

Imię i nazwisko autora rozprawy: Paweł Kubica

Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Chromatografia oddziaływań hydrofilowych sprzężona ze spektrometrią mas, jako alternatywne do chromatografii w odwróconym układzie faz rozwiązanie w celu rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych

Tytuł rozprawy w języku angielskim: High performance liquid chromatography of hydrophilic interactions coupled with mass spectrometry as an alternative solution for liquid chromatography with reversed phase for separation of polar and semipolar compounds

Promotor

dr hab. inż. Andrzej Wasik, prof. nadzw. PG

Gdańsk, 2016 rok

Składam serdeczne podziękowania

*Panu dr hab. inż. Andrzejowi Wasikowi, prof. nadzw. PG
za przekazaną mi wiedzę, życzliwą i nieocenioną pomoc
w trakcie wykonywania badań i redagowania niniejszej pracy*

dziękuję również

*Pani prof. dr hab. inż. Agacie Kot-Wasik
oraz
Panu prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi
za wszelkie porady oraz sugestie*

szczególne podziękowania należą się

*moim Bliskim,
za pomoc, otuchę i nieustanną motywację.*

*Badania zawarte w pracy doktorskiej zostały częściowo
sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt nr 2012/07/N/ST4/01834.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	5
1. WPROWADZENIE	7
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	10
2.1. FAZY STACJONARNE STOSOWANE W TECHNICIE HILIC	10
2.1.1 NIEMODYFIKOWANY ŻEL KRZEMIONKOWY	13
2.1.1.1 Ziarno całkowicie porowate oraz porowato-rdzeniowe	14
2.1.2. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY GRUPAMI AMINOWYMI	18
2.1.3. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY GRUPAMI DIOLOWYMI	18
2.1.4. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY GRUPAMI CYJANOPROPYLOWYMI	19
2.1.5. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY GRUPAMI PENTAFLUOROFENYLOWYMI	19
2.1.6. ZŁOŻA MIESZANE TYPU HILIC/IC, HILIC/IC/RPLC I HILIC/RPLC	19
2.1.7. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY GRUPAMI SULFABETAINOWYMI ORAZ FOSFORYLOCHOLINOWYMI	21
2.1.8. ŻEL KRZEMIONKOWY MODYFIKOWANY CYKLODEKSTRYNAMI	22
2.2. PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI FAZ STACJONARNYCH STOSOWANYCH W TECHNICIE HILIC	23
2.3. FAZY RUCHOME STOSOWANE W TECHNICIE HILIC	25
2.3.1. DODATKI DO FAZ RUCHOMYCH STOSOWANYCH W TECHNICIE HILIC	26
2.3.2. ROZPUSZCZALNIK PRÓBKII	26
2.4. MECHANIZMY RETENCJI WYSTĘPUJĄCE W TECHNICIE HILIC	27
2.5. WPŁYW POSZCZEGÓLNYCH CZYNNIKÓW WPŁYWAJĄCYCH NA RETENCJĘ	30
2.5.1. SKŁAD FAZY RUCHOMEJ	30
2.5.2. BUFORY JAKO DODATKI DO FAZY RUCHOMEJ	30
2.5.3. TEMPERATURA	32
2.6. OPRACOWANIE METOD OPARTYCH NA WYKORZYSTANIU TECHNIKI HILIC	33
2.7. TECHNIKA HILIC-ESI-MS JAKO NARZĘDZIE ANALITYCZNE	35
2.8. SPOSOBY ROZWIĄZYWANIA PROBLEMÓW W TRAKCIE STOSOWANIA TECHNIKI HILIC	40
3. CEL ORAZ ZAKRES BADAŃ	43

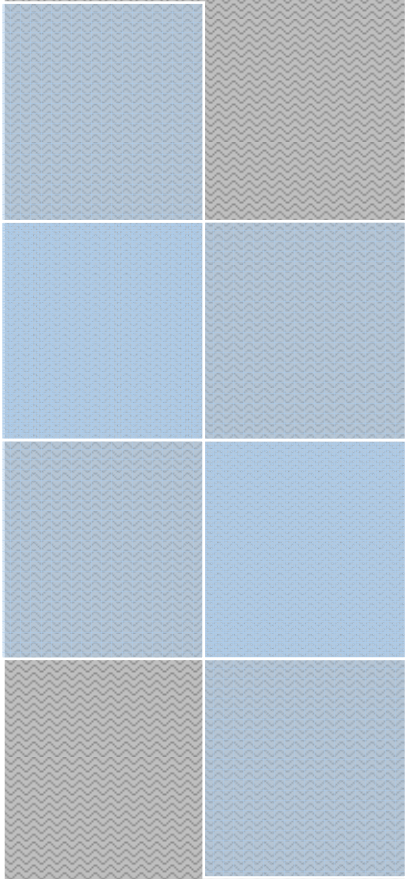
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	46
4.1. OZNACZANIE CUKRÓW W PRÓBKACH MOCZU DZIECI	46
4.2. OZNACZANIE CUKRÓW W PRÓBKACH PŁYNÓW DO ELEKTRONICZNYCH PAPIEROSÓW	57
4.3. OZNACZANIE NIKOTYNY W PRÓBKACH PŁYNÓW DO ELEKTRONICZNYCH PAPIEROSÓW	67
4.4. OZNACZANIE SUBSTANCJI INTENSYWNIIE SŁODZĄCYCH W PRÓBKACH NAPOJÓW	77
5. PODSUMOWANIE	104
6. BIBLIOGRAFIA	106
7. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	111
7.1. PUBLIKACJE Z LISTY FILADELFIJSKIEJ	111
7.2. POZOSTAŁE PUBLIKACJE I SKRYPTY	111
7.3. PLAKATY KONFERENCYJNE	111
7.4. UZYSKANE GRANTY	113

Wykaz skrótów i akronimów

Skrót/Akronim	Termin angielskojęzyczny	Termin polskojęzyczny
ANP	<i>Aqueous Normal Phase</i>	Chromatografia cieczowa w wodnym normalnym układzie faz
-β-CD	<i>β-cyclodextrin/Silica gel with β-cyclodextrin groups</i>	β-cyklodekstryna/Żel krzemionkowy z grupami β-cyklodekstrynowymi
-CN	<i>Cyano group/Silica gel modified with cyano groups</i>	Grupa cyjanowa/Żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanowymi
-c-OH _n	<i>Silica gel modified with crosslinked diol</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany usieciowanymi grupami diolowymi
CRM	<i>Charge Residue Model</i>	Model naładowanych pozostałości
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	Jonizacja poprzez elektrorozpylanie
-F5	<i>Pentafluorophenyl group/Silica gel modified with pentafluorophenyl groups</i>	Grupa pentafluorofenylowa/Żel krzemionkowy modyfikowany grupami pentafluorofenylowymi
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>	Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IC	<i>Ion Chromatography</i>	Chromatografia jonowa
IEM	<i>Ion Evaporation Model</i>	Jonowy model odparowania
logP	<i>Octanol/water Partition Coefficient</i>	Współczynnik podziału oktanol/woda
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	Monitorowanie wielu przejść jonowych
MS	<i>Mass spectrometry/Mass spectrometer</i>	Spektrometria mas/Spektrometr mas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry/Tandem Mass Spectrometer</i>	Tandemowa spektrometria mas/Tandemowy spektrometr mas
-NH ₂	<i>Amino group/Silica gel modified with amino groups</i>	Grupa aminowa/Żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminowymi
NPLC	<i>Normal Phase Liquid Chromatography</i>	Chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
-OH _n	<i>Silica gel modified with diol groups</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami diolowymi
-PEG _n	<i>Silica gel modified with polyethylene glycol</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany glikolem polietylenowym
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>	Chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
-SiH	<i>Silica Gel type C</i>	Żel krzemionkowy typu C
-SiOH	<i>Silica Gel type A and B</i>	Żel krzemionkowy typu A i B
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>	Ultrasprawna chromatografia cieczowa
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>	Spektroskopia UV-Vis/Spektroskopia w zakresie bliskiego ultrafioletu oraz światła widzialnego
WAX	<i>Weak Anion Exchanger</i>	Słaby wymiennicz anionowy
WCX	<i>Weak Cation Exchanger</i>	Słaby wymiennicz kationowy
ZIC-cHLIC	<i>Silica gel modified with phosphorylcholine groups</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami fosforylocholinowymi
ZIC-HILIC	<i>Silica gel modified with sulfobetaine groups</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami sulfobetainowymi
ZIC-pHILIC	<i>Polymer modified with sulfobetaine groups</i>	Polimer modyfikowany grupami sulfobetainowymi



Wprowadzenie



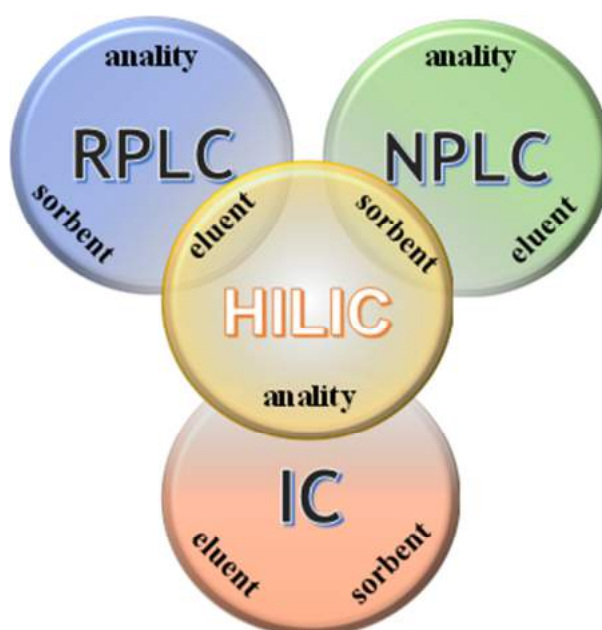
1. Wprowadzenie

Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC) jest techniką, która może służyć do rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych. Od ponad dwóch dekad jest skuteczną alternatywą dla chromatografii w normalnym układzie faz (NPLC) i w odwróconym układzie faz (RPLC), gdy istnieje potrzeba rozdzielania substancji polarnych. Warto zauważyć, że obecnie coraz częściej, dzięki zastosowaniu nowoczesnych wypełnień kolumn chromatograficznych, możliwe jest rozdzielanie substancji hydrofobowych z wykorzystaniem układu typu HILIC. Technika HILIC mająca wiele wspólnych cech z techniką NPLC znana jest też pod nazwą: wodny układ faz normalnych (*Aqueous Normal Phase – ANP*). W układzie typu NPLC faza stacjonarna (np. żel krzemionkowy) jest bardziej polarna niż faza ruchoma (np. heksan) [1]. Najczęściej w normalnym układzie faz rozdziela się wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, aminy, amidy, iminy, alkohole, fenole, sacharydy, kwasy karboksylowe, aminokwasy, peptydy, kwasy nukleinowe i inne. Układ taki ma sporo ograniczeń, ponieważ wymaga stosowania bezwodnych rozpuszczalników wysokiej czystości. W chwili obecnej, obszar zastosowania układu NPLC zmniejsza się, gdyż ten rodzaj chromatografii jest trudny do połączenia ze spektrometrią mas [2]. Już niewielka zawartość wody obecnej w fazie ruchomej (0,01%) powoduje uzyskiwanie niepowtarzalnych czasów retencji i wpływa negatywnie na kształt otrzymywanych pików.

Wprawdzie pierwsze doniesienie o zastosowaniu układu typu HILIC ukazało się już w 1975 roku [3], lecz termin ten określający technikę jako chromatografię podziałową typu ciecz-ciecz został wprowadzony dopiero w 1990 roku przez dr Andrew Alpert'a [4]. Mechanizm rozdzielania analitów opiera się zarówno na wykorzystaniu bezpośrednich oddziaływań pomiędzy fazą stacjonarną i fazą ruchomą (jak to ma miejsce w przypadku NPLC czy RPLC) [4], jak i zastosowaniu wody z dodatkiem modyfikatora jonowego (najczęściej jego zawartość nie przekracza 0,1% objętości) i mieszającego się z nią rozpuszczalnika organicznego w odpowiednich proporcjach, co powoduje, że na powierzchni ziaren sorbentu tworzy się warstwa eluentu o podwyższonej zawartości wody. Migrujące przez kolumnę chromatograficzną anality podlegają oddziaływaniom, które zachodzą pomiędzy warstwą fazy ruchomej o dużej zawartości składnika organicznego a warstwą zaadsorbowanej wody. W technice HILIC wykorzystywane są różnorodne mechanizmy retencji, które niestety nie są do końca poznane i opisane w literaturze naukowej. Dlatego też nie zawsze możliwe jest przewidywanie zachowania się poszczególnych związków podda-

nych procesowi rozdzielania. Kolejność elucji oznaczanych substancji zachodzi najczęściej od najmniej do tych najbardziej polarnych. Jednak od tej reguły są wyjątki. Występują one szczególnie wtedy, kiedy fazą stacjonarną jest modyfikowany żel krzemionkowy [5].

Technika HILIC zapewnia możliwość wykorzystania już istniejących kolumn chromatograficznych, jednakże poszukiwane są nowe fazy stacjonarne i ich modyfikacje, które mogą znaleźć zastosowanie w chromatografii oddziaływań hydrofilowych, rozszerzając zakres stosowania tej techniki. Można powiedzieć, że technika HILIC łączy w sobie elementy chromatografii w normalnym układzie faz, w odwróconym układzie faz oraz wymiany jonowej, co w sposób schematyczny przedstawiono na rysunku 1 [4, 5].



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie zależności pomiędzy technikami chromatograficznymi

Podjęcie typu HILIC zrewolucjonizowało proces rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych, ponieważ znane już rozwiązania wykorzystywane są w odmienny sposób. Na szczególną uwagę zasługuje połączenie techniki HILIC ze spektrometrią mas, które skutkuje opracowaniem nowych metodyk analitycznych. Warto dodać, że spektrometry mas są coraz częściej wykorzystywane jako uniwersalne detektory ze względu na wysoką czułość i na unikatowe sposoby pracy, takie jak: przemiatanie całego widma, monitorowanie wybranych reakcji czy monitorowanie wybranego jonu [6, 7].

W chwili obecnej, technika HILIC sprzężona ze spektrometrią mas staje się efektywną alternatywą dla innych technik chromatograficznych i może znaleźć zastosowanie w wielu dyscyplinach naukowych jako skuteczne narzędzie do rozdzielania i oznaczania substancji polarnych oraz średniopolarnych.



Część literaturowa

2. Część literaturowa

2.1. Fazy stacjonarne stosowane w technice HILIC

Niewątpliwą zaletą techniki HILIC jest możliwość wykorzystania bardzo wielu różnorodnych polarnych faz stacjonarnych. Większość z nich – podobnie jak ma to miejsce w przypadku faz stacjonarnych wykorzystywanych w RPLC – jest modyfikowanym żelem krzemionkowym. Ponadto, w technice HILIC znajduje zastosowanie czysty żel krzemionkowy, którego powierzchnia jest polarna. Pierwotnie zastosowanie techniki HILIC opierało się na wykorzystaniu czystego żelu krzemionkowego w celu rozdzielania aminokwasów, sacharydów oraz peptydów [8-10]. W miarę upływu czasu technika HILIC zaczęła cieszyć się coraz szerszym zainteresowaniem ze względu na możliwość rozdzielania polarnych farmaceutyków i ich metabolitów, substancji pochodzenia biologicznego, dodatków do żywności, związków toksycznych, białek, peptydów i innych. Również rozwój proteomiki i glikomiki przyczynił się do zwiększonego zainteresowania techniką HILIC [11], co w konsekwencji spowodowało, że pojawiała się ciągła potrzeba poszukiwania nowych bardziej selektywnych faz stacjonarnych i ulepszania tych istniejących. Producenci kolumn chromatograficznych oferują rozwiązania, które są efektem modyfikacji żelu krzemionkowego grupami, takimi jak: grupy aminowe, diolowe, poliglikolowe, cyklodekstrynowe, sulfobetainowe, cyjanopropyłowe, pentafluorofenyłowe, czy peptydowe. Zestawienie popularnych wypełnień stosowanych w technice HILIC, otrzymywanych na bazie żelu krzemionkowego, ich struktury oraz niektóre zastosowania zostały przedstawione w tabeli 1. Można zauważyć, że nazwy modyfikacji wypełnień odnoszą się wyłącznie do rodzaju grupy funkcyjnej, mającej największy wpływ na mechanizm retencji.

W ciągu ostatniego dziesięciolecia, powstało kilka całkowicie nowych modyfikacji, np. wypełnienia typu ZIC (amfoteryczna faza stacjonarna), złoża mieszane czy złoża oferujące różny mechanizm retencji w zależności od warunków chromatograficznych. Nowopowstające fazy stacjonarne różnią się i charakterystyką retencji, i selektywnością. Właściwe dobranie fazy stacjonarnej jest niezwykle ważnym etapem optymalizacji warunków rozdzielania analitów, by uzyskać mechanizm retencji wykorzystujący interakcje ciecz–ciecz. Mechanizm ten, oparty na dyfuzji fazy ruchomej, został opisany równocześnie z pierwszymi doniesieniami dotyczącymi układu typu HILIC [3, 4, 12]. Pomimo powstawania wielu modyfikacji faz stacjonarnych oraz różnych specyficznych złożeń dedykowanych rozdzielaniu poszczególnych grup związków, wciąż najpopularniejszą fazą stacjonarną wykorzystywaną w technice HILIC jest czysty żel krzemionkowy. Można powie-

dzieć, że jest to złoże uniwersalne i dlatego staje się zwykle pierwszym wyborem chemika analityka, który ma za zadanie rozdzielanie mieszaniny substancji o charakterze polarnym.

Tabela 1. Zestawienie popularnych wypełnień kolumn chromatograficznych stosowanych w technice HILIC.

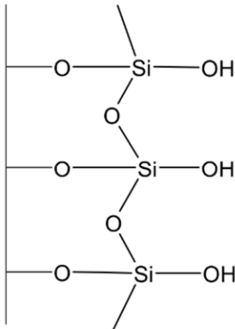
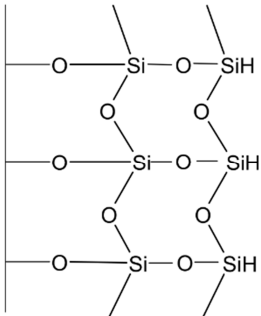
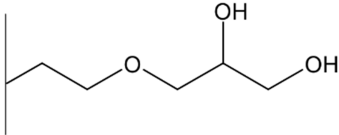
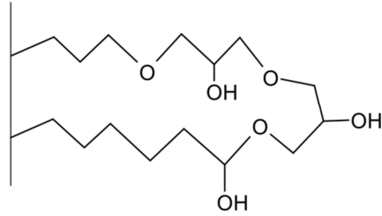
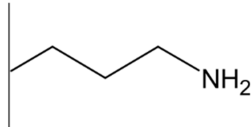
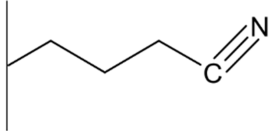
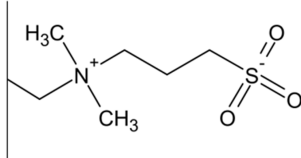
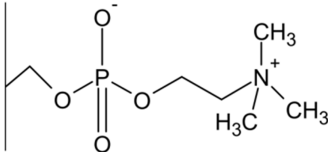
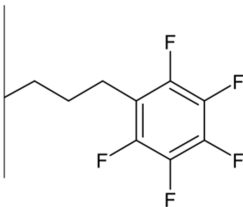
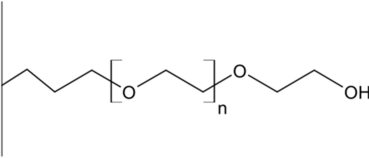
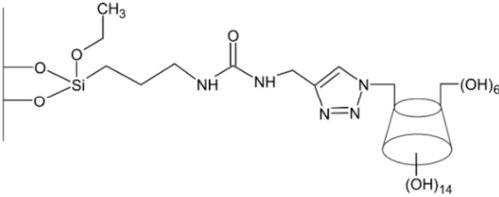
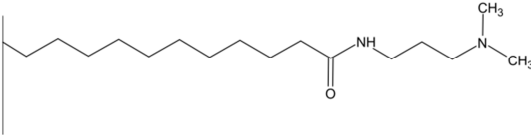
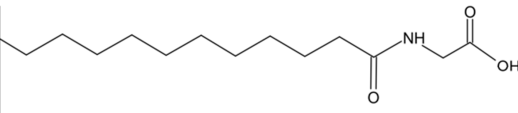
Nazwa wypełnienia	Skrót	Struktura fazy stacjonarnej	Przykładowe zastosowania
Żel krzemionkowy (typ A i B)	-SiOH		<ul style="list-style-type: none"> - alkohole cukrowe - aminokwasy - farmaceutyki - neuroprzeźniki - peptydy - sacharydy - witaminy rozpuszczalne w wodzie
Żel krzemionkowy (typ C)	-SiH		<ul style="list-style-type: none"> - aminokwasy - hydrofilowe metabolity - kwasy karboksylowe - nukleotydy - peptydy
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami diolowymi	-OH _n		<ul style="list-style-type: none"> - fenole - monitoring mutarotacji monosacharydów - oligonukleotydy - sacharydy - witaminy
Żel krzemionkowy modyfikowany usieciowanymi grupami diolowymi (ang. <i>cross-linked diol</i>)	-c-OH _n		<ul style="list-style-type: none"> - fenole - flawonoidy - fosfolipidy - oligonukleotydy - sacharydy
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminowymi	-NH ₂		<ul style="list-style-type: none"> - farmaceutyki - kwasy karboksylowe - peptydy - sacharydy

Tabela 1. c.d.

Żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanowymi	-CN		<ul style="list-style-type: none"> - denaturanty - farmaceutyki - silnie zasadowe związki
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami sulfobetainowymi	-ZIC		<ul style="list-style-type: none"> - alkohole cukrowe - farmaceutyki - glikoproteomika - metabolomika - proteomika - sacharydy
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami fosforylocholinowymi	-ZIC-c		<ul style="list-style-type: none"> - metabolomika - metalokompleksy - proteomika - sacharydy
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami pentafluorofenyłowymi	-F5		<ul style="list-style-type: none"> - aminy aromatyczne - polarne aromatyczne związki
Żel krzemionkowy modyfikowany glikolem polietylenowym	-PEG _n		<ul style="list-style-type: none"> - fenole - flawonoidy - fosfoproteiny
Żel krzemionkowy modyfikowany grupami β-cyklodekstrynowymi	-β-CD		<ul style="list-style-type: none"> - aminokwasy - chiralne polarne związki - oligosacharydy
Żel krzemionkowy modyfikowany typu WAX-1 (ang. <i>weak anion exchanger</i>)	WAX-1		<ul style="list-style-type: none"> - glikozydy stewiolowe - metabolity rybozydów i rybotydów - ryboza i jej pochodne
Żel krzemionkowy modyfikowany typu WCX-1 (ang. <i>weak cation exchanger</i>)	WCX-1		<ul style="list-style-type: none"> - fosfopeptydy - glikopeptydy - peptydy

2.1.1 Niemodyfikowany żel krzemionkowy

Niemodyfikowany, czysty żel krzemionkowy spośród wszelkich innych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii cieczowej charakteryzuje się tym, że właściwie nie ulega czasowej degradacji, nie biorąc pod uwagę nieodwracalnej adsorpcji zanieczyszczeń, czy też rozpuszczenia w warunkach silnie alkalicznych [13]. Żel krzemionkowy występuje w trzech wariantach w zależności od sposobu otrzymywania:

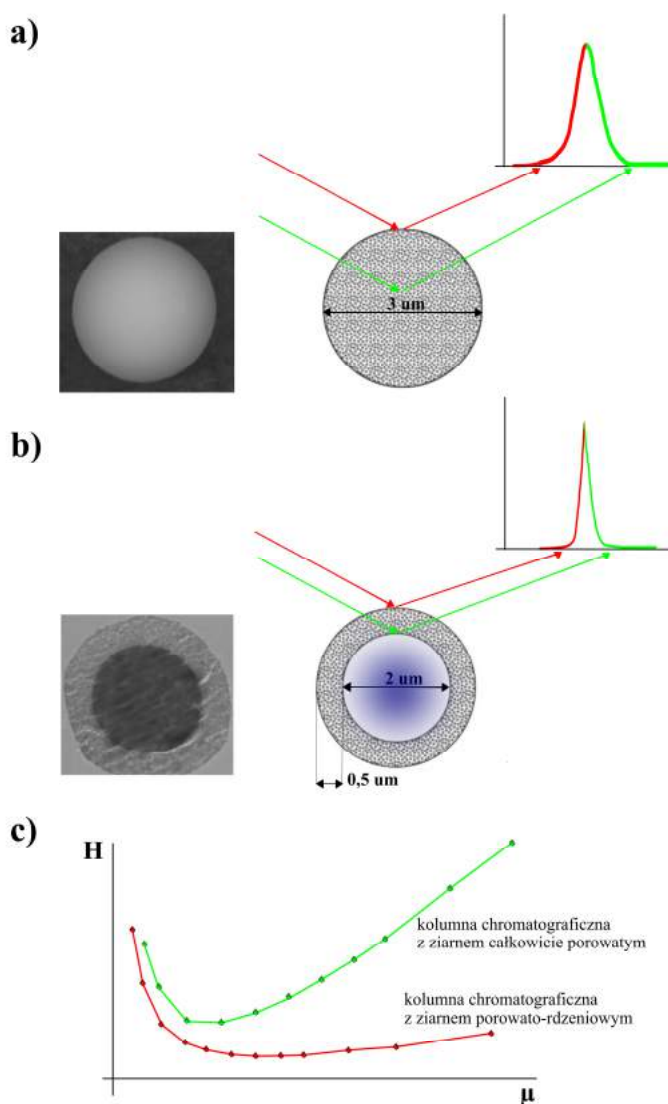
- żel krzemionkowy typu A - popularny materiał chromatograficzny, otrzymywany poprzez strącanie cząstek z zasadowych roztworów krzemionki. Zazwyczaj, ze względu na zanieczyszczenia metalami, żel krzemionkowy typu A jest rzadko wykorzystywany w technice HILIC;
- żel krzemionkowy typu B - powstaje przez działanie na zol krzemionkowy odpowiednimi prekursorami, np. alkoholami krzemu- tetrametoksy- i tertraetoksy-silanami [14]. Otrzymany żel krzemionkowy typu B zawiera mniej zanieczyszczeń niż typ A oraz ma względnie wysoką odporność na podwyższone pH (do pH 9);
- żel krzemionkowy typu C - to rodzaj żelu krzemionkowego, gdzie spora część grup silanolowych (Si-OH) jest zastępowana grupami Si-H podczas procesu hydrosilacji. Żel krzemionkowy typu C umożliwia niekiedy retencję niektórych związków niepolarnych.

W celu odróżnienia dwóch typów podobnych mechanizmów retencji, kolumny chromatograficzne wypełnione żelem krzemionkowym typu C nazywa się kolumnami chromatograficznymi pracującymi w trybie ANP, natomiast kolumny chromatograficzne z wypełnieniem typu A i B określa się kolumnami chromatograficznymi pracującymi w trybie HILIC [15, 16]. Warto dodać, że jest to umowna klasyfikacja, a określenia ANP oraz HILIC dość często w literaturze stosuje się zamiennie.

Kolumny chromatograficzne wypełnione czystym żelem krzemionkowym jako sorbentem znacznie różnią się właściwościami fizykochemicznymi w zależności od producenta, stopnia oczyszczenia oraz sposobu otrzymania, co w konsekwencji przyczynia się do braku powtarzalności otrzymywanych wyników (tj. czasu retencji, kształtu piku oraz innej sprawności).

2.1.1.1 Ziarno całkowicie porowate oraz porowato-rdzeniowe

Ziarna fazy stacjonarnej (żelu krzemionkowego) stosowane w chromatografii cieczowej mogą być albo całkowicie porowate albo porowate w warstwie około rdzeniowej (*core-shell particles*). Znane także jako wykonane w technologii core-shell lub ziarna porowato-rdzeniowe/ze stałym rdzeniem. Ziarna porowato-rdzeniowe najczęściej uzyskuje się poprzez modyfikację krzemionki typu B. Rozwiązanie w postaci porowatej otoczki wokół stałego niedostępnego dla fazy ruchomej rdzenia, powoduje że opory wynikające z przenoszenia masy między fazą ruchomą a stacjonarną zostają zredukowane, a w konsekwencji prowadzi to do wzrostu sprawności kolumny chromatograficznej (rysunek 2).



Rys. 2. Przekrój i zdjęcie przez ziarno żelu krzemionkowego a) całkowicie porowatego [17], b) porowato-rdzeniowego [18] oraz schemat migracji analitu, c) krzywe opisujące zależność $H=f(\mu)$ dla kolumny chromatograficznej wypełnionej ziarnem całkowicie porowatym i porowato-rdzeniowym; gdzie: H – wysokość równoważna półki teoretycznej, μ – prędkość liniowa przepływu strumienia fazy ruchomej.

Równanie van Deemtera opisuje wpływ zjawisk zachodzących podczas migracji analitów na wysokość półki teoretycznej, która jest miarą sprawności kolumny chromatograficznej. Im większa liczba półek teoretycznych i im mniejsza ich wysokość, tym sprawniejsza jest kolumna chromatograficzna [19, 20]. W związku z tym zmniejszenie oporów fazy ruchomej penetrującej fazę stacjonarną przekłada się na wyższą sprawność. Jedną z wersji rozszerzonej postaci równania van Deemtera wskazuje na wpływ wielu czynników na wysokość półki teoretycznej [21]. Rozszerzoną postać zależności van Deemtera opisuje równanie (2.1).

$$H = \underbrace{2\lambda d_p}_A + \underbrace{2\gamma D_m}_{B} \times \frac{1}{\mu} + \underbrace{\left(\frac{1}{96} \frac{d_p^2}{D_m} \frac{11k^2+6k+1}{(k+1)^2} + \frac{2}{3} \frac{d_s^2}{D_s} \frac{k}{(k+1)^2} \right)}_{\substack{C_m \quad C_s \\ C}} \mu \quad (2.1)$$

Gdzie:

H – wysokość równoważna półki teoretycznej,

A – dyfuzja wirowa,

B – dyfuzja wzdłużna (dyspersja),

C_m – transfer masy w fazie ruchomej,

C_s – transfer masy w fazie stacjonarnej,

C – opory przenikania masy między fazą stacjonarną i ruchomą,

μ – średnia prędkość liniowa przepływu strumienia fazy ruchomej,

γ – współczynnik opisujący nieregularność przestrzeni międzyziarnowej,

d_p – średnica ziarna,

λ – współczynnik upakowania kolumny chromatograficznej,

D_m – współczynnik dyfuzji w fazie ruchomej,

D_s – współczynnik dyfuzji w fazie stacjonarnej,

k – współczynnik retencji,

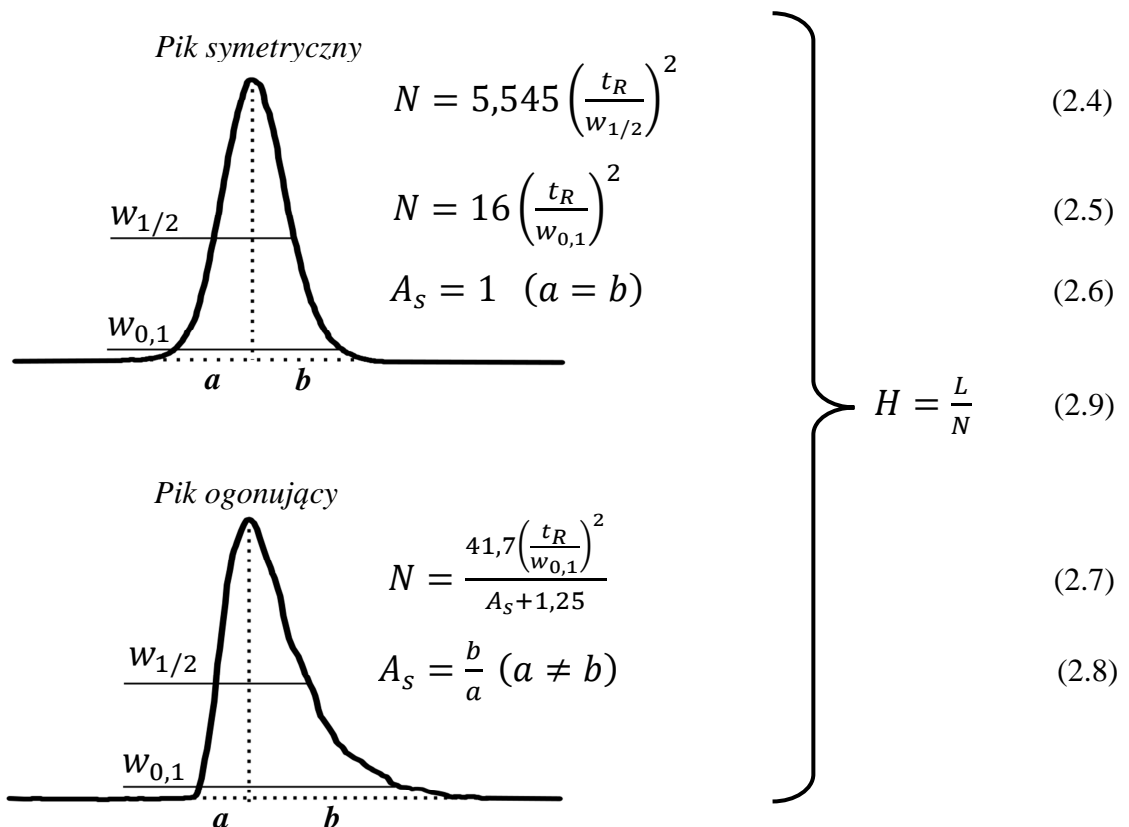
d_s – grubość fazy stacjonarnej.

Przedstawione równanie van Deemtera w postaci rozszerzonej zwraca uwagę na wpływ średnicy ziarna (d_p) na dyfuzję wirową (parametr A) oraz na opory przenikania masy (parametr C). Należy zaznaczyć, że dyfuzja wirowa nie zależy od objętościowego przepływu strumienia fazy ruchomej, lecz od średnicy ziarna wypełnienia oraz równomierności upakowania kolumny chromatograficznej. Ponadto, w chromatografii cieczowej

parametr C_s często przyjmuje dużo mniejszą wartość niż parametr C_m ze względu na to, że czas, jaki analit spędza w fazie stacjonarnej jest dużo krótszy od czasu spędzanego w fazie ruchomej. Im mniejsza średnica ziarna, tym mniejsze wartości będą przyjmowały parametry A oraz C. W związku z tym kolumna chromatograficzna będzie charakteryzować się wyższą sprawnością kosztem zwiększonych oporów przepływu co wiąże się ze zwiększeniem ciśnienia. Dzięki zastosowaniu wypełnienia typu porowato-rdzeniowego można uzyskać rezultaty zbliżone do tych uzyskiwanych z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii ciekowej (UPLC), przy zastosowaniu warunków typowych dla HPLC [20, 22, 23].

Przedstawiona zależność van Deemtera może przyjąć prostszą postać, która jest bardziej znana i została przedstawiona w równaniu (2.2). W praktyce jednak wysokość półki teoretycznej wyznacza się na podstawie parametrów piku odczytanych z chromatogramu (rysunek 3).

$$H = A + \frac{B}{\mu} + (C_m + C_s)\mu \quad (2.2)$$



Rys. 3. Porównanie wyznaczania liczby półek teoretycznych na podstawie parametrów odczytanych z chromatogramu dla piku symetrycznego oraz ogonującego.

Gdzie:

H – wysokość równoważna półki teoretycznej,

L – długość kolumny chromatograficznej,

N – liczba półek teoretycznych,

t_R – czas retencji analitu,

$w_{1/2}$ – szerokość pików w połowie wysokości,

$w_{0,1}$ – szerokość pików na wysokości 10% powyżej podstawy pików,

A_s – współczynnik asymetrii pików, czyli stosunek części zstępującej do wstępującej pików wyznaczony na poziomie 10% wysokości pików.

Zwykle pików otrzymanych z wykorzystaniem kolumn chromatograficznych z wypełnieniem porowato-rdzeniowym charakteryzują się wyższą (rzadziej podobną, prawie nigdy gorszą) sprawnością w porównaniu do pików otrzymanych z wykorzystaniem kolumn chromatograficznych z wypełnieniem całkowicie porowatym. Ponadto, czas analizy chromatograficznej jest krótszy, co przekłada się na mniejsze zużycie eluentów oraz w efekcie możliwość wykonania większej liczby analiz chromatograficznych w takim samym czasie. Zastosowanie ziaren porowato-rdzeniowych w efekcie prowadzi do:

- ograniczenia oporów przenoszenia masy między fazą ruchomą a fazą stacjonarną, co skutkuje kształtem pików zbliżonym do gaussowskiego;
- uzyskania niższych wartości ciśnienia w kolumnie chromatograficznej przy dużych przepływach strumienia fazy ruchomej przy wysokiej zawartości acetonitrylu (ACN) w fazie ruchomej stosowanej w układzie typu HILIC;
- redukcji objętości martwej kolumny chromatograficznej;
- stosowania wysokich wartości objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej z wykorzystaniem systemów przystosowanych do pracy w warunkach klasycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC);
- skrócenia czasu analizy chromatograficznej.

Należy jednak wspomnieć o istotnym ograniczeniu, które obserwowane jest podczas zastosowania kolumn chromatograficznych wypełnionych sorbentem typu porowato-rdzeniowym, mianowicie objętość próbki dozowanej do układu chromatograficznego jest zwykle mniejsza, ze względu na fakt, że czynna powierzchnia fazy stacjonarnej biorącej udział w procesie rozdzielania jest mniejsza w porównaniu do faz stacjonarnych opartych na ziarnach całkowicie porowatych.

2.1.2. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminowymi

Żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi jest jednym z najstarszych i ciągle bardzo popularnym typem wypełnienia używanym głównie do rozdzielania sacharydów, peptydów, kwasów karboksylowych oraz niektórych farmaceutyków [24, 25]. Podobnie, jak w przypadku czystego żelu krzemionkowego, i w tym przypadku w zależności od sposobu otrzymywania oraz oczyszczania złoża, poszczególne kolumny chromatograficzne mogą różnić się pomiędzy sobą pod względem zdolności rozdzielczej oraz selektywności [25]. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi wykazuje zwiększoną zdolność do retencji związków o charakterze kwasowym za co najprawdopodobniej odpowiedzialny jest mechanizm składający się z wymiany jonowej oraz podziału ciecż–ciecż. Wypełnienie tego typu jest podatne na działanie siły jonowej buforu – im większa jego siła jonowa, tym krótszy czas retencji związku o charakterze kwasowym [26]. Dwojakość mechanizmu dość często powoduje ogonowanie pików [25, 27]. Ponadto, cukry redukujące, takie jak: fruktoza, glukoza, galaktoza czy ryboza mają tendencję do trwałej adsorpcji na złożu kolumny chromatograficznej, za co odpowiedzialne są grupy aminowe. Z kolei, podczas rozdzielania niektórych aldehydów reaktywne grupy aminopropylowe mogą tworzyć zasady Schiffa ($R_1R_2C=N-R_3$, gdzie R_3 jest grupą aryłową lub grupą alkilową) trwale je wiążąc ze złożem, co skutkuje utratą sprawności kolumny chromatograficznej [28, 29].

2.1.3. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami diolowymi

Z żelem krzemionkowym grupy hydroksylowe są związane poprzez ligandy propylowe. Przyłączanie ligandów w celu uzyskania złoża chromatograficznego typu diol odbywa się poprzez działanie silanami (np. (3-glicydyloksypropylo) trimetoksysilanem) na żel krzemionkowy [1, 15, 30]. Fazy stacjonarne typu diol są bardziej polarne niż czysty żel krzemionkowy, jednak nie wykazują zdolności do tworzenia wiązań wodorowych, a grupy hydroksylowe zazwyczaj nie podlegają jonizacji. Ponadto, resztkowe grupy hydroksylowe żelu krzemionkowego są częściowo przesłonięte przez ligandy propylowe i nie biorą udziału w mechanizmie retencji. Wypełnienie typu diol jest najczęściej stosowane w celu rozdzielania białek [31], fenoli [32], kwasów organicznych [30], witamin rozpuszczalnych w wodzie [27] oraz sacharydów [33]. Specyficznym przykładem wykorzystania wypełnienia typu diol jest możliwość monitorowania mutarotacji niektórych monosacharydów, co stawia tego rodzaju wypełnienia w przewadze nad czystym żelem krzemionkowym oraz

tym modyfikowanym grupami aminopropylowymi [34]. Ze względu na obecność hydrofobowego łącznika (ligandu) pomiędzy powierzchnią żelu krzemionkowego a grupami hydroksylowymi możliwe jest zastosowanie kolumn chromatograficznych typu diol zarówno w technice RPLC, jak i HILIC [35]. Im dłuższy łańcuch ligandu, tym większe właściwości hydrofobowe będzie miała faza stacjonarna. Diol usieciowany będący modyfikacją fazy stacjonarnej typu diol ma większą odporność na hydrolizę i wykazuje silniejsze oddziaływanie hydrofobowe [36, 37].

2.1.4. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi

Kolumny chromatograficzne z wypełnieniem typu żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi, podobnie jak kolumny chromatograficzne z wypełnieniem typu diol mogą być wykorzystywane zarówno w trybie HILIC jak i RPLC [1]. Główny mechanizm retencji opiera się na wymianie jonowej. Zazwyczaj ligandem jest grupa propylowa o charakterze hydrofobowym, jednak dostępne są kolumny chromatograficzne z ligandem oktylodecylowym powszechnie stosowane w trybie RPLC, zaś ich zastosowanie w technice HILIC jest raczej ograniczone i może być przydatne w rozdzielaniu niektórych farmaceutyków oraz związków o charakterze zasadowym [38, 39].

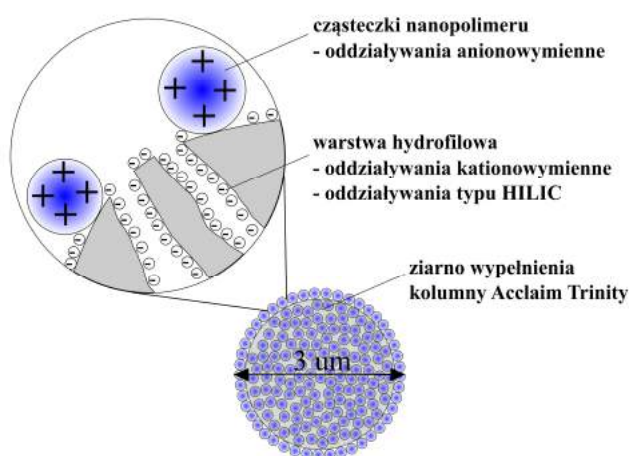
2.1.5. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami pentafluorofenylowymi

Głównym mechanizmem retencji, jaki bierze udział podczas wykorzystywania kolumny chromatograficznej z żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami pentafluorofenylowymi (-F5) jest wymiana jonowa, natomiast oddziaływania polarne są w mniejszości lub nie występują [40]. Zdolność fazy stacjonarnej do adsorpcji wody na jej powierzchni jest bardzo mała, co utrudnia utworzenie charakterystycznej dla techniki HILIC warstwy eluentu o zwiększonej zawartości wody na powierzchni ziaren wypełnienia [41]. Podobnie jak w przypadku wypełnienia cyjanopropylowego również kolumna chromatograficzna typu F5 jest sporadycznie stosowana w technice HILIC [1].

2.1.6. Złoża mieszane typu HILIC/IC, HILIC/IC/RPLC i HILIC/RPLC

Złoża mieszane zostały wprowadzone w celu zapewnienia możliwości rozdzielania szerokiej gamy związków polarnych, średnio- i małopolarnych. Przy zastosowaniu niektórych kolumn chromatograficznych ze specyficznym wypełnieniem możliwe staje się rozdzielanie związków niepolarnych w warunkach typu HILIC (czyli polarna faza stacjo-

narna i faza ruchoma). Przykładami kolumn chromatograficznych posiadających złoża mieszane są kolumny chromatograficzne Dionex: Acclaim WAX-1, Acclaim WCX-1, Acclaim HILIC-1 czy Acclaim Trinity P1 oraz P2. Kolumna chromatograficzna Acclaim WAX-1 umożliwia rozdzielanie w trybie RPLC i HILIC, oferuje także oddziaływania anionowymienne i kationowymienne. W tym wypadku żel krzemionkowy modyfikowany jest alkilowym łańcuchem z drugo- oraz trzeciorzędową aminą [35, 42, 43]. Podobną do niej jest kolumna chromatograficzna typu WCX-1, gdzie oprócz grup aminowych są również grupy karboksylowe. Złoże kolumny chromatograficznej oferuje mechanizmy typowe dla RPLC i HILIC, ma też właściwości jonowymienne. W porównaniu do złoża WAX-1, złoże jest bardziej hydrofilowe, a mechanizm rozdzielania w zależności od warunków może być bardziej typowy dla trybu HILIC niż RPLC. Warto zauważyć, że w zależności od użytej fazy ruchomej oraz siły jonowej buforu różne mechanizmy retencji mogą być aktywowane i brać udział w rozdzielaniu substancji [42, 44-46]. Kolumna chromatograficzna typu Acclaim Trinity P2 może być wykorzystana podczas analiz chromatograficznych zarówno w trybie IC, jak i HILIC. Wnętrze porów oraz powierzchnia żelu krzemionkowego pokryte są organiczną warstwą hydrofilową, która zapewnia wymianę kationową. Cząsteczki nanopolimeru znajdujące się na zewnętrznej powierzchni ziarna wypełnienia zapewniają wymianę anionową. Co więcej, właściwości hydrofilowe złoża, tj. duża zdolność do adsorpcji wody na powierzchni ziaren, umożliwiają wykorzystanie tej kolumny chromatograficznej w trybie HILIC. Przekrój przez ziarno wypełnienia użytego w kolumnie chromatograficznej Acclaim Trinity P2 przedstawiono na rysunku 4. Ze względu na tajemnicę handlową – otrzymywanie, budowa i charakter polimeru i rodzaj modyfikacji są nieznane [47-49].



