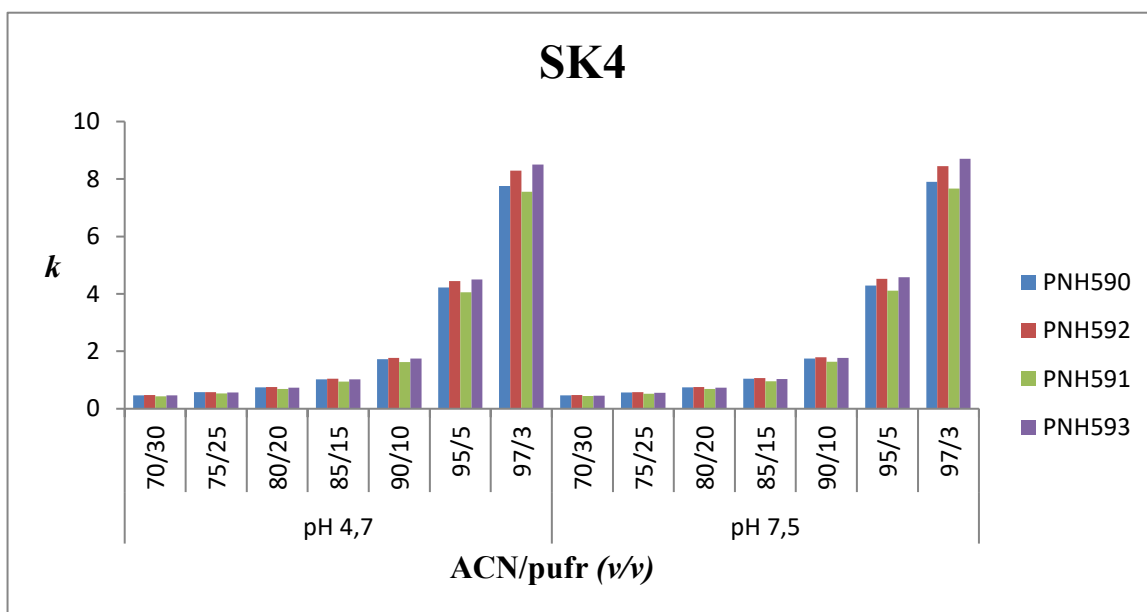
Obr. 32: Závislost retenčních faktorů k analytů SK1 na složení MF na koloně Frulic-N



Obr. 33: Závislost retenčních faktorů k analytů SK2 na složení MF na koloně Frulic-N



Obr. 34: Závislost retenčních faktorů k analytů SK3 na složení MF na koloně Frulic-N



Obr. 35: Závislost retenčních faktorů k analytů SK4 na složení MF na koloně Frulic-N

Tab. 7: Vliv pH pufru v MF ACN/10mM octan amonný 95/5 (v/v) na retenční faktory (k_1, k_2, k_3), rozlišení (R_1, R_2) a separační faktory (α_1, α_2) analytů na koloně Frulic-N

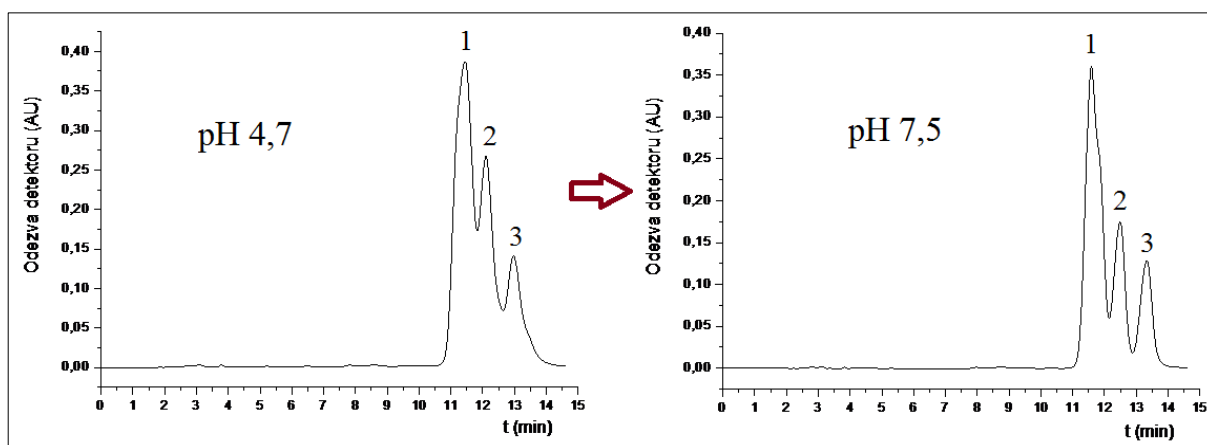
pH pufru	SK	k_1	k_2	k_3	R_1	R_2	α_1	α_2
4,7 (pufr 1)	1	2,99	3,22	3,52	0,62	0,86	1,08	1,09
	2	0,96	1,36	1,51	2,58	0,86	1,41	1,11
	3	3,54	3,74	3,93	0,37	0,32	1,06	1,05
	4	4,21	4,47	-	0,54	-	1,06	-
7,5 (pufr 3)	1	3,00	3,31	3,60	1,06	1,18	1,10	1,09
	2	0,97	1,40	1,54	3,34	1,06	1,45	1,10
	3	3,59	3,82	3,99	0,44	0,32	1,07	1,05
	4	4,14	4,58	-	1,34	-	1,11	-

