

**CHROMATOGRAFICZNA ANALIZA ZWIĄZKÓW  
BUDUJĄCYCH KWASY NUKLEINOWE**  
CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS  
CONSTITUENTS

**Sylwia Studzińska, Rafał Rola, Filip Łobodziński,  
Katarzyna Krzemińska**

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

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Chromatografia cieczowa w analizie nukleozydów
2. Zastosowanie chromatografii cieczowej do oznaczania nukleotydów
3. Analiza jakościowa i ilościowa oligonukleotydów syntetycznych
4. Nowe kierunki badań chromatograficznych związków budujących kwasy nukleinowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr Katarzyna Krzemińska**, doktorantka na Wydziale Chemii UMK od 2014 r. W pracy naukowej zajmuje się syntezą nowego typu faz stacjonarnych do chromatografii cieczerwowej.

**mgr Filip Łobodziński**, absolwent Wydziału Chemii UMK. W 2015 r. uzyskał tytuł magistra za pracę poświęconą wykorzystaniu chromatografii oddziaływań hydrofilowych w analizie oligonukleotydów.

**mgr Rafał Rola**, absolwent Wydziału Chemii UMK. W 2015 r. uzyskał tytuł magistra za pracę obejmującą badanie *in vitro* metabolizmu oligonukleotydów anty-sensownych z zastosowaniem chromatografii par jonowych.

**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, gdzie prowadzi badania nad chromatograficzną analizą i metabolizmem związków budujących kwasy nukleinowe. W 2016 roku uzyskała tytuł doktora habilitowanego za cykl prac poświęcony tym badaniom.

### ABSTRACT

Understanding the characteristics, role and structure of nucleic acids allowed to answer questions about the disease processes. Today, nucleic acids and their constituents are tools, which are used by molecular biology in medicine and biotechnology. Antisense and gene therapy are intensively developing methods for possible treating or preventing disease. They use short fragments of DNA or RNA - oligonucleotides to silence the genes expression. They are not the only ones that allow analytical chemists to obtain information about the state of our body. Determination of modified nucleoside allows detection of cancer, while analysis of nucleotides allows the estimation of strengthening the immune system.

There is a great need of sensitive, selective and precise methods of separation of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides and their qualitative and quantitative analysis. Consequently liquid chromatography (LC) is the most commonly used for analysis of nucleic acid constituents. The most widely used modes of LC include Ion Exchange Chromatography (IEC) and Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP HPLC). Both techniques have their advantages and disadvantages in the analysis of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides. In the case of IEC it is necessary to use high concentrations of the salt in the mobile phase or concentration gradients, which considerably limits the possibility of using MS detection. RP HPLC can be coupled with MS detection but only when volatile salts are mobile phase components. On the other hand there is a significant problem is the lack of sufficient selectivity for the most polar nucleosides and nucleotides. RP HPLC MS is still most often used in the determination of nucleosides and nucleotides, due to its high sensitivity and a comprehensive qualitative analysis.

Another system used for the HPLC analysis of oligonucleotides is Ion Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (IP RP HPLC). These compounds can not be analyzed by RP HPLC due to their high polarity. The advantage of IP RP HPLC is selectivity, achieved by a suitable choice of mobile phase composition and the possibility of using MS. A disadvantage of IP RP HPLC in the analysis of oligonucleotides is however lower sensitivity compared to RP HPLC.

During the last few years Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) was applied for the separation of mixtures of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides extracted from a biological or food samples. The presented results demonstrate the usefulness of this method, however, the resolving power is limited due to the asymmetric peak shape. On the other hand proper selection of the mobile and stationary phase can lead to a high selectivity in the analysis of the most polar nucleosides, nucleotides and oligonucleotides, which can not be separated by RP HPLC.

**Keywords:** nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, liquid chromatography, sensitivity, selectivity

**Słowa kluczowe:** nukleozydy, nukleotydy, oligonukleotydy, chromatografia cieczowa, czułość, selektywność

---

---

## WPROWADZENIE

Kwasy nukleinowe to związki pełniące funkcję źródła informacji o budowie i cechach każdego organizmu żywego [1]. Stanowią one polimery, zbudowane z mniejszych cząstek (monomerów), jakimi są nukleotydy. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmów niezbędne są nie tylko kwasy nukleinowe, ale również związki, które wchodzą w ich skład, takie jak oligonukleotydy, nukleotydy i nukleozydy [1]. Obecnie wszystkie z wymienionych grup związków stanowią ważne narzędzia, którymi posługuje się biologia molekularna – przede wszystkim w medycynie. Bada się m.in. stężenie nukleozydów w moczu, nukleotydów w mleku matki, płynie mózgowo-rdzeniowym, żywności, oraz zawartość oligonukleotydów lub małowcząsteczkowych kwasów nukleinowych w osoczu [2–9].

Nukleozydy to cząsteczki składające się z cukru (rybozy lub deoksyrybozy) oraz zasady azotowej (purynowej lub pirymidynowej). W kwasach nukleinowych do zasad purynowych należą: adenina (A) oraz guanina (G), natomiast do pirymidynowych: tymina (T), cytozyna (C) i uracyl (U). Odgrywają one bardzo ważną rolę, gdyż są prekursorami nukleotydów, biorących udział w przenoszeniu informacji genetycznej. Nukleozydy są także cząsteczkami sygnałowymi i neuromodulatorami [1, 9].

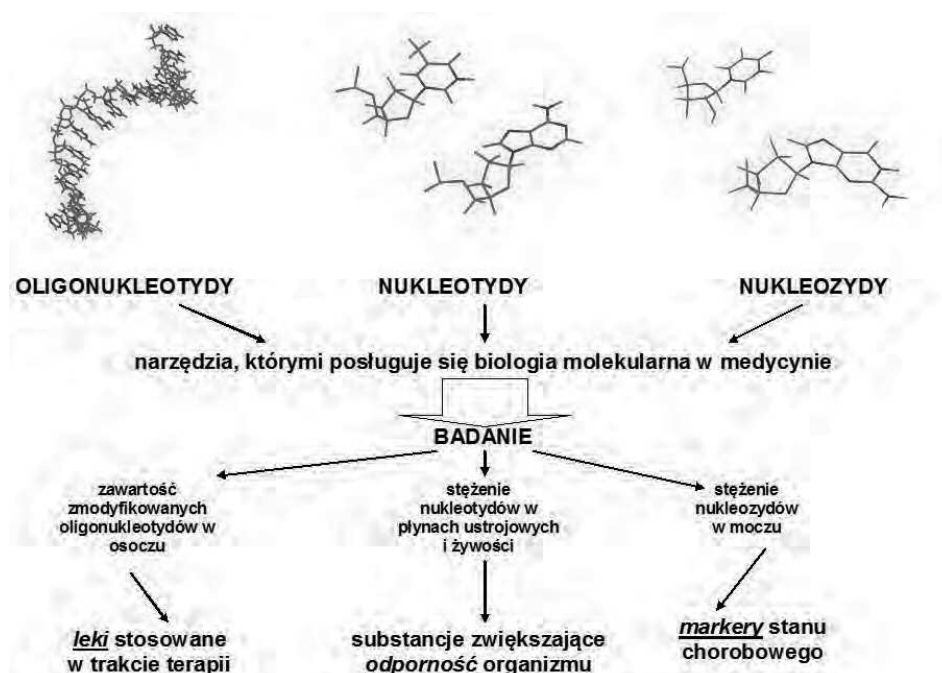
Transportujący kwas rybonukleinowy (tRNA) zawiera wiele zmodyfikowanych nukleozydów, które powstają w czasie potranskrypcyjnej obróbki enzymatycznej prekursorowego tRNA. Są to głównie analogi urydyny (rybotymidyna, dihydrourydyna, czy pseudourydyna) i adenozyne (np. inozyna, 1-metyloinozyna, 7-metylo-adenozyna) [1, 4, 9–12]. Modyfikacje nukleozydów mogą przyjmować charakter prosty (np. redukcja, utlenianie, metylacja) lub złożony, w wyniku którego powstają między innymi nukleozydy hiperzmodyfikowane [4, 10–12]. Zmodyfikowane nukleozydy uwalniane są z tRNA w wyniku hydrolitycznej aktywności fosfataz i rybonukleaz. Związki te nie mogą być włączone do powtórnej syntezy RNA, z tego względu krążą z krwią i trafiają do moczu, z którym są wydalane z organizmu. Wykazano, że poziom stężenia potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w moczu jest użytecznym parametrem w badaniu zmian RNA i metabolizmu białek. Zostały one uznane za markery chorób nowotworowych [10–12].

Ważne funkcje w organizmie pełnią także nukleotydy, które są estrami kwasu fosforowego i nukleozydu. Są one monomerami kwasów nukleinowych i biorą udział w przekazywaniu informacji genetycznej [1, 9]. Pełnią ponadto kluczową rolę w procesach syntezy fosfolipidów, białek i węglowodanów. Adenozyno-5'-trifosforan (ATP) jest nośnikiem energii niezbędnej do przebiegu większości procesów przebiegających w komórce [1, 9]. Z kolei cykliczne fosfodiestry uczestniczą w szlakach przekazywania sygnałów. Nukleotydy biorą także pośrednio udział w regulacji metabolizmu [1]. Ich obecność oraz poziom stężenia musi być monitorowany dla takich celów jak m. in.: ocena stanu układu sercowo-naczyniowego, oznaczanie biomarkerów stresu oksydacyjnego, badanie mikroorganizmów, analiza żywności, suplementacji diety, mleka matek karmiących oraz płynu mózgowo-rdzeniowego

[13–17]. Udowodniono ponadto, iż nukleotydy mają działanie immunostymulujące, poprawiające pracę i wydolność układu odpornościowego [18,19].

