

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**2017**

**Bc. Alexandra Moldová**

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Separácia polárnych látok v HILIC systémoch na modifikovaných  
a nemodifikovaných silikagélových kolónach

Bc. Alexandra Moldová

Pardubice

2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alexandra Moldová**  
Osobní číslo: **C15585**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Separace polárních látek v HILIC systémech na modifikovaných a nemodifikovaných silikagelových kolonách**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vyhledejte v literatuře práce zabývající se separacemi nízkomolekulárních látek na polárních kolonách v HILIC systémech. Zaměřte se především na kolony na bázi silikagelu s povrchově pórovitými částicemi.
2. Změřte retenční data vybraných skupin nízkomolekulárních polárních látek na kolonách se silikagelem a silikagelem modifikovaným polárními skupinami. Porovnejte možnosti separace na obou typech kolon a navrhněte optimální pracovní podmínky pro jejich separaci v oblasti HILIC módu.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem v oboru separací na polárních nemodifikovaných a chemicky modifikovaných silikagelových kolonách.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Pavel Jandera, DrSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Věntura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci použila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, hlavne so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o využití tejto práce ako školského diela podľa §60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k využitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o využití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Nesúhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach, dňa 18.5.2017

Bc. Alexandra Moldová

## Podakovanie

Na tomto mieste by som chcela predovšetkým poďakovať p. prof. Ing. Pavlovi Janderovi, DrSc za odborné vedenie diplomovej práce, cenné rady a pripomienky. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc v priebehu experimentálnej práce.

## **ANOTÁCIA**

Diplomová práca sa zaoberá separáciami nízkomolekulárnych látok na polárnych kolónach, predovšetkým na kolónach na báze silikagélu a chemicky modifikovaných kolónach v HILIC systéme. Oba typy kolón boli použité na separáciu vybraných skupín látok, a to fenolických kyselín, flavonoidových zlúčenín, nukleových báz a nukleozidov. Následne boli oba typy kolón použité aj na separáciu reálnych vzoriek zeleného čaju a piva.

### **KEÚČOVÉ SLOVÁ**

Kvapalinová chromatografia hydrofilných interakcií, silikagelové a chemicky modifikované stacionárne fázy, reverzné fázy, fenolické kyseliny, flavonoidové zlúčeniny, nukleové bázy a nukleozidy .

## **ANNOTATION**

The aim of this thesis are separations of low-molecular substances on polar columns, especially on columns based on silica gel and chemically modified columns, in the HILIC system. Both types of columns have been used to separate selected phenolic acids groups, flavonoid compounds, nucleic acids and nucleosides. Subsequently, both types of columns have also been used to separate real samples of green tea and beer.

### **KEY WORDS**

Hydrophilic interaction liquid chromatography, silica gel, chemically modified columns, reversed- phase, phenolic acids, flavonoid compounds, nucleic bases, nucleosides.

# Obsah

ÚVOD.....	11
1. TEORETICKÁ ČASŤ .....	12
1.1 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA.....	12
1.1.1 RETENČNÉ CHARAKTERISTIKY .....	12
1.1.1.1 ÚČINNOSŤ .....	14
1.1.2 HPLC V SYSTÉMOCH S NORMÁLNÝMI A REVEZNÝMI FÁZAMI .....	14
1.1.3 IZOKRATICKÁ A GRADIENTOVÁ ELÚCIA .....	15
1.2 KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA HYDROFILNÝCH .....	16
INTERAKCIÍ.....	16
1.2.1 STACIONÁRNE FÁZY V HILIC .....	16
1.2.1.1 SILIKAGÉL .....	17
1.2.1.2 CHEMICKY MODIFIKOVANÉ FÁZY .....	18
1.2.1.2.1 NEUTRÁLNE A NABITÉ STACIONÁRNE FÁZY .....	18
1.2.1.2.2 ZWITTERIÓNOVÉ STACIONÁRNE FÁZY .....	20
1.2.2 MOBILNÉ FÁZY V HILIC .....	21
1.2.3 POROVNANIE KOLÓN PRE HILIC APLIKÁCIE .....	22
1.2.4 SEPARAČNÝ MECHANIZMUS V HILIC .....	24
1.2.5 APLIKÁCIE HILIC.....	25
2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	28
2.1 PRÍSTROJE A ZARIADENIA .....	28
2.1.1 KVAPALINOVÝ CHROMATOGRAF.....	28
2.1.2 KOLÓNY.....	28
2.1.3 OSTATNÉ ZARIADENIA.....	28
2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ŠTANDARDY .....	29
2.2.1 CHEMIKÁLIE.....	29



2.2.2	ŠTANDARDY .....	29
2.2.3	REÁLNE VZORKY .....	36
2.3	PRACOVNÝ POSTUP.....	37
2.3.1	PRÍPRAVA MOBILNEJ FÁZY .....	37
2.3.2	PRÍPRAVA ŠTANDARDOV .....	37
2.3.3	PODMIENKY MERANIA.....	37
3.	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	38
3.1	ASCENTIS EXPRESS OH5 KOLÓNA.....	38
3.1.1	FENOLICKÉ KYSELINY .....	39
3.1.2	FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY .....	40
3.1.3	NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY .....	41
3.1.4	REÁLNE VZORKY .....	42
3.2	ASCENTIS EXPRESSS HILIC KOLÓNA .....	43
3.2.1	FENOLICKÉ KYSELINY .....	43
3.2.2	FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY .....	44
3.2.3	NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY .....	44
3.2.4	REÁLNE VZORKY .....	45
4.	ZÁVER.....	46
5.	ZOZNAM LITERATÚRY .....	48

## ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

<b>Obrázok 1:</b> Rôzne typy profilov gradientu mobilnej fázy (i, ii - kontinuálny gradient s nulovou (i) a nenulovou (ii) počiatočnou koncentráciou 1 - lineárny, 2- konkávny, 3 - konvexný; iii - stupňovitý gradient; iv - lineárny gradient (1) nasledovaný obráteným lineárnym gradientom .....	15
<b>Obrázok 2:</b> Silanolové skupiny: 1-vicinálne silanolové skupiny, 2-geminálne silanolové skupiny, 3-siloxánové skupiny, 4-asociované silanolové skupiny, 5-izolovaná silanolová skupina .....	17
<b>Obrázok 3:</b> Amínové stacionárne fázy .....	19
<b>Obrázok 4:</b> Amidové stacionárne fázy .....	19
<b>Obrázok 5:</b> Diolové stacionárne fázy .....	19
<b>Obrázok 6:</b> Sulfobetainové a fosfocholínové fázy .....	20
<b>Obrázok 7:</b> Difúzna vodná vrstva .....	21
<b>Obrázok 8:</b> Porovnanie povrchovo poréznej častice ascentis express s celkovo poréznou časticou. ....	23
<b>Obrázok 9:</b> Separačný mechanizmus v HILIC .....	24
<b>Tabuľka 1:</b> Štandardy fenolických kyselín .....	29
<b>Tabuľka 2:</b> Štandardy flavonoidových zlúčenín .....	32
<b>Tabuľka 3:</b> Štandardy nukleových báz a nukleozidov .....	34

## ZOZNAM SKRATIEK

ACN	acetonitril
AMK	aminokyseliny
ATP	adenozíntrifosfát
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CD	cyklodextrín
CE	kapilárna elektroforéza
GABA	kyselina gama-aminomaslová
HILIC	kvapalinová chromatografia hydrofilných interakcií
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IC	iónová chromatografia
LC-MS	kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou
MF	mobilná fáza
NP LC	kvapalinová chromatografia v systéme s normálnymi fázami
RP LC	kvapalinová chromatografia v systéme s reverznými fázami
SPE	extrakcia na pevnej fázi
TEAP	trietylamónium fosfát
UHPLC	ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV	ultrafialová spektrometria

## ÚVOD

Hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC) je považovaná za rýchlo rastúcu sub-techniku HPLC, zameranú predovšetkým na separáciu polárnych zlúčenín, ktoré vykazujú slabú retenciu v kvapalinovej chromatografii s reverznými fázami.

Pojem „hydrofilná“ označuje afinitu k vode. HILIC sa teda dá charakterizovať ako chromatografická technika používajúca NP stacionárne fázy v kombinácii s RP mobilnými fázami, ktoré obsahujú viac ako 50 % organického rozpúšťadla vo vode. Stacionárnou fázou je teda polárny adsorbent. Typickou mobilnou fázou pre túto metódu je zmes acetonitrilu s relatívne nízkym (5 – 40 %) obsahom vody s nízkou koncentráciou pufru. HILIC metóda sa často využíva aj ako alternatíva k chromatografii v systéme s obrátenými fázami.

Rovnako ako väčšina nových techník, HILIC zažila pomalý štart, ale v posledných niekoľkých rokoch sa HILIC stala uprednostňovanou technikou v mnohých oblastiach vedy zahŕňajúcej separáciu polárnych zlúčenín ako sú lieky, toxíny, a vo vznikajúcich bioanalytických oblastiach, ako je glykomika, glykoproteomika a metabolomika.

V súčasnosti sa využíva aj jej spojenie s detekčnými technikami, napríklad v spojení s ESI-MS alebo UV, kde našla široké uplatnenie.

# 1. TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je termín popisujúci kvapalinovú chromatografiu, kde kvapalná mobilná fáza je mechanicky pumpovaná cez kolónu, ktorá obsahuje stacionárnu fázu. Prístrojové vybavenie HPLC zahŕňa dávkovacie zariadenie, pumpu, kolónu a detektor [1].

### 1.1.1 RETENČNÉ CHARAKTERISTIKY

Retenčné charakteristiky slúžia k vyjadreniu zadržania zložky v kolóne. Uvádzajú sa buď absolútne, pomocou časov alebo objemov, alebo relatívne, porovnávaním či už so štandardmi alebo inertom.

Základné retenčné veličiny sú teda retenčný čas a retenčný objem. Retenčný čas je definovaný ako doba, počas ktorej bola daná zložka v kolóne. Doplnkom k nemu je mŕtvy retenčný čas, ktorý predstavuje retenčný čas zložky, ktorý nie je v kolóne zadržovaný. To znamená, že sa pohybuje rovnako rýchlo ako mobilná fáza [2]. Každému retenčnému času prislúcha zodpovedajúci retenčný objem  $V_R$ , ktorý získame vynásobením retenčného času zložky objemovým prietokom  $F_m$ . Rovnako aj mŕtvemu retenčnému času zodpovedá mŕtvy retenčný objem  $V_M$ .

$$V_R = t_R F_m \quad (1)$$

$$V_M = t_M F_m \quad (2)$$

Kde  $t_R$  je retenčný čas,  $t_M$  - mŕtvy retenčný čas,  $V_R$  – retenčný objem,  $V_M$  – mŕtvy retenčný objem a  $F_m$  – objemový prietok.

Retenčný faktor  $k$  súvisí s distribučnou konštantou. Často býva označovaný aj ako kapacitný faktor či pomer. Dá sa vyjadriť pomocou nasledujúcich vzťahov:

$$k = K_D \frac{V_s}{V_m} \quad (3)$$

a

$$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{V_R}{V_M} - 1 \quad (4)$$

alebo pomocou redukovaného retenčného času a mŕtveho retenčného času [3-5]

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (5)$$

V chromatografii s reverznými fázami je často využívaný jednoduchý semilogaritmický model na opis účinku objemového podielu organického rozpúšťadla ( $\varphi$ ) na retenčom faktore ( $k$ ) vo vodno-organických mobilných fázach [6,7] :

$$\log k = \log K_D + \log \frac{V_s}{V_M} = a - m\varphi \quad (6)$$

kde parameter  $a$  predstavuje  $\log k$  vo vode, parameter  $m$  predstavuje silu organického rozpúšťadla.

V NP LC sa využíva vzťah :

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi = a - m \log \varphi \quad (7)$$

Trojparametrová rovnica však zlyháva pri veľmi nízkych koncentráciách vody ( $\varphi$  ( $H_2O$ ) < 0,02). Vzhľadom na to iná trojparametrová rovnica vykazuje lepšie výsledky [8]:

$$k = (a - b\varphi)^{-m} \quad (8)$$

Pre popis retencie od 0 do 100 % vody MF, môžeme využiť trojparametrovú rovnicu pre RP a štvorparametrovú rovnicu pre HILIC, kde  $m_{RP}$  je príspevok koncentrácie vody v retencii v RP a  $m_{HILIC}$  je efekt koncentrácie vody na klesajúcu retenciu [4]

$$\log k = a_1 + m_{RP} \cdot (H_2O) - m_{HILIC} \cdot \log \varphi(H_2O) \quad (9)$$

$$\log k = a_2 + m_{RP} \cdot (H_2O) - m_{HILIC} \cdot \log \varphi[1 + b \cdot \varphi(H_2O)] \quad (10)$$

Zloženie mobilnej fázy v minime krivky ( $\log k - \varphi$ ) – zodpovedá trojparametrovej rovnici

$$\varphi_{min} = 0,434 m_{HILIC} / m_{RP} \quad (11)$$

Zloženie mobilnej fázy v minime krivky ( $\log k - \varphi$ ) – zodpovedá štvorparametrovej rovnici [9]

$$\varphi_{min} = 0,434 \frac{m_{HILIC}}{m_{RP}} - \frac{1}{b} \quad (12)$$

### 1.1.1.1 ÚČINNOSŤ

Schopnosť separovať zložky v zmesi predstavuje účinnosť. Účinnosť rastie s počtom teoretických poschodí ( $n$ ) kolóny, ktoré vieme určiť zo šírky píku v jeho základni  $Y$  alebo zo šírky píku v polovici jeho výšky  $Y_{1/2}$  a retenčného času. Jedná sa o pomyselnú časť, kde sa ustáľuje rovnováha medzi oboma fázami [1, 3].

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{Y} \right)^2 \text{ alebo } N = 5.545 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 \quad (13,14)$$

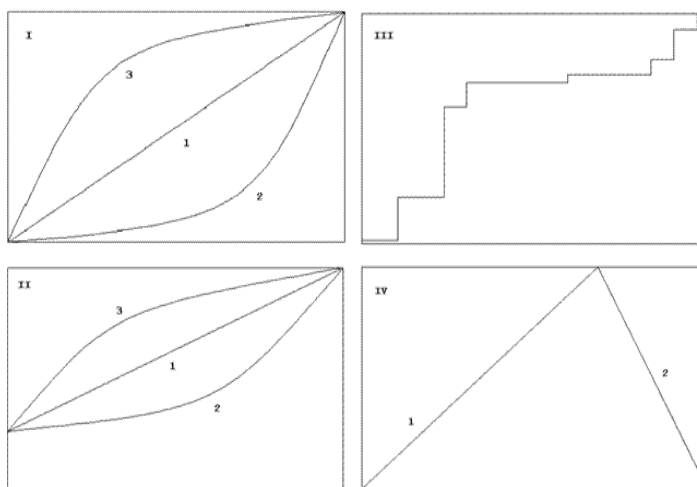
### 1.1.2 HPLC V SYSTÉMOCH S NORMÁLNymi A REVEZNÝmi FÁZAMI

- **Systémy s normálnymi fázami** – sú založené na interakcii analytu s polárnymi funkčnými skupinami na povrchu stacionárnej fázy, ktorá je najsilnejšia, ak sa ako mobilná fáza použijú nepolárne rozpúšťadlá. Využíva polárne adsorbenty ako je oxid kremičitý alebo alumina a nepolárne fázy založené na uhl'ovodíkoch ako je petroléter, chloroform.
- **Systémy s reverznými fázami** - odlišnosť od NP LC spočíva v relatívnej polarite stacionárnych a mobilných fáz. V tomto je mobilná fáza polárnejšia než stacionárna. Pevná stacionárna fáza, t.j. sorbent, je poväčšine nepolárna uhl'ovodíková fáza imobilizovaná na anorganickom nosiči. Široké uplatnenie majú chemicky viazané stacionárne fázy, napríklad nitrilové, alkylové reťazce C8, C18 na silikagéli. V porovnaní s kvapalnou stacionárnou fázou poskytujú vyššiu reprodukovateľnosť, stabilitu, separačnú účinnosť a možnosť využitia gradientovej elúcie. Mobilná fáza je obvykle vodný roztok s jedným alebo viacerými organickými rozpúšťadlami. Najčastejšie sa jedná o metanol, acetonitril alebo tetrahydrofurán. Pri separácii iónových, kyslých alebo bázických látok je potrebné pridať do mobilnej fázy pufo, neutrálne soli, slabé kyseliny alebo látky, ktoré vytvárajú iónové asociáty s ionizovanými rozpustenými látkami. Látky s nízkou polaritou môžu byť separované s organickou mobilnou fázou [10].

### 1.1.3 IZOKRATICKÁ A GRADIENTOVÁ ELÚCIA

Izokratická elúcia predstavuje separáciu pri konštantnom zložení mobilnej fázy počas celej doby separácie. Tento typ elúcie je jednoduchý a praktický, ale nie vždy sme schopní za pomoci izokratickej elúcie dosiahnuť uspokojivé separácie v rozumnom čase.

Gradientová elúcia predstavuje účinný spôsob separácie komplexných zmesí materiálov s veľmi rozdielnymi retenčnými vlastnosťami. V tradičnej gradientovej elúcii sa sila rozpúšťadla zvyšuje v priebehu elúcie či už lineárne alebo nelineárne, čiže všetky látky v zmesi eluátu poskytujú píky v relatívne krátkom čase. Pováčšine sa používa dvojzložkový gradient (binárny), kde jedna zložka má elučnú silu výrazne vyššiu ako tá druhá. Pojmom profil gradientu sa označuje časová zmena koncentrácie účinnej elučnej zložky v mobilnej fáze. Môže byť stupňovitý – predstavuje niekoľko naväzujúcich úsekov, kde má mobilná fáza konštantné zloženie, pričom koncentrácia účinnej elučnej zložky medzi nimi sa mení skokom. Spojitý gradient je charakterizovaný pomocou troch parametrov, a to počiatočnou koncentráciou  $c_0$  účinnej elučnej zložky, strmosťou gradientu  $b$  a tvarom gradientu. Na základe toho sa gradient delí na lineárny, konvexný a konkávny. Rôzne typy gradientu znázorňuje Obrázok 1 [3,11].



**Obrázok 1:** Rôzne typy profilov gradientu mobilnej fázy (I, II - kontinuálny gradient s nulovou (I) a nenulovou (II) počiatočnou koncentráciou 1 - lineárny, 2- konkávny, 3 - konvexný; III - stupňovitý gradient; IV - lineárny gradient (1) nasledovaný obráteným lineárnym gradientom [3])



## 1.2 KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA HYDROFILNÝCH INTERAKCIÍ

Kvapalinová chromatografia hydrofilných interakcií (HILIC) bola zavedená Alpertom v roku 1990. Jedná sa o metódu, kde polárna stacionárna fáza je použitá v spojení s mobilnou fázou obsahujúcou zmes so značným množstvom vody (minimálne 2,5 %) a menej polárne rozpúšťadla (> 70 % ACN). Veľa rokov bola používaná pre separáciu sacharidov.

Je alternatívou pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC) pre separáciu polárnych zlúčenín. HILIC sa často uvádza ako varianta kvapalinovej chromatografie s normálnymi fázami (NP LC), ale separačný mechanizmus používaný v HILIC je komplikovanejší ako u NP LC. Ako v NP LC, HILIC využíva tradičné polárne stacionárne fázy, ako napríklad silikagél, amino a cyano, ale mobilnú fázu využíva podobnú ako u kvapalinovej chromatografii s reverznými fázami (RP LC). HILIC tiež umožňuje analýzy nabitých látok podobne ako v iónovej chromatografii (IC).

HILIC má niekoľko špecifických výhod oproti konvenčným NP LC a RP LC. Napríklad je vhodný pre analýzu zlúčenín v zložitých systémoch, ktoré vždy eluujú v blízkosti mŕtveho objemu v chromatografii reverzných fází. Polárne vzorky vždy vykazujú dobrú rozpustnosť vo vodnej mobilnej fáze, použitej v HILIC, čo prekonáva nevýhody zlej rozpustnosti, s ktorou sa stretávame u NP LC. U tejto metódy sa nevyžadujú drahé ión párové činidlá, môže byť ľahko spojená s hmotnostnou spektrometriou, kde sa hlavne využíva ionizácia elektrosprejom. Na rozdiel od RP LC, gradientová elúcia v HILIC začína s nízkou polaritou organického rozpúšťadla a eluuje polárne analyty zvýšením polárne vodného obsahu [12-17].

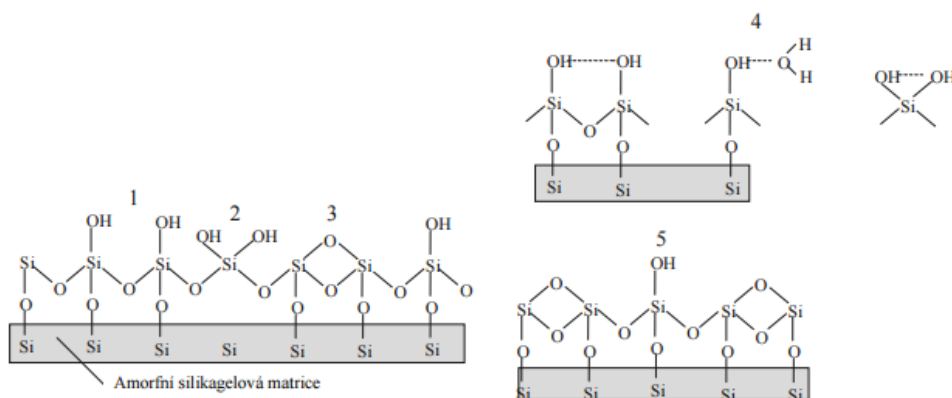
### 1.2.1 STACIONÁRNE FÁZY V HILIC

Akkoľvek polárne fázy, ktoré sú schopné zadržiavať vodu, môžu byť použité v HILIC móde. Prvé aplikácie boli prevedené na NP LC fázach, ako napríklad na amino a silikagélových fázach, a neviazané silikagélové fázy patria stále medzi najviac používané fázy v HILIC separáciách. S narastajúcim záujmom o analýzu polárnych zlúčenín boli vyvinuté nové funkčné stacionárne fázy, ktoré sú vhodné pre široký rozsah aplikácií. Mnohé z HILIC viazaných fází sú na báze silikagélu a pripravujú sa derivatizáciou povrchu silikagélu s polárnymi skupinami [18].

### 1.2.1.1 SILIKAGÉL

Silikagél je najrozšírenejší polárny anorganický sorbent, ktorý obsahuje poréznu amorfnú formu zloženú z  $\text{SiO}_2 \times x\text{H}_2\text{O}$ . Voda sa chemicky viaže za vzniku silanolových skupín Si-OH. Na povrchu silikagélu sa nachádzajú aktívne centrá a to hydroxylové alebo spomínané silanolové skupiny, ktoré zobrazuje obrázok 2. Silanolové skupiny zabezpečujú polárny charakter povrchu silikagélu a vzhľadom na ich reaktivitu, sa využívajú k príprave chemicky viazaných fází. Silanolové skupiny môžu byť buď izolované, vicinálne, geminálne a v prípade vhodnej polohy môžu byť susedné skupiny viazané vodíkovými väzbami, ako znázorňuje obrázok 6. Spôsob spracovania silikagélu udáva rozmiestnenie silanolových skupín na jeho povrchu.

V dôsledku prítomnosti silanolových skupín je povrch silikagélu kyslý a má vlastnosti iónového meniča. Vzhľadom na to, u pufrovaných mobilných fází nastáva výmena protónov silanolových skupín za kationy samotného pufru. Závisí to predovšetkým na pH mobilnej fázy. Silikagél zadržiava hlavne bázické látky, menej kyslé a neutrálne, a tiež môže spôsobovať chvostovanie píkovo bázických látok. V tomto prípade je jednoduchým riešením pridať do mobilnej fázy slabú organickú bazu, avšak pH mobilnej fáz nesmie presiahnuť hodnotu 8, aby nedochádzalo k rozpúšťaniu silikagélu [19].



**Obrázok 2:** Silanolové skupiny: 1-vicinálne silanolové skupiny, 2-geminálne silanolové skupiny, 3-siloxánové skupiny, 4-asociované silanolové skupiny, 5-izolovaná silanolová skupina [34]

Nemodifikovaný silikagél má tri základné typy A, B a C. Silikagél typu A, ktorý je pripravovaný zrážaním z roztokov silikátov, je kyslý z dôvodu znečistenia niektorými kovmi, ktoré aktivujú povrch silanolovej skupiny a vytvára komplexy s niektorými chelatovými rozpúšťadlami, čo spôsobuje silnú retenciu alebo asymetrickosť píkovo. Silikagél typu B je

tvorený agregáciou kremičitých solov vo vzduchu. Môžu obsahovať malé množstvo kovov, sú stabilnejšie pri strednom až vyššom pH (až do pH 9). Posledný typ C s hydrosilovaným povrchom je naplnený nepolárnym hydridom kremíka Si-H skupín a má odstránených viac ako 95% pôvodného silanolu, čo ho robí menej polárnym ako silikagél s väčšou populáciou silanolových skupín. Využíva sa k separácii kyselín alebo báz v HILIC móde v pufrovanej mobilnej fázi obsahujúcej viac ako 50-70 % organického rozpúšťadla (napr. acetonitril) [13,16,20].

### **1.2.1.2 CHEMICKY MODIFIKOVANÉ FÁZY**

Polárne chemicky modifikované stacionárne fázy na báze silikagélu vznikajú chemickou modifikáciou povrchu silikagélu reakciou s trialkoxysilanom, obsahujúcim polárne a alkylové skupiny. HILIC stacionárne fázy sú klasifikované na základe náboja funkčných skupín, a môžu byť rozdelené na neutrálne, nabité a zwitteriónove fázy [18,21].

#### **1.2.1.2.1 NEUTRÁLNE A NABITÉ STACIONÁRNE FÁZY**

Neutrálne stacionárne fázy obsahujú polárne funkčné skupiny, ktoré nie sú v nabitej forme. Ich pH sa pohybuje v rozmedzí 3-8, preto nemôžu poskytnúť iónovo výmenné interakcie s akýmkoľvek typom analytu. Vzhľadom na to je HILIC retencia v tomto prípade sprevádzaná hydrofilnými interakciami. Väčšina z HILIC stacionárnych fáz patrí do tejto kategórie, pričom obsahuje veľké množstvo funkčných skupín, ako napríklad amiín, amid, aspartamid, diol, cyklodextrin alebo sacharidy [16,22,23].

Nabité stacionárne fázy naopak obsahujú polárne funkčné skupiny, ktoré nesú pozitívny alebo negatívny náboj, ktorý závisí na pH mobilnej fázy. Vzhľadom na to, separácia nabitých analytov je z veľkej časti založená na iónovo výmennom mechanizme v kombinácii s hydrofilným rozdeľovaním [24].

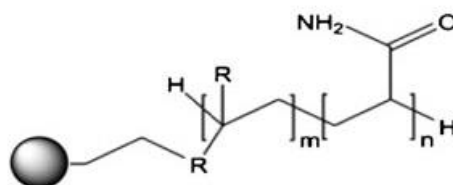
Aminové stacionárne fázy (Obrázok 3) patria medzi najstarší typ, ktorý je stále často využívaný v HILIC móde pre separáciu cukrov, aminokyselín, peptidov, karboxylových kyselín, nukleosidov a niektorých farmaceutických látok. Stacionárne fázy, ktoré obsahujú sekundárne alebo terciárne aminové skupiny, ako je YMC Pack Polyamine II, nemôže tvoriť Schiffove bázy s karbonylovými zlúčeninami, ktoré môžu viesť k zlepšeniu životnosti s ohľadom na aminopropyl oxidu kremičitého [18,25]. Aromatické aminové stacionárne fázy

viazané na oxide kremičitom, dostupné pod značkou Epic HILIC-PI poskytujú symetrické tvary signálov a krátku dobu separácie v HILIC separácii polárnych amínov alebo kyselín.



**Obrázok 3:** Amínové stacionárne fázy [22]

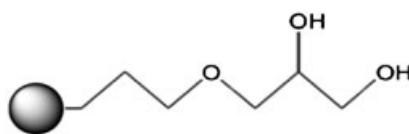
Amidové fázy, znázornené na Obrázku 4, sú pripravované funkcionalizáciou povrchu silikagélu s karbamoylovými alebo amidovými skupinami spojenými cez alkylový medzerník. Využívajú sa hlavne pre separáciu oligosacharidov a peptidov [21].