SK1: k_1 : AB47+AB44; k_2 : AB62; k_3 : AB38t

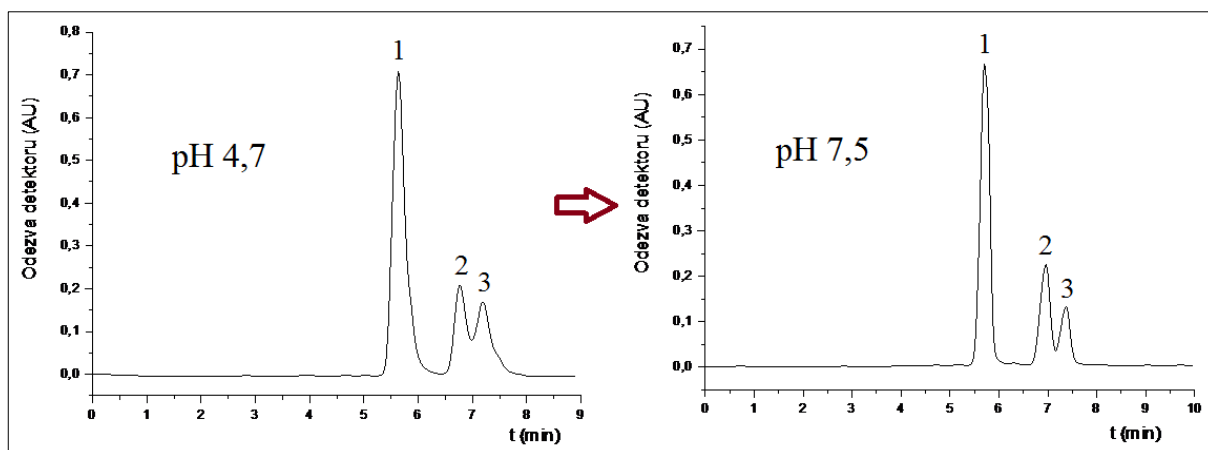
SK2: k_1 : PNH192+PNH168; k_2 : PNH259; k_3 : PNH193

SK3: k_1 : AB61; k_2 : AB43-2; k_3 : AB58+AB59

SK4: k_1 : PNH591+PNH590; k_2 : PNH592+PNH593



Obr. 36: Vliv pH pufru v MF ACN/10mM octan amonný 95/5 (v/v) na separaci SK1 (1-AB47+AB44; 2-AB62; 3-AB38t)



Obr. 37: Vliv pH pufru v MF ACN/10mM octan amonný 95/5 (v/v) na separaci SK2 (1-PNH192+PNH168; 2-PNH259; 3-PNH193)

Při použití MF ACN/pufr 3 95/5 (v/v) se podařilo směsi analytů SK1 až SK3 separovat částečně do 3 píků, SK4 částečně pouze do 2 píků.

5.3.3 Vliv koncentrace pufru o pH 7,5 na separaci skupin analytů

Směs SK1 vykazovala stejné eluční pořadí analytů při použití MF ACN/20mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) jako při použití 10mM octanu amonného ve stejném poměru s ACN v MF, tedy první koeluovaly analyty AB47 a AB44, v druhém píku eluoval AB62 a jako poslední AB38t. V ostatních testovaných koncentracích octanu amonného v pufru MF došlo k částečnému rozdělení analytů koeluujících v prvním píku, tedy první z nich eluoval analyt AB47 a poté AB44. U směsi SK2 bylo zjištěno stejné eluční pořadí analytů při použití MF ACN/20, 30 nebo 50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) jako při použití 10mM octanu amonného ve stejném poměru s ACN v MF, tedy v prvním píku spolu koeluovaly analyty PNH192 a PNH168, poté eluoval analyt PNH259 a jako poslední PNH193. Při použití 5mM octanu amonného ve stejném poměru s ACN v MF došlo k náznačce separace analytů SK2 koeluujících v prvním píku, tedy první eluoval analyt PNH192 a poté PNH168.

Eluční pořadí analytů SK3 se se změnou koncentrace pufru neměnilo. První tedy eluoval analyt AB61, poté AB43-2 a v posledním píku spolu koeluovaly analyty AB58 a AB59. Ze směsi analytů SK4 při snížení i zvýšení původní 10mM koncentrace octanu amonného eluoval nejprve analyt PNH591, poté PNH590 a v posledním píku spolu koeluovaly analyty PNH592 a PNH593.

Při použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) byl pozorován náznačce separace do 4 píků u směsi analytů SK1 a SK2 (Tab. 8, Obr. 38).

Tab. 8: Vliv koncentrace pufru v MF ACN/pufř pH 7,5 95/5 (v/v) na retenční faktory (k_1, k_2, k_3, k_4), rozlišení (R_1, R_2, R_3) a separační faktory ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) analytů na koloně Frulic-N

Koncentrace CH ₃ COONH ₄ [mM]	SK	k_1	k_2	k_3	k_4	R_1	R_2	R_3	α_1	α_2	α_3
5 (pufř 2)	1	2,94	3,03	3,26	3,54	0,37	0,97	1,59	1,03	1,08	1,09
	2	0,94	0,97	1,37	1,50	0,05	3,36	1,44	1,03	1,41	1,10
	3	3,53	3,74	3,94	-	1,12	0,89	-	1,06	1,05	-
	4	4,06	4,22	4,50	-	0,70	1,15	-	1,04	1,07	-
10 (pufř 3)	1	3,00	3,31	3,60	-	1,06	1,18	-	1,10	1,09	-
	2	0,97	1,40	1,54	-	3,34	1,06	-	1,45	1,10	-
	3	3,59	3,82	3,99	-	0,44	0,32	-	1,07	1,05	-
	4	4,14	4,58	-	-	1,34	-	-	1,11	-	-
20 (pufř 4)	1	2,94	3,25	3,53	-	1,24	1,37	-	1,10	1,09	-
	2	0,99	1,41	1,54	-	3,57	1,18	-	1,42	1,10	-
	3	3,53	3,73	3,91	-	0,79	0,64	-	1,06	1,05	-
	4	4,08	4,23	4,49	-	0,39	0,74	-	1,04	1,06	-
30 (pufř 5)	1	2,91	2,99	3,20	3,48	0,30	0,90	1,66	1,03	1,07	1,09
	2	1,01	1,42	1,57	-	3,97	1,53	-	1,40	1,11	-
	3	3,52	3,70	3,89	-	1,01	0,87	-	1,05	1,05	-
	4	4,07	4,20	4,48	-	0,54	1,13	-	1,03	1,07	-
50 (pufř 6)	1	2,88	2,96	3,17	3,45	0,27	0,84	1,72	1,03	1,07	1,09
	2	1,03	1,43	1,59	-	3,93	1,65	-	1,39	1,12	-
	3	3,47	3,64	3,83	-	0,97	0,88	-	1,05	1,05	-
	4	4,04	4,16	4,44	-	0,37	0,87	-	1,03	1,07	-

SK1: k_1 : AB47+AB44; k_2 : AB62; k_3 : AB38t (pufř 3, pufř 4)

k_1 : AB47; k_2 : AB44; k_3 : AB62; k_4 : AB38t (pufř 2, pufř 5, pufř 6)