Poszczególne nukleotydy połączone ze sobą wiązaniami 3'-5' fosfodiestrowymi tworzą cząsteczki oligonukleotydów. Stanowią one zatem krótkie, jednocieniowe fragmenty kwasu nukleinowego [1, 9]. W komórce występują zwykle w postaci krótkich cząsteczek RNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów (np. mikroRNA) lub są półproduktami rozkładu dużych cząsteczek kwasów nukleinowych [1]. Oligonukleotydy naturalnie występujące w organizmie mają zdolność do tworzenia dupleksów zarówno z cząsteczką DNA (właściwości antygenowe), jak i RNA (właściwości antysensowne). Są one jednak trawione przez enzymy z grupy nukleaz [1, 7, 9]. Z tego względu syntezowane są oligonukleotydy o zmodyfikowanej strukturze, składające się z 12-20 jednostek nukleotydowych. Związki te zdolne są do wiązania się z określonym fragmentem DNA, RNA, a nawet z białkami [2, 3, 7]. Sekwencja zasad azotowych w oligonukleotydzie jest komplementarna do sekwencji sensownej DNA lub mRNA, dlatego też związki te są nazywane oligonukleotydami antysensownymi. Hamują one procesy transkrypcji i translacji poprzez komplementarne łączenie z fragmentami kwasów nukleinowych. Dzięki temu stały się efektywnym narzędziem w regulacji ekspresji określonego genu [2, 3, 7, 8]. Modyfikacje strukturalne oligonukleotydów antysensownych mają na celu zwiększenie ich biodostępności, odporności na działanie nukleaz, powinowactwa do wybranych biomolekuł [20]. Zdolność do hamowania ekspresji genów jest powodem ich wykorzystywania w leczeniu wielu chorób. Ponad 40 z nich znajduje się w różnych fazach badań klinicznych, a 3 zostały już wprowadzone na rynek [2, 3, 21, 22]. Niezbędna jest obecnie kontrola poziomu stężeń zmodyfikowanych oligonukleotydów lub ich metabolitów w osoczu.

Podsumowując należy stwierdzić, że związki budujące kwasy nukleinowe są albo markerami stanu chorobowego (nukleozydy), albo substancjami zwiększającymi odporność organizmu (nukleotydy), bądź też lekami, które mają ten organizm przed chorobą bronić (oligonukleotydy) (Rys. 1). Możliwość monitorowania zmian chorobowych, zachodzących w organizmie poprzez oznaczenie nukleozydów, jak również terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów powoduje, iż niezbędne staje się ich oznaczanie w różnego typu matrycach. Prowadzi to do poszukiwania nowych metod analizy. Powinny one charakteryzować się krótkim czasem analizy, selektywnością, czułością i powtarzalnością. W analizie związków budujących kwasy nukleinowe powszechnie stosowane są techniki separacyjne, a zwłaszcza chromatografia cieczowa [2, 8, 12].



Rysunek 1. Struktura i rola związków budujących kwasy nukleinowe w organizmie  
 Figure 1. Structure and function of nucleic acids components

## 1. CHROMATOGRAFIA CIECZOWOWA W ANALIZIE NUKLEOZYDÓW

Współcześnie poszukuje się nowych metod analizy nukleozydów, które umożliwią pełną i szybką kontrolę zmian nowotworowych zachodzących w organizmie. Obecnie jako metody analizy nukleozydów wykorzystywane są chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC), chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC), strefowa elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), micelarna elektroforeza kapilarna (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC), elektrochromatografia kapilarna (ang. *Capillary Electrochromatography*, CEC). Najpowszechniej wykorzystywana jest jednak wysokosprawna chromatografia cieczerwowa w układzie faz odwróconych (ang. *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP HPLC), jonowymienna (ang. *Ion Exchange Chromatography*, IEC), oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) oraz par jonowych (ang. *Ion Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, IP RP HPLC).

Chromatografia cieczerwowa pozwala na precyzyjną i szybką analizę nukleozydów. W porównaniu z GC charakteryzuje ją szybkość i prostota przygotowania próbki,

zwłaszcza w kontekście derywatywacji [23]. Odpowiedni dobór fazy stacjonarnej i ruchomej powoduje, że HPLC stanowi doskonały układ do rutynowych oznaczeń jakościowych i ilościowych [24]. Dokonując zmiany siły elucyjnej, pH fazy ruchomej oraz temperatury kolumny możliwe jest selektywne rozdzielanie zmodyfikowanych nukleozydów w stosunkowo krótkim czasie [23, 24].

Pierwszą próbę oznaczenia potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w moczu za pomocą RP HPLC podjął w 1975 r. Gehrke i współpracownicy [25]. Z powodzeniem zidentyfikowali oni nukleozydy w próbkach moczu osób zdrowych i chorych na raka.

W swoich badaniach Seidel, Liebich i in. [26, 27] wykorzystali RP HPLC do oznaczenia zmodyfikowanych nukleozydów jako markerów chorób nowotworowych w moczu kilkudziesięciu osób. Udowodniono, iż w przypadku próbek pobranych od osób chorujących na nowotwór stężenie zmodyfikowanych nukleozydów jest podwyższone w porównaniu do ich stężenia w moczu osób zdrowych [26, 27].

Stężenie nukleozydów w moczu jest zależne od zmian fizjologicznych zachodzących w organizmie. W celu wyeliminowania substancji przeszkadzających znajdujących się w próbkach moczu, podczas analizy chromatograficznej stosowana może być dwuwymiarowa chromatografia cieczowa [28]. Próbkę moczu jest wstrzykiwana bezpośrednio do pierwszej kolumny (pre-kolumny) i przepłukiwana eluentem o wyższym pH (5 mM roztwór octanu amonu o pH = 7,5). Podczas tego procesu składniki przeszkadzające zostają usunięte z próbki, ponieważ wyższe pH zwiększa oddziaływanie polarnych analitów z wypełnieniem kolumny chromatograficznej. Pozostałe składniki próbki są wmywane z pierwszej kolumny eluentem o niższym pH (np. mieszaniną 5 mM roztwór octanu amonu pH = 4,5 i metanolu) do kolumny analitycznej, w której zachodzi właściwa analiza próbki moczu. Dzięki zastosowaniu takiego rozwiązania, które jest proste i szybkie, zbędne jest zatężanie i oczyszczanie próbki [28].

Oznaczanie ilościowe i jakościowe zmodyfikowanych nukleozydów w próbkach biologicznych, takich jak mocz i osocze, jest najczęściej wykonywane przy użyciu RP-HPLC z detekcją UV [29]. W przypadku analiz próbek złożonych ta metoda detekcji okazuje się niewystarczająca, zwłaszcza do analizy jakościowej podczas np. koelucji kilku nukleozydów. Sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS) pozwala na kompleksową analizę złożonej matrycy biologicznej [29]. Ten sposób detekcji zapewnia uzyskanie informacji na temat mas cząsteczkowych poszczególnych składników, co nie jest możliwe przy użyciu detekcji UV. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja kolejnych modyfikacji nukleozydów [29].

Metody te cechuje dobra rozdzielczość względem analizowanych związków, która jest jednak niższa w porównaniu do wyników uzyskiwanych przy użyciu ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).

Zhao i in. [30] oznaczyli nukleozydy za pomocą HPLC oraz UHPLC w układzie faz odwróconych. Jako detekcję stosowano spektrometrię mas. Analizy prowadzono w takich samych warunkach (poza kolumną chromatograficzną), co umożliwiło porównanie obu metod. W rezultacie zastosowanie UHPLC doprowadziło do rozdzielania 92 nukleozydów, w przeciwieństwie do 70 związków rozdzielonych za pomocą konwencjonalnej chromatografii cieczowej. UHPLC umożliwiła wykrycie 11000 związków, zaś HPLC – tylko 8000. Stosowanie pierwszej z technik w analizie zmodyfikowanych nukleozydów cechuje wyższa sprawność, czułość oraz trzykrotnie krótszy czas analizy [30].

UHPLC MS stosowano także w analizie 8-oksoguanozyny i 8-okso-2'-deoksyguanozyny w próbkach moczu [31]. Związki te odgrywają kluczową rolę w oksydacyjnych uszkodzeniach DNA. Zastosowanie UHPLC pozwoliło na opracowanie szybkiej i precyzyjnej metody o granicy wykrywalności równej 1 nM. Zastosowanie elucji gradientowej pozwoliło na rozdzielanie i oznaczenie kilkunastu nukleozydów w czasie poniżej 10 minut w układzie faz odwróconych przy zastosowaniu fazy ruchomej, w skład której wchodził bufor fosforanowy [31].

Technika IP RP HPLC również umożliwia badanie próbek pobranych z dolnych dróg moczowych w celu oceny zmian stężenia nukleotydów i nukleozydów [32]. Faza ruchoma w układzie IP RP HPLC wzbogacona jest w odczynnik do tworzenia par jonowych. Mechanizm retencji jest wówczas złożony: odczynnik do tworzenia pary jonowej oddziałuje zarówno ze składnikami badanej próbki (dzięki temu mają one większe powinowactwo do hydrofobowej fazy stacjonarnej), jak również ulega dynamicznej adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej [33]. Anality są wówczas zatrzymywane na dynamicznie zmodyfikowanej powierzchni wypełnienia kolumny.