**Obrázok 4:** Amidové stacionárne fázy [23]

Aspartamidové fázy sú polymérne fázy, ktoré sa pripravujú viazaním vrstvy polysukcínimidu na aminopropylový oxid kremičitý, a následnou reakciou polyméru s etanolamínom pre vytvorenie konečnej stacionárnej fázy. Takáto fáza má využitie v separácii malých polárnych zlúčenín, proteínov a peptidov [22].

Diolové fázy (Obrázok 5) obsahujú 2,3-dihydroxypropylové ligandy, ktoré vykazujú hydrogén-donorovú aj akceptorovú aktivitu cez -OH skupinu. Sú pripravované spájaním glycidoxypropyltrimetoxysilanu na povrch silikagélu, s následnou hydrolyzou epoxidových skupín. Tieto fázy sa používajú pre analýzu proteínov, polárnych metabolitov a vitamínov.



**Obrázok 5:** Diolové stacionárne fázy [22]

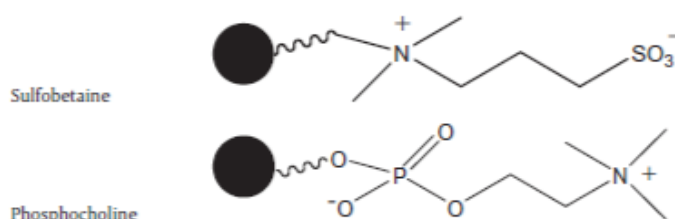
Cyklodextríny patria medzi cyklické oligosacharidy, ktoré môžu obsahovať 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) alebo 8 ( $\gamma$ -CD) D-glukózových jednotiek v toroidnom kruhu s relatívne hydrofóbnymi dutinami. CD sa často využívajú ako chirálne prísady do mobilnej fázy v LC alebo ako pracovné elektrolyty v CE, prípadne ako chemicky viazané funkčné skupiny

v chirálnych stacionárnych fázach pre enantioselektívne separácie. Cyklodextríny na báze oxidu kremičitého, pripravované imobilizáciou pomocou amínu, uretanu alebo éterovými väzbami sú užitočné pre chromatografické separácie enantiomérov pomocou RP alebo v polárnom organickom režime. Využívajú sa tiež v HILIC režime pre separáciu alkoholov, monosacharidov a oligosacharidov s 1-8 monosacharidovými jednotkami v 70 % acetonitrile ako MF [18,21,26].

### 1.2.1.2.2 ZWITTERIÓNOVÉ STACIONÁRNE FÁZY

Zwitteriónové fázy patria medzi relatívne novú triedu polárnych stacionárnych fází, využívaných na HILIC separáciu. Obsahujú aj pozitívne aj negatívne skupiny, čo poskytuje dobrú možnosť zmeniť separačnú selektivitu [27,28].

Typickým príkladom je sulfobetainová fáza, ktorá sa využíva hlavne na separáciu anorganických solí a malých iónových zlúčenín, ale našla uplatnenie aj v HILIC. Jedná sa o štiepený polymér s 3-sulfopropyldimetylalkylamóniom buď na pórovitom oxide kremičitom alebo na báze polyméru, pričom má aj kladne nabitú (kvartérny amónium) a aj negatívne nabitú (sulfónová kyselina) skupiny v pomere 1:1. Podobnou fázou je fosfocholínová fáza, ktorá je tiež založená na štiepení polyméru s zwitteriónovými fosfocholínovými skupinami. Oba typy sú znázornené na Obrázku 6. Rozdiel medzi nimi spočíva v tom, že negatívne nabitá sulfonátová skupina je na distálnom konci sulfobetainovej fázy, zatiaľ čo pozitívne nabitá kvartérna amóniová skupina je na distálnom konci fosfocholínovej fázy [22].



**Obrázok 6:** Sulfobetainové a fosfocholínové fáze [22]

Hu a spol. v roku 1993 [29] pripravili zwitteriónové kolóny s zwitteriónovou povrchovo aktívnou vrstvou na povrchu C18 (oktadecylsilika) pre súčasnú separáciu katiónov a aniónov s využitím čistej vody ako mobilnej fázy. Zároveň navrhli aj koncept elektrostatickej iónovej chromatografie (EIC).

Jiang a spol. [30] naviazali zwitteriónový 2-dimetyl taurín na metylakrylát polymérnej matrice. Stacionárna fáza bola schopná separovať anióny a katióny samostatne alebo súčasne v širokom rozmedzí pH s kyselinou chloristou ako mobilnou fázou.

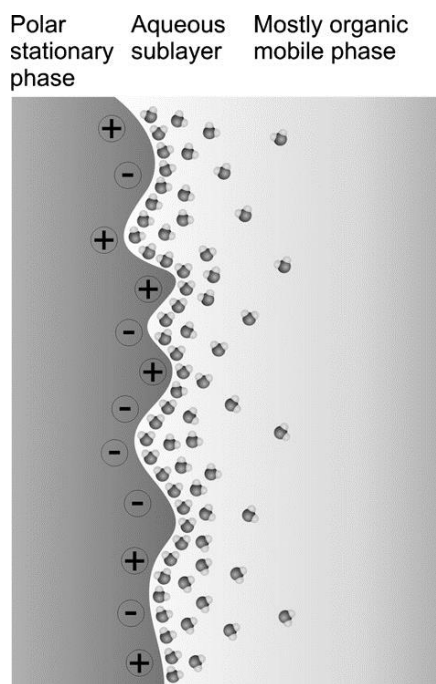
Cook a spol. [31] syntetizovali niektoré zwitteriónové náplne reguláciou polohy kladne a záporne nabitých funkčných skupín, priestorovým usporiadaním, pomerom, a dosiahli tým separácie katiónov a aniónov.

Nesterenko a spol. [32] pripravili poly (kyselina asparágová) funkčné skupiny oxidu kremičitého ako nové zwitteriónové fázy.

### 1.2.2 MOBILNÉ FÁZY V HILIC

HILIC na polárnych stacionárnych mobilných fázach využíva organické mobilné fázy, zvyčajne obsahujúce 5-40 % vody alebo pufru ( mravčan amónny alebo octan amónny). Spomenuté iónové prísady sa využívajú ku kontrole pH mobilnej fázy a iónovej sily. V HILIC môžu tiež prispieť k polarite analytu, čo má za následok diferenciálnu zmenu v retencii.

Zo zmiešanej vodne-organickej mobilnej fázy sa voda silne adsorbuje na povrch polárnych adsorbentov alebo viazaných fáz, a to buď nabitá alebo nenabitá. V mobilných fázach, ktoré obsahujú viac ako niekoľko stoviek ppm vody, adsorbcia spôsobuje vytvorenie difúznej vodnej vrstvy na povrchu stacionárnej fázy, čo znázorňuje Obrázok 7.



Obrázok 7: Difúzna vodná vrstva [18]

Výber vhodného organického rozpúšťadla má silný efekt na retenciu v HILIC režime. Elučná sila organického rozpúšťadla narastá jednak v poradí narastajúcej polariry rozpúšťadla a aj podľa schopnosti zúčastňovať sa protón-donorových či protón-akceptorových interakcií. Poradie je teda nasledovné: metanol > etanol > 2-propanol > tetrahydrofurán > acetonitril. Typickou mobilnou fázou pre HILIC je acetonitril s malým množstvom vody. HILIC separácie sa uskutočňujú buď v režime izokratickom s vysokým % organického rozpúšťadla, alebo pomocou gradientu, začínajúceho s vysokým % organického rozpúšťadla a končiaceho s vysokým % vodného rozpúšťadla [16,18,33].

### 1.2.3 POROVNANIE KOLÓN PRE HILIC APLIKÁCIE

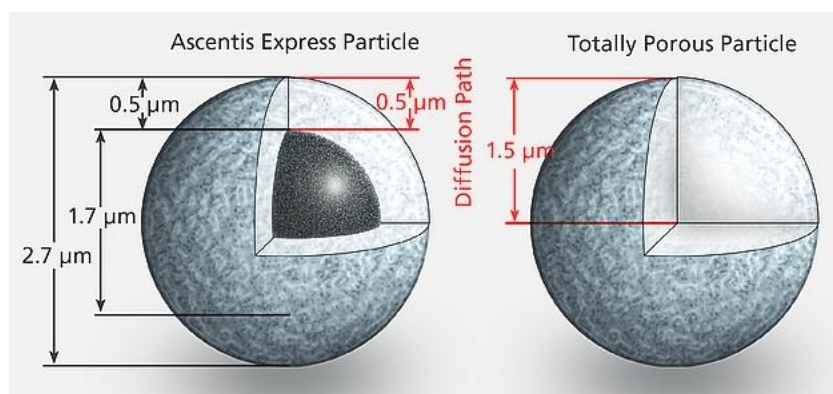
Okrem podstatných rozdielov v retencii a selektivite, rôzne typy HILIC kolón vykazujú významné rozdiely v účinnosti. Porovnanie je zhrnuté v nasledujúcich bodoch.

- Užitočnosť klasických jednoduchých silikagélových a aminopropyl-silica kolón je limitovaná, vzhľadom na silnú adsorpciu viacerých typov polárnych zlúčenín.
- (Poly)sukcinimidové viazané fázy vykazujú vhodnú retenciu pre široké rozmedzie analytov, ale relatívne nízku separačnú účinnosť.
- Kolóny s amidovými fázami sú odporúčané pre účinnú a rýchlu separáciu vysoko polárnych látok.
- Sulfobetáinové kolóny sú vhodné pre separáciu širokého rozmedzia polárnych analytov, avšak pri vysokých prietokoch separačná účinnosť klesá.
- Kolóny plnené časticami silikagélu modifikovaného sacharidmi, vykazujú dobrú účinnosť pre separácie oligosacharidov a aj pre niektoré chirálne separácie v HILIC režime.
- Monolitické kolóny na bázy silikagélu všeobecne vykazujú nižšiu separačnú účinnosť v HILIC aplikáciách ako alkyl-silica monolity v RP LC.
- HILIC kolóny plnené časticami menšími ako 2  $\mu\text{m}$  alebo s povrchovo poréznymi časticami sú veľmi sľubné pre vysoko účinnú rýchlu HILIC separáciu [18].

Rýchla separácia môže byť dosiahnutá použitím krátkych kolón plnených malými časticami. Rýchlosť separácie narastá s vyšším prietokom mobilnej fázy, ale zároveň je to sprevádzané buď znížením rozlíšenia alebo zvýšením prevádzkového tlaku. Extrémne rýchlu

účinnú separáciu zabezpečujú kolóny plnené časticami pod  $2\ \mu\text{m}$  v ultra vysoko účinnej kvapalinovej chromatografii (UHPLC). Alternatívou je tiež použitie kolón plnených neporéznymi alebo povrchovo poréznymi časticami.

Povrchovo porézne častice môžu mať rôzne rozmery napríklad  $1,6\ \mu\text{m}$ ,  $2,6$  alebo  $2,7\ \mu\text{m}$  a  $5\ \mu\text{m}$ . Vzhľad povrchovo poréznej častice zobrazuje Obrázok 8. Typickým príkladom povrchovo poréznej kolóny je Ascentis Express OH5 kolóna, ktorá má povrchovo porézne častice, ktoré pozostávajú z neporézneho jadra ( $1,7\ \mu\text{m}$ ) a z vrstvy porézneho silikagélu so šírkou  $0,5\ \mu\text{m}$ . Celkový priemer častice je teda  $2,7\ \mu\text{m}$ . Až 75% celkového objemu častice predstavuje povrchovo porézna vrstva.



**Obrázok 8:** Porovnanie povrchovo poréznej častice Ascentis Express s celkovo poréznuou časticou. [20]

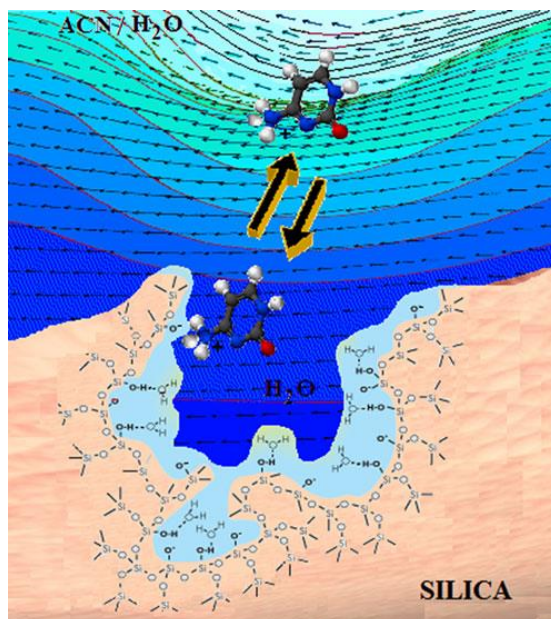
Takýto typ kolón sa využíva pre štandardné HPLC separácie. V prípade vyšších prietokov je nutné použiť UHPLC, ktorá umožňuje pracovať s vyššími tlakmi. Tlak na kolónach plných takýmto materiálom je teda nižší oproti kolónam s neporéznymi sorbentami, ale sorpčná kapacita je väčšia [34].

Účinnosť chromatografického systému je výrazne lepšia využitím takýchto povrchovo poréznych častíc v porovnaní s celkovo poréznymi časticami, a to aj v RP a aj v HILIC. Dá sa to vysvetliť van Deemterovou rovnicou. Keďže častice majú pevné jadro, axiálna difúzia je menšia a znižuje sa aj odpor proti prevodu hmoty (faktor C) cca o 25 %. Toto zníženie umožňuje používať vyššie prietoky mobilnej fázy bez straty chromatografickej účinnosti. Difúziou prekonaná vzdialenosť v stagnantnej mobilnej fázy vo vnútri pórov je kratšia ako  $0,5\ \mu\text{m}$ . Zároveň je znížená aj vírivá difúzia (faktor A) cca o 20 % [19].



## 1.2.4 SEPARAČNÝ MECHANIZMUS V HILIC

Separáčny mechanizmus v HILIC režime nie je stále úplne objasnený. Existujú tri možné spôsoby ako popísať separáčny mechanizmus. Prvý spôsob využíva rozdeľovanie analytu medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Druhý spôsob je adsorpcia analytu na povrch adsorbentu. Posledný spôsob predstavuje preferenčnú adsorpciu modifikátoru organickej mobilnej fázy na povrch adsorbentu, pričom je to doprevádzané rozdeľovaním tohto analytu do adsorbovanej vrstvy. Retenčný fenomén v HPLC zároveň závisí od rôznych typov medzimolekulárnych interakcií medzi rozpúšťadlom a stacionárnou fázou, rozpúšťadlom a mobilnou fázou, a stacionárnou a mobilnou fázou. Medzimolekulárne interakcie zahŕňajú jednak chemické (vodíkové väzby, donorové-akceptorové interakcie), fyzikálne (napr. ión-dipólové, dipól-dipólové), Van der Waalsové sily a hydrofóbné interakcie. V ideálnom prípade je separácia v HILIC riadená hydrofilnými interakciami medzi solutom a polárnou stacionárnou fázou. Súčasná teória predpokladá že HILIC retencia je spôsobená rozdeľovaním. V tomto režime je separáčny mechanizmus založený na rôznej distribúcii nadávkovaného analytu medzi acetonitrilovú mobilnú fázu a vodou obohatenú vrstvou naadsorbovanú na hydrofilnú stacionárnu fázu, čo znázorňuje Obrázok 9.



Obrázok 9: Separáčny mechanizmus v HILIC [16]

Platí, že čím viac je analyt hydrofilný, tým viac je rozdeľovacia rovnováha posunutá smerom k nepohyblivej vodnej vrstve na stacionárnej fáze, a vzhľadom na to je analyt o to viac zadržovaný. Inak povedané, separácia je založená na polarite zlúčenín a na hydratačnom stave.

Existujú štúdie, ktoré poukazujú na multimodálny separačný mechanizmus. Alpert [12] uvažoval, že aj dipól-dipólové interakcie a vodíkové väzby môžu prispieť k rozdeleniu na vrstvu stacionárnej fázy. Poznamenal, že náboj základnej skupiny v roztoku viedol k označovanej hydrofilicite a retencii. To znamená, že tieto interakcie významne prispievajú k mechanizmu separácie.

Yoshida [23] sa podobne domnieval, že HILIC retencia zahŕňa jednak vodíkové väzby (závisí na Lewisovej acidite / bazicite) a tiež dipól-dipólové interakcie (závisia na dipólových momentoch a na polarizovateľnosti molekúl) [35-41].

### 1.2.5 APLIKÁCIE HILIC

Metóda HILIC má široké uplatnenie či už v analýze malých polárnych látok zahŕňajúcej biomarkery, nukleosidy, nukleotidy/oligonukleotidy, aminokyseliny, peptidy a proteíny, sacharidy, glykosidy, oligosacharidy, hydrofilné drogy, alkaloidy, karbohydráty a ďalšie málo polárne látky alebo ionizovateľné zlúčeniny, ktoré prispievajú do oblasti farmaceutickej chémie, proteomiky, metabolomiky, medicíny, poľnohospodárskej a potravinárskej chémie. Režim HILIC sa používa intenzívne k separácii biomolekúl na základe rozdielnej polarity a tiež organických a anorganických molekúl.

Využíva sa aj jej kombinácia s rôznymi detekčnými technikami ako napríklad s UV, fluorescenciou a hmotnostnou spektrometriou (MS). Okrem toho táto metóda je vhodná pre citlivé LC-MS analýzy vo vode rozpustných zlúčenín, pretože vysoký obsah organických látok v mobilnej fáze vedie k rýchlemu odpareniu rozpúšťadla pri ionizácii elektrosprejom. Oproti RP LC môže poskytnúť až desaťnásobné zvýšenie citlivosti [16,42-44].

Separácia peptidov patrí medzi prvé aplikácie HILIC a bola preukázaná prakticky na všetkých bežne používaných stacionárnych fázach v HILIC. Yoshida [45] preskúmal aplikácie HILIC na separáciu peptidov. V prípade separácie peptidov v HILIC režime sa bežne používa PolyHydroxyethyl A kolóna v kombinácii s TEAP (trietylamónium fosfát) pufrom a vysokou koncentráciou organického rozpúšťadla. Ako uvádza článok, peptidy separované za týchto podmienok nemusia byť ľahko izolované, pretože mobilná fáza obsahuje neprchavé soli. Na druhej strane, ľahká izolácia peptidov sa dá dosiahnuť v režime HILIC použitím kolóny TSKgel Amid-80 v kombinácii s prchavou mobilnou fázou [46].

Biomarkery sú malé endogénne molekuly zahŕňajúce neurotransmitery a metabolické produkty, ako sú AMK, peptidy a sacharidy prítomné pri nízkych koncentráciách v komplexných matriciach. HILIC-MS/MS poskytuje alternatívny prístup pre kvantifikáciu

biomarkerov, ktorý nevyžaduje derivatizáciu, a má selektívnu a citlivú detekciu. Kvantifikované boli biomarkery ako dimetylarginín, ornitón, GABA (kyselina gama-aminomaselná), acetylcholíin, kyselina metylalónová a iné [46].

Nováková a spol. [47] použili 1,7 mm kolónu a okyslenú vodno-metanolovú mobilnú fázu na oddelenie 29 katechínov, flavonoidov a fenolických kyselín za dvadsať minút.

Gomez-Romero a spol. [48] identifikovali 135 fenolických zlúčenín (pričom 21 z nich bolo nových) v rôznych paradajkových pretlakoch použitím 46-minútovej gradientovej analýzy na 150 mm . 1,8  $\mu$ m kolóne pri 31°C.

Trautvetter a spol. [49] použili kombináciu 1,7 mm kolóny s Q-TOF-MS na identifikáciu 37 fenolických kyselín a flavonoidov v rôznych vzorkách medu za použitia gradientu.

Gruz a spol. [50] úspešne charakterizovali a kvantifikovali 17 rôznych fenolických kyselín v rôznych nápojoch v priebehu 10 minút za použitia 1,7 mm kolóny C18 s MS/MS detekciou.

Lou a spol. [51] použili opäť kombináciu 1,7 mm C18 kolóny a MS/MS detekcie s okyslenou vodno-metanol-acetonitrilovou MF k dosiahnutiu dobrej separácie fenolických kyselín a flavonoidov v listoch lopúcha.

Stanovenie nukleových báz, nukleozidov a nukleotidov našlo uplatnenie v biológii, v potravinárstve a medicíne.

Chen a kol. [52] identifikovali a kvantifikovali 14 nukleozidov a nukleových báz. Separácia prebiehala na kolóne TSKgél Amid 800 so zmesou acetonitrilu a 10 mM vodného octanu amónneho ako MF s prietokom 0,2 ml/min.

Tuytten a spol. [53] navrhli online systém vytvorený kopuláciou aprotickej chromatografie na bórovej kyseline s hydroxylovanou HILIC kolónov na stanovenie piatich nukleozidov vo vzorkách moču.

Goutier a spol. [54] prezentovali po prvý krát úspešný vývoj, validáciu a aplikáciu novej, robustnej, senzitivity HILIC-MS/MS metódy pre súčasné stanovenie dvoch nukleotidov, ATP (adenozíntrifosfát) a cAMP (cyklický adenosín monofosfát), v biologických vzorkách na štúdium receptorovej aktivity s použitím ZIC-pHILIC kolóny.

Zhao a spol. [55] navrhli určenie 7 nukleových báz a 9 nukleozidov v liečivých látkach morských živočíchov, využívajúc komerčnú Venusil HILIC kolónu. Inoue a spol. [56] stanovili 5 nukleotidov v dojčenskej výžive použitím TSK-Gel-NH<sub>2</sub>-100 kolóny.

Langrock a spol. [57] demonštrovali využitím HILIC separáciu 16 proteínogénnych aminokyselín v priebehu 25 minút s použitím amidovej kolóny spojennej s ESI-MS-MS.

HILIC je možné využiť aj na stanovenie látok priamo v ľudskom sére, pričom sa tu nevyžadujú veľké úpravy vzoriek. Kvantitatívne stanovenie aminoglykosidov ako napríklad amikacín, gentamycín, kanamycín, neomycín, tobramycín a paranomycín, bolo prevedené s HILIC v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou. Spomenuté vzorky boli pripravené automatizovanou SPE [58].

Ruta a spol. [59] vyhodnocovali výkonnosť core-shell častíc na rade farmaceuticky významných zlúčenín. Analyzovaná zmes 13 analytov vrátane základných liečiv a kyslých zlúčenín bola skúmaná použitím kolóny plnenej rôznymi core-shell a sub-2 m časticami. Fekete a Guillaume opísali použitie 1,3 m core-shell častíc pre separáciu malých molekúl a peptidov.

Keďže použitie povrchovo poréznych častíc je pomerne nedávny trend v chromatografii, ich použitie v oblastiach ako je potravinová analýza sa ešte stále objavuje. Niektoré príklady zahŕňajú stanovenie toltrazurilu a jeho metabolitov, kortikosteroidy, chloramfenikol a flavonoidy v potravinách a detekcia neonikotínoidov vo včelom vosku. Ďalšie použitie povrchovo poréznych kolón je v detekcii kontaminantov pochádzajúcich z obalov potravín, ako napríklad migrácia zlúčenín. Jedná sa napríklad o detekciu zlúčeniny bisfenolu v nealkoholických nápojoch a konzervovaných potravinách s použitím LC-MS/MS [60].

Ďalšie uplatnenie majú povrchovo porézne kolóny v analýze vzoriek vody, či už pitnej alebo povrchovej. Detekované sú antibiotiká, estrogény, liečivá, pesticídy a herbicídy. Zhang a spol. [61] predložili alternatívnu SPE a HPLC-MS/MS metódu na analýzu rady herbicídov v prírodnej vode. Chocholouš a spol. [62] skúmali výhody fused-core technológie pri stanovení fenolických kyselín s použitím s použitím sekvenčnej injekčnej chromatografie.

## **2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **2.1 PRÍSTROJE A ZARIADENIA**

#### **2.1.1 KVAPALINOVÝ CHROMATOGRAF**

Merania boli prevedené na kvapalinovom chromatografe Agilent 1200 Rapid Resolution (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), ktorý pozostával z častí: zásobník rozpúšťadiel, mikrovákuový degaser, binára pumpa SL, vysokoúčinný autosamplér SL, termostat kolón SL a detektor SL.

#### **2.1.2 KOLÓNY**

- Ascentis Express OH5 (SUPELCO, Bellefonte, PA 16823 USA)  
rozmer: 5  $\mu\text{m}$ , 3 cm x 2,7 mm  
sériové číslo: USZQ001252
  
- Ascentis Express HILIC (SUPELCO, Bellefonte, PA 16823 USA)  
rozmer: 2,7  $\mu\text{m}$ , 3 cm x 3 mm  
sériové číslo: TS1252

#### **2.1.3 OSTATNÉ ZARIADENIA**

- analytické váhy HR-120 ( Helado s.r.o., Hradec Králové, Česká republika )
- pH meter pH 211 ( Schott, Mainz, Nemecko )
- ultrazvukový kúpeľ UC 405 BJ1 ( Tesla, Praha, česká republika)

## 2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ŠTANDARDY

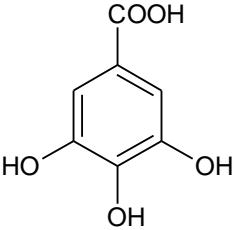
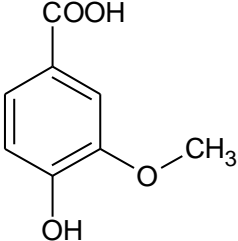
### 2.2.1 CHEMIKÁLIE

- acetonitril gradient grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- octan amónny  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- kyselina mravčia  $\geq 96\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- acetón  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- toluén  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- uracil  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- metanol  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
- redestilovaná voda (Milli-Q Reference Water Purification System, Millipore SAS, Molsheim, Francúzsko)

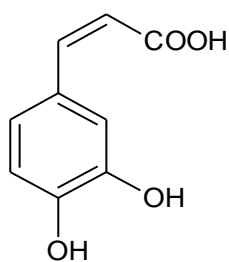
### 2.2.2 ŠTANDARDY

- fenolické kyseliny (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Tabuľka 1: Štandardy fenolických kyselín

FENOLICKÉ KYSELINY			
ŠTANDARD	SUMÁRNY VZOREC	M (g/mol)	ZNAČENIE
<b>K. GALLOVÁ</b> 	$C_7H_6O_5$	170,12	GALL
<b>K. VANILOVÁ</b> 	$C_8H_8O_4$	168,15	VAN