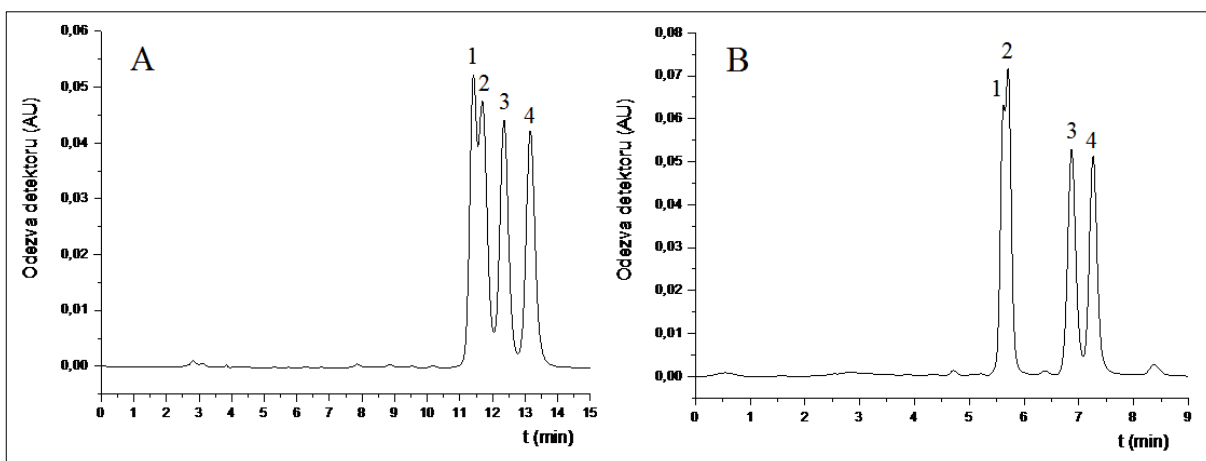
SK2: k_1 : PNH192+PNH168; k_2 : PNH259; k_3 : PNH193 (pufř 3, pufř 4, pufř 5, pufř 6)

k_1 : PNH192; k_2 : PNH168; k_3 : PNH259; k_4 : PNH193 (pufř 2)

SK3: k_1 : AB61; k_2 : AB43-2; k_3 : AB58+AB59

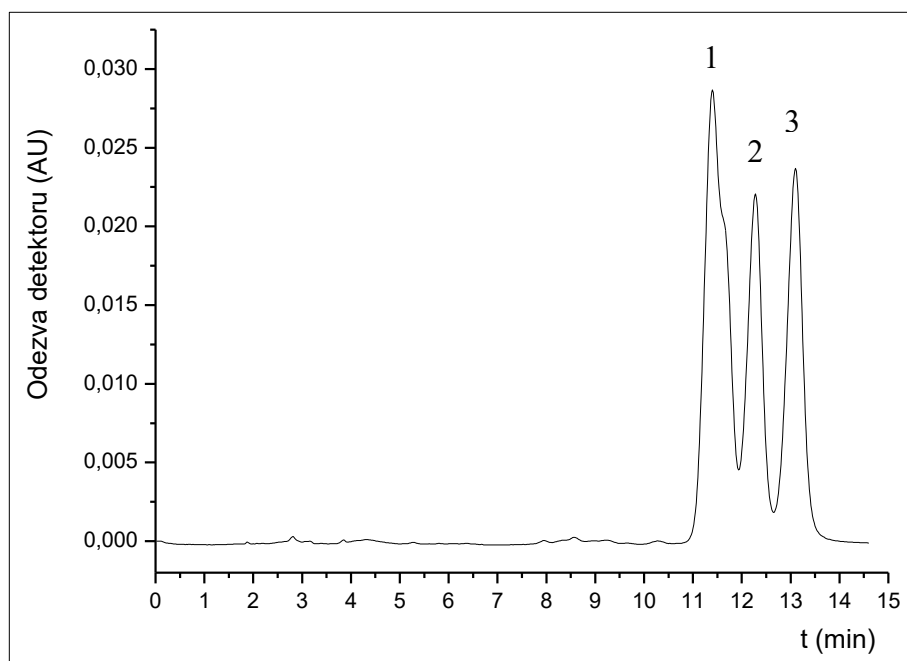
SK4: k_1 : PNH591+PNH590; k_2 : PNH592+PNH593 (pufř 3)

k_1 : PNH591; k_2 : PNH590; k_3 : PNH592+PNH593 (pufř 2, pufř 4, pufř 5, pufř 6)



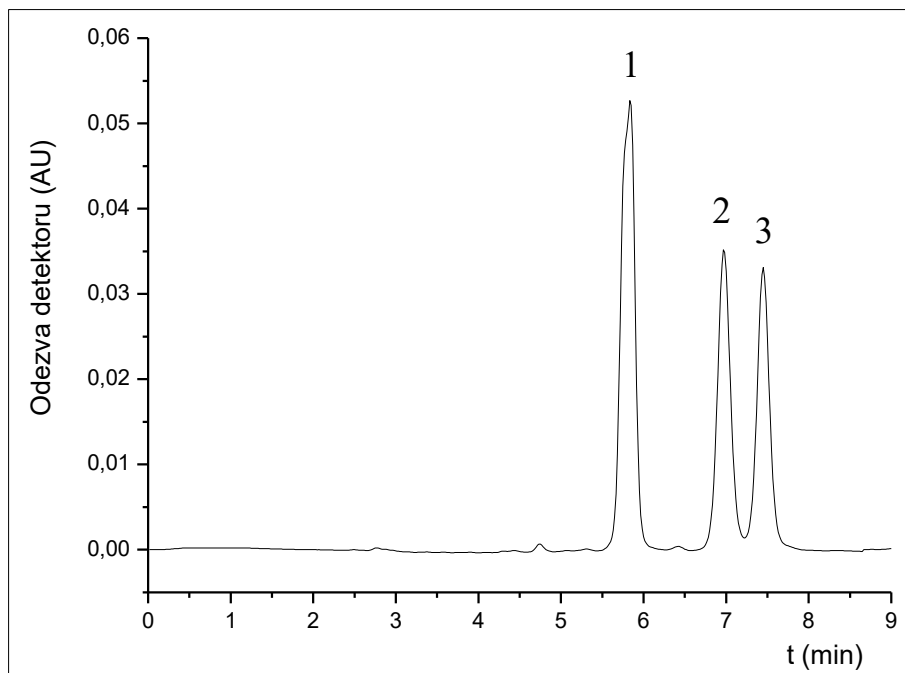
Obr. 38: Chromatogram separace analytů SK1 (A: 1-AB47; 2-AB44; 3-AB62; 4-AB38t) a SK2 (B: 1-PNH192; 2-PNH168; 3-PNH259; 4-PNH193) za použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*), kolona Frulic-N, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

Potenciál pro separaci do 4 píků měly analyty SK1 i při použití MF ACN/30 nebo 50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*). Za těchto podmínek ovšem docházelo ke zlepšení R_3 na úkor R_1 a R_2 . Nejvyšší hodnoty rozlišení R_1 a R_2 pro analyty SK1 byly zaznamenány při použití 20mM octanu amonného (Obr. 39).