Rys. 4. Ziarno wypełnienia oraz jego wycinek. Ziarno stosowane jako wypełnienie w kolumnie chromatograficznej Acclaim Trinity P2.

Wymienione wcześniej modyfikacje żelu krzemionkowego, np. propyloaminowe i diolowe, mogą być używane zarówno w trybie HILIC, jak i RPLC. Jeśli modyfikator żelu krzemionkowego posiada w swojej strukturze fragmenty o charakterze hydrofobowym, np. łańcuch alkiłowy lub pierścień, mogą występować inne oddziaływania niż typowe dla techniki HILIC. Przykładem dostępnej na wolnym rynku kolumny chromatograficznej oferującej oddziaływania HILIC/RPLC jest Acclaim HILIC-1, gdzie modyfikatorem żelu krzemionkowego jest długi łańcuch alkiłowy oraz grupy hydroksylowe. Odsłonięta część łańcucha alkiłowego ma charakter hydrofobowy, natomiast grupy hydroksylowe odpowiadają za oddziaływania hydrofilowe.

2.1.7. Żel krzemionkowy modyfikowany grupami sulfobetainowymi oraz fosforylocholinowymi

Fazy stacjonarne oparte na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami sulfobetainowymi (-ZIC) początkowo były stworzone z myślą o rozdzielaniu opartym na wymianie jonowej. Wykorzystując wypełnienie typu -ZIC możliwe jest rozdzielanie soli, organicznych związków jonowych oraz niektórych białek [50-54]. Sulfobetaina jako modyfikator żelu krzemionkowego posiada w swej strukturze grupy sulfonowe o charakterze kwasowym oraz zasadowe grupy amin czwartorzędowych. Obie grupy są najczęściej rozdzielone krótkim łańcuchem alkiłowym, np. grupą propylową. Obecność kwasowej i zasadowej grupy umożliwia jednocześnie rozdzielanie kationów i anionów. Resztkowe grupy hydroksylowe nie biorą udziału w mechanizmie retencji, ponieważ są skutecznie przysłonięte przez grupy sulfobetainowe [55, 56]. Natomiast można zaobserwować oddziaływania wodorowe, dipol-dipol oraz częściowo słabe oddziaływania elektrostatyczne, jeśli anality poddane rozdzielaniu mają charakter jonowy. Związki rozdzielane z wykorzystaniem złoża typu -ZIC eluują w kolejności od najbardziej do najmniej hydrofobowych oraz wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej. Jest to typowa elucja obserwowana przy zastosowaniu techniki HILIC [57].

Wypełnienie typu -ZIC w technice HILIC może być traktowane na równi ze złożem uniwersalnym, jakim jest czysty żel krzemionkowy. Znajduje ono zastosowanie w: rozdzielaniu prostych kwasów organicznych [58], sacharydów i alkoholi cukrowych [59], metabolomicie [5, 43, 60], proteomicie i peptydomicie [50, 61, 62], glikomicie [63-65] i glikopeptydomicie [63, 66]. Handlowo dostępne są trzy rodzaje kolumn chromatograficznych: ZIC-HILIC, gdzie złożem jest modyfikowany żel krzemionkowy; ZIC-pHILIC,

gdzie złożem jest polimer modyfikowany grupami sulfobetainowymi oraz ZIC-cHILIC, gdzie modyfikatorem jest fosforylocholina. Kolumny chromatograficzne typu ZIC-pHILIC charakteryzują się szerszym zakresem pH, w którym można prowadzić proces chromatograficznego rozdzielania, ze względu na podwyższoną odporność polimeru na bufor silnie kwaśne i silnie zasadowe, tj. odpowiednio poniżej pH=2 i powyżej pH=9. Kolumny chromatograficzne typu ZIC-cHILIC oferują zwiększone oddziaływania kationowymienne, co może znaleźć zastosowanie podczas rozdzielania metalokompleksów [67]. Z drugiej strony wypełnienie typu żel krzemionkowy modyfikowany grupami fosforylocholinowymi może być dobrą alternatywą dla kolumn chromatograficznych typu -ZIC, ponieważ ich selektywność jest inna ze względu na odwrócenie kolejności ładunków w modyfikatorze.

2.1.8. Żel krzemionkowy modyfikowany cyklodekstrynami

Cyklodekstryny to cykliczne dekstryny ułożone w kształt toroidu, zbudowane z prostych cukrów połączonych wiązaniem α -1,4-acetylowym. Najbardziej znane są α -, β - oraz γ -cyklodekstryny zbudowane z odpowiednio sześciu, siedmiu oraz ośmiu jednostek glukozy. Charakterystyczną cechą pierścieni cyklodekstrynowych jest wnęka hydrofobowa, której właściwości wykorzystuje się podczas rozdzielania związków optycznie czynnych. Wiązanie toroidów z żelem krzemionkowym następuje podczas działania aminami lub uretanami [35, 68]. W przypadku techniki HILIC kolumny chromatograficzne z wypełnieniem na bazie żelu krzemionkowego modyfikowane β -cyklodekstrynami stosuje się do rozdzielania izomerów optycznych alkoholi cukrowych, mono- i oligosacharydów, aminokwasów oraz flawonoidów [47, 69-72]. Wszystkie te substancje trudno rozdzielić przy wykorzystaniu techniki RPLC. Retencja związków rośnie wraz ze wzrastającą masą cząsteczkową, co najprawdopodobniej ma związek z oddziaływaniami hydrofilowymi, bardziej niż z udziałem hydrofobowej wnęki tworzonej przez β -cyklodekstrynę [71].

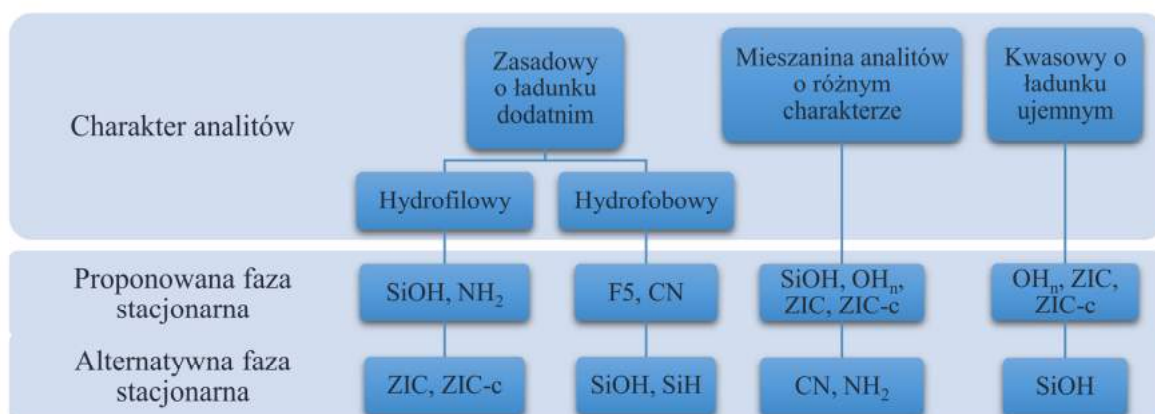
2.2. Porównanie właściwości faz stacjonarnych stosowanych w technice HILIC

Każde wypełnienie zastosowane w kolumnach chromatograficznych przystosowanych do pracy w trybie HILIC ma swoje zalety oraz ograniczenia. Daje to możliwość wyboru odpowiedniej fazy stacjonarnej do odpowiedniej grupy związków. Wiąże się to jednak ze zwiększonymi kosztami – laboratorium musi posiadać szeroki wybór różnych kolumn chromatograficznych, a także zwiększonym nakładem pracy i czasu. Wśród najważniejszych cech faz stacjonarnych oraz używanych kolumn chromatograficznych w technice HILIC można wyróżnić co następuje:

- Zdolność adsorpcji polarnych związków z wykorzystaniem czystego żelu krzemionkowego oraz żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami aminopropylowymi; skutkiem mogą być ogonujące piki.
- Kolumny chromatograficzne ze złożem typu czysty żel krzemionkowy oraz modyfikowany grupami aminopropylowymi charakteryzują się największymi różnicami w selektywności [25, 62].
- Przy zastosowaniu kolumn chromatograficznych wypełnionych czystym żelem krzemionkowym możliwe jest stosowanie dużych wartości objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej bez istotnego pogorszenia otrzymywanych parametrów chromatograficznych.
- Żel krzemionkowy modyfikowany grupami diolowymi jest alternatywą dla niektórych aplikacji, w których dotychczas był wykorzystywany czysty żel krzemionkowy lub żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi. W zależności od charakteru grupy diolowej, otrzymane złożo może mieć również charakter hydrofobowy i znajduje także wykorzystanie w technice RPLC.
- Kolumny chromatograficzne z wypełnieniem na bazie żelu krzemionkowego modyfikowanego sulfobetainą lub fosforylocholiną nadają się do rozdzielania polarnych substancji; jednak mają spośród wszystkich kolumn chromatograficznych najwęższy zakres optymalnych wartości objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej. Wyższe wartości objętościowe natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej znacząco pogarszają sprawność kolumny chromatograficznej [73].

- Mała dostępność kolumn chromatograficznych z wypełnieniem porowato-rdzeniowym, które mogą znaleźć zastosowanie w technice HILIC. Najpopularniejsze są kolumny chromatograficzne z czystym żelom krzemionkowym lub typu diol.
- Niektóre typy złożeń mają ograniczone zastosowanie w technice HILIC.
- Możliwość stosowania dużych wartości objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej ze względu na wysoką zawartość ACN w fazie ruchomej, co przekłada się na niższe wartości ciśnienia roboczego układu chromatograficznego w porównaniu do innych rodzajów chromatografii ciekłej (np. RPLC).

Na rysunku 5 przedstawiono proponowany schemat postępowania przy wyborze fazy stacjonarnej wykorzystywanej do rozdzielania mieszaniny związków w zależności od charakteru analitów.



Rys. 5. Proponowany schemat postępowania przy wyborze typu fazy stacjonarnej w zależności od charakteru analitów.

Pośród dostępnych kolumn chromatograficznych, nie ma jednej uniwersalnej fazy stacjonarnej, za to na rynku pojawiają się kolumny chromatograficzne mające bardzo specyficzne zastosowania, np. żel krzemionkowy modyfikowany maltozą [74], przeznaczony do rozdzielania glikopeptydów. Duży wybór faz stacjonarnych stosowanych w technice HILIC jest niewątpliwie jej zaletą, jednak z drugiej strony stwarza on konieczność wyboru jakiegoś analityka musi dokonać w celu osiągnięcia odpowiedniej selektywności, satysfakcjonującej rozdzielczości oraz dobrej sprawności w trakcie rozdzielania analitów.

2.3. Fazy ruchome stosowane w technice HILIC

W chromatografii oddziaływań hydrofilowych fazą ruchomą są mieszaniny rozpuszczalników organicznych, takich jak acetonitryl, metanol, etanol z wodą lub z buforem. Bufor zwykle oparty jest na octanie amonu lub mrówczanie amonu, natomiast składnikiem organicznym najczęściej jest ACN. W zależności od typu kolumny chromatograficznej i rodzaju wypełnienia kolumny chromatograficznej na początkowym etapie elucji faza ruchoma powinna zawierać minimum od 3 do 5% składnika wodnego [73]. Obecność wody jest niezbędna, by wystąpiły interakcje hydrofilowe pomiędzy zaadsorbowaną wodą a analitem. W kolejnym etapie optymalizacji składu fazy ruchomej następuje zwiększanie zawartości wody w fazie ruchomej. Podczas analizy chromatograficznej próbek rzeczywistych w celu wymycia silnie zaadsorbowanych pozostałych składników próbki zawartość składnika wodnego zwiększa się do 80–90%. W układach HILIC elucja izokratyczna jest rzadziej stosowana i najczęściej dotyczy przypadku silnie polarnych związków, np. cukrów [33].

Teoretycznie, do rozdzielania analitów w technice HILIC można zastosować wiele rozpuszczalników; ich siła elucyjna rośnie wraz ze wzrostem ich polarności i możliwości interakcji protono-wymiennej: woda > metanol > etanol > 2-propanol > tetrahydrofuran > acetonitryl > aceton [73, 75]. Użycie rozpuszczalników innych niż ACN dość często prowadzi do uzyskania niewystarczającej retencji oraz niesymetrycznych pików. Zastosowanie metanolu znajduje bardzo ograniczone zastosowanie w układzie HILIC, ponieważ metanol zachowuje się podobnie do wody i konkuruje z nią podczas adsorpcji na polarnej powierzchni ziaren wypełnienia, tworząc wiązania wodorowe. Dotyczy to również, chociaż w mniejszym stopniu, innych alkoholi, takich jak etanol czy izopropanol. Pomimo bardzo dobrej mieszalności z wodą, ACN nie konkuruje z tą zaadsorbowaną na powierzchni ziaren wypełnienia, dlatego stosując ACN uzyskuje się największe różnice w selektywności. ACN w niektórych aplikacjach może być zastąpiony tetrahydrofuranem lub acetonem. Aceton ma podobną polarność jak ACN, jednak jego zastosowanie prowadzi do uzyskania niższej selektywności dla kolumn chromatograficznych oraz w wielu przypadkach obserwuje się skrócenie czasów retencji poszczególnych analitów. W przypadku stosowania detektorów UV należy mieć na uwadze fakt, że aceton absorbuje światło UV w zakresie typowym dla niektórych analitów 240–300 nm, co negatywnie wpływa na jakość otrzymywanych wyników.

2.3.1. Dodatki do faz ruchomych stosowanych w technice HILIC

Do rozdzielania analitów w technice HILIC często stosuje się takie dodatki do fazy ruchomej jak mrówczan amonu i octan amonu, których główną funkcją jest kontrola pH oraz siły jonowej roztworu. Rolą dodatków do fazy ruchomej jest najczęściej cofnięcie dysocjacji związków o charakterze jonowym. Zazwyczaj, im większe stężenie buforu tym mniejsza retencja analitów, jeśli wymiana jonowa jest jednym z mechanizmów retencji [73, 75, 76]. Jeśli nie występują oddziaływania jonowe, zwiększanie stężenia buforu może mieć odwrotny efekt – czas retencji poszczególnych związków wydłuża się [13]. W niektórych przypadkach rozdzielania np. sacharydów, oligosacharydów, alkoholi cukrowych stężenie buforu w fazie ruchomej jest zwykle małe (2-10 mM) lub bufor jest całkowicie pomijany [1, 33]. Mechanizm retencji oparty na wymianie jonowej pomiędzy analitem a fazą stacjonarną nie jest silnie zależny od pH stosowanych buforów, jednak można zauważyć znaczący wpływ pH buforu na selektywność układu chromatograficznego. Wysoka zawartość ACN w fazie ruchomej osłabia działanie buforu oraz wpływa na pH fazy ruchomej. Odczyn pH fazy ruchomej, której głównymi składnikami są bufor i ACN, jest trudny do ustalenia. Wykazano, że pH fazy ruchomej składającej się z mieszaniny mrówczanu amonu o pH=3 i ACN (skład mieszaniny 15/85 v/v), w warunkach panujących w kolumnie chromatograficznej przyjmowało wartość około 5,2 [13].

2.3.2. Rozpuszczalnik próbki

Podczas rozdzielania analitów w trybie HILIC rozpuszczalnik, w którym rozpuszczone są składniki próbki odgrywa istotną rolę. Mieszaniny o dużej zawartości wody (tym samym o wysokiej sile elucyjnej) mogą zakłócić mechanizm podziału analitów pomiędzy fazą stacjonarną (zaadsorbowaną na niej wodą) a fazą ruchomą. W przypadku dozowania do układu chromatograficznego próbek o dużej zawartości wody można łatwo zakłócić retencję analitów oraz rozdzielczość. Zaleca się, by maksymalna zawartość H₂O w rozpuszczalniku próbki wynosiła 50% [13]. Niestety, nie zawsze możliwe jest zastosowanie się do tego zalecenia, w szczególności w przypadku bardzo polarnych analitów, ponieważ istnieje ryzyko strącenia ich w próbce. W takich przypadkach ACN zastępuje się – przynajmniej częściowo – etanolem lub izopropanolem. Jeśli to możliwe, próbki powinny zawierać jak najmniej metanolu ze względu na zbyt silne oddziaływania konkurencyjne, o których wspomniano wcześniej. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika jest pewnego rodzaju kompromisem pomiędzy rozpuszczalnością analitów, zapewnieniem powtarzalnych czasów retencji a otrzymywanym kształtem pików.

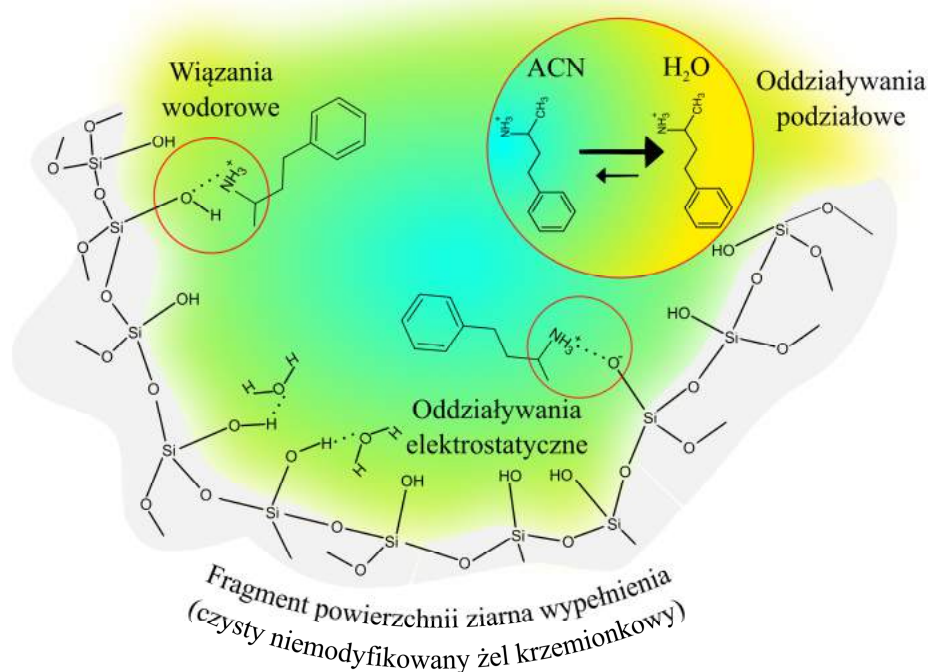
2.4. Mechanizmy retencji występujące w technice HILIC

Technika HILIC łączy w sobie właściwości trzech innych technik chromatograficznych, jednak najwięcej cech wspólnych upatruje się z techniką RPLC. Faza ruchoma charakteryzuje się dużą zawartością składnika organicznego (zazwyczaj >60%), a pozostała jej część to najczęściej bufor mrówczanowy lub octanowy. Bufor, którego głównym składnikiem jest woda, odpowiada za utworzenie warstwy eluentu o wysokiej zawartości wody skupionej wokół powierzchni ziaren fazy stacjonarnej oraz wewnątrz porów wypełnienia. Zjawisko to zostało zaobserwowane już w latach 70. ubiegłego wieku [3], jednak dopiero 20 lat później mechanizm ten stał się wykorzystywany podczas rozdzielania związków polarnych [4]. Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, anality o charakterze polarnym mają tendencję do dłuższego przebywania w zaadsorbowanej warstwie eluentu na powierzchni ziarna fazy stacjonarnej niż w fazie ruchomej [77, 78]. Ponadto, obecność wody jest niezbędna w celu uaktywnienia innych rodzajów interakcji, ponieważ to dzięki wodzie anality mogą się znaleźć wystarczająco blisko grup funkcyjnych modyfikatora fazy stacjonarnej. Ze względu na fakt, że na mechanizm retencji w chromatografii ciekłowej, a w tym w technice HILIC składają się różne rodzaje oddziaływań występujące pomiędzy analitami, fazą stacjonarną i fazą ruchomą trudno przewidzieć, które z nich będzie w przewadze, jednakże można wyróżnić następujące typy możliwych interakcji:

- oddziaływania hydrofilowe – powstają pomiędzy analitem zaadsorbowanym w warstwie eluentu o zwiększonej zawartości wody a fazą stacjonarną;
- oddziaływania wodorowe (wiązania wodorowe) – powstają pomiędzy cząsteczkami analitu i grupami funkcyjnymi fazy stacjonarnej, protonodonor – protonoakceptor;
- oddziaływania elektrostatyczne – powstają pomiędzy zjonizowanymi grupami funkcyjnymi analitu a grupami funkcyjnymi fazy stacjonarnej; są to słabe oddziaływania;
- oddziaływania van der Waalsa – powstają pomiędzy niepolarnymi grupami obecnymi w cząsteczce analitu a hydrofobowymi grupami funkcyjnymi modyfikującymi żel krzemionkowy (np. grupa aminopropylowa); nie prowadzą do trwałych połączeń.

Na rysunku 6 przedstawiono w sposób schematyczny mechanizm retencji amfetaminy na czystym żelu krzemionkowym, z uwzględnieniem trzech różnych typów od-

działywać pomiędzy fazą stacjonarną, zaadsorbowaną przy jej powierzchni warstwą eluentu o zwiększonej zawartości wody, analitem oraz fazą ruchomą (mniej hydrofilowa warstwa).



Rys. 6. Schemat mechanizmu retencji z wykorzystaniem techniki HILIC [79].

Wraz ze wzrostem zawartości ACN w fazie ruchomej, woda jest silniej adsorbowana na powierzchni fazy stacjonarnej np. żelu krzemionkowego. W takiej sytuacji rozpuszczalnik organiczny ma ograniczony kontakt z aktywną powierzchnią wypełnienia, zostawiając ją dostępną dla cząsteczek wody. Dzieje się tak do momentu, gdy zawartość składnika wodnego osiągnie około 20%, wówczas woda ma zdolność wypierania ACN z dostępu do powierzchni fazy stacjonarnej. Powyżej 20% zawartości składnika wodnego w fazie ruchomej przy powierzchni fazy stacjonarnej jest coraz więcej składnika organicznego [77, 80, 81]. Ponadto, w zależności od polarności fazy stacjonarnej zaadsorbowana warstwa eluentu o podwyższonej zawartości wody może mieć różną grubość. Obserwuje się także zjawiska warstwowania się składników fazy ruchomej. Oznacza to, że w układzie tym pojawia się wokół ziarna wypełnienia kilka warstw oraz mieszaniny ACN/H₂O wokół ziarna wypełnienia oraz kolejnych warstw [82]. Pomimo złożoności mechanizmu retencji analitów w układzie HILIC, a także występowania wielu odmiennych oddziaływań, kolejność elucji tych samych analitów z zastosowaniem różnych kolumn chromatograficznych

nie zmienia się istotnie. Związki eluują bowiem w zależności od masy cząsteczkowej i właściwości fizykochemicznych, a przede wszystkim polarności. Pozwala to w niewielkim stopniu przewidywać kolejność elucji, pod warunkiem, że znane są właściwości fizykochemiczne analitów. Należy wspomnieć, że interakcje takie, jak dipol-dipol czy wymiana jonowa mają istotny wpływ na zachowanie analitu, który znajduje się w fazie ruchomej [13, 77].

W przypadku zastosowania kolumn wypełnionych czystym żelem krzemionkowym występują głównie wymienione wcześniej trzy rodzaje oddziaływań. W zależności od składu i pH fazy ruchomej, właściwości fizykochemicznych analitów oraz rodzaju użytego wypełnienia w układzie HILIC mogą przeważać różne rodzaje interakcji analit – faza stacjonarna – faza ruchoma [77, 81]. Wyższe pH fazy ruchomej intensyfikuje jonizację grup silanolowych na powierzchni żelu krzemionkowego, powodując zwiększenie zdolności fazy stacjonarnej do wymiany kationowej, co można wykorzystać podczas rozdzielania związków o charakterze zasadowym. Związki takie zazwyczaj są silnie zatrzymywane na powierzchni żelu krzemionkowego poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływanie jonowymienne. Symetria pików związków o charakterze zasadowym rozdzielanych z wykorzystaniem techniki HILIC często jest lepsza od symetrii pików dla tych samych związków rozdzielanych w układzie RPLC [13]. Niektóre typy wypełnienia, np. sulfobetaina, mogą wykazywać oddziaływania jonowe dwóch typów: oddziaływania pomiędzy analitem a grupą sulfonową lub pomiędzy analitem a aminą czwartorzędową. Zastosowanie buforu może ograniczać oddziaływania jonowe, a mechanizm retencji będzie opierał się na podziale ciecz-ciecz. Podobny efekt ma dodatek kwasu mrówkowego lub octowego, który może ograniczać wymianę jonową między analitem a fazą stacjonarną [54, 83]. Natomiast żel krzemionkowy modyfikowany grupami pentafluorofenyłowymi, w niewielkim stopniu oferuje oddziaływania ciecz-ciecz, opierając mechanizm retencji na wymianie jonowej [40, 84]. Istotnym czynnikiem, wpływającym na mechanizm retencji, jest zastosowanie do faz ruchomych dodatków, takich jak bufony lub kwasy organiczne. Dodatki te powodują, że mechanizm retencji staje się bardziej skomplikowany [85]. Dzieje się tak dlatego, że jony konkurują między sobą o dostęp do powierzchni fazy stacjonarnej. Zakres, w którym dominują poszczególne rodzaje interakcji zależy od typu fazy stacjonarnej, stężenia użytego buforu, rodzaju rozpuszczalnika organicznego i pH fazy ruchomej. Dlatego też podczas optymalizacji warunków chromatograficznych należy sprawdzić szereg poszczególnych parametrów, które mogą mieć wpływ na retencję oraz kształt otrzymywanych pików.

2.5. Wpływ poszczególnych czynników wpływających na retencję

2.5.1. Skład fazy ruchomej

Głównymi składnikami fazy ruchomej pozostają ciągle wodny roztwór buforu oraz ACN. O stopniu rozdzielania poszczególnych składników mieszaniny decyduje przede wszystkim zawartość wody w fazie ruchomej. Nawet niewielka – kilkuprocentowa zmiana zawartości wody w fazie ruchomej – powoduje znaczące różnice w retencji rozdzielanych polarnych związków. Zazwyczaj w celu rozdzielania związków o niskiej polarności, zawartość wody nie przekracza 5%. W niektórych przypadkach dopuszcza się niższe zawartości (2–3%), jednak taki skład fazy ruchomej wymaga długiej stabilizacji kolumny chromatograficznej po ukończonej analizie – jeśli stosowana była elucja gradientowa. W niektórych aplikacjach woda może być wyeliminowana całkowicie lub częściowo przez polarny rozpuszczalnik organiczny, np. metanol lub etanol [86]. Takie rozwiązanie stwarza nowe problemy ze względu na ograniczenia w rozpuszczalności soli buforowych w składnikach organicznych fazy ruchomej. Woda bez dodatku buforu lub kwasu jako składnik nieorganiczny jest używana dość rzadko. Stosując kolumny chromatograficzne z wypełnieniem porowato-rdzeniowym, możliwe jest rozdzielanie sacharydów z wykorzystaniem czystej wody jako składnika fazy ruchomej lub buforu, którego stężenie nie przekracza 2 mM [33]. Zastosowanie buforu pozwala kontrolować retencję analitów, jeśli faza stacjonarna (np. typu pentadiol) ma charakter niejonowy lub oddziaływania elektrostatyczne są niewielkie. W takim przypadku retencja związków zazwyczaj maleje wraz ze stężeniem użytego buforu, co spowodowane jest zwiększonym udziałem interakcji typu ciecz-ciecz. Odpowiedzialnym za ten fakt jest efekt wysalania (wysycenia fazy stacjonarnej solą buforową). Możliwość tworzenia się wiązań wodorowych lub oddziaływań jonowych pomiędzy analitem a fazą stacjonarną jest ograniczona [7, 75, 87, 88]. Teoria ta jest sprzeczna z tym, co można znaleźć w niektórych doniesieniach naukowych, mianowicie, zwiększenie zawartości buforu w fazie ruchomej zwiększa objętość tworzonej warstwy hydrofilowej wokół ziaren wypełnienia, co może spowodować zwiększenie czasu retencji eluowanych związków [54, 83].

2.5.2. Bufory jako dodatki do fazy ruchomej

Jak już wspomniano, czysta woda jest rzadko używana jako składnik fazy ruchomej. Dużo częściej składnikiem wodnym fazy ruchomej używanym w technice HILIC są roztwory buforowe. Powszechne zastosowanie ze względu na swoją lotność znajduje bufor

mrówczanowy oraz octanowy. Powoduje to w konsekwencji, że sole te można stosować w układach chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrami mas. Rzadziej stosowane są nietłone bufony cytrynianowe, fosforanowe czy boranowe.

Bufor obecny w fazie ruchomej zazwyczaj zmniejsza oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy analitem a fazą stacjonarną [41, 87, 88], pozwalając, by w układzie HILIC mogły dominować inne mechanizmy retencji. Jednak te same bufony mogą mieć również działanie odwrotne i mogą zmniejszać retencję związków, jeśli faza stacjonarna ma charakter jonowy (np. sulfobetaina) lub częściowo jonowy (-SiOH, -NH₂). Istnieje hipoteza, że oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy analitem a fazą stacjonarną są zakłócone poprzez działanie jonów pochodzących od buforu [2, 71].

Istotną rolę w rozdzielaniu analitów odgrywa pH buforu, które może być kontrolowane za pomocą dodatku jednego ze składnika danej soli. Zazwyczaj pH buforów mrówczanowych i octanowych kontroluje się poprzez dodanie odpowiedniego kwasu do ustalenia żądanej wartości. Bufory o pH powyżej 8 są stosowane tylko z kolumnami chromatograficznymi o wypełnieniu polimerowym, np. ZIC-pHILIC, gdzie nie istnieje ryzyko rozpuszczenia fazy stacjonarnej.

W zależności od pH fazy ruchomej anality mogą przybierać formę zdysocjowaną lub niezdisocjowaną, jednak – jak wspomniano wcześniej – dokładny pomiar pH fazy ruchomej jest utrudniony ze względu na wysoką zawartość składnika organicznego. Można powiedzieć, że rola buforu jest dwojaka: bufor może w dużym stopniu ograniczyć występowanie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy analitem a fazą stacjonarną, bufor może także kontrolować charakter analitów (forma zdysocjowana lub nie). Udowodniono, że niektóre anality o charakterze kwasowym nie wykazują wystarczającej retencji z zastosowaniem buforów mrówczanowych. Jednak są silnie zatrzymywane na złożu po zmianie buforu na wodny roztwór kwasu trifluorooctowego [72, 89]. Podejrzewa się, że jest to możliwe ze względu na ograniczenie odpychania pomiędzy analitami a zdysocjowanymi grupami silanolowymi. W przypadku sacharydów dodatek kwasu mrówkowego do fazy ruchomej zamiast buforu mrówczanowego (kolumna: żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi) znacząco poprawił kształt pików, natomiast w niewielkim stopniu wpłynął na czas retencji [59]. Prawdopodobnie, jony pochodzące od kwasu utrudniają dostęp do grup funkcyjnych żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami aminopropylowymi, przez co mogą ograniczać oddziaływania jonowe.

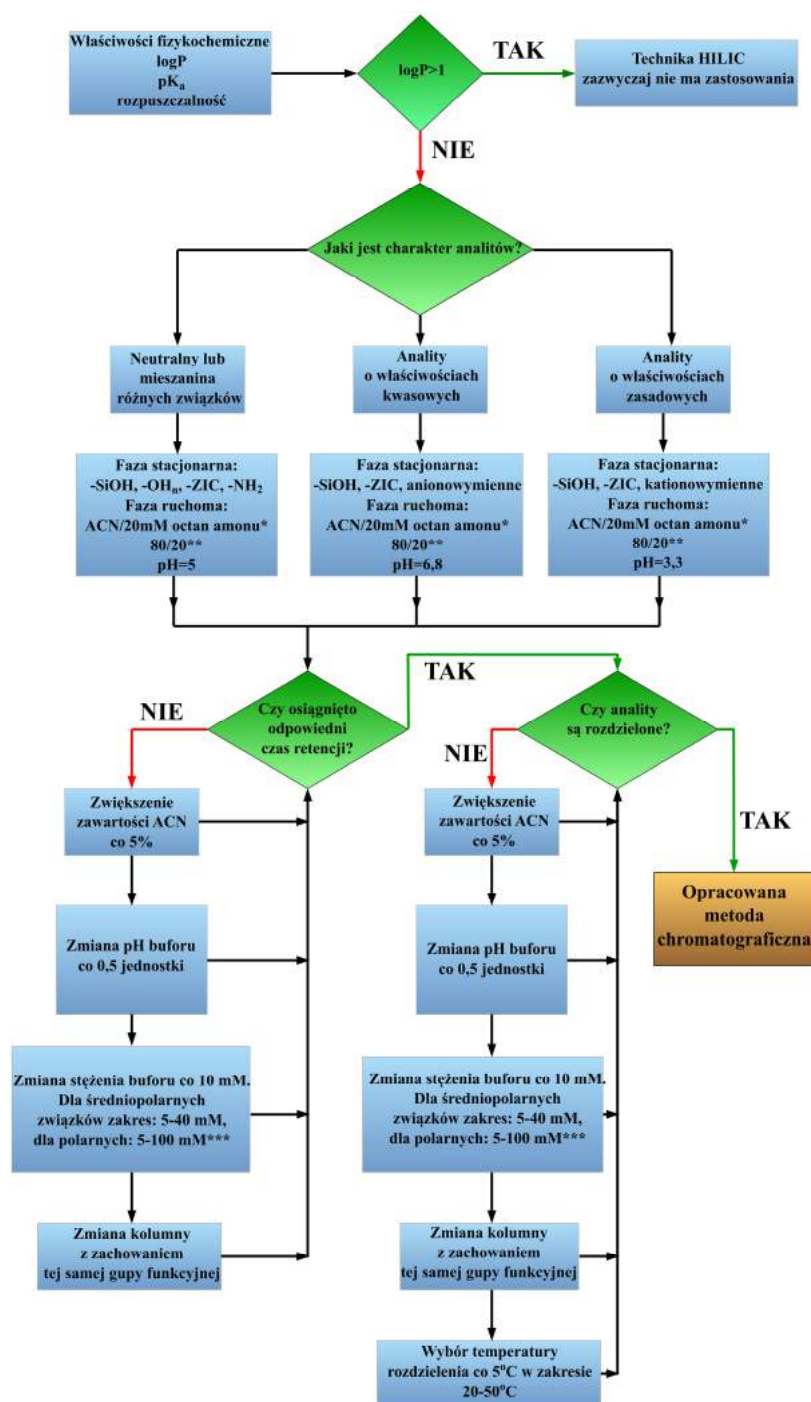
2.5.3. Temperatura

Temperatura termostatowania kolumny chromatograficznej w chromatografii cieczowej a zwłaszcza w technice HILIC ma istotny wpływ na czas retencji analitów oraz kształt otrzymywanych pików. Spora część związków o charakterze jonowym jest wrażliwa na zmiany temperatury, co wiąże się z otrzymywanym kształtem pików, a także w niewielkim stopniu oddziałuje na czas retencji. Wpływ temperatury na selektywność rozdzielania można zaobserwować dla mieszanin związków, które różnią się istotnie pod względem wielkości oraz kształtu cząsteczki oraz, jak już wspomniano, mają charakter jonowy lub są częściowo zdysocjowane [90]. W przeciwieństwie do rozdzielania z wykorzystaniem techniki RPLC, w technice HILIC zwiększenie temperatury termostatowania kolumny nie wpływa znacząco na czas retencji związków oraz kolejność ich elucji. Może mieć jednak wpływ na kształt otrzymywanych pików. W przypadku zastosowania rozdzielania z wykorzystaniem techniki RPLC zwiększenie temperatury ma związek z tym, że zmniejsza się lepkość fazy ruchomej i szybkość wymiany masy, co powoduje, że skraca się czas retencji analitów. Dzieje się tak ze względu na bardziej jednolity proces adsorpcji-desorpcji. Parametry te wpływają na mechanizm interakcji pomiędzy analitem a fazą stacjonarną [91, 92].

Podczas optymalizacji warunków chromatograficznych w trybie HILIC, temperatura bywa często pomijanym parametrem i zazwyczaj rozdzielanie przeprowadza się w temperaturze około 30°C. Jednak, należy mieć na uwadze fakt, że jest to ważny parametr optymalizacyjny [54]. Przykładem ilustrującym wpływ temperatury prowadzenia rozdzielania chromatograficznego na wynik analizy chromatograficznej może być analiza krystalicznej glukozy, która ulega tautomeryzacji, jeśli zostaje rozpuszczona w wodzie. W zależności od temperatury powstaje mieszanina kilku jej form, np. α -glukopiranoza i β -glukopiranoza [93]. W temperaturze $<15^{\circ}\text{C}$ obie główne formy (α - i β -glukopiranoza) mogą być rozdzielone z wykorzystaniem techniki HILIC [34, 87]. Natomiast zwiększenie temperatury $>15^{\circ}\text{C}$ powoduje, że piki zaczną koeluować. Dalsze zwiększanie temperatury powoduje otrzymanie jednego piku bez możliwości rozróżnienia form tautomerycznych [59, 94]. Temperatura termostatowania kolumny ma wpływ nie tylko na formę analitu w jakiej on występuje, ale oddziałuje też na proces transportu masy pomiędzy fazą ruchomą a fazą stacjonarną [95]. Uzyskanie węższych pików w podwyższonej temperaturze można wyjaśnić zwiększoną dyfuzją analitów. Natomiast niewielkie zmiany w czasie retencji analitów wraz ze wzrostem temperatury są trudne do wy tłumaczenia.

2.6. Opracowanie metod opartych na wykorzystaniu techniki HILIC

Opracowanie metody chromatograficznej opartej na wykorzystaniu techniki HILIC wymaga od analityka przeprowadzenia wieloetapowej optymalizacji warunków analizy. Na rysunku 7 przedstawiono schemat blokowy algorytmu umożliwiającego opracowanie optymalnych warunków pracy układu chromatograficznego typu HILIC.



* zamiast octanu amonu używa się również często mrówczanu amonu. Należy dobrać odpowiednią sól buforową doświadczalnie.

** w celu sprawdzenia, czy anality wymywają się całkowicie ze złoża kolumny przed optymalizacją metody, należy użyć mieszaniny ACN/woda 60/40 v/v i zadozować próbkę mieszaniny wzorcowej analitów w warunkach elucji izokratycznej.

*** wysoka zawartość buforu (powyżej 40–50 mM) nie jest zalecana dla detektorów, gdzie stosowana jest komora rozpylająca, np. spektrometr mas czy laserowy detektor światła rozproszonego

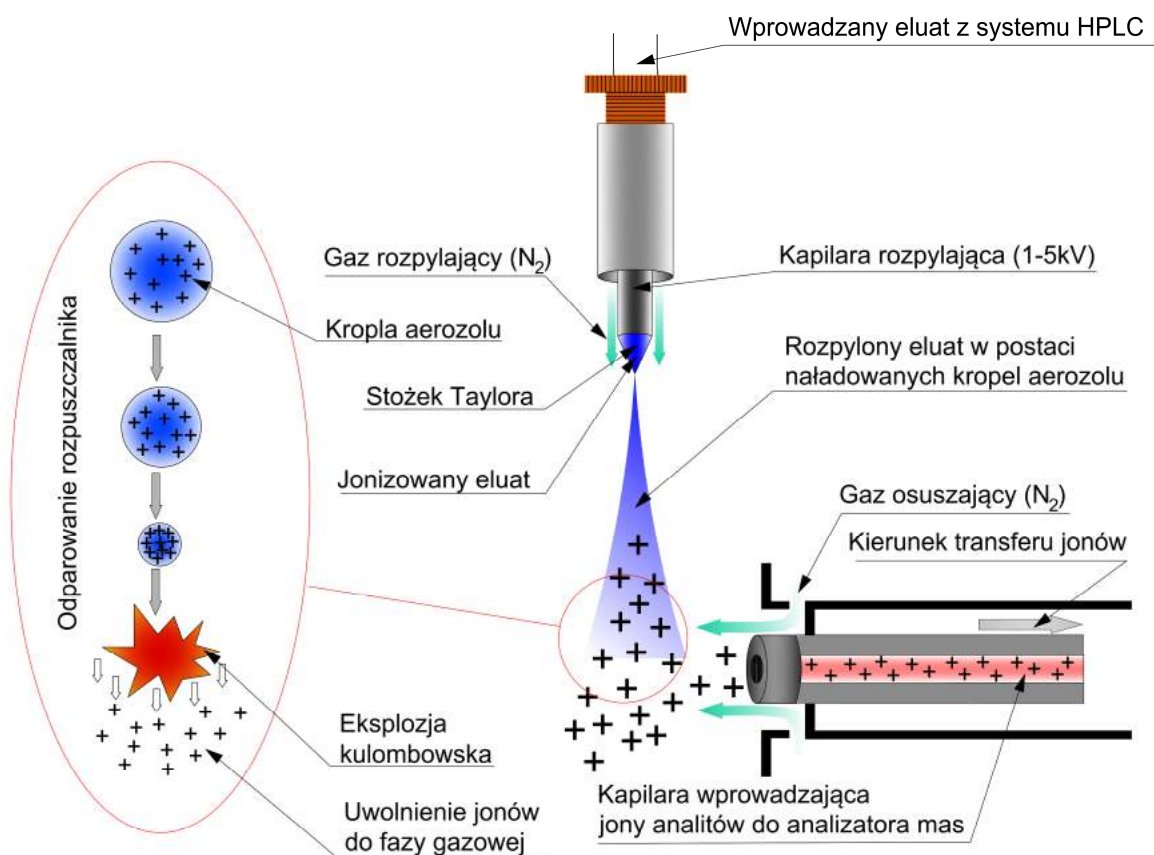
Rys. 7. Schemat blokowy algorytmu pozwalającego na wybór optymalnych warunków metody chromatograficznego rozdzielania analitów z wykorzystaniem techniki HILIC.

Dobór optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego analitów z wykorzystaniem techniki HILIC, to trudne i wieloetapowe zadanie. Opracowanie metody chromatograficznej, uwzględniającej rodzaje i charakter oddziaływań pomiędzy analitami a fazą stacjonarną, wymaga potwierdzenia przyjętych założeń na drodze doświadczalnej. Pierwszym krokiem analityka jest wybór kolumny chromatograficznej wypełnionej właściwą fazą stacjonarną. Już ten pierwszy krok jest tym trudniejszy im anality wchodzące w skład rozdzielanej mieszaniny mają bardziej zróżnicowany charakter. Kolejnym etapem jest dobranie optymalnego objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej. Stwierdzono doświadczalnie, że kolumny chromatograficzne z wypełnieniem typu czysty żel krzemionkowy mają szerszy zakres optymalnych natężeń przepływów niż kolumny ze złożem typu żel krzemionkowy modyfikowany grupami sulfobetainowymi czy fosforylocholinowymi. Następnie ustala się skład fazy ruchomej, zazwyczaj zwiększając stopniowo (zwykle co 5%) zawartość składnika organicznego. W zależności od typu wypełnienia oraz grubości tworzącej się wokół ziaren wypełnienia warstwy eluentu o zwiększonej zawartości wody, minimalna zawartość wody w fazie ruchomej wynosi od 3 do 5%. W przypadku mieszaniny analitów najczęściej stosuje się elucję gradientową, zaczynając od 95% zawartości ACN w wodzie. Jego zawartość utrzymuje się na stałym poziomie przez pierwsze 2 minuty analizy, po czym stopniowo zmniejsza się jego zawartość w fazie ruchomej do 60–70% w ciągu 10 minut. Podany przykład dotyczy kolumny chromatograficznej o długości 100 mm. Stosowanie elucji gradientowej wymusza potrzebę stabilizacji kolumny chromatograficznej po każdej analizie, co znacząco wydłuża całkowity czas trwania procesu optymalizacyjnego. Możliwe jest wzmocnienie siły elucyjnej organicznego składnika fazy ruchomej przez dodatek izopropanolu lub rzadziej – metanolu (nie więcej niż 20%). W efekcie wiąże się to ze skróceniem czasu retencji silnie polarnych związków zazwyczaj kosztem kształtu pików. Kolejne etapy w optymalizacji warunków rozdzielania dotyczą stężenia buforu oraz ustalenia pH fazy ruchomej. Przeważnie to ten etap jest najbardziej praco- i czasochłonny, ponieważ wymaga przygotowania wielu odpowiednich mieszanin faz ruchomych oraz przeprowadzenia optymalizacji warunków chromatograficznych z ich użyciem. Zmiana jednego składnika (buforu, jego stężenia lub pH) wymusza powtórny optymalizację elucji gradientowej ze względu na zmianę warunków panujących w kolumnie chromatograficznej. Ostatnim etapem optymalizacji jest dobór temperatury termostataowania kolumny chromatograficznej (w zakresie 20–50°C), która może mieć wpływ na mechanizm rozdzielania analitów oraz kształt pików.