Guanozyna i adenozyne mają bardzo polarny charakter, przez co są zatrzymywane na powierzchni niepolarnych faz stacjonarnych w niewielkim stopniu lub w ogóle. Z tego względu w skład fazy ruchomej wchodzi bufor o pH ok. 6. Dzięki temu nukleozydy nie posiadają ładunku, co skutkuje zwiększeniem ich retencji. Jednakże dochodzi do niekorzystnego oddziaływania między analizowanymi nukleozydami, a resztkowymi silanolami, co prowadzi do pogorszenia symetrii pików. Dodatek do fazy ruchomej odczynnika tworzącego pary jonowe np. wodorosiarczanu tetrabutylamonowego powoduje redukcję tego efektu. Podczas jednej analizy w układzie IP RP HPLC trwającej 20 minut można rozdzielić, zidentyfikować i oznaczyć stężenia 12 związków (nukleozydów, mono-, di-, i trifosforanów nukleozydów). Udowodniono, że czasy retencji nukleozydów ulegają redukcji po zastosowaniu m.in. trietyloaminy TEA jako dodatku do fazy ruchomej w stosunku do wykorzystywanej wcześniej identycznej fazy ruchomej bez TEA. Spowodowane jest to adsorpcją odczynnika do tworzenia par jonowych na powierzchni fazy stacjonarnej, co zmienia jej właściwości [34].

Zmodyfikowane potranskrypcyjnie nukleozydy są rozdzielane i oznaczane także za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofilowych [35]. Wykorzystywane są kolumny wypełnione polarnymi fazami stacjonarnymi, jak np. polihydroksyetyloaspartamidem. Fazę ruchomą stanowią zazwyczaj mieszaniny octanu lub mrów-



czanu amonu oraz acetonitrylu. Wykorzystanie HILIC pozwala na pełne rozdzielanie mieszanin nukleozydów i ich oznaczenie w próbkach moczu, jednakże metoda ta ma swoje ograniczenia: może być stosowana tylko do oznaczania nukleozydów, które są bardzo dobrze rozpuszczalne w acetonitrylu, a czas niezbędny do rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych jest zazwyczaj dłuższy niż w przypadku RP HPLC [35].

## 2. ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ DO OZNACZANIA NUKLEOTYDÓW

Nukleotydy analizowane są z wykorzystaniem trzech różnych typów chromatografii cieczonej: normalnego układu faz (ang. *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*, NP HPLC), RP HPLC, IEC oraz IP RP HPLC.

Zastosowanie NP-HPLC pozwala na rozdzielanie nukleotydów z wykorzystaniem fazy stacjonarnej m.in. na bazie żelu krzemionkowego. Mogą to być m.in. grupy wodorkowe, cząsteczki kwasu undecylenowego, grupy cyjanopropylowe, aminopropylowe [36, 37]. O uzyskaniu pełnego rozdzielania analizowanych nukleotydów decyduje odpowiedni dobór fazy ruchomej, która odgrywa w tym przypadku zasadnicze znaczenie, zwłaszcza w kwestii odpowiedniego pH i siły jonowej. Wykorzystanie układu NP HPLC umożliwia uzyskanie powtarzalnych wyników, choć czasy analiz są zazwyczaj długie [37].

W przypadku odwróconego układu faz składnikami fazy ruchomej są także bufony o odpowiednim stężeniu i pH. Najpowszechniej stosowanymi wypełnieniami kolumn chromatograficznych są oktadecylowe fazy stacjonarne, choć wykorzystywane są także niekonwencjonalne kolumny [38]. Dzięki właściwie dobranym parametrom fazy ruchomej, nukleotydy tracą swój ładunek elektryczny, wskutek czego oddziałują z niepolarną fazą związaną. Dla monofosforanów nukleotydów uzyskiwane są wyższe wartości współczynników retencji w porównaniu do di- lub trifosforanów. Jest to efekt dominujących oddziaływań hydrofobowych między analitem, a fazą stacjonarną w RP HPLC. Jednocześnie oddziaływanie puryn z powierzchnią wypełnienia kolumny jest bardziej efektywne w porównaniu do pirymidyn [38].

RP HPLC stosowana jest do rozdzielania i oznaczania 5'-monofosforanów nukleozydów w suplementach diety, mleku zmodyfikowanym dla niemowląt, płynie mózgowo-rdzeniowym, ekstraktach z ziół, itp. [14, 17, 39, 40]. Fazę ruchomą stanowi mieszanina acetonitrylu lub metanolu z odpowiednim buforem. W przypadku detekcji UV-Vis stosowany jest zazwyczaj bufor fosforanowy, natomiast sprzężenie RP HPLC z detekcją MS wymaga wykorzystania mrówczanu lub octanu amonu ze względu na ich lotność. Im niższe pH buforu, tym nukleotydy posiadają niższy ładunek, wówczas ich retencja jest mniejsza. Z tego względu warunki analizy są dobierane tak, aby pH mieściło się w granicach 5–6, w którym analizowane związki mają ładunek obojętny i efektywniej oddziałują z niepolarną fazą stacjonarną. Wraz ze wzrastającą siłą jonową soli, wchodzącej w skład fazy ruchomej analizowane związki

są szybciej wymywane z kolumny. Temperatura kolumny ma wpływ zarówno na wartości współczynników retencji, jak i na rozdzielczość: wraz z jej wzrostem obydwa parametry ulegają zmniejszeniu [15, 41]. Stosowanie odwróconego układu faz umożliwia opracowanie metod cechujących się wysoką czułością, rozdzielczością i odtwarzalnością [15, 17, 41]. Obecnie jednak większe znaczenie w oznaczaniu nukleotydów ma chromatografia par jonowych, niż RP HPLC.

Dzięki zastosowaniu IP RP HPLC osiągnię są niższe wartości współczynników retencji i wyższa rozdzielczość mieszanin nukleotydów w porównaniu do RP HPLC. Użycie jonów magnezu jako przeciwjonów w fazie ruchomej umożliwia rozdzielenie piętnastu nukleotydów w ekstraktach z linii komórkowych [42]. Możliwa jest także separacja nukleotydów oraz kompleksów nukleotyd – cukier w czasie trwania jednej analizy, z zachowaniem wysokiej czułości i odtwarzalności w analogicznej matrycy [43].

Wykorzystanie sprzężenia IP RP HPLC z detekcją MS pozwala na czułą analizę nukleotydów, przy czym należy stosować lotne odczynniki do tworzenia par jonowych, np. di- lub trialkiloaminy [44]. Dzięki IP RP HPLC można analizować nukleotydy z dobrą selektywnością, rozdzielczością i sprawnością. Zaletą tej metody, w porównaniu do odwróconego układu faz, jest możliwość łatwego rozdzielenia nukleotydów z wykorzystaniem hydrofobowych faz stacjonarnych [45]. Technika ta jest często stosowana do oznaczania nukleotydów w produktach nabiałowych [46], dietetycznych [47], alkoholach [48], krwi, komórkach ziarnistych mózdzku [49], a także w komórkach białaczkowych [50].

W analizie omawianej grupy związków wykorzystywana jest także chromatografia jonowymienna, ze względu na ładunek obecny w strukturze tych związków. Rozdzielane i oznaczane są zarówno rybonukleotydy, jak i deoksyrybonukleotydy. Wykorzystanie odpowiednich kolumn anionowymiennych umożliwia separację wspomnianych związków w czasie krótszym niż 20 minut [51]. Eluentami są zazwyczaj sole nieorganiczne, jak np. mieszanina wodorotlenku sodu z fosforanem sodu, fosforan potasu, chloran (VII) sodu oraz mieszaniny wodorotlenku sodu z octanem sodu, itp. Zmiana udziału procentowego poszczególnych składników fazy ruchomej, stężenia soli lub jej pH, wpływa na jonizację i retencję nukleotydów. Przykładem zmian selektywności pod wpływem zmian dokonywanych w pH fazy ruchomej jest stosowanie buforu fosforanowego (pH=2,8), w przypadku którego dwa monofosforany spośród czterech analizowanych nukleotydów (CMP, AMP, UMP, GMP) występują w formie sprotonowanej. Z tego względu ich współczynniki retencji są mniejsze, a rozdzielenie 4 składników próbki jest pełne [51].

Rozdzielenie nukleotydów prowadzi się przy użyciu polimerowych faz stacjonarnych, zmodyfikowanych grupami anionowymiennymi (drugo- lub trzeciorzędowe aminy) lub też wypełnień spreparowanych na bazie żelu krzemionkowego [51, 52]. Do głównych zalet IC należą: szeroki zakres stosowalności, selektywność, powtarzalność (<2%), jednakże zasadniczą wadą jest ograniczona możliwość wykorzystania detekcji MS [51, 52].

### 3. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA OLIGONUKLEOTYDÓW SYNTETYCZNYCH

Ze względu na terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów, a zwłaszcza ich zmodyfikowanych pochodnych niezbędne są metody ich oznaczania. W tym celu wykorzystywana jest chromatografia cieczowa: w układzie faz odwróconych, jonowymienna, par jonowych oraz oddziaływań hydrofilowych.