Obr. 39: Chromatogram separace analytů SK1 (1-AB47+AB44; 2-AB62; 3-AB38t) za použití MF ACN/20mM octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*), kolona Frulic-N, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

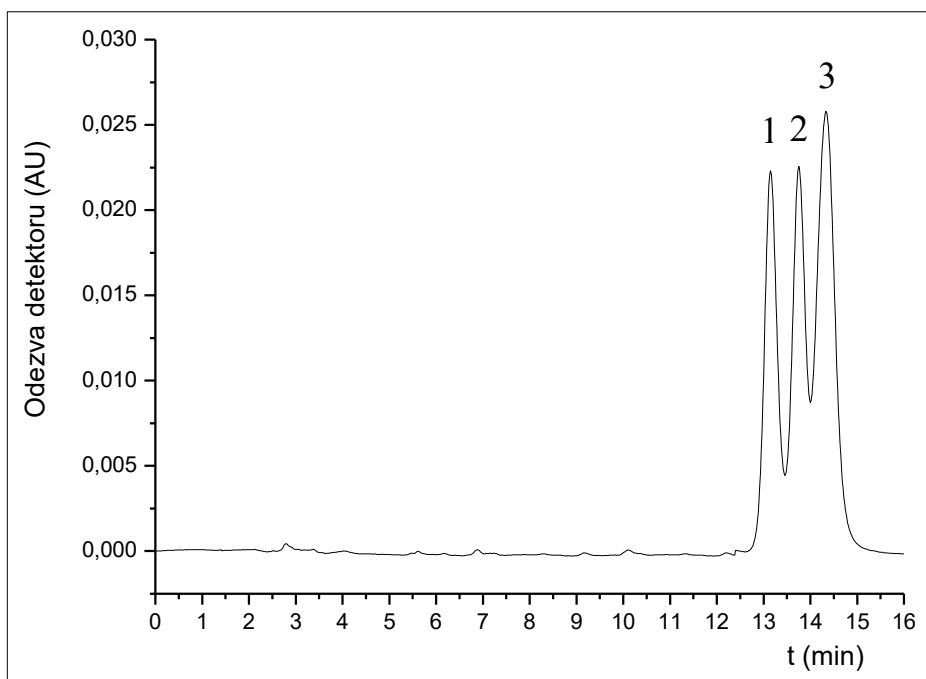
Rozlišení při separaci do 3 píků směsi analytů SK2 se postupně zlepšovala se zvyšující se koncentrací octanu amonného v pufru od 10 do 50 mM (Obr. 40).



Obr. 40: Chromatogram separace analytů SK2 (1-PNH192+PNH168; 2-PNH259; 3-PNH193) za použití MF ACN/50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), kolona Frulic-N, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

K největšímu zlepšení separace analytů SK2 do 3 píků došlo při zvýšení koncentrace octanu amonného v pufru z 20 na 30 mM. Při použití 30 a 50mM octanu amonného došlo u této skupiny analytů k separaci do 3 píků až na základní linii, přičemž v prvním píku spolu koeluovaly analyty PNH192 a PNH168. Při zvýšení koncentrace octanu amonného v pufru z 30 na 50 mM bylo pozorováno mírné zlepšení R_2 na úkor R_1 (Tab. 8). Kromě situace, kdy byl použit 5mM octan amonný, nebyl u této skupiny analytů pozorován žádný náznak separace do 4 píků.

U směsi analytů SK3 docházelo při použití pufrů o všech testovaných koncentracích k částečné separaci do 3 píků. Nejvyššího rozlišení bylo dosaženo při použití 5mM octanu amonného pH 7,5 (Obr. 41). Při zvyšování koncentrace octanu amonného v pufru z 10 na 20, a následně pak na 30 mM bylo pozorováno mírné zvýšení hodnot obou rozlišení. Při dalším zvýšení koncentrace octanu amonného v pufru na 50 mM došlo k mírnému zvýšení hodnoty R_2 současně s mírným snížením hodnoty R_1 .



Obr. 41: Chromatogram separace analytů SK3 (1-AB61; 2-AB43-2; 3-AB58+AB59) za použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), kolona Frulic-N, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

Nejnižší selektivita byla pozorována u směsi analytů SK4. Za použití 10mM octanu amonného se podařilo tuto skupinu analytů separovat pouze částečně do 2 píků, přičemž v prvním píku koeluovaly analyty PNH591 a PNH590 a v druhém analyty PNH592 a PNH593. Ke zlepšení separace přispělo jak snížení koncentrace octanu amonného v pufru na 5 mM, tak postupné zvyšování jeho koncentrace z 10 až na 30 mM. V obou případech docházelo k částečné separaci do 3 píků, kdy analyt PNH591 eluoval jako první, částečně separován od analytu PNH590. Další zvýšení jeho koncentrace z 30 na 50 mM způsobilo snížení obou hodnot rozlišení. Nejlepší separace pro tuto skupinu analytů do 3 píků bylo dosaženo při použití 5mM octanu amonného pH 7,5.

5.4 Srovnání separací na kolonách s různým typem stacionární fáze

Při použití MF ACN/pufř 3 95/5 (*v/v*) bylo zjištěno, že analýzy jednotlivých skupin analytů trvaly déle na koloně Frulic-N než na koloně TSKgel Amide-80. Délka analýz stoupala v řadě: analyty SK2 < analyty SK1 < analyty SK3 < analyty SK4. Při použití čistě silikagelové kolony byly nejdelší analýzy zaznamenány u analytů SK1, u které byly zjištěny nejvyšší hodnoty R^2 závislostí popisujících rozdělování a adsorpci. Při použití této kolony délka analýz stoupala v pořadí: analyty SK2 < analyty SK4 < analyty SK3 < analyty SK1.

