

**ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH JAKO
MODYFIKATORÓW FAZY RUCHOMEJ
W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**APPLICATION OF IONIC LIQUIDS AS MOBILE
PHASE MODIFIERS IN LIQUID
CHROMATOGAPHY**

**Anna Kilanowska, Judyta Zielak,
Sylwia Studzińska***

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń,
e-mail: kowalska@chem.umk.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Budowa i wybrane właściwości cieczy jonowych
 - 1.1. Kierunki zastosowania cieczy jonowych
2. Zastosowanie cieczy jonowych jako dodatków do fazy ruchomej w chromatografii cieczowej
3. Zastosowanie cieczy jonowych w analizie oligonukleotydów antysensownych
 - 3.1. Oligonukleotydy antysensowne
 - 3.2. Chromatograficzne metody oznaczania oligonukleotydów
 - 3.3. Zastosowanie cieczy jonowych jako odczynników do tworzenia par jonowych w analizie oligonukleotydów antysensownych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Anna Kilanowska, z UMK związana od 2012 roku. W 2017 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra chemii kosmetycznej w Katedrze Chemii Biomateriałów i Kosmetyków. Od 2017 roku realizuje doktorat w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky pod opieką dr hab. Sylwii Studzińskiej prof. UMK. Tematyka jej zainteresowań dotyczy badań metabolizmu oligonukleotydów antysensownych za pomocą chromatografii par jonowych oraz chromatografii oddziaływań hydrofilowych, sprzężonych ze spektrometrią mas. Jest współautorką 13 publikacji naukowych opublikowanych zarówno w prestiżowych zagranicznych czasopismach z listy JCR jak również w polskich czasopismach naukowych, znajdujących się na liście czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



<https://orcid.org/0000-0002-9100-5768>

Lic. Judyta Zielak, w 2019 r. ukończyła studia pierwszego stopnia na kierunku chemia ogólna, ze specjalnością chemia stosowana. Swoją pracę licencjacką realizowała na Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest studentką studiów drugiego stopnia na tym samym kierunku.



<https://orcid.org/0000-0002-0685-8222>

Dr hab. Sylwia Studzińska, stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2009 r. za pracę nad wpływem cieczy jonowych na środowisko oraz ich chromatograficzną analizę. Pracę wykonała w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii, UMK w Toruniu pod kierunkiem prof. Bogusława Buszewskiego. Praca została nagrodzona w ogólnopolskim konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej w 2010 r. Stypendystka Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, laureatka prestiżowego stypendium naukowego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców oraz Komisji Analizy Chromatograficznej KChA PAN dla młodych pracowników nauki w dziedzinie metod rozdzielania. Od 2014 roku jest adiunktem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, a w 2016 roku uzyskała tytuł doktora habilitowanego. Prowadzi badania nad chromatograficzną analizą i metabolizmem oligonukleotydów antysensownych w układach *in vitro* oraz *in vivo*.



<https://orcid.org/0000-0002-0685-8222>

ABSTRACT

Ionic liquids are molten salts composed of large, asymmetric, organic cations (e.g. imidazolium or piperidine) and inorganic anions such as e.g. chloride or fluoroborate. These compounds are characterized by low melting point, below 100°C, however, they also have other interesting properties including high thermal stability, minor vapor pressure or negligible volatility. Moreover, by the appropriate selection of the cation and anion building the ionic liquid, it is possible to obtain the desired physicochemical properties of these salts. For this reason, ionic liquids are applied to the synthesis, catalysis, electrochemical methods, extraction methods, etc. Application of these compounds in separation techniques merits special attention, especially considering liquid chromatography. Ionic liquids are commonly used in this technique as free silanol suppressors, especially regarding the analysis of basic compounds. Moreover, the excess amount of ionic liquids ions may adsorb on the hydrophobic ligands present at the stationary phase surface, which also plays a significant role in the retention of analytes. Besides their application as silanol suppressors, these compounds were also used as ion pair reagents in the analysis of antisense oligonucleotides, which are short nucleic acid fragments with therapeutic potential due to the ability to bind with complementary sequences of ribonucleic acid. For this reason, antisense oligonucleotides are used in the treatment of several diseases. This article briefly presents structures, properties and the application of ionic liquids as mobile phase modifiers for the analysis of the wide range of different analytes using liquid chromatography. Moreover, a part of this paper was devoted to the analysis of antisense oligonucleotides with the use of the different chromatographic techniques, including the application of ionic liquids as mobile phase additives in ion pair chromatography.

Keywords: ionic liquids; liquid chromatography; free silanol suppressors; ion pair chromatography; antisense oligonucleotides

Słowa kluczowe: ciecze jonowe; chromatografia cieczowa; blokowanie wolnych silanoli; chromatografia par jonowych; oligonukleotydy antysensowne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

[BMIM][Cl]	– chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
[EMIM][Cl]	– chlorek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy
[HMIM][Cl]	– chlorek 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy
ASO	– oligonukleotydy antysensowne (ang. <i>antisense oligonucleotides</i>)
DEA	– dietyloamina
DIPEA	– N,N-diizopropylodietylamina
DMBA	– N,N-dimetylobutyloamina
FDA	– Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i>)
HA	– heksyloamina
HILIC	– chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IEC	– chromatografia jonowymienna (ang. <i>ion exchange chromatography</i>)
ILs	– ciecze jonowe, (ang. <i>ionic liquids</i>)
IP RP HPLC	– chromatografia par jonowych w odwróconym układzie faz (ang. <i>ion pair reversed phase high performance liquid chromatography</i>)
IPR	– odczynniki do tworzenia par jonowych (ang. <i>ion pair reagents</i>)
LLE	– ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. <i>liquid-liquid extraction</i>)
LPME	– mikroekstrakcja do fazy ciekłej (ang. <i>liquid-phase microextraction</i>)
PA	– propyloamina
RP HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>)
RTIL	– niskotemperaturowe ciecze jonowe (ang. <i>room-temperature ionic liquids</i>)
SPME	– mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase microextraction</i>)
TEA	– trietyloamina
TLC	– chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TPA	– tripropyloamina

