

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Holoubková

VÝVOJ A OPTIMALIZACE SEPARACE
OLIGONUKLEOTIDŮ S VYUŽITÍM NOVÉHO PŘÍSTUPU
RECYKLAČNÍ HPLC

Development and optimization of oligonucleotide separation
using a novel recycle HPLC approach

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. června 2021

Bc. Barbora Holoubková

Abstrakt

Separace biologicky významných látek zahrnující proteiny, peptidy a nukleové kyseliny se v posledních letech staly významnou oblastí aplikací pro různé módy vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jednou z nich je preparativní separace s cílem izolace čistých produktů syntézy oligonukleotidů. Tyto mají v oblasti současné vědecké i komerční sféry zcela zásadní význam. Hrají nezastupitelnou roli v podobě krátkých sekvencí (primerů či sond) pro celou řadu molekulárních metod zahrnujících polymerázovou řetězovou reakci (PCR), DNA sekvenování, detekci patogenů pomocí specifické hybridizace a podobně. Příprava dokonale přesných a čistých oligonukleotidů bývá často zcela zásadní pro úspěšnost těchto metod, proto velmi záleží na účinnosti izolace cílové sekvence od neúplných produktů syntézy či dalších nechtěných příměsí. Současné postupy zahrnují mimo jiné i preparativní chromatografii, avšak nezdědka kdy mívají standardně používané postupy nedostatečné rozlišení.

Koncept recyklační chromatografie, kdy jsou analyty po výstupu z kolony navraceny zpět pro opakovaný průchod kolonou, a tím je zlepšeno jejich rozlišení, je znám od 60 let. V poslední době byl však představen zcela nový koncept, tzv. systému Repetto, kdy jsou segmenty separované směsi sekvenčně vraceny zpět na kolonu bez nutnosti průchodu pumpou snižující účinnost separace a s možností detekce mezi cykly, kdy na detektor nepůsobí vysoký zpětný tlak (jako např. při alternativní metodě tzv. přehazování mezi dvěma kolonami).

Hlavním cílem předložené práce byla optimalizace podmínek pro separaci směsi oligonukleotidů lišících se délkou sekvence či obsahem vysoko-tajících G a C bází a následné prokázání výrazného zlepšení rozlišení jejich separace pomocí výše zmíněného přístupu recyklační chromatografie. V první fázi byly optimalizovány podmínky iontově párové chromatografie v isokratickém režimu včetně nových experimentálně odhalených zásad zajištění reprodukovatelnost elučních časů a potlačení rozmytí píků. Ve druhé fázi byl demonstrován přínos recyklace u separace směsí různých typů oligonukleotidů, zahrnujících typy dle délky nebo poměrného zastoupení guaninu a cytosinu v sekvenci definující teplotu tání. Výsledky práce prokázaly využitelnost zvoleného recyklačního principu. Podařilo se dosáhnout excelentního rozlišení pro oddělení cílových píků od nekompletních vedlejších produktů syntézy či

nečistot. Získané postupy jsou v současné době implementovány v produkčním prostředí významného domácího producenta syntetických oligonukleotidů.

Klíčová slova: oligonukleotidy, iontově párová chromatografie, HPLC, Repetto, recyklace, TEAA

Abstract

Separation of biologically important substances such as proteins, peptides and nucleic acids, has become an important area of application for various modes of high-performance liquid chromatography in recent years. One of those applications is preparative chromatography for isolation of pure oligonucleotide synthesis products. Oligonucleotides are of fundamental importance in the field of contemporary scientific and commercial spheres. They play an irreplaceable role in the form of short sequences (primers or probes) for a variety of molecular methods including polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing, detection of pathogens by specific hybridization etc. The preparation of perfectly defined and pure oligonucleotides is often crucial for the success of these methods, so the efficiency of isolating the target sequence from incomplete synthesis products or other unwanted impurities is very important. Current procedures do not have sufficient enough resolution.

The concept of recycling chromatography, where the analytes are returned to the column for repeated passage after leaving the column and thus their resolution is improved, has been known since the 1960s. Recently, however, a completely new concept was introduced, the so-called Repetto system, where segments of the separated mixture are sequentially returned to the column without the need to pass a pump, which would reduce the separation efficiency, and with the possibility of detection between cycles, so the detector is not exposed to high back pressure (such as an alternative method called twin column recycling).

The main goal of this thesis was to optimize the conditions for separation of a mixture of oligonucleotides differing in sequence length or content of high-melting G and C bases and subsequent demonstration of significant improvement in resolution of their separation using the above-mentioned recycling chromatography approach. In the first phase, the conditions of ion-pair chromatography in the isocratic mode were optimized, including new experimentally revealed principles ensuring the reproducibility of elution times and suppression of peak broadening. In the second phase, the benefits of recycling in the separation of mixtures of different types of oligonucleotides, including types with different lengths or relative proportion of guanine and cytosine in the sequence defining the melting temperature, was demonstrated. The results of the thesis proved the applicability of the chosen recycling principle. Excellent

resolution was achieved to separate the target peaks from incomplete synthesis by-products or impurities. The obtained procedures are currently implemented in the production environment of a major domestic producer of synthetic oligonucleotides.

Keywords: oligonucleotides, ion-pair chromatography, HPLC, Repetto, recycling, TEAA

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Markovi Minárikovi, Ph.D. za ochotu a spolupráci, díky které jsem neklesala na duchu a podařilo se mi dostat takto náročnou metodu pevně do rukou. Dále velmi děkuji paní konzultantce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za užitečné rady a velkou morální oporu při tvorbě diplomové práce. Velmi děkuji také své rodině za morální i materiální podporu, že tu pro mě byli, když jsem je nejvíce potřebovala. Nakonec bych ráda poděkovala autorům odborných článků a literatury, ze kterých jsem čerpala.

Obsah

UNIVERZITA KARLOVA	1
Úvod.....	11
1 Teoretická část	12
1.1 Oligonukleotidy	12
1.1.1 Chemická struktura.....	12
1.1.2 Využití syntetických oligonukleotidů v praxi	14
1.2 Syntéza, purifikace a separace oligonukleotidů.....	14
1.2.1 Moderní postupy syntézy oligonukleotidů	14
1.2.2 Odsolení.....	15
1.2.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	16
1.2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	16
1.2.4.1 Iontově výměnná chromatografie.....	16
1.2.4.2 Iontově párová chromatografie	17
1.3 Koncept recyklační chromatografie.....	18
1.3.1 Rozlišení v kapalinové chromatografii.....	19
1.3.2 Opakovaný průchod jednou chromatografickou kolonou	20
2 Cíle práce	22
3 Experimentální část	23
3.1 Chemikálie	23
3.2 Instrumentace	24
3.3 Příprava mobilní fáze	24
3.4 Příprava vzorků.....	25
4 Výsledky a diskuse	26
4.1 Návrh a sestava HPLC systému.....	26
4.1.1 Systém pro optimalizaci metody	26
4.2 Robustnost systému, kvalifikační test.....	30
4.2.1 Kvalifikační test.....	30
4.2.2 Faktory účinnosti kolony (rozmytí píků).....	33
4.2.3 Vliv manipulace se vzorku před nástřikem	34
4.2.4 Vliv přípravy mobilní fáze, reprodukovatelnost elučních časů.....	35
4.3 Optimalizace parametrů metody pro isokratickou eluci	37
4.3.1 Optimalizace průtoku mobilní fáze	37
4.3.2 Optimalizace složení mobilní fáze podle délky a sekvence oligonukleotidů	38
4.3.3 Optimalizace koncentrace iontově párového činidla.....	42
4.3.4 Optimalizace teploty separace	43
4.4 Separace směsí oligonukleotidů při vybraných podmínkách separace.....	45
4.4.1 Výsledky separace směsí na krátké koloně Watrex DeltaSil C18.....	45

4.4.2	Výsledky separace směsí na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18.....	47
4.5	Separace směsí oligonukleotidů s využitím recyklace	49
4.5.1	Frekvence přepínání pozic ventilů.....	49
4.5.2	Vliv recyklace na parametry separace	50
4.5.3	Recyklace směsí oligonukleotidů na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18..	52
4.5.4	Recyklace směsí oligonukleotidů na krátké koloně Watrex DeltaSil C18...	54
4.5.5	Recyklace směsí oligonukleotidů na krátké koloně Waters XTerra C18.	58
5	Závěr	61
6	Soupis bibliografických citací	63

Seznam zkratek a symbolů

°C – stupeň Celsia, jednotka teploty

μl – mikrolitr, jednotka objemu

μm – mikrometr, jednotka délky

AIDS – syndrom získaného selhání imunity, nemoc

aRNA – antisense RNA, RNA komplementární k určitému řetězci mRNA

c – molární koncentrace, mol/dm³

C18 – oktadekan

CPG – nosič z porézního skla

DMT – dimethyltryptamin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, vládní agentura Spojených států amerických

g – gram, jednotka hmotnosti

H⁺ - vodíkový kation

HFIP – hexafluoroisopropanol

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Hz – hertz, jednotka frekvence

IE-HPLC – iontově výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IP-HPLC – iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie

mmol/dm³ – milimol/litr, jednotka molární koncentrace

mRNA – messenger RNA, předpis pro translaci

MS – hmotnostní spektrometrie

nm – nanometr

PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDA – detektor s diodovým polem

pH – záporný dekadický logaritmus koncentrace kationtů vodíku

RNA – ribonukleová kyselina

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

t_r - retenční čas, [min]

UV – ultrafialové záření

Úvod

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na analýzu vybraných oligonukleotidů v módu iontově párové kapalinové chromatografie a následné vylepšení separace s využitím nového konceptu recyklační chromatografie, při kterém jsou analyty s pomocí dedikovaného systému přepínacích ventilů navraceny na separační kolonu za účelem jejich opakované chromatografické separace. Úvodní část práce se zabývá studiem mechanismů separace a následným vývojem metodiky a optimalizací parametrů ovlivňujících kvalitu separace a zajištění robustnosti ve smyslu reprodukovatelnosti. Druhá část představuje vývoj HPLC systému zahrnujícího přístrojovou část a testování recyklačního modulu. Součástí je i vyhodnocení úrovně vylepšení separace (rozlišení).

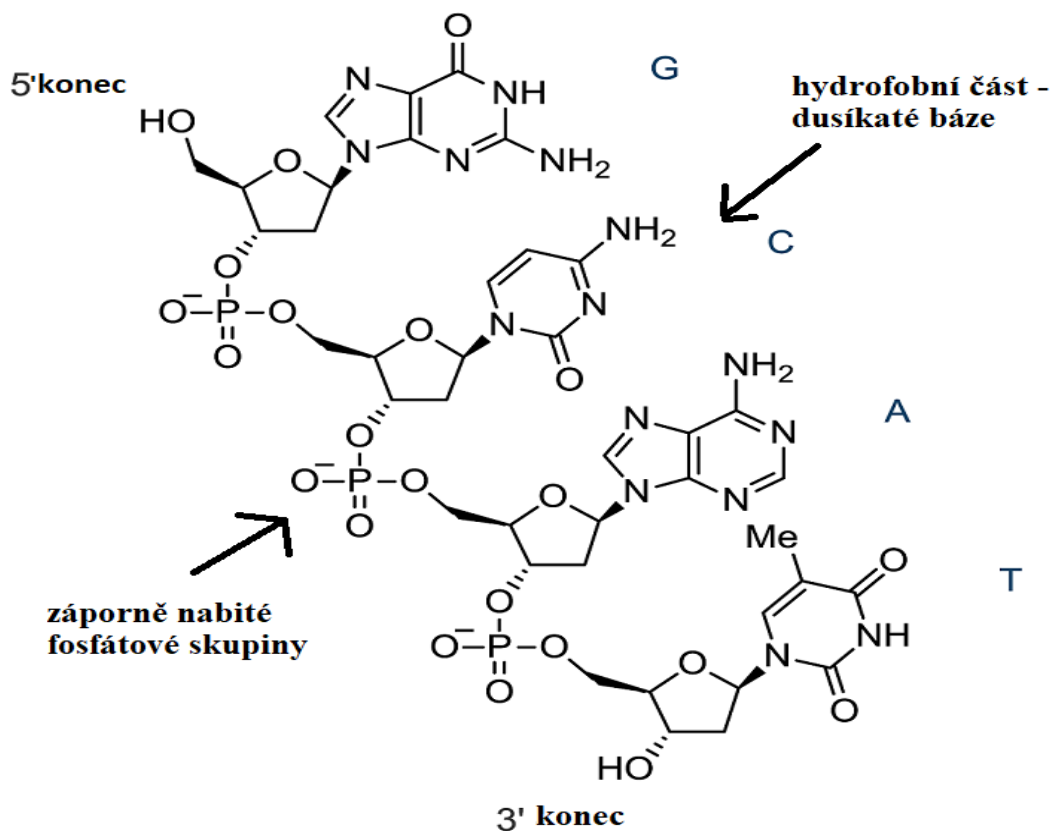
1 Teoretická část

1.1 Oligonukleotidy

1.1.1 Chemická struktura

V chemii a biochemii je oligomerem nazývána taková molekula, která je složena z několika podobných anebo identických opakujících se jednotek, monomerů. Slovo oligomer pochází z řeckého „*oligo-*“, několik či pár, a „*-mer*“, část. Polymer v porovnání s oligomerem chápeme jako spojení tisíců nebo i milionů monomerů, ale žádná přesně definovaná hranice mezi těmito pojmy určena není. Biologicky významné oligomery jsou například oligopeptidy, tvořené monomery aminokyselin, oligosacharidy, tvořené monosacharidy, a krátké jednovláknové fragmenty nukleových kyselin – oligonukleotidy [1,2].