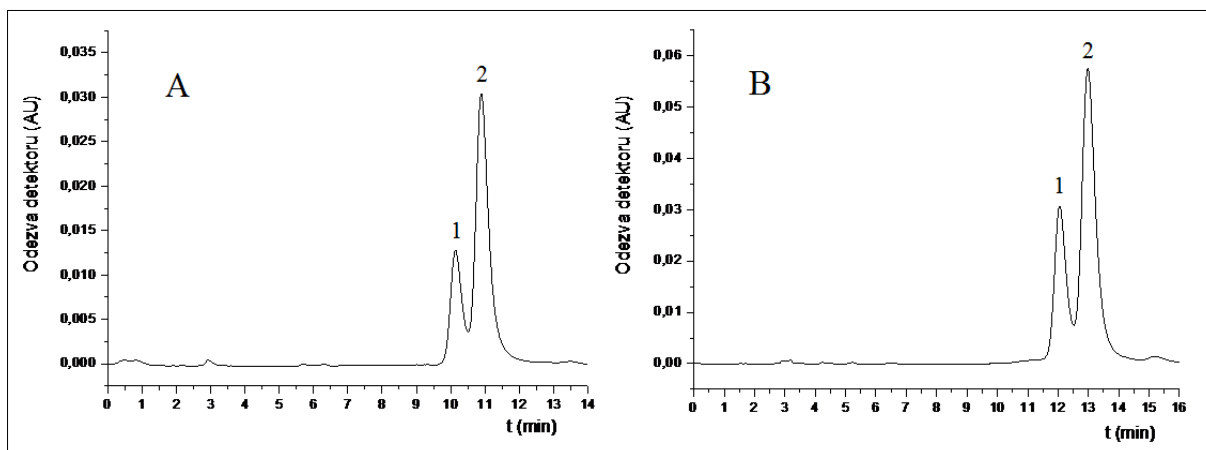
U amidové SF při použití MF ACN/10mM octan amonný 95/5 (*v/v*) byly pozorovány kratší retence všech analytů při použití pufru o pH 7,5 než při použití pufru o pH 4,7. U cyklofruktanové SF byl pro většinu analytů pozorován opačný efekt.

Na amidové SF se podařilo analyty SK1 částečně separovat do 3 píků, přičemž první eluoval analyt AB47, druhý z píků zahrnoval 2 analyty (AB44 a AB62) a poslední eluoval analyt AB38t (Obr. 26). Během testování vlivu koncentrace pufru nebyl na této koloně u směsi analytů SK1 pozorován žádný náznak separace do 4 píků. Oproti tomu na cyklofruktanové SF byl zaznamenán u této skupiny náznak separace do 4 píků při použití MF ACN/pufř pH 7,5 95/5 (*v/v*) o koncentraci octanu amonného 5 (Obr. 38A), 30 nebo 50 mM. Došlo k separaci dvou analytů, které koeluovaly na amidové SF, ovšem analyt AB44 byl tentokrát pouze částečně separován od analytu AB47. Během separace směsi analytů SK1 do 3 píků za použití 20mM pufru, kdy bylo dosaženo nejvyššího rozlišení na cyklofruktanové SF, spolu koeluovaly v prvním píku analyty AB47 a AB44 (Obr. 39). Eluční pořadí analytů bylo stejné u amidové i cyklofruktanové SF.

Směs analytů SK2 se na amidové SF podařilo separovat na základní linii do 3 píků, přičemž v prvním píku spolu koeluovaly analyty PNH192 a PNH168 (Obr. 27), což dokazuje, že druh halogenového substituentu (Cl, F) na pozici 7 purinového kruhu neovlivňuje retenci analytů natolik, aby došlo k jejich separaci. Naopak odlišnost atomu v hetarylu na pozici 6 purinového kruhu (atom kyslíku nebo síry) měla dostatečný vliv pro separaci analytů PNH192 a PNH193. Stejně tak odlišná pozice atomu síry v hetarylu u analytů PNH168 a PNH259 měla pozitivní vliv na jejich separaci. Na cyklofruktanové SF byl při použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*) u této skupiny analytů pozorován náznak separace do 4 píků (Obr. 38B), který u amidové SF za použití kterékoli MF pozorován nebyl. Při použití 50mM octanu amonného o pH 7,5 jako složky MF bylo dosaženo u analytů SK2 separace až na základní linii (Obr. 40), ovšem stejně jako u amidové SF pouze do 3 píků. Shodně

s amidovou SF spolu v prvním píku koeluovaly analyty PNH192 a PNH168. Pořadí eluce analytů SK2 se shodovalo u amidové a cyklofruktanové SF.

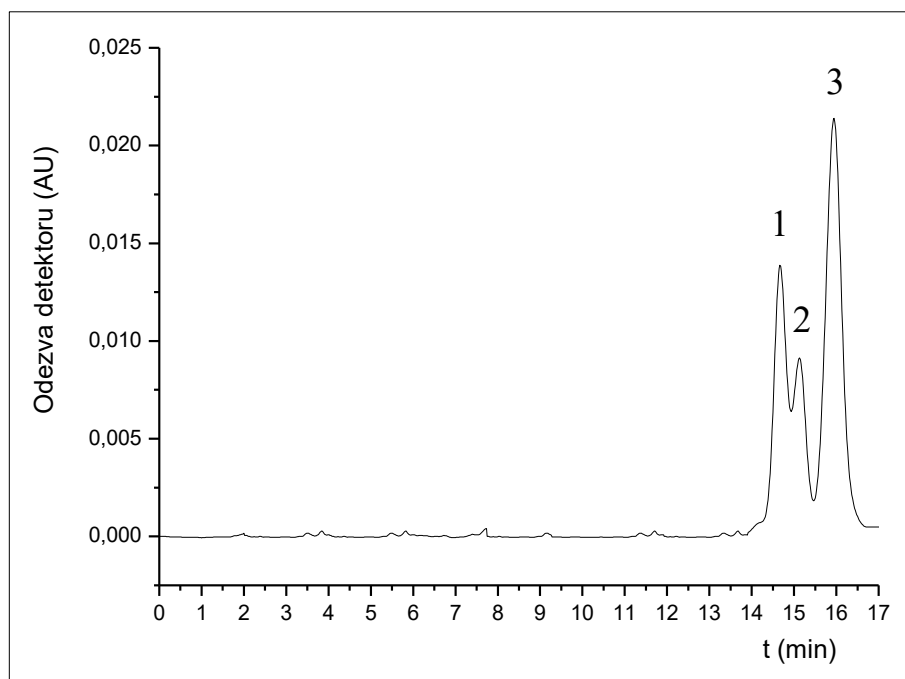
Na amidové SF se směs analytů SK3 podařilo separovat jen částečně, a to do 2 píků, přičemž druhý pík zahrnoval 3 analyty. Analyt AB61 eluoval samostatně jako první (Obr. 42A).