WPROWADZENIE

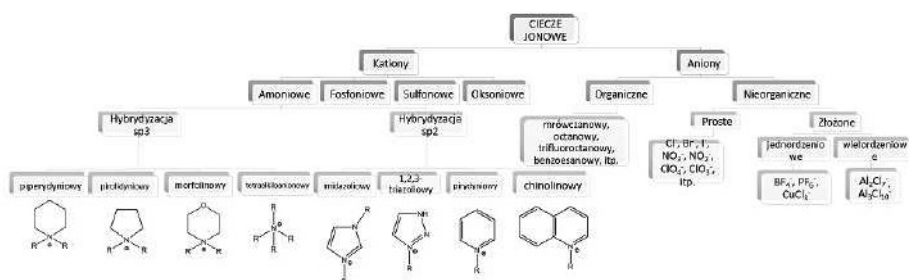
W ostatnich latach rośnie zainteresowanie badaczy cieczami jonowymi, zwłaszcza w kontekście zastosowania tych substancji w szerokim spektrum dziedzin. Wynika to przede wszystkim z ich interesujących właściwości fizyko-chemicznych, włączając wysoką stabilność termiczną i praktycznie niemierzalną prężność par. Dodatkowo, wiele związków organicznych rozpuszcza się w ILs [1]. Co więcej, poprzez odpowiedni dobór kationu i anionu budujących ciecz jonową, możliwe jest uzyskanie pożądanych właściwości tych substancji. Dzięki tym cechom, ciecze jonowe są obecnie wykorzystywane m. in. w syntezie organicznej, katalizie, czy też w technikach separacyjnych. Na szczególne zainteresowanie zasługuje zastosowanie tych związków jako modyfikatorów fazy ruchomej w chromatografii cieczowej, która jest jedną z kluczowych technik chromatograficznych w analizie związków aktywnych biologicznie, takich jak oligonukleotydy [2, 3].

1. BUDOWA I WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI CIECZY JONOWYCH

Ciecze jonowe (*ang. ionic liquids*, ILs) są solami, których charakterystyczną właściwością jest temperatura topnienia poniżej 100°C [1]. W przypadku, kiedy temperatura topnienia cieczy jonowej nie przekracza temperatury pokojowej, wówczas związki te nazywane są niskotemperaturowymi cieczami jonowymi (*ang. room-temperature ionic liquids*, RTIL).

ILs zbudowane są zazwyczaj z dużych, asymetrycznych kationów organicznych oraz nieorganicznych lub organicznych anionów. Kationy, które najczęściej wchodzi w skład ILs charakteryzują się niskim stopniem symetrii, co powoduje obniżenie energii sieci krystalicznej, prowadząc tym samym do obniżenia temperatury topnienia ILs. Ze względu na rodzaj atomu obdarzonego dodatnim ładunkiem, związki te można podzielić na amoniowe, fosfoniowe, sulfonowe oraz oksoniowe [2, 3]. ILs można także sklasyfikować ze względu na występowanie atomu wodoru, połączonego z centralnym atomem azotu, fosforu, siarki lub tlenu. Gdy atom wodoru jest obecny, wówczas ciecz jonową klasyfikuje się jako protonową, natomiast w przypadku jego braku - aprotonową [4]. Do najczęściej opisywanych w literaturze kationów budujących ciecze jonowe należy zaliczyć kationy piperidynowe, piperidynowe, morfolinowe, imidazoliowe, triazoliowe, chinolinowe czy pirydynowe [1, 2, 5–7]. Proste aniony nieorganiczne budują zazwyczaj mniej stabilne ILs, które charakteryzują się wyższą temperaturą topnienia. Do tej grupy można zaliczyć aniony halogenkowe (Cl⁻, Br⁻, I⁻), siarczanowe, (SO₄⁻, HSO₄⁻), azotanowe (NO₂⁻, NO₃⁻), chloranowe, ortofosforanowe, mrówczanowe czy octanowe. Bardziej złożone aniony, takie jak heksafluorofosforanowe, trifluorometylosulfonianowe czy tetrafluoroboranowe, budują zazwyczaj RTILs [1, 3]. Podział cieczy jonowych ze względu na budujące je

kationy i aniony zestawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający podział cieczy jonowych ze względu na budujące je kationy i aniony [2, 3]

Figure 1. Schematic representation of the division of ILs concerning their building cations and anions [2, 3]

ILs charakteryzują się niską prężnością par, dużą polarnością, stabilnością termiczną, wysokim przewodnictwem elektrycznym i niskim napięciem powierzchniowym oraz zróżnicowaną lepkością [8].

Temperatura topnienia IL uzależniona jest od jej struktury i zależy od rozkładu ładunku w jonach, dostępności wiązania wodorowego, oddziaływań van der Waalsa oraz symetrii jonów [8–10]. Budowa IL wpływa także na ich inne właściwości, np. lepkość, która rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w strukturze kationu. Parametr ten mieści się w zakresie od 10 do 1000 mPa·s i jest wyższy w porównaniu do tradycyjnie wykorzystywanych rozpuszczalników organicznych [11]. Rozpuszczalność ILs w wodzie zależy przede wszystkim od struktury kationu, rodzaju anionu oraz temperatury. ILs rozpuszczają niektóre polimery, sole czy minerały oraz dobrze mieszają się z wodą oraz rozpuszczalnikami organicznymi o średniej do wysokiej wartości stałej dielektrycznej, włączając metanol, acetonitryl czy dichlorometan [2]. ILs wykazują ponadto stabilność termiczną, która może przekraczać 400°C [12]. Kolejną istotną właściwością chemiczną jest ich niska prężność par i niewielka lotność. Cechy te są szczególnie ważne zwłaszcza z punktu widzenia ich zastosowania jako alternatywnych rozpuszczalników w reakcjach chemicznych, czy też wykorzystania ILs jako modyfikatorów fazy ruchomej w chromatografii cieczowej [1]. Wpływa to bezpośrednio na bezpieczeństwo ich zastosowania jako rozpuszczalników poprzez redukcję emisji par do środowiska naturalnego w porównaniu do tradycyjnie stosowanych rozpuszczalników organicznych [13]. W tabeli 1. zestawiono niektóre właściwości fizykochemiczne wybranych ILs.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne wybranych ILs [10, 14, 15]
 Table 1. Physicochemical properties of selected ILs [10, 14, 15]