Základními jednotkami (neboli monomery) oligonukleotidů jsou nukleotidy. Nukleotidy se skládají z báze, monosacharidu a zbytku kyseliny fosforečné – fosfátu. Nukleotidové báze jsou aromatickými heterocykly odvozenými od purinu nebo pyrimidinu. Rozeznáváme pět základních bází. Pyrimidinové báze cytosin, thymin (vyskytující se v DNA), uracil (vyskytující se v RNA) a purinové báze adenin a guanin. U vyšších forem organismů se v DNA můžeme také setkat s methylovaným cytosinem, jehož funkcí je bránit nežádoucí transkripci [3,4,5].



Obr. 1 Struktura oligonukleotidu. Převzato a upraveno z [6].

Spojení nukleobáze s monosacharidem nazýváme nukleosid. Tímto monosacharidem může být buď ribosa (v RNA) nebo 2 - deoxyribosa (v DNA). Báze a monosacharid jsou navzájem spojeny N - glykosidickou vazbou [3].

Jednotlivé nukleotidy se na sebe váží pomocí fosfátového zbytku a – OH skupiny na uhlíku 3' v monosacharidu. Vzniká tím mezi nimi fosfodiesterová vazba. Tímto řetězením pak vznikají oligonukleotidy a polynukleotidy (Obr. 1). Jejich sekvence se zapisuje jednopísmennými zkratkami bází ve směru od 5' konce k 3' konci [3].

Podle počtu nukleotidů, respektive počtu bází, oligonukleotidy označujeme příponou „mer“. Oligonukleotid o délce 26 bází tedy ponese označení 26–mer [2]. Přestože krátké fragmenty DNA a RNA mají v buňkách velký význam, oligonukleotidy se jako samostatné molekuly přirozeně v živých systémech nevyskytují, jejich původ je tedy vždy syntetický.

1.1.2 Využití syntetických oligonukleotidů v praxi

Syntetické oligonukleotidy se staly základním kamenem pro molekulární biologii, syntetickou biologii a biotechnologie. Mají zásadní význam v roli primerů nebo sond pro polymerázovou řetězovou reakci neboli PCR a DNA sekvenování. Tyto metody mají mnoho uplatnění, patří mezi ně například detekce patogenů, vyšetřování syndromů či predispozic v lékařské genetice či DNA fingerprinting ve forenzní analýze [7].

Další využití nachází oligonukleotidy ve vývoji nových léčiv, v podobě takzvané aRNA (antisense RNA), která je komplementární k mRNA. Antisense oligonukleotidy dokáží zabránit mRNA v translaci, což má potenciál při léčbě různých nemocí. Některá léčiva tohoto typu byla již schválena organizací FDA (U.S. Food and Drug Administration) s oficiálními protokoly k terapiím. Schválená léčiva obsahující antisense oligonukleotidy se využívají například k léčbě Battenovy choroby, cytomegalovirové retinitidy, Duchennovy svalové dystrofie nebo familiární hypercholesterolemie. Některé terapie jsou stále ve vývoji, ale je tu určitá šance, že by se antisense oligonukleotidy daly využít i při léčbě nemocí jako je rakovina, AIDS, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a mnoho dalších [8, 9, 10].

1.2 Syntéza, purifikace a separace oligonukleotidů

1.2.1 Moderní postupy syntézy oligonukleotidů

Pro syntézu oligonukleotidů bylo zásadní objevení technologie syntézy s fosforamidit v roce 1983, díky které bylo možné sériově vyrábět oligonukleotidy s dostatečnými výnosy reakcí [11, 14].

Tato technologie využívá fosforamiditové monomery. Jedná se o nukleotidy, které mají na své reaktivní skupiny (aminové, hydroxylové a fosfátové) navázané chránící skupiny znemožňující nechtěné postranní reakce. Vazba nukleotidů na pevný nosič je na uhlíku 3' monosacharidu a syntéza probíhá ve směru 3' → 5'. Pevným nosičem bývá obvykle porézní sklo (CPG neboli controlled pore glassbead) [10, 12, 15].

Na konci syntézy získáme oligonukleotid, který je 3' koncem navázaný na CPG nosič a jeho 5' konec je chráněn tritylovou skupinou [12, 15].

Výsledný produkt je následně odpojen od CPG nosiče přidáním hydroxidu amonného při vysoké teplotě [11,15].

Ve výsledném produktu výše uvedené syntézy je obsažena řada reakčních komponent či produktů. Tyto příměsi mohou negativně ovlivnit průběh PCR reakce, ve které je oligonukleotid použit, například způsobit inhibici DNA polymerázy, či změnit teploty nasednutí nebo annealingu. Navíc může zde být i přítomnost některých oligonukleotidů s chybovou sekvencí. Chybovou sekvencí rozumíme takovou sekvenci oligonukleotidů, která neobsahuje úseky požadované báze ve správném pořadí nebo se liší od požadované délky řetězce o jednu přebývající či chybějící bázi. Pro zajištění maximální spolehlivosti je tak téměř vždy potřeba produkty syntézy přečistit [16, 17, 18].

Vysoká míra purifikace se předpokládá obzvlášť u delších oligonukleotidů, určených pro klonování nebo hybridizaci, a dále u oligonukleotidů modifikovaných, které nesou například nestandardní báze nebo fluorescenční barviva [11, 13, 19].

1.2.2 Odsolení

Základní technikou purifikace oligonukleotidů je odsolení a provádí se nejčastěji metodou SPE extrakce (extrakcí na pevné fázi). Odsolení zbavuje směs malých molekul nečistot, které vznikly při odstraňování chránících skupin z fosfodiesterové páteře. Protože jsou odebrány pouze soli, nikoliv chybné sekvence oligonukleotidů, není u SPE možné garantovat míru čistoty preparátu, a proto si většina komerčních výrobců za odsolování neúčtuje žádné příplatky a jsou v ceně zakoupených výrobků [16, 20, 21].

SPE kolonky fungují na principu reverzní fáze. Sekvence produktu jsou zadrženy na stacionární fázi a ty nežádoucí jsou mobilní fází odplaveny. Oligonukleotidy značené některými barvivy (WellRED, Cyanine a jiné) jsou s touto metodou kompatibilní díky hydrofobním vlastnostem připojené fluorescenční značky. S rostoucí délkou oligonukleotidů se zvyšuje podíl nežádoucích krátkých sekvencí obsahujících 5'-DMT (dimethyltriptaminovou) skupinu. Díky navázanému DMT nemohou být odděleny od správných sekvencí, a proto je pro delší oligonukleotidy purifikace pomocí SPE nevhodná [16, 20, 21].

Nejvíce rozšířenými metodami purifikace a separace oligonukleotidů jsou v dnešní době hlavně elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) a různé druhy vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [11, 17, 22, 23].

1.2.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Obecně se dá o separaci pomocí PAGE říci, že rozděluje oligonukleotidy podle jejich délky, tím pádem je možné oddělit správné sekvence od těch nežádoucích, krátkých. Relativní pohyblivost oligonukleotidů skrz polyakrylamidový gel je určena velikostí pórů gelu a velikostí molekul oligonukleotidu. Velikost pórů je řízena koncentrací akrylamidu a objemovým poměrem akrylamidu a bisakrylamidu při tvorbě gelu. Rychlost migrace oligonukleotidů gelem ovlivňuje řada dalších důležitých faktorů, jako je konformace oligonukleotidů, koncentrace solí v pufru nebo gradient napětí. PAGE je vhodná zejména pro separaci dlouhých oligonukleotidů (nad 50 bází), kde dosahuje spolehlivých výsledků a vysokých výnosů. Nedostatky této metody jsou například nevhodnost pro modifikované oligonukleotidy, nízký výtěžek cílových oligonukleotidů z důvodu nutnosti vzorky dále extrahovat z gelu a také její pracnost a časová náročnost [16, 17, 20, 23, 25].

1.2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Obdobně jako v případě gelové elektroforézy dosahuje přečištění pomocí HPLC kvalitativně vyšších výtěžků. Chromatografické metody se pro analýzu a purifikaci oligonukleotidů začaly používat kolem roku 1970. V posledních letech se vývoj v instrumentaci a stacionárních fázích velmi posunul a pro analýzu a purifikaci oligonukleotidů se nyní používá hned několik různých druhů HPLC. Patří mezi ně iontová HPLC (též označovaná jako iontově výměnná HPLC, IE-HPLC) nebo iontově párová HPLC (IP-HPLC) [10, 17, 22, 27].

1.2.4.1 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je vhodná metoda k separaci nabitých molekul a je velmi často využívána k separaci a purifikaci oligonukleotidů o různých velikostech, tedy počtech nábojů. Obvyklými stacionárními fázemi bývají polymery terciálních nebo kvartérních amoniových solí nebo silikagel, jako mobilní fáze se používají gradienty vodných roztoků anorganických solí. Oligonukleotidy jsou schopny tvořit sekundární a terciální struktury, dimery nebo agregáty, a proto je třeba přidat do systému denaturační činidla zabráňující jejich vzniku. Mezi taková činidla patří například organická

rozpouštědla (ethanol, acetonitril), pufrů s vysokým pH nebo zvýšená teplota kolem 55 °C. Úpravu pH však nelze použít pro purifikaci nebo separaci některých modifikovaných oligonukleotidů z důvodu jejich nestability v alkalickém pH. Oligonukleotidy do 30 bází lze separovat a purifikovat pomocí aniontově-výměnné chromatografie podle počtu nabitých fosfátových skupin v monosacharid-fosfátovém řetězci. Výsledek purifikace cílových oligonukleotidů závisí na jejich délce a vyšší čistoty výsledného produktu dosahujeme na úkor výnosu. Jímané frakce cílových oligonukleotidů jsou po purifikaci odsolovány pomocí RP-HPLC [10, 17, 18, 26].

1.2.4.2 Iontově párová chromatografie

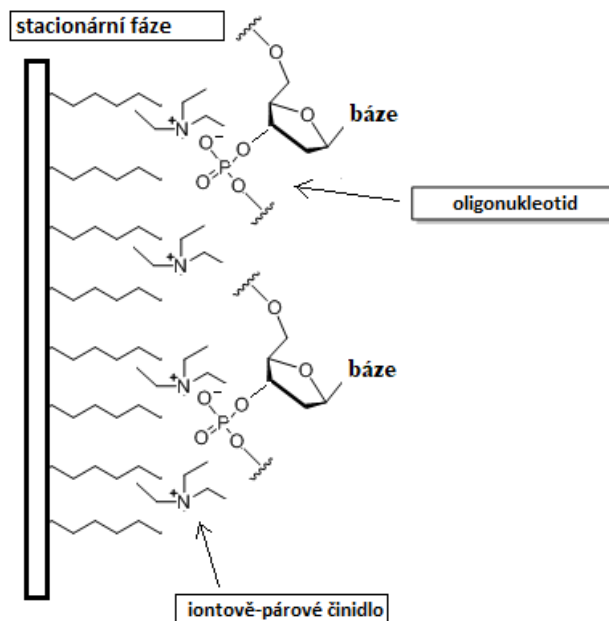
Tato práce byla zaměřena na využití nejčastěji používané metody pro separaci oligonukleotidů, kterou je iontově párová HPLC. Na rozdíl od klasické HPLC na reverzní fázi, která využívá přímé hydrofobní interakce s nepolární komponentou (bází). Iontově párová HPLC je zaměřena na vytvoření nepolární interagující komponenty vykrytím záporných nábojů nukleotidu. Do mobilní fáze je v nízké koncentraci přidán alkylovaný amin s uhlíkovým řetězcem. Výsledkem je výrazné snížení polaritativy oligonukleotidu vedoucí ke zvýšení jeho hydrofobní interakce s reverzní fází. Iontově párové interakce v tomto druhu HPLC jsou velmi komplexní. Retence a pořadí oligonukleotidů při separaci jsou řízeny nábojem oligonukleotidů, délkou alkylového řetězce v iontově-párovém činidle a také podílem organického rozpouštědla v mobilní fázi. Retenční čas je tím delší, čím více záporných nábojů oligonukleotidu má a čím delší je alkylový řetězec činidla (v obou případech tím roste hydrofóbnost iontového páru). Největší vliv na optimalizaci rozlišení a selektivity separace má právě složení mobilní fáze. Jako iontově-párová činidla se nejčastěji používají [18, 19, 22]:

- Triethylammonium acetát (TEAA),
- triethylamin (TEA) v kombinaci s hexafluoroisopropanolem (HFIP).

A případně další amoniové soli s navázanými uhlovodíkovými řetězci.

Jedním z nejvíce používaných činidel k separaci oligonukleotidů je TEAA, který se používá typicky v koncentraci 100 mmol/dm³ při pH 7. Volba HFIP je vhodná především díky kompatibilitě s MS detekcí. Při iontově párové HPLC se jako mobilní fáze používá

směs acetonitrilu (ACN) a vody, tak jako při běžné RP-HPLC. Obsah organické složky však musí být velmi nízký, neboť oligonukleotidy mají i v iontovém páru relativně nízkou úroveň hydrofobicity. I při malé změně zastoupení organického modifikátoru v mobilní fázi dochází k prudkým změnám retence oligonukleotidů. Jako stacionární fáze se v IP-HPLC používá klasický silikagel s C18. Na Obr. 2 je schematicky znázorněna interakce stacionární fáze, iontově párového činidla a oligonukleotidu [10, 17, 24, 28, 30].