Obr. 42: Chromatogram separace analytů SK3 (1-AB61; 2-AB58+AB43-2+AB59) a SK4 (1-PNH591; 2-PNH592+PNH593+PNH590) za použití MF ACN/50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v), kolona TSKgel Amide-80, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

Na cyklofruktanové SF při použití MF obsahující 5 mM octan amonný došlo také k částečné separaci SK3, ovšem tentokrát do 3 píků (Obr. 41). Z druhého píku byl částečně separován analyt AB43-2. Ani u jedné z kolon nebyl pozorován náznak separace směsi analytů SK3 do 4 píků.

Směs analytů SK4 se na amidové SF podařilo taktéž separovat pouze částečně do 2 píků. Opět druhý pík zahrnoval 3 analyty (Obr. 42B). Částečně separovaným analytem, který eluoval dříve než zbylé 3, byl v tomto případě analyt PNH591. Stejně jako u směsi analytů SK3 zapříčinilo použití cyklofruktanové SF zlepšení v podobě částečné separace SK4 do 3 píků při použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) (Obr. 43). Z druhého píku byl částečně separován analyt PNH590. Náznak separace do 4 píků nebyl pozorován ani u jedné z kolon.



Obr. 43: Chromatogram separace analytů SK4 (1-PNH591; 2-PNH590; 3-PNH593+PNH592) za použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*), kolona Frulic-N, průtok 1 ml/min, UV detekce při $\lambda=280$ nm

Podobnost výsledků analýz směsí SK3 a SK4 je evidentní. V obou případech došlo k částečné separaci do 2 píků na amidové a do 3 píků na cyklofruktanové SF. Z výsledků lze usuzovat, že druh atomu v hetarylovém substituentu na pozici 6 purinového kruhu má vliv na separaci, pouze pokud se vyskytuje na pozici 2 tohoto hetarylu. Pokud se heteroatom nachází na pozici 3, nemá vliv na separaci. Tato skutečnost se projevila u směsi SK3 i SK4, kdy došlo ke koeluci takových analytů v posledním píku. Naopak analyty AB61 a PNH591 mající atom síry na pozici 2 hetarylového substituentu byly částečně separovány jak na amidové, tak na cyklofruktanové SF.

Analýzy všech čtyř směsí za použití MF ACN/octan amonný pH 7,5 95/5 (*v/v*) o kterékoliv z testovaných koncentrací trvaly ve většině případů déle na cyklofruktanové SF než na amidové. S použitím cyklofruktanové SF bylo dosaženo lepšího rozlišení u všech čtyř skupin analytů.

6. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly separovány čtyři skupiny derivatizovaných endogenních nukleosidů (SK1: 7-fenyl-/7-(4-(methylsulfanyl)fenyl)-/7-(1-naftyl)-/7-(2-naftyl)-7-deazaadenosin; SK2: 7-fluor-6-(2-furyl)-/7-fluor-6-(2-thienyl)-/7-chlor-6-(2-thienyl)-/7-chlor-6-(3-thienyl)-7-deazaadenosin; SK3: 7-(2-furyl)-/7-(3-furyl)-/7-(2-thienyl)-/7-(3-thienyl)-7-deazaadenosin; SK4: 7-(2-furyl)-/7-(3-furyl)-/7-(2-thienyl)-/7-(3-thienyl)-2-amino-7-deazaadenosin) metodou HILIC.

Během optimalizace separace byl studován retenční a separační mechanismus v HILIC. Bylo potvrzeno, že se ve všech testovaných chromatografických systémech podílí na mechanismu separace jak rozdělování analytů mezi vodnou vrstvou částečně ukotvenou na povrchu SF a MF, tak i adsorpce analytů na SF.

Čistě silikagelová SF byla nejméně vhodnou pro separaci testovaných skupin analytů. Vodnou složku MF tvořila deionizovaná voda, 10mM octan amonný pH 4,7 nebo 7,5. Při použití deionizované vody v MF vykazovaly analyty příliš dlouhé retence. Použití pufru nepřineslo výrazné zlepšení, a proto pro další měření byly vybrány kolony s jiným typem SF, které poskytují další interakční možnosti.

Kolona TSKgel Amide-80 poskytla alespoň částečnou separaci analytů SK2 do 3 píků téměř až na základní linii při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) ($R_1=2,02$, $R_2=1,45$). Separace až na základní linii pro analyty SK2 bylo dosaženo při použití MF obsahující 50mM octan amonný pH 7,5 ve stejném poměru s ACN ($R_1=1,98$, $R_2=1,58$). Analyty SK1 se podařilo separovat částečně do 3 píků ($R_1=1,16$, $R_2=0,75$), analyty SK3 a SK4 pouze částečně do 2 píků s použitím stejné MF.

Kolona Frulic-N se ukázala být nejvhodnější pro separaci skupin testovaných analytů. Při použití MF ACN/10mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) došlo k částečné separaci do 3 píků u všech skupin analytů kromě analytů SK4. Během testování vlivu koncentrace pufru byl zaznamenán náznak separace do 4 píků u analytů SK1 a SK2 při použití MF ACN/5mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v). Směs analytů SK2 se při použití MF ACN/50mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) podařilo separovat do 3 píků až na základní linii ($R_1=3,93$, $R_2=1,65$), a to s vyššími hodnotami rozlišení, než tomu bylo na amidové SF. U směsi analytů SK1 došlo při použití MF ACN/20mM octan amonný pH 7,5 95/5 (v/v) k částečné separaci do 3 píků, také s vyššími hodnotami rozlišení než na amidové SF

($R_1=1,24$, $R_2=1,37$). Analýzy směsí analytů SK3 a SK4 poskytly pouze částečné separace do 3 píků, a to s nižším rozlišením, než které bylo zaznamenáno u směsi analytů SK1.