Kation	Anion	Skrót	Tempera- tura topnienia (°C)	Gęstość (g/ml)	Lepkość (mPa s)
1-butylo-3- metyloimidazoliowy	tetrafluoroboranowy	[BMIM][BF ₄]	-82	1,17	233 (30°C), 180 (25°C)
	heksafluorofosforanowy	[BMIM][PF ₆]	-8	1,36	148-450 (25°C)
	trifluorooctanowy	[BMIM][TFA]	-40	1,21	-
	trifluorometylosulfonianowy	[BMIM][TfO]	16	1,29	90 (20°C)
	bis[(trifluorometylo)sulfonylo]amidowy	[BMIM][TF ₂ N]	-4	1,43	52 (20°C)
	bromkowy	[BMIM][Br]	60	1,13	218,9 (25°C)
1-metylo-3- metyloimidazoliowy	chlorkowy	[MMIM][Cl]	125	-	-
1-etylo-3- metyloimidazoliowy		[EMIM][Cl]	84	1,36	-
1-propylo-3- metyloimidazoliowy		[PMIM][Cl]	60	-	-
1-butylo-3- metyloimidazoliowy		[BMIM][Cl]	65	1,10	-
1-heksylo-3- metyloimidazoliowy		[HMIM][Cl]	-75	1,29	-
1-etylo-3- metyloimidazoliowy		tetrafluoroboranowy	[EMIM][BF ₄]	6	1,25
	heksafluorofosforanowy	[EMIM][PF ₆]	58	1,37	450 (25°C)
1-heksylo-3- metyloimidazoliowy	tetrafluoroboranowy	[HMIM][BF ₄]	-82	1,075	211 (25°C)
	heksafluorofosforanowy	[HMIM][PF ₆]	-61	1,304	800 (25°C)

1.1. KIERUNKI ZASTOSOWAŃ CIECZY JONOWYCH

Największą zaletą ILs jest możliwość niemal dowolnego zaprojektowania ich właściwości poprzez odpowiedni dobór kationu i anionu, co spowodowało zastosowanie ILs w wielu gałęziach chemii [1, 16]. Substancje te wykorzystywane są m.in. w syntezie chemicznej, jako alternatywa dla tradycyjnych rozpuszczalników chemicznych; w katalizie; jako elektrolity do ogniw o dużej energii; w procesach przetwórstwa biomasy czy jako dodatki do paliw [2, 13, 17–20]. ILs są także wykorzystywane w technikach ekstrakcyjnych, (włączając ekstrakcję ciecz-ciecz - LLE, ang. *liquid-liquid extraction*, mikroekstrakcję do fazy ciekłej - LPME, ang. *liquid-phase microextraction* oraz mikroekstrakcję do fazy stałej - SPME, ang. *solid-phase microextraction*), chromatograficznych (włączając chromatografię cienkowarstwową – TLC, ang. *thin layer chromatography*, wysokosprawną chromatografię cieczową – HPLC, ang. *high performance liquid chromatography*, chromatografię gazową - GC, ang. *gas chromatography*), elektromigracyjnych oraz w spektrometrii mas i metodach spektroskopowych.

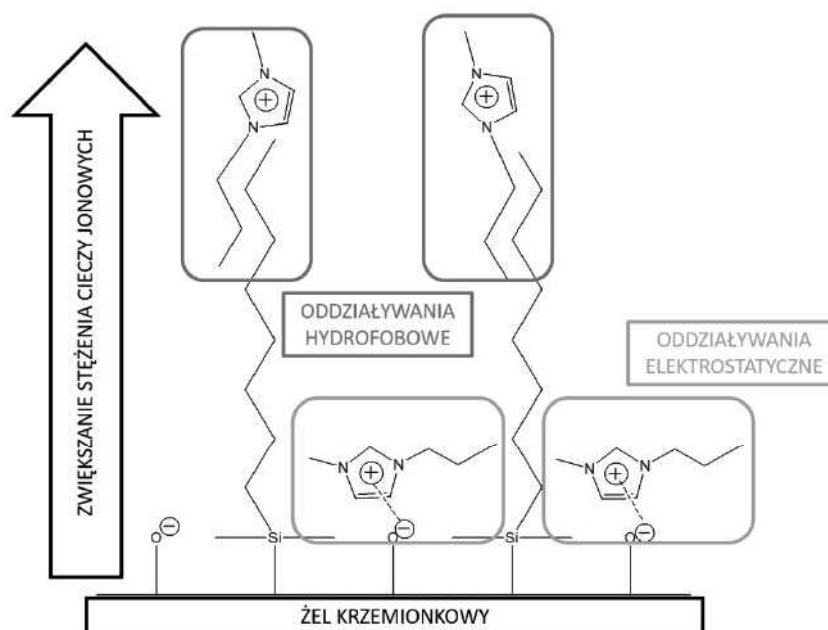
2. ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH JAKO DODATKÓW DO FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania ILs w technikach separacyjnych ILs datowane są na 1959 rok i dotyczą one zastosowania tych substancji jako modyfikatorów powierzchni fazy stacjonarnej w GC [21, 22]. Pierwsze zastosowanie ILs w HPLC datowane jest natomiast na koniec lat 80 XX wieku [21]. Poole i współpracownicy [23] zastosowali wówczas fazę ruchomą składającą się z wody i IL, zamiast tradycyjnie stosowanych rozpuszczalników organicznych, takich jak metanol czy acetonitryl. Mimo, że uzyskali oni rozdzielanie testowanych mieszanin, ciśnienie zwrotne w układzie było bardzo wysokie. Co więcej, ze względu na zastosowanie tycyjanianowej ILs, metalowe elementy uległy korozji, przez co porzucono dalsze badania [23].

ILs znacznie częściej są wykorzystywane jako dodatki do fazy ruchomej w RP HPLC. Wynika to w głównej mierze z właściwości akceptorowo-donorowych tych substancji, dzięki czemu mają one zdolność do blokowania wolnych silanoli, obecnych na powierzchni krzemionkowych faz stacjonarnych, podobnie jak w przypadku powszechnie stosowanych amin [1, 2, 21]. Zarówno rodzaj kationu, jak i anionu IL może mieć istotny wpływ na mechanizm retencji związków analizowanych za pomocą chromatografii cieczonej. W zależności od hydrofobowości jonów (zgodnie z szeregiem liotropowym Hoffmeistera), budujących ILs, mogą one w różnym stopniu oddziaływać z powierzchnią fazy stacjonarnej [21].