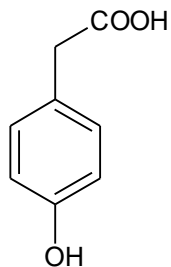
---

**K. KAVOVÁ** $C_9H_8O_4$ 

180,16

KAV

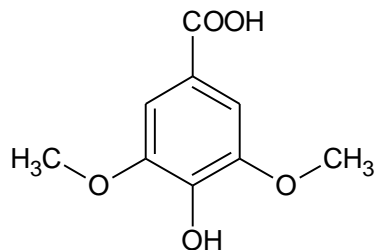
---

**K. 4-HYDROXY  
FENYLOCTOVÁ** $C_8H_8O_4$ 

152,15

HPA

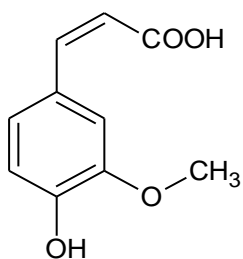
---

**K. SYRINGOVÁ** $C_9H_{10}O_5$ 

198,17

SYR

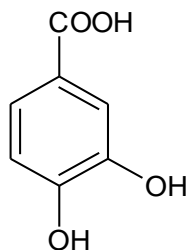
---

**K. FERULOVÁ** $C_{10}H_{10}O_4$ 

194,18

FER

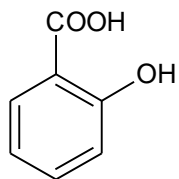
---

**K. PROTOKATECHOVÁ** $C_7H_6O_4$ 

154,12

PRO

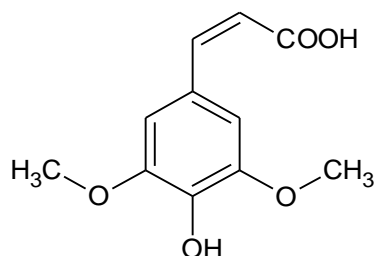
---

**K. SALICYLOVÁ** $C_7H_6O_3$ 

138,12

SAL

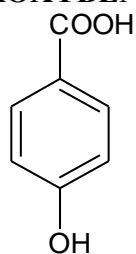
---

**K. SINAPOVÁ** $C_{11}H_{12}O_5$ 

224,21

SIN

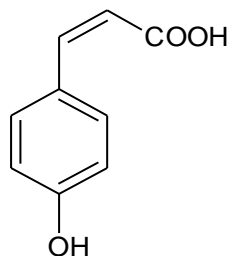
---

**K. HYDROXYBENZOOVÁ** $C_7H_6O_3$ 

138,121

PHB

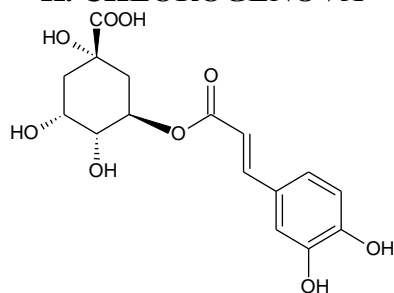
---

**K. p-KUMAROVÁ** $C_9H_8O_3$ 

164,16

KUM

---

**K. CHLOROGÉNOVÁ** $C_{16}H_{18}O_9$ 

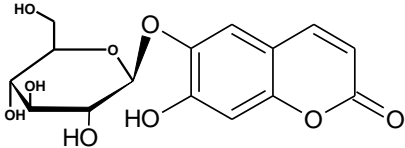
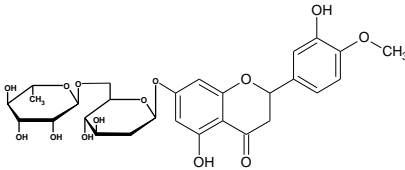
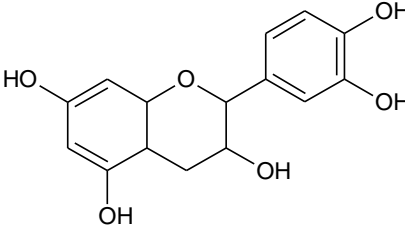
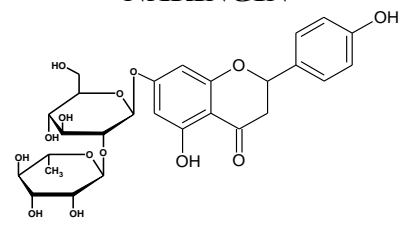
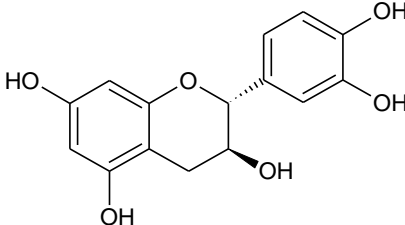
354,31

CHLG

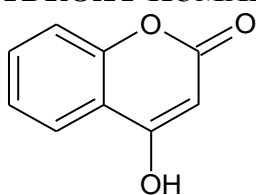


➤ flavonoidové zlúčeniny (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Tabuľka 2: Štandardy flavonoidových zlúčenin

FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY			
ŠTANDARD	SUMÁRNY VZOREC	M (g/mol)	ZNAČENIE
<p><b>ESKULÍN</b></p> 	$C_{15}H_{16}O_9$	340,282	ESK
<p><b>HESPERIDÍN</b></p> 	$C_{28}H_{34}O_{15}$	610,57	HES
<p><b>EPIKATECHÍN</b></p> 	$C_{15}H_{14}O_6$	290,27	EPI
<p><b>NARINGÍN</b></p> 	$C_{27}H_{32}O_{14}$	580,54	NAR
<p><b>KATECHÍN</b></p> 	$C_{15}H_{14}O_6$	290,27	KAT

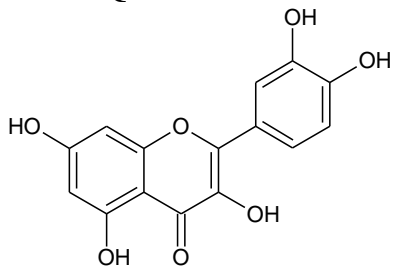
---

**4-HYDROXY KUMARÍN** $C_9H_6O_3$ 

162,14

HKUM

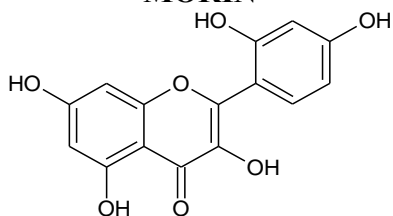
---

**QUERCETÍN** $C_{15}H_{10}O_7$ 

302,24

QUER

---

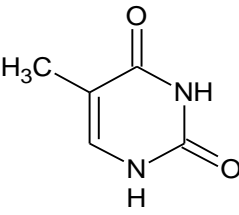
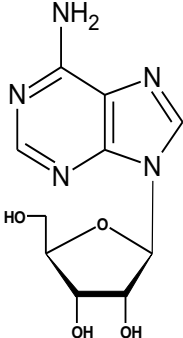
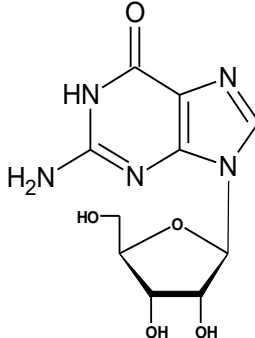
**MORÍN** $C_{15}H_{10}O_7 \cdot xH_2O$ 

302,24

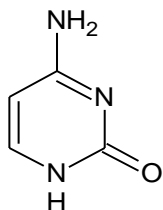
MOR

➤ nukleové bázy (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Tabuľka 3: Štandardy nukleových báz a nukleozidov

<b>NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY</b>			
<b>ŠTANDARD</b>	<b>SUMÁRNY VZOREC</b>	<b>M (g/mol )</b>	<b>ZNAČENIE</b>
<p><b>THYMÍN</b></p> 	$C_5H_6N_2O_2$	126,11	THY
<p><b>ADENOZÍN</b></p> 	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267,24	AD
<p><b>GUANOZÍN</b></p> 	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283,24	GU

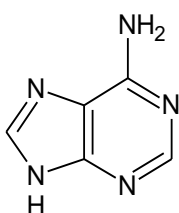
---

**CYTOSÍN** $C_4H_5N_3O$ 

111,10

CYT

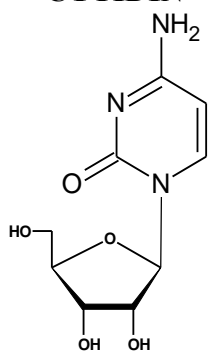
---

**ADENÍN** $C_5H_5N_5$ 

135,13

ADEN

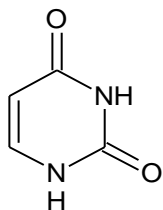
---

**CYTIDÍN** $C_9H_{13}N_3O_5$ 

243,22

CTD

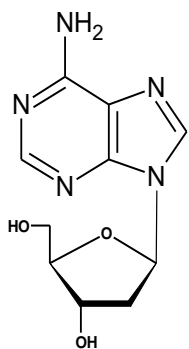
---

**URACIL** $C_4H_4N_2O_2$ 

112,09

UR

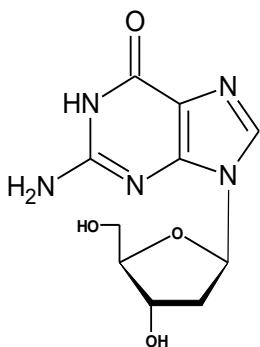
---

**2'-DEOXY ADENOZÍN** $C_{10}H_{13}N_2O_3$ 

269,26

2-DAD

---

**2'-DEOXY GUANOZÍN** $C_{10}H_{13}N_5O_4$ 

285,26

2-DGU

---

**2.2.3 REÁLNE VZORKY**

- čaj - Loyd Tea, Zelený čaj porcovaný (MOKATE S.A. , Poľsko)
- pivo – Braník svetlý 10° (Pivovar Staropramen, Praha –Smíchov)

## **2.3 PRACOVNÝ POSTUP**

### **2.3.1 PRÍPRAVA MOBILNEJ FÁZY**

Mobilná fáza (A) bola pripravená rozpustením 10 mM octanu amónneho v redestilovanej vode získanej z prístroja Milli-Q Reference Water Purification System. Na úpravu pH bola následne do mobilnej fázy pridaná kyselina mravčia (pH 3). Mobilná fáza (B) bola pripravená rozpustením 10 mM octanu amónneho v acetonitrile. Mobilná fáza pre gradientovú elúciu bola zaistená priamo gradientovým čerpadlom.

### **2.3.2 PRÍPRAVA ŠTANDARDOV**

Pre prípravu štandardných roztokov fenolických kyselín, flavonoidových zlúčenín a nukleových báz a nukleozidov boli použité už pripravené zásobné roztoky v koncentrácii 1mg/ml. Podľa potreby boli prípadne zriedené 10 až 20x. Vzorky zeleného čaju a piva boli pripravené odvzdušením v ultrazvukovom kúpeli a prefiltrovaním cez membránové filtre (0,45  $\mu\text{m}$ , Fischer Scientific).

### **2.3.3 PODMIENKY MERANIA**

U každej kolóny boli premerané retenčné charakteristiky všetkých troch skupín látok. Pri všetkých meraniach bol dávkovaný 1  $\mu\text{l}$  vzorky, prietok mobilnej fázy bol 1 ml/min a bol pravidelne kontrolovaný pomocou stopiek a byrety. Všetky merania prebiehali pri rovnakej teplote 30°C v niekoľkých opakovaniach. K meraniu mŕtveho objemu kolóny ( $V_M$ ) bol použitý v prípade režimu HILIC toluén, a v režime RP uracil. Zmerané retenčné časy a šírky píkov látok v polovici ich výšky boli vyhodnotené pomocou počítačového softvéru Agilent ChemStation. Látky boli identifikované podľa UV spektier pri vlnovej dĺžke 254, 280 a 370 nm. Pre vyhodnotenie a spracovanie nameraných dát bol použitý Adata, MS Excel a MS Word.

### **3. VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Táto diplomová práca sa zaoberá vybranými skupinami nízkomolekulárnych polárnych látok, ako sú fenolické kyseliny, flavonoidové zlúčeniny, nukleové bázy a nukleozidy. Analyzovanými fenolickými kyselinami boli kyselina gallová, vanilová, kávová, 4-hydroxyfenyloctová, syringová, ferulová, protokatechová, salicylová, sinapová, p-hydroxybenzoová, kumarová a chlorogénová vid' Tabuľky P1 a P14. Ďalšou skupinou analyzovaných látok boli flavonoidové zlúčeniny, zahŕňajúce eskulín, hesperidín, epikatechín, naringín, katechín, 4-hydroxykumarín, quercetín a morín vid' Tabuľky P4 a P16. Poslednou skupinou analyzovaných látok boli nukleové bázy a nukleozidy zahŕňajúce thymín, adenzín, guanozín, citozín, adenín, cytidín, uracyl, 2- deoxyadenozín, 2- deoxyguanozín vid' Tabuľky P7 a P18.

V práci boli použité povrchovo porézne kolóny, keďže poskytujú pomerne rýchle a účinné separácie. Tlak na takýchto kolónach je nižší oproti kolónam s neporéznymi sorbentami, ale sorpčná kapacita je väčšia. Využívajú sa pre štandardné HILIC separácie. Pracovalo sa s dvoma povrchovo poréznymi kolónami a to s Ascentis Express OH5 a Ascentis Express HILIC. Keďže v súčasnosti nie je veľa publikácií, ktoré by sa zamerali na tento typ kolón, cieľom práce bolo zistiť, či sú vhodné pre testované látky. Cieľom práce bolo teda zmerať retenčné charakteristiky daných skupín látok na oboch kolónach z dôvodu zisťovania správania sa daných látok na nich. Práca prebiehala v dvoch režimoch, HILIC a RP. Režim HILIC je vhodnejší pre veľmi polárne látky, zatiaľ čo v RP sú veľmi polárne látky zadržované veľmi málo. Našou úlohou bolo zistiť mieru zadržovania sa v daných režimoch. Zároveň bolo hlavnou náplňou aj zisťovanie, či sú dané typy kolón vhodné pre separáciu vybraných látok, porovnanie možnosti ich separácie a navrhnutie optimálnych pracovných podmienok pre ich separáciu v oblasti HILIC režimu.

#### **3.1 ASCENTIS EXPRESS OH5 KOLÓNA**

Na chemicky modifikovanej kolóne OH5 (silica s vysoko polárnym ligandom obsahujúcim 5 hydroxilových skupín) boli analyzované všetky vyššie uvedené látky, uskutočnené separácie zmesí jednotlivých skupín látok a zároveň analyzované reálne vzorky čaju a piva.

### 3.1.1 FENOLICKÉ KYSELINY

Ako prvé sa zisťovalo retenčné chovanie fenolických kyselín za izokratických podmienok, ktoré prebiehalo pri rôznom obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze (90 - 98% ACN) v režime HILIC, a v režime RP, v mobilnej fáze s vysokým obsahom vody (90 - 98% H<sub>2</sub>O). Retencia danej látky sa menila podľa toho, ako sa menil obsah vodnej zložky v mobilnej fáze. V HILIC platilo, že čím bolo vodnej zložky v MF menej, tým viac dochádzalo k rozširovaniu píkov a zároveň sa zvyšovala aj retencia danej látky. Naopak, čím bolo vodnej zložky viac, tým retencia látky klesala.

Postupne boli zmerané retenčné charakteristiky jednotlivých štandardov kyselín, a z nameraných retenčných dát boli vypočítané hodnoty retenčného faktoru  $k$  podľa rovnice (4), (6) a (7). Následne boli tieto hodnoty vynesené do grafu proti koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi$ ). Závislosti  $\log k = f(\phi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \phi_{H_2O})$  v režime HILIC znázorňujú Obrázky P1 a P2, a v režime RP Obrázky P3 a P4. Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P2 a P3. Zo šírky píkov látok v polovici ich výšky bola vypočítaná účinnosť pre každú kyselinu. Všetky retenčné charakteristiky sú uvedené v tabuľke 4 pre HILIC a v tabuľke 8 pre režim RP. K lepšiemu preloženiu získaných závislostí bola použitá trojparametrová rovnica (8) lepšie popisujúca retenciu málo zadržovaných látok, ktorá bola zadávaná do Adstatu, a zo získaných parametrov bola vypočítaná hodnota  $k$  a vynesená závislosť, ktorú znázorňuje Obrázok P11. Hodnoty parametrov z tejto rovnice sú uvedené v Tabuľke P12 pre HILIC aj RP. V príslušnej tabuľke sú tiež uvedené pre porovnanie retenčné faktory vypočítané z rovníc (6), (7). Ako najvhodnejšie preloženie pre fenolické kyseliny na základe vypočítaných retenčných faktorov sa javí preloženie trojparametrovou rovnicou a závislosti  $\log k = f(\phi_{H_2O})$ . Z daných závislostí v HILIC režime je možné vidieť, že najviac zadržovanou látkou je kyselina gallová a chlorogénová a to z dôvodu väčšieho počtu voľných hydroxylových skupín v molekule. Poskytujú teda silnejšie hydrofilné interakcie, preto sú viac zadržované. Naopak najmenej zadržovanou látkou je kyselina ferulová a sinapová, keďže majú iba jednu voľnú OH skupinu. Kyselina salicylová má odlišnú polaritu vzhľadom k ostatným látkam, vzhľadom na jej voľnú OH skupinu v polohe orto. V RP oblasti sú najviac zadržovanými látkami kyselina salicylová a sinapová (obsahuje v polohe 3, 5 polárnu metoxy-skupinu), najmenej kyselina gallová (obsahuje v polohe 3,4,5 hydroxyskupinu).

U fenolických kyselín bol ďalej zisťovaný duálny retenčný mechanizmus – krivky v tvare „U“, ktorý môže byť adekvátne popísaný štvorparametrovou rovnicou (10). Experimentálne krivky závislosti logaritmu retenčného faktoru,  $\log k$ , na objeme vodnej frakcii



v mobilnej fáze,  $\varphi_{H_2O}$ , pre všetky namerané kyseliny zobrazuje Obrázok P13. Hodnota regresného koeficientu sa pohybuje v rozmedzí 99,18 – 100 %, a potvrdzuje tak platnosť štvorparametrovej rovnice pre preloženie experimentálnych bodov. Prechod medzi RP a HILIC separačným módom sa pohybuje v rozmedzí 0,62 a 0,49. Parameter  $m_{RP}$  charakterizuje klesajúcu retenciu s rastúcim pomerom vodnej frakcie v MF bohatých na acetonitril,  $m_{HILIC}$  je mierou efektu vodnej frakcie na rastúcu retenciu vo vysoko vodnom RP rozsahu vodnej fázy a  $\varphi_{min}$  odpovedá objemovej frakcii vodnej časti mobilnej fázy, t.j. prechod medzi HILIC a RP mechanizmom.  $\varphi_{min}$  sa dá vypočítať podľa rovnice (12)

Po zmeraní jednotlivých kyselín bola prevedená separácia ich zmesi pomocou gradientovej elúcie. V priebehu analýzy bol plynule menený obsah vody v mobilnej fáze. Počiatočná mobilná fáza bola 98% acetonitrilu. Gradient bol nastavený na plynulú zmenu mobilnej fázy po dobu 15 minút z 98% ACN na 70% ACN. Chromatogram gradientovej separácie fenolických látok je zobrazený na Obrázku P22. Vzhľadom veľmi podobným retenčným časom jednotlivých kyselín, boli niektoré eluované v jednom píku, ako napríklad kyselina kumarová a syringová alebo protokatechová a kávová. Z obrázku vyplýva, že ako prvé sa eluovali kyseliny s jednou voľnou OH skupinou (kys. salicylová, ferulová, vanilová, p-hydroxybenzoová, kumarová, syringová, sinapová a 4-hydroxyfenyloctová), potom s dvoma voľnými OH skupinami (kys. protokatechová a kávová) a nakoniec kyselina gallová a chlorogénová. Výsledky potvrdzujú, že látky s niekoľkými polárnymi skupinami poskytujú v HILIC režime vyššiu retenciu.

### 3.1.2 FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY

Obdobne ako u fenolických kyselín, separácia prebiehala v dvoch režimoch HILIC a RP. Retencia flavonoidových zlúčenín je založená na rovnakom princípe ako u kyselín.

Opäť boli zmerané retenčné charakteristiky všetkých štandardov flavonoidových zlúčenín, a z nameraných dát boli vypočítane hodnoty retenčného faktoru  $k$  podľa rovnice (4), (6) a (7), zo šírky píkov látok v polovici ich výšky bola vypočítaná účinnosť (rovnica 14). Príslušné retenčné dáta sú uvedené v Tabuľke P4 pre HILIC aj RP. Hodnoty boli vynesené do grafu proti koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ). Závislosti  $\log k = f(\varphi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \varphi_{H_2O})$  v režime HILIC znázorňujú Obrázky P5 a P6, a v režime RP Obrázky P7 a P8. Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P5 a P6.

Rovnako ako v predchádzajúcom prípade k lepšiemu preloženiu získaných závislostí bola použitá trojparametrová rovnica (8), ktorá bola zadávaná do Adstatu, a zo získaných

parametrov bola vypočítaná hodnota  $k$  a vynesená závislosť, ktorú znázorňuje Obrázok P12. Hodnoty parametrov z tejto rovnice sú uvedené v Tabuľke P13, ako aj hodnoty retenčných faktorov vypočítaných z rovnice (6) a (7). Najvhodnejšie preloženie je v tomto prípade použitím rovnice (8). Z daných závislostí v režime HILIC vyplýva, že látky katechín, epikatechín a 4-hydroxykumrín sú zadržované veľmi málo. Naopak najviac zadržovanou látkou je v tomto prípade eskulín, hesperidín a naringín. Tieto látky obsahujú vo svojej molekule glykosidové jednotky, čo spôsobuje že eluujú relatívne neskôr. V režime RP bol najviac zadržovanou látkou quercetín a najmenej eskulín.

U flavonoidových zlúčenín bol tiež zisťovaný duálny retenčný mechanizmus. Experimentálne krivky závislosti logaritmu retenčného faktoru,  $\log k$ , na objeme vodnej frakcie v mobilnej fázy,  $\phi_{H_2O}$ , pre všetky namerané kyseliny zobrazuje Obrázok P14. Experimentálne dáta boli preložené štvorparametrovou rovnicou (10). Hodnoty parametrov  $a_1$ ,  $m_{RP}$  a  $m_{HILIC}$  ako aj ostatné údaje sú uvedené v Tabuľke P9. Najmenej zadržovanou látkou v tomto prípade je quercetín s  $\phi_{min} = 0,39$ , naopak najvyššieho rozsahu HILIC separačného režimu dosahuje eskulín s  $\phi_{min} = 0,53$ , čo je tiež uvedené v tabuľke P9. Prechod medzi RP a HILIC separačným módom sa pohybuje teda v rozmedzí 0,53 a 0,39.

Po zmeraní jednotlivých štandardov flavonoidových zlúčenín bola prevedená separácia ich zmesi opäť pomocou gradientovej elúcie. Gradient bol nastavený na plynulú zmenu mobilnej fázy po dobu 20 minút z 98 % ACN na 70 % ACN. Chromatogram gradientovej separácie flavonoidových zlúčenín zobrazuje Obrázok P23. V porovnaní s fenolickými kyselinami je separácia flavonoidových zlúčenín o niečo horšia, keďže sa nedosiahlo separácie látok v jednotlivých pikoch. Z obrázku je viditeľné, že najmenej zadržovanými látkami boli quercetín, katechín a epikatechín, a naopak najviac sa zadržovali látky obsahujúce glykozidové jednotky.

### 3.1.3 NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY

Aj v tomto prípade sa pracovalo v dvoch režimoch HILIC a RP za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcich prípadoch. Retencia nukleových báz a nukleozidov je tiež založená na rovnakom princípe ako u fenolických kyselín aj flavonoidových zlúčenín.

U nukleových báz boli obdobne zmerané retenčné charakteristiky všetkých štandardov, a z nameraných dát boli vypočítané hodnoty retenčného faktoru  $k$  podľa rovnice (4), (6) a (7), ktoré sú porovnané v Tabuľke P7. Zo šírky píkov látok v polovici ich výšky bola vypočítaná

účinnosť (rovnica 14). Príslušné retenčné dáta sú uvedené v Tabuľke P7 pre HILIC aj RP. U tejto skupiny látok boli vynášané hodnoty do grafu proti koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) iba v režime HILIC. Je to z toho dôvodu, že v režime RP sa nukleové bázy skoro vôbec nezadržovali, vychádzali buď s mŕtvym objemom alebo v jeho okolí. Závislosti  $\log k = f(\phi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \phi_{H_2O})$  znázorňujú Obrázky P9 a P10. Z daných závislostí vyplýva, že najviac zadržovanou látkou cytidín a 2'-deoxyguanozín, a naopak najmenej sa zadržujú látky thymín a uracil. Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P8.

V rámci tejto skupiny látok bol tiež využitý duálny retenčný mechanizmus. Z nameraných dát bola vytvorená závislosť logaritmu retenčného faktoru na obsahu vody v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze, čo znázorňuje Obrázok P15. Experimentálne dáta boli preložené štvorparametrovou rovnicou (10), vzhľadom na to, že nukleové bázy a nukleozidy sa vyznačujú pomerne veľkou retenciou v režime HILIC a relatívne malou retenciou v režime RP. Hodnoty regresných koeficientov sú uvedené tabuľke P11. V mobilných fázach, ktoré majú nízky obsah vody, sú látky veľmi silne zadržované. Naopak s rastúcim obsahom vody v mobilnej fáze retencia klesá až na svoje minimum. Najmenej zadržovanou látkou je teda thymín s  $\phi_{min} = 0,62$  a následne uracil s  $\phi_{min} = 0,64$ .

Rovnako ako u predchádzajúcich látok bola zmes nukleových báz separovaná pomocou gradientovej elúcie. Nastavenie gradientu odpovedalo gradientu použitého pri fenolických kyselinách. Obrázok P24 ukazuje chromatogram gradientovej separácie nukleových báz. Poradie retencie látok v HILIC režime separácia spĺňa. Na základe toho môžeme pozorovať píky látok v poradí elúcie: thymín, uracil, 2'-deoxyadenozín, adenín, adenosín, cytozín, cytidín, 2'-deoxyguanozín a nakoniec guanozín.

### 3.1.4 REÁLNE VZORKY

Cieľom práce bolo tiež analyzovať reálne vzorky obsahujúce dané skupiny látok, ktorými sa zaoberá diplomová práca. Analyzovali sa dve vzorky a to zelený čaj (Loyd Tea, Zelený čaj porciovaný) a pivo (Braník svetlý 10°). Separácia oboch vzoriek prebiehala pomocou gradientovej elúcie za rovnakých podmienok ako v prípade štandardov. Gradient bol nastavený na plynulú zmenu mobilnej fázy po dobu 15 minút z 98% ACN na 70% ACN. Chromatogram gradientovej separácie čaju je zobrazený na Obrázku P25 a piva na Obrázku P26. Látky prítomné v oboch vzorkách boli identifikované jednak na základe porovnania UV spektier jednotlivých pík s UV spektrami štandardov, a aj na základe porovnania s retenčnými časmi štandardných látok. V čaji boli identifikované látky eluujúce sa v tomto

poradí: morín, quercetín, myricetín, katechín a epikatechín. Pivo obsahovalo látky eluujúce sa v tomto poradí: kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina gallová, katechín a epikatechín.

## 3.2 ASCENTIS EXPRESS HILIC KOLÓNA

Na chemicky modifikovanej kolóne HILIC (silikagelová kolóna) boli uskutočnené rovnaké analýzy ako na predchádzajúcej kolóne. V režime RP látky neboli zadržované, a to z dôvodu že sa jedná o kolónu, ktorá je určená výhradne pre režim HILIC.

### 3.2.1 FENOLICKÉ KYSELINY

Separácia kyselín na tejto kolóne prebiehala opäť pri rôznom obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze (90 - 98% ACN) v režime HILIC. Retencia danej látky sa menila podľa toho, ako sa menil obsah vodnej zložky v mobilnej fáze. Platilo, že čím bolo vodnej zložky v MF menej, tým viac dochádzalo k rozširovaniu pík a zároveň sa zvyšovala aj retencia danej látky..

Zo získaných retenčných dát bola vytvorená lineárna závislosť retenčného faktoru  $k$  (výpočet podľa rovnice (4), (6) a (7)) na koncentrácii vody v MF ( $\phi_{H_2O}$ ). Všetky retenčné charakteristiky sú uvedené v Tabuľke P14. Obrázky P16 a P17 odpovedajú závislostiam  $\log k = f(\phi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \phi_{H_2O})$ . Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P15. Z daných závislostí vyplýva, podobne ako u kolóny OH5, že najviac zadržovanou látkou je opäť kyselina gallová a chlorogénová, keďže poskytujú silnejšie hydrofilné interakcie. Najmenej zadržovanou látkou je opäť ako v prípade OH5 kolóny kyselina ferulová, sinapová. Obdobné chovanie ako na predchádzajúcej kolóne má aj kyselina salicylová.

Separácia zmesí prebiehala opäť gradientovou elúciou po dobu 15 minút za rovnakých podmienok ako na OH5 kolóne. Chromatogram gradientovej separácie fenolických kyselín znázorňuje Obrázok P27. Z príslušného obrázku je viditeľné, že ako prvé sa eluovali kyseliny s jednou voľnou OH skupinou (kyselina salicylová, ferulová, vanilová, p-hydroxybenzoová, kumarová, sinapová, syringová a 4-hydroxyfenyloctová), potom s dvoma voľnými OH skupinami (kyselina kávová a protokatechová) a nakoniec kyselina gallová a chlorogénová. V porovnaní so separáciou na OH5 kolóne sa poradie v elúcii látok nijako výrazne nezmenilo.

### 3.2.2 FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY

Z flavonoidových zlúčenín boli na tejto kolóne analyzované všetky látky ktoré boli zadržované aj na OH5 kolóne.

Podmienky analýz aj separácie zmesi boli opäť rovnaké. Príslušné retenčné dáta a hodnoty vypočítaných retenčných faktorov podľa rovnice (6) a (7) sú uvedené v Tabuľke P16. Hodnoty boli vynesené do grafu proti koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ). Závislosti  $\log k = f(\phi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \phi_{H_2O})$  znázorňujú Obrázky P18 a P19. Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P17. Zo závislostí je vidieť, že aj na tejto kolóne je najviac zadržovanou látkou eskulín a naringín. Avšak oproti OH5 kolóne je v tomto prípade najmenej zadržovanou látkou 4-hydroxykumarín.

Chromatogram gradientovej separácie flavonoidových zlúčenín zobrazuje Obrázok P27. Oproti OH5 kolóne sa poradie separácie flavonoidových zlúčenín na HILIC kolóne trochu zmenilo. Medzi prvými sa separovali katechín a epikatechín, nasledoval morín, quercetín a následne hesperidín, naringín a eskulín.