2.7. Technika HILIC-ESI-MS jako narzędzie analityczne

Technika HILIC dedykowana analizie chromatograficznej związków polarnych, hydrofilowych i jonowych znakomicie sprawdza się w połączeniu z niezwykle popularną obecnie detekcją MS. Wysoka zawartość składnika organicznego w fazie ruchomej sprzyja powstawaniu jonów, gdyż tworzące się w komorze do elektrorozpylania (ESI) krople aerozolu charakteryzują się małymi średnicami. Zastosowanie różnych dodatków do faz ruchomych w postaci soli czy kwasów, które to mają korzystny wpływ na rozdzielanie chromatograficzne, może równocześnie negatywnie wpływać na proces tworzenia jonów w źródle spektrometru mas. W niniejszym rozdziale zostanie omówiony wpływ rozpuszczalników używanych w technice HILIC na tworzenie jonów w źródle typu ESI.

Schemat tworzenia się jonów analitu w komorze jonizacyjnej typu ESI przedstawiono na rysunku 8.



Rys. 8. Schemat tworzenia się jonów analitu w komorze jonizacyjnej typu ESI.

W celu zrozumienia procesu tworzenia jonów w źródle należy wspomnieć o rozpuszczalności analitów w fazie ruchomej, która w przypadku techniki HILIC najczęściej jest mieszaniną wody oraz ACN. Rozpuszczanie substancji to jej zdolność do oddziaływania z rozpuszczalnikiem poprzez słabe oddziaływania międzycząsteczkowe i dążenie układu rozpuszczalnik – substancja rozpuszczana do osiągnięcia jak najwyższej entropii i jak najniższej energii wewnętrznej. Każda mieszanina (rozpuszczalnik oraz analit) posiada określoną lepkość oraz ciśnienie pary nasyconej. W przypadku faz ruchomych (wodnych mieszanin rozpuszczalników organicznych) wykorzystywanych w technice HILIC lepkość oraz ciśnienie pary nasyconej są niższe niż dla faz ruchomych wykorzystywanych w technice RPLC. Dzięki temu wytworzenie kropli aerozolu jest i jej odparowanie w komorze jonizacyjnej są łatwiejsze. Mieszanina składająca się z fazy ruchomej oraz analitów jest rozpylana w komorze źródła zaraz u wylotu kapilary, do której przyłożone jest napięcie (zazwyczaj od 1 do 5 kV). Eluat opuszczający kapilarę tworzy stożek Taylora, składający się z naładowanych dodatnio lub ujemnie (zależnie od trybu jonizacji) kropeł aerozolu. Krople aerozolu nabierają ładunku po czym są przyciągane przez elektrodę o przeciwnym ładunku. Równanie (7.1) opisuje natężenie pola elektrycznego (E_p) z uwzględnieniem parametrów źródła w celu utworzenia naładowanych kropeł aerozolu [96-98].

$$E_p = 2 \frac{V_p}{r} \ln \left(\frac{4d}{r} \right) \quad (7.1)$$

Gdzie:

E_p – natężenie pola elektrycznego,

V_p – napięcie przyłożone do kapilary,

r – średnica kapilary,

d – odległość od elektrody.

Natężenie pola elektrycznego niezbędne do utworzenia naładowanych kropeł aerozolu jest zależne od napięcia V_p . Natomiast minimalne napięcie pola elektrycznego, niezbędnego do utworzenia naładowanych kropeł aerozolu (V_{min}) opisuje równanie (7.2).

$$V_{min} \approx 2 \times 10^5 \sqrt{\gamma r} \times \ln \left(\frac{4d}{r} \right) \quad (7.2)$$

Gdzie:

V_{min} – minimalna wartość napięcia niezbędnego do utworzenia naładowanych kropeł aerozolu,

γ – napięcie powierzchniowe eluatu

Jak wynika z równania (7.2), wartość V_{\min} jest zależna od napięcia powierzchniowego eluatu, dlatego w celu utworzenia naładowanych kropeł aerozolu wartość V_{\min} wzrasta wraz ze wzrostem wartości napięcia powierzchniowego eluatu. W technice HILIC, przeważającym składnikiem fazy ruchomej jest ACN, dlatego wymagane napięcie (V_{\min}) jest mniejsze niż w przypadku techniki RPLC, w której głównym składnikiem eluatu jest najczęściej woda. W miarę odparowywania rozpuszczalnika w podwyższonej temperaturze (150–650°C) i atmosferze gazu osuszającego (N_2) krople zmniejszają swoją objętość. W pewnym momencie następuje eksplozja kulombowska – naładowane cząsteczki wchodzące w skład kropli aerozolu odpychają się od siebie, podczas gdy siły napięcia powierzchniowego starają się utrzymać kroplę w całości. Średnica kropli r_k jest proporcjonalna do gęstości eluatu, liniowej prędkości przepływu strumienia mieszaniny fazy ruchomej oraz analitów, a także napięcia powierzchniowego, zgodnie z równaniem (7.3).

$$r_k \propto \sqrt{\rho\mu^2\gamma} \quad (7.3)$$

Gdzie:

r_k – średnica kropli aerozolu,

ρ – gęstość eluatu,

μ – liniowa prędkość przepływu strumienia fazy ruchomej.

Można by się spodziewać, że w celu zwiększenia liczby jonów analitów trafiających do komory jonizacyjnej należy zwiększyć odpowiednio wartość przepływu strumienia fazy ruchomej. Jednak efekt takiego działania jest odwrotny od zamierzonego. Liczba analitów trafiających do komory ESI co prawda zwiększa się, ale jednocześnie powstają większe krople aerozolu, które trudniej odparować, a w związku z tym później ulegają one eksplozji kulombowskiej. Innymi słowy, trudniej odparować większą ilość rozpuszczalnika trafiającego do źródła typu ESI. Powstają tym mniejsze krople aerozolu, im mniejsze są wartości gęstości oraz napięcia powierzchniowego. W technice HILIC głównym składnikiem jest ACN, który znacząco obniża zarówno gęstość, jak i wartość napięcia powierzchniowego eluatu, dlatego można oczekiwać większej efektywności jonizacji analitów. Ponadto szybkość, z jaką odparowuje rozpuszczalnik z kropli aerozolu, jest zależna od prężności par danego rozpuszczalnika, co po raz kolejny przemawia na korzyść faz ruchomych stosowanych w technice HILIC [99]. Granica stabilności Rayleigha (równanie 7.4) opisuje wartość ładunku, jaka jest potrzebna, by pokonać napięcie powierzchniowe kropli aerozolu w celu powstania eksplozji kulombowskiej [100].

$$Q_R^2 = 64\pi^2 \varepsilon_0 \gamma R_R^3 \quad (7.4)$$

Gdzie:

Q_R – wartość ładunku powierzchniowego kropli aerozolu potrzebna do przewyciężenia napięcia powierzchniowego,

ε_0 – przenikalność elektryczna próżni $8,84 \cdot 10^{-12}$ F/m,

R_R – średnica kropli aerozolu, która ma odpowiedni ładunek w celu osiągnięcia granicy stabilności Rayleigha.

Dla MeOH ($\gamma=0,0226$ N/m²), ACN ($\gamma=0,030$ N/m²) oraz wody ($\gamma=0,073$ N/m²) wartości Q_R wynoszą odpowiednio: $Q_{R,MeOH}=1,12 \cdot 10^{-5} R_R^3$, $Q_{R,ACN}=1,29 \cdot 10^{-5} R_R^3$ i $Q_{R,woda}=2,02 \cdot 10^{-5} R_R^3$. Można zauważyć, że wartość ładunku powierzchniowego w przypadku wody jest blisko dwukrotnie wyższa od wartości ładunku dla MeOH oraz ACN. Oznacza to, że kropla aerozolu musi posiadać wyższy ładunek w celu wystąpienia eksplozji kulombowskiej. Innymi słowy, krople o takiej samej objętości, ładunku oraz składające się głównie z MeOH lub ACN rozpadną się wcześniej, podczas gdy krople składające się z wody rozpadają się później. Rozpad kropli w celu uwolnienia jonów można przyspieszać lub opóźniać poprzez regulację temperatury źródła oraz przepływu gazu suszającego i rozpylającego. Jednak wraz ze wzrostem temperatury istnieje ryzyko, że anality ulegną rozpadowi zanim przejdą do stanu gazowego jako jony. Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na ilość utworzonych jonów jest zawartość dodatków w fazie ruchomej, pełniących rolę elektrolitów. Ich zadaniem jest przede wszystkim zapewnienie przewodnictwa elektrycznego oraz zmniejszenie napięcia powierzchniowego kropli aerozolu. Mechanizm odparowania rozpuszczalnika w źródle typu ESI przewiduje również rozpad większych kropel na mniejsze [98].

Uważa się, że niewielkie cząsteczki uwalniane są w postaci jonów z naładowanych kropel aerozolu zgodnie z jonowym modelem odparowania (*Ion Evaporation Model* – IEM). Model ten zakłada, że w pewnym momencie w dostatecznie małej kropli aerozolu gęstość ładunku przekracza energię solwatacji jonu analitu, co powoduje uwolnienie jonu do fazy gazowej [101]. Duże cząsteczki, takie jak białka lub polimery, uwalniane są do fazy gazowej w postaci jonów zgodnie z modelem naładowanych pozostałości (*Charge Residue Model* – CRM). Rozpuszczalnik z kropli aerozolu jest odparowywany dopóki nie pozostanie tylko jon analitu, który jest uwalniany do fazy gazowej [102, 103]. Opierając się na modelu IEM, można się spodziewać, że związki hydrofilowe chętniej ulegną jonizacji, kiedy głównym rozpuszczalnikiem jest rozpuszczalnik organiczny, np. ACN, co ma miejsce w przypadku zastosowania techniki HILIC. Odwrotna sytuacja ma miejsce z za-

stosowaniem techniki RPLC, gdzie głównym składnikiem eluatu jest woda, która faktycznie stwarza środowisko niesprzyjające rozpuszczalności związków o charakterze hydrofobowym. Jednak, jak już wspomniano wcześniej, wodne mieszaniny tworzące krople aerozolu trudniej odparować w komorze jonizacyjnej. W przypadku gdy głównym składnikiem eluatu jest MeOH lub ACN związki o charakterze hydrofobowym trudniej ulegają jonizacji, ponieważ opuszczają środowisko sprzyjające ich rozpuszczalności [99, 104]. Rola rozpuszczalników wchodzących w skład fazy ruchomej jest niezwykle ważna podczas tworzenia i uwalniania jonów analitów, tak samo jak zawartość dodatków oraz wartości objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej. Fizykochemiczne parametry mieszaniny rozpuszczalników decydują o wielkości kropli, stopniu odparowania oraz rozpadzie krolek aerozolu. Dodatkowo należy wspomnieć o konieczności optymalizacji parametrów źródła jonów, które mają wpływ na liczbę analitów, które ulegną jonizacji.

Technika HILIC–ESI–MS może być efektywnym narzędziem analitycznym wykorzystywanym w analizie jakościowej oraz ilościowej związków polarnych oraz średnio-polarnych. W przypadku rozdzielania złożonych mieszanin należy mieć na uwadze fakt, że optymalne warunki chromatograficznego rozdzielania analitów nie zawsze są optymalnymi warunkami detekcji z użyciem spektrometru mas. Najczęściej głównym składnikiem fazy ruchomej w technice HILIC jest rozpuszczalnik organiczny, dlatego w połączeniu ze spektrometrią mas, stwarza sprzyjające warunki jonizacji analitów.

2.8. Sposoby rozwiązywania problemów w trakcie stosowania techniki HILIC

Technika HILIC w porównaniu do techniki RPLC ma wiele zalet, nie jest jednak pozbawiona wad. Główną wadą techniki HILIC jest ścisły związek z praktycznie jedynym głównym składnikiem organicznym fazy ruchomej jakim jest ACN. Co prawda w niektórych przypadkach ACN można zastąpić acetonem [105-107], jednak aceton nie może być stosowany tam, gdzie są używane detektory typu UV-Vis ze względu na występowanie wysokiego poziomu tła pochodzącego od tego rozpuszczalnika. Problemami występującymi podczas rozdzielania substancji w trybie HILIC są: elucja związków w czasie martwym, koelucja dwóch lub więcej związków w tym samym czasie, niepowtarzalne czasy retencji oraz niegaussowski kształt otrzymywanych pików (ogonowanie). W tabeli 2 zestawiono informacje o najczęstszych, spotykanych w trakcie wykorzystywania techniki HILIC problemach, prawdopodobne ich przyczyny oraz sposoby rozwiązania powstałych problemów.

Tabela 2. Najczęstsze problemy chromatograficzne, ich prawdopodobne przyczyny oraz sposoby rozwiązywania problemów obserwowanych w technice HILIC.

Mała/brak retencji analitów	
Przyczyna	Rozwiązanie
Niewłaściwa faza stacjonarna	W celu uzyskania retencji związków należy znać podstawowe właściwości fizykochemiczne analitów. Dla związków o charakterze kwasowym odpowiednie będą np. kolumny wypełnione złożem oferującym oddziaływania anionowymienne, a dla związków o charakterze zasadowym kolumny z wypełnieniem o charakterze kationowym. Należy dobrać wartość pH buforu w taki sposób, by analit/anality były w stanie zdysocjowanym w roztworze. Należy mieć na uwadze fakt, że pH buforu może zmieniać również właściwości fazy stacjonarnej – grupy funkcyjne fazy ruchomej również powinny być w formie zdysocjowanej.
Zbyt duża zawartość wody w fazie ruchomej	Należy zwiększyć zawartość składnika organicznego w fazie ruchomej. Minimalna zawartość wody w fazie ruchomej wynosi odpowiednio 3% (dla mniej polarnych faz stacjonarnych) oraz 5% (dla bardziej polarnych faz stacjonarnych). Jeśli jest stosowana elucja gradientowa, należy przez okres minimum dwukrotnie dłuższy niż czas martwy zastosować elucję izokratyczną, np. 5% składnika wodnego oraz 95% składnika organicznego.
Niewłaściwy bufor	W zależności od stosowanego buforu należy wymienić mrówczan amonu na octan amonu lub odwrotnie. Po czym optymalizuje się warunki rozdzielania.
Niepowtarzalny czas retencji	
Niewłaściwe pH buforu	Jeśli wartość pH buforu jest bliska wartości pKa analitu, może to powodować otrzymywanie niepowtarzalnego czasu retencji. Jeśli to możliwe, należy wymienić stosowany bufor na taki o pH o 0,5 jednostki większej i/lub mniejszej. Możliwa jest również zmiana stosowanego buforu.

Tabela 2. c.d.

Zanieczyszczenia w kolumnie	Niepowtarzalny czas retencji lub zmiana rozdzielczości może wskazywać na obecność zanieczyszczeń w kolumnie chromatograficznej. Podwyższone ciśnienie pracy kolumny chromatograficznej może wskazywać na zanieczyszczenie filtra lub przedkolumny. Odwróconą kolumnę chromatograficzną należy przepłukać odpowiednią mieszaniną wody oraz rozpuszczalnika organicznego (około 10–20 objętości). Skład mieszaniny jest zależny od typu kolumny, a producent umieszcza informacje, jakiego składu mieszaniny należy użyć. Jeśli jest stosowana przedkolumna, należy ją wymienić.
Kolumna nie jest ustabilizowana po elucji gradientowej	Kolumny chromatograficzne pracujące w trybie HILIC zazwyczaj potrzebują więcej czasu na stabilizację warunków pracy niż te pracujące w trybie RPLC. Proces tworzenia warstwy eluentu o zwiększonej zawartości wody wokół ziaren wypełnienia jest dość powolny. Również podczas elucji izokratycznej należy upewnić się, że silnie polarne zanieczyszczenia pochodzące z próbki są wymyte. Mimo to nie zaleca się stosowania 100% wodnych składników fazy ruchomej do płukania kolumny. Czas stabilizacji jest specyficzny dla danej kolumny i wynosi odpowiednio 1-2 min stabilizacji na 1 cm kolumny chromatograficznej. Stabilizację można przyspieszyć, stosując duże objętościowe natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej.
Niegaussowskie piki	
Przewaga polarnego rozpuszczalnika próbki	Rozpuszczalnikiem próbki powinien być ten o mniejszej sile elucyjnej, jednak w takiej zawartości by nie powodować wytrącania analitów. Zawartość wody powinna być utrzymywana na jak najniższym poziomie. Wyższa zawartość wody (powyżej 30%) powoduje zakłócenie oddziaływań pomiędzy fazą stacjonarną a analitami, co przekłada się na ogonowanie pików, zmniejszenie czasów retencji oraz zmniejszenie rozdzielczości.
Niewłaściwa objętość dozowanej próbki	Możliwe jest przeładowanie kolumny, dlatego należy pamiętać o ograniczeniach w objętościach, jakie mogą być nastrzykiwane z wykorzystaniem kolumn pracujących w trybie HILIC. Zalecane objętości: kolumny o średnicy wewnętrznej 2.1 mm: 0,5-5 μ L; 4.6 mm: 5-40 μ L. Innymi słowy, objętość wprowadzanej próbki powinna być jak najmniejsza, szczególnie, kiedy woda jest jednym ze składników rozpuszczalnika próbki.
Niewłaściwe stężenie buforu	Niskie stężenie buforu może powodować występowanie drugorzędowych i niepożądanych rodzajów oddziaływań, np. słabych oddziaływań elektrostatycznych. Podwyższenie stężenia buforu może sprzyjać poprawieniu się kształtu piku, czasem kosztem zmniejszonej intensywności, kiedy stosowany jest spektrometr mas jako detektor.

Zrozumienie mechanizmów retencji analitów oraz wpływu parametrów chromatograficznych na retencję i kształt pików pozwala skorzystać z zalet, jakie oferuje technika HILIC. Kamieniem milowym w rozwoju techniki HILIC było wykorzystanie technologii umożliwiającej uzyskanie ziaren porowato-rdzeniowych, która pozwoliła zminimalizować problem rozmytych i ogonujących pików [22, 108]. Największe wady techniki HILIC to względnie długi czas stabilizacji kolumny chromatograficznej oraz możliwość występowania niepożądanych rodzajów oddziaływań (analit – faza stacjonarna). Jednakże ten mankament może stać się zaletą techniki, ponieważ optymalizacja warunków chromatograficznych umożliwia wybór pożądanego mechanizmu interakcji.

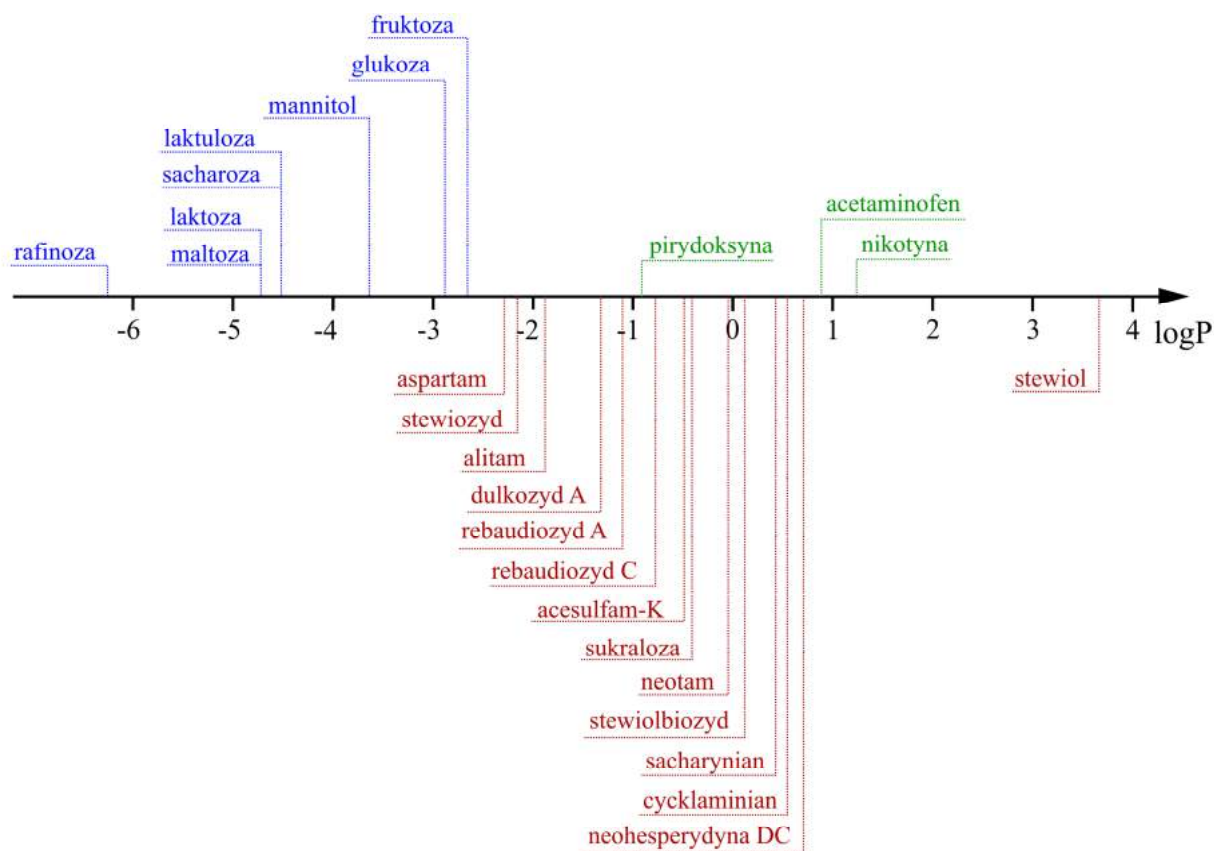


Cel oraz zakres badań

3. Cel oraz zakres badań

Technika HILIC w połączeniu ze spektrometrią mas lub tandemową spektrometrią mas stwarzają wiele możliwości opracowania nowych metodik analitycznych. Ogromnym wyzwaniem podczas tego procesu jest dobranie odpowiednich parametrów chromatograficznych, które uwzględniają właściwości fizykochemiczne oznaczanych substancji, i mogą zapewnić satysfakcjonujące rezultaty rozdzielania. Badania, których celem było opracowanie nowych metodik analitycznych, dotyczą aktualnych problemów w dziedzinach, takich jak analiza biomedyczna czy kontrola jakości.

Podstawowym celem pracy było opracowanie nowych metodik analitycznych i wyznaczenie podstawowych parametrów opisujących układ chromatograficzny z zastosowaniem techniki HILIC dla następujących związków: cukry i alkohole cukrowe, nikotyna, syntetyczne oraz naturalne substancje intensywnie słodzące. Wymienione anality w większości należą do substancji polarnych (rysunek 9).



Rysunek 9. Wartości liczbowe parametru $\log P$ dla związków będących przedmiotem zainteresowania.

Cukry oraz alkohole cukrowe bez uprzedniego przekształcenia w pochodne, są trudne w rozdzieleniu z wykorzystaniem techniki RPLC. Nikotyna jest przykładem alkaloidu, który z powodzeniem można rozdzielić zarówno za pomocą techniki HILIC, jak i RPLC. Mieszanina substancji intensywnie słodzących stanowiła wyzwanie ze względu na fakt, że związki te znacznie różnią się między sobą polarnością oraz właściwościami fizykochemicznymi. Opracowane metodyki analityczne z wykorzystaniem techniki HILIC oraz RPLC posłużyły do oznaczenia ww. substancji w próbkach pochodzących z różnych źródeł. Cukry i alkohole cukrowe zostały oznaczone w próbkach biologicznych, a także w próbkach płynów do napełniania wkładów e-papierosów. W próbkach tych również zostały oznaczone śladowe ilości nikotyny, mimo że według zapewnień producentów i informacji zamieszczonych na opakowaniach wkłady do e-papierosów miały być od niej wolne. Sztuczne i naturalne substancje intensywnie słodzące zostały oznaczone w próbkach napojów.

Opracowane nowe metodyki analityczne z wykorzystaniem techniki HILIC stanowią alternatywne rozwiązania do metodyk opracowanych za pomocą techniki RPLC. Opracowane metodyki mogą znaleźć szerokie zastosowanie w aplikacjach przemysłowych, badaniach klinicznych czy kontroli jakości. Oprócz tego, została przeprowadzona wewnątrzlaboratoryjna walidacja opracowanych metodyk, która miała na celu sprawdzenie wpływu matrycy poszczególnych próbek na uzyskiwane wyniki. Ostatnim etapem było wyznaczenie oraz porównanie podstawowych parametrów opisujących układ chromatograficzny typu HILIC z parametrami opisującymi układ typu RP.



Część doświadczalna

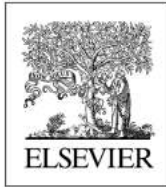
4. Część doświadczalna

4.1. Oznaczanie cukrów w próbkach moczu dzieci

W literaturze naukowej dostępnych jest kilka publikacji [109-111] dokumentujących metodyki analityczne umożliwiające rozdzielanie wybranych cukrów, głównie laktulozy oraz mannitolu. Sacharydy i ich proste pochodne stanowią grupę polarnych związków mających tendencję do elucji w układzie RPLC w czasie martwym. Nie oznaczano do tej pory takich analitów jak sacharoza i laktuloza obok siebie. Obie te substancje są do siebie podobne, mają taką samą masę cząsteczkową oraz zbudowane są z dwóch cukrów prostych: sacharoza z D-glukozy oraz D-fruktozy, zaś laktuloza z D-galaktozy oraz D-fruktozy). Te różnice w budowie strukturalnej obu cukrów wykorzystano do ich rozdzielania. Mieszaninę substancji (mannitol, laktuloza, sacharoza oraz rafinoza) poddano rozdzielaniu z wykorzystaniem trzech różnych kolumn, oferujących różne mechanizmy retencji. Związki, takie jak mannitol i laktuloza są stosowane do weryfikacji przepuszczalności jelita – mannitol jest łatwo wchłaniany, zaś laktuloza jest wchłaniana w niewielkim stopniu. Badanie zawartości poszczególnych związków w moczu zbieranym w ciągu kilku (6) godzin po wypiciu roztworu cukrów pozwala określić stopień ich wchłaniania. Podjęte badania nad opracowaniem metodyki jednoczesnego oznaczania mannitolu, laktulozy i sacharozy w próbkach moczu z wykorzystaniem techniki HILIC sprzężonej z tandemową spektrometrią mas mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie diagnostycznej.

Przedmiotem badań były próbki moczu, które jako materiał biologiczny charakteryzują się złożonym i zmiennym składem matrycy. Istotnym aspektem tego zakresu przeprowadzonych badań, było opracowanie uniwersalnej, nieskomplikowanej i szybkiej procedury, która umożliwiłaby analizy chromatograficzne próbek pochodzących zarówno od osób chorych jak i od osób zdrowych.

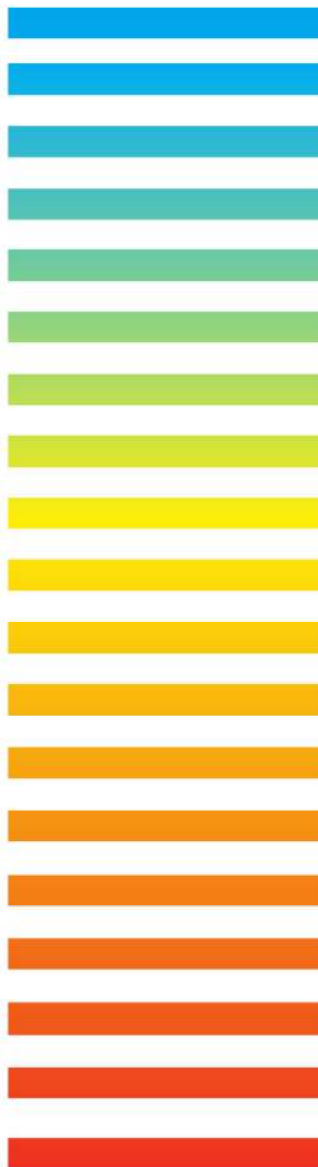
Temat przepuszczalności jelitowej jest obecnie ważnym polem badań naukowych, a opracowana procedura analityczna posłużyła jako narzędzie diagnostyczne wykorzystane w trakcie badań realizowanych w ramach współpracy z zespołem naukowym z Katedry i Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Określono stopień przepuszczalności jelitowej oraz żołądkowo-dwunastniczej u dzieci a uzyskane wyniki badań opublikowano w czasopiśmie *Journal of Chromatography B* [59].



Volume 907, 15 October 2012 ISSN 1570-0232

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B

ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES



EDITORS

R. Bischoff (Groningen)
D. Hage (Lincoln, NE)
G. Hopfgartner (Geneva)
H.T. Karnes (Richmond, VA)
P.J. Taylor (Brisbane)
G. Xu (Dalian)

EDITOR SPECIAL VOLUMES

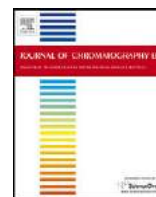
D. Tsikas (Hannover)

EDITORIAL BOARD

J. Angerer (Erlangen)
P. Araujo (Bergen)
A.-F. Aubry (New Brunswick, NJ)
J.H. Banoub (St. John's, NL)
M.G. Bartlett (Athens, GA)
D. Bhattacharyya (Calcutta)
E.C.Y. Chan (Singapore)
Y. Chen (Beijing)
G.J. de Jong (Utrecht)
E. De Lorenzi (Pavia)
Y. Deng (Beijing)
A. Guttman (Debrecen)
K. Hamase (Fukuoka)
P.C. Ho (Singapore)
C.G. Huber (Salzburg)
H. Irth (Amsterdam)
J. Jankowski (Berlin)
U. Karst (Münster)
P. Li (Nanjing)
W. Lindner (Vienna)
D.K. Lloyd (New Brunswick, NJ)
D.M. Lubman (Ann Arbor, MI)
J. Macek (Prague)
B.K. Matuszewski (North Wales, PA)
H.H. Maurer (Homburg/Saar)
D. Muddiman (Rochester, MN)
F.T. Peters (Jena)
T.M. Phillips (Bethesda MD)
M.A. Raggi (Bologna)
J.M. Rosenfeld (Hamilton)
R. Rossi (Siena)
A. Sparreboom (Memphis, TN)
G. Theodoridis (Thessaloniki)
T.-H. Tsai (Taipei)
I.W. Wainer (Baltimore, MD)

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect



Modern approach for determination of lactulose, mannitol and sucrose in human urine using HPLC–MS/MS for the studies of intestinal and upper digestive tract permeability

Paweł Kubica^{a,*}, Agata Kot-Wasik^a, Andrzej Wasik^a, Jacek Namieśnik^a, Piotr Landowski^b

^a Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

^b Department of Pediatrics, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition of Children, Medical University of Gdańsk, Nowe Ogrody 1-6, 80-803 Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2012

Accepted 27 August 2012

Available online 4 September 2012

Keywords:

HILIC

Intestinal permeability

Tandem mass spectrometry

Carbohydrate analysis

Urine

ABSTRACT

A new analytical procedure was described for the simultaneous determination of lactulose, mannitol and sucrose in urine, in which HILIC chromatography and tandem mass spectrometry detection are used. Sugars are orally administered for the estimation of intestinal permeability in children digestive tract. Samples were purified by dispersive solid phase extraction (d-SPE) using Amberlite MB150 resin. Raffinose was selected as an internal standard. The chosen chromatographic separation was carried out on ZIC®-HILIC column in 10 min at a flow rate of 0.3 mL/min, using mixture of acetonitrile (ACN) and ammonium acetate (NH₄Ac) in water (H₂O) as the mobile phase. Within-run precision (CV) measured at three concentrations was 1.08%, 0.32% and 0.49% for lactulose; 1.88%, 0.47% and 0.75% for mannitol, 2.95%, 1.31% and 0.6% for sucrose. Between-run CVs were 0.75%, 1.1% and 1.2% for lactulose; 1.1%, 1.02% and 1.01% for mannitol; 1.17%, 1.4% and 1.05% for sucrose. Analytical recovery of all three sugar probes was 95.06–99.92%. The detection limits were: 15.94 ng/mL for lactulose, 17.10 ng/mL for sucrose and 11.48 ng/mL for mannitol. The proposed method is rapid, simple, sensitive and suitable for the determination of intestinal permeability of the sugar derivatives in children.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

An efficient digestive system ensures the absorption of nutrients and water into the bloodstream. Simultaneously, it prevents the absorption into the body harmful or potentially hazardous substances. The integrity of the intestinal epithelium and its permeability is appropriate and selective in case of healthy body [1,2]. Membranes of epithelium cells have double layer of phospholipids, which is responsible for diffusion of substances soluble in lipids through small intestine cell membranes [2,3]. Substances soluble in water are transported through spaces between cells of small intestine. Such spaces are controlled by complex protein structures known as tight junctions [2,4]. Both types of transport are estimated by the intestinal permeability.

It is crucial to monitor and estimate the permeability of small intestine due to its relation with diseases like: coeliac disease [4,5], Leśniowski-Crohn disease [6], allergy for proteins in cow's milk [7], cirrhosis [8], HIV infection [9,10], chronic and acute

diarrhea [11], pediatric intestinal diseases [12], cystic fibrosis [13] and damages caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs [14].

Lactulose and mannitol represent compounds, which are transported passively and are not metabolized. The lactulose/mannitol test assumes that these two compounds are treated identically in all individual and physiological aspects [15,16]. Sucrose permeability test is commonly accepted as a marker of upper digestive tract (stomach and duodenum) mucosal barrier damage [17,18].

There are variety of techniques used to determine lactulose, mannitol and sucrose in urine samples. Most often used are the enzymatic methods. However, estimation of the concentration of lactulose and mannitol is not always accurate [17–21]. Gas chromatography requires evaporation and derivatization of the analytes present in studied samples prior injection. Sample preparation is time consuming and derivatizing step requires additionally chemical reagents. Unlike enzymatic assays, it is possible to determine lactulose and mannitol simultaneously [22–25]. Determination of sugars by capillary electrophoresis is relatively rapid but requires solid phase extraction at sample preparation step. Sensitivity is relatively low with usage of UV detection thus the values of LOD are at mg/mL level which is relatively high with comparison to other methods. During analysis high pH should be maintained due to pK_a values of analytes vary from 12 to 13 [26].

* Corresponding author. Tel.: +48 58 347 18 33; fax: +48 58 347 26 94.

E-mail addresses: pawel.kubica.pg@gmail.com (P. Kubica), agata@chem.pg.gda.pl (A. Kot-Wasik), wasia@chem.pg.gda.pl (A. Wasik), jacek.namiesnik@pg.gda.pl (J. Namieśnik), pland@gumed.edu.pl (P. Landowski).

Comparing with all above, HPLC is the most simple to perform, precise, rapid and easy to automate. An interesting choice for carbohydrate analysis is hydrophilic interactions liquid chromatography (HILIC) with electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). With this method, it is possible to detect common saccharides in extracts from plants [27]. Several HPLC procedures are available for the determination of sugars in urine [10,12,16,28–30]. Some methods are based on refractive index detection [28], which has the advantage of being universal. However, this type of detector suffers from external variations such as temperature and pressure. In addition, it is not easily adaptable for routine use, and it has poor sensitivity. Therefore pre- [31] or postcolumn [32] derivatization methods have been developed in the attempt to overcome these problems. Anion-exchange chromatography in conjunction with pulsed amperometric detection has been used for the rapid and simultaneous determination of sugars in urine or plasma [9]. The high sensitivity of pulsed amperometric detection allows injection of much diluted solutions, which leads to lower chromatographic system contamination and longer column life [33]. The detection using evaporative light-scattering detectors (ELSDs) seems to be more sensitive and easier to use than the refractive index detector, and it is compatible with gradient elution in carbohydrate analysis [16]. Electrochemical detection was applied for sugars analysis as well [34]. Specific and sensitive mass spectrometry detection in multiple reaction monitoring mode (MRM) combined with HPLC analysis was recently presented for the measurement of these compounds in urine of children affected by abdominal recurrent pain [29].

High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method is presented in this paper. The advantage of this method is to identify and determine simultaneously the mannitol/lactulose ratio and sucrose concentration level in excreted urine. Proposed method is rapid, sensitive, simple to perform and reliable. HILIC was a method of choice for the separation of polar compounds. Mobile phase used is mainly organic ($\geq 70\%$) with the amount of polar/aqueous solvent. High amount of organic solvent, due to its volatility, enhances the response of ESI-MS/MS [35,36].

A developed method may be used as a non-invasive test for obtaining information about intestinal permeability and digestive tract permeability.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards (lactulose, mannitol, glucose, sucrose and raffinose), ACN LC-MS grade, NH_4Ac , Amberlite MB150 resin and Whatman Puradisc™ 13 mm PTFE (2 μm pore size) syringe filters were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Formic acid (FA) was purchased from POCH (Gliwice, Poland). Ultrapure H_2O was prepared using HPL5 system from Hydrolab (Wiślnia, Poland).

2.2. Sample collection

After 12 h of fasting the patient empties the bladder and then drinks solution of mannitol (2 g), lactulose (10 g) and sucrose (20 g) in 250 mL of deionised water. It is recommended that patients should follow 24 h lactulose, mannitol, sucrose and raffinose free diet. To correct the endogenous presence of carbohydrates content a blank urine is collected before drinking the prepared solution. Urine is collected for the next 5 h and after first 2 h patient may drink 250 mL of mineral non-carbonated water. Chlorhexidine (0.1 mL of 1% aqueous solution) is added as antimicrobial agent to

each vessel containing urine. Collected samples for longer storage than several hours are immediately frozen at -20°C .

2.3. Preparation of standards and calibration solutions

Stock solutions of lactulose, mannitol, sucrose, glucose and raffinose (raffinose was used as internal standard for tandem mass spectrometry detection) were prepared by dissolving standards in ACN/ H_2O (75:25) mixture. The final concentration of four individual solutions of lactulose, mannitol, glucose and sucrose was at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and raffinose at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Calibration solutions were prepared by dilution of stock solutions with ACN to obtain concentrations: 50, 100, 500, 1000, 1500 and 2000 ng/mL of each analytes. In all calibration solutions the internal standard concentration was at 500 ng/mL. Stock solutions and calibration solutions were stored at 4°C . Every two weeks new solutions were prepared.

2.4. Sample preparation

Volume of 500 μL of urine was diluted with 500 μL of deionised water in Eppendorf vial. To the obtained solution 100 mg of Amberlite MB150 ion-exchange resin was added. Amberlite MB150 resin is added to eliminate from sodium ions. Sodium ions are thought to cause signal suppression from tandem mass spectrometry detector. Sample was stirred for 3 min and then centrifuged for 3 min at 5000 rpm. After centrifugation 10 μL of diluted and centrifuged sample was transferred to a flask containing 100 μL of stock solution of internal standard. Final concentration of internal standard was 500 ng/mL. The flask was filled up with ACN to the total volume of 2 mL. For the general scheme of the protocol of sample preparation see Fig. S1, Supplementary Data. Some urine samples were from patients with fairly stage of disease (including, i.e. kidney damage). In such cases after last step of sample preparation a further filtration through 0.2 μm PTFE syringe filter is needed to remove denatured proteins.

2.5. Preparation of fortified samples

Urine was collected from healthy volunteers after 12 h of sucrose-, mannitol- and lactulose-free diet. Urine was collected at fasting. Specific amounts of lactulose, mannitol and sucrose were dissolved in three urine samples free from compounds of interest, to obtain 40, 200 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each substance respectively. Fortified samples were prepared as mentioned above. Final concentrations in samples were 100, 500 and 1250 ng/mL of each substance respectively. Prepared fortified samples were analyzed by HPLC-MS/MS.

2.6. HPLC-MS/MS conditions

The HPLC-MS/MS contained Agilent (Santa Clara, USA) 1200 HPLC series pump, degasser, autosampler, column oven and Q-Trap 4000 triple quadrupole mass spectrometer from Applied Biosystems (Foster City, USA) with electrospray ionization in negative ion mode. The chromatographic separation was tested with analytical columns: 250 mm \times 2.1 mm, 5 μm with pore size 200 Å ZIC®-HILIC from Merck KgaA (Darmstadt, Germany); 150 mm \times 2.1 mm, 5 μm with pore size 100 Å Ascentis Si from Supelco (St. Louis, USA); 150 mm \times 3 mm, 3 μm with pore size 120 Å Supelcosil LC-NH2 from Supelco (St. Louis, USA). The chromatographic separation conditions for each chosen column, parameters for the monitored ion transitions and MS/MS operation parameters are presented in Table 1.

Table 1
Chromatographic separation conditions for three columns (ZIC®-HILIC, Ascentis Si and Supelcosil LC-NH2), optimal parameters for the monitored ion transitions and MS/MS operation parameters.

Chromatographic separation conditions					
	ZIC®-HILIC 250 mm × 2.1 mm, 5 μm	Ascentis Si 150 mm × 2.1 mm, 5 μm	Supelcosil LC-NH2 150 mm × 3 mm, 3.5 μm		
Mobile phase gradient	From 75% ACN/25% 5 mM of NH ₄ Ac in H ₂ O to 40% ACN/60% 5 mM of NH ₄ Ac in H ₂ O (pH = 6.84) in 10 min	From 80% ACN/20% 5 mM of NH ₄ Ac in H ₂ O to 65% ACN/35% 5 mM of NH ₄ Ac in H ₂ O (pH = 6.84) in 6 min	From 75% ACN 0.05% FA/25% H ₂ O 0.05% FA to 40% ACN 0.05% FA/60% H ₂ O 0.05% FA in 6 min (pH = 2.85)		
Flow	300 μL/min	400 μL/min	500 μL/min		
Injection volume		5 μL			
Column oven temperature		25 °C			
Run time of analysis	10 min		6 min		
Parameters for the monitored ion transitions					
Name	Quantitative [Q] qualitative [q] parent ion → fragment ion	Declustering potential (V)	Entrance potential (V)	Collision cell exit potential (V)	Collision energy (V)
Lactulose	Q 341.0 → 160.9 q 341.0 → 100.8	-80	-10	-12 -22	-7 -15
Mannitol	Q 180.9 → 88.8 q 180.9 → 100.9	-90	-10	-20	-13 -15
Sucrose	Q 340.9 → 179.0 q 340.9 → 118.9	-115	-10	-20 -26	-13 -7
Raffinose	Q 503.1 → 178.8 q 503.1 → 220.8	-145	-10	-30 -44	-13 -15
MS/MS operation parameters					
		Curtain gas (psi)	Temperature (°C)	Nebulizer gas (psi)	Turbo gas (psi)
Lactulose	Q 341.0 → 160.9 q 341.0 → 100.8	20	500	20	10
Mannitol	Q 180.9 → 88.8 q 180.9 → 100.9	10	550	30	20
Sucrose	Q 340.9 → 179.0 q 340.9 → 118.9	20	500	20	10
Raffinose	Q 503.1 → 178.8 q 503.1 → 220.8	20	500	20	20
Chosen parameters		20	500	20	10

Tandem mass spectrometry parameters for the monitored ion transitions were obtained using 1 μg/ml solutions of each substance with flow rate at 10 μl/min.

All data were collected and processed using Analyst 1.5.2 Software.

3. Results and discussion

3.1. Tandem mass spectrometry detection

Ions of compounds of interest could be detected in negative ESI mode in the presence of acetate ion. Declustering potential was the most important parameter, which impacts the response form detector. The most intense signals come from the precursor ions in case of mannitol, sucrose and raffinose. In case of lactulose the most intense signal comes from the one of the fragment ion 160.9 *m/z*.

For MS/MS operation parameters flow injection analysis (FIA) was done using 1 μg/mL solution of each substance. Mass spectra of the three compounds under the study and spectrum of internal standard (raffinose) obtained from FIA mode are presented in Fig. 1. In case of carbohydrate fragmentation, there are two types of cleavages: ring breakdown across two bonds (one of the bonds is from oxygen atom) or glycosidic bond breakdown which is linking two ring structures. Coelution, even with the usage of MRM, should be avoided because lactulose and sucrose have similar fragment ions: 179 *m/z* and 160 *m/z* which are shown in Fig. 1. In case of mannitol (sugar alcohol) cleavage is present on the molecular chain. MRM mode of MS/MS was chosen for analysis and specific ion transitions (Q for quantitative, q for qualitative) are presented in Table 1.

3.2. Chromatographic separation

For the ZIC®-HILIC and Ascentis Si column the mobile phase consisting in the aqueous part small amount of ammonium acetate (5 mM) as additive was sufficient to obtain good peak shape and high intensities of detector signal (Fig. 2A and B). For the Supelcosil LC-NH2, mobile phase consisting ammonium acetate in the aqueous part proved to be insufficient. The peak tailing phenomenon occurred for mannitol and lactulose (Fig. 2C). To minimize peak tailing 0.05% of formic acid (FA) was added to the both components of mobile phase. This results in better peak shape, however the decrease of sensitivity was observed (Fig. 2D). As mentioned before, the coelution in case of lactulose and sucrose should be avoided, even with the usage of MRM, due to the fact that both compounds form the same fragment ions.