IEC jest odpowiednią techniką do analizy wielokrotnie zjonizowanych oligonukleotydów, a w szczególności do ich oczyszczania oraz badań nad modyfikacjami i kinetyką. W ten sposób uzyskuje się rozdzielanie na podstawie różnic w długościach badanych związków, co związane jest z liczbą naładowanych grup fosforanowych [7]. W przypadku analizy oligonukleotydów za pomocą chromatografii jonowej mechanizm retencji opiera się na wymianie anionów. Typowy skład faz ruchomych stosowanych w analizie oligonukleotydów zawiera chlorek i nadchloran sodu w buforze Tris lub bufor fosforanowy o pH oraz sile elucji zależnej od rodzaju badanej próbki i fazy stacjonarnej [2]. Zdolność wymiany jonowej w oddzielaniu oligonukleotydów od innych polarnych cząstek, wchodzących w skład analizowanych próbek (np. pochodzenia biologicznego), oraz wysoka tolerancja dla soli, powoduje że IEC pełni ważną rolę w badaniach nad modyfikacjami, oczyszczaniem i badaniem kinetyki oligonukleotydów [2].

Najczęściej wykorzystywane fazy stacjonarne syntezowane są na bazie nośników polimerowych. Synteza tego typu wypełnień polega głównie na rodnikowej kopolimeryzacji metakrylanu glicydyli i dimetakrylanu etylenu lub diwinylobenzenu. Grupy epoksydowe modyfikowane są dietyloaminą [53]. Wypełnienia te są z powodzeniem stosowane do rozdzielania mieszanin homooligonukleotydów o różnej ilości nukleotydów w sekwencji. Cechuje je wysoka stabilność, a także uzyskiwanie czasów analiz w zakresie od 10–20 minut dla 15-sto składnikowych mieszanin [53].

Wykorzystanie silnych anionowymieniaczy w analizie oligonukleotydów daje możliwość kontroli ich struktury drugorzędowej [54]. Wypełnienia na bazie metakrylanu w znacznym stopniu wpływają na zminimalizowanie oddziaływań hydrofobowych oligonukleotydu z powierzchnią fazy stacjonarnej. Retencja tej grupy związków zależy jednak także od pH i składu fazy ruchomej. Wykazano, że wzrost wartości pH eluentu powoduje wzrost wartości współczynników retencji, zwłaszcza w zakresie pH od 9 do 11. Dochodzi wówczas do jonizacji tautomerycznego atomu tlenu w strukturze guaniny i tymidyny [55].

Użyteczną alternatywę dla chromatografii jonowymiennej stanowi IP RP HPLC. W tym przypadku różnice w wartościach współczynników retencji oligonukleotydów są konsekwencją różnej sekwencji, tzn. różnego udziału zasad azotowych w poszczególnych związkach. Jest to związane z odmienną hydrofobowością puryn i pirymidyn. Utrata adeniny lub tyminy, związków bardziej hydrofobowych, skutkuje niższymi wartościami współczynnika retencji, niż utrata cytozyny lub guaniny [56]. W analizie oligonukleotydów stosowane są głównie następujące czynniki do

tworzenia par jonowych: octan trietyloaminy (TEAA), octan heksyloaminy (HAA), octan diizopropylaminy, 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanol (HFIP) w mieszaninie z trietyloaminą, dimetylobutyloamina czy też heksyloamina, a także inne lotne aminy [2]. Dużą rolę przy doborze warunków do procesu rozdzielania, pełni rodzaj i stężenie odczynnika do tworzenia par jonowych. Im wyższe stężenie, tym wyższa retencja. Stężenie to powinno być jednocześnie na tyle niskie, aby odczynnik ten nie tłumił sygnałów z MS. Najczęściej stosowaną fazą stacjonarną jest wypełnienie na bazie żelu krzemionkowego modyfikowane grupami oktadecylowymi oraz kopolimery styrenu i diwinylobenzenu (w postaci cienkiego filmu lub monolitów) [2]. Sorbent wykorzystywany do syntezy fazy stacjonarnej powinien być nieporowaty, powierzchniowo porowaty lub o małej średnicy ziaren. Jest to związane z wolną dyfuzją wielkocząsteczkowych oligonukleotydów do wnętrza porów, która przyczynia się do poszerzenia pików [57].

W pierwszych próbach rozdzielania kwasów nukleinowych i ich pochodnych wykorzystywano dodatek TEAA [2]. Wyniki tych analiz wykazywały dobrą efektywność procesu rozdzielania, pomimo wysokiego stężenia TEAA sięgającego 100 mM. Najpopularniejszą obecnie fazą ruchomą stosowaną w rozdzielaniu oligonukleotydów za pomocą IP RP HPLC są mieszaniny HFIP z lotnymi aminami i metanolem [2]. Dodatek HFIP powoduje obniżenie rozpuszczalności amin w fazie ruchomej, co w konsekwencji zwiększa efektywność ich adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej [2]. Tym samym retencja oligonukleotydów jest wyższa w porównaniu do faz ruchomych, w skład których wchodzi octany amin [2].

Badano wpływ różnych odczynników do tworzenia par jonowych na retencję oligonukleotydów [58]. Wykazano, że octany amin (np. octan heksyloaminy) powodują uzyskanie wyższej rozdzielczości mieszanin hetero- i homooligonukleotydów w porównaniu do mieszanin HFIP i odpowiednich amin. Przeciwny efekt obserwowany jest w kontekście czułości oznaczeń za pomocą IP RP HPLC MS. W tym wypadku fazy ruchome, w skład których wchodzi HFIP umożliwiają uzyskanie niższych wartości granic wykrywalności i oznaczalności [58].

Liu i in. [59] zastosowali IP RP HPLC sprzężoną z MS w analizie zanieczyszczeń syntetycznego 13-merowego oligonukleotydu tiofosforanowego, którego końce 3' i 5' zostały zmodyfikowane grupami lipofilowymi. Testowano wpływ typu wypełnienia kolumny chromatograficznej (butylowe, oktylowe, oktadecylowe), odczynników do tworzenia par jonowych (TEAA, HFIP/TEA, octan dietyloaminy) i temperatury na retencję oligonukleotydów. Najwyższą sprawność rozdzielania uzyskano w przypadku fazy stacjonarnej modyfikowanej grupami butylowymi, co miało związek z modyfikacją oligonukleotydów grupami hydrofobowymi. Zastosowanie mieszaniny TEA/HFIP pozwoliło na uzyskanie pełnego rozdzielania oligonukleotydów od jego zanieczyszczeń. Metoda ta okazała się skuteczniejszą techniką analizy oligonukleotydów i ich zanieczyszczeń niż chromatografia jonowymienna [59].

W analizie oligonukleotydów coraz popularniejszą techniką staje się UHPLC, przy czym badania wykonywane są w trybie IP RP UHPLC [60]. Metoda ta była stosowana m.in. do analizy 20-merowego 2'-O-metylo-fosforotioianu, który zawierał

3% zanieczyszczeń. Uzyskano skrócenie czasu do 6 minut (20 minut dla HPLC) oraz zmniejszenie zużycia rozpuszczalników ze względu na różnice w prędkości przepływu (z 0,75 ml/min do 0,2 ml/min). Jednocześnie tylko dla UHPLC możliwe było pełne oddzielenie związku macierzystego od jego zanieczyszczeń [60].

Polarny charakter oligonukleotydów umożliwia ich analizę za pomocą układu HILIC. Alpert i in. [61] jako pierwszy wykorzystał ten układ faz w badaniu fragmentów kwasów nukleinowych. Podjął próbę rozdzielania mieszaniny oligomerów tymidynowych o różnej długości sekwencji. Fazą stacjonarną był żel krzemionkowy modyfikowany poli(2-hydroksyetyloaspartamidem), podczas gdy fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i fosforanu trietyloaminy. Retencja oligonukleotydów zwiększała się wraz z rosnącą ilością nukleotydów w sekwencji, przy czym dla homooligonukleotydów adeninowych uzyskiwano trzykrotnie wyższe wartości współczynnika retencji niż dla homooligonukleotydów tymidynowych, co jest związane z różnicami polarności. Wykazano także, że retencja w przypadku HILIC jest zależna od siły jonowej stosowanego eluentu [61].

Z tego względu testowano wpływ rodzaju buforu wchodzącego w skład fazy ruchomej na wyniki analiz oligonukleotydów w układzie HILIC. Wyniki prowadzonych badań dowiodły, że użycie roztworów soli poprawia rozdzielanie tych związków, dzięki zwiększeniu symetrii pików [62]. Porównano trzy lotne bufony stosowane w badaniu oligonukleotydów za pomocą układu HILIC i detekcji MS. Były to 100 mM mrówczan amonu (pH 3,5), 100 mM octan amonu (pH 5,8) oraz 100 mM wodorowęglan amonu (pH 7,6). Zastosowanie octanu amonu pozwoliło na uzyskanie symetrycznych pików w porównaniu z wodorowęglanem amonu. Wykorzystanie faz ruchomych, w skład których wchodził mrówczan amonu prowadziło z kolei do uzyskiwania dużych wartości współczynników retencji w przeciwieństwie do pozostałych dwóch soli. Mimo to, najlepsze wyniki rozdzieleń mieszanin oligonukleotydów uzyskiwano w przypadku octanu amonu o stężeniu 10 mM [62].