Obr. 2 Schéma interakce oligonukleotidu, iontově párového činidla a stacionární fáze v iontově-párové HPLC na reverzní fázi.

1.3 Koncept recyklační chromatografie

Kapalinová chromatografie je vysokoúčinná separační metoda založená na fázové separaci v důsledku dynamické rovnováhy mezi stacionární fází (sorbentem) a mobilní fází. Koncept recyklační chromatografie je založen na opakovaném návratu analytů zpět na počátek separační kolony, čímž se dosáhne virtuálního prodloužení délky kolony a zlepšení separace. Tento koncept vychází z teorie chromatografické separace, kde je hlavním parametrem rozlišení.

1.3.1 Rozlišení v kapalinové chromatografii

Rozlišení chromatografické separace je parametr, který udává kvalitu separace. Zahrnuje faktory rozdílu retence a rozmytí separovaných analytů. Níže (Rovnice 1) je uvedeno schéma rovnice pro rozlišení R_s , které je definováno účinností, selektivitou a retencí. Retence označuje dobu, jakou stráví zadržovaný analyt na koloně a nepřímo závisí na eluční síle mobilní fáze. Selektivita je schopnost metody dělit analyty na základě různých chemických, fyzikálních nebo biochemických vlastností. Selektivitu lze ovlivnit zejména výběrem stacionární fáze. Účinnost separace má zásadní vliv na rozmývání píků, a proto jde při recyklační chromatografii o zásadní parametr [29, 31, 37, 38].

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$
$$N \approx \frac{L}{H} \approx \frac{L}{2d_p}$$

Rovnice 1 Schéma rovnice pro rozlišení a počet teoretických pater kolony. První člen rovnice pro rozlišení je parametrem účinností. R_s označuje rozlišení, N je počet teoretických pater kolony, α značí retenční poměr a k značí kapacitní faktor. L značí délku kolony, H výšku teoretického patra a d_p označuje velikost částic.

Na základě uvedené rovnice je patrné, že účinnost separace je úměrná délce kolony. Pokud například prodloužíme kolonu na dvojnásobnou délku, pak se rozlišení zlepšší o 40 %. Prodloužení délky kolony však vede k nárůstu tlaku, jak je vyjádřeno v rovnici níže (Rovnice 2). Při obvyklých podmínkách HPLC, kdy běžně tlak dosahuje 80–150 atmosfér, je tak použití více než dvou kolon v sérii za sebou nemyslitelné, neboť tlakový limit běžných komponent nepřesahuje 400 atmosfér.

$$\Delta P = \frac{\eta FL}{K^o \pi r^2 d_p^2}$$

Rovnice 2 Rovnice protitlaku na koloně a jeho závislost na délce kolony. ΔP je protitlak, η značí viskozitu kapaliny, F je průtok mobilní fáze, L je délka kolony, K je specifická permeabilita, πr^2 je poloměr kolony a d_p^2 je průměr částic.

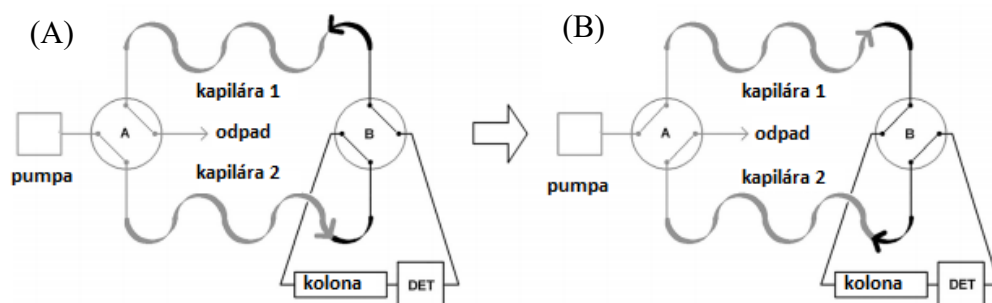
1.3.2 Opakovaný průchod jednou chromatografickou kolonou

Pro recyklační chromatografii byly v průběhu let vyvinuty různé přístupy a zapojení. Základním přístupem, který byl využíván od šedesátých let, je několikanásobný průchod analytů přes jednu chromatografickou kolonu. Principem je přesměrování eluujících analytů na pumpu a vrácení zpět na kolonu. Hlavní nevýhodou tohoto jednoduchého přístupu je rozmývání píků z důvodu velkého mrtvého vnitřního objemu pumpy. Z tohoto důvodu je využitelný především v preparativních aplikacích, kde je příspěvek mrtvého objemu pumpy malý [32, 38].

K vyřešení problému rozmývání píků vedl nápad přepínání eluátu mezi dvěma kolonami pomocí jednoho nebo dvou ventilů, uvedený v roce 1986. Přestože se nejedná o recyklaci v pravém slova smyslu, jde o metodu používanou k analytickým aplikacím a její funkčnost byla ověřena teoreticky i prakticky několika autory odborných článků. Autoři tuto metodu využili například k odstraňování malých nečistot u léčiv, separaci protilátek nebo separaci enantiomerů. Alternace za použití dvou separačních kolon má však zásadní nevýhodu v tom, že detektor je zapojen mezi kolonami, což znamená vysoký tlak [33–36, 39–41].

Problém tlaku na detektoru byl v nedávné době vyřešen zcela novým přístupem. Autoři Minárik M. a spol. pod označením Repetto představili nový recyklační princip, kdy do systému zapojili dva komerčně dostupné ventily se 4 porty a 2 pozicemi, které přepínají mezi uzavřenou recyklační smyčkou a pumpou rozpouštědla umístěnou mimo smyčku. Na rozdíl od předchozích zapojení zde není detektor mezi kolonami, ale za výstupem a detektor je v bezpečné části systému mimo vysoký tlak [33].

Základem myšlenky recyklačního principu Repetto je tak relativně rychlé synchronizované přepínání obou ventilů, které tvoří uzavřenou smyčku. Malé objemové sekce na výstupu jsou nanášeny zpět na kolonu. Na Obr. 3 je znázorněno schéma zapojení tohoto modulu [33].



Obr. 3 Schematické zapojení recyklačního modulu Repetto. (A) Pozice 1. (B) Pozice 2. Převzato a upraveno z [33].

Při svém představení byl princip recyklační HPLC systému Repetto demonstrován na výrazném zlepšení separace chirálních izomerů a benzenových izotopologů (normální versus deuteriovaná forma) [33].

Předkládaná práce je první aplikací tohoto systému u separací biologicky významných látek a představuje reálnou aplikaci pro využití v systému produkce syntetických oligonukleotidů.

2 Cíle práce

Předkládaná práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek pro separaci oligonukleotidů pomocí IP-HPLC uzpůsobené aplikaci této metody pro recyklační chromatografii za použití recyklačního principu Repetto. Dílčími cíli byly:

- Návrh a sestava HPLC systému dedikovanému dané aplikaci.
- Zajištění robustnosti systému i metody.
- Optimalizace koncentrace iontově párového činidla.
- Optimalizace teploty kolony.
- Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze.
- Separace směsí oligonukleotidů při optimálních podmínkách na standardní koloně o rozměrech 50x4 mm.
- Separace směsí oligonukleotidů při optimálních podmínkách na delší koloně.
- Výrazné vylepšení separace oligonukleotidů s využitím recyklačního principu Repetto a popis nových parametrů separace.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda (Premier MFG'D Systems, INC.)
- Acetonitril 99,9 % p.a., FisherScientific, UK
- Triethylammonium acetát (1 mol/dm³), MerckKGaA, Německo
- Kyselina octová ledová 99,8 % p.a., Penta, s.r.o., ČR
- Hydrogenuhlíčitan sodný, Lachema, ČR
- Syntetické oligonukleotidy, Generi biotech, ČR
 - Purifikace: stand., stanovení kvality: stand.
 - koncentrace zásobního roztoku: 0,1 mmol/dm³
 - další specifikace viz Tabulka 1.

Tabulka 1 Specifikace standardů oligonukleotidů od výrobce

Katalogové číslo	Označení	Délka řetězce	GC (%)	MW
1982C5	04_54_41	54-mer	40,7	16405,7
1982C6	05_55_40	55-mer	40,0	16793,9
1982C7	06_56_39	56-mer	39,3	17098,1
1982C8	07_24_67	24-mer	66,7	7305,8
1982C9	08_25_64	25-mer	64,0	7610,0
1982D0	09_26_65	26-mer	65,4	7899,1
1982D1	10_24_38	24-mer	37,5	7362,9
1982D2	11_25_40	25-mer	40,0	7652,1
1982D3	12_26_39	26-mer	38,5	7956,3

3.2 Instrumentace

- Chromatografická kolona DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, Watrex Praha, s.r.o., ČR
- Chromatografická kolona DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, Watrex Praha, s.r.o., ČR
- Chromatografická kolona XTerra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 µm, Waters Corporation, USA
- Čerpadlo Streamline P1m, Watrex Praha, s.r.o., ČR
- Čerpadlo Streamline P1s, Watrex Praha, s.r.o., ČR
- Spektrofotometrický detektor Streamline UV1, Watrex Praha, s.r.o., ČR
- Odplyňovač mobilní fáze SST Vacuum Pump, SYSTEC, USA
- Autosampler s chlazením AS-2051 Plus, Jasco, Japonsko
- Termostat z přístroje Agilent/HP 689A GC, Agilent Technologies, Inc., USA
- pH indikátorové papírky (1-14), Ahlstrom-Munksjö, Finsko
- Analytické váhy AA-250, Denver Instrument Company, USA
- Chromatografický software Clarity, Clarity Software Group, USA
- Automatická pipeta (100 – 1000 µl), Witeg, Německo
- Automatická pipeta (10 – 100 µl), Biohit Proline, BIOHIT, Finsko
- pH metr HI 221, Hanna instruments s.r.o., ČR
- Plastové vialky se septem
- Plastové Eppendorf mikrozkušavky

3.3 Příprava mobilní fáze

Hlavní složky mobilních fází byly tvořeny triethylamonium acetátem (TEAA) a acetonitrilem. TEAA bylo připravováno v požadované koncentraci smísením deionizované vody, ledové kyseliny octové a triethylaminu, pH bylo upravováno pomocí pH metru přidáním buď kyseliny octové pro snížení pH nebo hydrogenuhličitanu sodného pro jeho zvýšení. Mobilní fáze byly z důvodu používaných nízkých procent acetonitrilu připravovány přímo s acetonitrilem přimíchaným

v požadovaném poměru. Mobilní fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu, mobilní fáze B 15 % acetonitrilu a mobilní fáze C 100 % acetonitrilu. Protože byla aplikace velice citlivá na obsah acetonitrilu a kvůli mikrobiální degradaci aminového iontově párového činidla bylo nutné mobilní fáze A a B připravovat každý den čerstvé a všechny složky MF byly odměřovány gravimetricky (viz kapitola 4 Výsledky a diskuze). Takto připravené mobilní fáze byly poté zfiltrvány na vakuové filtrační sestavě.

3.4 Příprava vzorků

Alikvoty standardů oligonukleotidů byly z lyofilizovaného vzorku rozpuštěny na koncentraci $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ ($100 \text{ pmol/}\mu\text{l}$) přidáním objemů deionizované vody dle pokynů výrobce lišící se pro každý jednotlivý standard. Alikvoty byly dále uchovávány v mrazáku, zatímco zředěné vzorky a směsi byly uchovávány v lednici. Pro analýzy byly alikvoty zředěny 50x a vzorky byly nastříkovány v objemu $20 \mu\text{l}$. Na základě experimentů (viz kapitola 4 Výsledky a diskuze) byly po celou dobu manipulace vzorky drženy v chladu kolem $4 \text{ }^\circ\text{C}$ buď umístěním v autosampleru nebo v chladícím bloku.

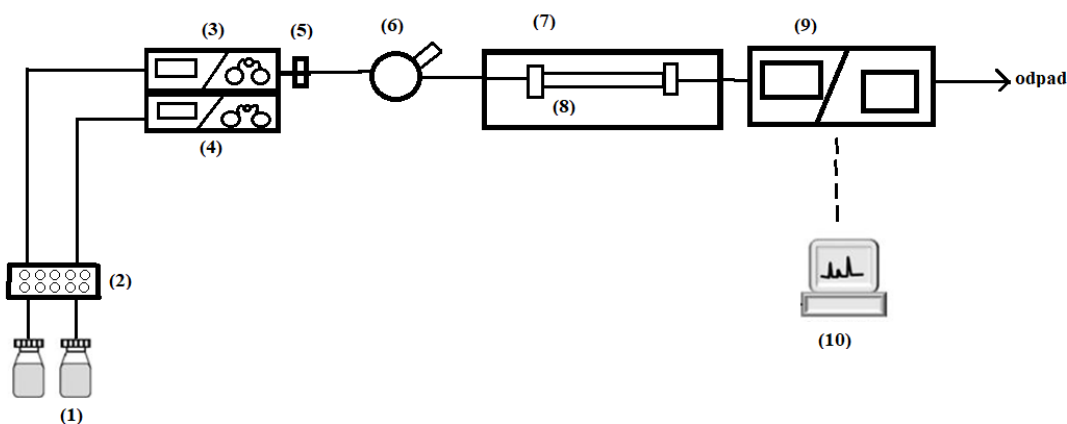
4 Výsledky a diskuse

4.1 Návrh a sestava HPLC systému

4.1.1 Systém pro optimalizaci metody

Chromatografický systém používaný v této práci byl poskytnut českým výrobcem Watrex Praha a v HPLC laboratoři Watrex také probíhali veškeré experimenty.