3.2.1. Glucose as potential interference in the studies of intestinal permeability

The separation of glucose as potential interference in the studies of intestinal permeability was done on ZIC®-HILIC column. Conditions for separation were taken from Table 1. The glucose transition is 179.1 → 89.0 *m/z* and this type of transition is characteristic for glucose. However, secondary fragmentation of sucrose and lactulose may result in the same fragmentation pattern. Secondary fragmentation means that lactulose and sucrose fragment to 179 *m/z* (mass spectra are shown in Fig. 1) and such fragments may undergo subsequent fragmentation to 89 *m/z*. This is the reason why 89 *m/z* ion is produced and two coeluted peaks are visible in the same retention times of sucrose and lactulose. In Fig. 3 the chromatogram of standards (including glucose) is presented. The transition for glucose is not monitored during the analysis of

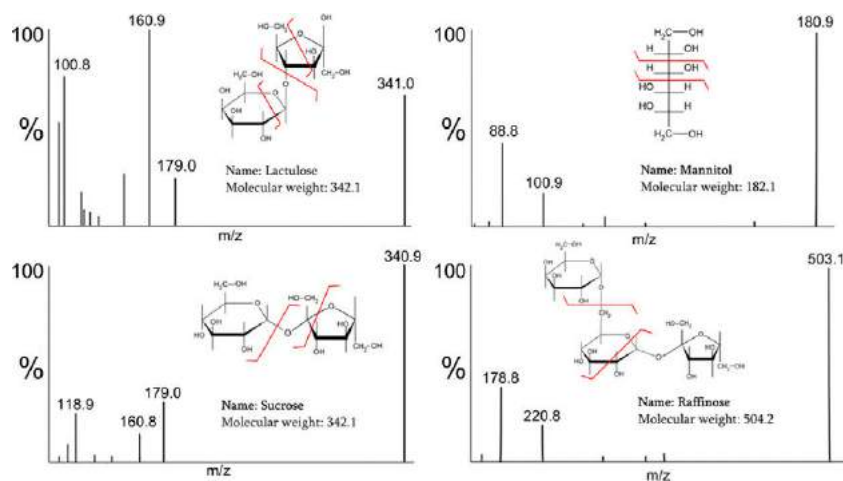


Fig. 1. Mass spectra obtained in negative mode $[M-H]^-$ of compounds under the study and their structures, including internal standard.

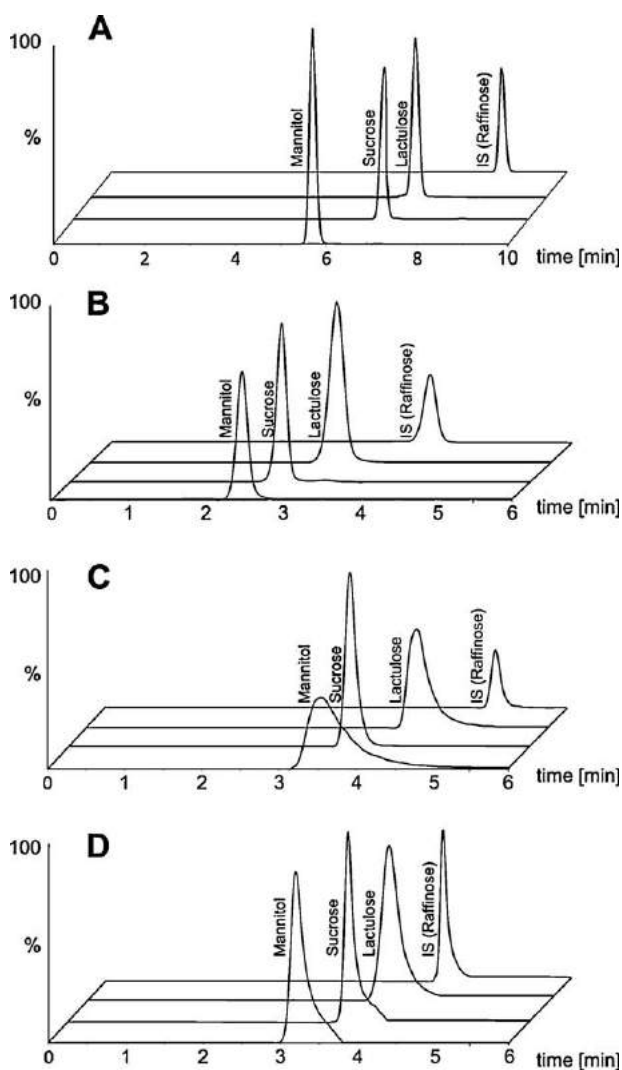


Fig. 2. Chromatogram of mixture of analytes and internal standard, detected by negative ESI-MS/MS on (A) ZIC[®]-HILIC column (250 mm × 2.1 mm, 5 μm) with flow 300 μL/min and injection volume 5 μL, (B) Ascentis Si column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) with flow 400 μL/min and injection volume 5 μL, (C) Supelcosil LC-NH₂ column (150 mm × 3 mm, 3.5 μm) with flow 500 μL/min, injection volume 5 μL and mobile phase consisting NH₄Ac (5 mM), (D) Supelcosil LC-NH₂ column (150 mm × 3 mm, 3.5 μm) with flow 500 μL/min, injection volume 5 μL and mobile phase consisting 0.05% FA.

samples of urine, therefore the potential interference of glucose can be eliminated due to the separation of glucose peak from the others.

3.3. Inter-laboratory method validation

3.3.1. Linearity, LOD and LOQ

Calibration curve were made by drafting ratio of analyte peak area to internal standard peak area to analyte concentration. Calibration solutions were done from standard solutions of three analytes, as described previously. Raffinose as internal standard was introduced into each calibration solution at concentration 500 ng/mL. Each calibration solution was analyzed three times.

Test for homoscedasticity (*F*-test) was done to choose the best weighting for the calibration curves. Test was done at 95% confidence level with 5% rejection. The limiting *F*-value was taken from the table with appropriate degrees of freedom (df_1 , $df_2 = n - 1$) and is equal to 19. In this case $df_1 = 2$ and $df_2 = 2$. The standard deviations (SD) and relative standard deviations (RSD) of upper limit of quantitation (UL, $C = 2000$ ng/mL) and lower limit of quantitation (LL, $C = 50$ ng/mL) for every analyte chosen for this test. For the calculated ratios UL and LL see Table S1, Supplementary Data.

Test for homoscedasticity proved that, there is no need to use weighting of the curves. Ratios of SD and ratios of RSD for each set of calibration data are smaller than limiting factor. Calibration curves were constructed without weighting.

Calculation of limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQs) were based on the value of standard deviation of constant term of calibration equation and slope of calibration curve.

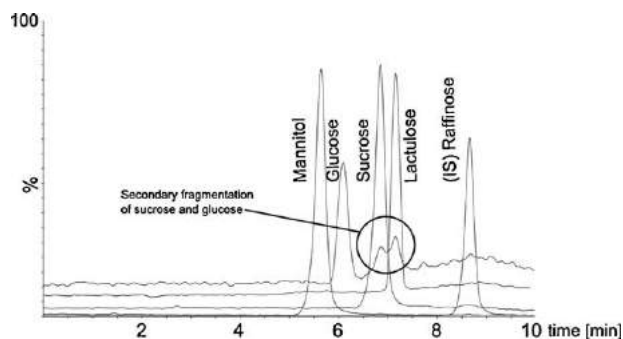


Fig. 3. Chromatogram of mixture of analytes and internal standard, detected by negative ESI-MS/MS on ZIC[®]-HILIC column (250 mm × 2.1 mm, 5 μm) with flow 300 μL/min and injection volume 5 μL, gradient programme: from 75% ACN/25% 5 mM of NH₄Ac in H₂O to 40% ACN/60% 5 mM of NH₄Ac in H₂O (pH = 6.84) in 10 min.

Table 2
Data collected from calibration curves obtained from chosen columns.

Analyte name	Calibration curve equation (ZIC®-HILIC column)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	S_a	S_b	R
Lactulose	$y = 0.003775x + 0.064$	15.94	47.83	0.000016	0.018	0.9999
Mannitol	$y = 0.0031148x + 0.037$	11.48	34.43	0.0000097	0.011	0.9999
Sucrose	$y = 0.0018623x + 0.0616$	17.10	51.30	0.0000086	0.0077	0.9998
Analyte name	Calibration curve equation (Ascentis Si)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	S_a	S_b	R
Lactulose	$y = 0.002753x - 0.039$	24.76	74.29	0.000022	0.021	0.9995
Mannitol	$y = 0.001748x - 0.069$	35.25	96.74	0.000018	0.017	0.9992
Sucrose	$y = 0.001475x + 0.125$	32.30	96.89	0.000016	0.014	0.9993
Analyte name	Calibration curve equation (SUPELCOSIL LC-NH2)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	S_a	S_b	R
Lactulose	$y = 0.002867x + 0.332$	44.15	132.46	0.000041	0.038	0.9986
Mannitol	$y = 0.002320x + 0.109$	51.51	154.52	0.000039	0.036	0.9981
Sucrose	$y = 0.001636x + 0.498$	47.40	142.20	0.000025	0.024	0.9985

Table 3
Recovery [%], standard deviation (SD), coefficient of variation (CV) [%], MDL and MQL obtained by HPLC–MS/MS analysis of fortified samples at three spiking levels of concentration in fortified samples.

Analyte	Spiking level (ng/mL)	Mean recovery (ng/mL) (%) (n = 3)	SD	CV (%)	MDL (ng/mL)	MQL (ng/mL)
Lactulose	100	97.56 (97.56)	1.06	1.08	7.62	22.87
	500	499.59 (99.92)	1.62	0.32		
	1250	1234.09 (98.73)	6.05	0.49		
Mannitol	100	95.06 (95.06)	1.79	1.88	11.61	34.82
	500	499.7 (99.94)	2.35	0.47		
	1250	1223.35 (97.87)	9.15	0.75		
Sucrose	100	96.56 (97.12)	2.85	2.95	14.73	44.20
	500	493.6 (98.72)	6.46	1.31		
	1250	1234.32 (98.75)	7.56	0.61		

Equations of calibration curves, LOD, LOQ, correlation coefficients (R), standard deviations of slope (S_a) and standard deviations of constant terms (S_b) are presented in Table 2. Plots of calibration curves are available as Fig. S2, Supplementary Material.

Despite the longer time of analysis, ZIC®-HILIC column was chosen for further experiments due to the lowest LOD and the highest correlation coefficients for each calibration curves.

3.3.2. Trueness, repeatability, intermediate precision, MDL and MQL

Trueness, repeatability and intermediate precision of the under-worked method were tested with prepared fortified samples at three levels of concentration for chosen analytical column. The unfortified samples of urine were analyzed to exclude the presence of the analytes of study. Three repeats were made for given three levels of fortified samples. Fortified samples were prepared accordingly to the presented protocol of sample preparation in Section 2.4. The method detection limit (MDL) values for analytes were calculated by multiplying the mean of sample standard deviations by Student's *t*-value. Degrees of freedom are 5 and the *t*-value is equal to 2.62. Method quantitation limit (MQL) values were obtained by multiplying MDL by 3. Data collected for trueness test are presented in Table 3.

Obtained results are satisfactory and it was proved that proposed method is suitable for analysis of lactulose, mannitol and sucrose in urine.

Repeatability study was done by the analysis of one fortified sample during 1 day with initial concentration at 500 ng/mL of lactulose, mannitol and sucrose. Analysis by HPLC–MS/MS was repeated six times. Intermediate precision was done in next 3 days by analysis of the same fortified sample. Six repeats were done during each day. Recovery, standard deviations and coefficients of variation are presented in Table 4.

In all cases recoveries were satisfactory and after sample preparation HPLC–MS/MS analysis may be performed in the next 3

days. Due to the high content of ACN, solution seems to be stable and decomposition of carbohydrates is reduced. Slight decrease in recovery was observed for mannitol and for sucrose. Lactulose concentration level seems to be stable along 3 days.

4. Analysis of real samples

Nine real samples of urine from children with diseases of digestive tract (mostly chronic intestinal inflammation, stomach and duodenum ulcer) and eight real samples of urine from healthy children were collected. All samples were prepared according to the described protocol in Section 2.3 and were analyzed by HPLC–MS/MS. Blank urines were prepared according to the protocol as well. The content of carbohydrates in urine was insignificant, see Fig. S3, Supplementary Data. Results are presented in Table 5. Concentrations below LOD in prepared samples were omitted.

The L/M ratio of recovered lactulose and mannitol was calculated. The recovered values of lactulose and mannitol were

Table 4
Repeatability study and intermediate precision, standard deviations and coefficients of variations are included.

Analyte	Day	Mean recovery (ng/mL) (%) (n = 6)	SD	CV (%)
Lactulose	1	493.91 (98.78)	3.71	0.75
	2	492.54 (98.51)	5.41	1.11
	3	494.55 (98.91)	5.92	1.23
Mannitol	1	506.42 (101.28)	5.58	1.16
	2	499.25 (99.85)	5.09	1.02
	3	494.38 (98.88)	4.97	1.01
Sucrose	1	489.79 (97.96)	5.74	1.17
	2	490.24 (98.05)	6.84	1.47
	3	484.48 (96.9)	5.11	1.05

Table 5

Concentrations of detected analytes in real samples.

Sample	Volume of sample (mL)	Concentration in urine ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD ($n = 3$)				
		Lactulose	Mannitol	Sucrose	L/M ratio	Sucrose recovery
1	350	51.70 \pm 0.61	254.47 \pm 6.98	12.53 \pm 1.09	0.041	0.00022
2	450	71.75 \pm 0.59	144.94 \pm 3.75	–	0.099	–
3	700	88.99 \pm 2.65	568.91 \pm 4.80	35.26 \pm 1.81	0.031	0.00030
4	225	74.58 \pm 0.23	222.48 \pm 7.42	–	0.067	–
5	250	127.61 \pm 0.78	512.84 \pm 3.67	–	0.050	–
6	250	82.35 \pm 0.98	199.61 \pm 2.58	7.97 \pm 0.21	0.083	0.00010
7	150	114.82 \pm 3.53	495.53 \pm 4.87	74.15 \pm 2.47	0.046	0.00056
8	200	95.76 \pm 0.29	454.59 \pm 6.50	–	0.042	–
9	300	45.07 \pm 0.16	229.45 \pm 3.98	–	0.039	–
Sample (healthy volunteers)						
1	350	30.52 \pm 1.21	382.78 \pm 2.77	–	0.016	–
2	450	51.52 \pm 0.64	515.72 \pm 2.64	–	0.02	–
3	295	20.56 \pm 0.18	503.05 \pm 1.97	–	0.008	–
4	220	29.09 \pm 0.77	524.78 \pm 2.12	–	0.011	–
5	235	55.60 \pm 0.61	511.32 \pm 2.7	–	0.022	–
6	270	49.03 \pm 0.59	500.75 \pm 1.70	–	0.020	–
7	320	27.93 \pm 0.46	366.22 \pm 1.84	–	0.015	–
8	250	33.64 \pm 0.56	395.23 \pm 1.97	–	0.017	–

obtained by multiplying the $\mu\text{g/mL}$ per volume of collected urine and divided by 10 in case of lactulose and by 2 in case of mannitol. The same calculations were made for sucrose recovery. The L/M reference range in healthy subjects is typically less than 0.03 [37]. The ratio observed in the urine samples of nine children with diseases of digestive tract was in general more elevated than the ratio in the eight healthy children. These preliminary results must be confirmed on a higher number of well classified subjects to define ranges of values correlated to the diseases and to validate this LC–MS/MS as a diagnostic test.

5. Conclusions

Modern medicine is directed to non-invasive and patient friendly diagnosis. The developed method is simple, rapid, selective and sensitive for determination of concentration of three different sugars in human urine. Such methods are found to be useful in designation of intestinal and upper digestive tract permeability. Sample preparation step of such complex matrix like urine does not include solid phase extraction. The addition of specific amount of ion exchange resin, mixing and vortexing the sample are sufficient to obtain high recovery values. Rapid sample preparation, low solvent usage per single run and total time of analysis equal to 10 min are suitable when dealing with large amount of samples. ZIC®-HILIC column was chosen due to its long life and easiness of handling.

Limits of detection and limits of quantitation were based on the value of standard deviation of constant term of calibration equation and slope of calibration curve for each of the analyzed compounds. The ability of MS/MS to monitor multiple reaction ion transitions per single run gives high specificity of the method (Table 1) and allows distinguishing molecules with the same molecular mass like lactulose and sucrose. ZIC®-HILIC column provides satisfactory separation and repeatable retention times.

Presented method with rapid sample preparation step is an interesting alternative to the enzymatic assay of intestinal and upper digestive tract permeability. It proves that HPLC with ZIC®-HILIC chromatography is able to separate highly polar compounds even with the same molecular mass and ESI-MS/MS is able to identify them. Method for determination of lactulose, mannitol and sucrose in human urine may be widely applied not only to children but to adult patients as well.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.031>.

References

- [1] I. Bjarnason, A. MacPherson, D. Hollander, *Gastroenterology* 108 (1995) 1566–1581.
- [2] D. Hollander, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1 (1999) 410–416.
- [3] C.W. Teshima, J.B. Meddings, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10 (2008) 443–449.
- [4] L. Greco, G. D'Adamo, A. Trusculli, G. Parrilli, M. Mayer, G. Budillon, *Arch. Dis. Child.* 66 (1991) 870–872.
- [5] H. Vogelsang, J. Wyatt, E. Penner, H. Lochs, *Am. J. Gastroenterol.* 90 (1995) 1838–1842.
- [6] R.V.D. D'Inca, C.G. Leo, D. Martinez, A. D'Odorico, C. Mestriner, C. Venturi, G. Longo, G.C. Sturniolo, *Am. J. Gastroenterol.* 94 (1999) 2956–2960.
- [7] T. Jalonen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 88 (1991) 737–742.
- [8] S. Pascual, J. Such, A. Esteban, P. Zapater, J.A. Casellas, J.R. Aparicio, E. Girona, A. Gutiérrez, F. Carnices, J. Palazón, J. Sola-Vera, M. Pérez-Mateo, *Hepatogastroenterology* 50 (2003) 1482–1486.
- [9] S.C. Fleming, J.A. Kynaston, M.F. Laker, A.D.J. Pearson, M.S. Kapembwa, G.E. Griffin, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 293–297.
- [10] R.A. Sherwood, J.T. Marsden, C.A. Stein, S. Somasundaram, C. Aitken, J.S. Oxford, I.S. Menzies, I. Bjarnason, *Antiviral Chem. Chemother.* (1997) 327–332.
- [11] V. DiLeo, R. D'Inca, N. Diaz-Granado, W. Fries, C. Venturi, A. D'Odorico, D. Martinez, G.C. Sturniolo, *Am. J. Gastroenterol.* 98 (2003) 2245–2252.
- [12] D. Willems, S. Cadranet, W. Jacobs, *Clin. Chem.* 39 (1993) 880–890.
- [13] R.M. VanElburg, J.J. Uil, W.M. VanAalderen, *Pediatr. Res.* 39 (1996) 985–991.
- [14] I. Bjarnason, *Gut (Suppl. 1)* (1994) s18–s22.
- [15] L.D. Juby, J. Rothwell, A.T.R. Axon, *Gut* 30 (1989) 476–480.
- [16] R. Marsilio, L. D'Antiga, L. Zancan, N. Dussini, F. Zacchello, *Clin. Chem.* 44 (1998).
- [17] M. Seimiya, S. Osawa, N. Hisae, T. Shishido, T. Yamaguchi, F. Nomura, *Clin. Chim. Acta* 343 (2004) 195–199.
- [18] T. Shishido, T. Yamaguchi, T. Odaka, M. Seimiya, H. Saisho, F. Nomura, *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 6905–6909.
- [19] Y. Zhang, B. Lee, M. Thompson, R. Glass, R.C. Lee, D. Figueroa, R. Gilman, D. Taylor, C. Stephenson, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31 (2000) 16–21.
- [20] P.G. Lunn, C.A. Northrop, A.J. Northrop, *Clin. Chim. Acta* 183 (1989) 163–170.
- [21] C.A. Northrop, P.G. Lunn, R.H. Behrens, *Clin. Chim. Acta* 187 (1990) 79–87.
- [22] O. Martínez-Augustin, J.J. Boza, J.M. Romera, A. Gil, *Clin. Biochem.* 28 (1995).
- [23] F. Dumas, C. Aussel, P. Pernet, C. Martin, J. Giboudeau, *J. Chromatogr. B* 654 (1994) 276–281.
- [24] R.L. Shippee, A.A. Johnson, W.G. Cioffi, J. Lasko, T.E. LeVoyer, B.S. Jordan, *Clin. Chem.* 38 (1992) 343–345.
- [25] M. Celli, P. D'Eufemia, R. Dommarco, R. Finocchiaro, D. Aprigliano, F. Martino, E. Cardi, O. Giardini, *Clin. Chem.* 41 (1995) 752–756.
- [26] R. Paroni, I. Fermo, a. Molteni, L. Folini, M.R. Pastore, A. Moscad, E. Bosi, *J. Chromatogr. B* 834 (2006) 183–187.
- [27] T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2533–2542.

- [28] H. Liu, S. Zhang, A. Yu, L. Qu, Y. Zhao, H. Huang, J. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2339–2344.
- [29] A.M. Lostia, L. Lionetto, L. Principessa, M. Evangelisti, A. Gamba, M.P. Villa, M. Simmaco, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 887–892.
- [30] S.A. Wring, A. Terry, R. Causon, W.N. Jenner, *J. Pharm. Biomed.* 16 (1997) 1213–1224.
- [31] D.R. Rooyakkers, H.M.H.v. Eijk, N.E.P. Deutz, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 99–105.
- [32] H. Engelhardt, P. Ohs, *Chromatographia* 23 (1987) 657–662.
- [33] S.C. Fleming, M.S. Kapembwa, M.F. Laker, G.E. Levin, G.E. Griffin, *Clin. Chem.* 36 (1990).
- [34] J.A. Kynaston, S.C. Fleming, M.F. Laker, A.D. Pearson, *Clin. Chem.* 39 (1993) 453–465.
- [35] H.P. Nguyen, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465–1480.
- [36] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196.
- [37] D.M. Brady, J.A. Bralley, R.S. Lord, in: R.S. Lord, J.A. Bralley (Eds.), *Laboratory Evaluations for Integrative and Functional Medicine*, 2nd edition, Metamatrix Institute, Canada, 2008, p. 426.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

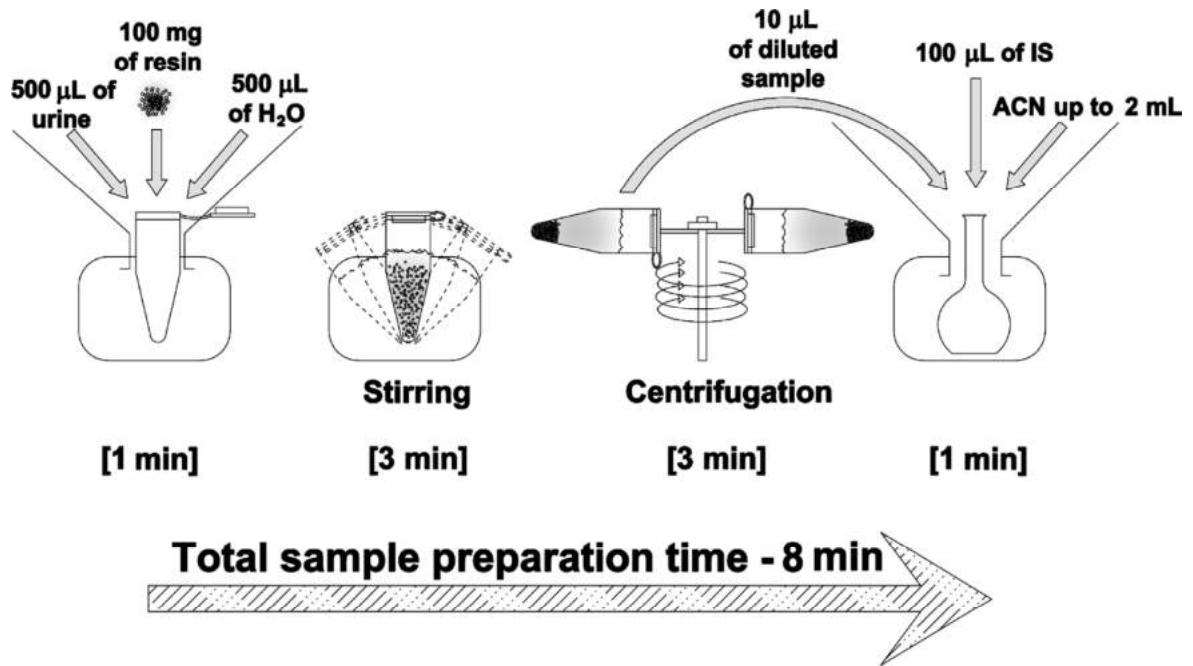


Figure S1. General scheme of the protocol of urine sample preparation

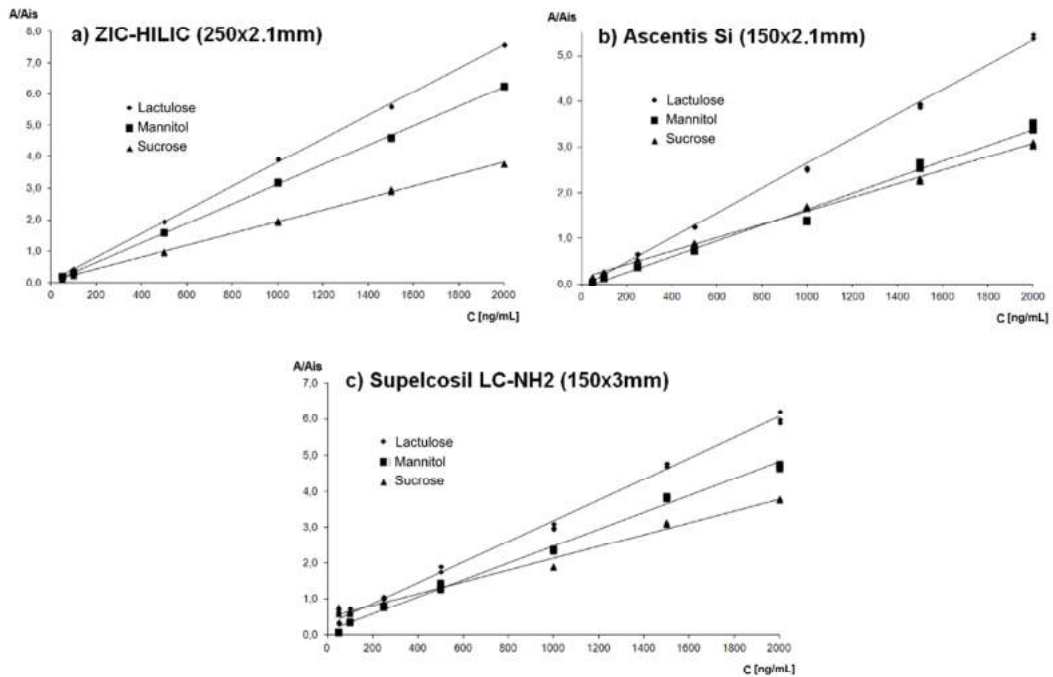


Figure S2. Plots of calibration curves for three different columns

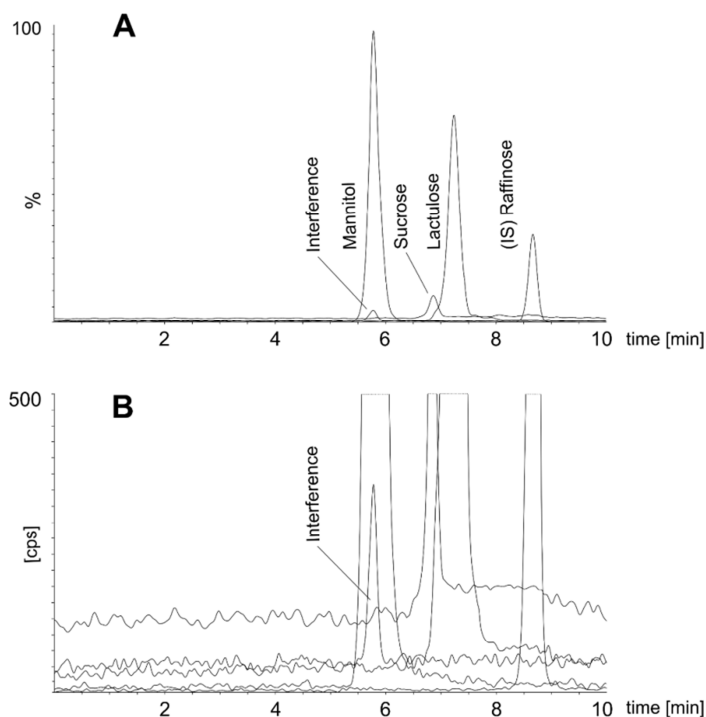


Figure S3. Interference of blank urine samples: A) full view, B) zoom on interference of mannitol

Table S1. Test for homoscedasticity based on limiting F -value=19 at 95% confidence level.

Column	Lactulose		Mannitol		Sucrose	
ZIC®-HILIC	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL
	0.0091	0.0012	0.0091	0.0015	0.0096	0.0026
	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL
	0.0083	0.033	0.0053	0.027	0.0032	0.023
Ratio	1.20	0.0013	2.98	0.003	8.83	0.012
Ascentis Si	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL
	0.12	0.023	0.084	0.025	0.043	0.014
	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL
	0.016	0.13	0.0048	0.13	0.015	0.11
Ratio	7.60	0.018	17.20	0.20	2.86	0.13
Supelcosil LC-NH2	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL	SD UL	RSD UL
	0.16	0.026	0.063	0.013	0.022	0.0057
	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL	SD LL	RSD LL
	0.079	0.21	0.019	0.29	0.094	0.14
Ratio	2.03	0.13	3.25	0.047	0.23	0.041

Opracowana procedura analityczna dotycząca oznaczania cukrów w próbkach moczu oferuje prostotę wykonania, szybkość uzyskiwania wyniku (krótki czas przygotowania próbek i krótki czas analizy), małe zużycie rozpuszczalników, niskie koszty związane z etapem przygotowania próbki, selektywność i czułość. Pozwala to na wykorzystanie opracowanej metodyki w diagnostyce medycznej, kiedy analityk ma do czynienia z dużą liczbą próbek. Metodyka może być z powodzeniem wykorzystana do badania przepuszczalności jelitowej nie tylko u dzieci ale także u dorosłych.

4.2. Oznaczanie cukrów w próbkach płynów do elektronicznych papierosów

Celem badań było opracowanie szybkiej i prostej metody analitycznej do oceny zawartości sacharozy i innych cukrów w próbkach płynów do e-papierosów z wykorzystaniem techniki HILIC i spektrometrii mas. Istnieje wiele kontrowersji na temat bezpieczeństwa stosowania papierosów elektronicznych. W krajach, gdzie e-papierosy są już powszechnie dostępne dopiero wprowadza się uregulowania prawne dotyczących składu i rodzaju używanych płynów.

Opracowana metoda badawcza może posłużyć jako narzędzie kontroli jakości oraz pomiaru zawartości poszczególnych sacharydów w próbkach płynów do e-papierosów. Oznaczone cukry, głównie sacharoza, podczas spalania mogą przyczyniać się do powstawania aldehydów oraz kwasów organicznych, których wpływ na zdrowie nie jest do końca poznany. Związki te oraz nikotyna zawarta w produktach do e-palenia mogą być czynnikami prowadzącymi do nałogu. Proponowana metoda analityczna umożliwi określenie zawartości sacharozy oraz innych cukrów w czasie krótszym niż 4 minuty. Ze względu na dość prosty skład matrycy próbki przygotowanie próbek zostało zredukowane do minimum i polegało na rozcieńczeniu próbki w odpowiednim składniku fazy ruchomej. Wyniki badań opublikowano w czasopiśmie *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [33], a temat badań – *Contaminants in e-liquids for electronic cigarettes* – ukazał się na okładce. Prezentowana publikacja znalazła się w dziesiątce najczęściej pobieranych publikacji w roku 2014.

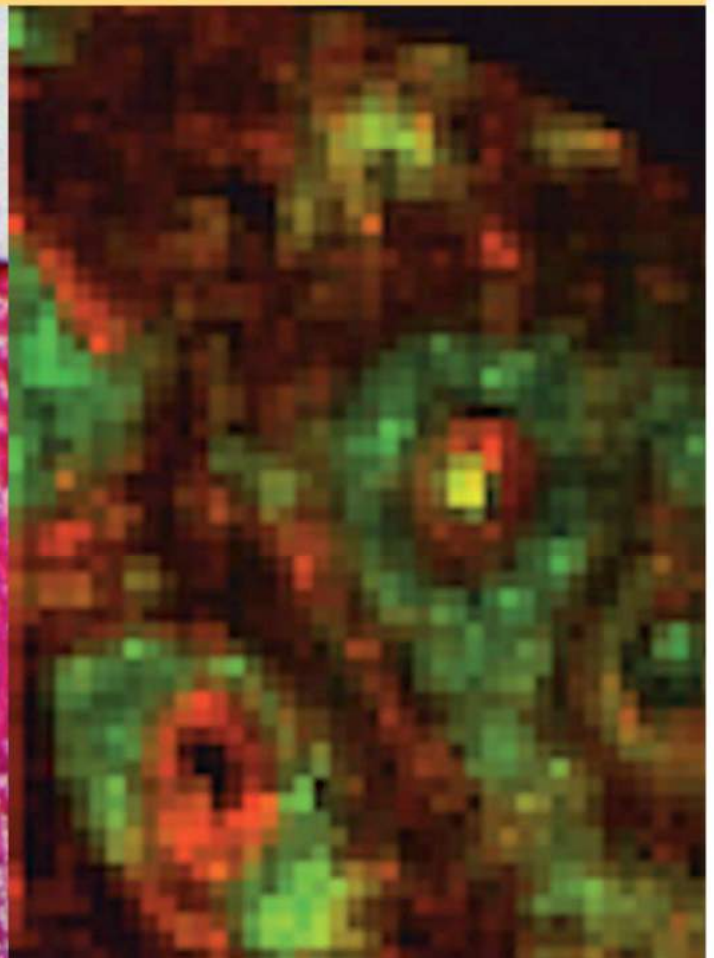
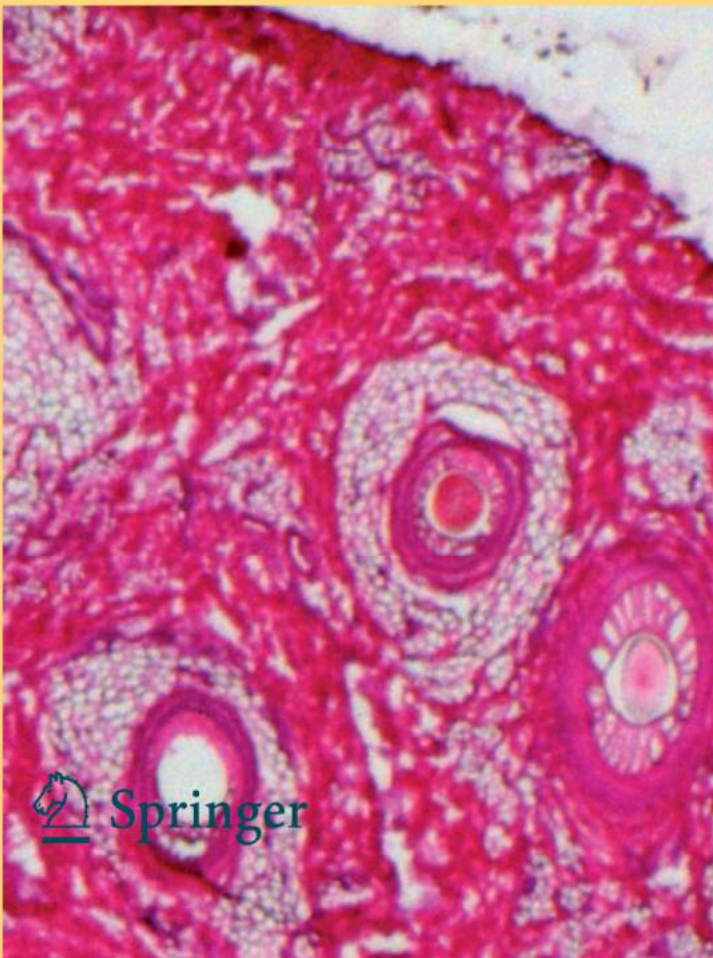
ANALYTICAL & BIOANALYTICAL CHEMISTRY



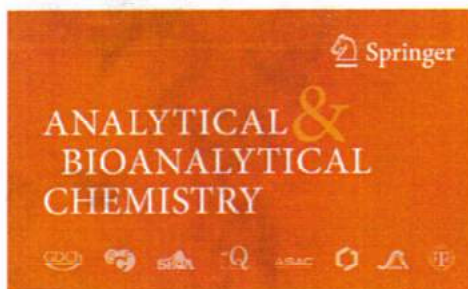
ASAC



Raman spectroscopic identification of single bacterial cells
Molecular beacons for sensitive nucleic acids analysis
Optimization of polar organic chemical integrative samplers
Contaminants in e-liquids for electronic cigarettes



 Springer



 Springer
www.springer.com/abc
ABC goes social – follow us on Twitter:
AnalBioanalChem!

Certificate
Most Downloaded 2014

**An evaluation of sucrose as a possible contaminant
in e-liquids for electronic cigarettes
by hydrophilic interaction liquid
chromatography–tandem mass spectrometry**

Paweł Kubica, Andrzej Wasik, Agata Kot-Wasik, Jacek Namieśnik

Anal Bioanal Chem (2014) 406: 3013-3018

is listed in the Top 10 most downloaded articles
published in 'Analytical and Bioanalytical Chemistry' in the year 2014.

The Editors offer their sincere congratulations and would like to thank you again
for publishing your excellent work in the journal.



Nicola Oberbeckmann-Winter
Managing Editor
Analytical and Bioanalytical Chemistry

On behalf of the 'Analytical and Bioanalytical Chemistry' Editors
Sylvia Daunert, Philippe Garrigues, Guenter Gauglitz, Klaus G. Heumann, Kiyokatsu Jinno,
David C. Muddiman, Aldo Roda, Alfredo Sanz-Medel, Stephen A. Wise and Regional Editor China Lihua Zhang

An evaluation of sucrose as a possible contaminant in e-liquids for electronic cigarettes by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Pawel Kubica · Andrzej Wasik · Agata Kot-Wasik · Jacek Namieśnik

Received: 3 December 2013 / Revised: 31 January 2014 / Accepted: 11 February 2014 / Published online: 25 March 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The influence of sucrose combustion products on smoking and nicotine addiction is still controversial because the presence of the sucrose may be treated as a source of aldehydes and organic acids. In e-liquids used as refills for electronic cigarettes, which are made primarily of poly(propylene glycol), glycerine and ethanol, sucrose may be present at trace levels, and its impact on mainstream smoke formation, and hence on human health and smoking/nicotine addiction is unknown. An analytical method was developed where high-performance liquid chromatography in hydrophilic interaction liquid chromatography mode and tandem mass spectrometry were used for fast and simple determination of sucrose and other saccharides in e-liquids for electronic cigarettes. Minimal effort was required in the sample preparation step, and satisfactory results were obtained, and the sample matrix had an insignificant impact. The chromatographic separation was done using an Ascentis Express OH5 column (150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm). The coefficients of variation for within-day precision for three concentrations were 2.4 %, 1.6 % and 2.3 %, and the between-day coefficients of variation for a single concentration were 2.1 %, 2.5 % and 1.7 % measured on the next 3 days. The detection limit was 0.73 μg/g, and the sucrose content in e-liquids ranged from 0.76 to 72.93 μg/g among 37 samples. Moreover, with the method presented it is possible to determine the presence of other saccharides such as fructose, glucose, maltose and lactose. However, only sucrose was found in all samples of e-liquids. The proposed method is rapid, simple and reliable in terms of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

Keywords Electronic cigarettes · Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry · Carbohydrates

Introduction

The use of electronic cigarettes (e-cigarettes) as an alternative to traditional tobacco smoking and as part of therapy in nicotine and smoking addiction is becoming more and more popular. In our previous research, we proved that not all liquids for e-cigarettes marked as nicotine-free are actually free of nicotine [1]. Sucrose is a popular additive in tobacco products and is commonly used in the production processes and to enhance the taste and flavour of the tobacco. Moreover, sucrose occurs naturally in tobacco leaves [2–4] and can be determined by liquid chromatography combined with mass spectrometry [5] or by other techniques [6]. The exact mechanism of the formation of aldehydes and organic acids during combustion of sucrose and other sugars in tobacco is still not fully understood [7, 8]. However, it is known that during this process organic acids and aldehydes may be formed [3, 9–12]. Aldehydes coming from sugars during the combustion of tobacco may have the reinforcing effect responsible for increased addiction to nicotine and smoking [9, 13]. The high temperature during the combustion of tobacco (from 600 to 900 °C during drawing) is responsible for the formation of aldehydes and organic acids. The working temperature of the heating element of e-cigarettes is variable owing to the cooling of inhaled air flow [14]. From one point of view, this temperature may seem too low (around 250 °C) to lead to the formation of aldehydes and organic acids, but there are reports [3, 15] indicating fairly quick formation of aldehydes from sucrose during cigarette smoking even at temperatures as low as 200 °C. Furthermore, more than ten different aldehydes

P. Kubica (✉) · A. Wasik · A. Kot-Wasik · J. Namieśnik
Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty,
Gdańsk University of Technology,
Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland
e-mail: pawel.kubica.pg@gmail.com

were detected in e-cigarette aerosol [16]. Despite this, the temperature is high enough to evaporate the main ingredient, which is poly(propylene glycol), with a boiling temperature of around 188 °C. All of the e-liquids available on the market are based on poly(propylene glycol) (above 80 %), glycerine and even ethanol (from 5 to 15 %) according to the labels attached. What is more, none of the labels of e-liquids on the market state that the products contain sucrose or may contain it at a trace level.

The purpose of the project was to develop a rapid and simple method for the evaluation of sucrose content in e-liquids by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and tandem mass spectrometry (MS/MS) with electrospray ionization and multiple reaction monitoring. The proposed analytical method allows the determination of the sucrose content in less than 4 min, with minimal effort required for sample preparation.

Materials and methods

Chemicals

Standards of sucrose, glucose, fructose, maltose, lactose and raffinose as well as ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC) grade acetonitrile was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained with the use of an HLP5 system from Hydrolab (Wiślina, Poland).

Samples

Thirty-seven samples from different producers of popular e-cigarettes were purchased on the local market. The labels attached to the products did not contain any information about carbohydrate content.

Preparation of standards and calibration solutions

Stock solutions of sucrose, glucose, fructose, maltose, lactose and raffinose (used as an internal standard) were prepared by dissolving an appropriate amount of each in a mixture of acetonitrile and water (80:20). The final concentration of each carbohydrate was 50 µg/mL. The purity of raffinose, with regard to the presence of sucrose, was tested, and no traces of sucrose were detected. All samples tested were raffinose-free, and therefore use of raffinose as an internal standard is acceptable. Calibration solutions were prepared by dilution of the stock solution with the mobile phase to obtain sucrose concentrations of 10, 50, 100, 150, 200 and 400 ng/mL, whereas the concentration of the internal standard was kept at 400 ng/mL. All solutions were stored in a refrigerator at 4 °C and every week new solutions were made.

Sample preparation and preparation of fortified samples

Fifty milligrams of each sample was added to a 10-mL volumetric flask. Internal standard solution (40 µL) was added, and the flask was filled up to the mark with the acetonitrile–water (80:20) mixture. Fortified samples were prepared as follows: a randomly selected sample with sucrose content below the limit of detection (LOD) was spiked with the appropriate amount of sucrose standard to obtain 10, 20 and 30 µg/g solutions (these correspond to 50, 100 and 150 ng/mL after sample preparation). The fortified samples were used for repeatability and trueness (recovery) determination.

MS/MS conditions

All analyses were performed with a Q-Trap 4000 triple-quadrupole mass spectrometer from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) with electrospray ionization in negative mode, using Analyst® 1.5.2. Analyte-specific multiple

Table 1 Optimal parameters for the ion transitions monitored and tandem mass spectrometry (MS/MS) operational parameters

Parameters for the ion transitions monitored						
Analyte	Pseudomolecular ion→fragment ion	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CE (V)	
Sucrose	341.0→179.1	-100	-10	-5	-20	
	341.0→89.0 ^a			-5	-26	
Glucose	178.9→88.9	-75	-10	-13	-10	
Fructose	178.9→88.9	-50	-10	-3	-12	
Maltose/lactose	341.3→160.7	-80	-10	-17	-10	
Raffinose	503.2→178.9	-125	-10	-13	-30	
MS/MS operation parameters						
Curtain gas (psi)	Temperature (°C)	Nebulizer gas (psi)		Turbo gas (psi)		
20	550	50		40		

DP declustering potential, EP entrance potential, CXP collision cell exit potential, CE collision energy

^a Qualitative transition

reaction monitoring conditions and ion source parameters were determined using an appropriate Analyst® feature, by the infusion of a 200 ng/mL solution of each carbohydrate, and in flow injection mode, respectively. Optimum detection conditions are presented in Table 1.