### 3.2.3 NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY

Príslušné retenčné dáta získané z analýzy nukleových báz a nukleozidov sú uvedené v Tabuľke P18. Hodnoty boli vynesené do grafu proti koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ). Závislosti  $\log k = f(\phi_{H_2O})$  a  $\log k = f(\log \phi_{H_2O})$  znázorňujú Obrázky P20 a P21. Príslušné parametre a korelačné koeficienty týchto kriviek sú uvedené v Tabuľke P19, a retenčné faktory z nich vypočítané v Tabuľke P18. Z daných závislostí vyplýva, že aj na HILIC kolóne je najviac zadržovanou látkou cytidín, 2'-deoxyguanozín a guanozín, a naopak najmenej sa zadržujú látky thymín a uracil.

Obrázok P29 ukazuje chromatogram gradientovej separácie nukleových báz, ktorá prebiehala za rovnakých podmienok ako na OH5 kolóne. Poradie retencie látok v HILIC režime separácia spĺňa. Na základe toho môžeme pozorovať píky látok v poradí elúcie: thymín, uracil, 2'-deoxyadenozín, adenín, adenosín, cytozín, cytidín, 2'-deoxyguanozín a nakoniec guanozín. Poradie v elúcii látok sa teda v porovnaní s OH5 kolónou nezmenilo.

### 3.2.4 REÁLNE VZORKY

Tak ako na prvej kolóne aj tu boli separované reálne vzorky zelený čaj (Loyd Tea, Zelený čaj porciovaný) a pivo (Braník svetlý 10°). Separácia prebiehala za rovnakých podmienok ako u štandardov.

Chromatogram gradientovej separácie čaju je zobrazený na Obrázku P30 a piva na Obrázku P31. V čaji boli identifikované látky eluujúce sa v tomto poradí: morín, quercetín, myricetín, katechín a epikatechín. Pivo obsahovalo látky eluujúce sa v tomto poradí: PHBA, kyselina gallová, katechín a epikatechín. Separácia reálnych vzoriek na HILIC kolóne je v porovnaní so separáciou na OH5 kolóne o niečo horšia, vzhľadom na menší počet separovaných látok oproti OH5 kolóne. Možnou optimalizáciou gradientu by sa mohlo doceliť lepších separácií.

## 4. ZÁVER

Diplomová práca sa zaoberala separáciou vybraných skupín nízkomolekulárnych polárnych látok na silikagelových a chemicky modifikovaných kolónach metódou HILIC. Jednalo sa predovšetkým o fenolické kyseliny, flavonoidové zlúčeniny, nukleové bázy a nukleozidy. Ako silikagelová kolóna bola použitá kolóna Ascentis Express HILIC, a chemicky modifikovaná bola kolóna Ascentis Express OH5.

Na oboch kolónach boli premerané štandardy všetkých skupín látok a následne boli zo získaných retenčných dát zostrojené kvadratické závislosti retenčného faktoru  $k$  na koncentrácii vody v MF  $\varphi$  :  $\log k = f(\varphi)$  a  $\log k = f(\log \varphi)$ . Zistoval sa tiež duálny retenčný mechanizmus látok. Zo získaných dát môžeme teda povedať, že duálny retenčný mechanizmus poskytujú iba fenolické kyseliny, niektoré flavonoidové zlúčeniny a nukleové bázy na OH5 kolóne.

Ďalším krokom bolo previesť separácie vybraných skupín nízkomolekulárnych látok, opäť na obidvoch typoch kolón. Rozdelenie zmesí fenolických kyselín, flavonoidových zlúčenín, nukleových báz a nukleozidov prebiehalo za použitia gradientovej elúcie.

Pre separáciu fenolických kyselín sa javí ako vhodnejšia kolóna Ascentis Express OH5 ako v režime HILIC tak aj v RP. Dôvodom je, že na nej došlo k dokonalejšej separácii zmesi v porovnaní s kolónou Ascentis Express HILIC, kde sa viacero kyselín za podmienok separácie neseparuje, z dôvodu nízkej retencie. Poradie v elúcii jednotlivých kyselín je takmer identické na obidvoch kolónach.

Separácia flavonoidových zlúčenín v režime HILIC oproti kyselinám prebiehala lepšie na kolóne Ascentis Express HILIC, kde môžeme vidieť lepšie rozdelenie hlavne látok obsahujúcich glykozidové jednotky. V tomto prípade sa poradie v elúcii jednotlivých flavonoidových látok na oboch kolónach líši.

Nukleové bázy a nukleozidy boli dobre separovateľné ako na kolóne Ascentis Express OH5, tak aj na kolóne Ascentis Express HILIC. V oboch prípadoch môžeme vidieť dokonalú separáciu danej zmesi na jednotlivé, symetrické píky. Poradie v elúcii jednotlivých nukleových báz a nukleozidov je úplne identické na obidvoch kolónach.

Ako posledný bod boli prevedené separácie reálnych vzoriek na oboch kolónach za rovnakých podmienok ako v prípade separácie všetkých vybraných skupín látok. Pre separáciu zeleného čaju a rovnako aj piva bola vhodnejšia kolóna Ascentis Express OH5. V porovnaní s Ascentis Express HILIC kolónou, rozdelenie zmesi oboch vzoriek bolo dokonalejšie na

jednotlivé, úzke píky. U Ascentis Express HILIC kolóny síce k separácii došlo, ale nie až na základnú líniu.

Z výsledkov diplomovej práce teda vyplýva, že obe kolóny majú pomerne dobrú reprodukovateľnosť dát pre použité vzorky. Kolóna Ascentis Express OH5 sa javí ako dobrá voľba pre separáciu fenolických kyselín, zatiaľ čo pre flavonidové zlúčeniny je lepšia kolóna Ascentis Express HILIC. Nukleové bázy a nukleozidy poskytujú dobré separácie na oboch typoch kolón.



## 5. ZOZNAM LITERATÚRY

- [1] A. Weston, P.R. Brown, *HPLC and CE: principles and practise*, Academic CPress, (1997), 279.
- [2] B. Bidlingmaier et al, *Comparative study on the column performance of microparticulate 5- $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub>-bonded and monolithic C<sub>18</sub>-bonded reversed-phase columns in high-performance liquid chromatography<sup>1</sup>*, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11-16.
- [3] J. Churáček. a. kol, *Analytická separace látek*, Praha: SNTL, (1990), 384.
- [4] M. Pospíšilová, *Separace polárních látek kapalinovou chromatografií hydrofilních interakcí*, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Pardubice (2008), 55.
- [5] O. Trapp, G. Guiochon, *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry [online]*, (2000).
- [6] P. Jandera, *Gradient elution in liquid chromatography : I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution — theoretical considerations*, *J. Chromatogr. A* 91 (1974) 207.
- [7] R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. Theoretical basis for reversed-phase systems*, *J. Chromatogr. A* 165 (1979) 3.
- [8] P. Jandera, T. Hájek, *Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants*, *J. Sep. Sci* 32 (2009) 3603-3619.
- [9] J. Urban, V. Skeříková, P. Jandera, R. Kubičková, M. Pospíšilová, *Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds*, *J. Sep. Sci* 32 (2009) 2530.

- [10] P. Jandera, „The Theory of Column Liquid Chromatography in Reversed-Phase Systems,“ rev. *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Academia Praha, (1993), 205-269.
- [11] J.J Kirkland, J.L. Glajsh, *Optimization of mobile phases for multisolvent gradient elution liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 255 (1983) 27-39.
- [12] A.J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, J. Chromatogr. A 499 (1990) 177-196.
- [13] D. McCalley, *Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?*, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 46-55.
- [14] J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Liquid chromatography of saccharides*, J. Chromatogr. A 105 (1975) 125.
- [15] P. Hemström, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, J. Sep. Sci 29 (2006) 784-1821.
- [16] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique*, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- [17] S. Cubbon, T. Bradbury, J. Wilson, J. Thomas-Oates, *Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine*, Anal. Chem. 79 (2007) 8911-8918.
- [18] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, Anal. Chim. Acta 692, (2011) 1-25.
- [19] L. Nováková, M. Douša a kol, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Praha, (2013), s. 300.
- [20] E. Sandoval, J.J. Pesek, *Synthesis and Characterization of a Hydride-Modified Porous*

*Silica Material as an Intermediate in the Preparation of Chemically Bonded Chromatographic Stationary Phases*, Anal. Chem 61 (1989) 2067-2075.

- [21] G. Greco, T. Letzel, *Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations*, J. Chromatogr. Sci 51 (2013) 684-693.
- [22] Y. Guo, S. Gaiki, *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920-5938.
- [23] T. Yoshida, *Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review*, J. Biochem. Biophys. Methods 60 (2004) 265-280.
- [24] N.P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, *Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5880-5891.
- [25] B. Olsen, *Hydrophilic interaction chromatography using amino and silicacolumns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities*, J. Chromatogr. A 913 (2011) 112.
- [26] D.W. Armstrong, H.L. Jin, *Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns*, J. Chromatogr. A 462(1989) 219.
- [27] G. Zhimou, A. Shen, L. Yu, L. Cao, X. Liang, *A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol-ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica*, Chem. Commun. 47 (2011) 4550-4552.
- [28] N. Nestrenko, P.R. Haddad, *Zwitterionic Ion-Exchangers in Liquid Chromatography*, Anal. Sci 16 (2000) 565-574.
- [29] W. Hu, T. Takeuchi, H. Haraguchi, *Electrostatic Ion Chromatography*, Anal. Chem 65 (1993) 2204-2208.

- [30] W. Jiang, K. Irgum, *Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions*, *Anal. Chem* 71 (1999) 333-344.
- [31] H.A. Cook, G.W. Dicoski, P.R. Haddad, *Mechanistic studies on the separation of cations in zwitterionic ion chromatography*, *J. Chromatogr. A* 997 (2003) 13-20.
- [32] M.G. Kiselova, P.A. Kebets, P.N. Nestrenko, *Simultaneous ion chromatographic separation of anions and cations on poly(aspartic acid) functionalized silica*, *Analyst* 126 (2001) 2119-2123.
- [33] N.S. Quiming et. al., *Retention behavior of ginsenosides on a poly(vinyl alcohol)-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography*, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1477.
- [34] D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, M. Zvolánková, *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC*, *Chem. Listy* 101 (2007) 190-199.
- [35] J. Vacek, L. Onofrejevová, B. Klejdas, V. Kubáň, *Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek*, *Chem. Listy* 103 (2009) 381-385.
- [36] P. Nguyem, K.A. Schug, *The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications*, *J. Sep. Sci* 31 (2008) 1465-1480.
- [37] K. Dill, J. Phys. *The mechanism of solute retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, *Chem* 91 (1987) 1980-1988.
- [38] P.T. Ying, J.G. Dorsey, K.A. Dill, *Retention Mechanisms of Reversed-Phase Liquid Chromatography: Determination of Solute-Solvent Interaction Free Energies*, *Anal. Chem* 61 (1989) 2540-2546.
- [39] L. Wang, U. Duda, C.J. Radke, J. Colloid, *Solution adsorption from liquid chromatography*, *Interface Sci* 66 (1978) 153-165.

- [40] F. Riedo, E.S. Kováts, *Adsorption from liquid mixtures and liquid chromatography*, J. chromatogr. A 239 (1982) 1-26.
- [41] J.H. Knox, A. Pryde, *Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography*, J. chromatogr. A 112 (1975) 171-188.
- [42] C.R. Mitchell, Y. Bao, N.J. Benz, S. Zhang, *Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes*, J. Chromatogr. B 877 (2009) 4133-4139.
- [43] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids*, J. Chromatogr. A 961 (2002) 9-21.
- [44] M. Douša, J. Břicháč, P. Gibala, P. Lehnert, *Rapid hydrophilic interaction chromatography determination of lysine in pharmaceutical preparations with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde*, J. Pharmaceut Biomed 54 (2011) 972-978.
- [45] T. Yoshida, *Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review*, J. Biochem. Biophys. Methods 60, (2004) 265-280.
- [46] W. Jian, R.W. Edom, Y. Xu, N. Weng, *Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis*, J. Sep. Sci 33 (2010) 681-697.
- [47] L. Nováková, Z. Spáčil, M. Seifrtová, L. Opletal, P. Solich, *Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures*, Talanta 80 (2010) 1970-1979.
- [48] M. Gomez-Romero, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit*, Phytochem. 71 (2010) 1848-1864.

- [49] K.M. KAlili, A. de Villiers, *Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*, J. Sep. Sci 34 (2011) 854-876.
- [50] J. Gruz, O. Novák, M. Strnad, *Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS*, Food Chem 111 (2008) 789-794.
- [51] Z. Lou, H. Wang, S. Zhu, M. Zhang, Y. Gao, Ch. MA, Z. Wang, *Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2441-2446.
- [52] P. Chen, W. Li, Y. Wang, Z. Li, Y. Ni, K. Koike, *Identification and quantification of nucleosides and nucleobases in Geosaurus and Leech by hydrophilic-interaction chromatography*, Talanta 85 (2011) 1634-1641.
- [53] T.J. Causon, H.J. Cortes, R.A. Shellie, E.F. Hilder, *Temperature Pulsing for Controlling Chromatographic Resolution in Capillary Liquid Chromatography*, Anal. Chem 84 (2012) 3362-3368.
- [54] W. Goutier, P.A. Spaans, M.A.W. van der Neut, A.C. McCreary, J.H. Reinders, *Development and application of an LC-MS/MS method for measuring the effect of (partial) agonists on cAMP accumulation in vitro*, J. Neurosci. Meth. 188 (2010) 24-31.
- [55] H. Zhao, J. Chen, Q. Shi, X. Li, W. Zhou, D. Zhang, et al., *Simultaneous determination nucleosides in marine organisms using ultrasound-assisted extraction followed by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*, J. Sep. Sci. 34 (2011) 2594-2601.
- [56] K. Inoue, R. Obara, T. Hino, H. Oka, *Development and Application of an HILIC-MS/MS Method for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula*, J. Agric. Food. Chem. 58 (2010) 9918-9924.
- [57] H. Kaspar, K. Detter, W. Gronwald, P.J. Oefner, *Advances in amino acid analysis*, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 445-452.
- [58] R. Oertel, V. Neumeuster, W. Kirch, *Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum*, J.

- Chromatogr. A 1058 (2004) 197-201.
- [59] J. Ruta, D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, *Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest*, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 221-231
- [60] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1357 (2014) 36-52
- [61] P. Zhang, A. Bui, G. Rose, G. Allinson, *Mixed-mode solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine phenoxy acid, sulfonylurea, triazine and other selected herbicides at nanogram per litre levels in environmental waters*, J. Chromatogr. A 1325 (2014) 56-64 P.
- [62] Chocholouš, J. Vacková, I. Šrámková, D. Šatínský, P. Solich, *Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids*, Talanta 103 (2013) 221-227

## **PRÍLOHOVÁ ČASŤ**



## ZOZNAM TABULIEK

- Tabuľka P1:** Retenčné charakteristiky fenolických kyselín v režime HILIC a RP; kolona Ascentis Express OH5,  $t_m$  (toluén) = 0,212 min,  $f_m = 1$  ml/min
- Tabuľka P2:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  v režime HILIC a RP
- Tabuľka P3:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC a RP
- Tabuľka P4:** Retenčné charakteristiky flavonoidových zlúčenín v režime HILIC a RP; kolona Ascentis Express oh5,  $t_m$  (toluén) = 0,212 min,  $f_m = 1$  ml/min
- Tabuľka P5:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  v režime HILIC a RP
- Tabuľka P6:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín závislosti  $\log k = f(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC a RP
- Tabuľka P7:** Retenčné charakteristiky nukleových báz a nukleozidov v režime HILIC a RP; kolona Ascentis Express OH5,  $t_m$  (toluén) = 0,212 min,  $f_m = 1$  ml/min
- Tabuľka P8:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) nukleových báz a nukleozidov závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC
- Tabuľka P9:** Parametre  $a_1$ ,  $m_{rp}$ ,  $m_{hilic}$  a  $b$  fenolických kyselín na OH5 kolone
- Tabuľka P10:** Parametre  $a_1$ ,  $m_{rp}$ ,  $m_{hilic}$  a  $b$  flavonoidových zlúčenín na OH5 kolone
- Tabuľka P11:** Parametre  $a_1$ ,  $m_{rp}$ ,  $m_{hilic}$  a  $b$  nukleových báz a nukleozidov na OH5 kolone
- Tabuľka P12:** Parametre  $a$ ,  $b$ ,  $m$  fenolických kyselín na OH5 kolone
- Tabuľka P13:** Parametre  $a$ ,  $b$ ,  $m$  flavonoidových zlúčenín na OH5 kolone
- Tabuľka P14:** Retenčné charakteristiky fenolických kyselín v režime HILIC; kolona Ascentis Express HILIC,  $t_m$  (toluén) = 0,155 min,  $f_m = 1$  ml/min
- Tabuľka P15:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC
- Tabuľka P16:** Retenčné charakteristiky flavonoidových zlúčenín v režime HILIC; kolona Ascentis Express HILIC,  $t_m$  (toluén) = 0,155 min,  $f_m = 1$  ml/min
- Tabuľka P17:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC
- Tabuľka P18:** Retenčné charakteristiky nukleových báz a nukleozidov v režime HILIC; kolona: Ascentis Expres HILIC,  $t_m$  (toluén) = 0,155 min,  $f_m = 1$  ml/min

**Tabuľka P19:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R_2$ ) nukleových báz a nukleozidov závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC

## ZOZNAM OBRÁZKOV

- Obrázok P1:** Závislosť logaritmu retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P2:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P3:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP
- Obrázok P4:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP
- Obrázok P5:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P6:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P7:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP
- Obrázok P8:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP
- Obrázok P9:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P10:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC
- Obrázok P11:** Vplyv vodnej frakcie,  $\varphi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , fenolických kyselín na kolóne Ascentis Expres OH5
- Obrázok P12:** Vplyv vodnej frakcie,  $\varphi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , flavonoidových zlúčenín na kolóne Ascentis Expres OH5
- Obrázok P13:** Vplyv vodnej frakcie,  $\varphi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , fenolických kyselín na kolóne Ascentis Expres OH5
- Obrázok P14:** Vplyv vodnej frakcie,  $\varphi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , flavonoidových zlúčenín na kolóne Ascentis Expres OH5
- Obrázok P15:** Vplyv vodnej frakcie,  $\varphi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , nukleových báz na kolóne Ascentis Expres OH5

- Obrázok P16:** Závislosť logaritmu retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P17:** Závislosť logaritmu retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P18:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P19:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P20:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P21:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC
- Obrázok P22:** Gradientová separácia fenolických kyselín na kolóne OH5
- Obrázok P23:** Gradientová separácia flavonoidových zlúčenín na kolóne OH5
- Obrázok P24:** Gradientová separácia nukleových báz a nukleozidov na kolóne OH5
- Obrázok P25:** Gradientová separácia čaju (Loyd tea – zelený poricovaný čaj) na kolóne OH5
- Obrázok P26:** Gradientová separácia piva (Braník svetlý 10°) na kolóne OH5
- Obrázok P27:** Gradientová separácia fenolických kyselín na kolóne HILIC
- Obrázok P28:** Gradientová separácia flavonoidových zlúčenín na kolóne HILIC
- Obrázok P29:** Gradientová separácia nukleových báz a nukleozidov na kolóne HILIC
- Obrázok P30:** Gradientová separácia čaju (Loyd tea – zelený porciovaný čaj) na kolóne HILIC
- Obrázok P31:** Gradientová separácia piva (Braník svetlý 10°) na kolóne HILIC

## **TABULKY**

➤ Ascentis Express OH5

**Tabuľka P1:** Retenčné charakteristiky fenolických kyselín v režime HILIC (90 - 98 % ACN) a RP (2 – 10 % ACN); kolóna Ascentis Express OH5,  $t_M$  (toluén) = 0,212 min,  $F_m$  = 1 ml/min,  $k$  – vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7) a (8),  $N$  – vzťahnuté na kolónu

<b>FENOLICKÉ KYSELINY</b>							
<b>KYSELINA</b>	$\phi_{H_2O}$	$t_R$ [min]	$k_4$	$k_6$	$k_7$	$k_8$	<b>N</b>
<b>GALL</b>	10	2,33	10,00	9,97	10,00	-	11500
	7	4,42	19,83	19,78	19,83	-	1500
	5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
<b>VAN</b>	10	0,76	2,57	2,54	3,16	2,59	2700
	7	1,39	5,57	5,61	4,94	5,53	4000
	5	2,187	9,32	9,51	7,52	9,34	4300
	2	4,71	21,20	20,95	23,64	21,19	5200
<b>KAV</b>	10	1,05	3,96	3,94	4,17	-	900
	7	2,51	10,82	10,84	9,95	-	600
	5	4,74	21,37	21,28	22,62	-	2900
	2	-	-	-	-	-	-
<b>HPA</b>	10	0,96	3,52	3,53	4,57	-	5700
	7	1,93	8,12	8,21	7,37	-	5700
	5	3,23	14,22	14,42	11,57	-	5700
	2	7,31	33,50	33,54	39,50	-	6000
<b>SYR</b>	10	0,85	2,99	2,92	3,63	3,00	2900
	7	1,54	6,25	6,31	5,61	6,22	3200
	5	2,41	10,36	10,54	8,46	10,38	3500
	2	5,16	23,32	22,76	25,87	23,32	16600
<b>FER</b>	10	0,63	1,97	1,94	2,45	2,00	1400
	7	1,15	4,43	4,41	3,92	4,37	1800
	5	1,80	7,50	7,65	6,09	7,54	1900
	2	3,99	17,82	17,43	20,21	17,82	2800

<b>PRO</b>	10	1,30	5,13	4,83	4,90	-	1500
	7	2,09	8,84	10,3	9,51	-	1700
	5	4,17	18,67	17,06	17,78	-	1800
	2	-	-	-	-	-	-
<b>SAL</b>	10	0,37	0,74	0,59	0,72	0,63	800
	7	0,43	1,01	1,31	1,16	1,16	900
	5	0,64	2,03	2,22	1,81	1,96	1900
	2	1,45	5,82	4,91	6,06	5,83	-
<b>SIN</b>	10	0,66	2,10	1,78	2,29	2,32	1000
	7	1,19	4,60	5,04	4,25	4,31	1600
	5	1,82	7,58	10,11	7,60	7,68	1800
	2	7,77	35,63	28,70	37,09	35,63	13200
<b>PHB</b>	10	0,73	2,46	2,45	3,09	2,51	4500
	7	1,43	5,72	5,73	5,00	5,64	5000
	5	2,30	9,84	10,10	7,88	9,89	5200
	2	5,28	23,89	23,65	27,14	23,88	500
<b>KUM</b>	10	0,67	2,14	2,11	2,69	2,19	1400
	7	1,30	5,15	5,21	4,48	5,06	2000
	5	2,15	9,13	9,50	7,25	9,17	2000
	2	5,28	23,88	23,29	26,89	23,87	9000
<b>CHLG</b>	10	2,17	9,22	9,16	9,12	-	1600
	7	6,27	28,57	28,41	28,25	-	500
	5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
<b>GALL</b>	90	0,30	0,18	-	-	-	2100
	93	0,31	0,24	-	-	-	2400
	95	0,32	0,29	-	-	-	2100
	98	0,34	0,36	-	-	-	2700

<b>VAN</b>	90	0,40	0,35	-	-	-	2200
	93	0,37	0,47	-	-	-	2600
	95	0,39	0,56	-	-	-	2800
	98	0,45	0,77	-	-	-	3200
<b>KAV</b>	90	0,36	0,45	-	-	-	2600
	93	0,40	0,60	-	-	-	2600
	95	0,43	0,72	-	-	-	2400
	98	0,60	1,37	-	-	-	4000
<b>HPA</b>	90	0,30	0,21	-	-	-	1500
	93	0,32	0,26	-	-	-	-
	95	0,33	0,30	-	-	-	2700
	98	0,35	0,38	-	-	-	2600
<b>SYR</b>	90	0,36	0,42	-	-	-	2400
	93	0,40	0,60	-	-	-	2500
	95	0,44	0,76	-	-	-	2700
	98	0,54	1,14	-	-	-	2400
<b>FER</b>	90	0,40	0,58	-	-	-	2700
	93	0,46	0,82	-	-	-	2700
	95	0,51	1,03	-	-	-	2700
	98	0,64	1,54	-	-	-	2500
<b>PRO</b>	90	0,31	0,24	-	-	-	2400
	93	0,33	0,31	-	-	-	2400
	95	0,34	0,36	-	-	-	3100
	98	0,36	0,45	-	-	-	2500
<b>SAL</b>	90	1,12	3,45	-	-	-	4000
	93	1,28	4,09	-	-	-	4000
	95	1,42	4,65	-	-	-	3700
	98	1,76	6,01	-	-	-	3300
<b>SIN</b>	90	0,44	0,76	-	-	-	2900
	93	0,49	0,94	-	-	-	2500
	95	0,56	1,25	-	-	-	2400
	98	0,77	2,06	-	-	-	2400



<b>PHB</b>	90	0,32	0,29	-	-	-	2100
	93	0,34	0,36	-	-	-	2400
	95	0,36	0,42	-	-	-	2900
	98	0,38	0,53	-	-	-	2700
<b>KUM</b>	90	0,38	0,52	-	-	-	2600
	93	0,43	0,69	-	-	-	2600
	95	0,46	0,83	-	-	-	3100
	98	0,53	1,11	-	-	-	2900
<b>CHLG</b>	90	0,45	0,78	-	-	-	1800
	93	0,49	0,96	-	-	-	1600
	95	0,54	1,15	-	-	-	1700
	98	0,62	1,48	-	-	-	1700

**Tabuľka P2:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H_2O})$  v režime HILIC a RP

<b>KYSELINA</b>	<b>m<sub>HILIC</sub></b>	<b>a<sub>HILIC</sub></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>HILIC</sub></b>	<b>m<sub>RP</sub></b>	<b>a<sub>RP</sub></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>RP</sub></b>
<b>GALL</b>	-9,91	1,99	1,00	3,72	-4,08	0,99
<b>VAN</b>	-11,44	1,55	0,99	4,27	-4,31	0,99
<b>KAV</b>	-14,64	2,06	1,00	5,93	-5,72	0,95
<b>HPA</b>	-12,22	1,77	1,00	3,26	-3,63	0,99
<b>SYR</b>	-11,14	1,58	0,99	5,37	-5,22	0,99
<b>FER</b>	-11,93	1,48	0,99	5,31	-5,03	0,99
<b>PRO</b>	-10,96	1,78	0,96	3,43	-3,71	0,99
<b>SAL</b>	-11,46	0,92	0,94	2,99	-2,17	0,99
<b>SIN</b>	-15,105	1,76	0,96	5,46	-5,06	0,96
<b>PHB</b>	-12,31	1,62	0,99	3,21	-3,43	0,99
<b>KUM</b>	-13,05	1,63	0,99	4,09	-3,97	0,99
<b>CHLG</b>	-16,38	2,60	1,00	3,53	-3,29	0,99

**Tabuľka P3:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\log \varphi_{H_2O})$  v režime HILIC a RP

KYSELINA	$m_{HILIC}$	$a_{HILIC}$	$R^2_{HILIC}$	$m_{RP}$	$a_{RP}$	$R^2_{RP}$
GALL	-1,92	-0,92	1,00	8,05	0,37	0,99
VAN	-1,25	-0,75	0,95	9,25	0,04	0,99
KAV	-2,44	-1,82	0,99	12,78	0,20	0,94
HPA	-1,34	-0,68	0,95	7,06	0,36	0,99
SYR	-1,22	-0,66	0,95	11,61	0,15	0,99
FER	-1,31	-0,92	0,95	11,49	0,28	0,99
PRO	-1,86	-1,17	0,98	7,43	0,28	0,99
SAL	-1,32	-1,46	0,98	6,48	0,82	0,98
SIN	-1,73	-1,37	0,99	11,78	0,38	0,96
PHB	-1,35	-0,86	0,95	6,94	0,22	0,99
KUM	-1,43	-1,00	0,95	8,86	0,12	0,99
CHLG	-3,17	-2,21	1,000	7,62	0,23	0,99

**Tabuľka P4:** Retenčné charakteristiky flavonoidových zlúčenín v režime HILIC (90 - 98 % ACN) a RP (2 - 10 % ACN); kolóna Ascentis Express OH5,  $t_M$  (toluén) = 0,212 min,  $F_m = 1$  ml/min,  $k$  - vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7) a (8),  $N$  - vzťahnuté na kolónu

FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY							
FLAV. ZL.	$\varphi_{H_2O}$	$t_R$ [min]	$k_4$	$k_6$	$k_7$	$k_8$	$N$
ESK	10	0,74	2,49	2,27	3,02	2,54	2400
	7	1,16	6,37	7,02	5,80	6,32	3700
	5	2,98	13,07	14,89	10,74	13,09	4200
	2	11,15	51,58	46,05	57,43	51,58	6600
HES	10	0,68	2,2	1,79	2,45	2,55	-
	7	1,41	5,63	6,28	5,15	5,22	1200
	5	2,37	10,18	14,50	10,38	10,30	1700
	2	14,31	66,52	50,89	69,80	66,51	900

<b>EPI</b>	10	0,32	0,52	0,41	0,52	0,54	2000
	7	0,43	1,03	1,21	1,00	0,99	-
	5	0,59	1,78	1,84	1,79	-	-
	2	2,27	9,69	9,66	9,69	-	-
<b>NAR</b>	10	0,72	2,41	1,95	2,63	2,81	-
	7	1,6	6,56	7,41	5,76	6,11	1500
	5	2,87	12,55	18,01	12,09	12,68	2000
	2	19,18	89,49	68,27	90,73	89,49	18200
<b>KAT</b>	10	0,32	0,52	0,42	0,52	1,22	1800
	7	0,43	1,03	1,20	0,98	2,03	-
	5	0,58	1,75	2,43	1,78	3,12	-
	2	2,13	9,05	6,99	8,92	7,75	-
<b>HKUM</b>	10	0,46	1,17	1,09	1,29	2,59	400
	7	0,62	2,12	2,19	1,93	5,53	1500
	5	0,87	3,08	3,49	2,84	9,34	1900
	2	1,86	7,75	7,03	8,07	21,19	1700
<b>QUER</b>	10	0,25	0,20	0,20	0,21	-	2700
	7	0,31	0,47	0,46	0,43	-	1900
	5	0,38	0,80	0,80	0,84	-	2100
	2	-	-	-	-	-	-
<b>MOR</b>	10	0,44	1,06	1,02	1,07	-	400
	7	0,73	2,45	2,72	2,51	-	-
	5	1,39	5,56	5,24	5,62	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
<b>ESK</b>	90	0,28	0,10	-	-	-	1600
	93	0,29	0,15	-	-	-	2100
	95	0,30	0,18	-	-	-	2100
	98	0,32	0,29	-	-	-	1500
<b>HES</b>	90	0,34	0,34	-	-	-	500
	93	0,40	0,61	-	-	-	600
	95	0,48	0,90	-	-	-	500
	98	0,79	2,13	-	-	-	-

<b>EPI</b>	90	0,33	0,32	-	-	-	1800
	93	0,36	0,44	-	-	-	1600
	95	0,39	0,55	-	-	-	2800
	98	0,46	0,83	-	-	-	1600
<b>NAR</b>	90	0,32	0,27	-	-	-	1300
	93	0,36	0,42	-	-	-	1300
	95	0,40	0,58	-	-	-	700
	98	0,51	1,04	-	-	-	-
<b>KAT</b>	90	0,32	0,28	-	-	-	1400
	93	0,35	0,40	-	-	-	1600
	95	0,38	0,51	-	-	-	2100
	98	0,44	0,75	-	-	-	1300
<b>HKUM</b>	90	0,63	1,52	-	-	-	3200
	93	0,76	2,02	-	-	-	370
	95	0,88	2,49	-	-	-	3500
	98	1,21	3,80	-	-	-	2500
<b>QUER</b>	90	1,01	3,01	-	-	-	1200
	93	1,71	5,82	-	-	-	-
	95	2,36	8,38	-	-	-	-
	98	4,54	17,08	-	-	-	-
<b>MOR</b>	90	0,81	2,21	-	-	-	600
	93	1,23	3,88	-	-	-	-
	95	1,56	5,20	-	-	-	1000
	98	2,18	7,69	-	-	-	-

**Tabuľka P5:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H_2O})$  v režime HILIC a RP

<b>FLAV. ZL.</b>	<b>m<sub>HILIC</sub></b>	<b>a<sub>HILIC</sub></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>HILIC</sub></b>	<b>m<sub>RP</sub></b>	<b>a<sub>RP</sub></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>RP</sub></b>
<b>ESC</b>	-16,34	1,99	0,99	5,68	-6,12	0,99
<b>HESP</b>	-18,17	2,07	0,96	9,90	-9,41	0,98
<b>EPI</b>	-15,66	1,18	0,94	5,08	-5,07	0,99

<b>NAR</b>	-19,29	2,22	0,96	7,35	-7,19	0,99
<b>KAT</b>	-15,28	1,15	0,95	5,31	-5,33	0,99
<b>HKUM</b>	-10,14	1,05	0,98	4,95	-4,29	0,99
<b>QUER</b>	-12,13	0,51	0,99	9,33	-7,92	0,99
<b>MOR</b>	-14,21	1,43	0,98	6,75	-5,71	0,99

**Tabuľka P6:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín závislosti  $\log k = f(\log \varphi_{H_2O})$  v režime HILIC a RP

<b>FLAV. ZL.</b>	<b><math>m_{HILIC}</math></b>	<b><math>a_{HILIC}</math></b>	<b><math>R^2_{HILIC}</math></b>	<b><math>m_{RP}</math></b>	<b><math>a_{RP}</math></b>	<b><math>R^2_{RP}</math></b>
<b>ESC</b>	-1,83	-1,35	0,981	12,28	0,44	0,996
<b>HESP</b>	-2,08	-1,69	0,997	21,38	0,47	0,984
<b>EPI</b>	-1,81	-2,09	0,999	10,98	9.10 <sup>-4</sup>	0,994
<b>NAR</b>	-2,20	-1,78	0,996	15,88	0,14	0,993
<b>KAT</b>	-1,76	-2,04	0,999	11,47	0,03	0,998
<b>HKUM</b>	-1,14	-1,03	0,986	10,71	0,65	0,986
<b>QUER</b>	-2,01	-2,69	0,985	20,18	1,39	0,997
<b>MOR</b>	-2,39	-2,36	0,999	14,62	1,03	0,993

**Tabuľka P7:** Retenčné charakteristiky nukleových báz v režime HILIC (90 - 98 % ACN) a RP (2 - 10 % ACN); kolóna Ascentis Express OH5,  $t_M$  (toluén) = 0,212 min,  $F_m = 1$  ml/min,  $k$  - vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7) a (8), N - vzťahnuté na kolónu

#### NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOSIDY

<b>NUKL. B.</b>	<b><math>\varphi_{H_2O}</math></b>	<b><math>t_R</math> [min]</b>	<b><math>k_4</math></b>	<b><math>k_6</math></b>	<b><math>k_7</math></b>	<b>N</b>
<b>THY</b>	10	0,31	0,47	0,50	0,54	1300
	7	0,35	0,67	0,64	0,61	3300
	5	0,38	0,79	0,76	0,70	2300
	2	0,41	0,92	0,97	0,99	800
<b>AD</b>	10	0,73	2,45	2,38	2,75	2000
	7	1,06	3,98	4,21	3,82	2000
	5	1,44	5,77	6,14	5,21	2100
	2	2,58	11,19	10,85	12,11	2500

<b>GU</b>	10	1,80	7,49	6,44	8,91	5000
	7	4,19	18,78	21,44	17,93	5800
	5	8,94	41,19	47,81	34,68	10000
	2	39,54	185,52	159,15	208,92	3700
<b>CYT</b>	10	1,03	3,85	3,45	4,37	3900
	7	1,74	7,20	7,65	6,92	4500
	5	2,78	12,10	13,00	10,67	4900
	2	7,04	32,19	28,81	34,81	5200
<b>ADEDN</b>	10	0,67	2,16	2,02	2,29	2000
	7	0,92	3,33	3,59	3,20	1700
	5	1,23	4,79	5,28	4,40	2000
	2	2,36	10,11	9,40	10,40	1300
<b>CTD</b>	10	1,53	6,23	5,69	7,24	5200
	7	3,14	13,79	15,22	12,77	5800
	5	5,81	26,42	29,34	21,81	5500
	2	18,48	86,18	78,52	93,62	8800
<b>UR</b>	10	0,37	0,73	0,67	0,74	-
	7	0,40	0,91	1,00	0,93	-
	5	0,47	1,23	1,30	1,16	-
	2	0,65	2,06	1,93	2,11	700
<b>2-DAD</b>	10	0,59	1,79	1,75	1,95	1100
	7	0,76	2,59	2,64	2,47	1500
	5	0,93	3,40	3,48	3,08	1500
	2	1,36	5,40	5,28	5,64	1600
<b>2-DGU</b>	10	1,32	5,24	5,64	7,24	3900
	7	2,67	11,61	11,39	10,61	4800
	5	4,99	22,52	18,22	15,21	6700
	2	7,13	32,65	36,83	40,54	1600
<b>THY</b>	90,0	0,26	0,04	-	-	2300
	93,0	0,27	0,06	-	-	1600
	95,0	0,27	0,08	-	-	2200
	98,0	0,28	0,12	-	-	3000

<b>AD</b>	90,0	0,21	-0,17	-	-	1300
	93,0	0,20	-0,18	-	-	1400
	95,0	0,19	-0,21	-	-	1300
	98,0	0,19	-0,21	-	-	1600
<b>GU</b>	90,0	0,25	0,00	-	-	2400
	93,0	0,25	0,01	-	-	2400
	95,0	0,25	0,004	-	-	1000
	98,0	0,25	0,02	-	-	2600
<b>CYT</b>	90,0	0,18	-0,27	-	-	1300
	93,0	0,18	-0,27	-	-	1300
	95,0	0,18	-0,27	-	-	1400
	98,0	0,18	-0,27	-	-	1400
<b>ADEN</b>	90,0	0,24	-0,05	-	-	2100
	93,0	0,19	-0,23	-	-	1300
	95,0	0,19	-0,23	-	-	1400
	98,0	0,19	-0,24	-	-	1500
<b>CYTID</b>	90,0	0,18	-0,27	-	-	1100
	93,0	0,18	-0,27	-	-	1100
	95,0	0,18	-0,27	-	-	1000
	98,0	0,18	-0,27	-	-	1400
<b>UR</b>	90,0	0,25	0,00	-	-	2500
	93,0	0,25	0,004	-	-	2400
	95,0	0,25	0,02	-	-	1300
	98,0	0,26	0,13	-	-	2300
<b>2-DAD</b>	90,0	0,21	-0,17	-	-	1700
	93,0	0,20	-0,20	-	-	1200
	95,0	0,19	-0,21	-	-	1400
	98,0	0,19	-0,21	-	-	1600
<b>2-DGU</b>	90,0	0,25	0,008	-	-	2600
	93,0	0,25	0,02	-	-	2600
	95,0	0,25	0,008	-	-	2600
	98,0	0,26	0,03	-	-	2600

**Tabuľka P8:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) nukleových báz závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $\log k = f(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC

<b>NUKL. B.</b>	<b>m <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>m <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>
<b>THY</b>	-3,63	0,06	0,98	-0,38	-0,65	0,83
<b>AD</b>	-8,23	1,20	0,96	-0,92	-0,48	0,97
<b>GU</b>	-17,41	2,55	0,99	-1,-96	-1,01	0,98
<b>CYT</b>	-11,52	1,69	0,99	-1,-29	-0,65	0,98
<b>ADEN</b>	-8,35	1,14	0,98	-0,94	-0,58	0,99
<b>CTD</b>	-14,25	2,18	0,98	-1,59	-0,73	0,98
<b>UR</b>	-5,72	0,40	0,96	-0,65	-0,78	0,99
<b>2-DAD</b>	-5,98	0,84	0,99	-0,66	-0,37	0,97
<b>2-DGU</b>	-10,19	1,77	0,96	-1,07	-0,21	0,84



**Tabuľka P9:** Parametre  $a_2$ ,  $m_{RP}$ ,  $m_{HILIC}$  a  $b$  podľa rovnice 10 na OH5 kolóne, koeficient preloženia  $D^2$ , objemový podiel vody,  $\phi_{min}$ , pri prechode medzi HILIC a RP mechanizmom

<b>FENOLICKÉ KYSELINY</b>											
<b>KYSELINA</b>	<b><math>a_2</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{RP}</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{HILIC}</math></b>	<b>SD</b>	<b>B</b>	<b>SD</b>	<b><math>\phi_{MIN}</math></b>	<b>RSC</b>	<b><math>D^2</math> (%)</b>
<b>GALL</b>	2,09	0,06	25,91	5,61	114,79	47,85	0,77	0,22	0,62	$2,16 \cdot 10^{-4}$	100,00
<b>VAN</b>	1,61	0,02	15,54	1,36	39,00	5,68	1,76	0,19	0,52	$5,01 \cdot 10^{-4}$	99,98
<b>KAV</b>	2,31	0,05	11,29	1,44	19,25	3,69	4,03	0,74	0,49	$3,21 \cdot 10^{-4}$	99,99
<b>HPA</b>	1,84	0,02	11,78	1,55	26,42	5,30	2,38	0,38	0,55	$1,13 \cdot 10^{-3}$	99,98
<b>SYR</b>	1,63	0,01	25,26	1,37	88,74	8,69	1,00	0,07	0,53	$1,46 \cdot 10^{-4}$	100,00
<b>FER</b>	1,55	0,02	18,42	1,61	46,53	7,06	1,65	0,18	0,49	$6,23 \cdot 10^{-4}$	99,97
<b>PRO</b>	1,92	0,13	12,64	4,81	30,22	18,98	2,09	1,11	0,56	$5,14 \cdot 10^{-3}$	99,87
<b>SAL</b>	1,35	0,19	4,17	0,88	3,10	1,06	31,89	22,86	0,29	$5,97 \cdot 10^{-3}$	99,30
<b>SIN</b>	1,91	0,10	12,51	4,34	20,52	11,14	3,83	1,87	0,45	$1,77 \cdot 10^{-2}$	99,18
<b>PHB</b>	1,70	0,08	9,90	1,37	19,01	3,92	3,18	0,56	0,52	$3,22 \cdot 10^{-4}$	99,96
<b>KUM</b>	1,72	0,02	11,48	1,22	21,05	3,48	3,17	0,45	0,48	$1,13 \cdot 10^{-3}$	99,96
<b>CHLG</b>	3,21	0,06	8,22	0,30	11,39	0,61	8,58	0,71	0,49	$1,46 \cdot 10^{-4}$	100,00

**Tabuľka P10:** Parametre  $a_2$ ,  $m_{RP}$ ,  $m_{HILIC}$  a  $b$  podľa rovnice 10 na OH5 kolóne, koeficient preloženia  $D^2$ , objemový podiel vody,  $\varphi_{min}$ , pri prechode medzi HILIC a RP mechanizmom

<b>FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY</b>											
<b>FEN .L.</b>	<b><math>a_2</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{RP}</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{HILIC}</math></b>	<b>SD</b>	<b>b</b>	<b>SD</b>	<b><math>\varphi_{MIN}</math></b>	<b>RSC</b>	<b><math>D^2</math> [%]</b>
<b>ESC</b>	2,09	0,03	19,24	2,59	44,81	9,70	2,06	0,35	0,53	$2,44 \cdot 10^{-3}$	99,97
<b>HES</b>	2,18	0,12	38,58	16,93	118,56	94,21	1,19	0,65	0,49	$3,36 \cdot 10^{-2}$	99,13
<b>EPI</b>	1,43	0,14	8,40	3,13	10,39	5,66	7,92	4,84	0,41	$2,06 \cdot 10^{-2}$	98,67
<b>NAR</b>	2,38	0,12	19,57	6,61	37,73	20,44	2,79	1,25	0,48	$2,62 \cdot 10^{-2}$	99,49
<b>KAT</b>	1,35	0,13	9,83	3,65	13,43	7,54	5,87	3,35	0,42	$2,06 \cdot 10^{-2}$	98,70
<b>HKUM</b>	1,13	0,04	12,81	2,33	24,51	7,75	2,48	0,63	0,43	$2,72 \cdot 10^{-3}$	99,40
<b>QUER</b>	0,67	0,06	26,61	2,85	62,03	13,41	1,61	0,28	0,39	$1,06 \cdot 10^{-3}$	99,97
<b>MOR</b>	1,70	0,11	15,20	2,40	23,81	6,77	3,63	1,02	0,40	$3,07 \cdot 10^{-3}$	99,41

**Tabuľka P11:** Parametre  $a_2$ ,  $m_{RP}$ ,  $m_{HILIC}$  a  $b$  podľa rovnice 10 na OH5 kolóne, koeficient preloženia  $D^2$ , objemový podiel vody,  $\varphi_{min}$ , pri prechode medzi HILIC a RP mechanizmom

<b>NUKLEOVÉ BÁZY</b>											
<b>NUK. L.</b>	<b><math>a_2</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{RP}</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>m_{HILIC}</math></b>	<b>SD</b>	<b>b</b>	<b>SD</b>	<b><math>\varphi_{MIN}</math></b>	<b>RSC</b>	<b><math>D^2</math> [%]</b>
<b>THY</b>	0,07	0,04	-6,74	1,89	7,95	4,40	-0,82	0,08	0,62	$4,15 \cdot 10^{-3}$	99,81
<b>UR</b>	0,40	0,05	-10,09	2,93	11,92	7,69	-0,80	0,10	0,64	$4,02 \cdot 10^{-3}$	99,90

**Tabuľka P12:** Parametre  $a$ ,  $b$ ,  $-m$  (experimentálne konštanty závisiace na rozpúšťadle a chromatografickom systéme) podľa rovnice 8 na OH5 kolóne, koeficient preloženia  $D^2$ , objemový podiel vody,  $\varphi_{\min}$

<b>FENOLICKÉ KYSELINY</b>									
<b>KYSELINA</b>	<b>a</b>	<b>SD</b>	<b>b</b>	<b>SD</b>	<b>-m</b>	<b>SD</b>	<b>RSC</b>	<b>D<sup>2</sup> (%)</b>	
<b>VAN</b>	0,80	0,06	1,42	0,39	16,39	5,27	$2,95 \cdot 10^{-3}$	99,99	
<b>HPA</b>	-0,92	0,01	-0,56	0,08	47,86	6,93	$1,93 \cdot 10^{-4}$	100,00	
<b>SYR</b>	0,74	0,03	1,77	0,19	12,13	1,59	$1,04 \cdot 10^{-3}$	100,00	
<b>FER</b>	0,78	0,10	1,75	0,71	13,75	6,70	$6,88 \cdot 10^{-3}$	99,99	
<b>SAL</b>	0,29	0,38	9,28	4,58	2,36	1,94	$4,14 \cdot 10^{-2}$	99,75	
<b>SIN</b>	0,01	0,05	6,10	0,67	1,77	0,44	$1,48 \cdot 10^{-2}$	99,98	
<b>PHB</b>	0,79	0,11	1,52	0,73	16,35	9,29	$1,23 \cdot 10^{-2}$	99,99	
<b>KUM</b>	0,70	0,10	2,27	0,69	11,01	4,28	$1,24 \cdot 10^{-2}$	99,99	

**Tabuľka P13:** Parametre  $a$ ,  $b$ ,  $-m$  (experimentálne konštanty závisiace na rozpúšťadle a chromatografickom systéme) podľa rovnice 8 na OH5 kolóne, koeficient preloženia  $D^2$ , objemový podiel vody

<b>FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY</b>								
<b>FLAV. ZL.</b>	<b>a</b>	<b>SD</b>	<b>b</b>	<b>SD</b>	<b>-m</b>	<b>SD</b>	<b>RSC</b>	<b>D<sup>2</sup> (%)</b>
<b>ESC</b>	0,32	0,02	4,92	0,09	4,58	0,26	$4,78 \cdot 10^{-3}$	100,00
<b>HES</b>	0,00	0,05	6,30	0,75	2,00	0,49	$2,99 \cdot 10^{-1}$	99,98
<b>EPIKAT</b>	-0,05	0,04	14,99	0,55	1,64	0,16	$1,55 \cdot 10^{-3}$	99,99
<b>NAR</b>	0,01	0,05	6,19	0,66	2,21	0,50	$3,77 \cdot 10^{-1}$	99,99
<b>KAT</b>	-0,04	0,05	14,93	0,98	1,62	0,19	$2,08 \cdot 10^{-3}$	99,99
<b>HKUM</b>	0,21	0,13	6,94	0,68	1,92	0,60	$1,33 \cdot 10^{-2}$	99,95

➤ Ascentis Express HILIC

**Tabuľka P14:** Retenčné charakteristiky fenolických kyselín v režime HILIC (90 – 98% ACN); kolóna Ascentis Express HILIC,  $t_M$  (toluén) = 0,155 min,  $F_m$  = 1 ml/min,  $k$  – vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7), N – vzťahnuté na kolónu

FENOLICKÉ KYSELINY						
KYSELINA	$\varphi_{H_2O}$	$t_R$ [min]	$k_4$	$k_6$	$k_7$	N
<b>GALL</b>	10	0,46	1,94	1,95	2,88	1100
	7	1,40	8,03	7,77	6,28	1400
	5	3,07	18,80	19,52	13,07	2100
	2	12,35	78,64	77,66	96,3	10200
<b>VAN</b>	10	0,32	1,05	1,00	1,32	-
	7	0,56	2,64	2,70	2,32	600
	5	0,94	5,05	5,24	3,97	1200
	2	2,47	14,92	14,18	17,04	1700
<b>KAV</b>	10	0,79	4,12	5,18	6,46	-
	7	2,06	12,32	9,22	8,68	-
	5	2,61	15,86	13,55	11,48	-
	2	3,24	19,88	24,14	24,56	1000
<b>HPA</b>	10	0,40	1,56	1,55	2,09	-
	7	0,87	4,61	4,53	3,82	1500
	5	1,54	8,94	9,24	6,74	-
	2	4,39	27,33	26,93	31,71	1500
<b>SYR</b>	10	0,38	1,46	1,43	1,82	-
	7	0,73	3,68	3,70	3,12	500
	5	1,15	6,40	6,97	5,18	1000
	2	3,04	18,67	18,00	26,67	1500
<b>FER</b>	10	0,31	1,01	0,99	1,29	-
	7	0,56	2,61	2,57	2,22	-
	5	0,87	4,61	4,86	3,69	700
	2	2,21	13,23	12,67	14,87	1000
<b>PRO</b>	10	0,32	1,04	1,05	1,55	-
	7	0,82	4,30	4,03	3,31	100
	5	1,63	9,49	9,89	6,78	-
	2	6,16	38,72	38,02	47,73	2200

<b>SAL</b>	10	0,16	0,06	0,08	0,11	1600
	7	0,20	0,28	0,19	0,17	2000
	5	0,22	0,42	0,34	0,27	2800
	2	0,25	0,59	0,80	0,83	-
<b>SIN</b>	10	0,25	0,63	2,71	2,82	-
	7	0,62	2,97	6,82	6,38	600
	5	0,97	4,64	12,63	13,78	700
	2	2,41	14,55	31,81	112,37	1000
<b>PHB</b>	10	0,20	0,29	2,31	2,40	-
	7	0,56	2,59	6,11	5,67	1300
	5	0,87	4,64	11,67	12,75	1400
	2	2,29	13,79	30,82	116,02	1900
<b>KUM</b>	10	0,18	0,13	2,28	2,34	1400
	7	0,55	2,52	6,29	5,76	1000
	5	0,89	4,72	12,40	13,45	1400
	2	2,41	14,54	34,31	135,33	900
<b>CHLG</b>	10	0,64	3,14	3,05	3,24	600
	7	1,78	10,44	11,37	10,10	1300
	5	4,60	28,68	27,35	29,53	4200
	2	-	-	-	-	-

**Tabuľka P15:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) fenolických kyselín závislosti  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $\log k = f(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC

<b>KYSELINA</b>	<b>m <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>m <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>
<b>GALL</b>	-19,99	2,29	0,99	-2,18	-1,72	0,95
<b>VAN</b>	-14,41	1,44	0,99	-1,59	-1,47	0,96
<b>KAV</b>	-8,36	1,55	0,86	-0,83	-0,02	0,68
<b>HPA</b>	-15,49	1,74	0,99	-1,69	-1,37	0,95
<b>SYR</b>	-13,74	1,53	0,99	-1,51	-1,25	0,96
<b>FER</b>	-13,86	1,38	0,99	-1,52	-1,41	0,96
<b>PRO</b>	-19,50	1,97	0,99	-2,13	-1,94	0,94
<b>SAL</b>	-12,41	0,15	0,87	-1,24	-2,19	0,69
<b>SIN</b>	-13,37	1,77	0,93	-2,29	-1,84	0,97
<b>PHB</b>	-14,06	1,77	0,92	-2,41	-2,03	0,97

<b>KUM</b>	-14,73	1,83	0,92	-2,52	-2,15	0,97
<b>CHLG</b>	-19,06	2,39	0,99	-3,19	-2,68	0,99

**Tabuľka P16:** Retenčné charakteristiky flavonoidových zlúčenín v režime HILIC (90 – 98% ACN); kolóna Ascentis Express HILIC,  $t_M$  (toluén) = 0,155 min,  $F_m$  = 1 ml/min,  $k$  – vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7),  $N$  – vzťahnuté na kolónu

<b>FLAVONOIDOVÉ ZLÚČENINY</b>						
<b>FLAV. ZL.</b>	$\phi_{H_2O}$	$t_R$ [min]	$k_4$	$k_6$	$k_7$	$N$
<b>ESK</b>	10	0,29	0,88	0,78	1,12	-
	7	0,57	2,69	3,00	2,43	800
	5	1,19	6,70	7,35	5,05	1100
	2	5,08	31,77	28,22	36,88	1600
<b>HES</b>	10	0,27	0,76	0,68	0,95	-
	7	0,49	2,13	2,49	2,01	-
	5	1,03	5,66	5,92	4,04	500
	2	3,76	23,25	21,62	27,16	7400
<b>EPI</b>	10	0,19	0,19	0,15	0,21	-
	7	0,21	0,34	0,56	0,46	-
	5	0,38	1,47	1,37	0,95	-
	2	1,10	6,07	5,26	7,09	-
<b>NAR</b>	10	0,28	0,83	0,65	0,93	-
	7	0,44	1,85	2,67	2,13	-
	5	1,17	6,54	6,85	4,63	1000
	2	5,34	33,46	28,21	38,43	1000
<b>KAT</b>	10	0,18	0,14	0,14	0,21	-
	7	0,25	0,61	0,53	0,44	2100
	5	0,34	1,21	1,24	0,87	-
	2	0,84	4,43	4,53	5,52	-

<b>HKUM</b>	10	0,17	0,12	0,10	0,14	2100
	7	0,21	0,35	0,33	0,27	2500
	5	0,24	0,52	0,71	0,50	900
	2	0,58	2,72	2,23	2,80	-
<b>QUER</b>	10	0,19	0,24	0,25	0,27	-
	7	0,40	1,56	1,42	1,20	-
	5	0,82	4,30	4,53	4,88	-
	2	-	-	-	-	-
<b>MOR</b>	10	0,17	0,08	0,09	0,11	-
	7	0,30	0,91	0,65	0,54	-
	5	0,46	1,94	2,34	2,51	-
	2	-	-	-	-	-

**Tabuľka P17:** Parametre a korelačné koeficienty ( $R^2$ ) flavonoidových zlúčenín  $\log k = f(\varphi_{H2O})$  a  $\log k = f(\log \varphi_{H2O})$  v režime HILIC

<b>FLAV. ZL.</b>	<b>m <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\varphi_{H2O}</math></b>	<b>m <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b>a <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>	<b><math>R^2</math> <math>\log \varphi_{H2O}</math></b>
<b>ESC</b>	-19,47	1,84	0,99	-2,17	-2,12	0,98
<b>HESP</b>	-18,76	1,71	0,99	-2,08	-2,10	0,97
<b>EPI</b>	-19,44	1,11	0,95	-2,19	-2,87	0,96
<b>NAR</b>	-20,48	1,86	0,97	-2,31	-2,34	0,98
<b>KAT</b>	-18,70	1,03	0,99	-2,02	-2,69	0,93
<b>HKUM</b>	-16,62	0,68	0,99	-1,87	-2,73	0,98
<b>QUER</b>	-25,27	1,92	0,97	-4,18	-4,75	0,93
<b>MOR</b>	-27,832	1,76	0,99	-4,55	-5,52	0,98



**Tabuľka P18:** Retenčné charakteristiky nukleových báz v režime HILIC (90 – 98% ACN); kolóna: Ascentis Expres HILIC,  $t_M$  (toluén) = 0,155 min,  $F_m$  = 1 ml/min,  $k$  – vypočítané podľa rovníc (4), (6), (7),  $N$  – vzťahnuté na kolónu