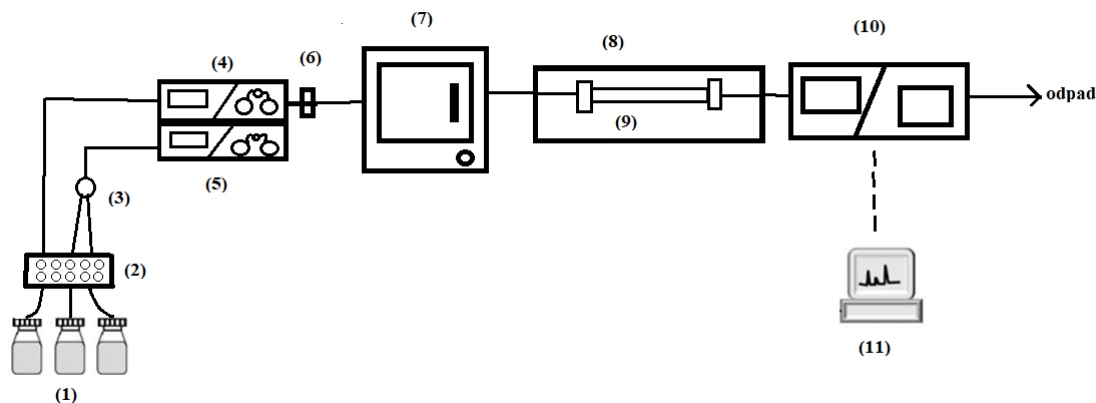
Počáteční verze systému obsahovala dvě čerpadla, manuální dávkovač, směšovače mobilních fází, kolonu, UV detektor a datastanici. Jednalo se tak o klasické uspořádání binárního gradientu, kdy se mobilní fáze vytváří ze dvou složek dvěma čerpadly a k míchání dochází na straně vysokého tlaku. Ačkoliv je vysokotlaký gradient z principu méně náchylný na zavzdušnění, byl v systému zapojen odplyňovač mobilní fáze. Na tomto systému jsem si ověřila základní práci se systémem na měření standardů a osvojila jsem si práci s chromatografickým softwarem Clarity od českého výrobce DataApex, který je využíván i v systémech jiných výrobců (např. Knauer). Dále jsem se naučila sledovat stav přístroje, stabilitu tlaku, řešit efekty zavzdušnění systému a teplotní stability. Pro zajištění stabilních separačních podmínek byl do systému zařazen termostat. Schéma systému pro vývoj a optimalizaci metody separace oligonukleotidů je znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4 Schéma základního HPLC systému pro optimalizaci metody separace oligonukleotidů. (1) Zásobníky mobilní fáze. (2) Degasser. (3), (4) Čerpadla mobilní fáze. (5) Směšovač mobilní fáze. (6) Manuální dávkovač. (7) Termostat. (8) Kolona. (9) UV Detektor. (10) Datastanice. Tento systém byl využit pro první sadu experimentů.

Tento základní systém byl vyvinut pro první soubor měření a zjišťování základních vlastností systému jako například vliv koncentrace iontově párového činidla, rozsah organické složky mobilní fáze, pH, teplot atd.

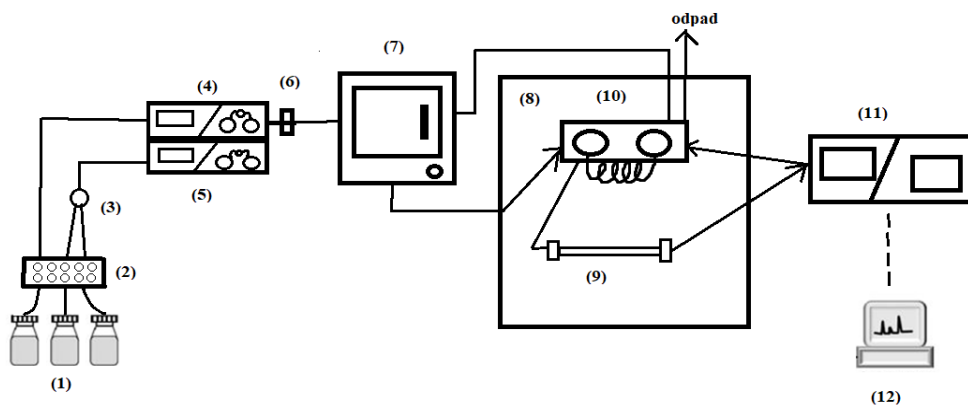
Na základě výsledků experimentů (viz kapitola 4 Výsledky a diskuze) byl přidán autosampler vybavený chlazením vzorku na 4 °C. Další změnou byl způsob mísení mobilní fáze. Původně byly v systému pouze dva zásobníky na mobilní fázi, tedy jeden zásobník s TEAA a druhý se 100% acetonitrilem. Protože se v aplikaci používají velmi malá procenta acetonitrilu (7-12 %), byl průtok na druhém čerpadle s acetonitrilem často pod 0,1 ml/min, což způsobovalo chybovost v měřeních. Protože jsou zároveň v aplikaci nezbytné oplachy 100% acetonitrilem k vymytí aminů, zbytků iontově párového činidla, byl tento problém vyřešen přidáním prepínacího ventilu pro třetí zásobník. Výsledkem byla možnost dvou zásobníků s acetonitrilem v nízké koncentraci pro přesné míchání mobilní fáze při analýze a jedním s čistým acetonitrilem pro oplach. Modifikovaná verze optimalizovaného systému je zobrazena na Obr. 5. Původně byl v systému zapojen DAD detektor, na kterém bylo možné dělat analýzy v celém spektru vlnových délek, tudíž identifikovat na základě absorpčního maxima systémové píky od píků analytů. Později byl tento detektor nahrazen standardním UV1 detektorem s volitelnou vlnovou délkou.



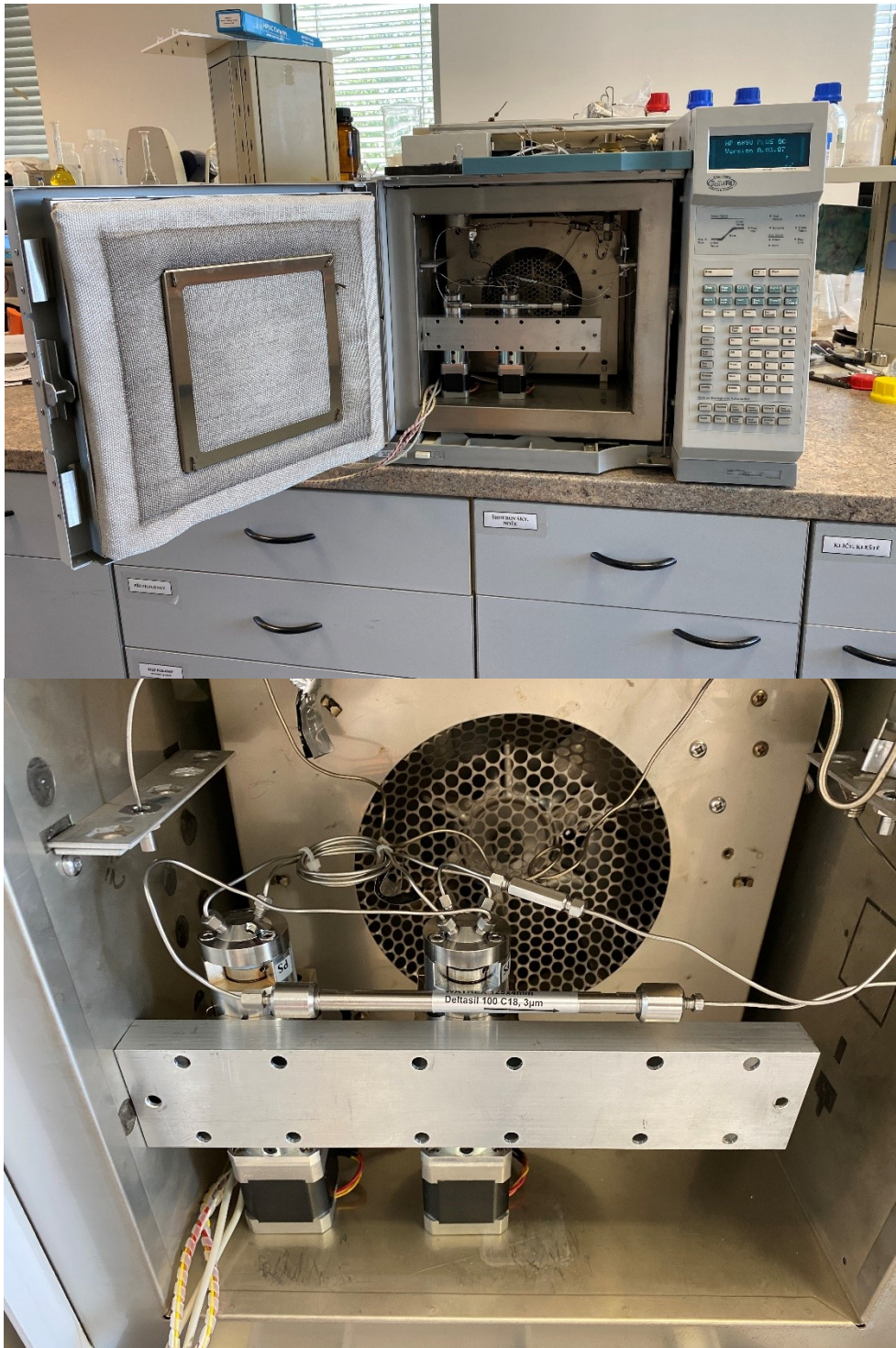
Obr. 5 Schéma modifikované verze systému s přidáním přepínacím ventilem pro selekci zásobníků s různými koncentracemi ACN a chlazeným autosamplerm. (1) Zásobníky mobilní fáze. (2) Degasser. (3) Přepínací ventil pro selekci zásobníků mobilní fáze. (4), (5) Čerpadla mobilní fáze. (6) Směšovač mobilní fáze. (7) Chlazený autosampler. (8) Termostat. (9) Kolona. (10) UV Detektor. (11) Datastanice.

Jistý problém nastal v druhé části práce, která byla zaměřena na využití recyklační HPLC. Při zapojování recyklačního modulu Repetto bylo nutné vyřešit problém s teplotní kontrolou nejen samotné kolony, ale i přepínacích ventilů a spojů, uvnitř kterých se analyty významnou dobu během separace s recyklací nacházejí.

Před zapojením recyklačního modulu byl standardní termostat nahrazen prostornou kolonovou skříní plynového chromatografu. Kolona i celý recyklační modul tak byly spolehlivě temperovány na teplotu přesně zajišťovanou plynovým chromatografem. Konečná podoba systému včetně recyklačního modulu je na Obr. 6 a na fotografii na Obr. 7.



Obr. 6 Schéma systému po zapojení recyklačního modulu Repetto. (1) Zásobníky mobilní fáze. (2) Degasser. (3) Přepínací ventil pro selekci zásobníků mobilní fáze. (4), (5) Čerpadla mobilní fáze. (6) Směšovač mobilní fáze. (7) Chlazený autosampler. (8) Plynový chromatograf. (9) Kolona. (10) Repetto. (11) UV Detektor. (12) Datastanice.



Obr. 7 Fotografie zapojení kolony v systému s recyklačním modulem Repetto. Modul se zapojenou kolonou byl umístěn uvnitř prostorné kolonové skříně plynového chromatografu k zajištění stabilního temperování kolony i všech součástí modulu.

4.2 Robustnost systému, kvalifikační test

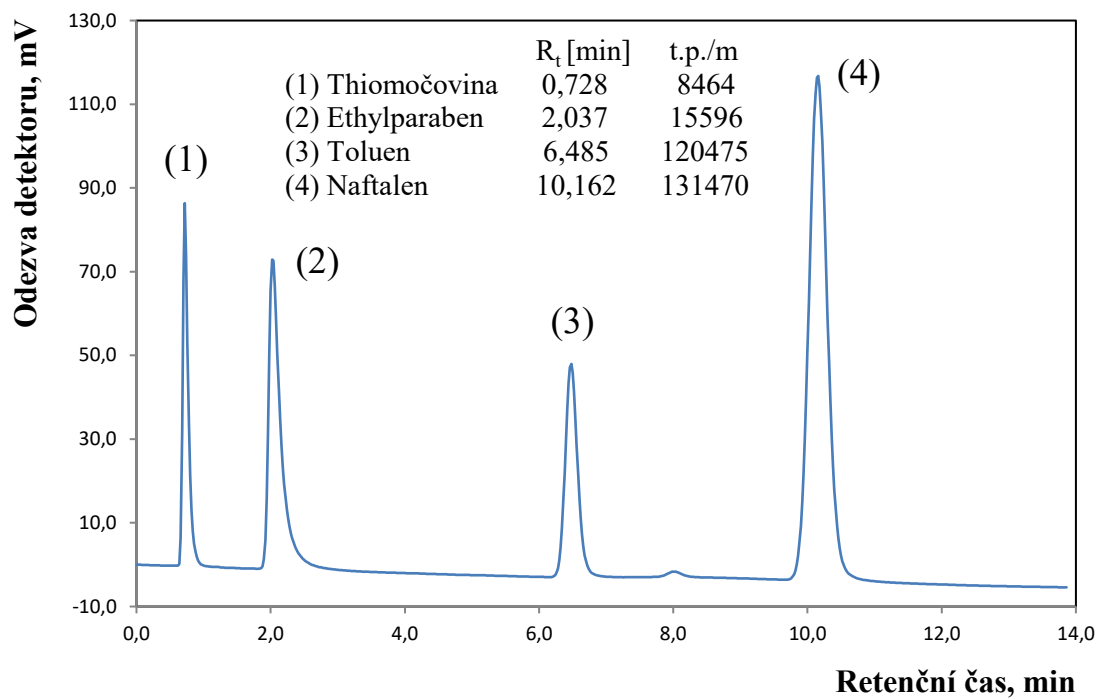
4.2.1 Kvalifikační test

Iontově párová chromatografie má ve srovnání s ostatními metodami vyšší požadavky na robustnost a je extrémně náročná na opakovatelnost. Zatímco jiné metody jsou dobře probádány a k dosažení robustnosti a opakovatelnosti existuje mnoho příruček a doporučení, u IP-HPLC tomu tak není. Náročnost této metody souvisí s komplikovaným systémem retence na základě dvou současných interakcí, a to interakce iontově párového činidla s analytem, a interakce vzniklého komplexu se stacionární fází.