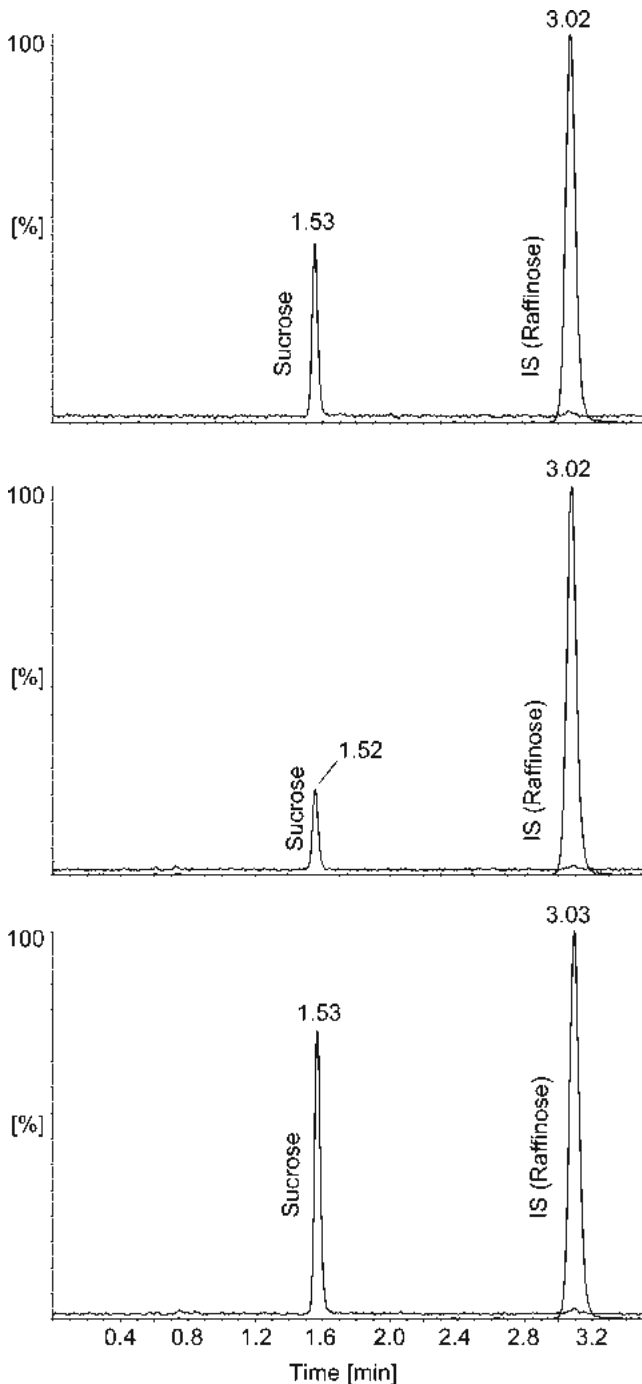


Fig. 1 Examples of chromatograms obtained in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mode. From the *top*: mixture of standards sucrose (100 ng/mL) and raffinose (400 ng/mL), chromatogram of real sample C cherry (sucrose concentration 8.00 µg/g), chromatogram of real sample D coffee (sucrose concentration 40.82 µg/g). *IS* internal standard

HPLC conditions

The chromatographic separation was performed using the HPLC–MS/MS system consisting of a pump, degasser, autosampler and column oven from the Agilent 1200 series. The separation of analytes was achieved in the HILIC mode using an Ascentis Express column (Supelco, Bellefonte, PA, USA; 150 mm×2.1 mm, 2.7 µm, pore size 80 Å). The column oven temperature was set to 35 °C. The mobile phase contained acetonitrile (solvent A) and ammonium formate buffer (solvent B) adjusted to pH 6.8. The presence of ammonium formate is necessary to obtain narrow and symmetrical peaks. Too high a concentration of buffer will suppress the detector signal, and therefore its concentration was kept to a minimum, i.e. 2 mM. The separation of sugars was performed in the isocratic mode (80 % solvent A and 20 % solvent B) at a flow rate of 0.7 mL/min. The injection volume was set to 5 µL. The total time of the chromatographic run was 3.5 min. Chromatograms of standards (sucrose and raffinose) and chromatograms of selected real samples are presented in Fig. 1.

Results and discussion

The possible presence of other sugars in e-liquids

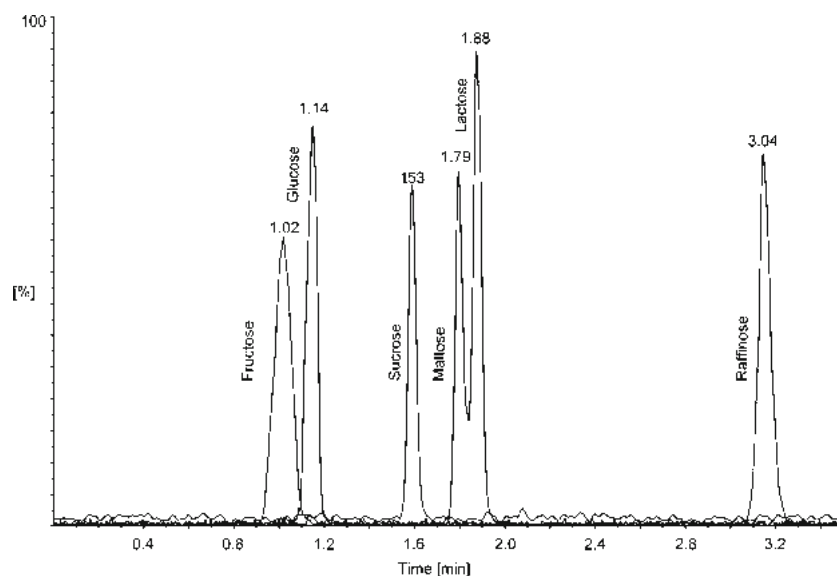
Most of the disaccharides are built of monomers such as glucose, galactose and fructose. This means that they will generate the same pseudomolecular and fragmentation ions during MS/MS. In fact, only the difference in the retention times between different sugars allows their identification. The samples of e-liquids were tested for the presence of two disaccharides (lactose and maltose) and two common monosaccharides (fructose and glucose) in order to exclude their possible coelution with sucrose. The mixture containing each sugar at 200 ng/mL was analysed under the conditions described in “HPLC conditions”. The chromatogram presenting the separation of standards is shown in Fig. 2. Under the proposed HPLC conditions, sucrose is baseline-separated from other sugars; hence, they will not interfere with its quantitative determination. None of the 37 samples analysed were found to contain sugars other than sucrose.

Within-laboratory validation

Analytical figures of merit

A six-point calibration curve was constructed using raffinose as an internal standard, and each calibration solution (see “Preparation of standards and calibration solutions”) was analysed in triplicate. The curve was linear in the range of concentrations studied. The LOD was calculated with the

Fig. 2 Chromatogram of a mixture of analytes: fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose and raffinose (each at 200 ng/mL) detected by negative electrospray ionization tandem mass spectrometry in HILIC mode



equation $LOD=3.3S_b/a$, where S_b is the standard deviation of the intercept and a is the slope of the calibration curve. The limit of quantitation was calculated as three times the LOD. The LOD obtained ($0.73 \mu\text{g/g}$) is similar to [17, 18] or even lower [19, 20] than the values reported by others. Within-day precision was estimated by replicate ($n=6$) analysis of samples fortified at three concentrations (10, 20 and $30 \mu\text{g/g}$) on 1 day. Data obtained during the within-day precision investigation were also used to assess the trueness of the method. Intermediate (between-day) precision was verified by analysing the single fortified solution ($20 \mu\text{g/g}$) for three consecutive days. Again, each analysis was performed six times ($n=6$).

As can be seen from Table 2, the recovery values at all spiking levels are close to 100 %, which means that no matrix effects or bias was observed. This allows the use of external calibration instead of a matrix-matched approach. The method also performs well in terms of precision. In no case was the coefficient of variation greater than 2.5 %.

Analysis of real samples

All samples were prepared according to the protocol described in “Sample preparation and preparation of fortified samples”. Samples were chosen from among the most manufacturers

Table 2 Determination of sucrose in fortified e-liquid samples: calibration parameters, trueness and repeatability data

Analyte	Calibration curve equation (6 point, $n=3$)	S_a^a	S_b^c	R^{2d}	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
Sucrose	$y=0.001746x+0.0479$	0.000011	0.0019	0.9995	0.73	2.2
	Within-day precision (3 spiking levels, $n=6$)					
	Spiking level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^b (%)	CV (%)			
	10	101.4	2.4			
	20	101.1	1.6			
	30	98.3	2.3			
	Between-day precision (1 spiking level, $20 \mu\text{g/g}$, $n=6$)					
	Day	Recovery ^b (%)	CV (%)			
	1	99.6	2.1			
	2	105.8	2.5			
	3	102.9	1.7			

LOD limit of detection, LOQ limit of quantitation, SD standard deviation, CV coefficient of variation

^a Standard deviation of the slope

^b Calculated as the ratio between the mean concentration found from the calibration curve and the spiking level

^c Standard deviation of the constant term

^d Coefficient of determination

and the popular brands available on the market. The content of sucrose in the samples analysed is presented in Table 3.

Only in four samples was the sucrose content below the LOD or C_{min} used for the construction of the calibration curve. These samples were reanalysed with less dilution (5 mL instead of 10 mL). There is no clear relationship between the sucrose content and the manufacturer. Among the samples of a given brand, one will find e-liquids that are almost sucrose-

Table 3 Concentration of sucrose in e-liquids for electronic cigarettes: analysis of real samples

Company	Taste	Concentration of sucrose ± SD (µg/g)
A	Black	1.11±0.21
	Cherry	2.28±0.11
	Menthol	23.73±0.81
B	Camel	0.68 ^a
	Chocolate	7.315±0.095
	Grape	5.04±0.28
	Orange	0.56 ^a
	Strawberry	0.64 ^a
C	Watermelon	1.99±0.11
	Banana	2.31±0.19
	Camel	10.89±0.14
	Cherry	8.006±0.024
	Fruit mix	5.62±0.37
	Marlboro	20.15±0.43
	Menthol	10.66±0.55
	L&M	0.784±0.053
	Red Bull	19.06±0.34
Vanilla	1.027±0.093	
D	Apple	25.07±0.35
	Camel	1.211±0.052
	Cherry	8.65±0.36
	Chocolate	72.93±0.72
	Coffee	40.82±0.52
	L&M	9.86±0.28
	Marlboro	13.11±0.20
	Red Bull	13.46±0.23
	Strawberry	8.22±0.14
	Tobacco	19.91±0.54
E	Cherry	0.62 ^a
	Coffee	3.40±0.20
F	Coffee	0.76±0.12
	Menthol	26.23±0.29
	Red Bull	7.74±0.20
	Tea	22.25±0.46
	Tobacco	29.82±0.43
G	Fruit mix	1.80±0.13
	Menthol	11.67±0.35

^a Informative value only, samples were reanalysed with less dilution (see the text for details)

free together with others high in sucrose. For example, most of the samples from producer B are low in sucrose (less than 1 µg/g), but there is an exception. Chocolate-flavoured e-liquid was found to contain sucrose at a concentration of 7.3 µg/g. The opposite situation can be observed in the case of producers C and D. Here, most of the samples were found to be high in sucrose, but there were a few exceptions. Likewise, no direct relationship was found between the flavour and the sucrose content. Only in the case of menthol-flavoured e-liquids was the sucrose content rather high in each sample.

Conclusions

The purpose of this project was to develop a simple, reliable and sensitive method for the determination of sucrose in e-liquids with minimum effort for sample preparation. The method developed may be helpful in future research on e-cigarettes. The main advantages of the method presented are the low LOD (0.73 µg/g) and the short analysis time, without the need to stabilize the column owing to the isocratic separation mode. The source of sucrose in e-liquids is unknown. One of the possibilities is that sucrose is a component of the flavour/taste additives, or it is a contaminant from the production process. Another possibility is that sucrose is extracted along with nicotine from tobacco leaves, although in such a case reducing sugars such as fructose and glucose should also be present. Still, there is much controversy about the safety of e-cigarettes, and the method developed may be helpful in quality control, or research on the impact of e-liquid content and the composition of e-cigarette aerosol.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Kubica P, Kot-Wasik A, Wasik A, Namieśnik J (2013) “Dilute & shoot” approach for rapid determination of trace amounts of nicotine in zero-level e-liquids by reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interactions liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-electrospray ionization. *J Chromatogr A* 1289: 13–18
2. Leffingwell JC (1999) Leaf chemistry: basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. In: Davis DL, Nielsen MT (eds) *Tobacco: production chemistry and technology*. Blackwell, Oxford, pp 265–284
3. Talhout R, Opperhuizen A, Amsterdam JGCV (2006) Sugars as tobacco ingredient: effects on mainstream smoke composition. *Food Chem Toxicol* 44:1789–1798

4. Bates C, Jarvis M, Connolly G (1999) Tobacco additives: cigarette engineering and nicotine addiction. http://www.ash.org.uk/files/documents/ASH_623.pdf
5. Clarke MB, Bezabeh DZ, Howard CT (2006) Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry: a comparison with ion chromatography and application to product discrimination. *J Agric Food Chem* 54(6):1975–1981
6. Troje ZŠ, Fröbe Z, Perović Đ (1997) Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. *J Chromatogr A* 775:101–107
7. Tomasik P, Pałasiński M, Wiejak S (1989) The thermal decomposition of carbohydrates. Part I. The decomposition of mono-, di-, and oligo-saccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 47:203–278
8. Tomasik P, Pałasiński M, Wiejak S (1989) The thermal decomposition of carbohydrates. Part II.* The decomposition of starch. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 47:279–343
9. Talhout R, Opperhuizen A, van Amsterdam JGC (2007) Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:627–636
10. Seeman JI, Dixon M, Haussmann HJ (2002) Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. *Chem Res Toxicol* 15(11):1331–1350
11. Seeman JI, Laffoon SW, Kassman AJ (2003) Evaluation of relationships between mainstream smoke acetaldehyde and "tar" and carbon monoxide yields in tobacco smoke and reducing sugars in tobacco blends of U.S. commercial cigarettes. *Inhal Toxicol* 15(4):373–395
12. Baker RR (2006) The generation of formaldehyde in cigarettes—overview and recent experiments. *Food Chem Toxicol* 44:1799–1822
13. Belluzzi JD, Wang R, Leslie FM (2005) Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 30(4):705–712
14. Westenberger BJ (2009) Evaluation of e-cigarettes. Food and Drug Administration, Rockville
15. Burton HR (1976) Thermal decomposition and gas phase analysis of carbohydrates found in tobacco. In: Shafizadeh F, Sarkanen KV, Tillman DA (eds) Thermal uses and properties of carbohydrates and lignins. Academic, New York
16. Goniewicz MŁ, Knysak, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, Prokopowicz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob P III, Benowitz N (2014) Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control* 23:133–139. doi:10.1136/tobaccocontrol-2012-050859
17. Ikegami T, Horie K, Saad N, Hosoya K, Fiehn O, Tanaka N (2008) Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC. *Anal Bioanal Chem* 391(7):2533–2542
18. Perrone D, Donangelo CM, Farah A (2008) Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem* 110:1030–1035
19. D'Arcy-Moskwa E, Westonb L, Noble GN, Raidal SL (2011) Determination of sucrose in equine serum using liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS). *J Chromatogr B* 879:3668–3671
20. Nielsen NJ, Granby K, Hedegaard RV, Skibsted LH (2006) A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. *Anal Chim Acta* 557:211–220

Oznaczenie cukrów w próbkach płynów do e-papierosów jest jedną z pierwszych prób scharakteryzowania składu tego rodzaju produktów. Opracowana metoda charakteryzuje się krótkim czasem analizy chromatograficznej, wysoką czułością oraz dostarcza interesujących informacji co do składu i zawartości produktów używanych do e-palenia. Dzięki wykorzystaniu kolumny z sorbentem typu ziarna porowato-rdzeniowe, można zauważyć znaczącą poprawę w kształcie pików oraz skrócenie ich czasu retencji bez utraty rozdzielczości. Wypełnienie ziarnem porowato-rdzeniowym stanowi ciekawą alternatywę dla technik wykorzystujących warunki UPLC, gdzie ziarna całkowicie porowate mają średnicę poniżej 1,7 μm . Wynika to z faktu, że ten nowy rodzaj wypełnienia nie stawia tak dużego oporu fazie ruchomej jak ziarna o mniejszej średnicy, wykorzystywane w technice UPLC.

4.3. Oznaczanie nikotyny w próbkach płynów do elektronicznych papierosów

Nikotyna to alkaloid naturalnie występujący w liściach oraz korzeniach tytoniu szlachetnego. Nikotyna jest dobrze rozpuszczalna zarówno w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, jak i w wodzie ($\log P=1,2$ oznacza, że można ją zakwalifikować jako substancję średniolipofilową). Najpopularniejszą formą przyjmowania nikotyny jest palenie tytoniu, jakkolwiek produkty ją zawierające mogą być także żute, inhalowane, wciągane nosem, przyklejane do ciała (gumy, tabletki, tabaka, aerozole, plastry). Człowiek uważał praktykę palenia tytoniu najpierw za wysublimowany rodzaj rozrywki, by z czasem uznać to za źródło wielu niebezpiecznych chorób.

Celem badań było opracowanie metodyk analitycznych z wykorzystaniem techniki HILIC i RPLC sprzężonych z detektorem MS/MS w trybie monitorowania wielu przejść jonowych (MRM). Metodyki były opracowane w taki sposób, żeby można było ich użyć niezależnie lub zamiennie jako uzupełnienie i/lub potwierdzenie zawartości nikotyny w próbkach. Ponadto badania miały na celu: uzyskanie krótkiego czasu analizy chromatograficznej bez użycia techniki UPLC, wykorzystanie elucji izokratycznej, by wyeliminować potrzebę stabilizacji kolumny pomiędzy analizami oraz opracowanie prostej procedury przygotowania próbki. Opracowane metody wykorzystano do oznaczenia zawartości nikotyny w ponad 40 próbkach płynów pochodzących od różnych producentów e-papierosów. Wszystkie pozyskane produkty do badań były oznaczone jako niezawierające nikotyny.

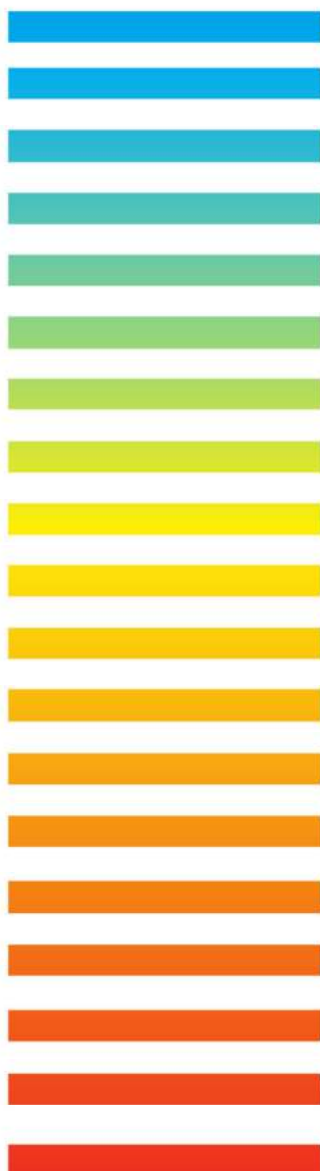
Opracowane metody badawcze mogą zostać wykorzystane jako narzędzia kontroli jakości oraz pomiaru zawartości nikotyny, gdyż jej obecność w produktach oznaczonych jako niezawierające nikotyny może budzić kontrowersje. Wyniki badań opublikowano w czasopiśmie *Journal of Chromatography A* [112].



Volume 1289, 10 May 2013 ISSN 0021-9673

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

INCLUDING ELECTROPHORESIS, MASS SPECTROMETRY AND
OTHER SEPARATION AND DETECTION METHODS

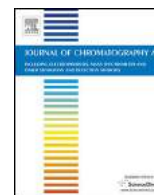


EDITORS

J.G. Dorsey (Tallahassee, FL)
S. Fanali (Monterotondo)
R.W. Giese (Boston, MA)
P.R. Haddad (Hobart)
H.K. Lee (Singapore)
C.F. Poole (Detroit, MI)
M.-L. Riekkola (Helsinki)
P.J. Schoenmakers (Amsterdam)
N. Tanaka (Kyoto)

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect



“Dilute & Shoot” approach for rapid determination of trace amounts of nicotine in zero-level e-liquids by reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interactions liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-electrospray ionization



Paweł Kubica*, Agata Kot-Wasik, Andrzej Wasik, Jacek Namieśnik

Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2013
Received in revised form 21 February 2013
Accepted 24 February 2013
Available online 4 March 2013

Keywords:

Nicotine
Electronic cigarettes
RPLC–MS/MS
HILIC–MS/MS

ABSTRACT

Two analytical procedures are proposed where HILIC and RPLC techniques are coupled with tandem mass spectrometry detection for rapid determination of trace amounts of nicotine in zero-level liquids for electronic cigarettes. Samples are prepared on the basis of the approach “dilute & shoot” which makes this important step quick and not complicated. The chromatographic separation was carried out on a Zorbax XDB column (RPLC method) and Ascentis Si column (HILIC mode). Within-run precisions (CVs) measured at three concentration levels were as follows: 0.73%, 0.98% and 1.44% for RPLC method and 1.39%, 1.44% and 0.57% (HILIC mode). Between-run CVs were as follows: 1.94%, 1.02% and 1.22% for RPLC mode and 1.49%, 1.20% and 1.22% for HILIC mode. The detection limits of RPLC and HILIC modes were 4.08 and 3.90 ng/mL respectively. The proposed procedures are rapid, not complicated, sensitive and are suitable for fast determination of trace amounts of nicotine in zero-level liquids for electronic cigarettes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tobacco leaves are rich with closely related alkaloids like: nicotine, anabasine, anatabine, nornicotine, nicotyrine, myosmine, 2,3'-dipyridyl and cotinine [1]. The most popular and well known alkaloid is nicotine due to its potential as one of the most addictive substances. From the pharmaceutical point of view nicotine plays an important role as the agent responsible for numerous behavioural and physiological effects [2–5]. There are many ways to consume the tobacco and receive nicotine. Nicotine products can be divided into those that produce smoke like cigarettes, pipes or cigars and to those that do not produce smoke for instance gums and inhalers [3].

Recently, manufacturers mainly located in China have been producing electronic cigarettes and equipment for them. Such devices are powered by batteries and produce vapour from liquid containing nicotine and mixture of glycols (mainly polypropylene glycol as solvent) [6]. The cartridges are filled with liquids that contain different amount of nicotine and flavours. Sometimes colourants

are used to encourage potential customers. The content of specific flavours (fruits, mint, branded cigarettes taste) can simulate the real sensations of cigarette smoking [6,7]. Some cartridges and liquids may contain nicotine at trace amount level [8].

There are some known analytical procedures for the determination of nicotine and its derivatives in various types of samples. Up to now UV detection has been frequently applied for the determination of nicotine [9–15]. Information found in recent publications indicate that the most popular ones are based on the application of high and ultra performance liquid chromatography (HPLC and UPLC), coupled with mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) [4,16–25] due to sensitivity, confidence and versatility. Gas chromatography coupled with flame ionization detection [1], MS and MS/MS [24,26–32], time-of-flight MS [33,34], electron capture detector (ECD) [35], nitrogen chemiluminescence detection [36] or nitrogen–phosphorous detection (NPD) [37] is used as well for determination of nicotine concentration. Moreover, developed methods with the use of capillary electrophoresis coupled with UV detection [38,39], MS [40] and electrochemiluminescence detector [41] have been reported for the determination of nicotine. Detection by UV is not as sensitive as MS/MS detection and further analysis and evaluation of nicotine content in zero-level liquids have to be done.

The aim of the project was to develop a rapid, simple and sensitive methods for the determination and quantification of nicotine

* Corresponding author. Tel.: +48 58 347 18 33; fax: +48 58 347 26 94.
E-mail addresses: pawel.kubica.pg@gmail.com (P. Kubica),
agata@chem.pg.gda.pl (A. Kot-Wasik), wasia@chem.pg.gda.pl (A. Wasik),
jacek.namiesnik@pg.gda.pl (J. Namieśnik).

in zero-level liquids for electronic cigarettes by reversed phase liquid chromatography (RPLC) and by hydrophilic interactions liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass spectrometry-electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Sample preparation is based on the approach “dilute & shoot” due to simple and stable composition of the matrix. Two proposed analytical methods allow determining the concentration of nicotine at trace amount in zero-level liquids in less than 4 min per single analysis run.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards of racemic nicotine, acetaminophen (internal standard for the RPLC mode of separation), pyridoxine hydrochloride (vitamin B6; internal standard for the HILIC mode of separation) and ammonium formate were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrile HPLC gradient (ACN) and methanol HPLC gradient (MeOH) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Formic acid (FA) and ethanol were purchased from POCH (Gliwice, Poland). Propylene glycol and glycerol were purchased from EasyChem (Szamotuły, Poland). Deionized water (H₂O) was prepared with the use of the HLP5 system from Hydrolab (Wiślina, Poland).

2.2. Samples

Forty one liquids from seven different producers marked with zero-level of nicotine were purchased from stores of popular distributors of electronic cigarettes on the Polish market. Four producers placed information on the liquids' bottles that product may contain nicotine. Two producers did not include any information about nicotine content. One of the producers gave information about possible trace levels of nicotine.

2.3. Preparation of standards and calibration solutions

Stock solutions of nicotine, acetaminophen and pyridoxine were prepared by dissolving the weighted amount of standards in the following solutions: in a mixture of H₂O and MeOH (75:25) for the RPLC mode of separation, in a mixture of H₂O and ACN (25:75) for the HILIC mode of separation. The final concentration of nicotine and acetaminophen was 10 µg/mL and pyridoxine was 40 µg/mL. Calibration solutions were made by dilution of stock solutions in the mobile phase (separately for the RPLC and HILIC) to obtain the following concentrations: 5, 10, 50, 100, 150, 200 and 400 ng/mL. In each calibration solution, the IS concentration was 100 ng/mL (RPLC mode) and 200 ng/mL (HILIC mode). Standards, stock solutions and calibration solutions were stored in refrigerator at 4 °C. Every two weeks new stock solutions and calibration solutions were prepared.

2.4. Sample preparation

Approximately 10 mg of each sample was weighted into a 10 mL flask and 100 µL (RPLC mode) or 50 µL (HILIC mode) of IS was added, depending on the used method. Finally, the flask was filled up to 10 mL with the mobile phase for the chosen mode of separation.

2.5. Preparation of fortified samples

The main ingredients of liquids for electronic cigarettes are propylene glycol (>70%), glycerol (>15%) and ethanol (>10%). The rest of the components are complex alcohols, diols, flavours and colourants. The liquid for fortification with nicotine was prepared

by mixing 75% of propylene glycol, 15% of glycerol and 10% of ethanol. To such liquid nicotine was added to obtain 50, 150 and 300 µg/g of analyte per gram of liquid. Fortified samples and unfortified laboratory made samples of liquid were prepared according to the protocol described in Section 2.4.

To examine the influence of the sample matrix components another calibration solutions were prepared in the same range and in the same way as described in Section 2.3. Furthermore, for every 10 mL of each calibration solution 10 mg of randomly selected real sample was added. The nicotine content in chosen real sample was below LOD.

2.6. MS/MS conditions

Analyses were done using a Q-Trap 4000 triple quadrupole mass spectrometer from Applied Biosystems (Foster City, USA) with electrospray ionization in positive ion mode. For setting the parameters of MRM mode, the infusion analyses were performed with solutions containing 100 ng/mL of nicotine, pyridoxine and acetaminophen. The positive ion mode tandem mass spectra of nicotine, acetaminophen and pyridoxine and their structures are presented in Fig. S1 (supplementary material). In order to evaluate optimal parameters for MS/MS ion source for RPLC and HILIC modes flow injection analyses (FIA) of a standard solution of nicotine (100 ng/mL) were done. Operational parameters of ion source were optimized in order to obtain the highest intensity for nicotine. Parameters of the MRM mode for the analyte and internal standards as well as ion source parameters are presented in Table S1 (supplementary material). All data were collected and processed using Analyst 1.5.2 Software and ChemStation B.04.02 SP1.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.078>.

2.7. HPLC conditions

Separation was carried out with the use of HPLC–MS/MS system with the Agilent 1200 series containing a pump coupled with photodiode array detector (DAD), degasser, column oven and autosampler. The RPLC mode was performed on analytical column Zorbax XDB-C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm with pore size 100 Å). The column temperature was set to 35 °C. Mobile phase consisted of H₂O with 0.05% of FA (A) and MeOH with 0.05% of FA (B), while flow rate was set to 0.7 mL/min. Injection volume was set to 5 µL. Isocratic flow conditions were chosen for this method: 75% of A and 25% of B. Total time of analysis was 4 min. In case of RPLC mode the acetaminophen was chosen as internal standard.

The HILIC mode was performed on analytical column Ascen-tis Si from Supelco (150 mm × 2.1 mm, 5 µm with pore size 100 Å). The column temperature was set to 25 °C. Mobile phase consisted of ACN with 0.01% of FA (A) and H₂O with 10 mM of ammonium formate (B), while flow rate was set to 0.8 mL/min. Injection volume was set to 5 µL. Again, isocratic flow conditions were chosen for this method: 75% of A and 25% of B. Total time of analysis was 4 min. In case of HILIC mode the pyridoxine was selected as internal standard.

Chromatograms of mixtures of standard of racemic nicotine and chosen IS for each mode and examples of chromatograms of real samples are presented in Fig. 1.

3. Results and discussion

3.1. Inter-laboratory validation

3.1.1. Linearity, LOD, LOQ and matrix influence

Calibration curves were constructed using the internal standard method. Seven calibration solutions were made from standard

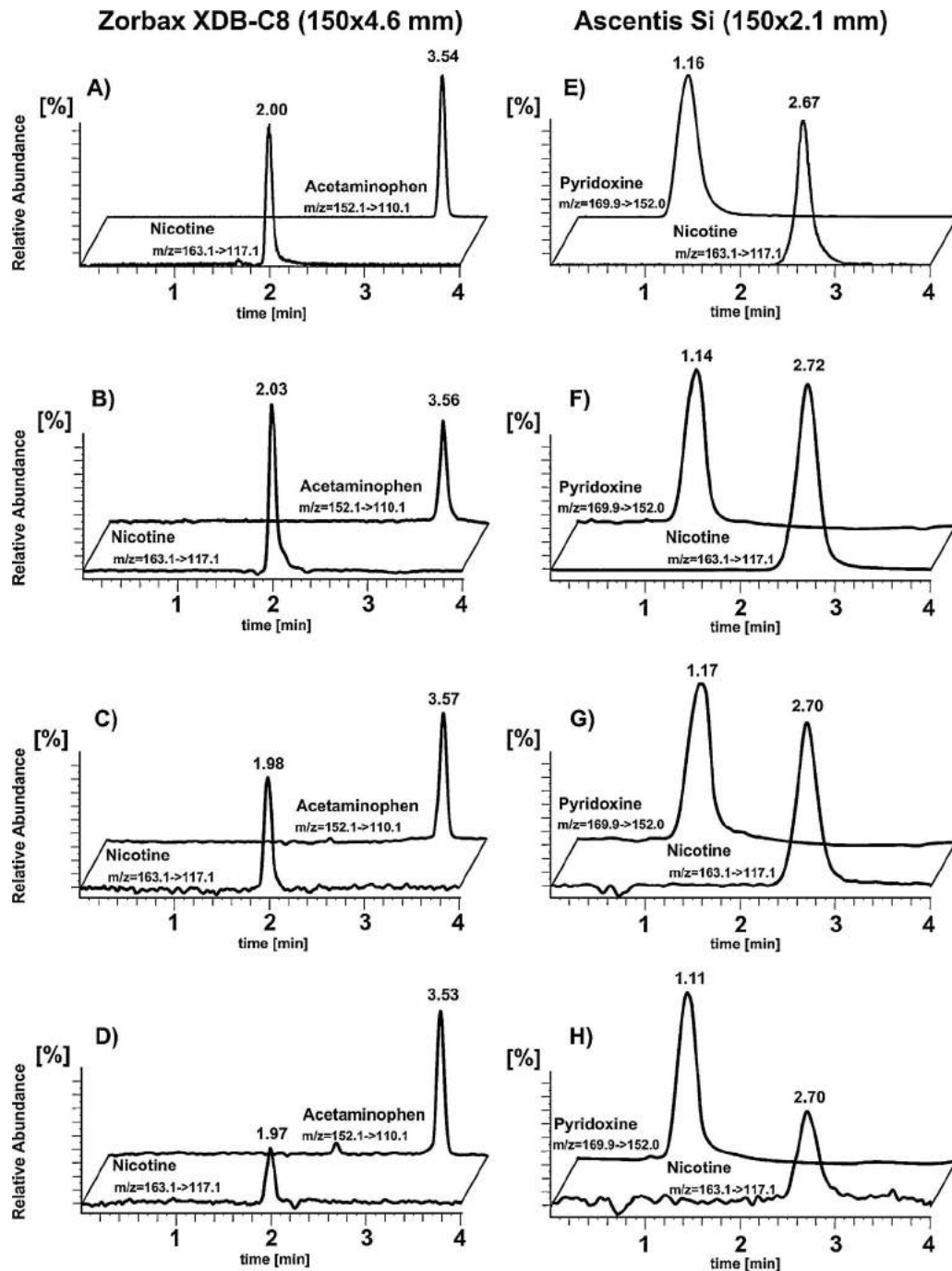


Fig. 1. Left panel. Multiple-reaction monitoring chromatograms obtained with column Zorbax XDB-C8 (150 mm × 4.6 mm): (A) mixture of racemic nicotine (100 ng/mL) and IS (acetaminophen 100 ng/mL), (B) sample of Producer C – taste “Chocolate” ($C_{\text{Nicotine}} = 320.95 \pm 2.02 \mu\text{g/g}$), (C) sample of Producer G – taste “Vanilla” ($C_{\text{Nicotine}} = 88.48 \pm 0.95 \mu\text{g/g}$), (D) sample of Producer D – taste “Desert Ship” ($C_{\text{Nicotine}} = 10.05 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$). Right panel. Multiple reaction monitoring obtained with column Ascentis Si (150 × 2.1): (E) mixture of racemic nicotine (100 ng/mL) and IS (pyridoxine 200 ng/mL), (F) sample of Producer C – taste “Chocolate” ($C_{\text{Nicotine}} = 312.32 \pm 1.51 \mu\text{g/g}$), (G) sample of Producer G – taste “Vanilla” ($C_{\text{Nicotine}} = 84.19 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$), (H) sample of Producer D – taste “Desert Ship” ($C_{\text{Nicotine}} = 9.74 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$).

solutions of nicotine as described in Section 2.3. Each calibration solution contained a specific amount of IS (100 ng/mL of acetaminophen for RPLC mode and 200 ng/mL of pyridoxine for HILIC mode). Each solution was analyzed three times. The values of limits of detection (LODs) were calculated by multiplying the constant term in the equation of the calibration curve by 3.3 and dividing by the slope of the calibration curve. The values of the limits of quantitation (LOQs) were calculated by multiplying LODs by 3. Equations of calibration curves, values of LODs, LOQs, coefficients of

determination (R^2), standard deviations of slope (S_a) and standard deviations of constant term (S_b) are summarized in Table 1.

The obtained values of LOD are proof that with presented methods it is possible to determine the trace amount of nicotine in zero-level liquids for electronic cigarettes. In all cases LOD values are lower than the lowest concentration of calibration solution. High values of coefficient of determination demonstrate an appropriate and acceptable matching of the corresponding points to the calibration curve equation. The influence of matrix components to

Table 1
Data gathered from the equations of calibration curves for two presented methods.

Analyte	Calibration curve equation (5–400 ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	S _a	S _b	R ²
RPLC mode (Zorbax XDB-C8 150 mm × 4.6 mm)						
Nicotine	$y = 0.0142243x + 0.1720$	4.08	12.24	0.000096	0.018	0.9991
Nicotine (matrix influence)	$y = 0.0141687x + 0.278$	4.19	12.58	0.000074	0.018	0.9997
HILIC mode (Ascentis Si 150 mm × 2.1 mm)						
Nicotine	$y = 0.0006367x + 0.00331$	3.90	11.70	0.0000041	0.00075	0.9992
Nicotine (matrix influence)	$y = 0.0006254x + 0.00365$	4.43	13.30	0.0000068	0.00084	0.9993

Table 2
Recovery, standard deviations (SD), coefficients of variation (CV) and variance analysis (ANOVA) taken from HPLC–MS/MS analysis of spiked samples at three levels.

Analyte	Spiking level (μg/g)	Mean recovery (μg/g) (%) (n = 6)	SD	CV (%)
RPLC mode (Zorbax XDB-C8 150 mm × 4.6 mm)				
Nicotine	50	51.20 (102.4)	0.37	0.73
	150	148.22 (98.8)	1.45	0.98
	300	296.08 (98.36)	2.92	1.94
HILIC mode (Ascentis Si 150 mm × 2.1 mm)				
Nicotine	50	49.37 (98.7)	0.69	1.39
	150	151.34 (100.9)	2.18	1.44
	300	296.45 (98.8)	1.68	0.57
Analysis of variance (two way) ANOVA				
Source of variation	F value	F critical test	p-value	α
Sample	96,819.26	3.32	7.09×10^{-58}	0.05
Columns	2.32	4.17	0.14	
Interaction	9.67	3.32	0.00057	
Analysis of variance (two way) ANOVA				
Spiking level (μg/g)	RPLC variance	HILIC variance		
50	0.055	0.19		
150	0.84	1.90		
300	7.24	1.14		

the calibration curve trends is insignificant and is not observed. Such finding is based due to the similarities and the compatibility of the obtained values of LODs, LOQs and another from the calibration curves obtained without adding the real sample and calibration curves with real sample content. The composition of samples is relatively simple and the influence of alcohols, diols, colourants or flavour components to the nicotine ions is minimal.

In order to exclude other effects of sample components and coelution with analyte or IS the randomly selected sample was prepared according to Section 2.4 (in this case without adding the IS) and analysis was performed with the usage of DAD detector at 254 nm. Chromatograms of real sample in HILIC and RPLC modes recorded at 254 nm are presented in Fig. 2.

3.1.2. Trueness, intermediate precision and repeatability of the developed methods

The developed methods were tested in view of trueness, intermediate precision and repeatability. Fortified liquids were prepared according to the protocol described in Section 2.5. The fortified samples were prepared according to the protocol described in Section 2.4. Three levels of concentrations were prepared to obtain separately 300, 150 and 50 μg/g of nicotine in liquid. After sample preparation step the concentration levels were 300, 150 and 50 ng/mL. At the same time unfortified samples were prepared to exclude the influence of ingredients of liquids to the signal coming from nicotine. Six repeats were made for a given level of fortified sample for each of the developed methods. Results are presented in μg/g of liquid and the weight of the sample was included in the calculations. To compare the obtained mean recoveries an ANOVA test was conducted. The null hypothesis is that means of recovery

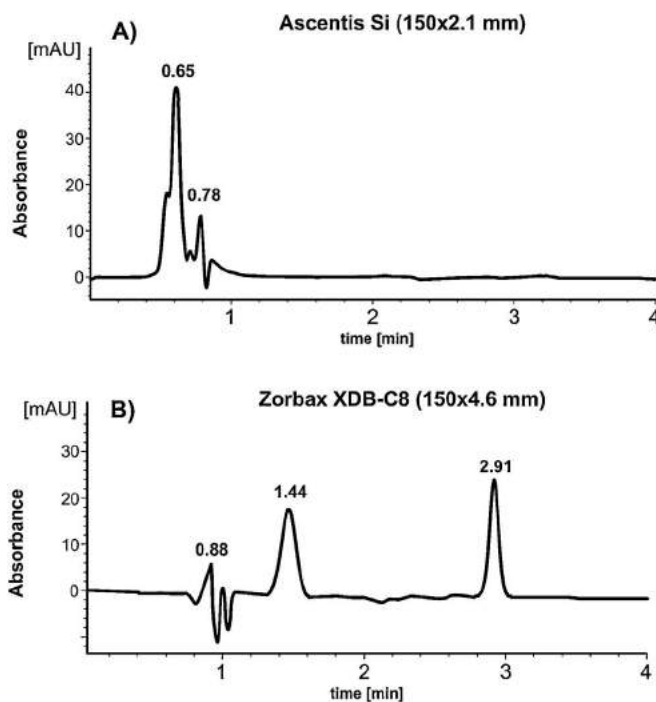


Fig. 2. Chromatograms of real sample recorded at 254 nm: (A) HILIC mode and (B) RPLC mode.

Table 3
Concentration of nicotine in zero-level liquids for electronic cigarettes.

Producer	Taste/flavour	Detected concentration of nicotine in zero-level liquids ($\mu\text{g/g}$) \pm SD ($n = 3$)		Absolute difference in concentration among methods ($\mu\text{g/g}$)
		HILIC mode method	RPLC mode method	
A	Menthol	–	–	–
	Cherry	160.22 \pm 1.81	166.35 \pm 1.17	6.13
	Marlboro	–	–	–
B	Strawberry	–	–	–
	Chocolate	–	–	–
	Orange	–	–	–
	Camel	–	–	–
	Watermelon	–	–	–
	Grape	–	–	–
C	Chocolate	312.32 \pm 1.51	320.95 \pm 2.02	8.63
	Coffee	125.93 \pm 0.92	127.76 \pm 1.14	1.83
	RedBull	41.30 \pm 0.33	39.07 \pm 0.35	2.23
	L&M	–	–	–
	Marlboro	–	–	–
	Camel	–	–	–
	Strawberry	–	–	–
	Cherry	205.42 \pm 1.03	207.33 \pm 1.24	1.91
	Apple	74.63 \pm 0.72	71.76 \pm 0.54	2.87
	D	Desert ship	9.74 \pm 0.16	10.05 \pm 0.15
Cherry		338.46 \pm 1.96	332.49 \pm 1.92	5.97
USA mix		30.97 \pm 0.40	29.32 \pm 0.52	1.64
Menthol		5.82 \pm 0.12	5.30 \pm 0.07	0.52
Fruit mix		–	–	–
–		–	–	–
E	Cuban tobacco	26.94 \pm 0.78	28.56 \pm 0.16	1.62
	Café latte	14.90 \pm 0.20	14.01 \pm 0.07	0.90
	English Black tea	–	–	–
	Energy drink	–	–	–
	Strong mint	–	–	–
F	Tiramisu	19.90 \pm 0.35	18.32 \pm 0.37	1.57
	Cherry	6.15 \pm 0.14	6.21 \pm 0.20	0.06
	Coffee	5.11 \pm 0.08	5.55 \pm 0.73	0.44
G	Watermelon	318.28 \pm 0.97	315.58 \pm 1.55	2.70
	Banana	151.33 \pm 1.66	148.89 \pm 1.16	2.44
	Vanilla	84.19 \pm 1.55	88.48 \pm 0.95	4.28
	Camel	23.26 \pm 0.33	22.03 \pm 0.22	1.23
	Marlboro	20.37 \pm 0.29	22.56 \pm 1.04	2.19
	RedBull	53.47 \pm 0.17	47.15 \pm 0.97	6.32
	Blackberry	22.82 \pm 0.13	23.36 \pm 0.95	0.54
	Cherry	280.75 \pm 2.59	283.53 \pm 1.58	2.78
	Menthol	72.75 \pm 0.55	69.06 \pm 0.36	3.69
	Fruit mix	34.40 \pm 0.19	31.18 \pm 0.31	3.22

resulting from both methods are equal, due to the similarity in SD and CV. The objective of the test was to accept or reject such hypothesis. The confidence level was 95% and $\alpha = 0.05$. Data gathered from trueness test and ANOVA test are presented in Table 2.

Calculated F values are greater than F_{critical} and p -values are smaller than α . The obtained results from the ANOVA test indicate a rejection of the hypothesis that the means are equal. The conclusion is that the effectiveness of the two presented methods is different for recovery of nicotine. Furthermore $F_{\text{calculated}} (2.32) < F_{\text{critical}} (4.17)$, hence there is no significant difference between the two methods at 0.05 confidence level. The analysis of variance for each spiking level demonstrated that RPLC method is more suitable than HILIC method for lower levels of concentration. However, the analysis of variance of HILIC method (more than six times smaller than for RPLC method) is a proof for adjustment of this method to higher concentration levels.

Repeatability test was done by the analysis of fortified sample at chosen initial concentration 150 $\mu\text{g/g}$ of nicotine. The sample was prepared according to the protocol described in Section 2.4. All analyses were done by HPLC–MS/MS with six repeats during

the next three days. No significant difference between recoveries, SDs and CVs values were observed. Results are presented in Table S2 (supplementary material)

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.078>.

The results are satisfactory and it was proved and concluded that it is possible to analyze liquids for electronic cigarettes in case of determination of trace amount of nicotine. The recovery values are at acceptable levels and after sample preparation HPLC–MS/MS analysis with both or one of the presented methods is possible.

3.1.3. Analysis of real samples

Forty one samples of the zero-level content nicotine liquids were analyzed with two presented methods in case of determination of trace amount of nicotine. All samples were prepared according to the presented protocol in Section 2.4. The presented results are in $\mu\text{g/mg}$ not in $\mu\text{g/mL}$. The reason why the results are shown in this way is due to the difference in the density of analyzed samples. Each producer has its own recipe for liquids and the content of propylene glycol, glycerol and ethanol differs amongst the

products. Moreover, some producers do not use glycerol or ethanol during preparation of liquids.

Results are presented in Table 3 and concentration below LOD and below the calibration curve range was omitted. Examples of chromatograms of real samples are presented in the Fig. 1. The distribution of nicotine among the samples of liquids under study for HILIC and RPLC methods is presented in the Fig. S2 (supplementary material).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.078>.

The results were calculated as follows: concentrations resulting from the equation of calibration curves (ng/mL) were multiplied by 10 (sample diluted in 10 mL) and divided by the weight of the sample. The final results are presented in $\mu\text{g}_{\text{nicotine}}/\text{g}_{\text{liquid}}$ which is equal to $\text{ng}_{\text{nicotine}}/\text{mg}_{\text{liquid}}$. Among the samples with detected nicotine more than 17 samples contain nicotine at a level below 100 $\mu\text{g/g}$. However 8 samples contain nicotine at a higher amount.

4. Conclusions

Current trends allow smokers to use tobacco substitutes containing nicotine in various forms including the latest fashion: electronic cigarettes. There is a lot of controversy about the use and safety of electronic cigarettes and some countries (Australia, Hong Kong, Brazil) prohibit their sale. Other countries such as Poland, Belgium, and Germany have not introduced so far legal restrictions on the e-cigarettes. This means that the nicotine content in liquids for filing e-cigarettes is not controlled. Particularly noteworthy are liquids that do not contain nicotine and are intended as help in quitting smoking.

Developed methods may be used independently or simultaneously to verify the concentration of nicotine in the liquids identified as zero-level. Presented methods are rapid, reproducible and do not require complex equipment. Moreover, with the HPLC it is possible to perform the analysis in a similar time to that of a UPLC. The LOD and LOQ values obtained for the two methods are at satisfactory level. Selected compounds as internal standards are easy available, cheap, stable and the probability that they are present in the liquids for e-cigarettes is very low. Furthermore, the sample preparation step is fast and simple. Additionally, presented methods may be used as a part of quality control for e-liquids, only the dilution of the samples should be compatible in such cases.