U kolon TSKgel Amide-80 a Frulic-N byl nejvhodnější poměr složek MF ACN/pufř 95/5 (v/v) a hodnota pH použitého pufř 7,5 byla zvolena jako vhodnější pro separaci skupin testovaných analytů.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Zhou, W.; Zhu, B.; Liu, F.; Lyu, Ch.; Zhang, S.; Yan, Ch.; Cheng, Y.; Wei, H.: A rapid and simple method for the simultaneous determination of four endogenous monoamine neurotransmitters in rat brain using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with atmospheric-pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1002, 379-386 (2015).
2. McCalley, D. V.: Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A* 1171, 46-55 (2007).
3. Çelebi, B.; Özen, B.; Kip, Ç.; Tuncel, A.: A New Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography: Polyacrylate-Based Hydrophilic, Monosized-Porous Beads with Zwitterionic Molecular Brushes. *Chromatographia* 77, 1511-1520 (2014).
4. Bourderioux, A.; Nauš, P.; Perlíková, P.; Pohl, R.; Pichová, I.; Votruba, I.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Stray, K. M.; Wang, T.; Ray, A. S.; Feng, J. Y.; Birkus, G.; Cihlar, T.; Hocek, M.: Synthesis and Significant Cytostatic Activity of 7-Hetaryl-7-deazaadenosines. *Journal of Medicinal Chemistry* 54, 5498-5507 (2011).
5. Wang, Ch.; Jiang, Ch.; Armstrong, D. W.: Considerations on HILIC and polar organic solvent-based separations: Use of cyclodextrin and macrocyclic glycopeptide stationary phases. *Journal of Separation Science* 31, 1980-1990 (2008).
6. Lim, Y.; Breitbach, Z. S.; Armstrong, D. W.; Berthod, A.: Screening primary racemic amines for enantioseparation by derivatized polysaccharide and cyclofructan columns. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 345-355 (2016).

7. Kahsay, G.; Song, H.; Schepdael, A. V.; Cabooter, D.; Adams, E.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87, 142-154 (2014).
8. Buszewski, B.; Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 231-247 (2012).
9. Alpert, A.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* 499, 177-196 (1990).
10. Liang, T.; Fu, Q.; Li, F.; Zhou, W.; Xin, H.; Wang, H.; Jin, Y.; Liang, X.: Hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation, purification, and quantification of raffinose family oligosaccharides from *Lycopus lucidus* Turcz. *Journal of Separation Science* 38, 2607-2613 (2015).
11. Hawkins, C. A.; Rud, A.; Guthrie, M. L.; Dietz, M. L.: Rapid quantification of imidazolium-based ionic liquids by hydrophilic interaction liquid chromatography: Methodology and an investigation of the retention mechanisms. *Journal of Chromatography A* 1400, 54-64 (2015).
12. Kozlík, P.; Šímová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases. *Journal of Chromatography A* 1257, 58-65 (2012).
13. Greco, G.; Letzel, T.: Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *Journal of Chromatographic Science* 51, 684-693 (2013).
14. Maksić, J.; Jovanović, M.; Rakić, T.; Popović, I.; Ivanović, D.; Jančić-Stojanović, B.: Chromatographic Analysis of Olopatadine in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 53, 680-686 (2015).

15. Yong, T.; Wu, F.; Xiao, H.; Wan, B.: Silica modified with a thiourea derivative as a new stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 38, 3852-3861 (2015).
16. Tufi, S.; Lamoree, M.; de Boer, J.; Leonards, P.: Simultaneous analysis of multiple neurotransmitters by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1395, 79-87 (2015).
17. Guan, Ch.; Yu, H.: Hydrophilic interaction liquid chromatography for separation and determination of pyrrolidinium ionic liquid cations. *Analytical Methods* 8, 840-845 (2016).
18. Roy, C.-E.; Kauss, T.; Prevot, S.; Barthelemy, P.; Gaudin, K.: Analysis of fatty acid samples by hydrophilic interaction liquid chromatography and charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A* 1383, 121-126 (2015).
19. Song, H.; Desmet, G.; Cabooter, D.: Evaluation of the Kinetic Performance Differences between Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography and Reversed-Phase Liquid Chromatography under Conditions of Identical Packing Structure. *Analytical Chemistry* 87, 12331-12339 (2015).
20. Pedrali, A.; Bleve, M.; Capra, P.; Jonsson, T.; Massolini, G.; Perugini, P.; Marrubini, G.: Determination of N-acetylglucosamine in cosmetic formulations and skin test samples by hydrophilic interaction liquid chromatography and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 107, 125-130 (2015).
21. Hernandez-Hernandez, O.; Quintanilla-Lopez, J. E.; Lebron-Aguilar, R.; Sanz, M. L.; Moreno, F. J.: Characterization of post-translationally modified peptides by hydrophilic interaction and reverse phase liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1428, 202-211 (2016).

22. Warth, B.; Siegwart, G.; Lemmens, M.; Krska, R.; Adam, G.; Schuhmacher, R.: Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the quantification of uridine diphosphate-glucose, uridine diphosphate-glucuronic acid, deoxynivalenol and its glucoside: In-house validation and application to wheat. *Journal of Chromatography A* 1423, 183-189 (2016).
23. Wang, J.; Guo, Z.; Shen, A.; Yu, L.; Xiao, Y.; Xue, X.; Zhang, X.; Liang, X.: Hydrophilic-subtraction model for the characterization and comparison of hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A* 1398, 29-46 (2015).
24. Hao, Z.; Xiao, B.; Weng, N.: Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science* 31, 1449-1464 (2008).
25. Hemström, P.; Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29, 1784-1821 (2006).
26. Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* 692, 1-25 (2011).
27. Yang, P.; Pursch, M.: Hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of acidic agricultural compounds. *Journal of Separation Science* 38, 2253-2259 (2015).
28. Schoenmakers, P. J.; Billiet, H. A. H.; de Galan, L.: Systematic study of ternary solvent behaviour in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 218, 261-284 (1981).
29. Kalíková, K.; Kozlík, P.; Gilar, M.; Tesařová, E.: Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science* 36, 2421-2429 (2013).