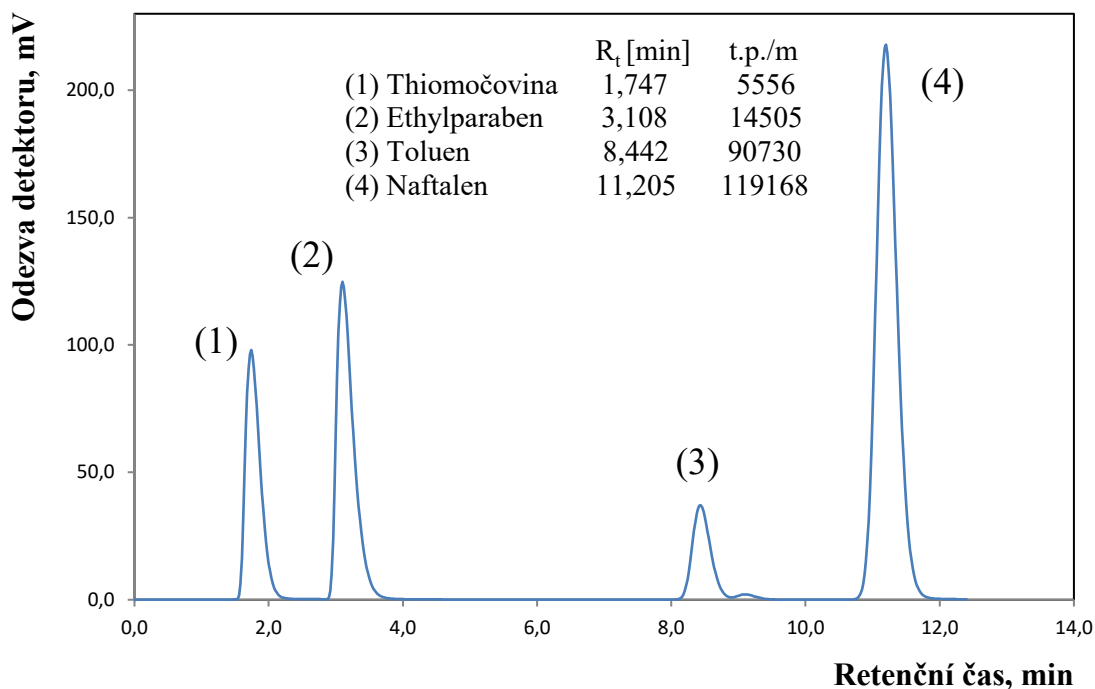
Jak bylo popsáno v kapitole 1.3.1, základním předpokladem dobře funkční metody vykazující vysoké rozlišení jsou dva parametry – reprodukovatelnost elučních časů a separační účinnost, charakterizovaná nízkým rozmytím píků.

Faktory, které mohou ovlivnit reprodukovatelnost retenčních časů, pocházejí buď z mobilní fáze (z jejího složení nebo rychlosti průtoku) nebo ze stacionární fáze (především kvalitou naplnění kolony, či následného stárnutí a degradace sorbentu).

Pro účely testování účinnosti systému byla nejprve využita standardní směs jednoduchých látek s různou polaritou skládající se z thiomčoviny, ethylparabenu, toluenu a naftalenu (TETN). Na chromatogramech na Obr. 8 a Obr. 9 jsou ukázkové separace této směsi standardů na koloně XTerra 50x4,6 mm (Waters Corporation, USA) a na koloně Deltasil 125x4 mm (Watrex Praha).



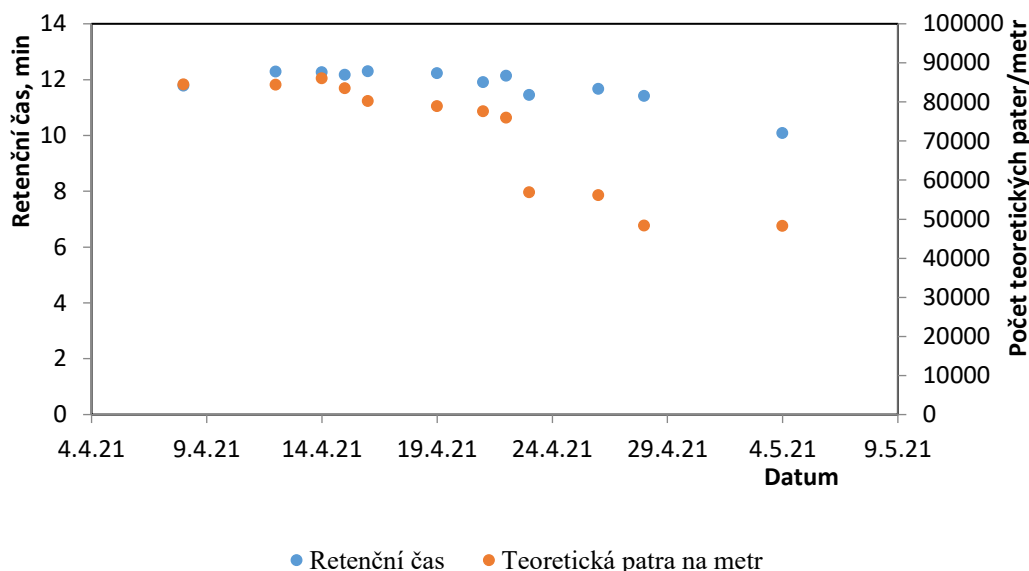
Obr. 8 Chromatogram směsi TETN na koloně XTerra 50x 4,6 mm. Experimentální podmínky: kolona Waters XTerra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 µm, mobilní fáze H₂O/ACN (60:40, v/v), 1 ml/min, teplota separace laboratorní, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 254 nm.



Obr. 9 Chromatogram směsi TETN na koloně DeltaSil 125x4 mm. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze H₂O/ACN (50:50, v/v), 0,8 ml/min, teplota separace laboratorní, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 254 nm.

Je známo, že dlouhodobějším používáním TEAA dochází k postupné změně hydrofobních vlastností reverzní fáze. U klasických kolon pro reverzní fázi tvořených C18-modifikovaným silikagelem navíc též při pH nad 7 dochází k postupné degradaci. Pro udržení dlouhodobě spolehlivých výsledků je tak při IP-HPLC nutno průběžně stav kolony ověřovat pomocí pravidelných kvalifikačních testů.

V této práci tak byly vždy ráno prováděny kontrolní nástřiky 2 µl výše popsaného standardu TETN a kontrolovány retenční časy a také účinnost kolony (počet teoretických pater na metr). Na Obr. 10 je ilustrace postupné degradace kolony v průběhu měsíčních experimentů.



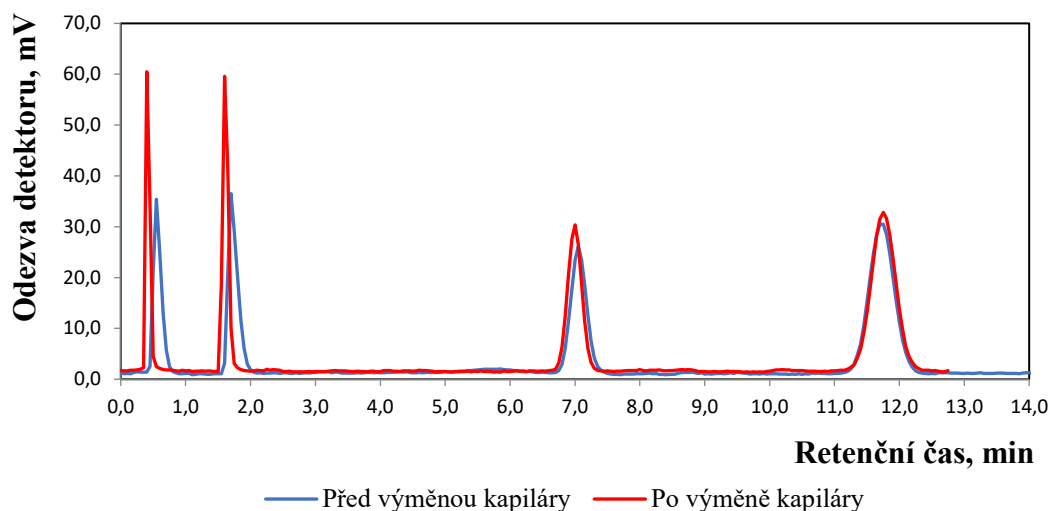
Obr. 10 Efekt degradace kolony v průběhu optimalizace. Graf závislosti retenčního času a počtu teoretických pater kolony na metr na datu kontrolních měření pro poslední pík směsi standardů TETN, naftalen. Na obou závislostech je patrná postupná degradace kolony v průběhu měsíce.

4.2.2 Faktory účinnosti kolony (rozmytí píků)

Zdroje rozmytí píků mohou být kolonové nebo extrakolonové. Zatímco příspěvek extrakolonových faktorů, například v důsledku míchání v mrtvém objemu na spojích kapilár či uvnitř detektoru, je konstantní, příspěvek kolonových faktorů k rozmytí píků, vlivem například nerovnoměrného toku uvnitř kolony nebo pomalé kinetiky interakce analytu se sorbentem, je úměrný rychlosti průtoku mobilní fáze. Závislost rozmytí píků na průtoku, takzvanou Van Deemterovu křivku, lze tak využít pro odlišení zdroje rozmytí. V kapitole 4.3.1 byly závislosti rozmytí na průtoku využity pro optimalizaci nastavení teploty vzhledem k rozmytí.

V průběhu experimentů, které často vyžadovaly změny na systému, byla kvalifikační směs standardů TETN vždy použita pro ověření funkčnosti systému, kolony, teplotní kontroly a podobně. Jako příklad využití této kontroly může být uveden profil separace TETN před a po výměně kapiláry, kdy bylo odhaleno, že nově nainstalovaná nerezová kapilára způsobovala výrazné rozmytí v důsledku nadbytečného mrtvého objemu. Jak je vidět na Obr. 11, nižší účinnost pro první dvě komponenty směsi byla následně vylepšena po korekci výměnou přívodní kapiláry s menším

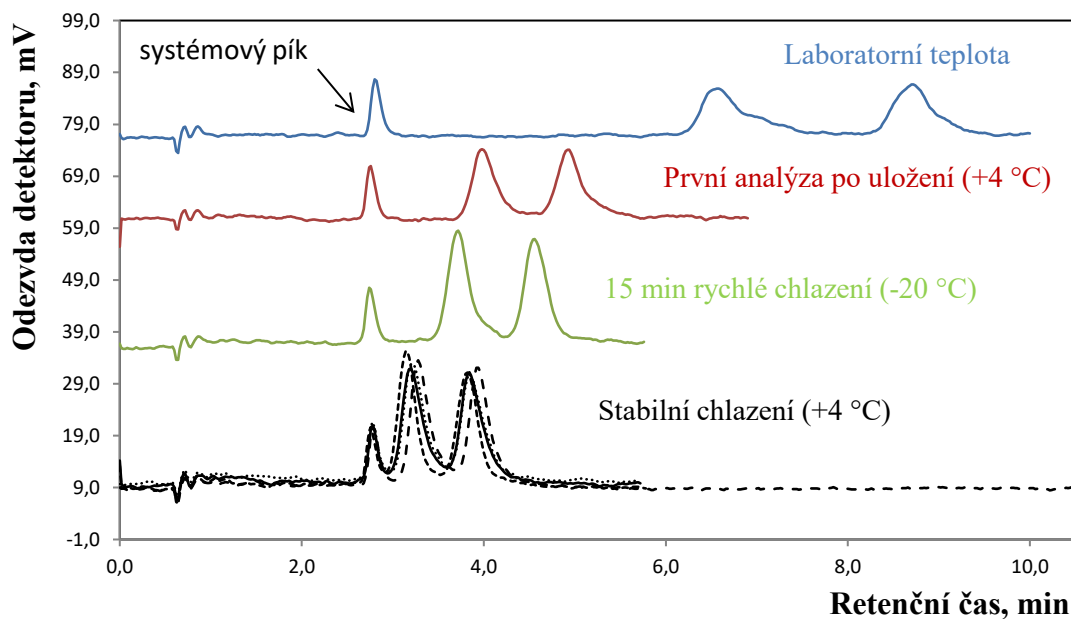
průměrem. U třetího a čtvrtého píku jsou již dominantní kolonové efekty, proto se na nich tento jev neprojevil.