References

- [1] J. Cai, B. Liu, P. Lin, Q. Su, J. Chromatogr. A 1017 (2003) 187–193.
- [2] D.M. Atrens, J. Drug Issues 31 (2001) 325–394.
- [3] F. Marclay, M. Saugy, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7528–7538.
- [4] D.M. Shakleya, M.A. Huestis, J. Chromatogr. B 877 (2009) 3537–3542.
- [5] Y. Xue, E.F. Domino, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 32 (2008) 1131–1138.
- [6] J.-F. Etter, BMC Public Health 10 (2010) 1–7.
- [7] L. Dawkins, J. Turner, S. Hasna, K. Soar, Addict. Behav. 37 (2012) 970–973.
- [8] B.J. Westenberg, Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, 2009, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/Scienceresearch/UCM173250.pdf>
- [9] J.E. Jablonski, J.E. Schlessler, P. Mariappagoudar, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 7460–7465.
- [10] A. Aresta, F. Palmisano, C.G. Zambonin, Food Chem. 93 (2005) 177–181.
- [11] C. Oddeze, A.M. Pauli, J. Pastor, J. Chromatogr. B 708 (1998) 95–101.
- [12] Y.-L. Chang, P.-L. Tsai, Y.-C. Chou, J.-H. Tien, T.-H. Tsai, J. Chromatogr. A 1088 (2005) 152–157.
- [13] B. Sellergren, A. Zander, T. Renner, A. Swietlow, J. Chromatogr. A 829 (1998) 143–152.
- [14] M. Page-Sharp, T.W. Hale, L.P. Hackett, J.H. Kristensen, K.F. Ilett, J. Chromatogr. B 796 (2003) 173–180.
- [15] A.W. Abu-Qare, M.B. Abou-Donia, J. Chromatogr. B 757 (2001) 295–300.
- [16] F. Baumann, R. Regenthal, I.L. Burgos-Guerrero, U. Hegerl, R. Preiss, J. Chromatogr. B 878 (2010) 107–111.
- [17] M. Concheiro, T.R. Gray, D.M. Shakleya, M.A. Huestis, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 915–924.
- [18] H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, K. Saito, J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 49 (2009) 108–114.
- [19] J. Kuhn, T. Vollmer, C. Martin, D. Hendig, C. Knabbe, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7528–7538.
- [20] E.I. Miller, H.-R.K. Norris, D.E. Rollins, S.T. Tiffany, D.G. Wilkins, J. Chromatogr. B 878 (2010) 725–737.
- [21] S. Onoue, N. Yamamoto, Y. Seto, S. Yamada, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 26 (2011) 416–422.
- [22] K.B. Scheidweiler, D.M. Shakleya, M.A. Huestis, Clin. Chim. Acta 413 (2012) 978–984.
- [23] P.L. Vieira-Brock, E.I. Miller, S.M. Nielsen, A.E. Fleckenstein, D.G. Wilkins, J. Chromatogr. B 879 (2011) 3465–3474.
- [24] D.V. Zagorevski, J.A. Loughmiller-Newman, Rapid Commun. Mass Spectrom. 26 (2012) 403–411.
- [25] P. Jacob, L. Yu, M. Duan, L. Ramos, O. Yturralde, N.L. Benowitz, J. Chromatogr. B 879 (2011) 267–276.
- [26] M.-J.e. Binette, P. Lafontaine, M. Vanier, L.-K. Ng, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 1151–1155.
- [27] B.M.d. Fonseca, I.E.D. Moreno, A.R. Magalhães, M. Barroso, J.A. Queiroz, S. Ravara, J. Calheiros, E. Gallardo, J. Chromatogr. B 889–890 (2012) 116–122.
- [28] A.M. Hossain, S.M. Salehuddin, Arab. J. Chem. (2011), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.10.006>, in press.
- [29] X. Joya, M. Pujadas, M. Falcón, E. Civit, O. Garcia-Algar, O. Vall, S. Pichini, A. Luna, R.d.I. Torre, Forensic Sci. Int. 196 (2010) 34–42.
- [30] C.N. Man, S. Ismail, G.L. Harn, R. Lajis, R. Awang, J. Chromatogr. B 877 (2009) 339–342.
- [31] K. Shrivastava, D.K. Patel, Food Chem. 1222 (2010) 314–318.
- [32] M. Sleiman, R.L. Maddalena, L.A. Gundel, H. Destailats, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7899–7905.
- [33] P. Begley, S. Francis-McIntyre, W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, A. Halsall, A. Tseng, J. Knowles, R. Goodacre, D.B. Kell, Anal. Chem. 81 (2009) 7038–7046.
- [34] V. Lopez-Avila, J. Cooley, R. Urdahl, M. Thevis, Rapid Commun. Mass Spectrom. 26 (2012) 2714–2724.
- [35] J.M. Moore, D.M. Cooper, T.C. Kram, R.F.C. Klein, J. Chromatogr. 645 (1993) 273–281.
- [36] N. Ramírez, M.Z. Özel, A.C. Lewis, R.M. Marcé, F. Borrull, J.F. Hamilton, J. Chromatogr. A 1219 (2012) 180–187.
- [37] L. Malafatti, P.P. Maia, M.C.G. Martins, M.E.P.B.d. Siqueira, I. Martins, Braz. J. Pharm. Sci. 46 (2010) 769–776.
- [38] A.A. Dahab, N.W. Smith, J. Sep. Sci. 35 (2012) 66–72.
- [39] S. Kodama, A. Morikawa, K. Nakagomi, A. Yamamoto, A. Sato, K. Suzuki, T. Yamashita, T. Kemmei, A. Taga, Electrophoresis 30 (2009) 349–356.
- [40] C.-W. Chiu, H.-H. Liang, H.-Y. Huang, Electrophoresis 28 (2007) 4220–4226.
- [41] J. Sun, H. Du, T. You, Electrophoresis 32 (2011) 2148–2154.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Optimal parameters for the monitored ion transitions (MRM) and chosen operational parameters of ion source

Parameters for the monitored ion transitions					
Name	Transition ^a	Declustering Potential (V)	Entrance Potential (V)	Collision Cell Exit Potential (V)	Collision Energy (V)
Nicotine	<u>163.1→130.1</u>	56		8	29
	163.1→117.1			20	37
Acetaminophen	<u>152.1→110.1</u>	61	10	18	23
	152.1→93.1			16	31
Pyridoxine	<u>169.9→152.0</u>	91		12	19
	169.9→134.0			10	27
MS/MS operational parameters of the ion source					
	Curtain Gas (psi)	Temperature (°C)	Nebulizer Gas (psi)	Turbo Gas (psi)	
RPLC mode	15	600	50	60	
HILIC mode	50	550		50	

a – quantification ion transitions are underlined

Table S2. Recovery, standard deviations and coefficients of variations taken from HPLC-MS/MS analysis of one fortified sample at initial concentration 150 µg/g.

Analyte	Day	Mean recovery (µg/g) (%) (n=6)	SD	CV (%)
RPLC method (Zorbax XDB-C8 150 x 4.6 mm)				
Nicotine	1	150.39 (100.4)	2.92	1.94
	2	148.19 (98.8)	1.51	1.02
	3	151.21 (100.8)	1.84	1.22
HILIC method (Ascentis Si 150 x 2.1 mm)				
Nicotine	1	153.54 (102.4)	2.29	1.49
	2	154.66 (103.1)	1.85	1.20
	3	153.68 (102.5)	1.87	1.22

Analizie chromatograficznej poddawano próbki produktów płynów do e-papierosów dostępnych handlowo, które pochodziły od różnych producentów. Pomimo deklaracji na etykietach, że produkty te nie zawierają nikotyny, wykryto ją w ponad dwóch trzecich próbek. Opracowane metodyki analityczne z powodzeniem można zastosować do analiz chromatograficznych zawartości nikotyny w próbkach płynów oznaczonych jako te zawierające nikotynę. Jediną modyfikacją jest zmiana proponowanego rozcieńczenia na większe lub zmniejszenie objętości próbki wprowadzanej do układu chromatograficznego.

E-papierosy pozwalają użytkownikom na dostarczanie nikotyny do organizmu w równie skuteczny sposób, co zwykle papierosy. Zainteresowanie e-paleniem ciągle wzrasta a na rynku pojawiają się nowe i udoskonalone produkty umożliwiające użytkownikom wybór produktów dopasowanych do ich preferencji. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 3 kwietnia 2014 r. wprowadza regulacje dotyczące składu oraz zawartości nikotyny w produktach służących do e-palenia. Opracowane metodyki mogą znaleźć zastosowanie jako skuteczne narzędzie pozwalające na kontrolę zawartości nikotyny w produktach służących do e-palenia.

Oznaczenie nikotyny oraz cukrów w próbkach płynów do e-papierosów jest jedną z pierwszych prób scharakteryzowania składu tego rodzaju produktów oraz ewentualnych zanieczyszczeń produktów. Badania dotyczące oznaczenia pozostałości nikotyny w próbkach płynów do e-papierosów przyczyniają się do wzrostu świadomości społecznej, a opracowane procedury z powodzeniem można wykorzystać w kontroli jakości produktów związanych z e-paleniem. Prace badawcze nad e-papierosami są szczególnie istotne ze względu na fakt, że mogą przyczynić się do lepszego poznania wpływu e-palenia na zdrowie. Opracowane metody (oznaczenie cukrów oraz nikotyny) charakteryzują się bardzo krótkim czasem analizy chromatograficznej, wysoką czułością oraz dostarczają interesujących informacji co do składu produktów używanych do e-palenia. W przypadku alkaloidu, jakim jest nikotyna, możliwe jest jej rozdzielenie zarówno za pomocą techniki HILIC, jak i techniki RPLC.

4.4. Oznaczanie substancji intensywnie słodzących w próbkach napojów

Produkty o obniżonej zawartości energetycznej cieszą się dużą popularnością. Ten trend będzie zapewne kontynuowany ze względu na realizację zaleceń obniżania kaloryczności produktów przez producentów żywności [113]. Mając na uwadze liczbę substancji dodawanych do żywności, jak i mnogość produktów, w których stosuje się zamienniki cukru, niezbędnym staje się opracowanie procedur analitycznych, które mogą stanowić narzędzie do badania zawartości słodzików w próbkach żywności.

W celu ilościowego oznaczenia 14 słodzików pochodzenia syntetycznego i pół-syntetycznego (acesulfam-K, sacharynian sodu, aspartam, sukraloza, cyklamian sodu, alitam, neohesperydina DC i neotam) oraz diterpenoglikozydów pochodzenia roślinnego (rebaudiozyd A, rebaudiozyd C, stewiozyd, stewiolbiozyd, dulkozyd A i stewiol) w próbkach napojów opracowano dwie metodyki analityczne wykorzystujące technikę HILIC i RPLC. Substancje intensywnie słodzące charakteryzują się różną polarnością i różnymi właściwościami fizykochemicznymi, co utrudnia dobranie optymalnych parametrów pracy układu chromatograficznego. Na etapie detekcji zastosowano tandemową spektrometrię mas (MS/MS), co pozwoliło na uzyskanie niskich wartości granicy oznaczalności. Przygotowanie próbek obejmowało rozcieńczenie próbki w fazie ruchomej i odwirowanie. Podejście typu „rozcieńcz i analizuj” było możliwe ze względu na wysoką czułość detektora oraz małą objętość dozowanej próbki. Realizacja zamierzonego projektu pozwoliła na porównanie możliwości techniki HILIC oraz techniki RPLC w połączeniu z tandemową spektrometrią mas. Prace badawcze miały na celu opracowanie dwóch metodyk analitycznych, które charakteryzowałyby się krótkim czasem analizy chromatograficznej, dużą czułością oraz uproszczoną procedurą przygotowania próbki. Przeprowadzone badania po raz pierwszy pozwoliły na jednoczesne oznaczenie wszystkich (oprócz taumatyny) substancji o intensywnej mocy słodzącej dopuszczonych do użytku w Unii Europejskiej podczas jednego cyklu analitycznego.

Wyniki badań dotyczące oznaczania zawartości słodzików w próbkach napojów opublikowano w czasopiśmie *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [114], a temat badań ukazał się na okładce: *Determination of artificial sweeteners in beverages*. Z kolei wyniki badań porównania techniki HILIC i RPLC do rozdzielania mieszaniny substancji intensywnie słodzących opublikowano w czasopiśmie *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [115].

ANALYTICAL & BIOANALYTICAL CHEMISTRY

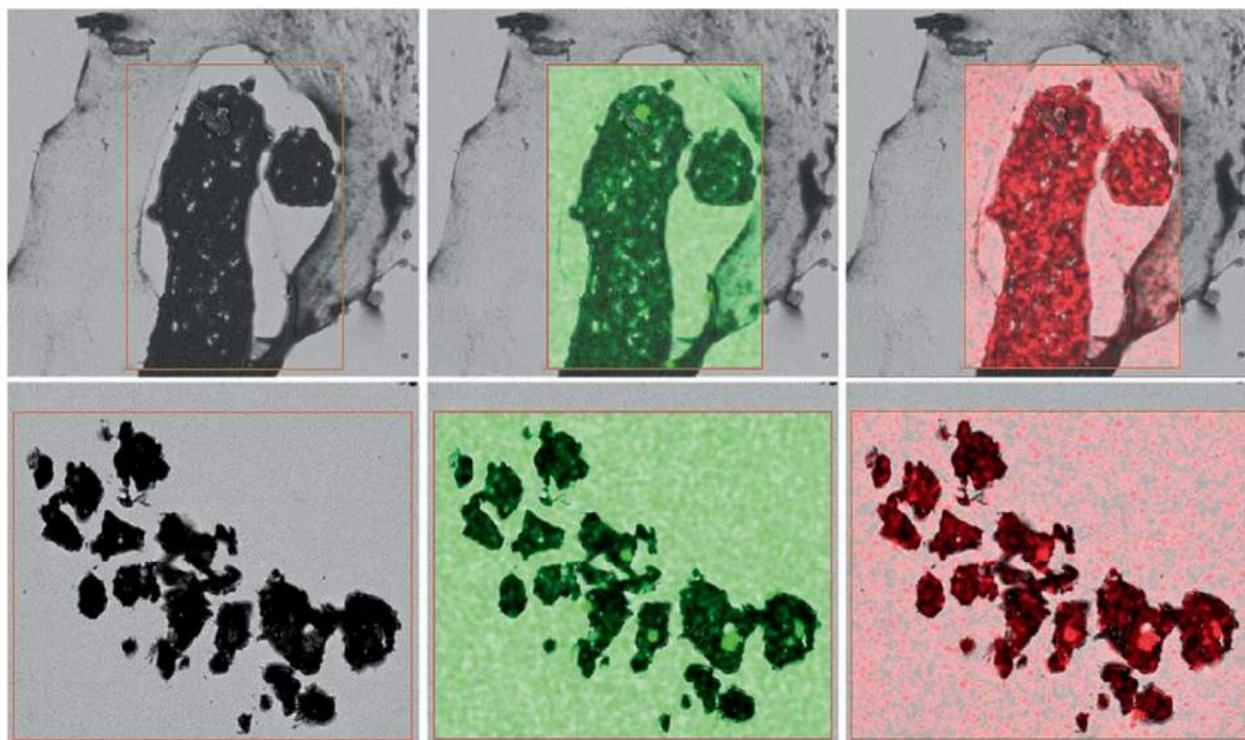


Probing biomarkers in saliva by SPri-MS

Minimizing fluorescence background in Raman optical activity

Determination of artificial sweeteners in beverages

Using MOOCs for teaching analytical chemistry



Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

Paweł Kubica · Jacek Namieśnik · Andrzej Wasik

Received: 7 October 2014 / Revised: 12 November 2014 / Accepted: 17 November 2014 / Published online: 4 December 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The method for the determination of acesulfame-K, saccharine, cyclamate, aspartame, sucralose, alitame, neohesperidin dihydrochalcone, neotame and five common steviol glycosides (rebaudioside A, rebaudioside C, steviol, steviolbioside and stevioside) in soft and alcoholic beverages was developed using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionisation (HPLC-ESI-MS/MS). To the best of our knowledge, this is the first work that presents an HPLC-ESI-MS/MS method which allows for the simultaneous determination of all EU-authorised high-potency sweeteners (thaumatin being the only exception) in one analytical run. The minimalistic sample preparation procedure consisted of only two operations; dilution and centrifugation. Linearity, limits of detection and quantitation, repeatability, and trueness of the method were evaluated. The obtained recoveries at three tested concentration levels varied from 97.0 to 105.7 %, with relative standard deviations lower than 4.1 %. The proposed method was successfully applied for the determination of sweeteners in 24 samples of different soft and alcoholic drinks.

Keywords Artificial sweeteners · Steviol glycosides · *Stevia rebaudiana* · Tandem mass spectrometry · Liquid chromatography

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-8355-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Kubica · J. Namieśnik · A. Wasik (✉)
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk
University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk,
Poland
e-mail: wasia@pg.gda.pl

Introduction

Sweetness is probably one of the most appreciated features of the food we eat. However, not all consumers want to (or can) consume sugars—the most obvious source of sweetness. The artificial sweeteners which are commonly used in the food industry seem to be an ideal, non-caloric replacement for sweet-tasting sugars.

These sweeteners and their mixtures play an important role in the modern food industry since they provide a means to fulfil the consumer's demand for sweet, tooth-friendly, reduced-calorie food. The newest members of the European Union (EU)-authorised sweeteners' family are steviol glycosides. The leaves of *Stevia* contain mostly stevioside and rebaudioside A. Other glycosides present include rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside, rubusoside and rebaudiosides D, E and F [1, 2]. Rebaudioside A is the most desired component of *Stevia* leaf extracts, due to its highest sweetening potency and the least pronounced bitter aftertaste. Steviol glycosides are the second completely natural EU-authorised sweeteners, thaumatin being the first.

While the demand for sweetness without calories is continuously growing, there are still controversies concerning the safety of high-potency sweeteners. Therefore, to ensure consumer safety and trust, the content of such sweeteners in food is strictly regulated by regional or national legislation [3–7]. Proper control over food manufacturing processes calls for appropriate analytical methods, capable of providing reliable results when analysing food samples, usually characterised by quite a complex matrix.

Among all the available methods for the determination of artificial sweeteners in foodstuffs, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with a variety of detectors is probably the most popular choice [8]. Nowadays, RP-HPLC coupled with tandem mass

spectrometry is becoming more and more popular due to its high selectivity and multianalyte capability [9–14], which is an important feature since different sweeteners are frequently used in mixtures to achieve the desired taste, flavour or texture of an end product. Methods capable of separating and quantifying multiple high-potency sweeteners in foods are known [8, 10, 15–29], but, to the best of our knowledge, their ability to determine *Stevia*-based sweeteners in mixtures with other non-caloric sweeteners was not yet demonstrated in practice.

The purpose of this project was to develop a quick, simple and robust method for the determination of almost all EU-authorized high-potency sweeteners, including steviol glycosides. The only exception is thaumatin which is a protein and cannot be quantified with this method due to the incompatibility with the separation conditions used. According to the proposed method, analytes are separated by RP-HPLC, and later on detected and quantified using tandem mass spectrometry. The sample preparation procedure is limited to the dilution and centrifugation (or filtration) of the samples. The method allows the quantification of 14 compounds in one 16-min-long analytical run. Low values of limits of quantitation (LOQ), high recoveries, and satisfactory repeatability make it suitable for application in food control laboratories, as demonstrated by the analysis of 24 samples of different soft and alcoholic beverages.

Materials and methods

Chemicals

Standards of artificial sweeteners and steviol glycosides were obtained from different sources: acesulfame-K from Nutrinova (Frankfurt am Main, Germany); saccharine, sucralose and neohesperidin DC from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); aspartame from Ajinomoto Foods Europe (Nesle, France); cyclamate from Merck KGaA (Darmstadt, Germany); alitame from Frapp's Pharma (Hong Kong, China); neotame from CHEMOS (Regenstauf, Germany); and rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside and steviol from LGC Standards (Łomianki, Poland). As the internal standard (IS), sodium *N*-(2-methylcyclohexyl)sulfamate was used [27]. Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and acetone were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Acetic acid (AA) was obtained from POCH (Gliwice, Poland). Ultrapure water was prepared using the HLP5 system from Hydrolab (Wiślnia, Poland).

Samples

Twenty-one samples of popular soft and alcoholic drinks and three samples of instant drink powders from different

producers were purchased in local shops. Most products were labelled as containing steviol glycosides, although other drinks were also included for method-testing purposes.

Preparation of standards and calibration solutions

The stock solutions of acesulfame-K, saccharine, neohesperidin DC, aspartame, sucralose, cyclamate, alitame, neotame, rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside and steviol were prepared by dissolving the appropriate amount of pure standard in the mixture of ACN and H₂O (60+40). The final concentration of each standard was around 50 µg/mL. The calibration solutions were prepared by mixing and diluting the stock solutions with the mobile-phase component A to obtain 5, 20, 50, 100, 200, 400 and 800 ng/mL of acesulfame-K, saccharin, neohesperidin DC, aspartame, sucralose, cyclamate, alitame and neotame, while concentrations of rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside and steviol were 5, 20, 100, 300, 600, 1000 and 1600 ng/mL, respectively. The IS concentration was kept at 50 ng/mL in each calibration solution. All solutions were stored in a refrigerator at 4 °C; new solutions were prepared monthly.

Sample preparation and fortification procedures

Before sample preparation, all samples of soft and alcoholic drinks were degassed by sonication for 15 min. Instant drinks were prepared according to the manufacturer's directions. Samples were diluted with mobile-phase component A in order to fall within calibration curve concentration range. In practice, a hundred times of dilution was appropriate, i.e. 100 µL of each sample and 50 µL of IS solution were placed in a 10-mL volumetric flask and filled up to the mark. Approximately 1.5 mL of this solution was placed in an Eppendorf tube and centrifuged for 5 min at 7000 rpm. Supernatant was collected, placed in the autosampler vial and analysed.

Fortified samples (three concentration levels) were prepared using the Sprite™ drink (old recipe, free from steviol glycosides and other high-potency sweeteners) as a matrix. Sweeteners were dissolved in Sprite™ to get a concentration of 500 µg/mL each. This mixture was later on diluted with Sprite™ to obtain the concentration levels of 10, 25 and 60 µg/mL. Fortified samples were used for repeatability and apparent recovery estimation.

MS/MS conditions

All analyses were done using a Shimadzu LCMS-8050 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan)

equipped with an ESI source working in the polarity-switching MRM mode. Positive detection mode for aspartame, alitame and neotame was selected to increase the sensitivity. Data acquisition and analysis were accomplished with LabSolutions 5.60 SP1 software. The specific MRM transitions were chosen in the flow injection mode. The optimum detection conditions are presented in Table S1 in the Electronic Supplementary Material (ESM).

HPLC conditions

The chromatographic separation was carried out using an HPLC system (Shimadzu, Japan) consisting of a degasser DGU-20A5R, controller CBM-20A, binary pump Nexera X2 LC-30 AD, autosampler Nexera X2 SIL-30AC and column oven CTO-20AC. The analytes were separated on an Ascentis Express C18 column (Supelco, Bellefonte, PA, 100 mm×4.6 mm, 2.7 μm). The temperature of the column oven was set to 40 °C, the flow rate was kept at 0.8 mL/min and the injection volume was set to 2 μL. The mobile phase used for the separation was H₂O+MeOH+acetone (75+20+5) with 0.1 %v/v of AA (component A) and ACN+acetone (95+5) with 0.1 %v/v of AA (component B). The chromatographic separation was performed in gradient elution mode: 0 min (0 % B), 10 min (30 % B), 15 min (70 % B) and 16 min (70 % B). The total time of the chromatographic run was 16 min, while the column equilibration time was set to 8 min. The chromatogram presenting the separation of analytes is shown in Fig. 1.

Results and discussion

Separation and detection of analytes

In case of sucralose, acetic acid adduct was chosen (454.85 *m/z*) as the parent ion and 395.05 as the fragment ion. The choice was dictated by the fact that the intensity of this transition (454.85→395.05) was higher than the transition of the pseudomolecular ion of sucralose (395.05) to its fragments: 359.15 or 87.05. The fragmentation of steviol molecule was not observed neither in negative nor in positive mode. The higher intensity of the pseudomolecular ion was higher in the negative mode. The absence of fragment ions forced the choice of pseudotransition of steviol 317.40→317.40. The best response for aspartame, alitame and neotame was observed in the positive mode of detection.

The addition of a small amount of acetone to both components of the mobile phase resulted in narrower

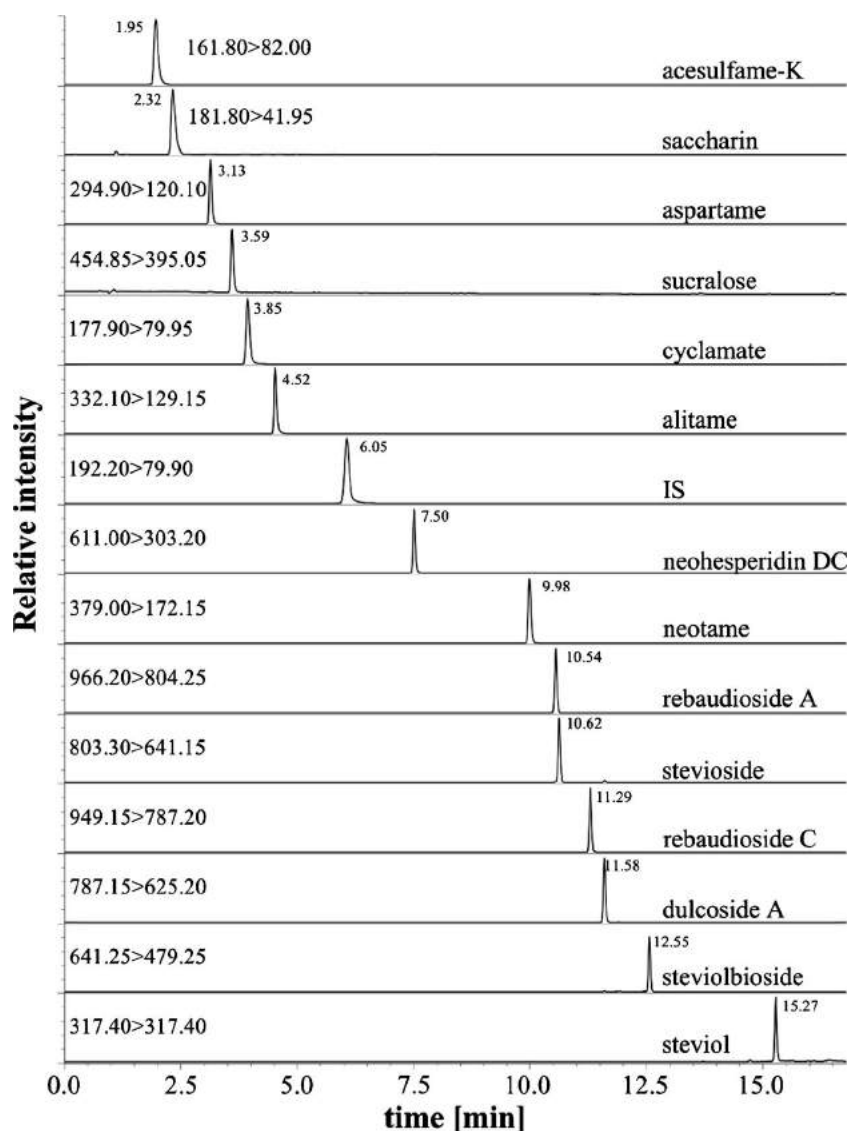
peaks for acesulfame-K, saccharin, aspartame, sucralose, cyclamate, alitame, neohesperidin DC and neotame. The change of peak shapes for rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside, steviolbioside and steviol was not observed regardless of acetone addition. Use of two organic components in mobile phase (ACN and MeOH) resulted in better separation of analytes in comparison to the separation achieved with only one organic component. Methanol-only mobile phase had not enough eluting strength to achieve separation in less than 25 min; an incomplete separation of rebaudioside A and stevioside was observed as well. On the other hand, acetonitrile-only mobile phase had higher elution power, but an incomplete separation of acesulfame-K and saccharin, sucralose and cyclamate, and rebaudioside A and stevioside was noticed. The combination of methanol in mobile-phase component A and acetonitrile in mobile-phase component B resulted in a complete separation of these compounds, relatively short analysis time and better separation of rebaudioside A and stevioside. A complete separation was achieved for most of the compounds, except rebaudioside A and stevioside ($R_s=1.2$). This was caused by fact that these two compounds differ only by one extra glucose molecule in the structure of RA. However, complete separation is not necessary in that case, since two specific transitions for RA and SV, respectively, can be measured independently.

Within-laboratory validation

Calibration

Seven-point calibration curves were constructed by plotting the ratio of the analyte's peak area to the peak area of the IS versus the analyte's concentration ($n=3$). Different concentration ranges were used for two different classes of sweeteners: 5–800 ng/mL for the artificial ones and 5–1600 ng/mL for steviol glycosides. Calibration curves were linear in the studied concentration range with correlation coefficients of over 0.9987. The weighing factor of $1/x$ was applied to all calibration curves in order to increase the accuracy in the lower concentration range. The values of limit of detection (LOD) were calculated using the following formula: $LOD=3.3 \cdot S_b/a$, where S_b is the standard deviation of the intercept and a is the slope of the calibration curve. The values of limit of quantitation (LOQ) were calculated as three times LOD. Quantification limits were between 3.23 and 13.56 ng/mL, which correspond to the range of 0.323 and 1.36 mg/L in the original sample, assuming a hundred times of dilution of the sample. These values are well below the regulatory limits for all

Fig. 1 Example of a chromatogram of standard mixture (200 ng/mL each)—see conditions in the text



compounds under the study. The values of calibration parameters are presented in Table 1.

Trueness and repeatability

The trueness of the results was assessed in terms of apparent recoveries using spiked Sprite™ drink as a matrix. Samples spiked at three concentration levels (10, 25 and 60 µg/mL) were analysed on the same day (six replicates of each concentration level). Recoveries varied between 97.0 and 105.7 %, while the relative standard deviations (%RSD) of the results were in the range of 0.4–4.1 %. The recovery data and %RSD values indicate good method accuracy and precision. No matrix effects were observed, thanks to the use of an internal standard, significant dilution of the samples and complete separation of analytes.

Repeatability, expressed as between-day precision during the next three consecutive days, was estimated by analysing a set of samples ($n=6$) spiked at one concentration level (600 ng/mL after sample preparation step). The %RSD of the results were in the range of 1.1–4.5 %, very close to the within-day precision. This demonstrates that the method provides consistent, day-by-day results. Detailed data concerning trueness and repeatability are presented in ESM Table S2.

Analysis of real samples

Samples were bought in local shops, and attention was paid to ensure their diversity. Three types of drinks were analysed: non-carbonated and carbonated soft drinks, and carbonated alcoholic beverages (beers). Most of the samples (18) were labelled as containing steviol glycosides, though beverages sweetened with other

Table 1 Quantification and validation data for artificial sweeteners and steviol glycosides

Analyte	Calibration curve equation (7 points, $n=3$)	S_a	S_b	r	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
Acesulfame-K	$y=0.04286x+0.099$	0.00079	0.059	0.9987	4.52	13.56
Saccharin	$y=0.004583x+0.0025$	0.000025	0.0018	0.9997	1.32	3.95
Aspartame	$y=0.04189x-0.070$	0.00028	0.021	0.9996	1.63	4.90
Sucralose	$y=0.010964x-0.0158$	0.000062	0.0046	0.9997	1.38	4.14
Cyclamate	$y=0.02994x-0.0454$	0.00013	0.0098	0.9998	1.08	3.23
Alitame	$y=0.02816x-0.024$	0.00021	0.015	0.9994	1.78	5.35
Neohesperidin DC	$y=0.04840x-0.124$	0.00045	0.033	0.9991	2.28	6.84
Neotame	$y=0.004872x-0.0012$	0.000020	0.0029	0.9998	1.98	5.95
Rebaudioside A	$y=0.004625x-0.0005$	0.000019	0.0029	0.9998	2.04	6.11
Stevioside	$y=0.016005x-0.011$	0.000071	0.010	0.9998	2.16	6.48
Rebaudioside C	$y=0.007403x-0.0168$	0.000035	0.0052	0.9997	2.33	7.00
Dulcoside A	$y=0.002522x+0.0022$	0.000014	0.0021	0.9997	2.69	8.08
Steviolbioside	$y=0.05032x+0.131$	0.00028	0.042	0.9997	2.74	8.23
Steviol	$y=0.011370x-0.0362$	0.000095	0.0070	0.9993	2.04	6.12

S_a standard deviation of the slope, S_b standard deviation of the intercept, r correlation coefficient, LOD limit of detection, LOQ limit of quantitation, n number of measurements

compounds were also taken into account. According to the regulations [5, 6], the content of steviol glycosides should be expressed as the sum of steviol equivalents. The equivalents of steviol are calculated for each glycoside separately using the following multiplication factors: steviol (1.000), stevioside (0.395), rebaudioside A (0.329), rebaudioside C (0.334), dulcoside A (0.400) and steviolbioside (0.496). For the majority of tested samples, the sum of steviol equivalents was within the acceptable limit (60 mg/L)—see Table 2 for details. In two cases (NCNA4 and NCNA8), the legal limit was exceeded.

Stevia-based sweeteners used in the food industry differ in terms of their composition. Four out of 18 samples were sweetened with highly purified rebaudioside A, and 6 contained rebaudioside A and stevioside. Also, in six cases, three steviol glycosides (rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C) were found, and two samples contained four glycosides (rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C and steviolbioside). The major compound found in the samples containing a mixture of steviol glycosides was rebaudioside A, the rest being stevioside and, in some cases, minor amounts of rebaudioside C and steviolbioside.

Beverages sweetened with steviol glycosides were found free from other high-potency sweeteners. However, in three cases (CNA1, CNA4 and NCNA4), small amounts of neohesperidin DC were detected. The labels of these beverages did not mention any sweetener other than steviol glycosides, but since neohesperidin DC at

low concentrations (up to 3 mg/kg) may be used as a flavour enhancer [7], the composition of these samples is in accordance with the law.

Two out of the five analysed beer samples (CA4 and CA5) were sweetened with artificial high-potency sweeteners. Mixtures of two and four compounds were detected in these cases.

Detailed results of the analysis of all samples are presented in Table 2, and examples of real chromatograms are presented in Fig. 2.

Conclusions

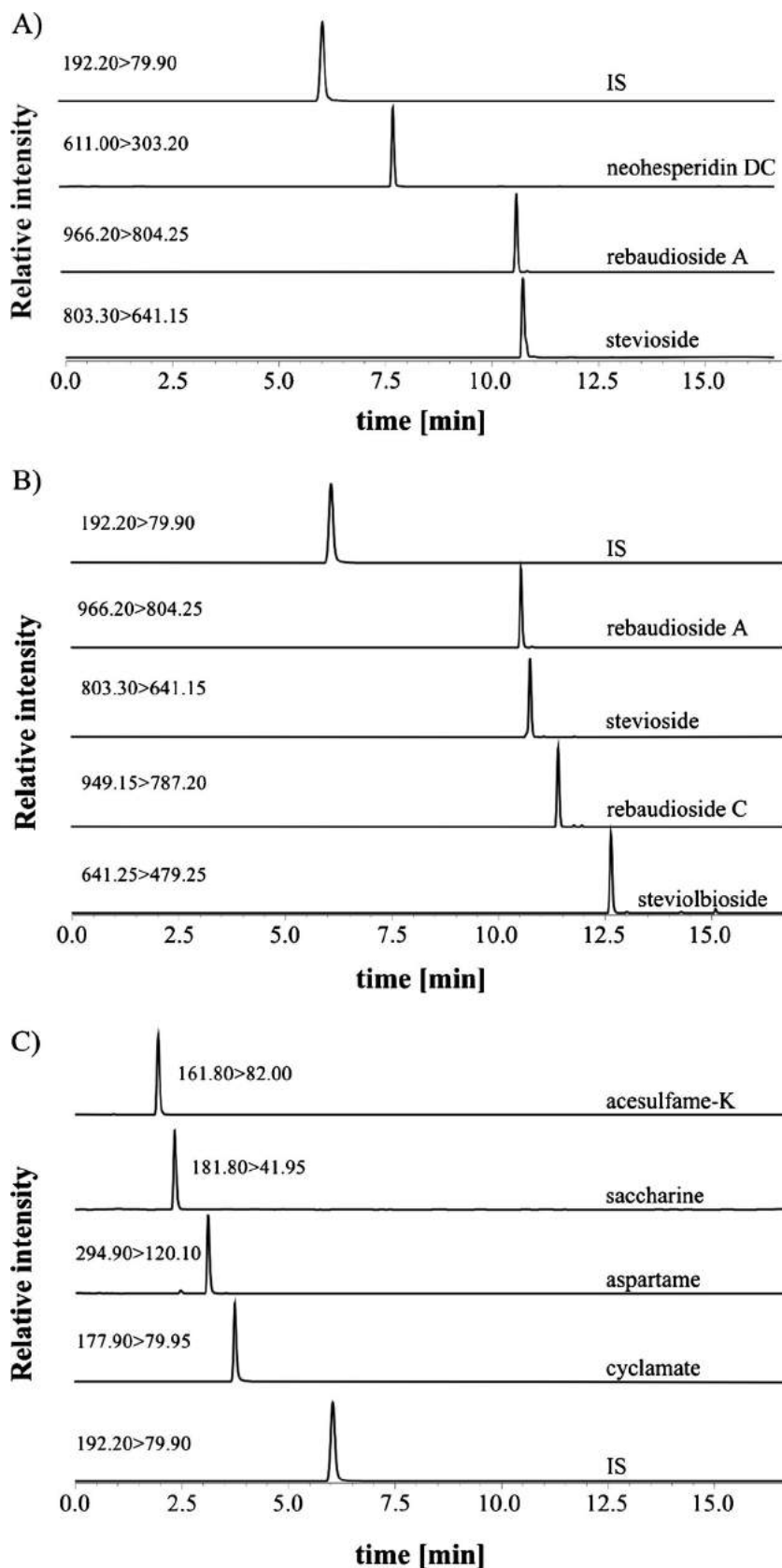
The presented method allows for the quick determination of all but one EU-authorized high-potency sweeteners in one analytical run. The sample preparation step was simplified to an absolute minimum. It consisted of only two operations: the dilution and centrifugation (or filtration) of the samples. Thanks to the complete separation of analytes and considerable dilution of the analysed samples, no matrix effects were observed. Since the method allows the separation and quantifying of common steviol glycosides, being the components of commercially available *Stevia*-based sweeteners, it can be used to determine their purity/quality. Low limits of quantification, high recoveries and good repeatability of results make it suitable for food quality and safety control. The method was successfully applied for the analysis of sweeteners in alcoholic

Table 2 Concentrations of artificial sweeteners and steviol glycosides in soft and alcoholic drinks: analysis of real samples. Only detected compounds are shown

Sample type	Name of sample	Acesulfame-K 350	Saccharin 80	Aspartame 600	Cyclamate 250	Neohesperidin DC 30	Rebaudioside A ^a 60 ^b	Stevioside ^a	Rebaudioside C ^a	Steviolbioside ^a
MUD ^c in soft drinks [mg/L]										
Detected sweetener content [mg/L]±SD (n=3)										
Carbonated non-alcoholic	CNA1					0.999±0.052	34.30±0.28	0.616±0.019		
	CNA2	None detected, in accordance with product label								
	CNA3	None detected, in accordance with product label								
	CNA4					1.071±0.071				
	CNA5						17.02±0.36	10.62±0.22	2.542±0.080	
Non-carbonated non-alcoholic	NCNA1						12.64±0.24			
	NCNA2						17.08±0.22	0.310±0.012		
	NCNA3						10.672±0.059	7.70±0.24	1.714±0.019	
	NCNA4					3.02±0.16	53.69±0.99	12.25±0.43	2.498±0.047	
	NCNA5						9.42±0.24	6.01±0.15	1.479±0.018	
	NCNA6						16.48±0.36	6.85±0.25	0.8595±0.0064	0.434±0.018
	NCNA7						11.12±0.43			
	NCNA8						47.94±0.26	28.5±1.1	1.667±0.025	0.784±0.069
	NCNA9						21.91±0.2	13.96±0.21	0.6981±0.0077	
	NCNA10						35.4±1.3	0.691±0.037		
	NCNA11						51.65±0.13	0.7726±0.0071		
MUD in alcoholic drinks [mg/L]										
Carbonated alcoholic	CA1						18.29±0.59	0.475±0.015		
	CA2						16.20±0.13	0.419±0.028		
	CA3	None detected, in accordance with product label								
	CA4	9.25±0.43	5.95±0.34	9.88±0.17	35.0±1.1					
	CA5	23.39±0.19		65.56±0.60						
Detected sweetener content [mg/g]±SD (n=3)										
Instant drink powders	IDP1						2.131±0.049			
	IDP2						2.19±0.033			
	IDP3						2.802±0.049	1.159±0.055	0.408±0.037	

^a Expressed as steviol equivalent^b The MUD expressed as the sum of steviol equivalents according to commission regulation (EU) no. 1131/2011 of 11 November 2011^c Maximum usable dose as set by the Directive 94/35/EC of European Parliament and of the Council of 30 June 1994 and commission regulation (EU) no. 1131/2011 of 11 November 2011

Fig. 2 Examples of chromatograms obtained for real samples. *From the top:* **A** sample of CNA1, **B** sample of NCNA6 and **C** sample of CA4



and non-alcoholic beverages. To the best of our knowledge, this is the first method which allows for the comprehensive analysis of beverages with regard to high-potency sweetener content, including the recently introduced steviol glycosides.

Acknowledgments The authors would like to thank Andrzej Reszka and Marcin Gawryś (Shim-Pol, Poland) for providing the LCMS-8050 instrument. This work has been financially supported by a Polish National Science Centre grant (research project no. 2012/07/N/ST4/01834). Paweł Kubica acknowledges the grant awarded by PSEZ (Pomeranian Special Economic Zone Ltd.). The authors would like to thank Barbara Sobieszek for her great support.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Stevia - a non-caloric sweetener of natural origin (2012) Institute of Food Science and Technology, London. <http://www.ifst.org/print/130>. Accessed 2 October 2014
2. Jackson AU, Tata A, Wu C, Perry RH, Haas G, West L, Cooks RG (2009) *Analyst* 134:867
3. European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on sweeteners for use in foodstuffs L237/13 (1994) OJ 237:3
4. Commission Directive 2009/163/EU of 22 December amending Directive 94/35/EC of the European Parliament and of the Council on sweeteners for use in foodstuffs with regard to neotame (2009) L344:37
5. Regulation of the Polish Minister of Health of 22 November 2010 on the permitted additives (2010) 177:1094
6. Commission Regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides (2011) L295:205
7. Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC (2012) L267:1
8. Wasik A, Namieśnik J (2009) *TrAC Trends Anal Chem* 28:1082
9. Berset J-D, Ochsenbein N (2012) *Chemosphere* 88:563
10. Chen X-H, Zhao Y-G, Shen H-Y, Jin M-C (2012) *J Chromatogr A* 1263:34
11. Gan Z, Sun H, Wang R, Feng B (2013) *J Chromatogr A* 1274:87
12. Loos R, Gawlik BM, Boettcher K, Locoro G, Contini S, Bidoglio G (2009) *J Chromatogr A* 1216:1126
13. Ordóñez EY, Quintana JB, Rodil R, Cela R (2012) *J Chromatogr A* 1256:197
14. Scheurer M, Brauch H-J, Lange FT (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:1585
15. Bergamo AB, Silva JAF, Jesus DP (2011) *Food Chem* 2011:1714
16. Croitoru MD, Fülöp I, Ajtay MK, Balogh C, Dogaru MT (2011) *Acta Aliment Hung* 40:459
17. Ferrer I, Thurman EM (2010) *J Chromatogr A* 1217:4127
18. Huang Z, Mab J, Chen B, Zhang Y, Yao S (2006) *Anal Chim Acta* 555:233
19. Llamas NE, Nezio MSD, Palomeque ME, Band BSF (2008) *Food Anal Method* 1:43
20. Lorenzo RA, Pena MT, Fernández P, González PP, Carro AM (2015) *Food Control* 47:43
21. Nazareth V, Fernandes O, Fernandes LB, Vasconcellos JP, Jager AV, Tonin FG, Oliveira MAL (2013) *Anal Methods* 5:1524
22. Qing-Chuan, Wang J (2001) *J Chromatogr A* 937:57
23. Stojkovic M, Mai TD, Hauser PC (2013) *Anal Chim Acta* 787:254
24. Wasik A, McCourt J, Buchgraber M (2007) *J Chromatogr A* 1157:187
25. Yang D-J, Chen B (2009) *J Agr Food Chem* 57:3022
26. Zhu Y, Guo Y, Ye M, James FS (2005) *J Chromatogr A* 1085:143
27. Zyglar A, Wasik A, Kot-Wasik A, Namieśnik J (2011) *Anal Bioanal Chem* 400:2159
28. Zyglar A, Wasik A, Kot-Wasik A, Namieśnik J (2012) *Food Addit Contam A* 29:1391
29. Zyglar A, Wasik A, Namieśnik J (2010) *Talanta* 82:1742

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Monitored ion transitions and optimal MS/MS operational parameters.