Powszechnym problemem w analizie związków o charakterze zasadowym za pomocą chromatografii cieczonej jest ogonowanie pików, wynikające w głównej mierze z oddziaływań polarnych analitów lub analitów obdarzonych dodatnim ładunkiem z ujemnie naładowanymi, wolnymi grupami silanolowymi. Wolne grupy silanolowe stanowią około 19 % wszystkich grup silanolowych, występujących na powierzchni krzemionki. Charakteryzują się one najwyższą zdolnością adsorpcyjną w porównaniu do wicynalnych i geminalnych grup silanolowych. Grupy silanolowe nadają krzemionce kwasowy charakter, a ich średnia wartość pKa wynosi 7.1. Oznacza to, że w zależności od pH fazy ruchomej, grupy silanolowe mogą być pozbawione ładunku lub ujemnie naładowane [2]. W celu zredukowania niepożądanych oddziaływań między analitami, a resztkowymi grupami silanolowymi, stosowane są dodatki do fazy ruchomej, takie jak aminy, czy też ILs. Po dodaniu ILs do fazy ruchomej, jej składniki należy traktować jako oddzielne indywidua, w związku z czym tylko kation odpowiedzialny jest za blokowanie aktywności wolnych silanoli. Wówczas uzyskiwane piki analitów charakteryzują się większą symetrią, a czasy retencji ulegają skróceniu. Wnioskuje się, że w przypadku niskich stężeń ILs, oddziałują one tylko z resztkowymi silanolami,

blokując tym samym ich dostęp do analitów. Zwiększanie stężenia ILs w fazie ruchomej prowadzi natomiast do adsorpcji kationów ILs na powierzchni hydrofobowych łańcuchów alkilowych [2, 24]. Wówczas, w zależności od siły adsorpcji kationów i anionów, na powierzchni fazy stacjonarnej tworzy się dodatnio lub ujemnie naładowana warstwa elektryczna. Schemat oddziaływań zachodzących pomiędzy fazą stacjonarną, a przykładowymi imidazoliowymi kationami IL wraz ze wzrostem jej stężenia przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat oddziaływań pomiędzy fazą stacjonarną, a kationami cieczy jonowej wraz ze zwiększaniem ich stężenia [2, 24, 25]

Figure 2. Schematic illustration of interactions between the stationary phase and ILs cations with respect to increasing their concentration [2, 24, 25]

W literaturze można znaleźć wiele prac, które umożliwiają poznanie mechanizmów oddziaływań między ILs, fazą stacjonarną i szeroką grupą różnych analitów o charakterze zasadowym [6, 9, 24, 26]. Niezależnie od testowanych analitów i rodzaju ILs obserwowano analogiczne tendencje. Wraz ze zwiększaniem stężenia ILs i długości łańcucha alkilowego w strukturze kationu imidazoliowego, obserwowano obniżenie wartości współczynników retencji zarówno amin, puryn, nitrozwiązków aromatycznych, alkaloidów, jak i efedryn. Dowiedziono, że w przypadku niższego stężenia ILs, uzyskane tendencje były wynikiem współzawodnictwa analitów i kationów imidazoliowych o wolne grupy silanolowe

wewnątrz oktadecylowej fazy stacjonarnej. Co więcej, zwiększanie stężenia ILS prowadziło do jednoczesnej adsorpcji kationów imidazoliowych na powierzchni łańcuchów alkilowych fazy stacjonarnej. Adsorpcja była tym silniejsza, im dłuższy łańcuch alkilowy w strukturze kationu imidazoliowego [27–31]. Co więcej, He i współpracownicy [28] postulowali, że dodatek ILS do fazy ruchomej powoduje, że uzyskiwane piki charakteryzują się większą symetrią w porównaniu do wyników uzyskiwanych dla faz ruchomych modyfikowanych aminami. Prawdopodobną przyczyną tego efektu były słabsze oddziaływania elektrostatyczne między aminami, a wolnymi grupami silanolowymi w porównaniu do ILS. Dodatek ILS do fazy ruchomej powodował także zwiększenie efektywności rozdzielania mieszanin różnych analitów (puryn, amin, efedryn, nitrozwiązków aromatycznych), w porównaniu z fazą ruchomą będącą mieszaniną wody i rozpuszczalnika organicznego [27–29, 31]. Dotyczy to także substancji o podobnej strukturze, takich jak alkaloidy o zbliżonych strukturach (oksymatryny, sofokarpiny, soforydyny i matryny), których rozdzielenie za pomocą fazy ruchomej, w skład której wchodzi woda i metanol może być trudne w trybie RP HPLC [30]. Dodatek ILS do fazy ruchomej spowodował, że oddziaływania elektrostatyczne między wolnymi silanolami, a analitami zostały zredukowane, w konsekwencji prowadząc do skrócenia czasów retencji analitów i zwiększenia selektywności układu względem badanych mieszanin, poprzez zmianę kinetyki sorpcji i desorpcji analitów [27–31]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono także, że dodatek ILS nie wpływa na zmianę kolejności elucji analitów [31]. Należy także zaznaczyć, że dodatek ILS powoduje obniżenie ilości pólek teoretycznych o około 20 %, w porównaniu do fazy ruchomej składającej się z wody i metanolu. Jednakże, większą ilość pólki teoretycznej uzyskano dla ILS w porównaniu do trietyloaminy [1].

ILs zostały także zastosowane w analizie związków o charakterze kwasowym, w przypadku których zaobserwowano obniżenie wartości współczynników retencji wraz ze wzrostem stężenia imidazoliowej ILS [27, 32, 33]. Były to tendencje przeciwne do obserwowanych dla faz ruchomych modyfikowanych dodatkiem aminy. Prawdopodobną przyczyną obserwowanych efektów była delokalizacja ładunku w kationie imidazoliowym, co wiąże się z niższą stałą asocjacji między analitami a ILS, a w konsekwencji mniejszą ilością kationów imidazoliowych zaadsorbowanych na powierzchni oktadecylowej fazy stacjonarnej [27, 32]. Wówczas oddziaływania elektrostatyczne między ujemnie naładowanymi analitami, a dodatnio naładowanymi kationami imidazoliowymi są słabsze. Wpływ na obserwowane efekty mogła mieć także bariera steryczna oraz odpychanie elektrostatyczne między anionami IL, a analitami [27, 32]. Podobnie jak w przypadku analitów o charakterze zasadowym wykazano, że dodatek ILS wpływał na efektywność rozdzielania testowanych mieszanin poprzez blokowanie reszkowych silanoli [27, 32, 33]. Ponadto tworzenie par jonowych pomiędzy ujem-

nie naładowanymi analitami, a kationami ILs także determinowało rozdzielanie [32]. Mimo tego, ze względu na współistniejące oddziaływania, retencja testowanych substancji na powierzchni fazy stacjonarnej była mniejsza [27, 32].