Obr. 11 Efekt příspěvku kapiláry k parametrům píků. Srovnání chromatogramů směsi standardů TETN (thiomočovina, ethylparaben, toluen, naftalen) před a po výměně nevhodné kapiláry ve spojení autosampleru a kolony. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze H₂O/ACN (60:40, v/v), 1 ml/min, teplota separace laboratorní, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 254 nm.

4.2.3 Vliv manipulace se vzorku před nástřikem

Úvodní pokusy s dělením oligonukleotidů se od počátku potýkaly s variabilitou v elučních časech a rozmytím píků. Přesný původ tohoto jevu není znám, ale experimentálně bylo zjištěno, že se tento efekt dá zmírnit zchlazením vzorku na teplotu kolem 4 °C, jak je vidět na Obr. 12. Dalším parametrem zmírňujícím tento efekt bylo zvýšené pH, ale z důvodu velmi urychlené degradace kolony nebyla tato podmínka do optimalizace zařazena. Pravděpodobně se jedná o efekt adsorpce oligonukleotidů na kovový povrch frity v koloně a pro úplné odstranění tohoto efektu by bylo nutné využít kolony s inaktivovaným povrchem dedikovaným podobným aplikacím [42].



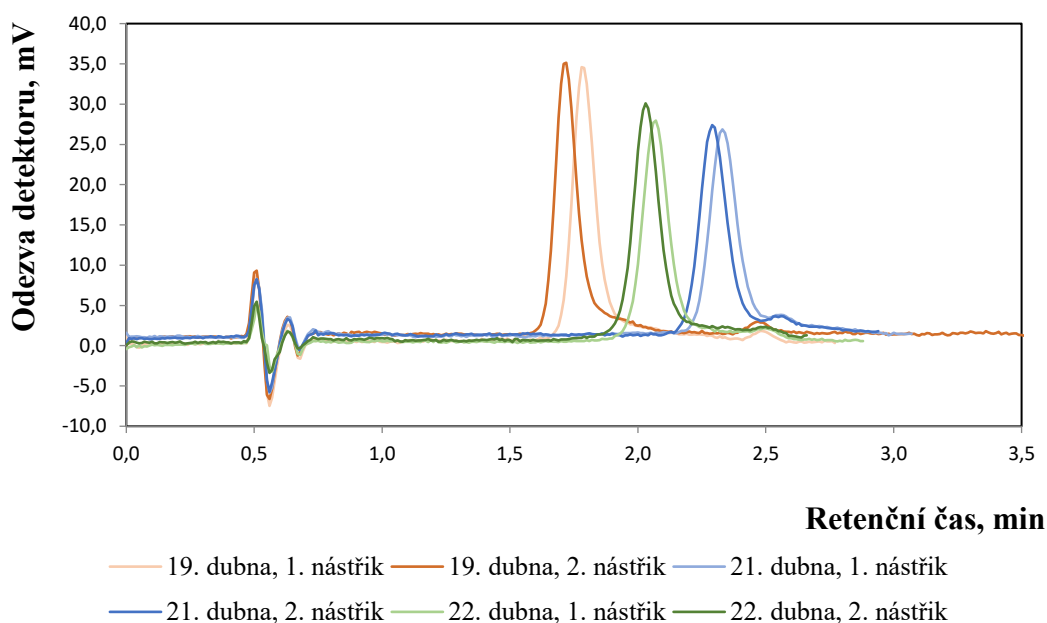
Obr. 12 Efekt chlazení vzorku na stabilitu retenčních časů a menší rozmytí píků. Srovnání chromatogramů 50x ředěné směsi řetězců oligonukleotidů 24-mer a 26-mer (~40 % GC). Modře vzorek při laboratorní teplotě. Červeně vzorek měřený ráno po vyjmutí z lednice. Zeleně vzorek 15 min rychle chlazený v -20 °C. Černě opakovaný nástřik stabilně zchlazeného vzorku kolem 4 °C. Na posledních zmíněných analýzách jsou patrné reprodukovatelné eluční časy a zmenšené rozmytí píků směsi dvou oligonukleotidů. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (60:40, v/v), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min) teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

4.2.4 Vliv přípravy mobilní fáze, reprodukovatelnost elučních časů

Tato aplikace se nakonec ukázala daleko komplikovanější, než se předpokládalo, a dosáhnout stability měření bylo, vzhledem ke komerčnímu využití a tím i nedostatku dostupných podstatných informací, po všech stránkách náročné. Jedním ze zásadních problémů byla degradace aminové mobilní fáze zkombinovaná s velmi malým rozsahem acetonitrilu v mobilní fázi. Díky této vlastnosti TEAA bylo nutné připravovat mobilní fázi každý den čerstvou, a díky citlivosti metody na množství acetonitrilu byly výsledky měření v rámci různých dnů nereprodukovatelné. Tento problém byl vyřešen gravimetrickou přípravou mobilní fáze. Zhoršená reprodukovatelnost výsledků dále souvisí s interakcí TEAA se stacionární fází, která způsobuje drifts a také se projevuje

v chromatogramech v podobě systémového píku s absorpčním maximem při 230 nm. Na Obr. 13 je chromatogram kontrolních měření 50x ředěného standardu 24-mer oligonukleotidu (~60 % GC) v rámci tří dnů. Měření provedená v jeden den vykazují dobrou reprodukovatelnost (cca 3 % RSD), měření provedená v různých dnech mají reprodukovatelnost mírně zhoršenou (cca 7 % RSD).

Zatímco směs kvalifikačních standardů TETN sloužila ke kontrole systému a teploty, tak ke kontrole iontově párového systému byl vybrán jeden ze standardů oligonukleotidů při zvolených podmínkách, konkrétně 24-mer (~60 % GC) v isokratickém módu s 0,1 mol/dm³ TEAA o pH 7, 9 % acetonitrilu, 60 °C a průtokem mobilní fáze 1 ml/min. Tento standard byl proměřován několikrát za den.



Obr. 13 Reprodukovatelnost elučních časů v závislosti na přípravě mobilní fáze. Srovnání chromatogramů 50x ředěného standardu oligonukleotidu o délce 24-mer (~60 % GC) získaných opakovaným měřením standardu za stejných podmínek v rámci tří dnů. Každý jednotlivý den byla připravena čerstvá mobilní fáze. Na chromatogramech je patrné, že v rámci jednoho dne jsou nástřiky opakovatelné a chyba měření je menší v porovnání s nástřikem v jiný den. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (60:40, v/v), 1 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min) teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

4.3 Optimalizace parametrů metody pro isokratickou eluci

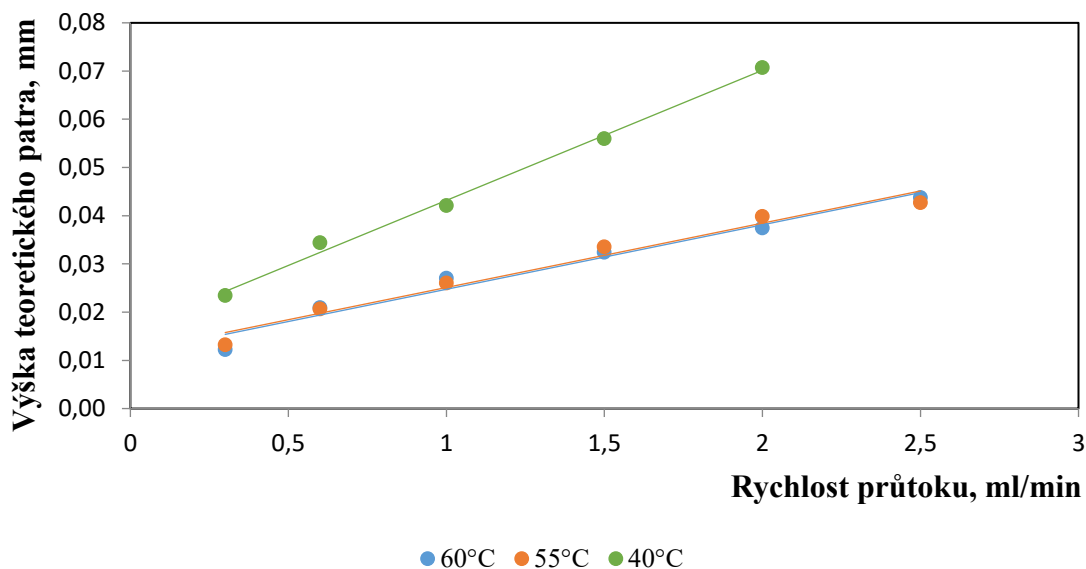
Při využití IP-HPLC pro purifikaci syntetických oligonukleotidů se většinou využívá gradientové eluce. Využití gradientové eluce však při zapojení recyklačního modulu není možné, neboť analyty jsou zpět na začátek kolony nanášeny v segmentech s konstantním složením mobilní fáze. Proto byla hlavní náplní této práce optimalizace podmínek metody pro isokratickou eluci umožňující recyklaci. Parametry píků jsou ovlivňovány zejména koncentrací iontově-párového činidla v mobilní fázi, teplotou separace, průtokem mobilní fáze a podílem organické složky v mobilní fázi, acetonitrilem. V této kapitole bude popsáno, které podmínky byly pro isokratickou eluci zvoleny. Současně je demonstrována separace pro různé délky kolon.

4.3.1 Optimalizace průtoku mobilní fáze

Optimalizace průtoku mobilní fáze byla provedena s využitím Van Deemterových křivek, což jsou závislosti výšky teoretického patra kolony na průtoku mobilní fáze. Na rozdíl od jiných grafů posuzujících účinnost separace v této diplomové práci je u Van Deemterových křivek žádoucí co nejnižší hodnota na ose y, protože čím nižší je výška jednoho teoretického patra, tím vyšší je účinnost separace. Účelem optimalizace metody je mít analýzy co nejrychlejší, ale ne na úkor rozmytí píků. Z křivek na Obr. 14 byl vybrán na základě nejnižší výšky teoretického patra průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Menší průtok nemohl být vybrán, protože by při míchání mobilní fáze byl průtok na jednotlivých pumpách příliš nízký, a to by způsobilo velkou chybu v měřeních.

Van Deemterovy křivky jsou také dobrým indikátorem toho, zda jsou důvodem zhoršené kvality píků (jejich rozšiřováním nebo deformacemi) extrakolonové či kolonové příspěvky do separace, jak to bylo již využito v kapitole 4.2.2. Na Obr. 14 je patrné, že výsledné body se nacházejí v lineární části křivky, tudíž příspěvek extrakolonových jevů můžeme vyloučit. Kolonové příspěvky mohou být způsobeny buď špatně naplněnou či degradovanou kolonou nebo tzv. „mass-transfer“, v tomto případě interakcí stacionární fáze kolony, iontově párového činidla a samotného analytu. První zmíněný příspěvek byl vyloučen pravidelným měřením kvalifikačního standardu mimo iontově-párový mód. Tudíž je rozmývání píků pravděpodobně způsobeno interakcí molekul. Dále by rozmývání mohlo být způsobeno samotnou

velikostí molekul oligonukleotidů. Křivky byly změřeny pro 50x ředěný standard 24-mer (~60 % GC) při různých teplotách separace, aby se zjistilo, zda nemá tento parametr vliv na kolonové příspěvky. Pro teploty kolem 60 °C (což byla dle specifikací oligonukleotidů od výrobce jejich denaturační teplota), jsou hodnoty téměř shodné, zatímco teplota 40 °C se ukázala jako nevhodná.