Name	Polarity	Transition	Q1 Pre bias (V)	Collision Energy (V)	Q3 Pre bias (V)
acesulfame-K	-	161.80→82.00	18	16	30
saccharin	-	181.80→41.95	19	26	14
aspartame	+	294.90→120.10	-30	-25	-24
sucralose	-	454.85→395.05*	22	12	26
cyclamate	-	177.90→79.95	19	27	29
alitame	+	332.10→129.15	-16	-18	-27
IS	-	192.20→79.90	14	29	29
neohesperidin DC	-	611.00→303.20	30	37	30
neotame	+	379.00→172.15	-27	-22	-19
rebaudioside A	-	966.20→804.25	38	28	38
stevioside	-	803.30→641.15	30	28	30
rebaudioside C	-	949.15→787.20	38	33	38
dulcoside A	-	787.15→625.20	32	22	30
steviolbioside	-	641.25→479.25	24	42	22
steviol	-	317.40→317.40**	24	15	30
*adduct with acetic acid					
**compound does not fragment					
MS/MS operational parameters					
Nebulizing Gas Flow (L/min)	Heating Gas Flow (L/min)	Interface Temperature (°C)	DL Temperature (°C)	Heat Block Temperature (°C)	Drying Gas Flow (L/min)
3	10	350	250	500	10

DL - Desolvation Line

Table S2. Within- and between-day recoveries (%) and relative standard deviations (RSDs) (%) obtained after HPLC-MS/MS analysis of fortified samples

Analyte	Within-day recoveries (RSD, n=6) (%) at different spiking levels			Between-day recoveries (RSD, n=6) (%) at one spiking level (600 ng/mL)		
	100 ng/mL	250 ng/mL	600 ng/mL	Day 1	Day 2	Day 3
	acesulfame-K	100.4 (2.5)	103.5 (2.3)	102.2 (0.6)	103.9 (1.5)	103.5 (1.9)
saccharin	100.2 (1.9)	97.0 (1.9)	99.0 (1.8)	103.0 (2.9)	103.9 (3.5)	105.2 (2.4)
aspartame	103.3 (2.7)	100.3 (1.1)	102.0 (0.4)	98.4 (1.8)	102.2 (1.2)	101.8 (2.1)
sucralose	104.4 (2.1)	103.0 (1.9)	100.5 (0.4)	103.6 (1.9)	99.6 (2.5)	98.5 (2.6)
cyclamate	101.4 (1.7)	98.1 (2.0)	98.9 (1.1)	97.6 (1.3)	98.9 (1.2)	100.0 (1.5)
alitame	103.8 (2.4)	101.3 (1.4)	101.7 (2.9)	97.8 (2.5)	98.7 (2.1)	97.9 (1.5)
neohesperidin DC	101.9 (3.3)	100.3 (2.3)	98.4 (1.3)	98.8 (1.1)	100.0 (2.3)	101.6 (2.9)
neotame	102.4 (1.8)	99.5 (1.6)	102.1 (1.9)	97.6 (1.2)	97.0 (1.5)	98.1 (1.5)
rebaudioside A	98.4 (2.1)	101.4 (2.9)	103.1 (1.4)	103.3 (2.3)	103.0 (1.8)	101.6 (2.3)
stevioside	102.9 (1.3)	102.4 (3.1)	101.5 (1.7)	102.1 (2.5)	98.3 (1.3)	99.4 (2.7)
rebaudioside C	103.1 (3.4)	102.0 (3.1)	101.9 (2.2)	103.6 (3.0)	102.4 (1.3)	102.1 (2.1)
dulcoside A	105.7 (3.6)	102.6 (2.4)	102.9 (1.4)	105.5 (4.5)	103.2 (1.4)	104.0 (1.8)
steviolbioside	98.0 (4.1)	100.3 (1.8)	102.7 (3.4)	101.9 (2.5)	98.9 (3.6)	98.2 (4.1)
steviol	103.6 (2.8)	100.7 (1.7)	102.1 (2.5)	104.6 (2.9)	98.6 (1.3)	100.8 (2.9)

Artykuł przyjęty do druku w czasopiśmie:
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages

Paweł Kubica, Jacek Namieśnik, Andrzej Wasik*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2015
Received in revised form
31 December 2015
Accepted 2 January 2016
Available online xxx

Keywords:

HILIC–MS/MS
Artificial sweeteners
Steviol glycosides
HILIC method development

ABSTRACT

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) was used to separate artificial and natural sweeteners approved for use in European Union (EU). Among three tested HILIC columns (BlueOrchid PAL-HILIC, Ascentis Express Si and Acclaim™ Trinity™ P2) the last one was selected for the development of HILIC method due to the best results obtained with it. Early eluting and coeluting compounds in HILIC (acesulfame-K, saccharin, cyclamate, sucralose and aspartame) were successfully separated by the HILIC-based approach for the first time. The developed HILIC method allows for determination of all high potency sweeteners in one analytical run. The calibration curves for all analytes had good linearity within the tested ranges. The limits of detection and quantitation were in the range 0.81–3.30 ng/mL and 2.32–9.89 ng/mL, respectively. The obtained recoveries used for trueness and precision estimation were from 98.6% to 106.2% with standard deviation less than 4.1%. Sample preparation was reduced to a necessary minimum and contained only proper dilution and centrifugation. More than twenty samples of beverages were analyzed with the developed HILIC method. Finally, the chromatographic parameters of peaks (reduced retention time, width at baseline, width at 50% of peak height, tailing factor and efficiency) obtained in HILIC mode and in RPLC mode were compared. Developed HILIC method along with RPLC method can be applied for rapid evaluation of sweeteners' content, quality and safety control.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The sugar substitutes known as artificial and natural sweeteners or substances with high sweetening power are commonly used by food producers. The possibility of the use of these food additives in food products has many benefits, including extended shelf-life, elevated quality and sweet taste. Among the available artificial sweetening substances the most popular are acesulfame-K, saccharin, cyclamates, aspartame, sucralose, alitame, neohesperidin dihydrochalcone (DC) and neotame [1,2]. New class of sweeteners known as steviol glycosides was added to this group in 2014 by the European Union (EU). These complex molecules are built of steviol and different simple sugars [3,4]. The most desired steviol glycosides, and with the highest sweetening power, are stevio-

side and rebaudioside A. Other minor glycosides are dulcoside A, steviolbioside, rubusoside and rebaudioside C, D, E, and F.

The use of high potency sweeteners is governed by the Regulation of the European Parliament and Council Regulation No. 1333/2008 [5], as amended by regulation No. 1129/2011 establishing a list of food additives [6]. For steviol glycosides another regulation was established [7]. Since April 2013, neohesperidin DC and one of the steviol glycosides (rebaudioside A) have been approved for use as flavoring substances by regulation No. 872/2012 [8].

All of the above mentioned sweeteners were successfully separated by reversed phase liquid chromatography (RPLC) [9]. Many other methods based on RPLC coupled with mass spectrometry or UV–vis detection are known and well described [1,10–21]. Due to the rapid development of the HILIC technique it was decided to check whether it can provide results similar to those obtained with RPLC-based methods. Theoretically, the HILIC mode allows for achieving better sensitivity when using a mass spectrometer (MS) as a detector. Furthermore, there is no method based on the HILIC technique that allows the separation of all EU-authorized high

* Corresponding author. Fax: +48 58 347 26 94.

E-mail addresses: pawel.kubica.pg@gmail.com (P. Kubica), jacek.namiesnik@pg.gda.pl (J. Namieśnik), wasia@pg.gda.pl (A. Wasik).

potency sweeteners. In most cases only a few representatives of sweeteners highly soluble in water are chosen for the HILIC-type separation methods [22–24]. In some cases HILIC mode separations were eliminated in preliminary studies [10,25] as providing insufficient resolution and undesirable peak shapes. Other methods suffer from the coelution of acesulfame-K with saccharin and cyclamate with sucralose, as well as poor peak shape for aspartame [26]. The coelution of sucralose and neohesperidin DC was also observed [27]. In fact, in HILIC-type methods acesulfame-K, cyclamate and saccharin tend to elute close to the void time, despite the high organics content in the mobile phase. Nevertheless, the separation of water-soluble steviol glycosides can be achieved in the HILIC mode, and symmetrical peaks are observed [23,28–30].

The main objective of this research was to develop a method for the determination of natural and artificial sweeteners with the use of the HILIC technique coupled with tandem mass spectrometry detection (MS/MS). The other objectives included separation of early eluting compounds in the HILIC mode (acesulfame-K, cyclamate) and obtaining symmetrical peak shapes, comparable to those attained by RPLC methods. Finally, the chromatographic parameters (reduced retention time, width at baseline, width at 50% of peak height, tailing factor at 10% of height, efficiency and plate height) of peaks obtained in HILIC separation mode were compared to those obtained with the use of the previously described RPLC method [9]. The developed HILIC method allows the quantification of fourteen compounds during one analytical run with low limits of quantification (LOQ) values, recoveries close to 100% and good repeatability. The performance of the method was checked during the analysis of more than twenty samples of popular soft and alcoholic beverages.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The following standards of artificial sweeteners and steviol glycosides were acquired: acesulfame-K, from Nutrinova (Frankfurt am Main, Germany), saccharin, sucralose and neohesperidin DC, from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), aspartame, from Ajinomoto Foods Europe (Nesle, France), cyclamate, from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), alitame, from Frapp's Pharma (Hong Kong, China), neotame, from CHEMOS (Regenstauf, Germany), and rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside, and steviol, from LGC Standards (Łomianki, Poland). The internal standard (IS) was sodium *N*-(2-methylcyclohexyl) sulfamate [16] synthesized on site. Acetonitrile (ACN) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate (NH_4Ac) was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Acetic acid (AA) was purchased from POCH (Gliwice, Poland). Ultrapure water was produced by the HLP5 system from Hydrolab (Wiślna, Poland).

2.2. Samples

Twenty-one samples of alcoholic and non-alcoholic beverages, and three instant drink powders were purchased from local shops. Many of the bought products were labelled as containing steviol glycosides, although some of them contained artificial sweeteners as well. Three of them were free from any sweetener.

2.3. Preparation of standards and calibration solutions

Individual stock solutions of all sweeteners and IS were prepared by dissolving a proper amount of them in a mixture of ACN:H₂O (60+40). The final concentration of each standard was around 50 ng/mL. Calibration solutions were prepared by mixing and dilution of the stock solutions with mobile phase component B (ACN 0.01% v/v AA). Two different calibration ranges were chosen

for artificial and natural sweeteners. For acesulfame-K, saccharin, neohesperidin DC, aspartame, sucralose, cyclamate, alitame and neotame the concentrations of calibration solutions were 5, 20, 50, 100, 200, 400 and 800 ng/mL of each. For rebaudioside A, stevioside, rebaudioside C, dulcoside A, steviolbioside and steviol the concentrations were as follows: 5, 20, 100, 300, 600, 1000, and 1600 ng/mL. In all calibration solutions the concentration of IS was maintained at 50 ng/mL. Stock solutions and calibration solutions were stored in a refrigerator at 4 °C, and every month new solutions were made.

2.4. Sample preparation procedure and spiked samples

All samples of beverages were degassed in a sonic bath for 15 min. Powders of instant drinks were prepared according to the labels on them. An aliquot of a sample was placed in a volumetric flask together with appropriate amount of IS solution and diluted one hundred times with mobile phase component B (ACN 0.01% v/v AA). This dilution was enough to fit all results into the calibration curves ranges. The concentration of IS in diluted samples was equal to 50 ng/mL. Next, a solution of the sample was placed in an eppendorf tube and centrifuged for 5 min at 7000 rpm. Supernatant was collected and analyzed directly. The procedure for preparation of spiked samples was described in the previous publication [9].

2.5. MS/MS conditions

All analyses were done using a Shimadzu LC–MS–MS system (LCMS-8050, Shimadzu, Japan) with an ESI source in the polarity switching mode. Multiple reaction monitoring mode (MRM) was employed for quantitation purposes. Conditions of ion transitions were chosen separately for the HILIC mode and for the RPLC mode [9]. The parameters of the ion source were the same for both methods. The parameters of ion transitions and conditions of the ESI source for a method based on HILIC are presented in Table S1 (Supplementary material). For most of the compounds the negative mode of ionisation was chosen, except for aspartame, alitame and neotame. For these three compounds higher intensity was observed in the positive mode. In the case of sucralose, acetic acid adduct (454.85) produced much higher intensity of ion transition than fragmentation of the pseudomolecular ion (395.05). The steviol molecule does not produce any observable fragment ions, either in the negative or positive mode. For this compound the pseudo-transition in the negative mode was chosen (317.30 → 317.40).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

2.6. Separation conditions

The chromatographic separation was done using the UPLC Nexera X2 system (Shimadzu) consisting of the following components: degasser DGU-20A5R, controller CBM-20A, binary pump LC-30 AD, autosampler SIL-30AC and thermostated column oven CTO-20AC.

Among the available HILIC columns three were chosen: Blue-Orchid PAL–HILIC 100 mm × 2 mm, 1.8 μm (Knauer), Ascentis Express Si 150 mm × 2.1 mm, 3 μm (Supelco) and AcclaimTM TrinityTM P2 100 mm × 2.1 mm, 3 μm (Thermo Fisher Scientific). A further discussion of the results obtained with all three columns is presented in Section 3.1. For the final HILIC method the AcclaimTM TrinityTM P2 column was chosen. Separation conditions for HILIC and RPLC methods are presented in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Separation of analytes

The main objective was to separate all sweeteners together with steviol as the main building block of steviol glycosides.

Table 1

Chosen separation conditions of the chromatographic system for the RPLC and HILIC methods.

	RPLC method [9]	HILIC method
Column	Ascentis® Express C18 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm)	Acclaim™ Trinity™ P2 (100 mm × 2.1 mm, 3 μm)
Flow rate	0.8 mL/min	0.6 mL/min
Temperature of thermostated column compartment	40 °C	30 °C
Injection volume	2 μL	2 μL
Analysis time	16 min	18 min
Mobile chase components	A: MeOH + H ₂ O + ACTN (20 + 75 + 5) 0.1% v/v AA B: ACN + ACTN (95 + 5) 0.1% v/v AA	A: 40 mM NH ₄ Ac pH 6.8 B: ACN 0.01% v/v AA
Gradient elution	0 → 10 min 0–30% B 10 → 15 min 30–70% B 15 → 16 min 70% B	0 → 2 min 96% B 2 → 11 min 96–87% B 11 → 14 min 87% B 14 → 18 min 87–50% B

Three columns were chosen to develop a method based on the HILIC approach: BlueOrchid PAL-HILIC, Ascentis Express Si and Acclaim™ Trinity™ P2. The Ascentis Express Si column is packed with high purity bare silica (core-shell technology, 0.5 μm thick porous shell with 1.7 μm solid impenetrable core). In the BlueOrchid PAL-HILIC a high purity, fully porous silica modified with polymer amine ligands was used. This column was designed for the separations in anion exchange and in HILIC modes. Third column—Acclaim™ Trinity™ P2 is based on nanopolymer-silica hybrid technology. The sorbent is 3 μm silica coated with charged particles of a nanopolymer: the inner pores of silica particles are modified with a covalently bonded hydrophilic layer, while the outer surface is modified with anion-exchange nanopolymer particles. This approach offers cation exchange retention in the innerpore region and anion-exchange retention on the outer surface. Moreover, the hydrophilic surface can be used in HILIC chromatography.

In HILIC, partitioning mainly occurs between the water-rich surface and water-deficient bulk mobile phase. In addition to this mechanism other phenomena are present: adsorption of molecule's polar functional groups on the stationary phase, ion exchange, and partial reversed-phase retention on the hydrophobic parts of bonded ligands [31].

ACN modified with acetic acid (up to 0.05% v/v) was chosen as the main organic component in the optimization of chromatographic runs. Two buffer solutions: ammonium formate and ammonium acetate, were tested as the aqueous parts of the mobile phase. However, better results in term of peak shapes and efficiency were obtained with NH₄Ac buffer on all columns. The initial composition of mobile phase was identical for all three tested columns. The mobile phase was composed of ACN (0.01% AA v/v) and 10 mM of NH₄Ac. The initial content of the aqueous component of the mobile phase was kept at 2–3% to enhance the separation of early eluting compounds. Further on, the gradient conditions were optimized to separate later eluting compounds. Additionally, other combinations of aqueous/organic parts of mobile phases were tested: the amount of NH₄Ac buffer was increased (25, 40, 50 up to 75 mM), together with the amount of AA (up to 0.05% v/v) in the organic component of the mobile phase. The last step was to choose the temperature of separation in the range from 30–50 °C. Example chromatograms obtained with BlueOrchid PAL-HILIC and Ascentis Express Si columns under optimized conditions are presented in Fig. 1.

Regardless of the mobile phase composition (buffer amount, AA amount in ACN, initial organic component content) the separation of the acesulfame-K, saccharin and steviol on Ascentis Express Si column was not sufficient. These analytes eluted close to the void time of the system and were poorly separated from each other, which is typical in the case of the bare silica columns, and was previously reported [26]. The increased content of buffer (above 10 mM) resulted in small changes in peak shapes and in suppress-

ing the signal. The increased content of AA in ACN (>0.05% v/v) had similar effect. Moreover, the peaks of neotame, aspartame and alitame showed severe tailing. The peaks of steviol glycosides were well separated and the order of elution was correct for HILIC chromatography—from the lowest to the highest molecular mass. In the case of separation done on BlueOrchid PAL-HILIC the peak shapes for tailing compounds (aspartame, alitame) were improved at the cost of the peak width of saccharin and acesulfame-K. The optimum buffer concentration in case of this column was 25 mM. Lower concentrations (5 and 10 mM) yielded poor peak shapes for aspartame and alitame, while higher concentrations (40, 50 and 75 mM) resulted in overall lower sensitivity. In all experiments the detection sensitivity was comparable up to 40 mM of NH₄Ac buffer, despite the different gradient programs. Above 40 mM the detection sensitivity of all transitions was suppressed, probably due to the increased amount of ions present in the eluate sprayed into the ionization chamber. In case of separation of steviol glycosides on BlueOrchid PAL-HILIC, the retention was not characteristic for the HILIC-type chromatography (reverse retention of rebaudioside C and A), hence different mechanisms of separation were involved. Most likely the exposed steviol moiety of rebaudiosides A and C was attracted to the hydrophobic ligand chain.

The Acclaim™ Trinity™ P2 column was originally designed for ion chromatography to determine the counter ions of some pharmaceuticals. This specific sorbent offers HILIC separation mechanisms as well. A higher buffer content (40 mM) than suggested by the producer (10 mM as minimal to force HILIC mechanism) was applied. The buffer content was increased in order to saturate the stationary phase sufficiently. Two example chromatograms obtained with the Acclaim™ Trinity™ P2 column with two different buffer concentrations (10 and 40 mM) as aqueous mobile phase are presented in Fig. 2. The concentration of buffer smaller than 40 mM resulted in irregular peak shapes for ionic compounds (saccharin and acesulfame-K) and substantially longer retention times for all analytes (see Fig. 2). To reduce retention times and improve peak shapes the buffer concentration was increased to 40 mM. Another factor to favor buffer at 40 mM was the high content of the organic component at the initial conditions (96%) necessary to separate steviol and shift its peak away from the dead time. However, buffer concentrations higher than 40 mM of NH₄Ac did not improve neither separation nor peak shapes, while the detection sensitivity started to decrease, similarly to the previously described cases. It is suspected that the high concentration of ions derived from ammonium acetate in the mobile phase (salting out effect) can limit the formation of hydrogen bonds between molecules of the analytes and stationary phase. Further analysis of the mechanism of separation is difficult because of commercial confidentiality concerning the structure of silica gel with nanoparticles. The order of elution of steviol glycosides with the use of the Acclaim™ Trinity™ P2 column is classic for HILIC (from the smallest mass-steviolbioside to the largest mass-rebaudioside A).

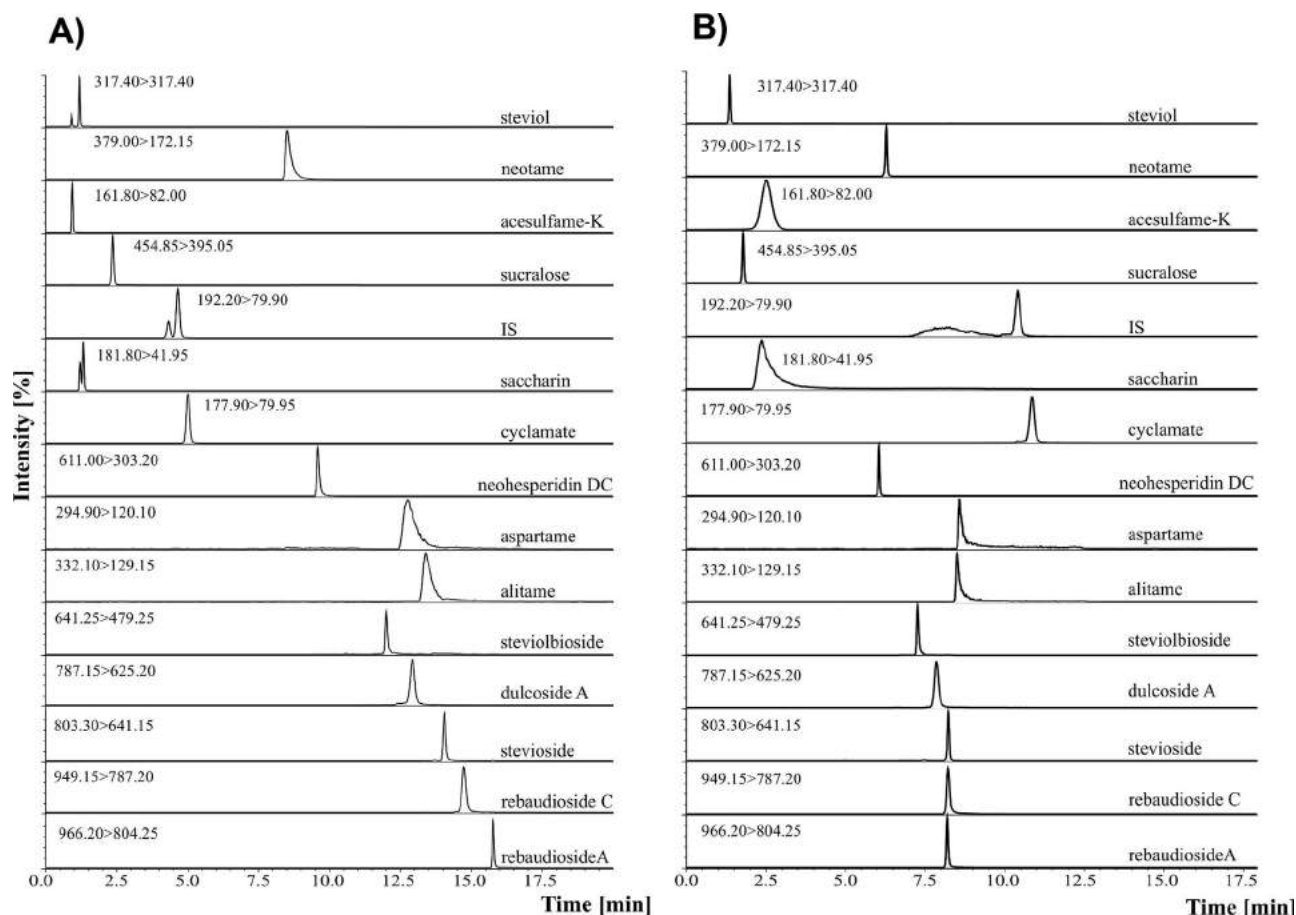


Fig. 1. Example chromatograms of a mixture of standards of sweeteners (50 ng/mL) under optimized conditions: (A) separation on Ascentis Express Si, mobile phase: A–10 mM NH_4Ac , B–ACN 0.05% AA v/v, gradient program: 0–5 min 3% A, 5–15 min 3–20% A, 15–20 min 20% A, temperature of column compartment 30 °C, injection volume 2 μL ; (B) separation on BlueOrchid PAL–HILIC, mobile phase: A–25 mM NH_4Ac , B–ACN 0.05% AA v/v, gradient program: 0–3 min 5% A, 3–15 min 5–45% A, 15–20 min 45% A, temperature of column compartment 35 °C, injection volume 2 μL .

Detailed information about chromatographic parameters is presented in Section 3.2. For further analysis and for comparison with the previously developed RPLC method [9] the HILIC method employing the Acclaim™ Trinity™ P2 column was chosen due to the best peak shapes and separation factors.

3.2. Comparison of chromatographic parameters

Two developed methods based on the HILIC and RPLC modes were compared in terms of basic chromatographic parameters: reduced retention time (t'_R), width at baseline (w), width at 50% of height ($w_{50\%}$), tailing factor at 10% of height ($\text{TF}_{10\%}$), efficiency (N) and plate height (H). The compared results are presented in Table 2.

In case of the RPLC method the smallest t_{RS} values are obtained for the most polar substances, and the highest for the steviol glycosides. The only part of the molecule of steviol glycosides that undergoes interactions with the stationary phase in the RPLC mode (Ascentis Express C18) is the exposed hydrophobic steviol moiety. In the method using the HILIC mode (Acclaim™ Trinity™ P2) interactions between the stationary phase and the steviol glycosides mainly involves the carbohydrates attached to the steviol moiety.

The shape and symmetry of the peaks were evaluated on the basis of w , $w_{50\%}$ and $\text{TF}_{10\%}$. The peaks of synthetic sweeteners are narrower in the case of the RPLC mode than in the case of the HILIC mode. In contrast, minor differences in the shape of peaks are observed for steviol glycosides—regardless of the method used. For both chromatographic methods the $\text{TF}_{10\%}$ values are within the

range of typical values, that is, optimal conditions of migration of analytes through the sorbent were achieved. However, in the case of the RPLC method the obtained peaks have a tendency for tailing ($\text{TF}_{10\%}$ above 1), while some peaks in the case of the HILIC method have the fronting tendency ($\text{TF}_{10\%}$ below 1). This is probably related to separation conditions (solute–solute interactions) of the substances of highly ionic character: acesulfame-K, saccharin and cyclamate. In order to obtain retention of steviol (low affinity to the stationary phase of the Acclaim™ Trinity™ P2 column) the chromatographic run has to start with the low elution-strength mobile phase (4% of component A).

The RPLC method was developed with the column based on core–shell technology, hence the analytes have a shorter and more uniform diffusional path in comparison to the column with fully porous particles, as in the HILIC method. In general, the core–shell particles are more efficient than fully porous particles, due to the reduction of the resistance of mass transfer in the mobile and stationary phases, as well as the reduction of the eddy diffusion.

The number of theoretical plates for the individual peaks is greater for the method based on the HILIC technique, and this is particularly apparent for the steviol glycosides and some synthetic sweeteners. Only in the case of steviol, neotame and alitame the plate number is significantly lower, due to weak interactions with the stationary phase (steviol) and the relatively high peak width (alitame and neotame).

The resolutions for two adjacent peaks were calculated for chromatograms obtained with the developed RPLC and HILIC methods, and the results are presented in Table S2 (Supplementary material).

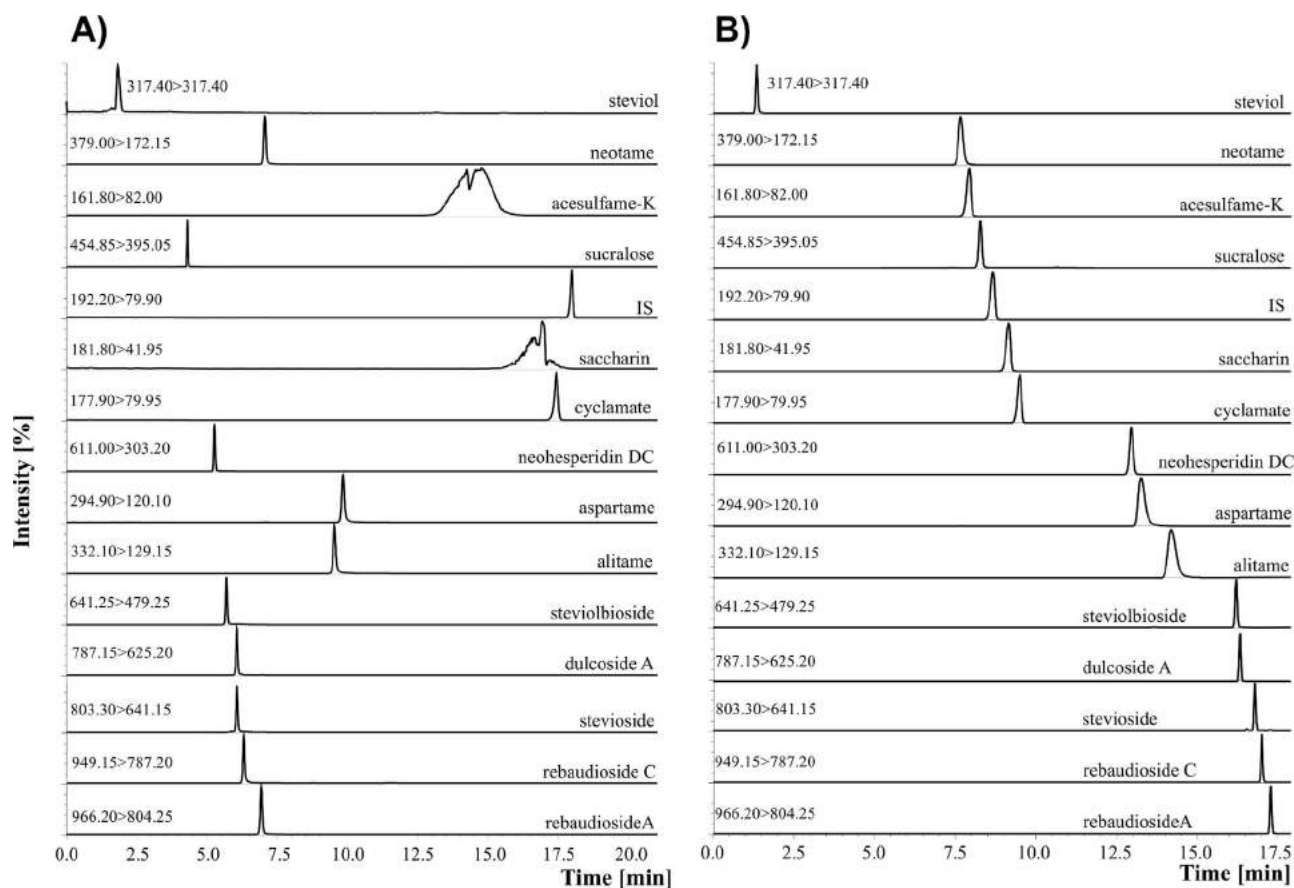


Fig. 2. Example of chromatograms of a mixture of standards of sweeteners (50 ng/mL) separated on Acclaim™ Trinity™ P2 column: (A) buffer content 10 mM in aqueous part of mobile phase, (B) buffer content 40 mM in aqueous component of mobile phase.

Table 2

Comparison of selected chromatographic parameters for two developed methods based on the RPLC [9] and HILIC modes of separation.

Analyte	RPLC HILIC t_R (min)		RPLC HILIC w (min)		RPLC HILIC $w_{50\%}$ (min)		RPLC HILIC $TF_{10\%}$		RPLC HILIC N (th.)		RPLC HILIC H (μm)	
Acesulfame-K	1.75	7.48	0.157	0.278	0.072	0.134	1.24	0.93	4.1	19.7	24.38	5.06
Saccharin	2.12	8.72	0.166	0.298	0.079	0.140	1.23	0.92	4.8	24.0	20.93	4.16
Aspartame	2.93	12.84	0.149	0.469	0.064	0.213	1.22	1.17	13.1	21.7	7.63	4.60
Sucralose	3.39	7.83	0.130	0.219	0.057	0.100	1.21	0.96	22.0	38.2	4.55	2.62
Cyclamate	3.65	9.06	0.173	0.280	0.073	0.129	1.19	0.93	15.3	30.4	6.55	3.29
Alitame	4.32	13.77	0.141	0.523	0.059	0.252	1.23	1.21	32.9	17.8	3.04	5.61
IS	5.85	8.22	0.241	0.292	0.101	0.146	1.08	0.94	19.7	19.9	5.06	5.04
Neohesperidin DC	7.30	12.53	0.128	0.286	0.056	0.127	1.15	0.96	98.2	58.0	1.02	1.72
Neotame	9.78	7.21	0.130	0.343	0.060	0.158	1.13	1.11	153.3	13.2	0.65	7.55
Rebaudioside A	10.34	16.87	0.122	0.136	0.056	0.061	1.11	1.15	196.3	444.3	0.51	0.23
Stevioside	10.42	16.59	0.123	0.116	0.056	0.052	1.12	1.17	196.9	590.8	0.51	0.17
Rebaudioside C	11.09	16.38	0.123	0.135	0.056	0.056	1.13	1.16	222.5	503.4	0.45	0.20
Dulcoside A	11.38	15.91	0.123	0.128	0.057	0.055	1.11	1.15	231.4	493.2	0.43	0.20
Steviolbioside	12.35	15.80	0.103	0.141	0.047	0.059	1.14	1.04	395.0	427.7	0.25	0.23
Steviol	15.07	1.36	0.108	0.143	0.049	0.062	1.10	1.15	530.8	2.7	0.19	37.11

t_R —reduced retention time, w —width at baseline, $w_{50\%}$ —width at 50% of peak height, $TF_{10\%}$ —tailing factor at 10% of height, N —efficiency, H —plate height.

For the RPLC mode of separation all peaks are well separated (R_s above 1.5), except rebaudioside A and stevioside (R_s 1.2). As mentioned before, only the steviol part of the molecule is involved in the separation mechanism on the Ascentis Express C18 column, and this might be the reason for the lower R_s . In case of the HILIC mode of separation, three pairs (neotame–acesulfame-K, neohesperidin DC–aspartame and steviolbioside–dulcoside A) are not completely resolved (R_s 1.1–1.2). This is probably connected with the limitations of the column stationary phase and gradient changes.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

3.3. Within laboratory validation

3.3.1. Calibration

For both methods a seven-point calibration curve was made by plotting the ratio of the peak area of the analyte to the peak area of IS versus concentration. Two concentration ranges were used for synthetic and natural sweeteners (see Section 2.3). The obtained calibration curves were linear in the tested concentration ranges. Weighting factor $1/x$ was applied to all calibration curves in order to increase accuracy at the lower concentration range. Limit of detection (LOD) values were estimated using the following formula; $LOD = 3.3S_b/a$, where S_b is the standard deviation of intercept

Table 3
Quantification and validation data for artificial sweeteners and steviol glycosides for the RPLC and HILIC methods.

RPLC [9]						
Analyte	Calibration curve equation (7 points, n = 3)	S_a	S_b	r	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Acesulfame-K	$y = 0.04286x + 0.099$	0.00079	0.059	0.9987	4.52	13.56
Saccharin	$y = 0.004583x + 0.0025$	0.000025	0.0018	0.9997	1.32	3.95
Aspartame	$y = 0.04189x - 0.070$	0.00028	0.021	0.9996	1.63	4.90
Sucralose	$y = 0.010964x - 0.0158$	0.000062	0.0046	0.9997	1.38	4.14
Cyclamate	$y = 0.02994x - 0.0454$	0.00013	0.0098	0.9998	1.08	3.23
Alitame	$y = 0.02816x - 0.024$	0.00021	0.015	0.9994	1.78	5.35
Neohesperidin DC	$y = 0.011370x - 0.0362$	0.000095	0.0070	0.9993	2.04	6.12
Neotame	$y = 0.04840x - 0.124$	0.00045	0.033	0.9991	2.28	6.84
Rebaudioside A	$y = 0.004872x - 0.0012$	0.000020	0.0029	0.9998	1.98	5.95
Stevioside	$y = 0.004625x - 0.0005$	0.000019	0.0029	0.9998	2.04	6.11
Rebaudioside C	$y = 0.016005x - 0.011$	0.000071	0.010	0.9998	2.16	6.48
Dulcoside A	$y = 0.007403x - 0.0168$	0.000035	0.0052	0.9997	2.33	7.00
Steviolbioside	$y = 0.002522x + 0.0022$	0.000014	0.0021	0.9997	2.69	8.08
Steviol	$y = 0.05032x + 0.131$	0.00028	0.042	0.9997	2.74	8.23
HILIC						
Acesulfame-K	$y = 0.02930x + 0.047$	0.00026	0.019	0.9993	2.14	6.42
Saccharin	$y = 0.0019827x - 0.00231$	0.0000066	0.00048	0.9999	0.81	2.42
Aspartame	$y = 0.003794x - 0.0193$	0.000018	0.0013	0.9998	1.11	3.33
Sucralose	$y = 0.004268x + 0.0029$	0.000039	0.0029	0.9992	2.24	6.73
Cyclamate	$y = 0.018984x - 0.0094$	0.000057	0.0042	0.9999	0.74	2.21
Alitame	$y = 0.003217x - 0.0175$	0.000017	0.0012	0.9998	1.20	3.60
Neohesperidin DC	$y = 0.0005855x - 0.00218$	0.0000062	0.00046	0.9989	2.59	7.78
Neotame	$y = 0.04902x - 0.145$	0.00032	0.023	0.9996	1.57	4.70
Rebaudioside A	$y = 0.00013818x - 0.002533$	0.00000047	0.000089	0.9999	2.12	6.37
Stevioside	$y = 0.00010864x - 0.00194$	0.00000051	0.00010	0.9998	3.13	9.40
Rebaudioside C	$y = 0.0003665x - 0.00769$	0.0000017	0.00031	0.9998	2.83	8.50
Dulcoside A	$y = 0.0002334x - 0.00413$	0.0000010	0.00020	0.9998	2.88	8.65
Steviolbioside	$y = 0.00006585x - 0.001302$	0.00000025	0.000047	0.9998	2.36	7.08
Steviol	$y = 0.06131x - 0.806$	0.00032	0.061	0.9997	3.30	9.89

S_a standard deviation of the slope, S_b standard deviation of the intercept, r correlation coefficient, LOD limit of detection, OQ limit of quantitation, n number of measurements.

and a is the slope of the calibration curve. To estimate limit of quantitation (LOQ) values the LOD values were multiplied by three. The figures of merit for the RPLC and HILIC methods are presented in Table 3. In general the LOD values obtained for a given analyte are comparable regardless of the method used (RPLC or HILIC). However, some exceptions can be noticed for example acesulfame-K and sucralose. The high content of ACN in the mobile phase in the HILIC method results in increased detection sensitivity, which partially compensates for the wider peaks of aspartame and alitame. Chromatogram corresponding to the lowest calibration point (5 ng/mL, HILIC mode) is shown in Fig. S1.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

3.3.2. Trueness and repeatability

The trueness and repeatability of the results of the two methods were estimated on the basis of the recovery of analytes from spiked samples. The procedure for the preparation of spiked samples was presented before [9]. Six independent analyses were done for each of the three levels of concentration for both methods. The recoveries of individual analytes are summarized in Table 4. Recoveries for the RPLC method vary from 97.0 to 105.7%, with relative standard deviations (RSDs) in the range of 0.4–4.1%, while recoveries for the HILIC method vary from 99.3 to 106.2%, with RSDs from 0.8 to 4.2%. From these results it can be concluded that both methods are comparable in terms of trueness and precision. No matrix effects were observed for either of the methods, mainly because of the high dilution of the sample, sufficient separation, and use of IS.

Six analyses were performed on three consecutive days for a spiked sample of the desired concentration. The results were used to check the next parameter validation–repeatability. Detailed data about recovery for repeatability estimation are presented in electronic Supplementary material (Table S3). Again, no signifi-

cant differences were observed, and recoveries were in the range 97.6–105.5%, with RSDs range 1.1–4.5% for the RPLC method, and recoveries from 98.5 to 105.0% with RSDs 1.1–4.4% for the HILIC method.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

3.3.3. Comparison of precision and accuracy by the F-Snedecor and t-Student tests.

In order to compare the precision of both developed methods the F-Snedecor ($\alpha = 0.05$) test was applied. The obtained values were compared with the $F_{critical}$ (5.05) value. The results are presented in electronic Supplementary material (Table S4). For most of the compounds there is no statistically significant difference in precision. The obtained values do not exceed $F_{critical}$ and these two methods do not differ in term of precision in a statistically significant manner. However, some values are close to $F_{critical}$. In order to verify the accuracy of both methods the Student t -test was applied for all the results. The obtained values were compared with the $t_{critical}$ value (2.23) for the Student t -test. For the four compounds (cyclamate, neohesperidin DC, rebaudioside A, dulcoside A) it can be observed that both methods differ statistically in terms of accuracy for two tested concentrations ($t_{critical}$ is exceeded). The values for acesulfame-K, saccharin and steviolbioside are exceeded for one tested concentration.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

It should be noted that different integrating peak algorithms in LabSolution software were used for chromatograms obtained with the RPLC and HILIC methods. The integration of wider and tailing peaks is problematic, hence the differences in accuracy. Results from validation clearly indicate the usefulness of the developed methods for identifying and quantifying artificial and natural

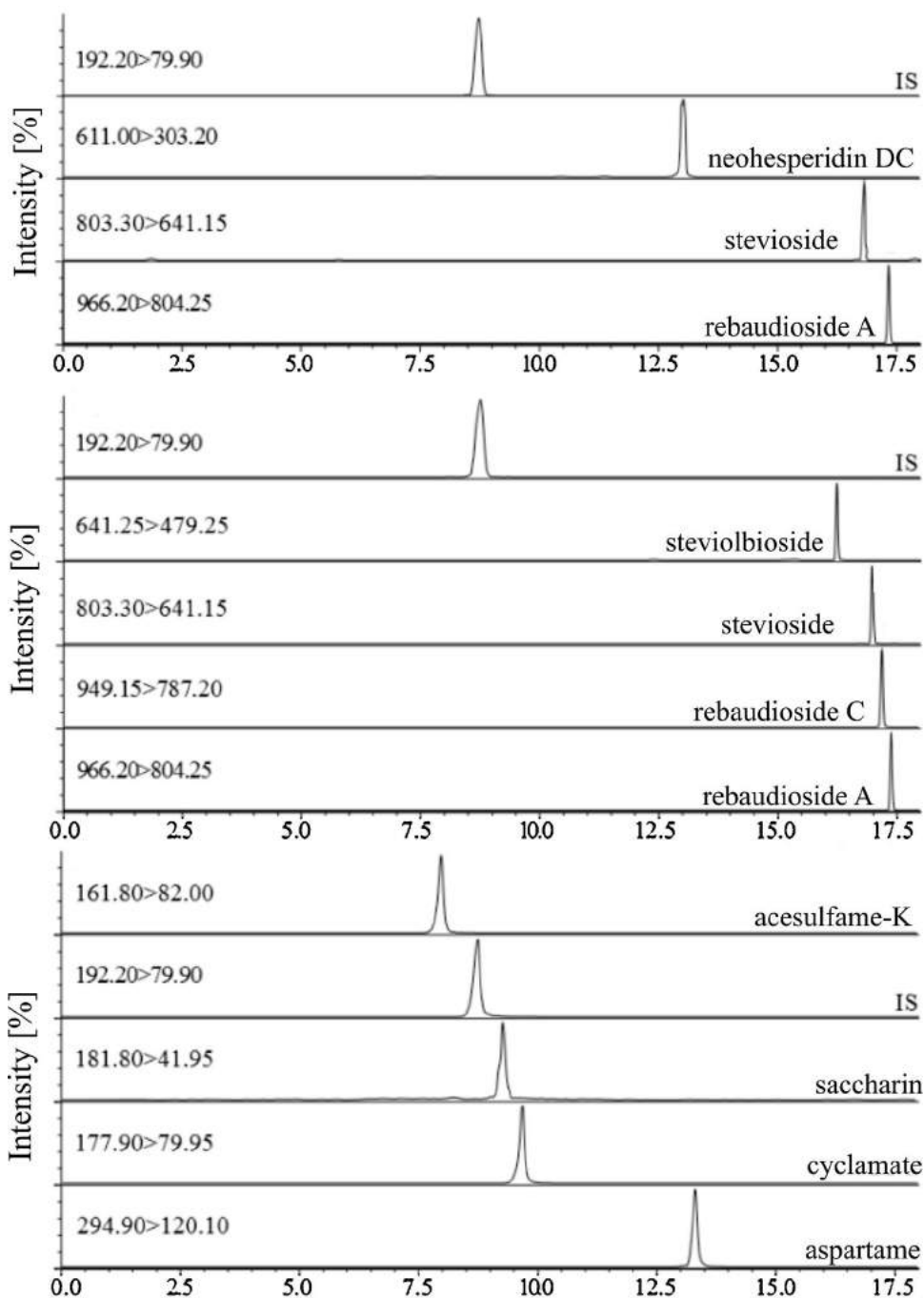


Fig. 3. Examples of chromatograms obtained for real samples with the HILIC method. From the top: CNA1, NCNA6 and CA4.

sweeteners in beverage samples, despite the differences between accuracy and precision. No significant or observable matrix effects were found during analysis.

4. Analysis of real samples

Twenty-four samples from different producers of soft and alcoholic drinks, including three instant drinks, were analyzed with the described HILIC method and previously published [9] RPLC method. Majority of the tested samples contained high-potency sweeteners. Three samples were labelled as free of sweeteners. All samples were prepared with the procedure described in Section 2.4. The equations of calibration curves for each analyte were used to determine the content of substances with high sweetening power in samples

of soft and alcoholic drinks. The results of HILIC analyses are summarized in electronic Supplementary material (Table S5). Example chromatograms obtained during the analysis of the samples by the HILIC method are shown in Fig. 3.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.006>.

5. Conclusions

The developed methods allow the separation and quantification of substances of various natures exhibiting high sweetening power. In the case of a HILIC-type separation it is possible to completely resolve the steviol glycosides with better efficiency than in the case of RPLC-type separation. For some of the compounds,

Table 4
Recoveries of analytes at three independent concentrations.