Dokonywano także prób rozdzielania heterooligonukleotydów oraz ich zanieczyszczeń, różniących się typem zasady azotowej w danej pozycji sekwencji. Zastosowanie układu HILIC pozwoliło na rozdzielanie związku bazowego od oligonukleotydu z dodatkową zasadą: C lub G na końcu 3'. Nie uzyskano natomiast rozdzielania oligonukleotydów, w których sekwencji w miejsce końcowych nukleotydów C lub G wprowadzone zostały mniej hydrofilowe A lub T. Prawdopodobnie można tego dokonać przez zwiększenie temperatury kolumny, co wykazał Oefner. Wykazano, iż oligonukleotydy zawierające zróżnicowany udział procentowy A, T, C i G w sekwencji z różną siłą oddziałującą z powierzchnią polarnych faz stacjonarnych, ze względu na różnice hydrofilowości zasad azotowych [62].

Easter i in. [63] jako pierwsi zastosowali HILIC sprzężoną ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) w analizie homooligonukleotydów. Jako fazy ruchome testowano ponownie mieszaniny acetonitrylu z mrówczanem lub octanem amonu lub propionianem sodu. Zastosowanie mrówczanu amonu nie umożliwiło uzy-

skania pełnego rozdzielania związków, natomiast dla pozostałych dwóch buforów były one porównywalne. Do badań wykorzystano ponownie roztwór octanu amonu o pH 5,8. Analiza oligonukleotydów za pomocą ICP-MS umożliwia czułą detekcję fosforu obecnego w wiązaniach fosfodiesterowych oligonukleotydów. Z tego względu wraz ze wzrostem ilości nukleotydów, budujących dany oligonukleotyd wartości granic oznaczalności malały. Granice wykrywalności odpowiadały natomiast kilku nanogramom w próbce [63].

Poza jonizacją w plazmie wykorzystywana jest także jonizacja za pomocą elektrozpraszania, którą także zastosowano w analizie oligonukleotydów tiofosforanowych w układzie HILIC. Testowano dwie komercyjnie dostępne kolumny na bazie żel krzemionkowy, których powierzchnia pokryta była grupami amidowymi lub diolowymi. Analizy prowadzono z wykorzystaniem fazy ruchomej w skład której wchodził acetonitryl oraz octan amonu. Metoda pozwoliła na rozdzielanie badanych związków, a także na ich czułą analizę (50 nM). Obserwowano jednak tworzenie się adduktów sodowych i z tego względu stosowano tryb monitorowania wybranych jonów. Sprzężenie HILIC-MS znajduje zastosowanie do zweryfikowania obecności tych związków w małej ilości próbki z dużą czułością [64].

Możliwości analityczne układu HILIC i IP RP HPLC w analizie oligonukleotydów wykorzystał w swoich badaniach Li i współpracownicy [65]. Zastosowali oni dwuwymiarową chromatografię cieczową, przy czym w pierwszym wymiarze wykorzystano HILIC, a w drugim IP RP HPLC. Badano wpływ modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, pH, siły jonowej na retencję 27 homooligonukleotydów o sekwencji zbudowanej z od 2 do 10 nukleotydów. W wyniku analizy udało się rozdzielić wszystkie składniki próbek z selektywnością wyższą niż w przypadku stosowania tylko jednego z tych układów chromatografii cieczowej [65].

Analiza oligonukleotydów ma szczególne znaczenie, jeśli analizowane są związki zmodyfikowane. Modyfikacje te dokonywane są zarówno w obrębie grupy fosforanowej, cząsteczek cukrów lub samych zasad pirymidynowych lub purynowych. Zmiany strukturalne syntetycznych oligonukleotydów mają na celu zwiększenie ich hydrofobowości i odporności na działanie enzymów. Z tego powodu znajdują one zastosowanie w terapii genowej lub antysensownej. Testowanie tego typu związków jako potencjalnych leków niesie ze sobą konieczność badania m.in. produktów ich metabolizmu.

Rozdzielenie chemicznie zmodyfikowanych oligonukleotydów od ich metabolitów, w warunkach *in vitro*, możliwe jest dzięki zastosowaniu IP RP HPLC sprzężonego z detekcją MS. Przeprowadzono m.in. inkubację 21-nukleotydowego oligonukleotydu w roztworze 3'-egzonukleazy, po czym rozdzielano i oznaczano jakościowo i ilościowo uzyskane metabolity. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 400 mM HFIP/16,3 mM TEA o pH = 7,9 oraz metanolu. Fazę stacjonarną był żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C18) [57]. Udowodniono, iż detekcja UV jest bardziej czuła i odpowiednia do ilościowej analizy metabolitów o krótszych sekwencjach, w przeciwieństwie do oligonukleotydów zbudowanych

z wielu monomerów nukleotydowych. W przypadku tych cząsteczek wyższą czułość uzyskiwano dla detekcji MS. Jest to konsekwencja wpływu czynnika do tworzenia par jonowych oraz jego stężenia na proces jonizacji [57].

Wykorzystanie IP RP HPLC oraz tandemowej spektrometrii mas (ang. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) z jonizacją przez elektrorozpraszanie umożliwiło identyfikację metabolitów syntetycznych, zmodyfikowanych oligonukleotydów w warunkach *in vivo* [66]. Fazę ruchomą stanowił HFIP o stężeniu 400 mM i taka ilość TEA, aby pH wyniosło 7,0. Analizę jakościową przeprowadzono za pomocą MS/MS. Jony macierzyste wybrano na podstawie intensywności sygnałów, natomiast spośród 13 jonów fragmentacyjnych, 8 przypisano do końca 3', a 5 do końca 5' oligonukleotydu. Potwierdziło to udział 5'-endonukleazy w procesie biotransformacji, chociaż jej aktywność jest mniejsza niż egzonukleazy [66].

Dai i in. [67] wykorzystali IP RP HPLC MS/MS do analiz osocza osób, którym podawano lek na bazie oligonukleotydu G3139. Jako fazę ruchomą wykorzystano standardowo mieszaninę HFIP/TEA oraz metanolu, a fazę stacjonarną było konwencjonalne wypełnienie oktadecylowe. Metabolit M1 powstał w wyniku usunięcia nukleotydu tymidynowego, który znajduje się zarówno na końcu 3', jak i 5' sekwencji oligonukleotydu. Wykorzystanie MS/MS pozwoliło na potwierdzenie, że hydroliza wiązania fosfodiesterowego zaszła od końca 3'. Informacje na temat zasad, z których zbudowane są poszczególne metabolity, uzyskano na podstawie mas cząsteczkowych, które wyznaczono po zastosowaniu dekonwolucji. Charakterystyka metabolitów była możliwa, dzięki bardzo dokładnym pomiarom ( $\pm 0,009\%$ ) masy cząsteczkowej [67].

W trakcie badań nad metabolizmem (*in vitro* i *in vivo*) oligonukleotydów zmodyfikowanych wykorzystano szereg próbek biologicznych, w tym roztwory egzonukleaz, osocze, mocz, homogenat mysiej wątroby/nerki oraz mikrosomy wyekstrahowane z ludzkiej wątroby [56, 67]. Analizy chromatograficzne próbek z powodzeniem prowadzono z wykorzystaniem IP RP HPLC MS/MS oraz wcześniej stosowanymi fazami ruchomymi i stacjonarnymi. We wszystkich wymienionych matrycach wykryto związki krótsze o N-nukleotydów poczynając od końca 3' sekwencji. Uzyskane wyniki dowodzą, iż rozkład enzymatyczny w obu matrycach zachodzi według takiego samego schematu. Świadczy to m.in. o tym, że mikrosomy, wykazujące aktywność enzymatyczną, mogą być użyteczne w badaniu metabolizmu oligonukleotydów antysensownych, w odniesieniu do organizmu człowieka [56, 67].

#### 4. NOWE KIERUNKI BADAŃ CHROMATOGRAFICZYCH ZWIĄZKÓW BUDUJĄCYCH KWASY NUKLEINOWE

Możliwość monitorowania zmian chorobowych, zachodzących w organizmie poprzez oznaczenie nukleozydów, jak również terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów powoduje, iż niezbędne staje się ich oznaczanie w różnego typu matrycach. Prowadzi to do poszukiwania nowych metod analizy lub udoskonalania metod

już istniejących. Zastosowanie chromatografii cieczowej umożliwia dobór warunków analiz w szerokim zakresie różnego typu parametrów, takich jak np. faza stacjonarna, czy ruchoma. Nukleozydy, nukleotydy oraz oligonukleotydy analizowane są jednak głównie z wykorzystaniem oktadecylowego wypełnienia kolumny chromatograficznej. W wielu przypadkach nie umożliwia ono uzyskania wystarczającego rozdzielania wszystkich związków w mieszaninie lub też krótkiego czasu analizy. To wypełnienie kolumny chromatograficznej zazwyczaj nie jest odpowiednie do analiz małych, polarnych cząsteczek (nukleozydy lub niektóre nukleotydy), ponieważ są one często wymywane blisko objętości martwej układu. Stosowanym dotychczas rozwiązaniem jest wykorzystanie kolumn o długości 250 mm, co prowadzi jednak do długiego czasu analizy. Długie czasy analiz uzyskiwane są także w przypadku chromatograficznego rozdzielania mieszanin oligonukleotydów, zwłaszcza w przypadku związków o niewielkich różnicach w sekwencji (np. zamiana jednej zasady w danej pozycji sekwencji).