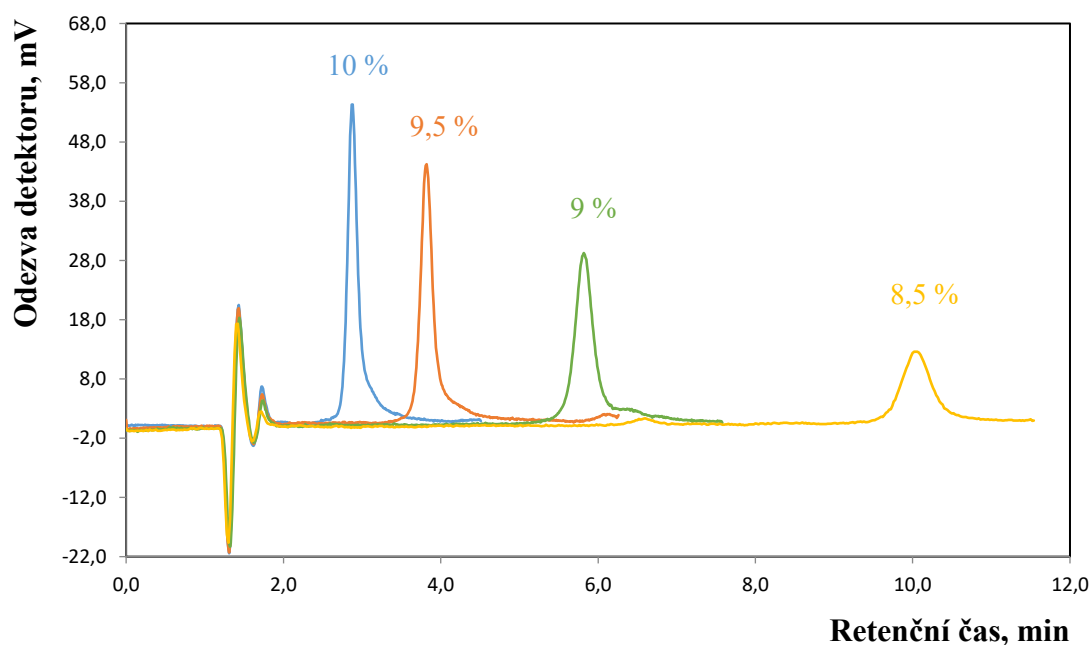


Obr. 14 Van Deemterova křivka pro různé teploty kolony. Graf závislosti výšky teoretického patra kolony na rychlosti průtoku mobilní fáze pro 50x ředěný standard 24 - mer (~60 % GC). Na základě této křivky byl zvolen průtok mobilní fáze 0,4 ml/min a bylo zjištěno, že vhodná teplota separace se bude pohybovat kolem 60 °C. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm

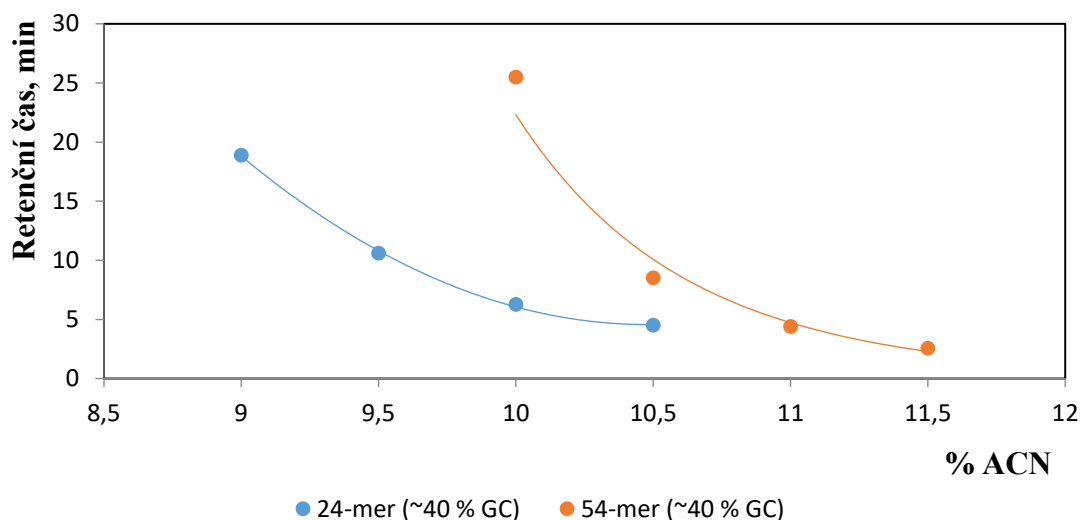
4.3.2 Optimalizace složení mobilní fáze podle délky a sekvence oligonukleotidů

Protože byly využívány úzké rozsahy koncentrací acetonitrilu, hrály roli v retenci analytu a účinnosti kolony i velmi malé rozdíly v zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Pro každou ze tří skupin standardů oligonukleotidů (krátké s ~60 % GC, krátké se ~40 % GC a dlouhé se ~40 % GC) byl zvolen jeden zástupce pro měření řad různých procent acetonitrilu, na jejichž základě pak bylo zvoleno ideální zastoupení acetonitrilu pro isokratickou eluci. Oligonukleotidy byly rozděleny do těchto skupin z toho důvodu, že se u těchto analytů na retenci podílí nejen elektrostatická interakce s iontově

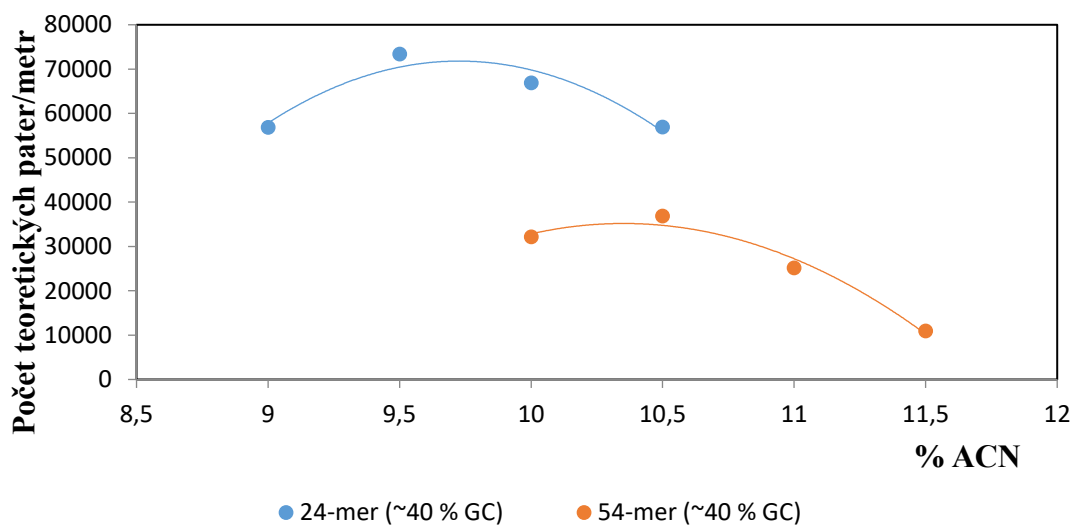
párovým činidlem, ale také hydrofobní interakce samotných bází se stacionární fází kolony. Právě guanin (G) a cytosin (C) jsou nejméně hydrofobními bázemi, a proto jsou oligonukleotidy s vysokým podílem těchto bází v řetězci na koloně méně zadržovány. Na Obr. 15 je zobrazen ukázkový chromatogram pro píky oligonukleotidu 24-mer s ~60 % GC. Na Obr. 16 a 17 jsou zobrazeny grafy závislosti retenčních časů a počtu teoretických pater kolony na metr na procentech zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi pro porovnání skupin oligonukleotidů podle délky řetězce s podobným obsahem GC v sekvenci, a na Obr. 18 a 19 jsou tytéž závislosti, ale pro porovnání dvou skupin stejně dlouhých oligonukleotidů lišících se obsahem GC v sekvenci.



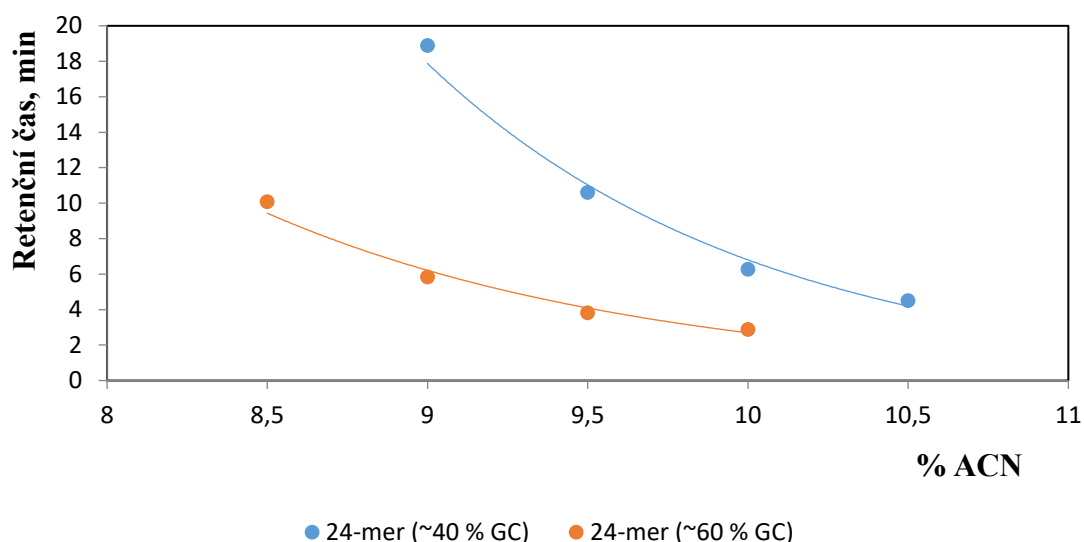
Obr. 15 Ukázkový chromatogram optimalizace složení mobilní fáze. Chromatogram optimalizace % acetonitrilu v mobilní fázi pro 50x ředěný 24 - mer (~60 % GC). Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



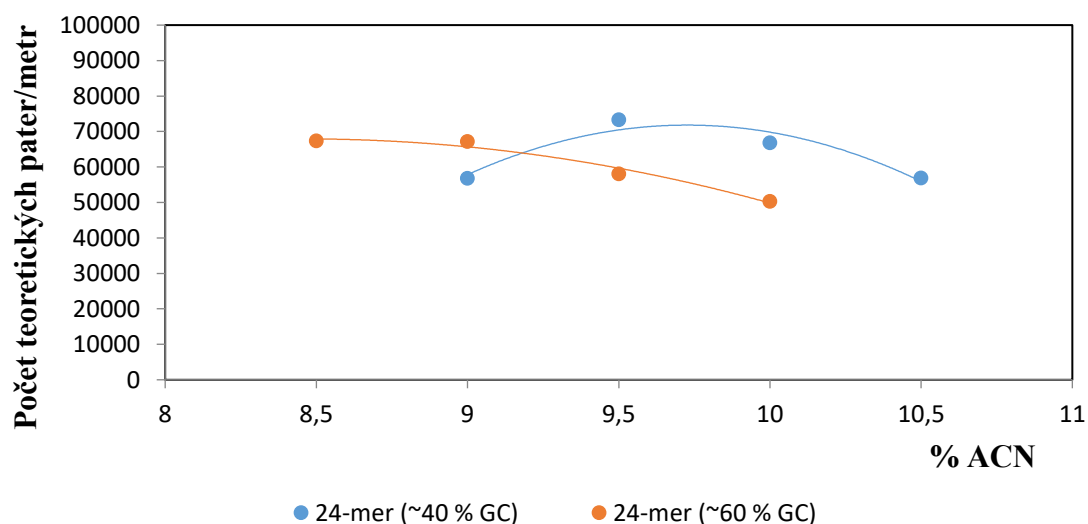
Obr. 16 Graf optimalizace složení mobilní fáze pro různé délky oligonukleotidů. Graf závislosti retenčního času na % ACN v MF pro 50x ředěný 24-mer (~40% GC) a 54-mer (~40% GC). Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



Obr.17 Graf optimalizace složení mobilní fáze pro různé délky oligonukleotidů Graf závislosti počtu teoretických pater kolony na metr na % ACN v MF pro 50x ředěný 24-mer (~40% GC) a 54-mer (~40% GC). Na základě grafu bylo vybráno zastoupení 9,5 % ACN pro 24-mer a 10,5 % pro 54-mer. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



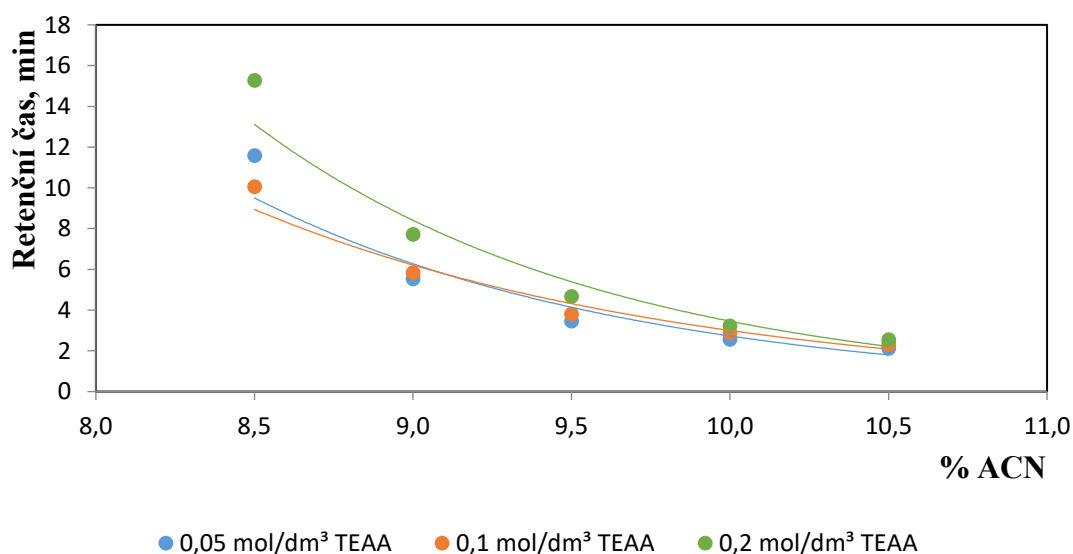
Obr. 18 Graf optimalizace složení mobilní fáze pro různé sekvence oligonukleotidů. Graf závislosti retenčního času na % ACN v MF pro 50x ředěný 24-mer (~40% GC) a 24-mer (~60% GC). Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



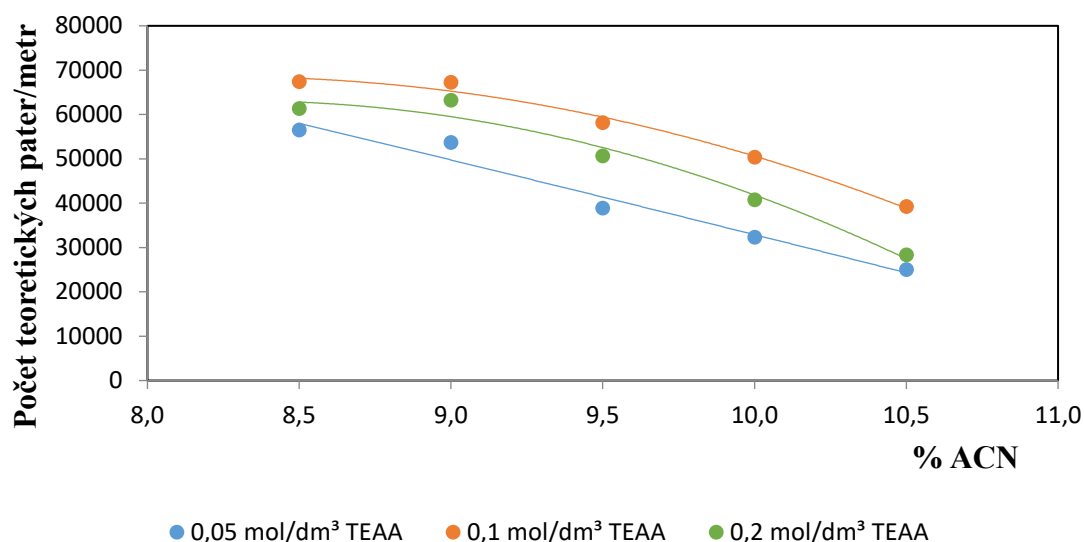
Obr. 19 Graf optimalizace složení mobilní fáze pro různé sekvence oligonukleotidů Graf závislosti počtu teoretických pater kolony na metr na % ACN v MF pro 50x ředěný 24-mer (~40% GC) a 24-mer (~60% GC). Na základě grafu bylo vybráno zastoupení 9,5 % ACN pro 24-mer (~40% GC) a 9 % pro 24-mer (~60% GC). Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.