Imidazoliowe ILs są najczęściej wykorzystywane do modyfikowania składu fazy ruchomej w RP HPLC, jednakże podjęto także próby zastosowania innych kationów budujących ILs. Porównano imidazoliowe i pirydyniowe ILs w analizie substancji obdarzonych ładunkiem dodatnim oraz anionów [24, 34, 35]. Dowiedziono, że w przypadku tych pierwszych, rodzaj zastosowanej IL, nie wpłynął bezpośrednio na zmianę wartości współczynników retencji, niemniej jednak miał istotny wpływ na wygląd chromatogramów. W przypadku pirydyniowej ILs, obserwowano dryft linii bazowej [24]. Rodzaj kationu w strukturze ILs miał zdecydowanie większy wpływ na uzyskiwane tendencje w przypadku analizy różnych anionów [34, 35]. Niezależnie od rodzaju kationu w strukturze zastosowanej ILs, obserwowano zwiększenie wartości współczynników retencji analitów wraz z wydłużeniem łańcucha alkilowego w strukturze ILs, co wskazuje na tworzenie się par jonowych między kationami ILs, a analizowanymi anionami. Zmiana rodzaju kationu na pirydyniowy powodowała dodatkowo znaczące zwiększenie wartości współczynników retencji analitów w związku z jego większą hydrofobowością w porównaniu z kationem imidazoliowym. Mimo uzyskania pełnego rozdzielania testowanej mieszaniny anionów (tiocyanianu i jodu) w przypadku pirydyniowych ILs, czas retencji był długi, a dodatkowo obserwowano wyższe wartości LOD w porównaniu do imidazoliowych ILs [35]. Wskazano także, że imidazoliowe ILs są odpowiedniejszym modyfikatorem fazy ruchomej ze względu na krótsze czasy retencji analitów oraz niższe wartości granicy ich wykrywalności [34, 35].

Istotny wpływ na retencję analitów ma także rodzaj anionu w strukturze ILs. Dowiedziono bowiem, że podobnie jak w przypadku kationów budujących ILs, mogą one ulegać adsorpcji na powierzchni oktadecylowej fazy stacjonarnej, w zależności od położenia w szeregu Hoffmeistera [21]. Aniony o charakterze chaotropowym (takie jak PF_6^- czy BF_4^-) silniej adsorbują się na powierzchni wypełnienia w porównaniu do anionów o charakterze kosmotropowym (I^- , Br^- czy Cl^-) [21, 36]. Chaotropowe aniony powodują, że uzyskiwane piki analitów o charakterze zasadowym są węższe ze względu na fakt, że w ich obecności zjawisko sorpcji i desorpcji analitów są efektywniejsze. Jednakże czasy retencji analitów ulegają wydłużeniu, co spowodowane jest zwiększeniem hydrofobowości analitów poprzez zmniejszenie ich otoczki hydratacyjnej. Aniony kosmotropowe są natomiast silnie uwodnione, przez co nie oddziałują one z analitami i z powierzchnią oktadecylowej fazy stacjonarnej [37–39].

ILs są stosowane jako dodatki do fazy ruchomej w analizie wielu analitów o charakterze kwasowym oraz charakteryzujących się dużą polarnością. Do tego

typu związków należą m. in. oligonukleotydy antysensowne. Mimo wielu zalet zastosowania ILS w chromatografii cieczowej, do głównych wad należy zaliczyć ich wysoki koszt, toksyczność oraz brak możliwości zastosowania detekcji MS [1,2].

3. ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH W CHROMATOGRAFICZNEJ ANALIZIE OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSENSOWNYCH

W literaturze wykazano, że oprócz zdolności ILS do blokowania wolnych grup silanolowych, ich nadmiar może adsorbować się na ligandach oktadecylowych, podobnie jak w przypadku alkiloamin, które stosowane są powszechnie zarówno do blokowania wolnych silanoli, jak i jako odczynniki do tworzenia par jonowych (IPR, ang. *ion pair reagents*) [1, 2, 21, 36]. Co więcej, wykazano zdolność ILS do tworzenia par jonowych z analitami obdarzonymi ujemnym ładunkiem [27]. Jednakże, oddziaływania te nie były dominujące i obserwowano efekty odwrotne niż w przypadku chromatografii par jonowych (IP RP HPLC, ang. *ion pair reversed phase liquid chromatography*). IP RP HPLC jest użyteczną techniką chromatograficzną, zwłaszcza w przypadku analiz chromatograficznych polarnych substancji obdarzonych ładunkiem, które nie są zatrzymywane na powierzchni niepolarniej, oktadecylowej fazy stacjonarnej. Do takich związków należą oligonukleotydy antysensowne (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*).

3.1. OLIGONUKLEOTYDY ANTYSENSOWNE

Oligonukleotydy są jedno- lub dwuniciowymi fragmentami kwasu rybonukleinowego lub deoksyrybonukleinowego, zbudowanymi z kilku do kilkunastu nukleotydów. Jeden nukleotyd jest natomiast zbudowany z cukru z grupy pentoz, reszty kwasu fosforanowego (V) oraz zasady azotowej [40–44]. W fizjologicznym pH, grupy fosforanowe budujące szkielet fosforanowo-cukrowy oligonukleotydu są obdarzone ładunkiem ujemnym. Zastosowanie niemodyfikowanych oligonukleotydów jako środków terapeutycznych jest ograniczone ze względu na ich trawienie enzymatyczne przez wewnątrzkomórkowe endo- i egzonukleazy oraz potencjalną toksyczność produktów biodegradacji tych biomolekuł. Z tego względu konieczna jest chemiczna modyfikacja w obrębie grupy fosforanowej, cukru lub zasady azotowej, która zwiększa ich biodostępność i stabilność w matrycach biologicznych. Wówczas związki te nazywane są oligonukleotydami antysensownymi (ASO) [37–39].

Potencjał terapeutyczny ASO wynika ze zdolności tych związków do wiązania się z komplementarną sekwencją DNA lub RNA na zasadzie hybrydyzacji z udziałem wiązań wodorowych, dzięki czemu są one zdolne do zahamowania

ekspresji genów [45–47]. Aktualnie dostępnych jest dziewięć leków antysensownych, zaakceptowanych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration, FDA*). Antysensowne środki terapeutyczne stosowane są m.in. w leczeniu schorzeń neurologicznych i chorób wieńcowych czy też w cytomegalowirusowym zapaleniu siatkówki (tabela 2). Aktualnie prowadzone są również badania kliniczne w kierunku zastosowania ASO w leczeniu chorób nowotworowych [42].