Istnieją zatem problemy w analizie chromatograficznej związków budujących kwasy nukleinowe, spowodowane przez niekorzystne oddziaływania analitów z najpopularniejszymi fazami stacjonarnymi. Z tego względu jednym z nowych kierunków badań nad nukleozydami, nukleotydami i oligonukleotydami jest próba wykorzystania innego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane do powierzchni nośnika, grupy funkcyjne. U podstaw tych badań leży koncepcja udoskonalenia istniejących już rozwiązań analitycznych, które umożliwią uzyskanie lepszych wyników w stosunku do prezentowanych dotychczas w literaturze.

W ciągu ostatnich 5 lat prowadzono badania nad wykorzystywaniem różnego typu wypełnień kolumn chromatograficznych, w przypadku których do nośnika krzemionkowego związane na drodze chemicznej modyfikacji różne grupy funkcyjne. Były to fazy stacjonarne aminopropylowe, alkiloamidowe, cholesterolowe, N,O-dialkylfosforoamidowe, fenylowe, pentafluorofenylowe czy też wypełnienia o strukturze dendrymerycznej, zawierające centra anionowymienne [68–71]. Ich schematyczne struktury zostały przedstawione na Rysunku 2. Kolumny tego typu nie były nigdy wcześniej wykorzystywane w analizie tych biocząsteczek. Prowadzono systematyczne badania, mające na celu dobór warunków analiz chromatograficznych do rozdzielania nukleotydów, nukleotydów i oligonukleotydów. W tym celu dokonywano zmian w obrębie fazy ruchomej: typu rozpuszczalnika organicznego, buforu, jego stężenia i pH. Stosowano odwrócony układ faz, chromatografię oddziaływań hydrofilowych, par jonowych oraz chromatografię jonową. Warto podkreślić jest wykazanie, iż odczyn buforu wchodzącego w skład fazy ruchomej jest w przypadku niekonwencjonalnych faz stacjonarnych istotnym parametrem, umożliwiającym sterowanie rozdzielczością, co jest niezwykle ważne w rutynowych analizach chromatograficznych związków budujących kwasy nukleinowe [68–71].

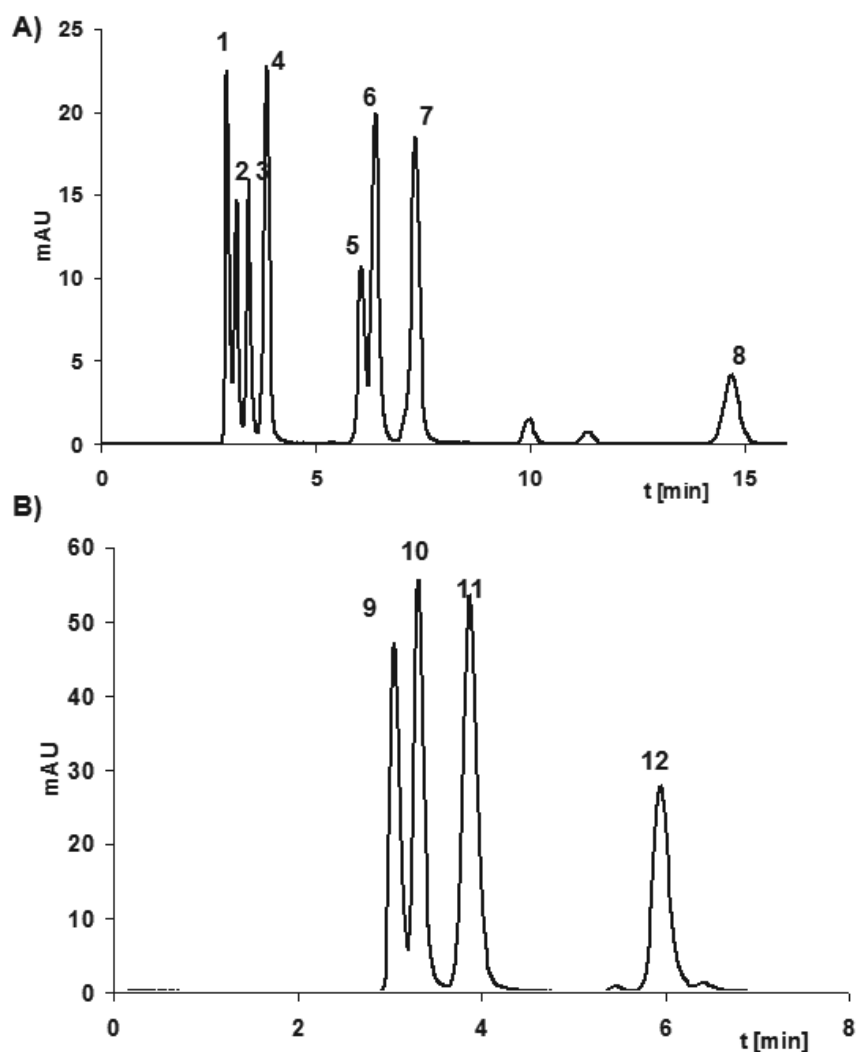




Rysunek 2. Schematyczne struktury faz stacjonarnych, stosowanych w analizie nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów

Figure 2. Schematic structures of stationary phases applied in the analysis of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides

Wykorzystanie alkiloamidowej fazy stacjonarnej umożliwiło rozdzielanie polarnych, małowcząsteczkowych nukleozydów (cytozyna, urydyna), co nie było możliwe w przypadku wypełnienia oktadecylowego [69]. Jednocześnie czas analizy był krótszy. Natomiast zastosowanie cholesterolowej fazy stacjonarnej pozwala na uzyskanie analogicznych czasów retencji, jak w przypadku kolumny z wypełnieniem oktadecylowym. Selektywność tego wypełnienia kolumny była wyższa dla najbardziej polarnych nukleozydów i nukleotydów (cytozyna, urydyna, urydino-5'-monofosforan, cytydino-5'-monofosforan) w porównaniu do konwencjonalnej kolumny oktadecylowej (Rys. 3) [68]. Zastosowanie fenyłowego wypełnienia kolumny chromatograficznej prowadziło do uzyskania krótszych czasów analiz w stosunku do oktadecylowej fazy stacjonarnej, jednakże rozdzielanie niepolarnych, małowcząsteczkowych składowych kwasów nukleinowych nie było możliwe [70]. Analogiczne tendencje zaobserwowano podczas prób rozdzielania mieszanin oligonukleotydów, w przypadku których czasy analiz były krótsze dla alkiloamidowej i cholesterolowej fazy stacjonarnej. Ich wykorzystanie umożliwiło rozdzielanie oligonukleotydów z dobrą selektywnością w warunkach elucji izokratycznej. W ten sposób wykazano, że stosowanie tych typów wypełnień kolumn chromatograficznych jest dobrą alternatywą w chromatograficznej analizie związków budujących kwasy nukleinowe w stosunku do powszechnie stosowanej oktadecylowej [68–70]. Poza hydrofobowo-hydrofilowymi fazami stacjonarnymi, stosowano także po raz pierwszy wypełnienia dendrymeryczne do chromatografii jonowej. Uzyskano wzrost selektywności i sprawności rozdzielania oraz krótsze czasy rozdzielania nukleotydów w stosunku do danych prezentowanych w literaturze [71].

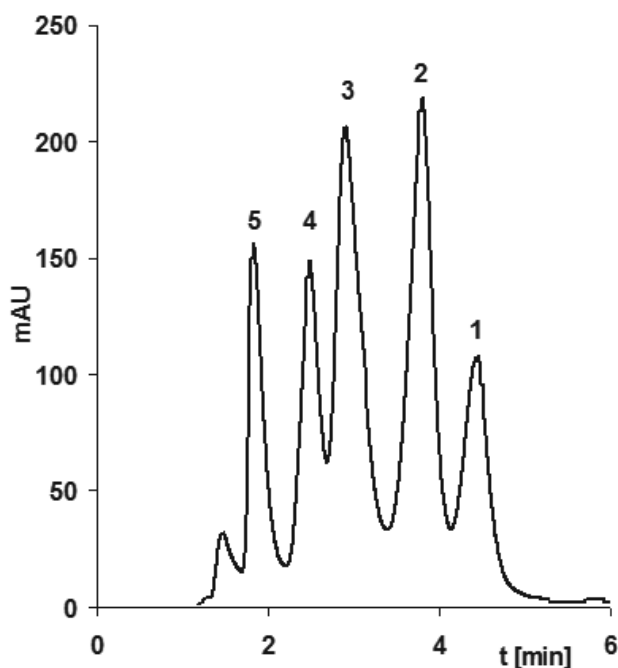


Rysunek 3. Chromatogramy rozdzielania nukleozydów i nukleotydów z wykorzystaniem cholesterolowej fazy stacjonarnej: A) mieszanina nukleozydów, skład fazy ruchomej: 30 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 6,5 oraz metanol, elucja gradientowa: 0–3 min 5% v/v MeOH, 3–15 min – 50% v/v MeOH, prędkość przepływu fazy ruchomej: 0,5 mL  $min^{-1}$ ; B) mieszanina monofosforanów nukleotydów, skład fazy ruchomej: 5% v/v MeOH oraz 95% v/v 30 mM  $CH_3COONH_4$  pH 5. Oznaczenie: 1 – cytydyna, 2 – urydyna, 3 – guanozyna, 4 – tymidyna, 5 – 1-metyloguanozyna G, 6 – 1-metyloinozyna, 7 – adenzyna, 8 – 1-metyloadenzyna, 9 – cytydino-5'-monofosforan, 10 – urydino-5'-monofosforan, 11 – guanozino-5'-monofosforan, 12 – adenzyno-5'-monofosforan