Analyte	RPLC [9]			HILIC		
	Recovery (RSD) (%) of analyte (n = 6)					
	10 × 10 ³ ng/mL	25 × 10 ³ ng/mL	60 × 10 ³ ng/mL	10 × 10 ³ ng/mL	25 × 10 ³ ng/mL	60 × 10 ³ ng/mL
Acesulfame-K	100.4 (2.5)	103.5 (2.3)	102.2 (0.6)	99.4 (3.2)	105.3 (1.0)	106.2 (0.9)
Saccharin	100.2 (1.9)	97.0 (1.9)	99.0 (1.8)	102.7 (2.4)	100.5 (1.7)	99.8 (1.5)
Aspartame	103.3 (2.7)	100.3 (1.1)	102.0 (1.4)	103.0 (3.1)	102.4 (2.4)	100.6 (1.9)
Sucralose	104.4 (2.1)	103.0 (1.9)	100.5 (2.4)	103.2 (4.1)	102.7 (1.1)	99.6 (1.7)
Cyclamate	101.4 (1.7)	98.0 (2.0)	98.9 (1.1)	105.7 (1.1)	102.8 (1.4)	98.6 (0.8)
Alitame	103.8 (2.4)	101.3 (1.4)	101.7 (2.9)	102.9 (0.7)	100.7 (2.1)	101.4 (1.0)
Neohesperidin DC	101.9 (3.3)	100.3 (2.3)	98.4 (1.3)	100.1 (2.8)	103.2 (1.1)	100.4 (1.5)
Neotame	102.4 (1.8)	99.5 (1.6)	102.1 (1.9)	101.4 (2.3)	101.3 (2.5)	100.7 (2.8)
Rebaudioside A	98.4 (2.1)	101.4 (2.9)	103.1 (1.4)	103.3 (2.6)	100.0 (1.5)	99.9 (1.6)
Stevioside	102.9 (1.3)	102.4 (3.1)	101.5 (1.7)	101.9 (1.4)	103.9 (1.9)	100.7 (1.2)
Rebaudioside C	103.1 (3.4)	102.0 (3.1)	101.9 (2.2)	102.1 (4.1)	99.5 (1.5)	102.0 (1.5)
Dulcoside A	105.7 (3.6)	102.6 (2.4)	102.9 (1.4)	99.3 (3.5)	99.9 (0.8)	101.0 (1.4)
Steviolbioside	98.0 (4.1)	100.3 (1.8)	102.7 (3.4)	101.8 (2.4)	104.0 (1.0)	99.2 (2.8)
Steviol	103.6 (2.8)	100.7 (1.7)	102.1 (2.5)	103.4 (3.7)	100.6 (1.5)	100.7 (2.5)

such as acesulfame-K, neohesperidin DC, neotame and steviol, RPLC separation is superior to HILIC. However, this is closely related to the physicochemical properties of the molecules and their affinity to the stationary phase. Acesulfame-K as an ionic compound may require specific chromatographic conditions (pH below 3). In the case of HILIC-type separation the pH is above 6, and the amino group of acesulfame-K is protonated, and this might be the reason for the wider peak of this compound, hence lower efficiency. For neohesperidin DC the significant difference in efficiency may result from the presence of other hydrophilic parts of its molecule, except moieties of simple sugars. The hydroxyl groups at the phenyl rings may be involved in the separation mechanism. The neotame has two hydrophobic parts: the aliphatic chain and the phenyl ring. These two parts may partially cover the hydrophilic parts (carboxylic groups), hence the interactions with the stationary phase might be disturbed. The steviol molecule is the key element in all steviol glycosides, although as a molecule it is hydrophobic and difficult to separate in the HILIC mode. The steviol molecule might be a marker of the freshness of products, since steviol glycosides may decompose in time (losing moieties of simple sugars) with the formation of steviol.

The two developed methods (HILIC and RPLC) may be used independently or interchangeably, depending on needs, in order to control the content of each sweetener in beverages. The methods provide short analysis time, high repeatability, and simple sample preparation, which is reduced to a minimum and involves only dilution and centrifuging. Using both methods, it is possible to achieve low LODs, high recovery values and good repeatability of results, and make these methods suitable for food quality and safety control. The method using the Acclaim™ Trinity™ P2 column is the first HILIC application where separation of acesulfame-K, saccharin and sucralose is achieved, and the results are comparable to those obtained in RPLC modes.

Acknowledgement

This work has been financially supported by a Polish National Science Centre (research project no.2012/07/N/ST4/01834).

References

- [1] A. Zygler, A. Wasik, J. Namieśnik, Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents, *Talanta* 82 (2010) 174–1748.
- [2] A. Zygler, A. Wasik, J. Namieśnik, Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *Trends Anal. Chem. TrAC* 28 (2009) 1082–1102.
- [3] J.M.C. Geuns, Stevioside, *Phytochem.* 64 (2003) 913–921.

- [4] R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, K. Ah-Hend, *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects, *Food Chem.* 132 (2012) 1121–1132.
- [5] Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives.
- [6] Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives.
- [7] Commission Regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides (2011) L295:205.
- [8] Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavoring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC (2012) L267:1.
- [9] P. Kubica, J. Namieśnik, A. Wasik, Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1505–1512.
- [10] R. Shah, S. Farris, L.S. de Jager, T.H. Begley, A novel method for the simultaneous determination of 14 sweeteners of regulatory interest using UHPLC–MS/MS, *Food Addit. Contam. A* 32 (2014) 141–151.
- [11] R. Shah, L.S. de Jager, T.H. Begley, Development and single-laboratory validation of an improved method for the determination of cyclamate in foods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 1651–1655.
- [12] N.E. Llamas, M.S. Di Nezio, M.E. Palomeque, B.S. Fernández Band, Direct determination of saccharin and acesulfame-K in sweeteners and fruit juices powders, *Food Anal. Methods* 1 (2008) 43–48.
- [13] V.N.O. Fernandes, L.B. Fernandes, J.P. Vasconcellos, A.V. Jager, F.G. Tonin, M.A.L. de Oliveira, Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection, *Anal. Methods* 5 (2013) 1524–1532.
- [14] Q.C. Chen, J. Wang, Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 57–64.
- [15] J.I. Zhang, X. Li, Z. Ouyang, R.G. Cooks, Direct analysis of steviol glycosides from *Stevia* leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves, *Analyst* 137 (2013) 3091–3098.
- [16] A. Zygler, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2159–2172.
- [17] A. Zygler, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, The content of high-intensity sweeteners in different categories of foods available on the Polish market, *Food Addit. Contam. A* 29 (2012) 1391–1401.
- [18] D. Yang, B. Chen, Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI–MS, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3022–3027.
- [19] I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, E.M. Thurman, Analytical methodologies for the detection of sucralose in water, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9581–9587.
- [20] Y.H. Wang, B. Avula, W. Tang, M. Wang, M.A. Elsohly, I.A. Khan, Ultra-HPLC method for quality and adulterant assessment of steviol glycosides sweeteners—*Stevia rebaudiana* and stevia products, *Food Addit. Contam. A* 32 (2015) 674–685.
- [21] D.Q. Pane, C.B. Dias, A.D. Meinhardt, C.A. Ballus, H.T. Godoy, Evaluation of the sweetener content in diet/light/zero foods and drinks by HPLC–DAD, *J. Food Sci. Technol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1816-1>, available online.

- [22] M.A. Stander, W. Kühn, N.F. Hiten, Survey of South African fruit juices using a fast screening HILIC–MS method, *Food Addit. Contam. A* 30 (2013) 1473–1484.
- [23] U. Woelwer-Rieck, C. Lankes, A. Wawrzun, M. Wust, Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*, *Eur. Food Res. Technol.* 231 (2010) 581–588.
- [24] D. Salas, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé, Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8330-6>, available online.
- [25] C. Gardana, M. Scaglianti, P. Simonetti, Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1463–1470.
- [26] E.Y. Ordonez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197–205.
- [27] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 5 (2013) 3825–3833.
- [28] C. Well, O. Frank, T. Hofmann, Quantitation of sweet steviol glycosides by means of a HILIC–MS/MS–SIDA approach, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 11312–11320.
- [29] D. Hurum, J. Rohrer, Steviol glycoside determination by hplc with charged aerosol and uv detections using the acclaim trinity P1Column, Thermo scientific application note 293.
- [30] B.F. Zimmermann, Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 1575–1582.
- [31] D.V. McCalley, Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 12171 (2010) 3408–3417.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

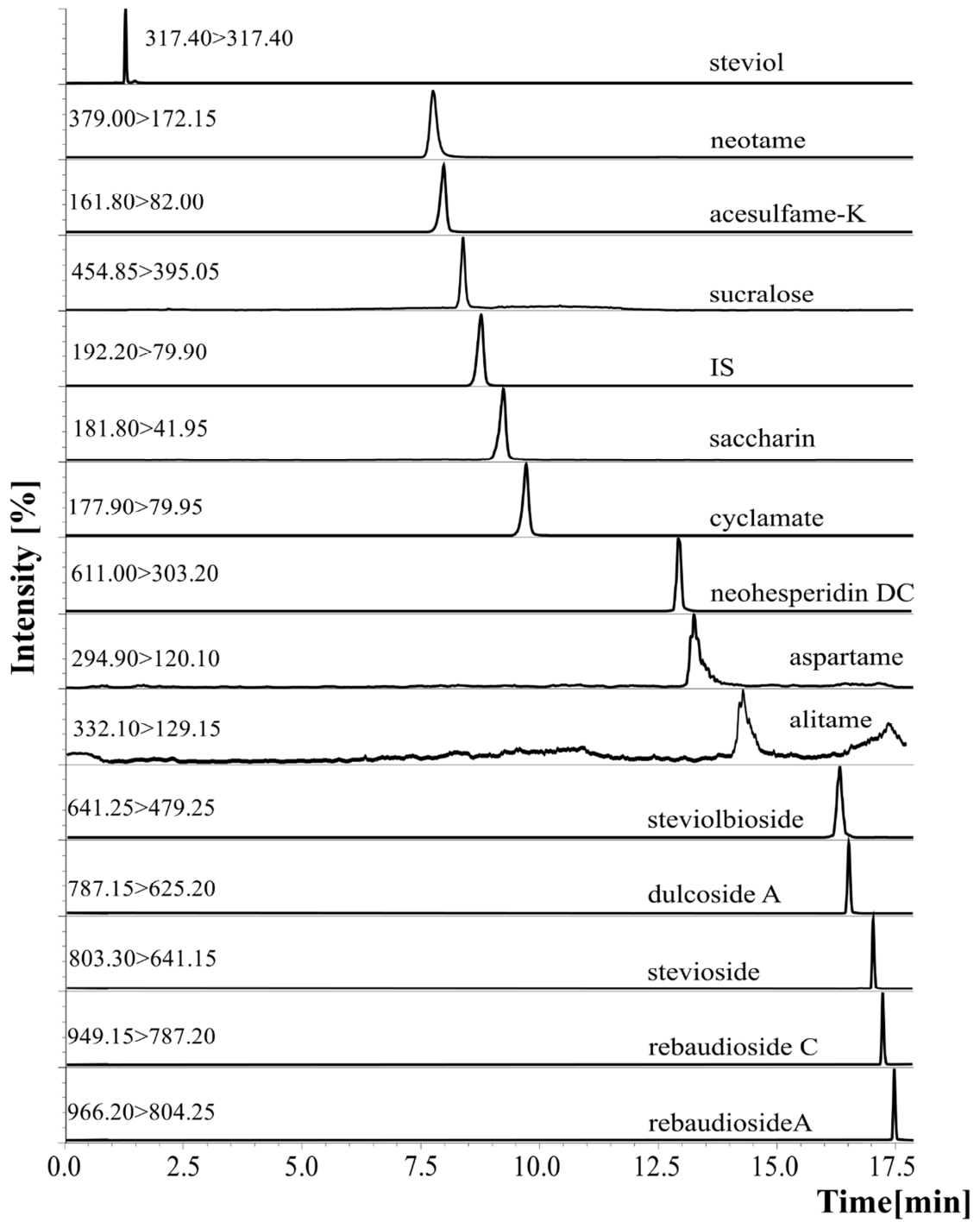


Figure S1. Chromatogram corresponding to the lowest calibration point (5 ng/mL, HILIC mode)

Table S1. Monitored ion transitions, their parameters and optimal MS/MS operational parameters

Compound	Polarity	Ion transition	Q1 Prebias (V)	Collision energy (V)	Q3 Prebias (V)
acesulfame-K	-	161.80→82.00	17	15	30
saccharin	-	181.80→41.95	18	27	14
aspartame	+	294.90→120.10	-30	-14	-19
sucralose	-	454.85→395.05*	22	11	17
cyclamate	-	177.90→79.95	18	26	30
alitame	+	332.10→129.15	16	15	20
IS	-	192.20→79.90	14	28	30
neohesperidin DC	-	611.00→303.20	26	37	30
neotame	+	379.00→172.15	-18	-21	-19
rebaudioside A	-	966.20→804.25	38	26	40
stevioside	-	803.30→641.15	30	29	30
rebaudioside C	-	949.15→787.20	38	33	38
dulcoside A	-	787.15→625.20	32	22	30
steviolbioside	-	641.25→479.25	24	42	22
steviol	-	317.40→317.40**	24	15	30

*adduct with acetic acid
**compound does not undergo fragmentation

MS/MS operation parameters					
Nebulising Gas Flow (L/min)	Heating Gas Flow (L/min)	Interface Temperature (°C)	DL Temperature (°C)	Heat Block Temperature (°C)	Drying Gas Flow (L/min)
3	10	350	250	500	10

DL – Desolvation line

Table S2. Resolution factors between adjacent peaks obtained for two developed methods - HILIC and RPLC.

RPLC		HILIC	
	Rs (-)		Rs (-)
RS _(acesulfame-K, saccharin)	2.9	RS _(steviol, neotame)	34.2
RS _(saccharin, aspartame)	6.7	RS _(neotame, acesulfame-K)	1.1
RS _(aspartame, sucralose)	4.5	RS _(acesulfame-K, sucralose)	1.8
RS _(sucralose, cyclamate)	2.4	RS _(sucralose, IS)	1.9
RS _(cyclamate, alitame)	6.0	RS _(IS, saccharin)	2.1
RS _(alitame, IS)	11.3	RS _(saccharin, cyclamate)	1.6
RS _(IS, neohesperidin DC)	10.9	RS _(cyclamate, neohesperidin DC)	15.9
RS _(neohesperidin DC, neotame)	25.1	RS _(neohesperidin DC, aspartame)	1.1
RS _(neotame, rebaudioside A)	5.7	RS _(aspartame, alitame)	2.4
RS _(rebaudioside A, stevioside)	1.2	RS _(alitame, steviolbioside)	7.7
RS _(stevioside, rebaudioside C)	7.0	RS _(steviolbioside, dulcoside A)	1.1
RS _(rebaudioside C, dulcoside A)	3.0	RS _(dulcoside A, rebaudioside C)	5.0
RS _(dulcoside A, steviolbioside)	11.0	RS _(rebaudioside C, stevioside)	2.3
RS _(steviolbioside, steviol)	33.3	RS _(stevioside, rebaudioside A)	2.9

Table S3. Recovery values used for estimation of repeatability.

Analyte	RPLC			HILIC		
	Recovery (RSD) (%) of the analyte (n=6) 60*10 ³ ng/mL					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
acesulfame-K	103.9 (1.5)	103.5 (1.9)	104.0 (2.2)	101.5 (1.9)	104.5 (3.1)	103.7 (1.2)
saccharin	103.0 (2.9)	103.9 (3.5)	105.2 (2.4)	100.5 (2.1)	101.6 (2.5)	102.1 (3.2)
aspartame	98.4 (1.8)	102.2 (1.2)	101.8 (2.1)	103.8 (2.3)	103.7 (3.4)	102.8 (2.6)
sucralose	103.6 (1.9)	99.6 (2.5)	98.5 (2.6)	102.3 (2.9)	102.4 (2.7)	104.3 (2.6)
cyclamate	97.6 (1.3)	98.9 (1.2)	100.0 (1.5)	99.6 (1.3)	99.5 (3.3)	102.6 (2.4)
alitame	97.8 (2.5)	98.7 (2.1)	97.9 (1.5)	98.9 (2.8)	101.0 (1.8)	103.2 (1.5)
neohesperidin DC	98.8 (1.1)	100.0 (2.3)	101.6 (2.9)	102.6 (1.6)	103.4 (3.2)	102.1 (2.8)
neotame	97.6 (1.2)	97.0 (1.5)	98.1 (1.5)	104.9 (3.7)	103.9 (2.2)	105.0 (3.1)
rebaudioside A	103.3 (2.3)	103.0 (1.8)	101.6 (2.3)	101.7 (4.4)	102.6 (3.1)	101.3 (4.0)
stevioside	102.1 (2.5)	98.3 (1.3)	99.4 (2.7)	103.3 (1.8)	101.9 (4.3)	104.2 (2.2)
rebaudioside C	103.6 (3.0)	102.4 (1.3)	102.1 (2.1)	98.9 (2.4)	99.2 (1.6)	98.7 (2.3)
dulcoside A	105.5 (4.5)	103.2 (1.4)	104.0 (1.8)	103.7 (3.5)	101.7 (2.6)	102.3 (3.7)
steviolbioside	101.9 (2.5)	98.9 (3.6)	98.2 (4.1)	102.5 (2.4)	98.5 (2.9)	101.5 (1.4)
steviol	104.6 (2.9)	98.6 (1.3)	100.8 (2.9)	100.9 (2.2)	102.4 (1.1)	101.2 (1.8)

Table S4. Comparison of precision and accuracy of results obtained with RPLC and HILIC methods based on the values obtained by F-Snedecor test and Student t-test

Analyte	F-Snedecor test ($F_{critical}=5.05$)			Student t-test ($t_{critical}=2.23$)		
	F_1 (10×10 ³ ng/mL)	F_2 (25×10 ³ ng/mL)	F_3 (60×10 ³ ng/mL)	t_1 (10×10 ³ ng/mL)	t_2 (25×10 ³ ng/mL)	t_3 (60×10 ³ ng/mL)
acesulfame-K	1.61	5.01	2.43	0.60	1.69	8.63
saccharin	1.68	1.16	1.42	1.97	3.41	0.84
aspartame	1.31	4.96	1.79	0.17	1.91	1.44
sucralose	3.72	3.00	2.03	0.62	0.33	0.75
cyclamate	2.20	1.85	1.90	5.07	4.84	0.55
alitame	4.93	2.22	4.78	0.36	0.58	0.26
neohesperidin DC	1.44	4.13	1.39	1.01	2.76	2.48
neotame	1.60	2.53	2.11	0.82	1.47	1.00
rebaudioside A	1.69	3.84	1.23	3.54	1.04	3.64
stevioside	1.14	2.59	2.04	1.25	0.98	0.93
rebaudioside C	1.43	4.49	2.15	0.45	1.75	0.09
dulcoside A	1.20	3.71	1.04	3.04	3.81	2.31
steviolbioside	2.70	3.01	1.58	1.98	4.35	1.92
steviol	1.74	1.29	1.03	0.10	0.11	0.96

Table S5. Concentrations of all found sweeteners in soft and alcoholic drinks: analysis of real samples. Only detected compounds are shown

		acesulfame-K	saccharin	aspartame	cyclamate	neohesperidin DC	rebaudioside A ^b	stevioside ^b	rebaudioside C ^b	steviolbioside ^b
MUD ^a in drinks ($\times 10^3$ ng/mL)		350	80	600	250	30			60 ^c	
Content of sweeteners ($\times 10^3$ ng/mL) \pm SD (n=3)										
Type	Name									
Carbonated non- alcoholic	CNA1					0.93 \pm 0.12 ^d	35.8 \pm 1.0	0.6326 \pm 0.0075		
	CNA2	None detected, in accordance with product label								
	CNA3	None detected, in accordance with product label								
	CNA4					1.02 \pm 0.11 ^d				
	CNA5						16.84 \pm 0.31	10.23 \pm 0.11	2.749 \pm 0.044	
Non- carbonated non- alcoholic	NCNA1						12.39 \pm 0.092			
	NCNA2						17.116 \pm 0.066			
	NCNA3						10.34 \pm 0.33	7.908 \pm 0.091	1.882 \pm 0.060	
	NCNA4					2.990 \pm 0.024 ^d	54.17 \pm 0.79	12.05 \pm 0.33	2.776 \pm 0.064	
	NCNA5						9.02 \pm 0.46	6.30 \pm 0.30	1.326 \pm 0.054	
	NCNA6						16.30 \pm 0.49	6.895 \pm 0.099	0.907 \pm 0.040	0.436 \pm 0.054
	NCNA7						10.95 \pm 0.15			
	NCNA8						48.37 \pm 0.63	27.73 \pm 0.59	1.691 \pm 0.054	0.790 \pm 0.037
	NCNA9						21.80 \pm 0.26	14.48 \pm 0.39	0.7079 \pm 0.0027	
	NCNA10						34.5 \pm 1.2	0.7175 \pm 0.0011		
	NCNA11						50.7 \pm 1.1	0.728 \pm 0.023		
Carbonated alcoholic	CA1						18.08 \pm 0.39	0.4747 \pm 0.0055		
	CA2						160.8 \pm 0.26	0.423 \pm 0.044		
	CA3	None detected, in accordance with product label								
	CA4	8.86 \pm 0.28	6.20 \pm 0.24	10.48 \pm 0.87	35.4 \pm 1.0					
	CA5	23.47 \pm 0.43	66.14 \pm 0.69							
<i>Quantum satis</i>										
Instant drink powders	IDP1						2.14 \pm 0.053			
	IDP2						2.13 \pm 0.13			
	IDP3						2.726 \pm 0.095	1.179 \pm 0.044	0.4172 \pm 0.0057	

^a maximum usable dose set by Directive 94/35/EC of the European Parliament and of the Council of 30 June 1994 and commission regulation (EU) no. 1131/2011 of 11 November 2011

^b expressed as steviol equivalents

^c MUD expressed as the sum of steviol equivalents according to commission regulation (EU) no. 1131/2011 of 11 November 2011

^d not specified on the product label

Jest to pierwszy przykład kompletnego rozdzielania całej grupy związków intensywnie słodzących za pomocą techniki HILIC. Dotychczasowe doniesienia naukowe nie prezentowały kompletnego rozdzielania oraz nie prezentowały jednoczesnego rozdzielania i oznaczenia sztucznych oraz naturalnych związków intensywnie słodzących. Z wykorzystaniem obu technik uzyskano po raz pierwszy rozdzielanie wszystkich substancji intensywnie słodzących (oprócz taumatyny) dopuszczonych do stosowania w Unii Europejskiej podczas jednego cyklu analitycznego. W badaniach uwzględniono syntetyczne i półsyntetyczne substancje słodzące oraz substancje pochodzenia naturalnego – stewiol i glikozydy stewiolowe, stosowane w różnych produktach spożywczych. W przypadku układu typu HILIC możliwe jest całkowite rozdzielanie glikozydów stewiolowych z lepszą sprawnością niż w przypadku układu typu RPLC. Opracowane metodyki mogą być wykorzystywane niezależnie lub zamiennie w celu kontroli zawartości substancji o dużej mocy słodzącej. Metodyki zapewniają krótki czas analizy chromatograficznej oraz wysoką powtarzalność, a przygotowanie próbek jest zredukowane do niezbędnego minimum.

Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność opracowanych metodyk, które mogą znaleźć zastosowanie w kontroli zawartości poszczególnych substancji o dużej mocy słodzącej w próbkach napojów.



Podsumowanie

5. Podsumowanie

Głównym założeniem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie nowych metodyk analitycznych z wykorzystaniem techniki HILIC, która jest nową i ciągle rozwijającą się odmianą chromatografii cieczerwowej. Unikalny charakter oddziaływań oraz szerokie możliwości wykorzystania tej techniki mogą stanowić interesującą alternatywę do już wprowadzonych rozwiązań. Dzięki zaprezentowaniu możliwości techniki HILIC, jej potencjalne wykorzystanie jako skutecznego narzędzia analitycznego ciągle wzrasta. Warunki chromatograficzne, które są wykorzystywane podczas rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych są bardziej przyjazne detektorom z komorą rozpylającą, np. spektrometrowi mas ze źródłem typu ESI, dzięki wysokiej zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. W związku z tym możliwe jest uzyskanie większej czułości. Niestety, zwiększona czułość jest czasem niwelowana przez otrzymywanie gorszych parametrów piku (np. szerokość u podstawy) w porównaniu do tych otrzymywanych z zastosowaniem techniki RPLC. Technika HILIC jest trudniejsza w opanowaniu i implementacji niż pozostałe techniki chromatograficzne. Wiąże się to z tym, że mechanizm retencji związków jest skomplikowany, ponieważ opiera się na kilku rodzajach oddziaływań. Trudno przewidzieć wpływ poszczególnych parametrów chromatograficznych takich jak: stężenie buforu, pH fazy ruchomej i ilość oraz rodzaj dodatku modyfikatora organicznego na retencję i kształt otrzymywanych pików. Istotną wadą jest dłuższy czas potrzebny na stabilizację warunków panujących w kolumnie typu HILIC. Warstwa eluentu o podwyższonej zawartości wody musi się odbudować wokół ziaren wypełnienia po każdej analizie chromatograficznej. Problem ten został częściowo rozwiązany przy zastosowaniu kolumn z wypełnieniem porowato-rdzeniowym – wymagają one znacznie krótszego czasu stabilizacji. Ponadto, w czasie stabilizacji możliwe jest zwiększenie objętościowego przepływu strumienia fazy ruchomej, co również skraca czas potrzebny do odnowienia początkowych warunków chromatograficznych.

Technika HILIC została zaprezentowana jako uzupełnienie oraz skuteczna alternatywa w rozdzielaniu szerokiej gamy związków. Celem badań było przybliżenie możliwości techniki HILIC oraz zaprezentowanie szerokiej możliwości zastosowania tej techniki podczas analiz chromatograficznych i oznaczania substancji należących do różnych grup związków chemicznych. Można traktować technikę HILIC jako skuteczną alternatywę dla innych technik chromatograficznych w wielu dyscyplinach naukowych, takich jak diagnostyka medyczna czy kontrola jakości produktów żywnościowych.



Bibliografia

6. Bibliografia

- [1] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bional. Chem.* **402**, 231, 2012.
- [2] P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* **29**, 1784, 2006.
- [3] J. C. Linden, C. L. Lawhead, *J. Chromatogr. A* **105**, 125, 1975.
- [4] A. J. Alpert, *J. Chromatogr. A* **499**, 177, 1990.
- [5] M. Diener, K. Erler, B. Christian, B. Luckas, *J. Sep. Sci.* **30**, 1821, 2007.
- [6] T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Bional. Chem.* **391**, 2533, 2008.
- [7] H. P. Nguyen, K. A. Schug, *J. Sep. Sci.* **31**, 1465, 2008.
- [8] A. S. Feste, I. Khan, *J. Chromatogr. A* **630**, 129, 1993.
- [9] S. C. Churms, *J. Chromatogr. A* **720**, 75, 1996.
- [10] S.-C. Lin, W.-C. Lee, *J. Chromatogr. A* **803**, 302, 1998.
- [11] M. A. Strega, *Anal. Chem.* **70**, 2439, 1998.
- [12] J. F. K. Huber, M. Pawlowska, P. Markl, *J. Chromatogr. A* **500**, 257, 1990.
- [13] D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A* **1171**, 46, 2007.
- [14] K. Polska, J. Fiedurek, S. Radzki, *Biotechnologia* **1**, 77, 2007.
- [15] J. J. Pesek, M. T. Matyska, M. T. W. Hearn, R. I. Boysen, *J. Chromatogr. A* **1216**, 1140, 2009.
- [16] J. T. Pesek, M. T. Matyska, *LC GC N. Am.* **1**, 2007.
- [17] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Buszewski, *Analyst* **137**, 4610, 2012.
- [18] *Separation Science*, artykuł dostępny w internecie: <http://www.sepscience.com/1736-/CoreShell-Particles-Precision-Engineered-for-Protein-and-Peptide-Separations>,
- [19] O. E. Schupp, *Chromatografia gazowa* (tłum. Jerzy Kuryłowicz), Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1972.
- [20] *Chromatografia Cieczowa* (praca zbiorowa pod redakcją M. Kamińskiego i R. Kartanowicza), Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 2004.
- [21] J. J. v. Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.* **5**, 271, 1956.
- [22] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, *J. Chromatogr. A* **1228**, 57, 2012.
- [23] F. Grittia, I. Leonardis, J. Abia, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1217**, 3819, 2010.
- [24] V. V. Tolstikov, O. Fiehn, *Anal. Biochem.* **301**, 298, 2002.
- [25] B. A. Olsen, *J. Chromatogr. A* **913**, 113, 2001.
- [26] A. R. Oyler, B. L. Armstrong, J. Y. Cha, M. X. Zhou, Q. Yang, R. I. Robinson, R. Dunphy, D. J. Burinsky, *J. Chromatogr. A* **724**, 378, 1996.
- [27] A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* **32**, 909, 2009.
- [28] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **1184**, 474, 2008.
- [29] P. Przybylski, A. Huczynski, B. Brzezinski, G. Schroeder, *Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli. Materiały supramolekularne*, Betagraf, Poznań, 2008.
- [30] N. S. Quiming, N. L. Denola, Y. Saito, A. P. Catabay, K. Jinno, *Chromatographia* **67**, 507, 2008.
- [31] D. E. Schmidt, R. W. Giese, D. Conron, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **52**, 177, 1980.
- [32] P. Jandera, T. Hájek, *J. Sep. Sci.* **32**, 3603, 2009.
- [33] P. Kubica, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Anal. Bional. Chem.* **406**, 3013, 2014.
- [34] J. Pazourek, *J. Sep. Sci.* **33**, 974, 2010.
- [35] X. Liu, C. Pohl, *J. Chromatogr. A* **1191**, 83, 2008.

- [36] P. Jandera, T. Hájek, V. Škeříková, J. Soukup, *J. Sep. Sci.* **33**, 841, 2010.
- [37] P. Kośliński, P. Jarzemski, M. J. Markuszewski, R. Kaliszan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **91**, 37, 2014.
- [38] M. Jovanović, B. J. Stojanović, T. Rakić, A. Malenović, D. Ivanović, M. Medenica, *Centr. Eur. J. Chem.* **11**, 1150, 2013.
- [39] N. F. Al-Tannak, S. Bawazeer, T. H. Siddiqui, D. G. Watson, *J. Chromatogr. A* **1218**, 1486, 2011.
- [40] D. S. Bell, A. D. Jones, *J. Chromatogr. A* **1073**, 99, 2005.
- [41] J. Soukup, P. Jandera, *J. Chromatogr. A* **1374**, 102, 2014.
- [42] M. Dolci, L. Pereira, T. Edge, *Thermo Fisher Scientific*, artykuł dostępny w internecie: <http://www.thermoscientific.de/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-documents/sci-res/posters/chrom/lc/col/PN-21216-HPLC-Acetonitrile-Content-HILIC-PN21216-EN-Rev1.pdf>, 2015.
- [43] E. Apfelthaler, W. Bicker, M. Lämmerhofer, M. Sulyok, R. Krska, W. Lindner, R. Schuhmacher, *J. Chromatogr. A* **1191**, 171, 2008.
- [44] C. Hao, D. Morse, F. Morra, X. Zhao, P. Yang, B. Nunn, *J. Chromatogr. A* **1218**, 5638, 2011.
- [45] K. Jaworska, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *J. AOAC Int.* **95**, 1588, 2012.
- [46] A. A. Kazarian, P. N. Nesterenko, P. Soisungnoen, R. Burakham, S. Srijaranai, B. Paull, *J. Sep. Sci.* **37**, 2014.
- [47] C. Wang, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong, *Separ. Sci. Technol.* **45**, 447, 2010.
- [48] K. J. Fountain, J. Xu, D. M. Diehl, D. Morrison, *J. Sep. Sci.* **33**, 740, 2010.
- [49] B. Buszewski, K. Krupczyńska, R. M. Gadzała-Kopciuch, G. Rychlicki, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.* **26**, 2003.
- [50] C. Viklund, K. Irgum, *Macromolecules* **33**, 2539, 2000.
- [51] P. Appelblad, P. Abrahamsson, *LC GC N. Am.* **1**, 2005.
- [52] W. Jiang, K. Irgum, *Anal. Chem.* **74**, 4682, 2002.
- [53] E. Wikberg, J. J. Verhage, C. Viklund, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* **32**, 2008, 2009.
- [54] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* **1074**, 71, 2005.
- [55] G. Greco, S. Grosse, T. Letzel, *J. Chromatogr. A* **1235**, 60,
- [56] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* **1218**, 3994, 2011.
- [57] G. Marrubini, B. E. C. Mendoza, G. Massolini, *J. Sep. Sci.* **33**, 803, 2010.
- [58] Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatographia* **66**, 223, 2007.
- [59] P. Kubica, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, P. Landowski, *J. Chromatogr. B* **907**, 34, 2012.
- [60] D. K. Trivedi, H. Jones, A. Shah, R. K. Iles, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **3**, 1, 2012.
- [61] M. Michel, T. Bączek, S. Studzińska, K. Bodzioch, T. Jonsson, R. Kaliszan, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* **1175**, 49, 2007.
- [62] S. D. Palma, P. J. Boersema, A. J. R. Heck, S. Mohammed, *Anal. Chem.* **83**, 3440, 2011.
- [63] Y. Takegawa, H. Ito, T. Keira, K. Deguchi, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, *J. Sep. Sci.* **31**, 1585, 2008.
- [64] M. Wührer, A. R. d. Boer, A. M. Deelder, *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 192, 2009.
- [65] G. Zauner, A. M. Deelder, M. Wührer, *Electrophoresis* **32**, 3456, 2011.
- [66] Y. Takegawa, K. Deguchi, H. Ito, T. Keira, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, *J. Sep. Sci.* **29**, 2533, 2006.
- [67] G. Weber, N. v. Wirn, H. Hayen, *J. Sep. Sci.* **31**, 1615, 2008.
- [68] Y. Li, C. Song, L. Zhang, W. Zhang, H. Fu, *Talanta* **80**, 1378, 2010.
- [69] H. Zhang, Z. Guo, F. Zhang, Q. Xu, X. Liang, *J. Sep. Sci.* **31**, 1623, 2008.

- [70] Z. Guo, Y. Jin, T. Liang, Y. Liu, Q. Xu, X. Liang, A. Lei, *J. Chromatogr. A* 1216, 257, 2009.
- [71] A. Berthod, S. S. C. Chang, J. P. S. Kullman, D. W. Armstrong, *Talanta* 47, 1001, 1998.
- [72] C. Wang, C. Jiang, D. W. Armstrong, *J. Sep. Sci.* 31, 1980, 2008.
- [73] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692, 1, 2011.
- [74] L. Yu, X. Li, Z. Guo, X. Zhang, X. Liang, *Chem.-Eur. J.* 15, 12618, 2009.
- [75] P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 31, 1421, 2008.
- [76] W. Naidong, *J. Chromatogr. B* 796, 209, 2003.
- [77] D. V. McCalley, U. D. Neue, *J. Chromatogr. A* 1192, 225, 2008.
- [78] S. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* 1204, 35, 2008.
- [79] U. D. Neue, Waters Corporation, artykuł dostępny w internecie: <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/501-/Hydrophilic-interaction-chromatography-HILIC>, 2015.
- [80] B. Chauve, D. Guillarme, P. Cléon, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 33, 752, 2010.
- [81] F. Gritti, A. d. S. Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1216, 8496, 2009.
- [82] Y. Guo, *Analyst* 140, 6452, 2015.
- [83] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1218, 5920, 2011.
- [84] D. S. Bell, R. E. Majors, *LC GC Eur.* 28, 102, 2015.
- [85] R. Kaliszan, *Chem. Rev.* 107, 3212, 2007.
- [86] W. Bicker, J. Y. Wu, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31, 2971, 2008.
- [87] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 31, 1449, 2008.
- [88] H. P. Nguyen, S. H. Yang, J. G. Wigginton, J. W. Simpkins, K. A. Schug, *J. Sep. Sci.* 33, 793, 2010.
- [89] R. Li, J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1041, 163, 2004.
- [90] P. L. Zhu, J. W. Dolan, L. R. Snyder, D. W. Hill, L. V. Heukelem, T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 756, 51, 1996.
- [91] J. V. Tran, P. Molander, T. Greibrokk, E. Lundanes, *J. Sep. Sci.* 24, 930, 2001.
- [92] D. Guillarme, S. Heinisch, *Sep. Purif. Rev.* 34, 181, 2005.
- [93] S. J. Angyal, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 8, 157, 1969.
- [94] T. Nishikawa, S. Suzuki, H. Kubo, H. Ohtani, *J. Chromatogr. A* 720, 167, 1996.
- [95] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A* 1092, 246, 2005.
- [96] G. Taylor, *Proc. R. Soc. Lond. A* 280, 383, 1964.
- [97] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* 65, 1993.
- [98] M. Wilm, *Mol. Cell. Proteomics*, artykuł dostępny w internecie: DOI:10.1074/mcp.M111.009407, 2011.
- [99] R. B. Cole, A. K. Harrata, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 546, 1993.
- [100] D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis, *Langmuir* 5, 376, 1989.
- [101] M. Labowsky, J. B. Fenn, J. F. Mora, *Anal. Chim. Acta* 406, 105, 2000.
- [102] A. T. Iavarone, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 2319, 2003.
- [103] J. F. Mora, *Anal. Chim. Acta* 406, 93, 2000.
- [104] N. B. Cech, C. G. Enke, *Anal. Chem.* 72, 2717, 2000.
- [105] R. Fritz, W. Ruth, U. Kragl, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 2139, 2009.
- [106] T. R. Keppel, M. E. Jacques, D. D. Weis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 6, 2010.
- [107] J. Heaton, M. D. Jones, C. Legido-Quigley, R. S. Plumb, N. W. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 3666, 2011.
- [108] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 482, 2011.

- [109] H. Liu, S. Zhang, A. Yu, L. Qu, Y. Zhao, H. Huang, J. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2339, 2004.
- [110] A. M. Lostia, L. Lionetto, L. Principessa, M. Evangelisti, A. Gamba, M. P. Villa, M. Simmaco, *Clin. Biochem.* 41, 887, 2008.
- [111] S. A. Wring, A. Terry, R. Causonb, W. N. Jenner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 1213, 1998.
- [112] P. Kubica, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A* 1289, 13, 2013.
- [113] C. Piernas, S. W. Ng, B. Popkin, *Pediatr. Obes.* 8, 294, 2013.
- [114] P. Kubica, J. Namieśnik, A. Wasik, *Anal. Bional. Chem.* 407, 1505, 2015.
- [115] P. Kubica, J. Namieśnik, A. Wasik, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, artykuł dostępny w internecie: doi:10.1016/j.jpba.2016.01.006, 2016.



Wykaz dorobku naukowego

7. Wykaz dorobku naukowego

7.1. Publikacje z listy filadelfijskiej

- [1] M. Janicka, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, J. Kot, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. B*, 893 – 894, 144, 2012.
- [2] **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, P. Landowski, *J. Chromatogr. B*, 907C, 34, 2012.
- [3] **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A*, 1289, 13, 2013.
- [4] **P. Kubica**, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3013, 2014.
- [5] **P. Kubica**, J. Namieśnik, A. Wasik, *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1505, 2015.
- [6] **P. Kubica**, H. Garraud, J. Szpunar, R. Łobinski, *J. Chromatogr. A*, 1417, 30, 2015.
- [7] **P. Kubica**, J. Namieśnik, A. Wasik, *J. Pharm. Biomed. Anal.* artykuł dostępny w internecie: doi:10.1016/j.jpba.2016.01.006.

7.2. Pozostałe publikacje i skrypty

- [1] **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, P. Landowski, J. Namieśnik, *Analityka Nauka i Praktyka*, 2, 48, 2012.
- [2] **P. Kubica**, Comparison of classical and modern approach of determination of highly polar compounds by High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Advances in Chemical and Mechanical Engineering I/II*, GUT Publishing House, Gdańsk, 2012, str. 299.
- [3] A. Kot-Wasik, A. Wasik, **P. Kubica**, *Water Quality and Water Pollution Control*, GUT Publishing House, Gdańsk, 2013.
- [4] **P. Kubica**, K. Wilczewska, A. Jakimska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, *Water and Wastewater Analysis*, GUT Publishing House, Gdańsk, 2014.
- [5] K. Wilczewska, W. Hewelt-Belka, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, *Analiza ilościowa w chromatografii ciekowej*, GUT Publishing House, Gdańsk, 2014.

7.3. Plakaty konferencyjne

- [1] M. Janicka, A. Zygler, A. Jakimska, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Determination of cyclophosphamide in surface water. Materiały XVII Konferencji „International Symposium on Separation Sciences” Cluj Napoca, Rumunia, 5–9.09.2011, str. 105.
- [2] M. Janicka, A. Zygler, A. Jakimska, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Study of degradation products of tetracyclines using HPLC-MS/MS. Materiały XVII Konferencji „International Symposium on Separation Sciences” Cluj Napoca, Rumunia, 5–9.09.2011, str. 104.
- [3] **P. Kubica**, M. Janicka, A. Zygler, A. Jakimska, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Carbohydrate analysis in urine by liquid chromatography and tandem mass

- specrometry as non-invasive method for establish permeability of digestive tract. Materiały Konferencji „Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society” Poznań, Polska, 4–7.03.2012, str. 289.
- [4] A. Zygler, A. Jakimska, **P. Kubica**, M. Janicka, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Stability study of sweeteners in beverages and identification of potential degradation products using hyphenated techniques. Materiały Konferencji „Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society” Poznań, Polska, 4–7.03.2012, str. 213.
- [5] M. Janicka, A. Zygler, A. Jakimska, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Increased confidence of biomarkers identification in EBC samples using LC-MS/MS. Materiały Konferencji „Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society” Poznań, Polska, 4–7.03.2012, str. 266.
- [6] A. Jakimska, **P. Kubica**, M. Janicka, A. Zygler, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Mass spectrometers as a powerful tool for stability studies and identification of degradation products of tetracyclines. Materiały Konferencji „Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society” Poznań, Polska, 4–7.03.2012, str. 186.
- [7] A. Zygler, **P. Kubica**, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Analysis of high-intensity sweeteners in environmental water samples by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Materiały XXIX Konferencji „International Symposium on Chromatography” Toruń, Polska, 9–13.03.2012, str. 522.
- [8] **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, Comparison of three HILIC approaches used for determination of carbohydrates in human urine as indicators of digestive tract permeability. Materiały XXIX Konferencji „International Symposium on Chromatography” Toruń, Polska, 9–13.03.2012, str. 436.
- [9] **P. Kubica**, K. Wilczewska, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Do electronic cigarettes help in quitting nicotine and smoking addiction? Evaluation of nicotine content in zero-level e-liquids with the approach “dilute and shoot” by RPLC-MS/MS and HILIC-MS/MS. Materiały XXXIX Konferencji „International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Amsterdam, Holandia, 16–20.06.2013, str. 499.
- [10] **P. Kubica**, A. Jakimska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, Comparison of three HILIC approaches for the determination of pharmaceutical residues by electrospray ionization – tandem mass spectrometry (HILIC ESI-MS/MS). Materiały XXXIX Konferencji „International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Amsterdam, Holandia, 16–20.06.2013, str. 902.
- [11] A. Jakimska, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, Elucidation of Degradation Pathway of Ketoprofen and Ibuprofen by UPLC-QTOF-MS. Materiały XXXIX Konferencji „International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Amsterdam, Holandia, 16–20.06.2013, str. 522.
- [12] K. Wilczewska, A. Wasik, A. Rutkowska, **P. Kubica**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Determination of Trace Amounts of Bisphenol a in Human Serum by Liquid

- Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. Materiały XXXIX Konferencji „International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Amsterdam, Holandia, 16–20.06.2013, str. 608.
- [13] W. Hewelt-Belka, **P. Kubica**, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Comparison of mobile phase additives for determination of amino acids in reversed phase mode. Materiały XIX Konferencji „International Symposium on Separation Sciences” Porec, Chorwacja, 25-28.09.2013, str. 123
- [14] **P. Kubica**, A. Wasik, J. Namieśnik, Comprehensive analysis of high intensity sweeteners in selected foods. Materiały Konferencji „High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Genewa, Szwajcaria, 21–25.06.2015, str. 127.
- [15] **P. Kubica**, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, M. Szczygieł, J. Aszyk, J. Namieśnik, Separation of complex mixture of pharmaceuticals by RPLC-MS/MS and HILIC-MS/MS – comparison of developed methods. Materiały Konferencji „High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Genewa, Szwajcaria, 21–25.06.2015, str. 166.
- [16] K. Wilczewska, **P. Kubica**, J. Namieśnik, A. Wasik, The troubleshooting of the determination of BPA at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Materiały Konferencji „High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Genewa, Szwajcaria, 21–25.06.2015, str. 181.
- [17] **P. Kubica**, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, Analysis of nicotine free e-liquids for electronic cigarettes for trace amounts of carbohydrates and nicotine by RPLC-MS/MS and HILIC-MS/MS. Materiały Konferencji „High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Genewa, Szwajcaria, 21–25.06.2015, str. 341.
- [18] J. Aszyk, M. Szczygieł, **P. Kubica**, K. Wilczewska, M. Wiergowski, A. Kot-Wasik, Simultaneous and simple determination of 25B-NBOMe and 4-CMC in blood by HPLC-MS/MS and HPLC-QTOF in a case of severe intoxication. Materiały Konferencji „High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” Genewa, Szwajcaria, 21–25.06.2015, str. 349.

7.4. Uzyskane granty

Wysokosprawna chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych sprzężona ze spektrometrią mas jako alternatywne rozwiązanie w stosunku do chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz do rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych, Nr 2012/07/N/ST4/01834.