30. Snyder, L. R.; Poppe, H.: Mechanism of solute retention in liquid-solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation. *Journal of Chromatography* 184, 363-413 (1980).
31. Greco, G.; Grosse, S.; Letzel, T.: Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *Journal of Chromatography A* 1235, 60-67 (2012).
32. Qiao, L.; Shi, X.; Xu, G.: Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 81, 23-33 (2016).
33. Česla, P.; Vaňková, N.; Křenková, J.; Fischer, J.: Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides. *Journal of Chromatography A* 1438, 179-188 (2016).
34. Losito, I.; Facchini, L.; Diomede, S.; Conte, E.; Megli, F. M.; Cataldi, T. R. I.; Palmisano, F.: Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry of a complex mixture of native and oxidized phospholipids. *Journal of Chromatography A* 1422, 194-205 (2015).
35. Vlčková, H.; Ježková, K.; Štětková, K.; Tomšíková, H.; Solich, P.; Nováková, L.: Study of the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases used in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 37, 1297-1307 (2014).
36. McCalley, D. V.: Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1193, 85-91 (2008).
37. Guo, Y.; Gaiki, S.: Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218, 5920-5938 (2011).

38. Borges, E. M.: Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 53, 580-597 (2015).
39. Naidong, W.: Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *Journal of Chromatography B* 796, 209-224 (2003).
40. Cervený, S.; Schwartz, G. A.; Otegui, J.; Colmenero, J.; Loichen, J.; Westermann, S.: Dielectric Study of Hydration Water in Silica Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* 116, 24340-24349 (2012).
41. Soukup, J.; Jandera, P.: Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1374, 102-111 (2014).
42. *Spherisorb Columns Care and Use Manual*. Milford, USA, Waters Corporation 2012.
43. Guo, Y.; Shah, R.: Detailed insights into the retention mechanism of caffeine metabolites on the amide stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1463, 121-127 (2016).
44. Shen, G.; Zhang, F.; Yang, B.; Chu, Ch.; Liang, X.: A novel amide stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and ion chromatography. *Talanta* 115, 129-132 (2013).
45. *TSK-gel HILIC columns*. Stuttgart, Germany, Tosoh Bioscience GmbH 2015.
46. Sun, P.; Wang, Ch.; Breitbach, Z. S.; Zhang, Y.; Armstrong, D. W.: Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans. *Analytical Chemistry* 81, 10215-10226 (2009).

47. Qiu, H.; Loukotková, L.; Sun, P.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.: Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218, 270-279 (2011).
48. Shu, Y.; Lang, J. C.; Breitbach, Z. S.; Qiu, H.; Smuts, J. P.; Kiyono-Shimobe, M.; Yasuda, M.; Armstrong, D. W.: Separation of therapeutic peptides with cyclofructan and glycopeptide based columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1390, 50-61 (2015).
49. Padivitage, N. L. T.; Dissanayake, M. K.; Armstrong, D. W.: Separation of nucleotides by hydrophilic interaction chromatography using the FRULIC-N column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 8837-8848 (2013).
50. Wang, Y.; Wahab, M. F.; Breitbach, Z. S.; Armstrong, D. W.: Carboxylated cyclofructan 6 as a hydrolytically stable high efficiency stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and mixed mode separations. *Analytical Methods* 8, 6038-6045 (2016).
51. Hynie, S.: *Farmakologie v kostce*. 2. přepracované vydání Praha, Triton 2001.
52. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 4. české vydání Praha, Grada 2012.
53. Koolman, J.; Röhm, K.-H.: *Barevný atlas biochemie*. 1. české vydání Praha, Grada 2012.
54. van Nuijs, A. L. N.; Tarcomnicu, I.; Covaci, A.: Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1218, 5964-5974 (2011).
55. Nauš, P.; Pohl, R.; Votruba, I.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Ameral, R.; Birkuš, G.; Wang, T.; Ray, A. S.; Mackman, R.; Cihlar, T.; Hocek, M.: 6-(Het)aryl-7-

- Deazapurine Ribonucleosides as Novel Potent Cytostatic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 460-470 (2010).
56. Nauš, P.; Perlíková, P.; Bourderioux, A.; Pohl, R.; Slavětínská, L.; Votruba, I.; Bahador, G.; Birkuš, G.; Cihlář, T.; Hocek, M.: Sugar-modified derivatives of cytostatic 7-(het)aryl-7-dezaadenosines: 2'-C-methylribonucleosides, 2'-deoxy-2'-fluoroarabinonucleosides, arabinonucleosides and 2'-deoxyribonucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 5202-5214 (2012).
57. Perlíková, P.; Rylová, G.; Nauš, P.; Elbert, T.; Tloušťová, E.; Bourderioux, A.; Poštová Slavětínská, L.; Motyka, K.; Doležal, D.; Znojek, P.; Nová, A.; Harvanová, M.; Džubák, P.; Šiller, M.; Hlaváč, J.; Hajdúch, M.; Hocek, M.: 7-(2-Thienyl)-7-dezaadenosine (AB61), a New Potent Nucleoside Cytostatic with a Complex Mode of Action. *Molecular Cancer Therapeutics* 15, 922-937 (2016).
58. Snášel, J.; Nauš, P.; Dostál, J.; Hnízda, A.; Fanfrlík, J.; Brynda, J.; Bourderioux, A.; Dušek, M.; Dvořáková, H.; Stolaříková, J.; Zábranská, H.; Pohl, R.; Konečný, P.; Džubák, P.; Votruba, I.; Hajdúch, M.; Řezáčová, P.; Veverka, V.; Hocek, M.; Pichová, I.: Structural Basis for Inhibition of Mycobacterial and Human Adenosine Kinase by 7-Substituted 7-(Het)aryl-7-dezaadenine Ribonucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 8268-8279 (2014).
59. Perlíková, P.; Konečný, P.; Nauš, P.; Snášel, J.; Votruba, I.; Džubák, P.; Pichová, I.; Hajdúch, M.; Hocek, M.: 6-Alkyl-, 6-aryl- or 6-hetaryl-7-deazapurine ribonucleosides as inhibitors of human or MTB adenosine kinase and potential antimycobacterial agents. *Medicinal Chemical Communications* 4, 1497-1500 (2013).
60. Nauš, P.; Caletková, O.; Konečný, P.; Džubák, P.; Bogdanová, K.; Kolář, M.; Vrbková, J.; Slavětínská, L.; Tloušťová, E.; Perlíková, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M.: Synthesis, Cytostatic, Antimicrobial, and Anti-HCV Activity of 6-Substituted 7-(Het)aryl-7-deazapurine Ribonucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 1097-1110 (2014).