Figure 3. Chromatograms of separation of nucleosides and nucleotides with the use of cholesterol-based stationary phase: A) mixture of nucleosides, mobile phase composition: 30 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 6.5 and methanol, gradient elution: 0–3 min 5% v/v MeOH, 3–15 min – 50% v/v MeOH, flow rate: 0.5 mL  $min^{-1}$ ; B) mixture of nucleotides, mobile phase composition: 5% v/v MeOH and 95% v/v 30 mM  $CH_3COONH_4$  pH 5. Notation: 1 – cytidine, 2 – uridine, 3 – guanosine, 4 – thymidine, 5 – 1-methylguanosine, 6 – 1-methylinosine, 7 – adenosine, 8 – 1-methyladenosine, 9 – cytidine 5'-monophosphate, 10 – uridine 5'-monophosphate, 11 – guanosine 5'-monophosphate, 12 – adenosine 5'-monophosphate

Innym trendem analitycznym w chromatograficznym badaniu nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów jest wykorzystanie UHPLC [72, 73]. W literaturze istnieje jednak tylko kilka przykładów wykorzystania tej techniki w rozdzielaniu i oznaczaniu związków budujących kwasy nukleinowe. Z tego względu podjęto próbą zastosowania różnych średnic cząstek (1,3–2,0  $\mu\text{m}$ ) komercyjnych faz stacjonarnych (oktylowa, oktedecylowa, fenylova, pentafluorofenylova, niezmodyfikowany żel krzemionkowy) w analizie potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów. W przypadku pierwszej grupy związków wykazano, że duża sprawność układów UHPLC umożliwiła analizę polarnych nukleozydów bez konieczności stosowania buforów w fazie ruchomej przy zachowaniu symetrycznych kształtów pików [73]. Chromatograficzna analiza tych cząsteczek wymagała stosowania buforów o różnych stężeniach, co było przyczyną ograniczonych możliwości zastosowań różnorodnych detektorów, zwłaszcza spektrometrów mas. Uzyskano całkowite rozdzielanie mieszaniny dziesięciu potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w czasie jedynie 4 minut. Podobne wyniki w zakresie skrócenia czasu rozdzielania uzyskano także w przypadku oligonukleotydów [72]. Testowano możliwości rozdzielcze UHPLC dla mieszanin oligonukleotydów i ich syntetycznych metabolitów oraz mieszanin oligonukleotydów będących swoimi izomerami sekwencyjnymi. W każdym z opisanych przypadków otrzymano pełną separację biocząsteczek w czasie krótszym niż 10 minut z zastosowaniem fenylowej oraz pentafluorofenylowej fazy stacjonarnej [72, 74]. Wykorzystanie wypełnienia oktadecylowego o małej średnicy cząstek fazy stacjonarnej pozwoliło natomiast na rozdzielanie w krótkim czasie oligonukleotydów antysensownych od ich metabolitów, czego przykład przedstawiono na Rysunku 4.

Metody oznaczania nukleozydów z wykorzystaniem cholesterolowej fazy stacjonarnej lub techniki UHPLC zostały z powodzeniem zastosowane do rozdzielania i oznaczenia ilościowego w próbkach moczu i osocza. UHPLC wykorzystano także do oznaczania zmodyfikowanych oligonukleotydów i ich metabolitów w osoczu. Natomiast metody opracowane z wykorzystaniem hydrofobowo-hydrofilowych oraz dendrymerycznych faz stacjonarnych zastosowane zostały do rozdzielania nukleotydów i oznaczania poziomu ich stężenia w zmodyfikowanym mleku dla niemowląt. Opracowane metody cechuje liniowość w szerokim zakresie stężeń, wysoka dokładność i precyzja. Mogą one być z powodzeniem stosowane w rutynowych analizach nukleozydów i oligonukleotydów, jak i ich zmodyfikowanych pochodnych w próbkach biologicznych [68–74].



**Rysunek 4**

Rysunek 4. Chromatogram rozdzielania oligonukleotydu tiofosforanowego oraz jego syntetycznych metabolitów za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Warunki analiz: kolumna chromatograficzna Kinetex C18 1,7  $\mu\text{m}$  (100  $\times$  2,1 mm); skład fazy ruchomej: 5 mM DMBA/150 mM HFIP oraz MeOH, elucja gradientowa: 24–27% v/v MeOH w 10 minut; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detekcja UV-Vis dla  $\lambda = 260$  nm. Oznaczenie: 1 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'; 2 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTC-3'; 3 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTT-3'; 4 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTT-3'; 5 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAG-3'

Figure 4. Chromatogram of separation of phosphorothioate oligonucleotide and its metabolites with the use of ultra high performance liquid chromatography. Experimental conditions: chromatographic column Kinetex C18 1.7  $\mu\text{m}$  (100  $\times$  2.1 mm); mobile phase composition 5 mM DMBA/150 mM HFIP and methanol, gradient elution: 24–27% v/v of methanol in 10 min.; flow rate 0.3 mL min<sup>-1</sup>; UV-Vis detection for  $\lambda = 260$  nm. Notation: 1 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'; 2 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTC-3'; 3 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTT-3'; 4 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTT-3'; 5 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAG-3'

## PODSUMOWANIE

Poznanie właściwości, roli i struktury kwasów nukleinowych umożliwiło udzielenie odpowiedzi na pytania dotyczące wzrostu, rozwoju organizmu, dziedziczenia cech, ale także procesów chorobowych. Obecnie kwasy nukleinowe jak i związki je budujące stanowią narzędzia, którymi posługuje się biologia molekularna w medycynie i biotechnologii. Określenie mechanizmów powstawania chorób mających podłoże genetyczne pozwala na zaprojektowanie leków, które będą zapobiegać rozwojowi schorzenia. Terapia genowa i antysensowa są intensywnie rozwijającymi się

obecnie kierunkami badań. Wykorzystują one krótkie fragmenty DNA lub RNA, czyli oligonukleotydy w celu wyciszenia ekspresji genów powodujących choroby. Te składowe kwasów nukleinowych nie są jedynymi, które pozwalają chemikom analitykom na uzyskanie informacji o stanie naszego organizmu. Oznaczenie zmodyfikowanych nukleozydów umożliwi wykrycie choroby nowotworowej, a analiza nukleotydów pozwala na oszacowanie wzmacniania układu odpornościowego.

W każdym z tych trzech przypadków konieczne są czułe, selektywne i precyzyjne metody rozdzielania nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów oraz ich analizy jakościowej i ilościowej. Wymagania te spełniają techniki chromatograficzne, a zwłaszcza chromatografia cieczowa, która jest najpowszechniej stosowana w analizie związków budujących kwasy nukleinowe. Do najpowszechniej wykorzystywanych typów tej techniki zalicza się IEC i RP HPLC. Obie techniki w analizie trzech omawianych grup związków mają swoje zalety i wady. W przypadku IEC konieczne jest stosowanie wysokich stężeń lub gradientów stężeń soli w fazie ruchomej, co znacząco ogranicza możliwość wykorzystania detekcji MS. Technika ta umożliwia jednak uzyskanie zadowalającej rozdzielczości i selektywności w analizie nukleotydów i oligonukleotydów. RP HPLC można sprzęgać z detekcją MS pod warunkiem stosowania faz ruchomych, w skład których wchodzi lotne sole (np. mrówczan amonu). Istotnym problemem analiz próbek zawierających związki budujące kwasy nukleinowe jest brak wystarczającej selektywności względem najbardziej polarnych nukleozydów i nukleotydów, które najczęściej nie ulegają rozdzielaniu w przypadku konwencjonalnie stosowanych faz stacjonarnych. Pomimo tego ograniczenia RP HPLC, jest ona najczęściej wykorzystywana w oznaczaniu nukleozydów i nukleotydów ze względu na prostotę sprzężenia z detektorem mas. Jest to niezwykle istotne ze względu zarówno na wysoką czułość, jak i na kompleksową analizę jakościową.

Innym układem chromatografii cieczowej wykorzystywanym zwłaszcza do analiz oligonukleotydów jest IP RP HPLC. Związki te nie mogą być analizowane za pomocą RP HPLC, ze względu na ich dużą polarność. Z powodzeniem są jednak rozdzielane i oznaczane za pomocą IP RP HPLC. Zaletą metody jest duża selektywność przy odpowiednim doborze składu fazy ruchomej oraz możliwość analiz za pomocą MS. Wadą IP RP HPLC w analizie oligonukleotydów jest jednak niższa czułość IP RP HPLC MS w porównaniu do RP HPLC MS. Jest to efekt różnego składu faz ruchomych i tłumienia procesu jonizacji oligonukleotydów w przypadku stosowania soli par jonowych.