Tabela 2. Oligonukleotydy stosowane w terapii antysensownej, zaakceptowane przez FDA [42, 44, 46, 48]
Table 2. FDA-approved antisense oligonucleotides used in antisense therapy [42, 44, 46, 48]

Nazwa leku	Długość sekwencji	Modyfikacja	Droga podania	Choroba
Fomivirsen (Vitravene)	21	tiofosforanowa	iniekcja do ciała szklanego	cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki oka
Macugen (Pegaptanib)	27	pegylowany, tiofosforanowy aptamer z modyfikacją 2'O-metylową cukru przy każdej purynie i 2'O-fluorową przy każdej pirymidynie	iniekcja do ciała szklanego	wysiękowe zwyrodnienie plamki żółtej
Kynamro (Mipomersen)	20	tiofosforanowa/2'O-metylowa	iniekcja podskórna	homozygotyczna rodzinna hipercholesterolemia
Eteplirsen (Exondys 51)	30	oligomer morfolinowy	infuzja dożylna	dystrofia mięśniowa Duchenne'a
Defilbrotide (Defitelio)	50	tiofosforanowa	infuzja dożylna	choroba żylna-okluzyjna
Spinraza (Nusinersen)	18	tiofosforanowa/2'O-metoksyetylowa	iniekcja dooponowa	rdzeniowy zanik mięśni (SMA)
Tegsedi (Inotersen)	20	tiofosforanowa/2'O-metoksyetylowa	iniekcja podskórna	polineuropatia spowodowana dziedziczną amyloidozą transtyretynową

Onpattro (Patisiran)	21	2'O-metylowy krótki, interferujący kwas rybonukleinowy	infuzja dożylna	polineuropatia spowodowana dziedziczną amyloidozą transtyretynową
Givlaari (Givosiran)	21/23	tiofosforanowy/2'O-MEmetylowy/2'O-fluorowy krótki, interferujący kwas rybonukleinowy	iniekcja podskórna	ostra porfiria wątrobowa

3.2. CHROMATOGRAFICZNE METODY OZNACZANIA OLIGONUKLEOTYDÓW

Zastosowanie oligonukleotydów w terapii antysensownej sprawiło, że istnieje konieczność ich analizy, zwłaszcza w kontekście oznaczania i identyfikacji ASO w matrycach biologicznych, takich jak osocze, surowica, mocz czy tkanki. Innym ważnym aspektem jest oddzielanie zanieczyszczeń, takich jak ASO o krótszych sekwencjach, powstających w procesie chemicznej syntezy tych związków. Aktualnie chromatografia cieczowa jest najpowszechniej stosowana w analizie zanieczyszczeń ASO oraz produktów ich metabolizmu [42, 44]. Do najpopularniejszych technik chromatograficznych stosowanych w oznaczaniu i identyfikacji oligonukleotydów należą chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC, ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*), chromatografia jonowymienna (IEC, ang. *ion exchange chromatography*) oraz IP RP HPLC [49–51].

W analizie ASO za pomocą HILIC istotną zaletą jest możliwość sprzężenia tej techniki ze spektrometrią mas ze względu na dużą lotność fazy ruchomej, co w konsekwencji wpływa znacząco na zwiększenie czułości oznaczania tych związków [42, 44, 52]. Główną wadą tej techniki w analizie ASO jest natomiast ograniczona selektywność rozdzielania tych związków, przez co tryb HILIC jest wykorzystywany w ich analizie zdecydowanie rzadziej niż IEC czy IP RP HPLC [53–55].

W przypadku analizy ASO za pomocą EIC, największą zaletą jest dobra selektywność względem rozdzielania mieszanin ASO, różniących się zarówno liczbą ładunków ujemnych w szkielecie cukrowo-fosforanowym, jak i sekwencją nukleotydów. Wadę stanowi natomiast ograniczona kompatybilność ze spektrometrią mas ze względu na zastosowanie faz ruchomych, w skład których wchodzi roztwory soli nieorganicznych [42, 49].

IP RP HPLC stanowi obecnie najpopularniejszą technikę w analizie ASO. Jak wspomniano, w tej technice faza ruchoma jest wzbogacona dodatkiem kationowych IPR, którymi najczęściej są aminy w mieszaninie z octanami, węglanami i 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolem (HFIP) [42, 49, 57, 58]. IPR charakteryzują się wysoką lotnością, dzięki czemu możliwe jest sprzężenie IP RP HPLC ze spektrometrią mas, co znacząco wpływa na zwiększenie czułości analizy ASO. Oktadecylowa faza stacjonarna jest najpowszechniej stosowana w analizie ASO,

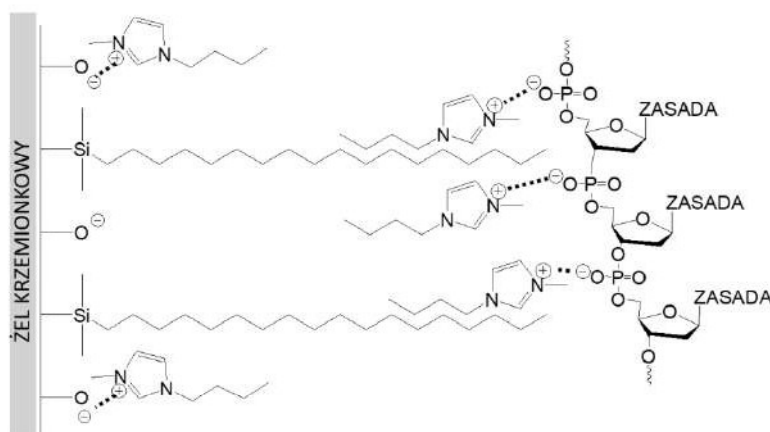
niemniej jednak w literaturze można znaleźć prace dotyczące zastosowania innych faz stacjonarnych, włączając żel krzemionkowy modyfikowany grupami fenyłowymi, pentafluorofenyłowymi czy też cholesterolowymi [43, 59, 60]. Mechanizm retencji w IP RP HPLC obejmuje zmniejszenie wypadkowego ładunku ASO poprzez utworzenie pary jonowej z IPR, czego efektem jest zwiększenie retencji tych związków. Co więcej, możliwa jest także adsorpcja IPR na powierzchni ligandów fazy stacjonarnej, w wyniku czego powstaje dynamiczny wymiennicz jonowy. Wówczas ASO mogą oddziaływać także poprzez oddziaływania elektrostatyczne z IPR. Istnieje kilka czynników mających istotny wpływ na siłę oddziaływań pomiędzy IPR, ASO, a powierzchnią wypełnienia kolumny. Zalicza się do nich długość sekwencji ASO, rodzaj zastosowanego IPR oraz grup funkcyjnych w strukturze fazy stacjonarnej. Z tego względu istotny jest odpowiedni dobór parametrów chromatograficznych w celu uzyskania odpowiedniej selektywności rozdzielania mieszanin ASO [42–44].