NUKLEOVÉ BÁZY A NUKLEOZIDY						
NUKL. B.	$\phi_{H_2O}$	$t_R$ [min]	$k_4$	$k_6$	$k_7$	$N$
<b>THY</b>	10	0,18	0,00	0,00	0,01	2000
	7	0,20	0,01	0,01	0,01	2500
	5	0,21	0,01	0,01	0,01	2800
	2	0,24	0,01	0,01	0,01	1000
<b>AD</b>	10	0,34	0,03	0,03	0,03	400
	7	0,46	0,05	0,05	0,05	400
	5	0,61	0,07	0,08	0,06	-
	2	1,22	0,17	0,15	0,17	600
<b>GU</b>	10	0,51	0,06	0,05	0,07	500
	7	1,07	0,14	0,15	0,13	1400
	5	1,98	0,28	0,31	0,23	1500
	2	6,59	1,00	0,93	1,14	500
<b>CYT</b>	10	0,51	0,05	0,05	0,06	900
	7	0,83	0,11	0,12	0,10	1400
	5	1,29	0,18	0,21	0,17	1500
	2	3,97	0,59	0,52	0,63	2300
<b>ADEN</b>	10	0,35	0,03	0,03	0,03	-
	7	0,46	0,05	0,05	0,05	500
	5	0,63	0,07	0,08	0,07	600
	2	1,31	0,18	0,16	0,19	1100
<b>CTD</b>	10	0,57	0,06	0,06	0,07	1000
	7	1,16	0,16	0,17	0,14	1800
	5	1,96	0,28	0,35	0,25	2000
	2	7,93	1,21	1,04	1,28	3100

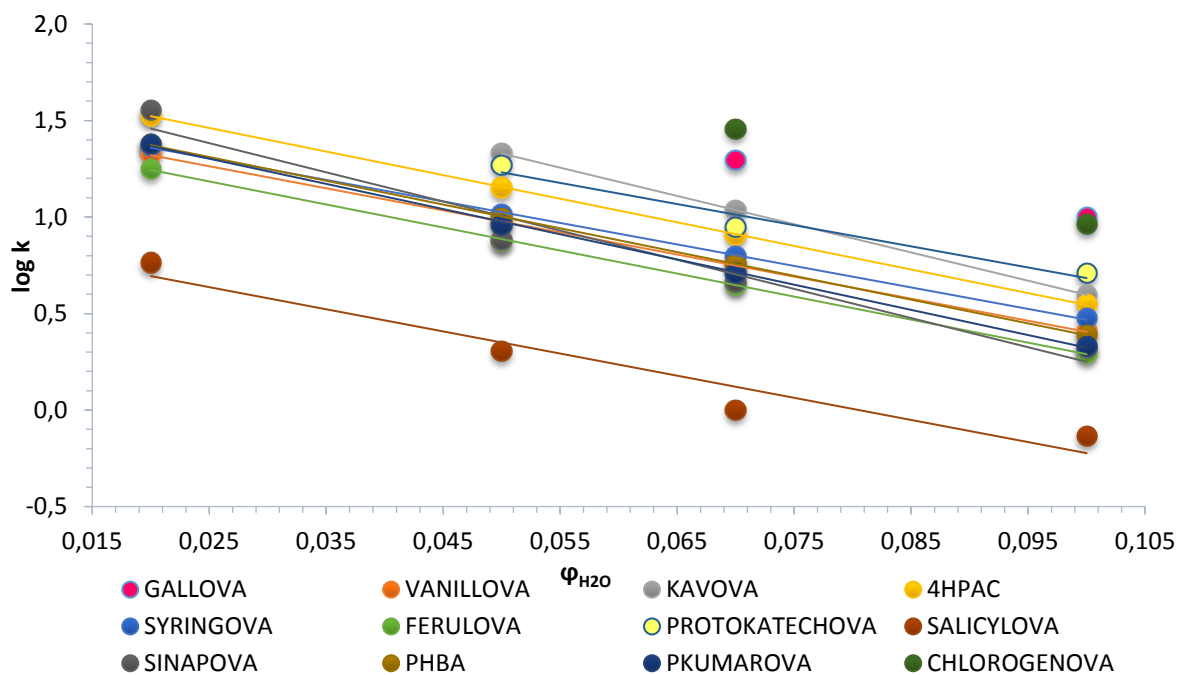
<b>UR</b>	10	0,20	0,01	0,01	0,01	-
	7	0,21	0,01	0,01	0,01	700
	5	0,22	0,01	0,01	0,01	-
	2	0,29	0,02	0,02	0,02	-
<b>2-DAD</b>	10	0,32	0,03	0,02	0,03	-
	7	0,41	0,04	0,04	0,04	-
	5	0,51	0,06	0,06	0,05	-
	2	0,83	0,11	0,10	0,11	1100
<b>2-DGU</b>	10	0,46	0,05	0,04	0,01	600
	7	0,87	0,11	0,13	0,02	1300
	5	1,51	0,21	0,27	0,04	1500
	2	6,57	0,99	0,82	0,20	2900

**Tabuľka P19:** Parametre a korelačné koeficienty nukleových báz závislosti  $\log k = f(\varphi_{H20})$  a  $\log k = f(\log \varphi_{H20})$  v režime HILIC

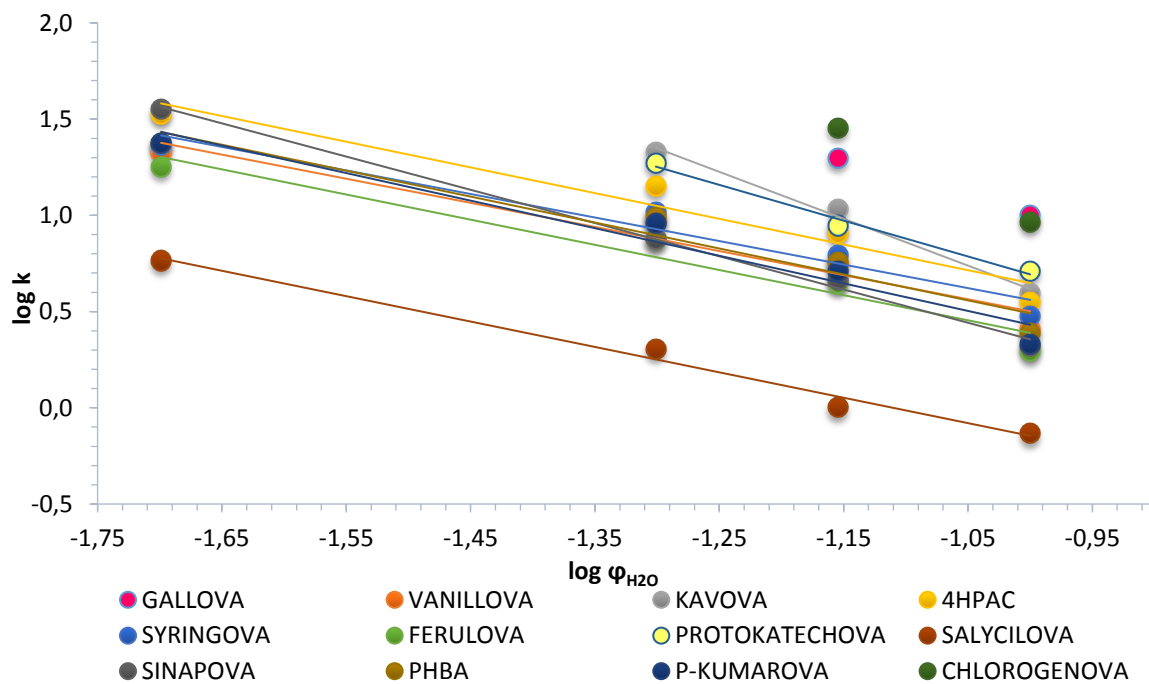
<b>NUKL. B.</b>	<b><math>m_{\varphi_{H20}}</math></b>	<b><math>a_{\varphi_{H20}}</math></b>	<b><math>R^2_{\varphi_{H20}}</math></b>	<b><math>m_{\log \varphi_{H20}}</math></b>	<b><math>a_{\log \varphi_{H20}}</math></b>	<b><math>R^2_{\log \varphi_{H20}}</math></b>
<b>THY</b>	-5,56	-1,79	0,97	-0,60	-2,9	0,91
<b>AD</b>	-9,48	-0,64	0,98	-1,07	-2,58	0,99
<b>GU</b>	-15,67	0,28	0,97	-1,74	-2,90	0,99
<b>CYT</b>	-12,87	-0,03	0,99	-1,46	-2,68	0,97
<b>ADEN</b>	-9,59	-0,60	0,97	-1,09	-2,58	0,99
<b>CTD</b>	-15,75	0,33	0,98	-1,77	-2,90	0,99
<b>UR</b>	-5,74	-1,63	0,92	-0,67	-2,83	0,99
<b>2-DAD</b>	-7,54	-0,86	0,98	-0,85	-2,40	0,98
<b>2-DGU</b>	-16,31	0,24	0,97	-1,85	-3,85	0,99

## **OBRÁZKY**

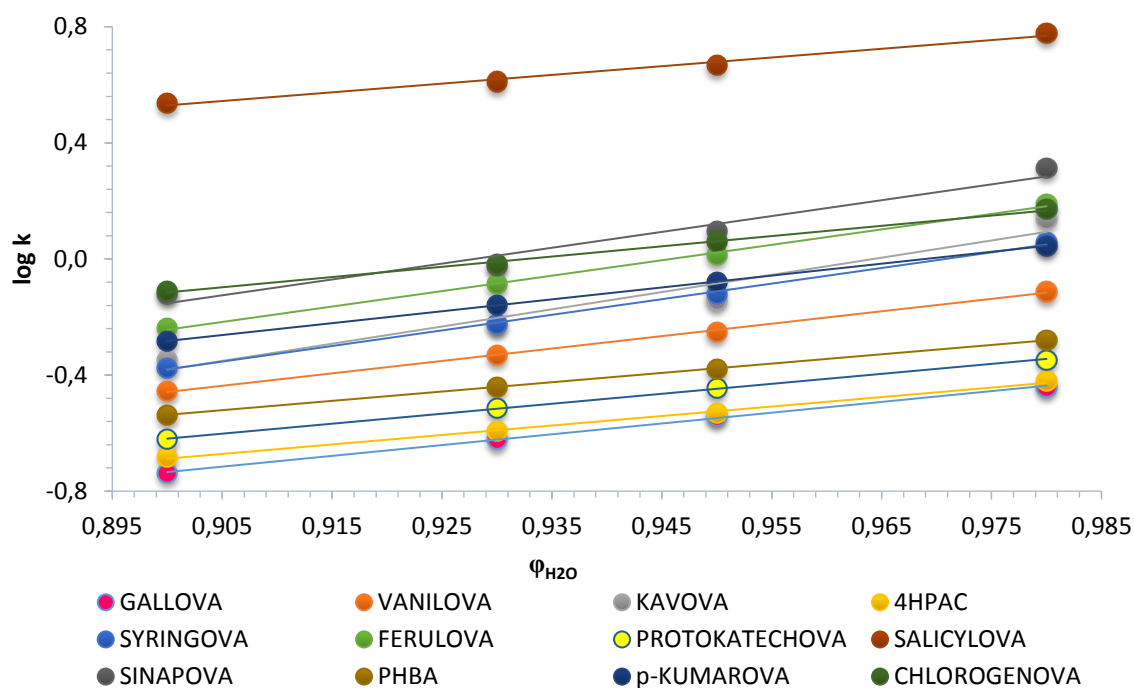
➤ Ascentis Express OH5



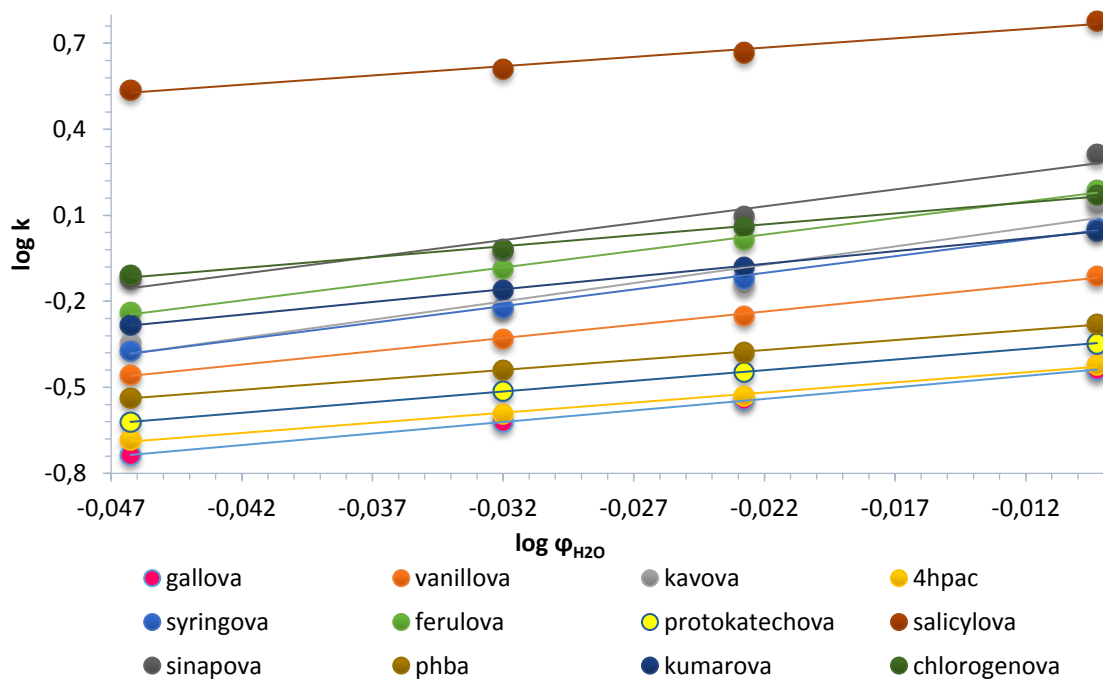
**Obrázok P1:** Závislosť logaritmu retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fázi ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC



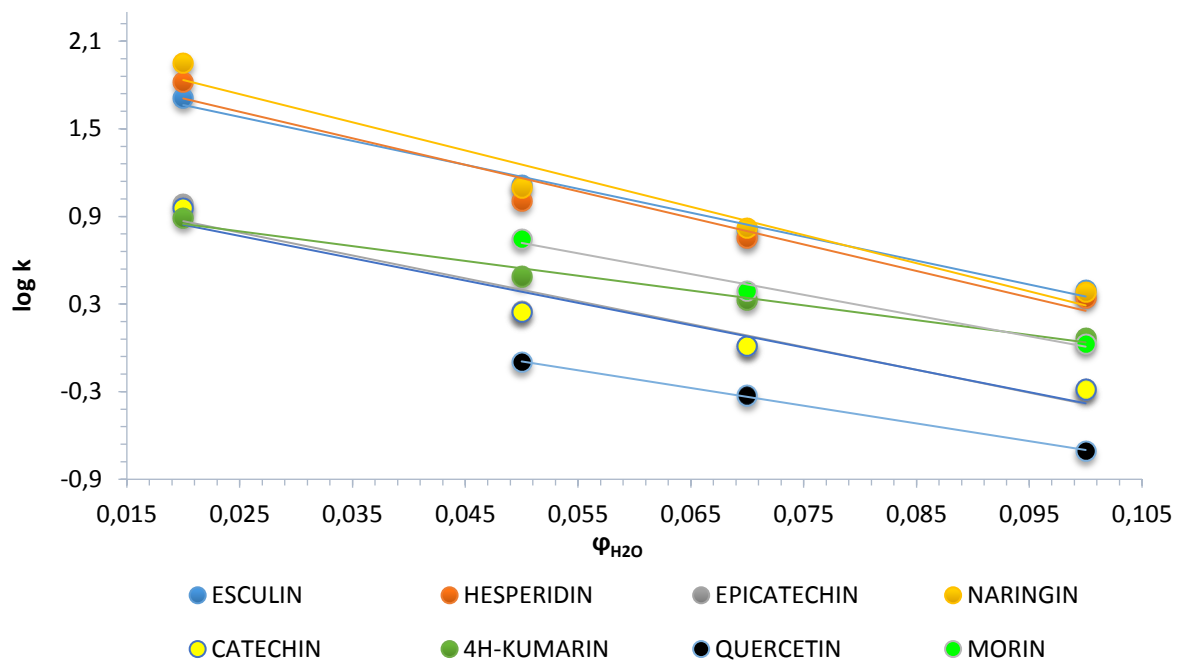
**Obrázok P2:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC



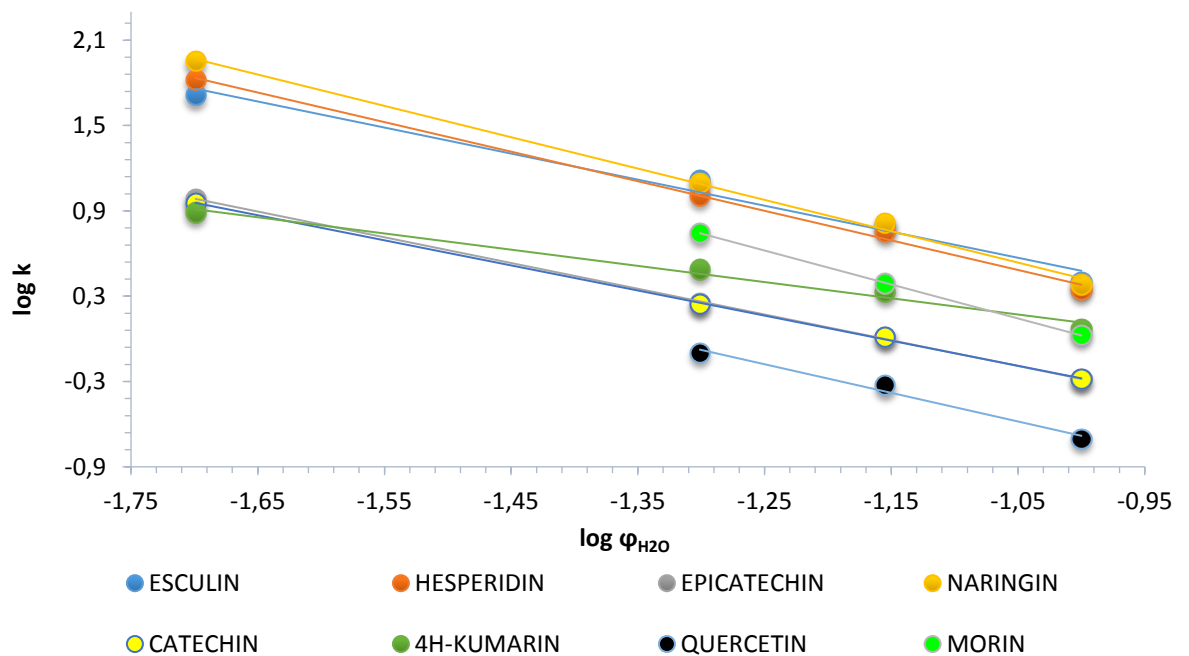
**Obrázok P3:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP



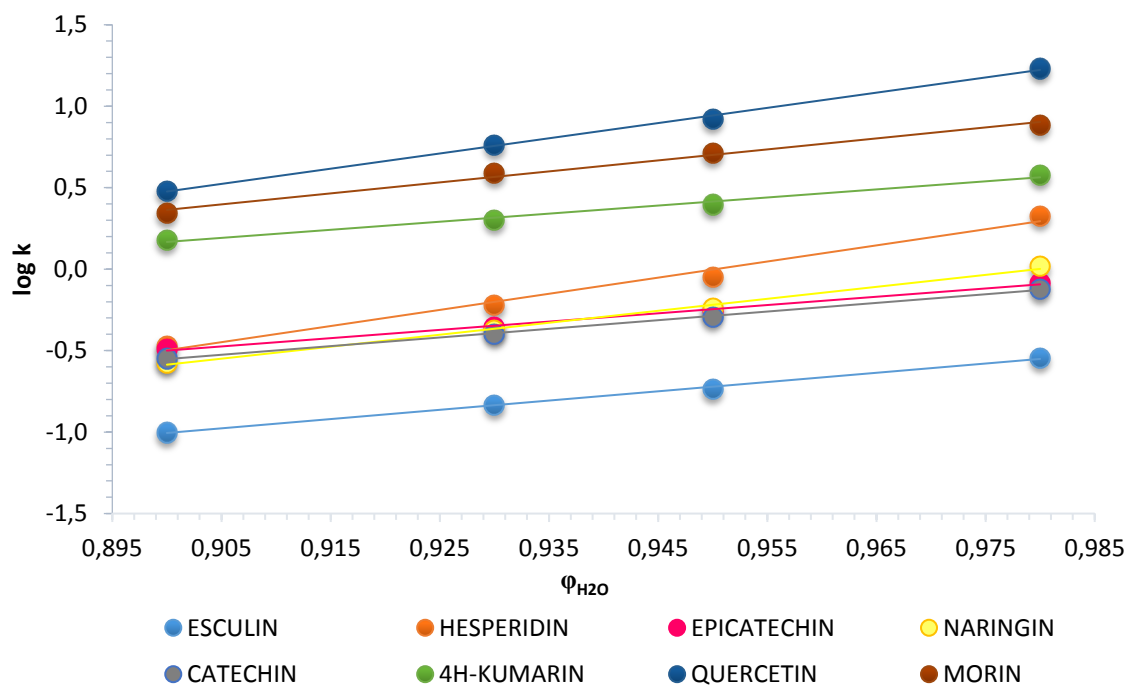
**Obrázok P4:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP



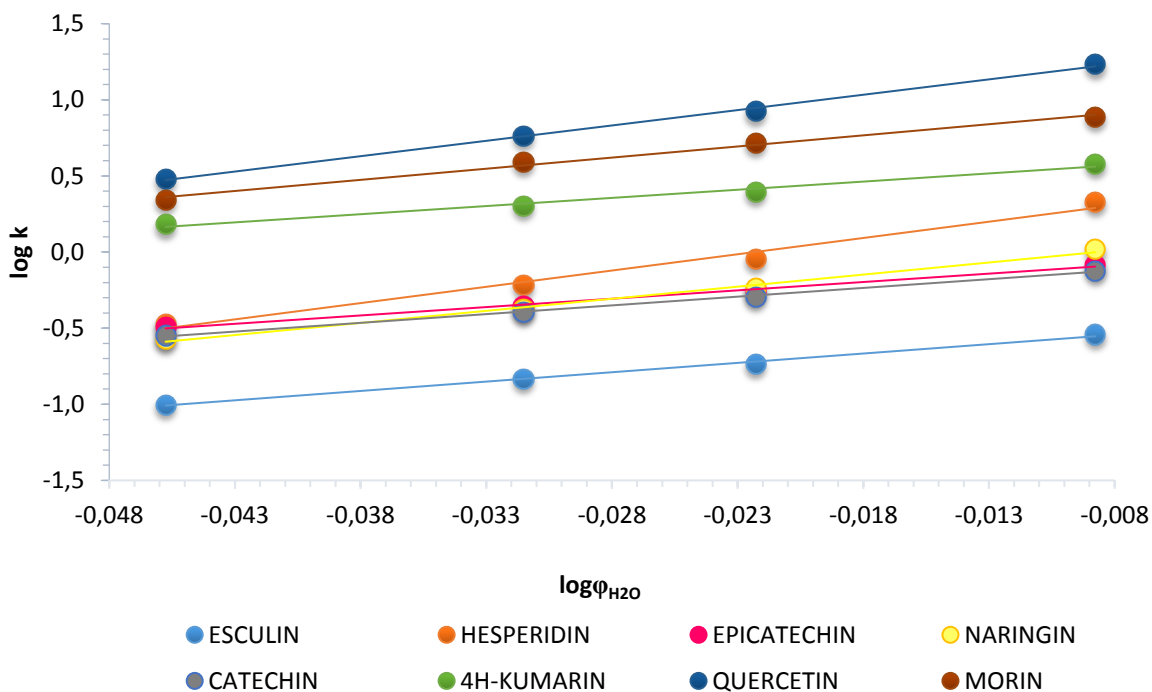
**Obrázok P5:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC



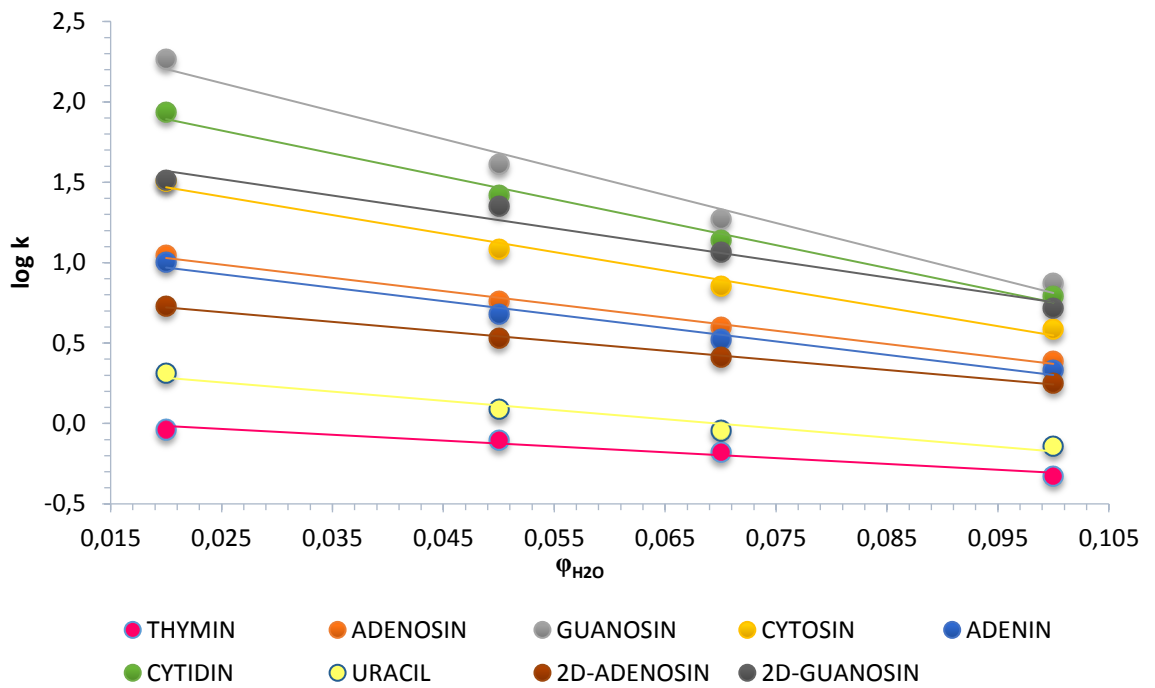
**Obrázok P6:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC



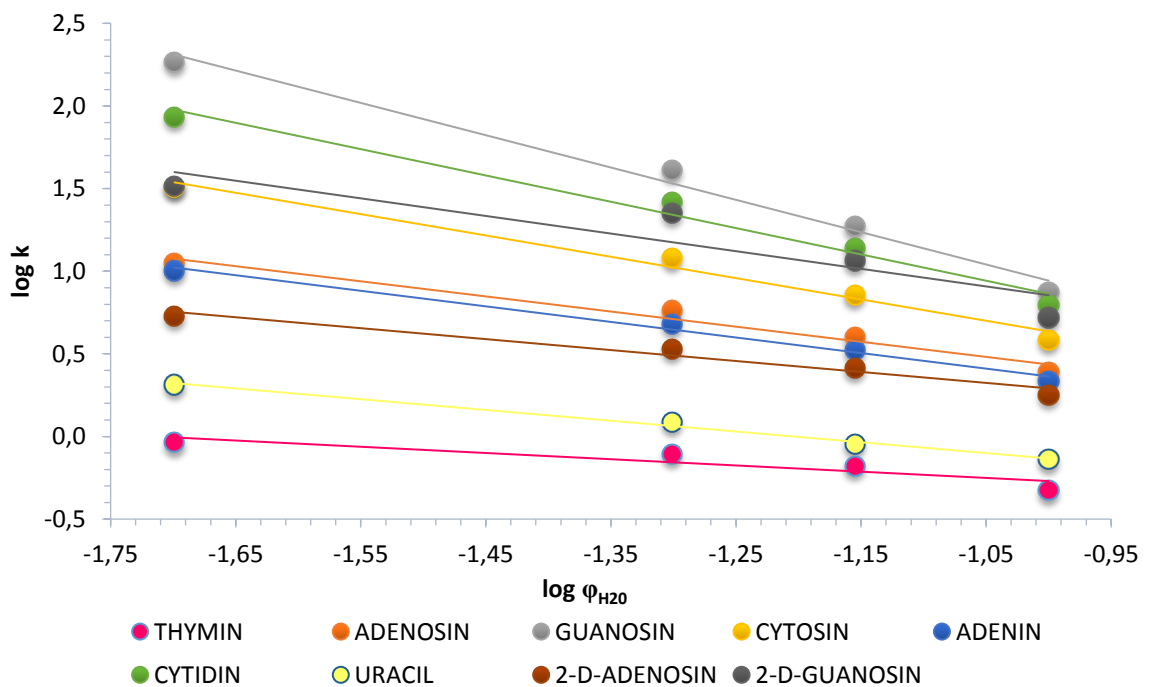
**Obrázok P7:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP



**Obrázok P8:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime RP

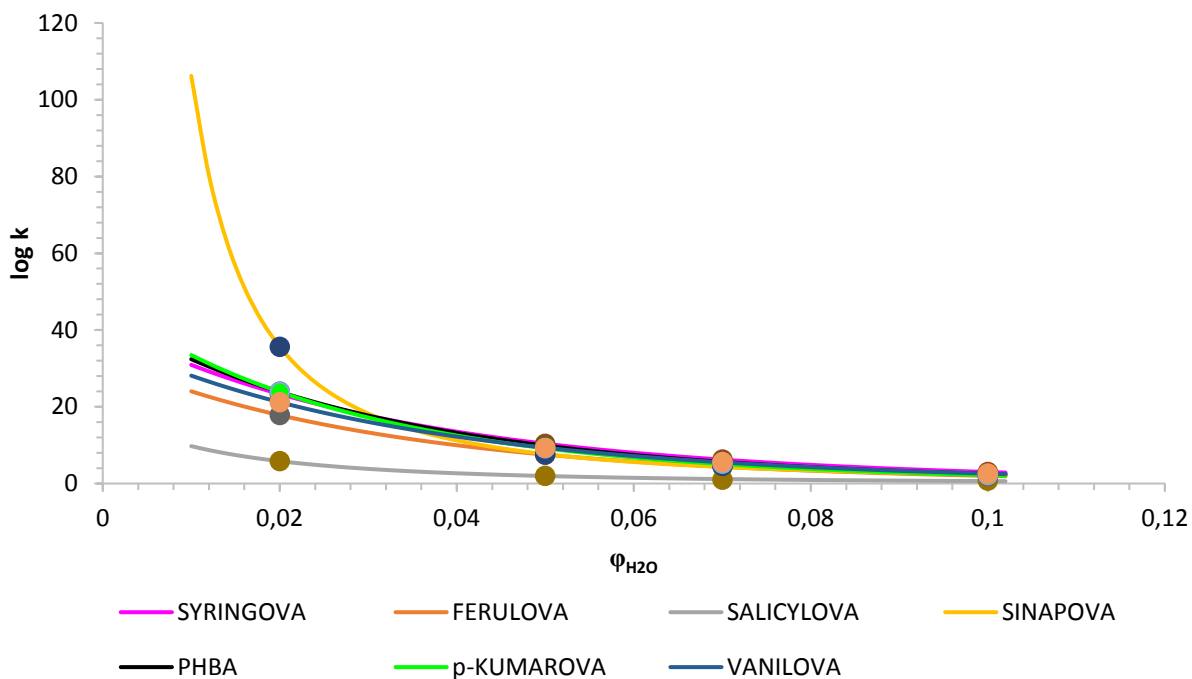


**Obrázok P9:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC

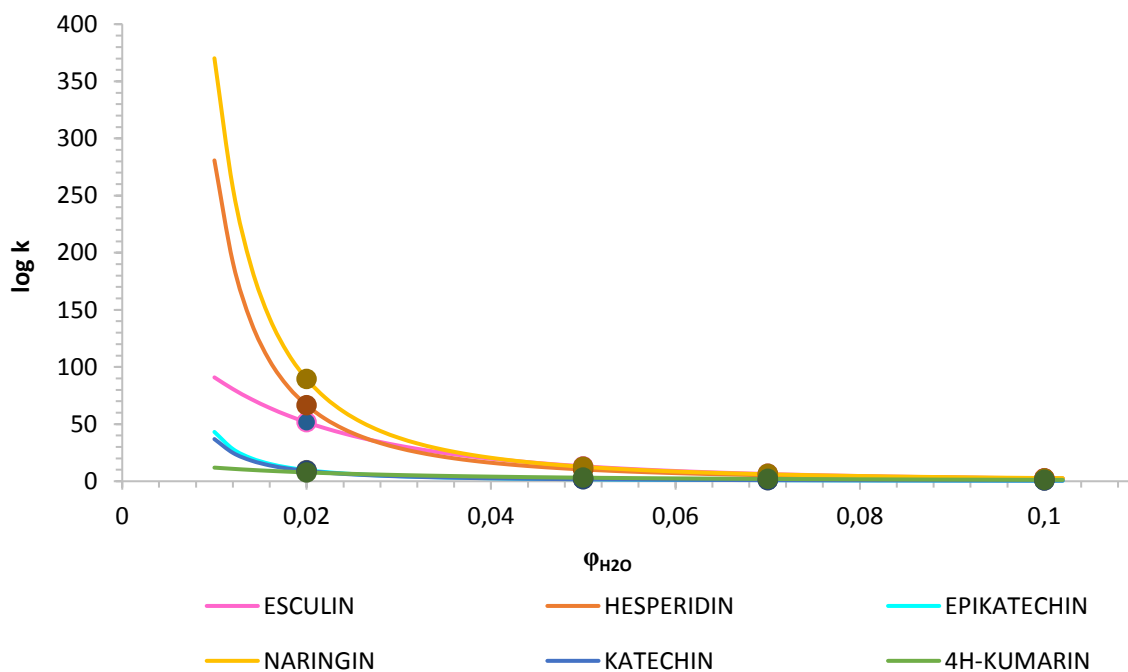


**Obrázok P10:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \phi_{H_2O}$ ) pre kolónu OH5 v režime HILIC

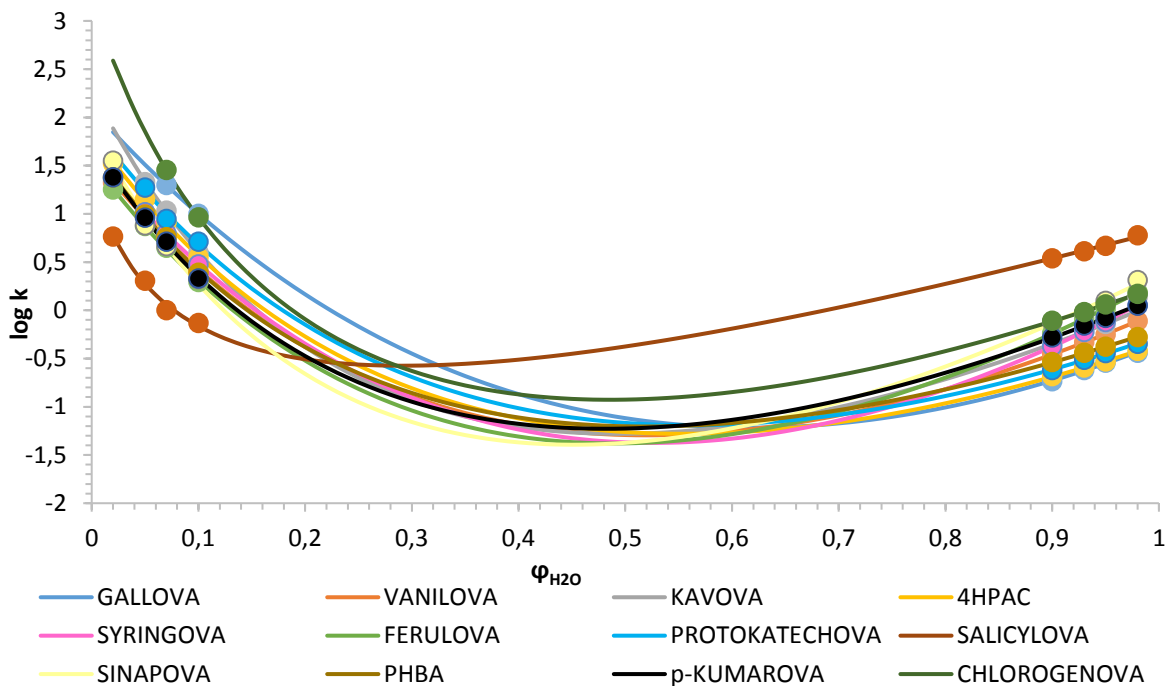




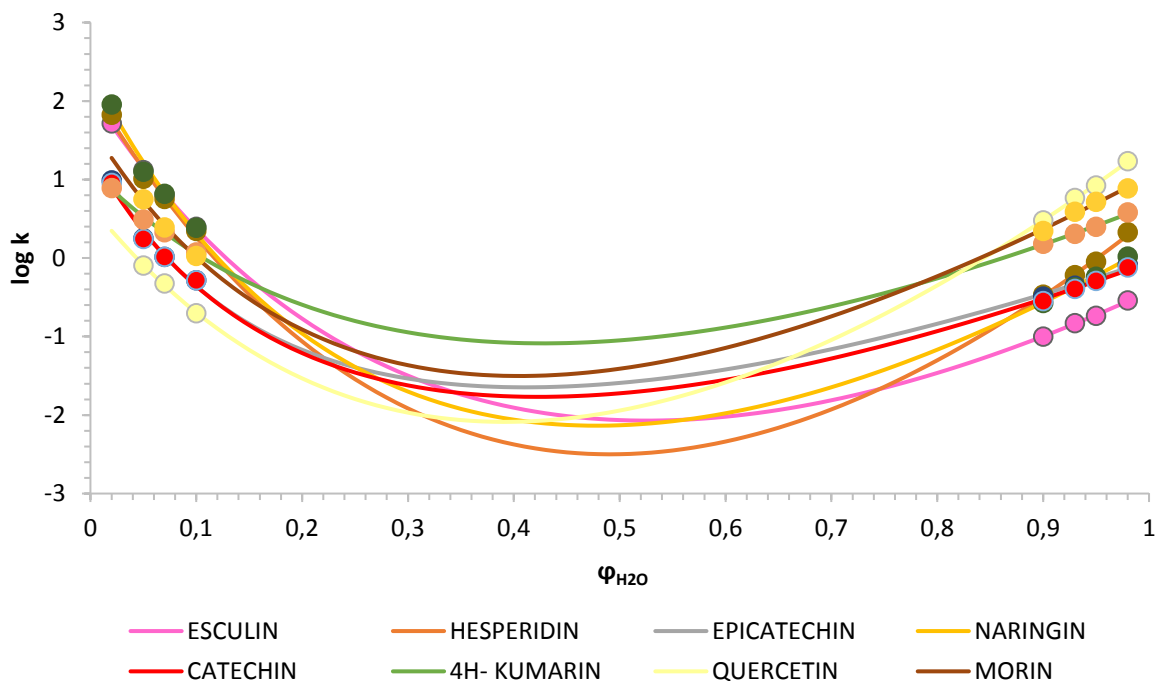
**Obrázok P11:** Vplyv vodnej frakcie,  $\phi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , fenolických kyselín na kolóne Ascentis Expres OH5; mobilná fáza acetonitril-voda, rozsah zloženia mobilnej fáze: 90 – 98% ACN



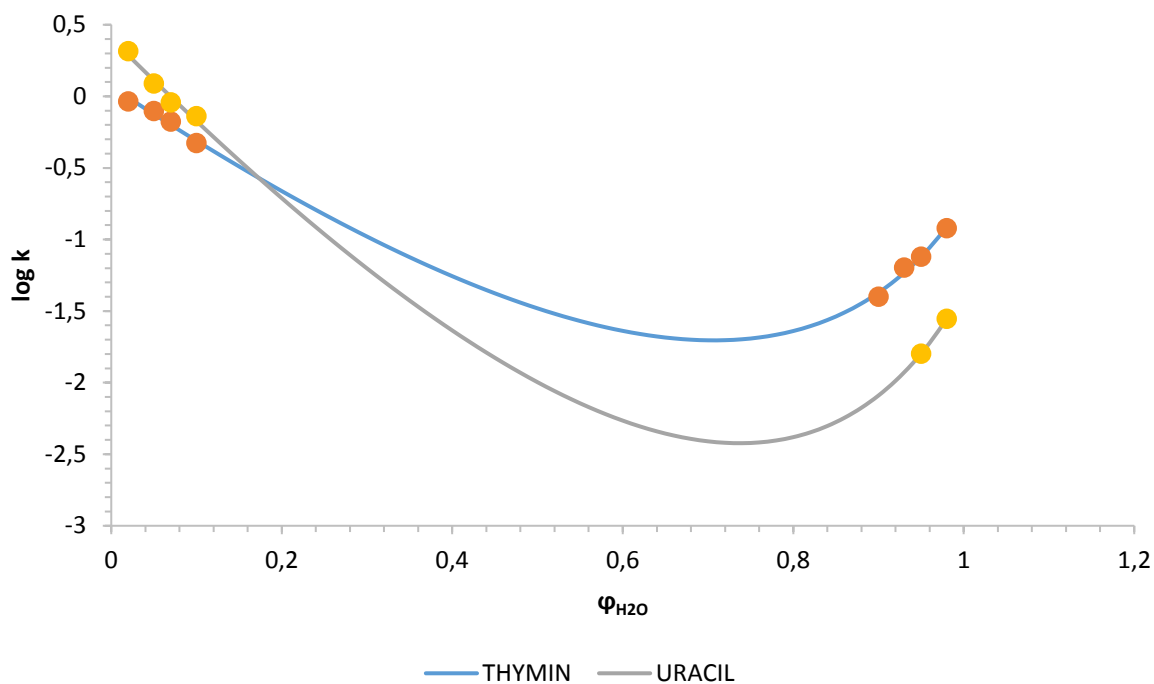
**Obrázok P12:** Vplyv vodnej frakcie,  $\phi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , flavonoidových zlúčenín na kolóne Ascentis Expres OH5; mobilná fáza acetonitril-voda, rozsah zloženia mobilnej fáze: 90 – 98% ACN



**Obrázok P13:** Vplyv vodnej frakcie,  $\phi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , fenolických kyselín na kolóne Ascentis Expres OH5; mobilná fáza acetonitril-voda, rozsah zloženia mobilnej fázy: 2 – 98% ACN

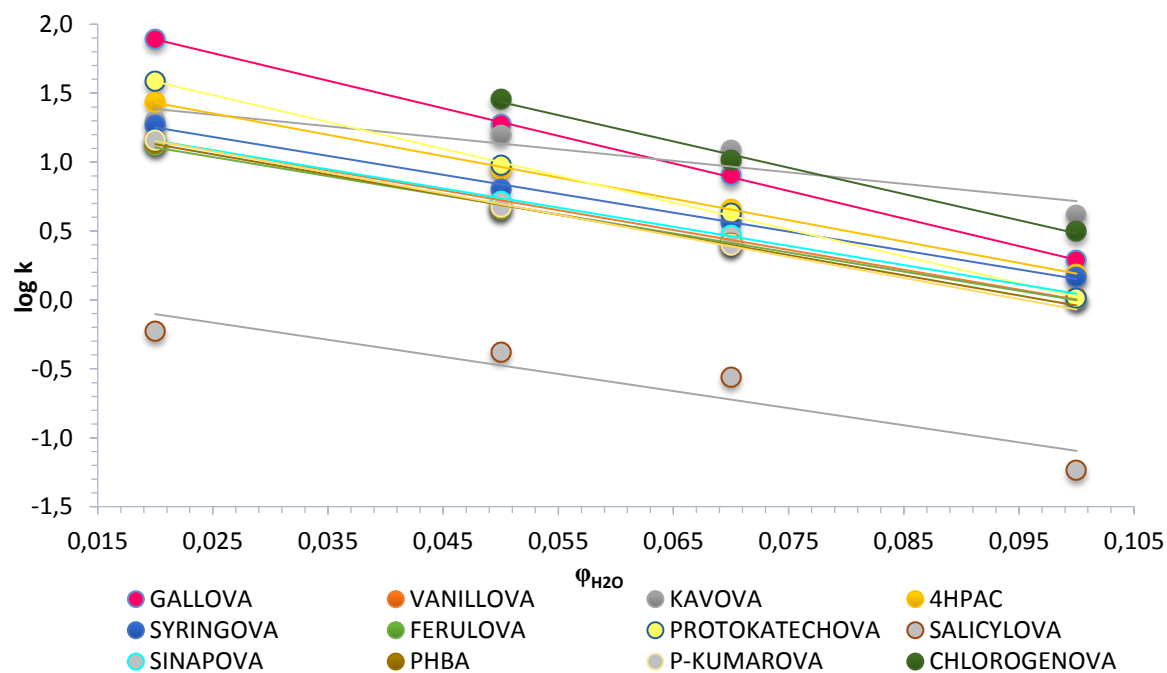


**Obrázok P14:** Vplyv vodnej frakcie,  $\phi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , flavonoidových zlúčenín na kolóne Ascentis Expres OH5; mobilná fáza acetonitril-voda, rozsah zloženia mobilnej fázy: 2 – 98% ACN

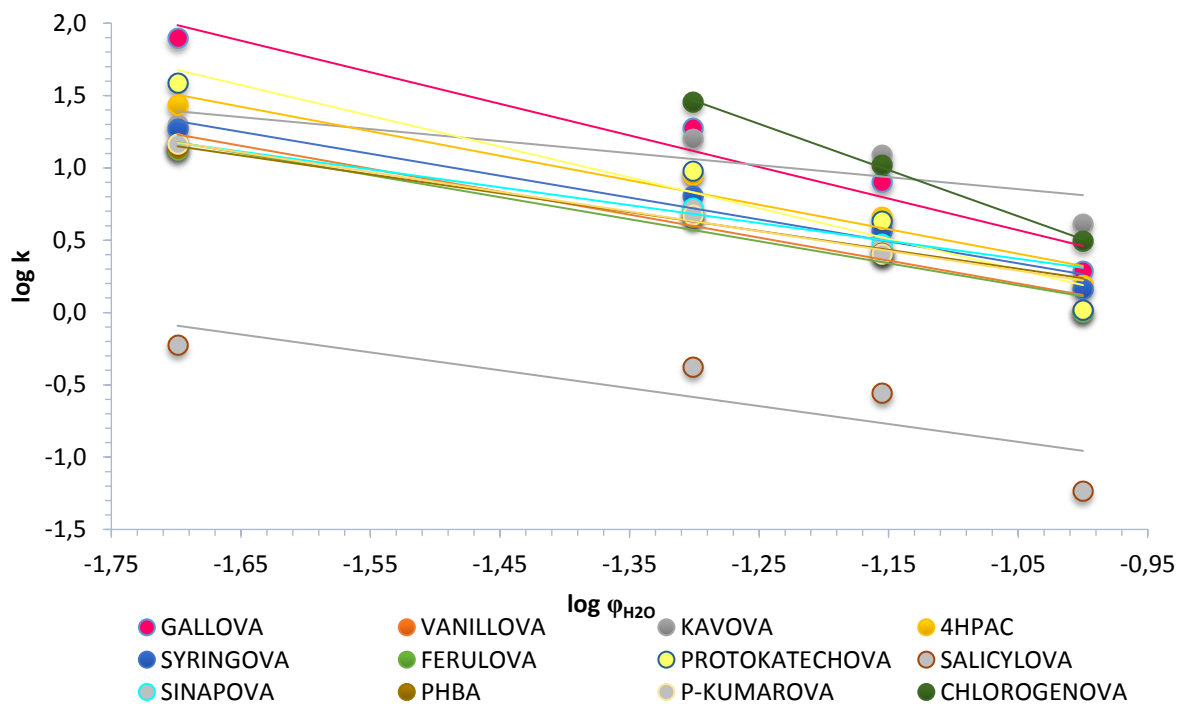


**Obrázok P15:** Vplyv vodnej frakcie,  $\phi_{H_2O}$ , v pufrovanej vodne-organickej mobilnej fáze na retenčný faktor,  $k$ , nukleových báz na kolóne Ascentis Express OH5; mobilná fáza acetonitril-voda, rozsah zloženia mobilnej fázy: 2 – 98% ACN

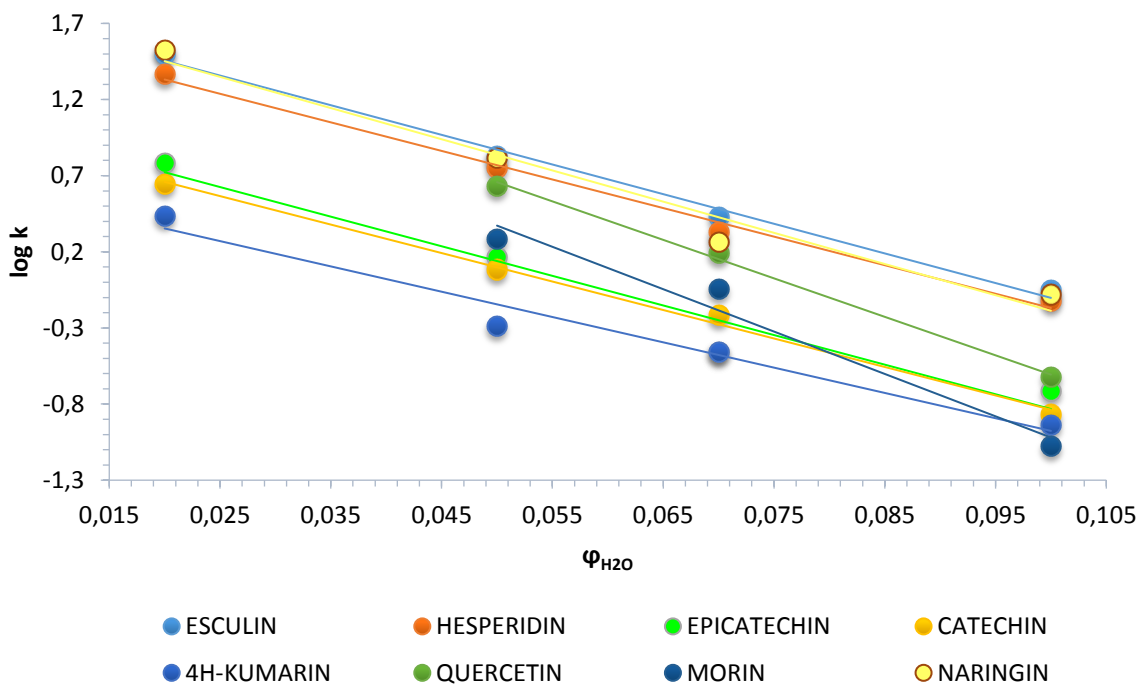
➤ Ascentis Express HILIC



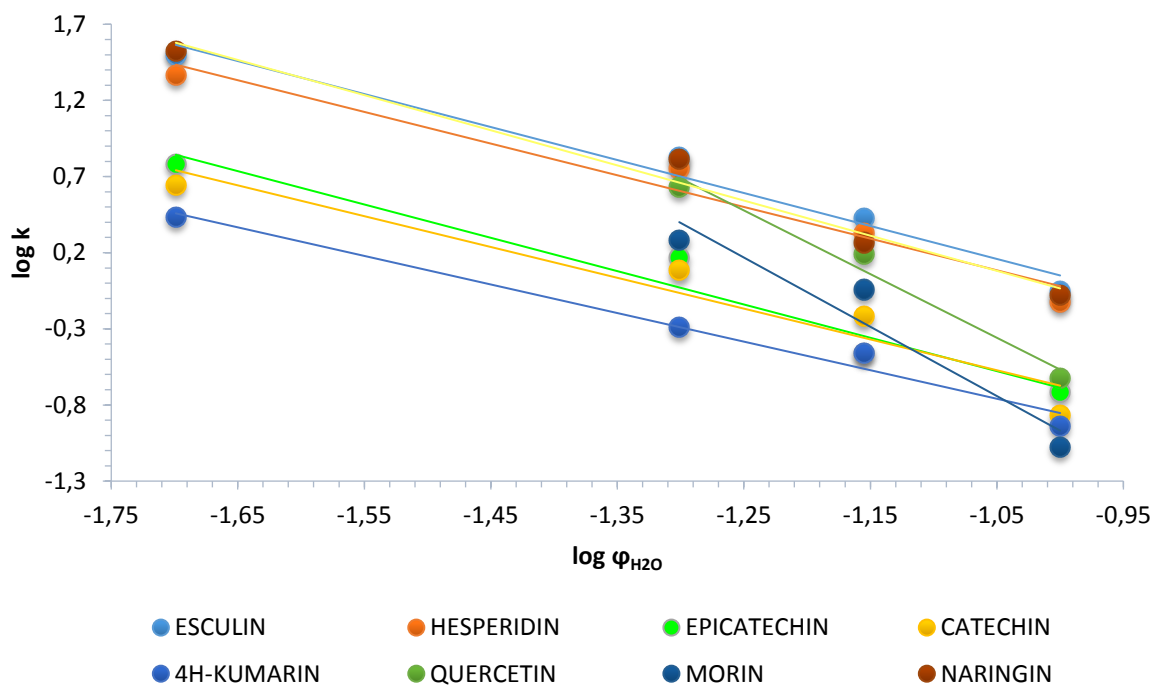
**Obrázok P16:** Závislosť logaritmu retenčného faktora ( $\log k$ ) fenolických kyselín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\phi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC



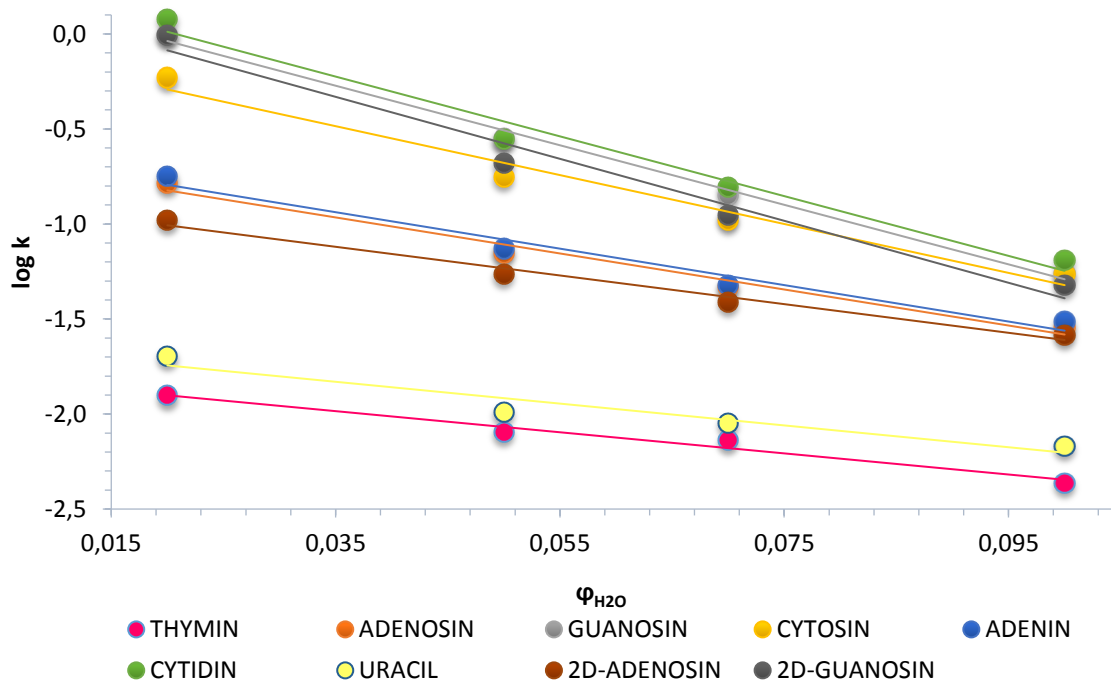
**Obrázok P17:** Závislosť logaritmu retenčného faktoru ( $\log k$ ) fenolických kyselín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC



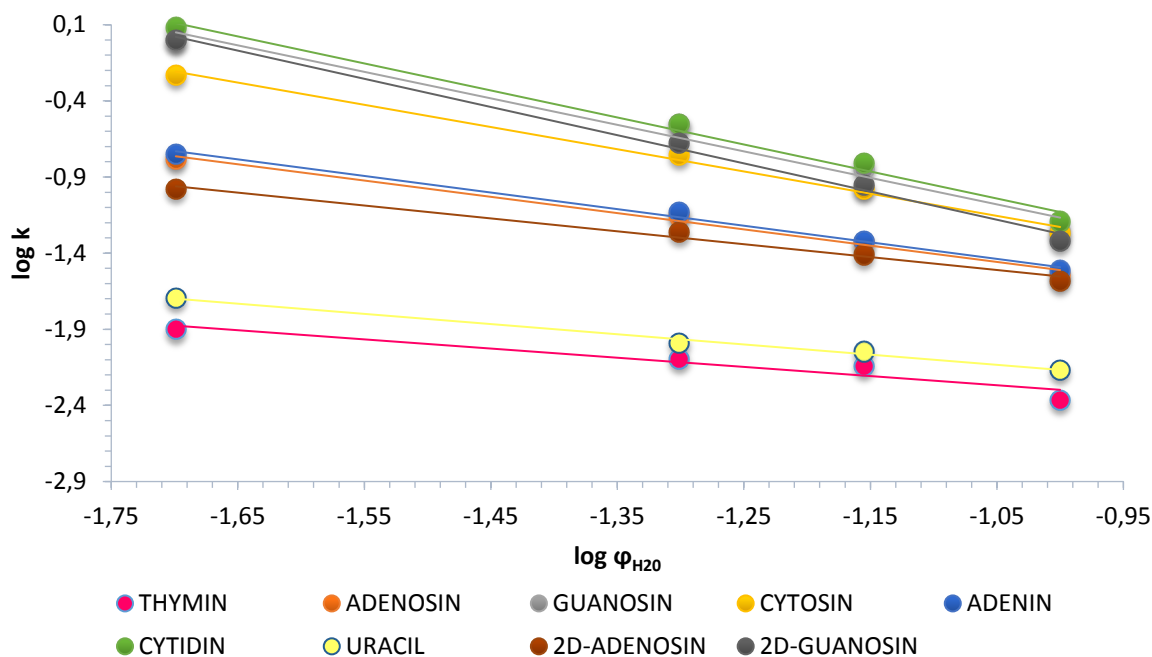
**Obrázok P18:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC



**Obrázok P19:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) flavonoidových zlúčenín na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC

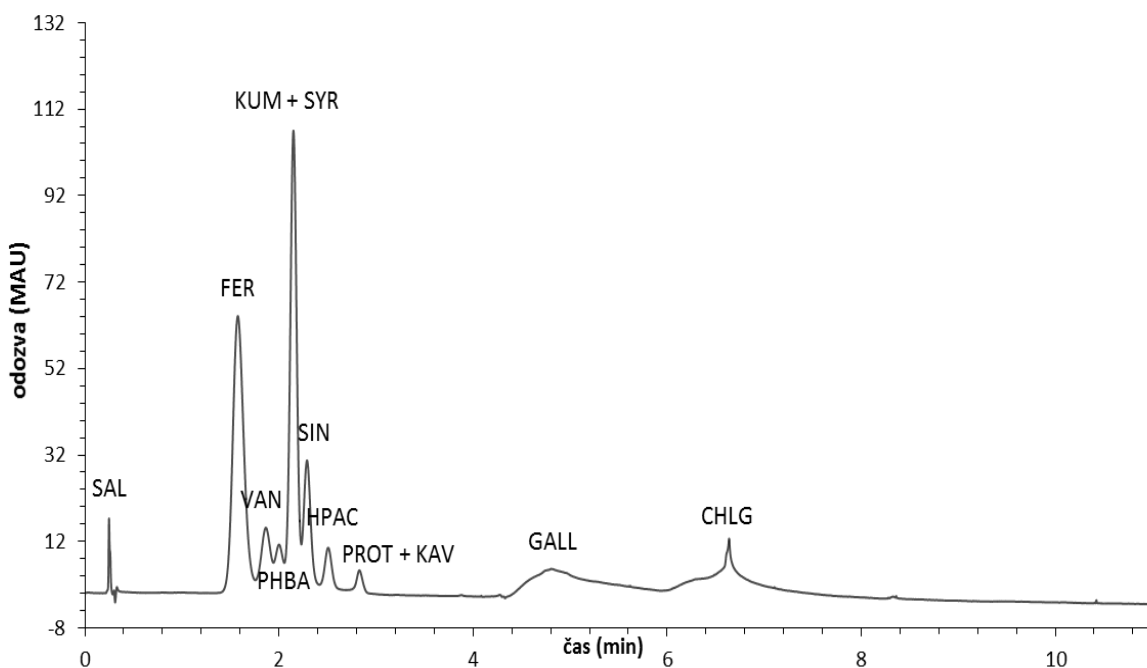


**Obrázok P20:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na koncentrácii vody v mobilnej fáze ( $\varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC

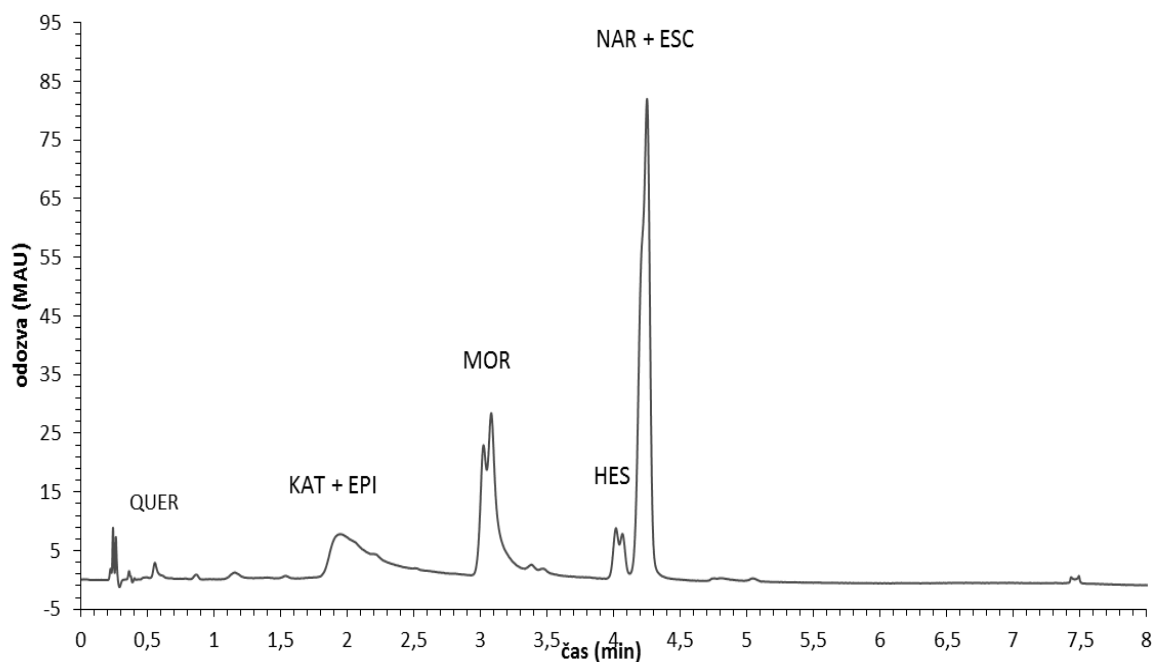


**Obrázok P21:** Závislosť retenčného faktoru ( $\log k$ ) nukleových báz a nukleozidov na logaritme koncentrácie vody v mobilnej fáze ( $\log \varphi_{H_2O}$ ) pre kolónu HILIC v režime HILIC

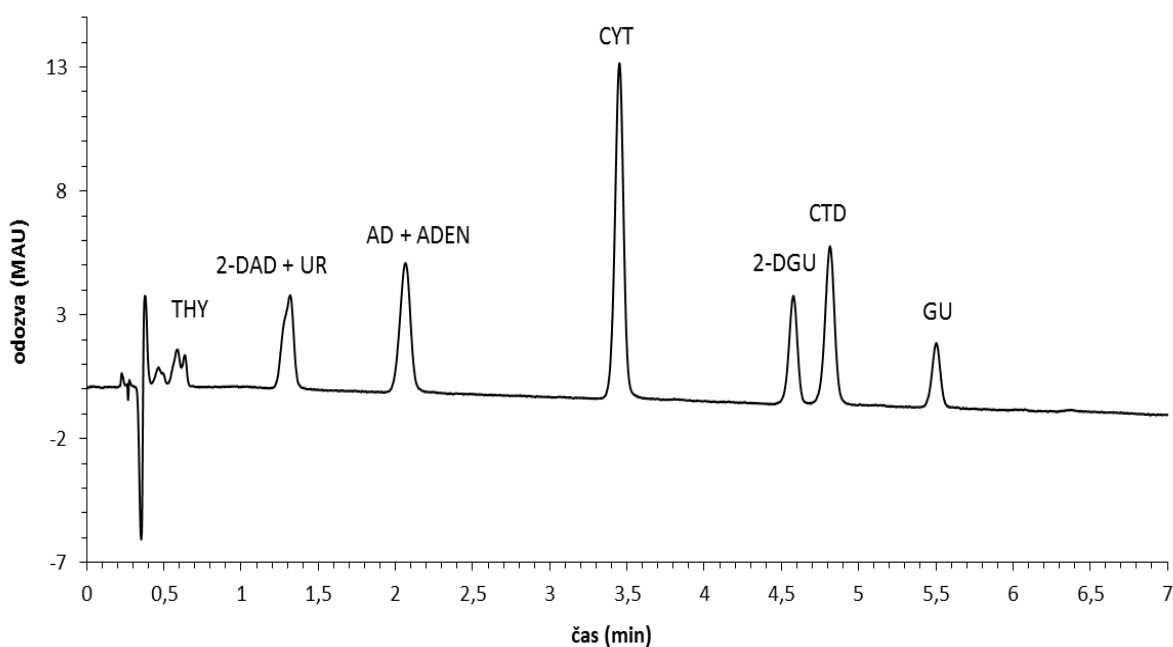
➤ Ascentis Express OH5



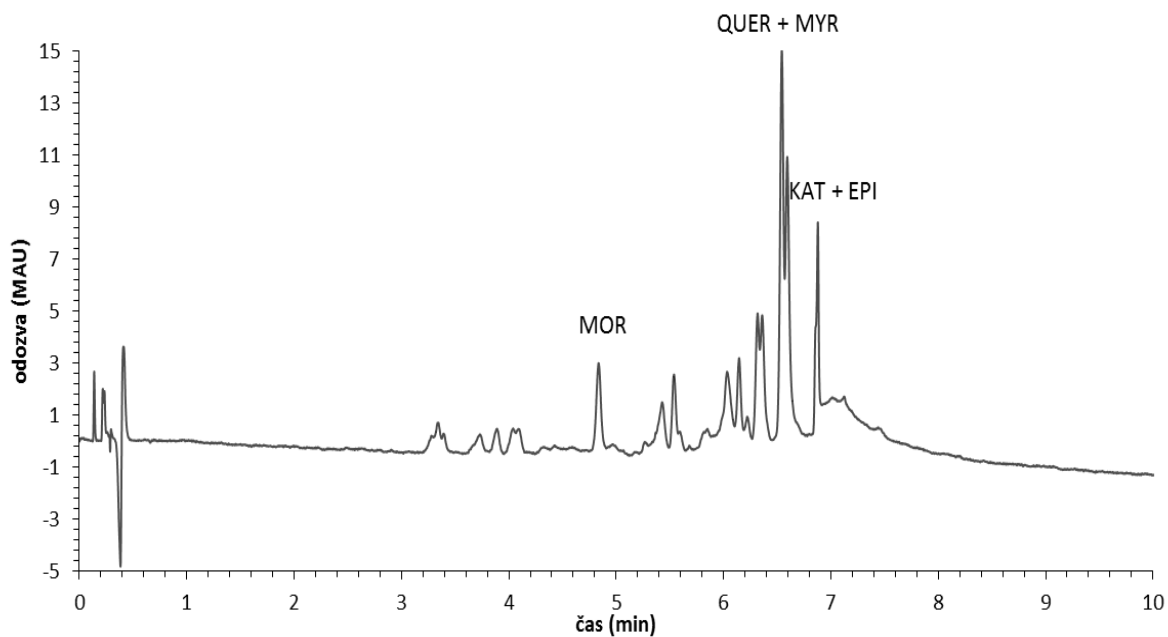
**Obrázok P22:** Gradientová separácia fenolických kyselín na kolóne OH5; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



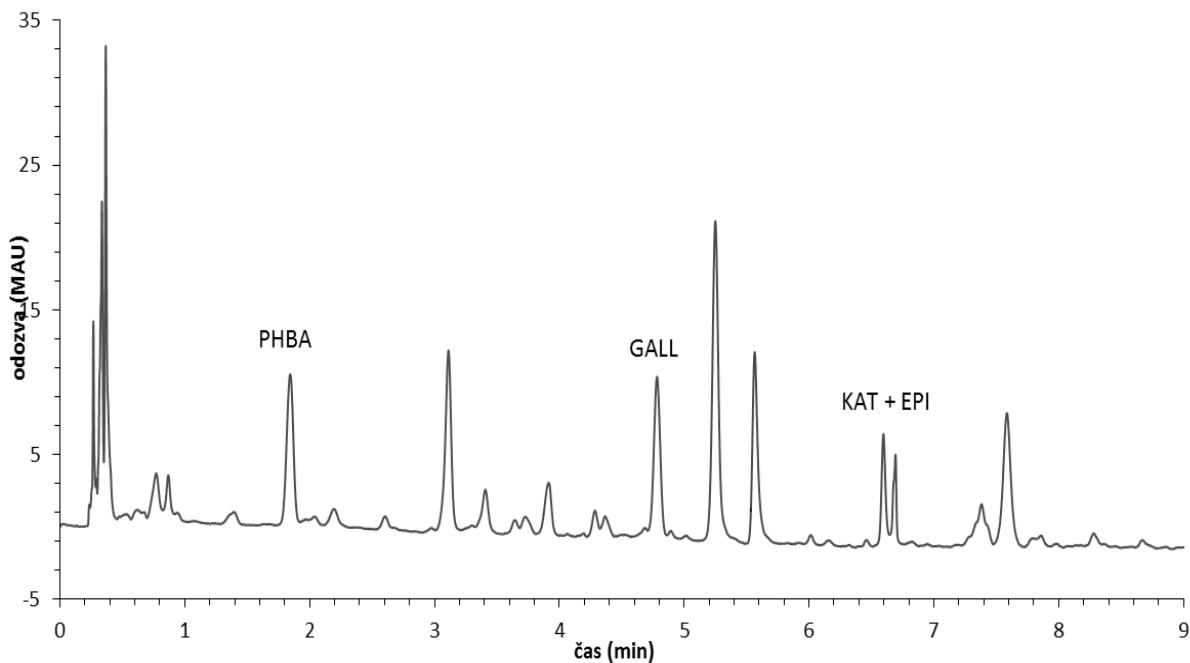
**Obrázok P23:** Gradientová separácia flavonoidových zlúčenín na kolóne OH5; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny; Fm = 1 ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 20 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



**Obrázok P24:** Gradientová separácia nukleových báz a nukleozidov na kolóne OH5; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny; Fm = 1 ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



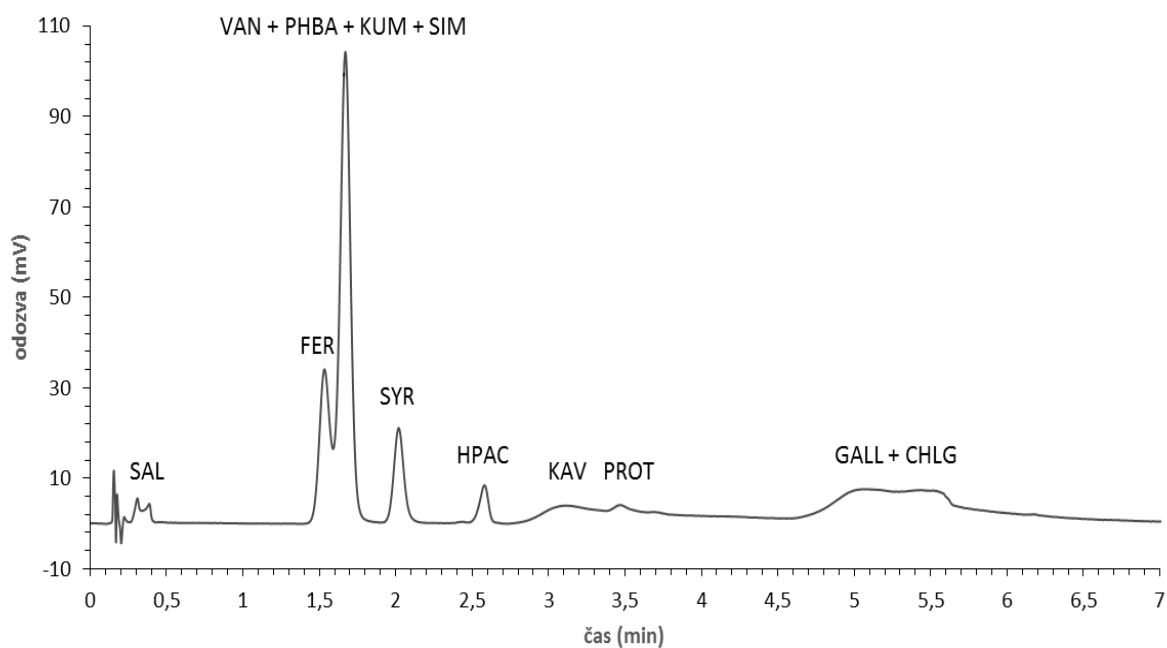
**Obrázok P25:** Gradientová separácia čaju (Lloyd Tea – Zelený porciovaný čaj) na kolóne OH5; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 370$  nm



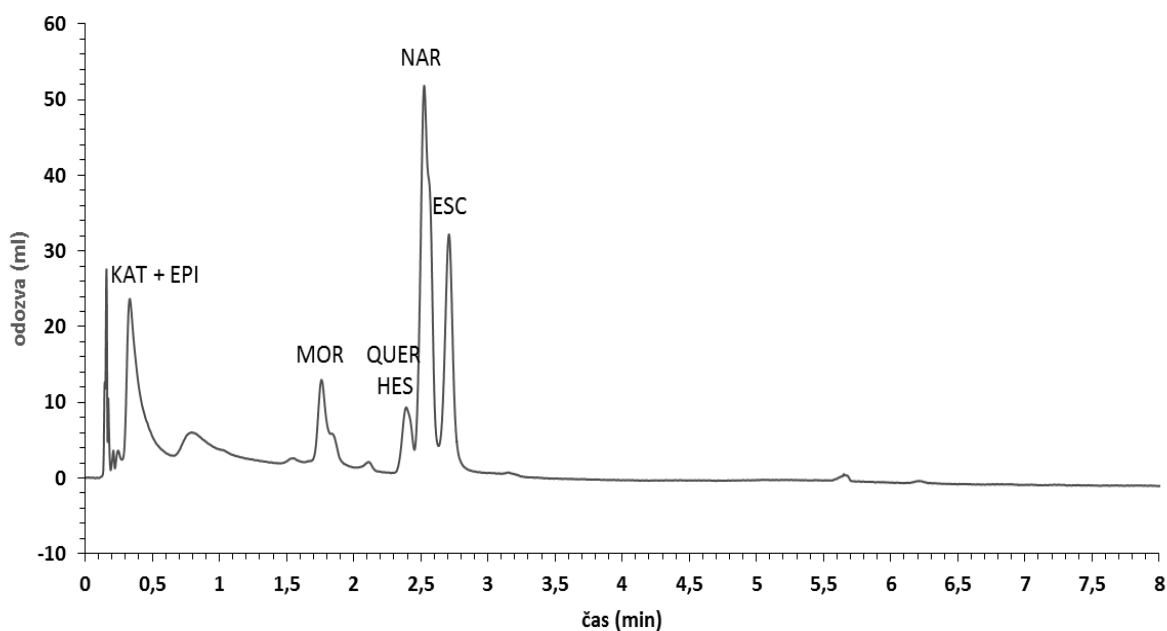
**Obrázok P26:** Gradientová separácia piva (Braník svetlý 10°) na kolóne OH5; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 370$  nm



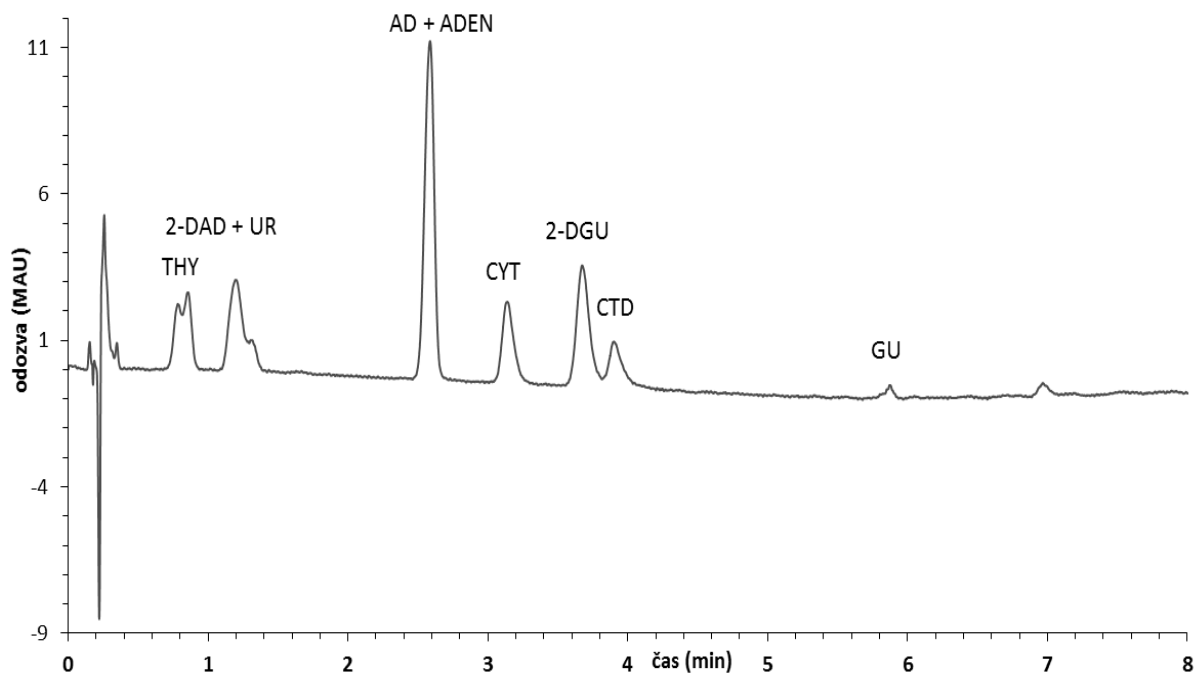
➤ Ascentis Express HILIC



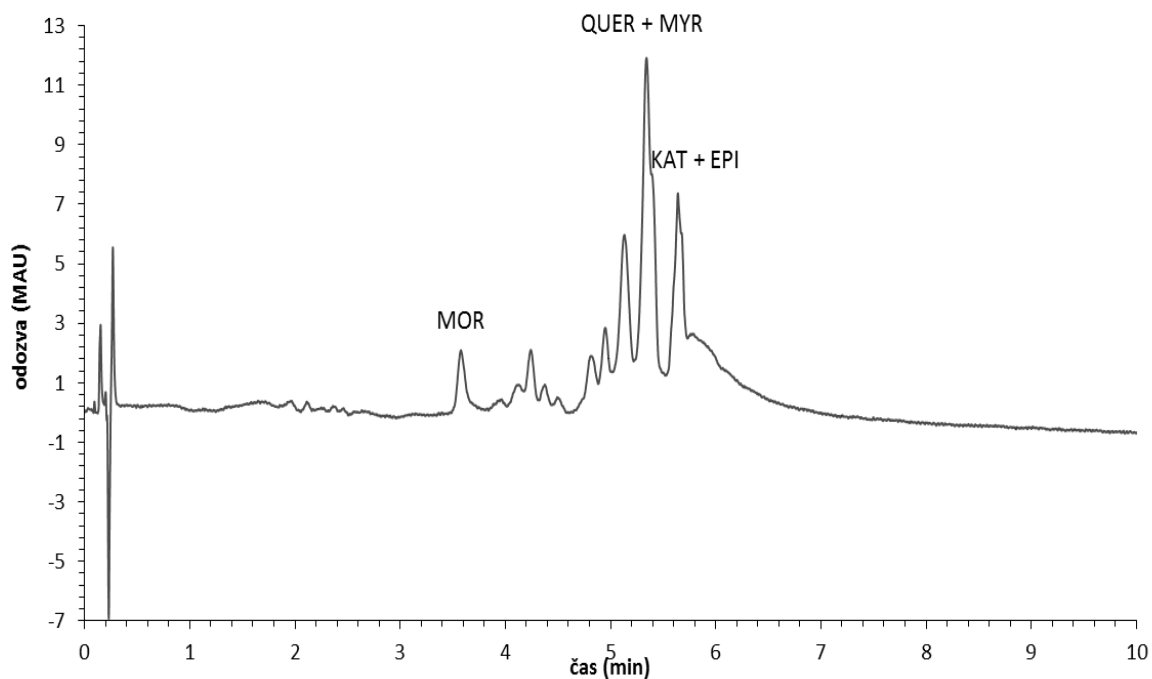
**Obrázok P27:** Gradientová separácia fenolických kyselín na kolóne HILIC; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



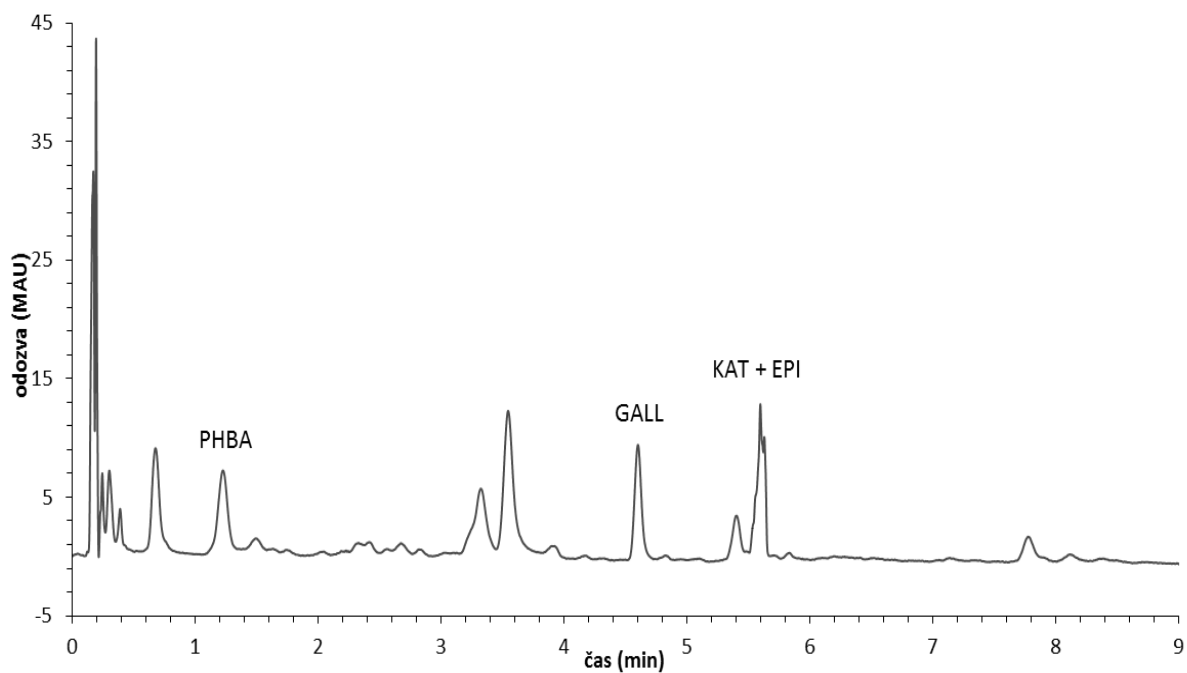
**Obrázok P28:** Gradientová separácia flavonoidových zlúčenín na kolóne HILIC; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 20 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



**Obrázok P29:** Gradientová separácia nukleových báz a nukleozidov na kolóne HILIC; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 280$  nm



**Obrázok P30:** Gradientová separácia čaju (Lloyd Tea – Zelený porciovaný čaj) na kolóne HILIC; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 370$  nm



**Obrázok P31:** Gradientová separácia piva (Braník svetlý 10°) na kolóne HILIC; MF (A) – voda + 10 mM octan amónny, pH = 3; MF (B) – ACN + 10 mM octan amónny;  $F_m = 1$  ml/min; gradient: 0 min – 98% MF (B), 15 min – 70% MF (B);  $\lambda = 370$  nm