W czasie kilku ostatnich lat rośnie ilość prac naukowych prezentujących wyniki prób zastosowania układu HILIC do rozdzielania mieszanin nukleozydów, nukleotydów, oligonukleotydów wyekstrahowanych z próbek biologicznych lub żywności. Prezentowane wyniki dowodzą użyteczności tej metody, jednakże zdolności rozdzielcze HILIC są ograniczone ze względu na asymetryczny kształt pików, będący konsekwencją dużej polarności składowych kwasów nukleinowych. Niemniej odpowiedni dobór składu fazy ruchomej oraz stacjonarnej może doprowadzić do uzyskania dużej selektywności w analizie najbardziej polarnych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów, których nie można rozdzielić RP HPLC.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.
- [2] A.C. McGinnis, B. Chen, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B*, 2012, **883**, 76.
- [3] N. Dias, C.A. Stein, *Mol. Cancer Therap.*, 2002, **1**, 347.
- [4] W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, M. J. Markuszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2039.
- [5] A. Ranogajec, S. Beluhan, Z. Šmit, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 1024.
- [6] A. Contreras-Sanz, T.S. Scott-Ward, H.S. Gill, J.C. Jacoby, R.E. Birch, J. Malone-Lee, K.M.G. Taylor, C.M. Peppiatt-Wildman, S.P. Wildman, *Purinergic Signalling*, 2012, **8**, 741.
- [7] Y. Baba, L. Zhang, *Nucleic acids and their constituents, chromatographic methods*, [w:] *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques*, E. Heftmann (Red.), Elsevier Science, 2004.
- [8] D. Farbis, P.A. Limbach, *J. Am. Soc. Mass.*, 2010, **21**, R1.
- [9] G.M. Blackburn, *Nucleic Acid in Chemistry and Biology*, The Royal Society of Chemistry, Great Britain, 2006.
- [10] D. Bullinger, H. Fröhlich, F. Klaus, H. Neubauer, A. Frickenschmidt, C. Henneges, A. Zell, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, B. Kammerer, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **618**, 29.
- [11] M.J. Markuszewski, W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2300.
- [12] W. Struck-Lewicka, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **101**, 50.
- [13] P. Yeung, L. Ding, W.L. Casley, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **47**, 377.
- [14] C. Bolin, F. Cardozo-Pelaez, *J. Chromatogr. B*, 2007, **856**, 121.
- [15] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, S. Martínez-López, I. Vasallo, M. Hernández-Córdoba, *J. Agricul. Food Chem.*, 2009, **57**, 7245.
- [16] N. Yamaoka, Y. Kudo, K. Inazawa, S. Inagawa, M. Yasuda, K. Mawatari, K. Nakagomi, K. Kaneko, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 2054.
- [17] J. Czarnecka, M. Cieślak, M. Komoszyński, *J. Chromatogr. B*, 2005, **822**, 85.
- [18] A. Gil, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002, **56**, 1.
- [19] J.R. Hess, N.A. Greenberg, *Nutr. Clin. Pract.*, 2012, **27**, 281.
- [20] E. Urban, C.R. Noe, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 243.
- [21] E.W.M. Ng, D.T. Shima, P. Calias, E.T. Cunningham, D.R. Guyer, A.P. Adamis, *Nature Rev. Drug Disc.*, 2006, **5**, 123.
- [22] R.S. Geary, B.F. Baker, S.T. Crooke, *Clin. Pharmacokin.*, 2015, **54**, 133.
- [23] E. Szymańska, M.J. Markuszewski, Y.V. Heyden, R. Kaliszan, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3573.
- [24] S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1502.
- [25] C.W. Gehrke, K.C. Kuo, *J. Chromatogr.*, 1980, **188**, 129.
- [26] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, M. Bacher, H.-G. Scheel-Walter, X. Lu, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, K.-R. Kim, H. Gérard, *J. Chromatogr. B*, 2005, **814**, 275.
- [27] A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G.I. Fritz, O. Herbarth, *Br. J. Cancer*, 2006, **94**, 1726.
- [28] S.-H. Cho, B.H. Jung, S.H. Lee, W.-Y. Lee, G. Kong, *B.Ch. Chung, Biomed. Chromatogr.*, 2006, **20**, 1229.
- [29] N. Takeda, H. Yoshizumi, T. Niwa, *J. Chromatogr. B*, 2000, **746**, 51.
- [30] X. Zhao, W. Wang, J. Wang, J. Yang, G. Xu, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 2444.
- [31] T. Henriksen, P.R. Hillestrom, H. E Poulsen, A. Weimann, *Free Rad. Biol. Med.*, 2009, **47**, 629.
- [32] A. Contreras-Sanz, T.S. Scott-Ward, H.S. Gill, J.C. Jacoby, R.E. Birch, J. Malone-Lee, K.M. G. Taylor, C.M. Peppiatt-Wildman, S.P. Wildman, *Purinergic Signalling*, 2012, **8**, 741.
- [33] T. Cecchi, *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques*, Taylor & Francis Group, 2010.

- [34] T. Uesugi, K. Sano, Y. Uesawa, Y. Ikegami, K. Mohri, *J. Chromatogr. B*, 1997, **703**, 63.
- [35] R. Tuytten, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, E. Dudley, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1263
- [36] J.J. Pesek, M.T. Matyska, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1845.
- [37] J. Pesek, M.T. Matyska, M.T. W. Hearn, R.I. Boysen, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1140.
- [38] J. Kehr, M. Chavko, *Fresenius Anal. Chem.*, 1986, **325**, 466.
- [39] Y. Ren, J. Zhang, X. Song, X. Chen, D. Li, *J. Chromatogr. Sci.*, 2011, **49**, 332.
- [40] C. Perrin, L. Meyer, C. Mujahid, C.J. Blake, *Food Chem.*, 2001, **74**, 245.
- [41] C. Ren, J. Zhang, X. Song, X. Chen, D. Li, *J. Chromatogr. Sci.*, 2011, **49**, 332.
- [42] M. Cichna, M. Raab, H. Daxecker, A. Griesmacher, M.M. Müller, P. Markl, *J. Chromatogr. B*, 2003, **787**, 381.
- [43] N. Kochanowski, F. Blanchard, R. Cacan, F. Chirat, E. Guedon, A. Marc, J.-L. Goergen, *Anal. Biochem.*, 2006, **348**, 243.
- [44] R.M. Seifar, C. Ras, J.C. van Dam, W.M. van Gulik, J.J. Heijnen, W.A. van Winden, *Anal. Biochem.*, 2009, **388**, 213.
- [45] M. Ganzera, P. Vrabl, E. Wörle, W. Burgstaller, H. Stuppner, *Anal. Biochem.*, 2006, **359**, 132.
- [46] I. Ferreira, E. Mendes, A. Gomes, M. Faria, M. Ferreira, *Food Chem.*, 2001, **74**, 239.
- [47] N. Yamaoka, Y. Kudo, K. Inazawa, S. Inagawa, M. Yasuda, K. Mawatari, K. Nakagomi, K. Kaneko, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 2054.
- [48] J. Aussenac, D. Chassagne, C. Claparols, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, C. Charpentier, *J. Chromatogr. A*, 2001, **907**, 155.
- [49] S. Giannattasio, S. Gagliardi, M. Samaja, E. Marra, *Brain Research Protocols*, 2003, **10**, 168.
- [50] V. Reichelova, F. Albertioni, J. Liliemark, *J. Chromatogr. B*, 1996, **682**, 115.
- [51] Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7394.
- [52] N. Tomiya, E. Ailor, S.M. Lawrence, M.J. Betenbaugh, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.*, 2001, **293**, 129.
- [53] D. Šykora, F. Svec, J.M.J. Frechet *J. Chromatogr. A*, 1999, **852**, 297.
- [54] C.P. Bisjak, R. Bakry, Ch.W. Huck, G.K. Bonn, *Chromatogr.*, 2005, **62**, S31.
- [55] J.R. Thayer, V. Barreto, S. Rao, C. Pohl, *Anal. Biochem.*, 2005, **338**, 39.
- [56] X. Wei, G. Dai, Z. Liu, H. Cheng, Z. Xie, G. Marcucci, K. K. Chan, *The AAPS Journal*, 2006, **8**, 743.
- [57] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, J.L. Holyoke, H. Davoudi, J.C. Gebler, *Oligonucleotides*, 2003, **13**, 229.
- [58] S.M. McCarthy, M. Gilar, Waters Corporation 2010
- [59] C. Liu, D. Lu, X. Deng, Y. Wang, J. Zhang, Y. Zhang, S. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 1333.
- [60] V. Bonilla, G. Srivatsa, *Handbook of analysis of oligonucleotides and related products*, CRC Press, 2011.
- [61] A.J. Alpert *J. Chromatogr.*, 1990, **499**, 177.
- [62] L. Gong, J.S.O. McCullagh, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 5480.
- [63] R.N. Easter, K.K. Kröning, J.A. Caruso, P.A. Limbach, *Analyst*, 2010, **135**, 2560.
- [64] R. Easter, C. Barry, J. Caruso, P. Limbach, *Anal. Met.*, 2013, **5**, 2657.
- [65] Q. Li, F. Lynena, J. Wang, H. Li, G. Xub, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1255**, 237.
- [66] Z.J. Lin, W. Li, G. Dai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 330.
- [67] G. Dai, X. Wei, Z. Liu, S. Liu, G. Marcucci, K. K. Chan, *J. Chromatogr. B*, 2005, **825**, 201.
- [68] S. Studzińska, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 1663.
- [69] S. Studzińska, B. Buszewski, *Biomed. Chromatogr.*, 2014, **28**, 1140.
- [70] S. Studzińska, L. Pietrzak, B. Buszewski, *Chromatographia*, 2014, **77**, 1589.
- [71] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2014, **949**, 87.

- [72] S. Studzińska, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 7127.
- [73] S. Studzińska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2012, **887**, 93.
- [74] S. Studzińska, S. Mounicou, J. Szpunar, R. Łobiński, B. Buszewski, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **855**, 13.

Praca wpłynęła do Redakcji