Obecnie do najczęściej stosowanych amin w analizie ASO należą N,N-dimetylobutyloamina (DMBA), heksyloamina (HA), trietyloamina (TEA), tripropyloamina (TPA), dietyloamina (DEA), N,N-diizopropylloetyloamina (DIPEA) oraz propyloamina (PA) [25, 42, 44, 60]. Struktura IPR w istotny sposób wpływa na retencję ASO. W wielu badaniach udowodniono, że wraz z wydłużeniem łańcucha alkilowego w strukturze IPR rośnie retencja ASO, co wiąże się z ich efektywniejszą adsorpcją na ligandach alkilowych fazy stacjonarnej [43, 60–62]. IPR zbudowane z rozgałęzionego łańcucha alkilowego mniej efektywnie adsorbują się na powierzchni fazy stacjonarnej w porównaniu do IPR, w strukturze których występują nierozgałęzione łańcuchy alkilowe. W konsekwencji prowadzi to do uzyskania niższych wartości współczynników retencji ASO [25]. Stężenie IPR jest kolejnym ważnym czynnikiem determinującym siłę oddziaływań między IPR, ASO, a fazą stacjonarną. Zwiększanie stężenia powoduje zwiększenie wartości współczynników retencji ASO, jak również zwiększenie efektywności ich rozdzielania [60].

3.3. ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH JAKO ODCZYNNIKÓW DO TWORZENIA PAR JONOWYCH W ANALIZIE OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSENSOWNYCH

Z uwagi na fakt, że IL mogą tworzyć pary jonowe zostały po raz pierwszy (i jak dotychczas jedyny) zastosowane w analizie oligonukleotydów z modyfikacją tiofosforanową, 2'-O-metylową oraz 2'-O-metoksyetylową za pomocą IP RP HPLC [25]. W badaniach testowano ILs z różną długością podstawnika alkilowego w strukturze kationu imidazoliowego ([EMIM][Cl], [BMIM][Cl], [HMIM][Cl]) o stężeniach w zakresie od 0,1 do 7 mM. Jako fazy stacjonarne wybrano wypełnienie oktadecylowe, pentafluorofenyłowe oraz oktadecylowe z wbudowaną

grupą polarną. W badaniach dowiedziono, że obserwowane efekty są analogiczne do tych uzyskiwanych podczas zastosowania tradycyjnych IPR w analizie ASO za pomocą IP RP HPLC. Przede wszystkim zwiększenie stężenia ILs w fazie ruchomej powodowało wzrost wartości współczynników retencji ASO, ze względu na silniejsze oddziaływania elektrostatyczne między kationami IL oraz ASO. Co więcej, najwyższe wartości współczynników retencji ASO uzyskano dla IL z najdłuższym podstawnikiem alkilowym w strukturze kationu imidazoliowego, ze względu na jego silniejszą adsorpcję na ligandach fazy stacjonarnej [25]. Zaobserwowano także, że zwiększenie stężenia ILs wpływa na poprawienie efektywności rozdzielania mieszanin ASO oraz ich syntetycznych metabolitów, niezależnie od zastosowanej fazy stacjonarnej. Efekt ten był widoczny zwłaszcza dla mieszaniny oligonukleotydów tiofosforanowych, których rozdzielanie do linii podstawowej uzyskano w mniej niż 10 minut dla wszystkich testowanych faz stacjonarnych. W przypadku mieszaniny oligonukleotydów z modyfikacją 2'-O-metylową, zadowalające rozdzielanie uzyskano w czasie nieprzekraczającym 9 minut dla kolumny oktadecylowej i pentafluorofenylovej [25]. Schematyczne przedstawienie oddziaływań pomiędzy ASO, kationem imidazoliowym, a oktadecylową fazą stacjonarną zaprezentowano na rysunku 3.



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie oddziaływań pomiędzy ASO, kationem, a oktadecylową fazą stacjonarną w trybie IP RP HPLC

Figure 3. A schematic representation of the interactions between ASO, ILs cation, and octadecyl stationary phase in the RP HPLC IP mode

Opracowana metoda chromatograficznego rozdzielania została zastosowana w oznaczaniu ilościowym ASO z modyfikacją tiofosforanową w próbkach wzbogaconego osocza oraz rozdzielaniu potencjalnych zanieczyszczeń powstających w procesie syntezy tych związków. W tym celu zastosowano detekcję UV oraz fazę ruchomą, składającą się z metanolu i 10 mM roztworu [HMIM][Cl] (program elucji gradientowej: 45–60 % v/v metanolu w 10 minut) oraz kolumnę pentafluorofenyłową i oktadecylową z wbudowanymi grupami polarnymi. Dwuskładnikową mieszaninę rozdzielono w czasie nieprzekraczającym 6 minut. Opracowana metoda ilościowego oznaczania ASO we wzbogaconym osoczu charakteryzowała się dobrą liniowością w zakresie stężeń od 8 do 20 μM oraz wartościami granicy wykrywalności i granicy oznaczalności równymi 1,74 μM i 5,23 μM [25]. Tym samym po raz pierwszy wykazano, że ILs mogą być z powodzeniem stosowane jako IPR w analizie ASO różnych generacji za pomocą IP RP HPLC.

UWAGI KOŃCOWE

ILs są substancjami o ciągle rosnącym potencjale aplikacyjnym w wielu gałęziach chemii, włączając chemię analityczną, farmację, katalizę, syntezę czy też medycynę. Ze względu na niską lotność i prężność par, jak również z uwagi na możliwość projektowania ich właściwości fizykochemicznych poprzez zmianę struktury, są one z powodzeniem wykorzystywane także w technikach separacyjnych, zwłaszcza w chromatografii cieczowej. Dodatek ILs do fazy ruchomej jest szczególnie użyteczny w przypadku analitów o charakterze zasadowym, ze względu na ich możliwe oddziaływania z wolnymi grupami silanolowymi, obecnymi na powierzchni faz stacjonarnych. Wówczas następuje supresja wolnych silanoli. Niemniej jednak, ze względu na możliwość adsorpcji ILs na ligandach alkilowych faz stacjonarnych, związki te mogą być z powodzeniem wykorzystane jako IPR w analizie polarnych, wielkocząsteczkowych analitów, takich jak ASO. Ze względu na potencjał terapeutyczny tych związków, wymagana jest metoda ich analizy zapewniająca odpowiednią selektywność rozdzielania. Najpopularniejszą techniką ich rozdzielania jest chromatografia par jonowych z użyciem amin jako odczynników do tworzenia par jonowych. Zamiana tych substancji na ILs pozwala na uzyskanie podobnej selektywności rozdzielania mieszanin ASO, bez konieczności modyfikowania pH fazy ruchomej.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja powstała w ramach realizacji projektu badawczego SONATA-BIS UMO-2016/22/E/ST4/ 00478, finansowanego ze środków przyznawanych przez Narodowe Centrum Nauki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A.*, 2018, **1559**, 2.
- [2] M. Buszewska-Forajta, M.J. Markuszewski, R. Kaliszán, *J. Chromatogr. A.*, 2018, **1559**, 17.
- [3] M. Niemezak, *Synteza i właściwości dwufunkcyjnych herbicydowych cieczy jonowych*, Praca doktorska, Poznań, 2015.
- [4] T.L. Greaves, A. Weerawardena, I. Krodkiewska, C.J. Drummond, *J. Phys. Chem. B.*, 2008, **112**, 896.
- [5] D. Mieszkowski, W.D. Sroka, M.P. Marszał, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2015, **38**, 1499.
- [6] S. Calabuig-Hernández, M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, *J. Chromatogr. A.*, 2016, **1465**, 98.
- [7] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 2002, **182–183**, 419.
- [8] F. Endres, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 1648.
- [9] S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, *J. Chromatogr. A.*, 2018, **1559**, 112.
- [10] Y. Polyakova, Y.M. Koo, K.H. Row, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2016, **11**, 1.
- [11] J.P. Hallett, T. Welton, *Chem. Rev.* 2011, **111**, 3508.
- [12] J.D. Holbrey, R.D. Rogers, *Ionic Liquids in Synthesis*, Second Edition, WILEY-VCH, Weinheim, 2008.
- [13] K. Materna, T. Rzemieniecki, J. Pernak, *Chemik*, 2016, **70**, 471.
- [14] J.F. Liu, G. Bin Jiang, J.Á. Jönsson, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 20.
- [15] S. Studzińska, *Oznaczanie cieczy jonowych w próbkach biologicznych i środowiskowych za pomocą łączonych technik chromatograficznych*, Praca doktorska, Toruń, 2009.
- [16] H. Tokuda, S. Tsuzuki, M.A.B.H. Susan, K. Hayamizu, M. Watanabe *J. Phys. Chem. B.*, 2006, **110**, 19593.
- [17] N. V. Plechkova, K.R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 123.
- [18] M. David, *Applications of ionic liquids in polymer science and technology*, Intech, Rijeka, 2015.
- [19] J. Nawała, B. Dawidziuk, D. Dziedzic, D. Gordon, S. Popiel, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2018, **105**, 18.
- [20] R.L. Vekariya, *J. Mol. Liq.*, 2017, **227**, 44.
- [21] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A.*, 2008, **1184**, 6.
- [22] D.W. Barber, C.S.G. Phillips, G.F. Tusa, A. Verdin, *J. Chem. Soc.*, 1959, 18.
- [23] P.H. Shetty, P.J. Youngberg, B.R. Kersten, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A.*, 1987, **411**, 61.
- [24] W. Zhang, L. He, Y. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Lett.*, 2003, **36**, 827.
- [25] A. Kaczmarkiewicz, J. Zielak, Ł. Nuckowski, S. Studzińska, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 39100.
- [26] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 1439.
- [27] X. Xiaohua, Z. Liang, L. Xia, J. Shengxiang, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **519**, 207.
- [28] L.J. He, W.Z. Zhang, B. Wen, X. Liu, S.X. Jiang, *Chinese Chem. Lett.*, 2003, **14**, 39.
- [29] J. Zheng, K.H. Row, *Am. J. Appl. Sci.*, 2006, **3**, 2160.
- [30] M. Tian, J. Liu, K.H. Row, *Molecules*, 2009, **14**, 2127.
- [31] T. Ahmad, S. Smith, B. Redlinski, C. Utterback, D. Perkins, S. Sharp, A. Heagy, T. Ahmad, *Adv. Anal. Chem.*, 2012, **2**, 60.
- [32] H. Xialin, P. Jinfeng, H. Yuanjian, Y. Daqiang, L. Jingfu, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 4126.
- [33] R. Kaliszán, M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, T. Bączek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A.*, 2004, **1030**, 263.

- [34] Y. Zhang, H. Yu, Y. Ma, G. Cui, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**, 7347.
- [35] G. Cui, H. Yu, Y. jie Ma, *J. Sep. Sci.*, 2019, **42**, 1733.
- [36] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Huguet, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 4071.
- [37] M. Caban, P. Stepnowski, *Anal. Chim. Acta.*, 2017, **967**, 102.
- [38] L. Pan, R. Lobrutto, Y. V. Kazakevich, R. Thompson, *J. Chromatogr. A.*, 2004, **1049**, 63.
- [39] X. Wang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A.*, 2007, 1154,165.
- [40] D. Nurzyńska, *Współcz. Onkol.*, 2003, **7**, 18.
- [41] S. Studzińska, R. Rola, F. Łobodziński, K. Krzemińska, *Wiad. Chem.*, 2016, **70**, 634.
- [42] S. Studzińska, *Talanta*, 2018, **176**, 329.
- [43] A. Kaczmarkiewicz, L. Nuckowski, S. Studzińska, *Talanta*, 2019, **196**, 54.
- [44] A. Kaczmarkiewicz, L. Nuckowski, S. Studzińska, B. Buszewski, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2019, **49**, 256.
- [45] A. Sehgal, A. Vaishnav, K. Fitzgerald, *J. Hepatol.*, 2013, **59**, 1354.
- [46] C.A. Stein, D. Castanotto, *Mol. Ther.*, 2017, **25**, 1069.
- [47] N.M. Dean, C. Frank Bennett, *Oncogene*, 2003, **22**, 9087.
- [48] A. Goyon, P. Yehl, K. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, **182**, 113105.
- [49] A.C. McGinnis, B. Chen, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012, **883–884**, 76.
- [50] M. Biba, J.P. Foley, C.J. Welch, *Liquid chromatographic separation of oligonucleotides*, Second Edition, Elsevier Inc., 2017.
- [51] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A.*, 2004, **1037**, 49.
- [52] Z.J. Lin, W. Li, G. Dai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 330.
- [53] L. Gong, J.S.O. McCullagh, *J. Chromatogr. A.*, 2011, **1218**, 5480
- [54] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta.*, 2011, **692**, 1.
- [55] P.A. Lobue, M. Jora, B. Addepalli, P.A. Limbach, *J. Chromatogr. A.*, 2019, **1595**, 39.
- [56] D. Sýkora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr. A.*, 1999, **852**, 297.
- [57] S. Studzińska, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 2076.
- [58] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, *J. Chromatogr. A.*, 2014, **1245**, 65.
- [59] S. Studzińska, K. Krzemińska, M. Szumski, B. Buszewski, *Talanta*, 2016, **154**, 270.
- [60] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2017, **138**, 146.
- [61] S. Studzińska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A.*, 2018, **1554**, 71.
- [62] L. Gong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2015, **29**, 2402.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 kwietnia 2020 r.