4.3.3 Optimalizace koncentrace iontově párového činidla

Kladně nabité molekuly iontově párového činidla tvoří se záporně nabitými řetězci oligonukleotidů nepolární nenabitý iontový pár, který je poté zadržován na koloně s reverzní fází. Proto koncentrace iontově párového činidla přímo souvisí se zadržováním analytu na koloně. Je nutné nalézt takovou koncentraci iontově párového činidla, která bude vykazovat co nejkratší retenční čas analytů s co nejvyšší účinností separace. Na základě literární rešerše byly pro optimalizaci vybrány koncentrace TEAA 0,05 mol/dm³, 0,1 mol/dm³ a 0,2 mol/dm³ o pH 7 při teplotě kolony 60 °C. Byly vytvořeny grafy závislosti retenčních časů a teoretických pater kolony na metr na různých procentech acetonitrilu v mobilní fázi, tyto grafy jsou zobrazeny na Obr. 20 a 21. Z grafů je zřejmé, že hledaná koncentrace pro použité standardy oligonukleotidů byla 0,1 mol/dm³. Koncentrace 0,05 mol/dm³ vykazovala téměř shodné retenční časy s vybranou koncentrací, ale znatelně nižší účinnost. U koncentrace 0,2 mol/dm³ se projevil nárůst retenčních časů analytů.



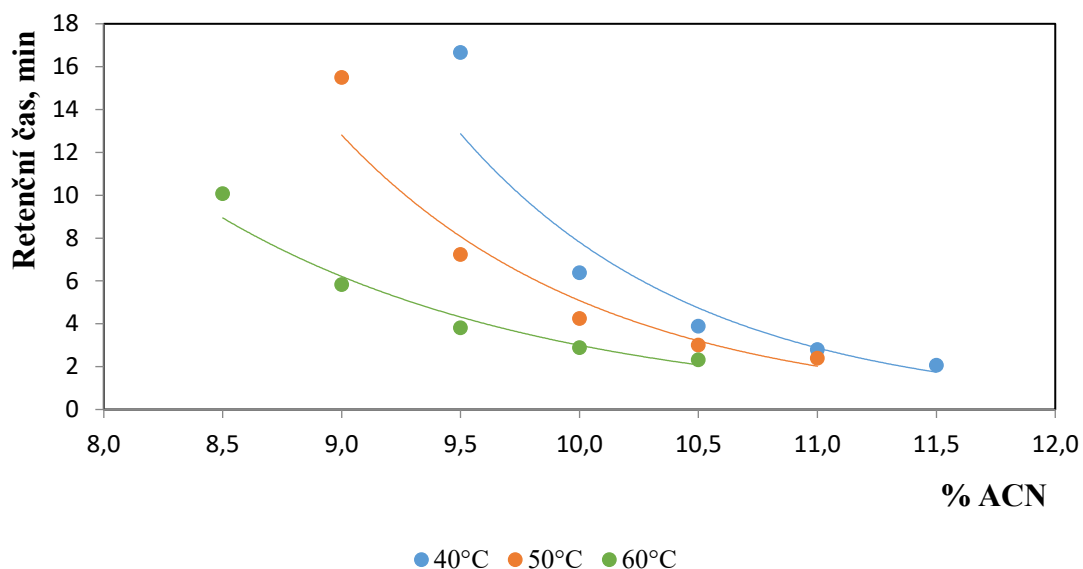
Obr. 20 Efekt koncentrace TEAA na retenční čas analytu. Graf závislosti retenčního času 50x ředěného standardu 24-mer (~60 % GC) na % ACN v mobilní fázi. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, oplach 3 min (1 ml/min), 0,4 ml/min, ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.



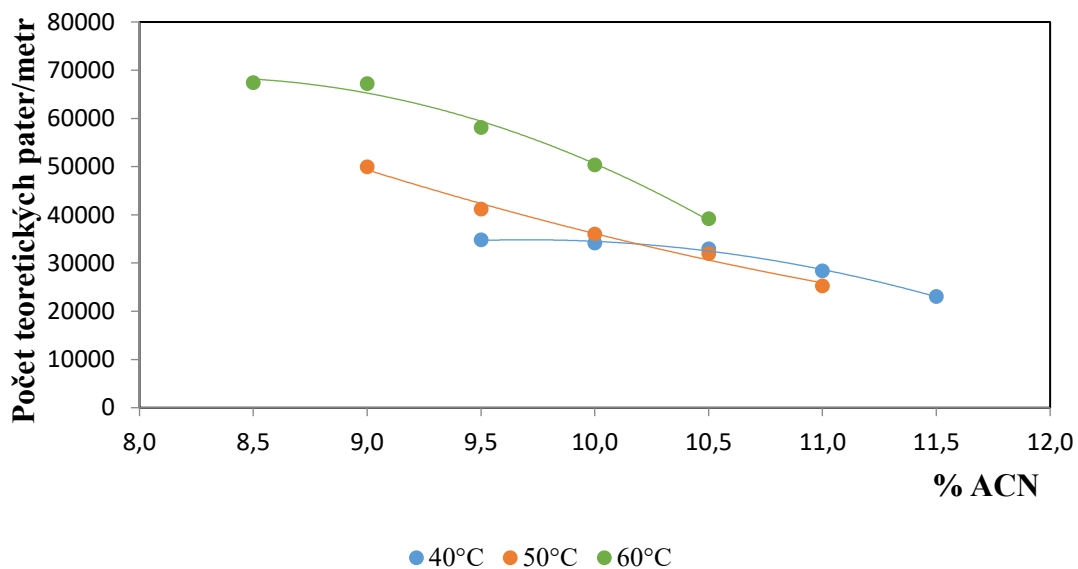
Obr. 21 Efekt koncentrace TEAA na účinnost separace. Graf závislosti počtu teoretických pater kolony na metr 50x ředěného standardu 24-mer (~60 % GC) na % ACN v mobilní fázi. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min) teplota separace 60 °C, nástřík vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

4.3.4 Optimalizace teploty separace

Oligonukleotidy jsou jednořetězcové velké biomolekuly, které v roztoku vytváří sekundární struktury, například tzv. „loops“ nebo nespecifické duplexy. Tyto struktury jsou pro analýzu nežádoucí, protože nereprodukovaně ovlivňují retenci. Proto je nutné zvýšit teplotu na koloně tak, aby se pohybovala kolem denaturační teploty daného řetězce. V grafech na Obr. 22 a 23 je patrné, že čím menší byla teplota oproti denaturační teplotě 24-mer (~60 % GC), pohybující se kolem 60 °C, tím byla retence delší, účinnost kolony menší a bylo třeba více procent acetonitrilu k eluci analytů. Pro analýzy byla tedy zvolena teplota 60 °C.



Obr. 22 Efekt teploty separace na retenční čas analytu. Graf závislosti retenčního času 50x ředěného standardu 24-mer (~60 % GC) na % ACN v mobilní fázi. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), nástřík vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



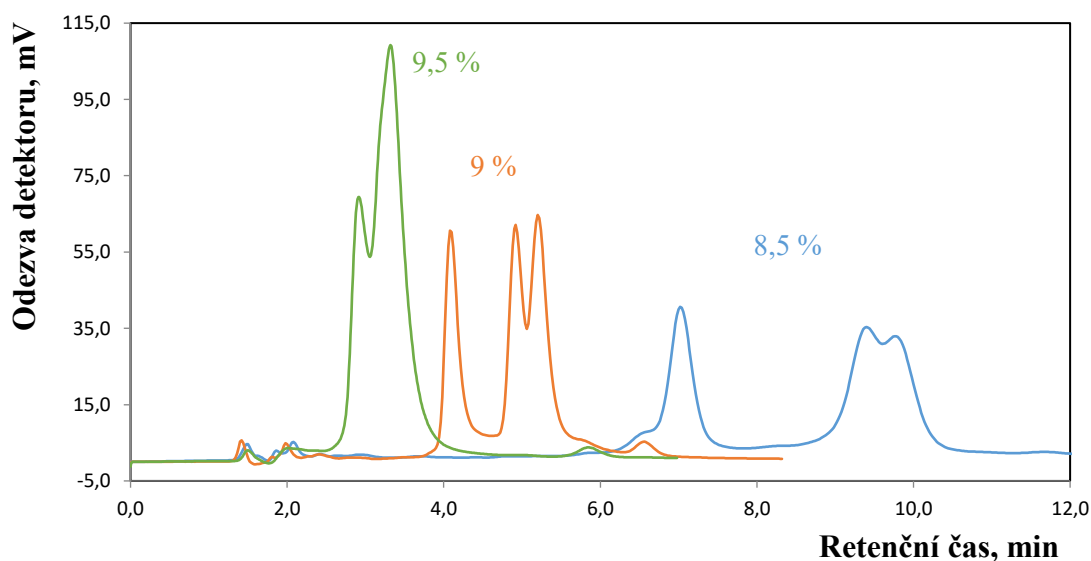
Obr. 23 Efekt teploty separace na její účinnost. Graf závislosti počtu teoretických pater kolony na metr 50x ředěného standardu 24-mer (~60 % GC) na % ACN v mobilní fázi. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), nástřík vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.

4.4 Separace směsí oligonukleotidů při vybraných podmínkách separace

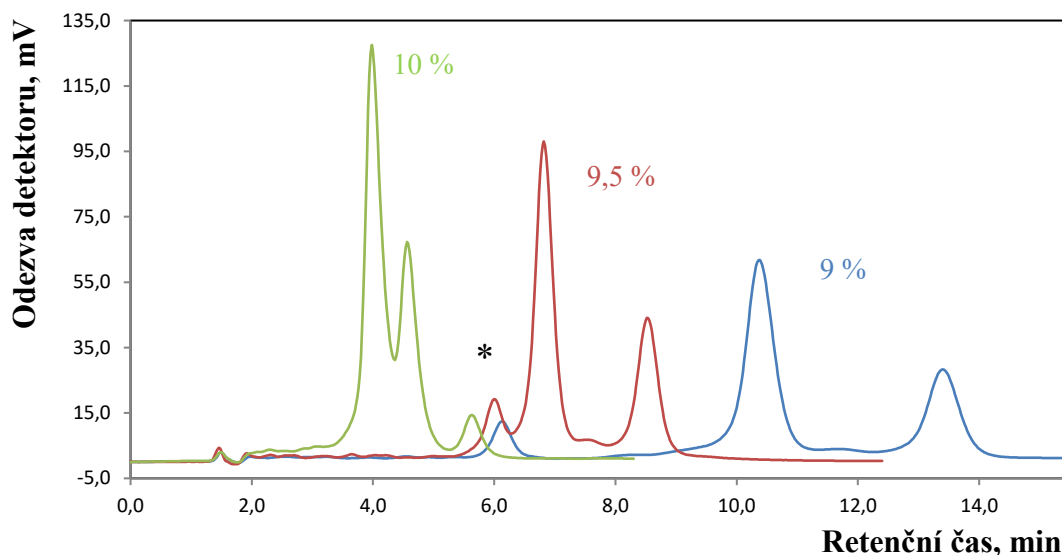
V této kapitole budou ukázány výsledné chromatogramy separace směsí krátkých oligonukleotidů s vysokým podílem GC v sekvenci (cca 60 %), krátkých oligonukleotidů s nízkým podílem GC (cca 40 %) a dlouhých oligonukleotidů s nízkým podílem GC.

4.4.1 Výsledky separace směsí na krátké koloně Watrex DeltaSil C18

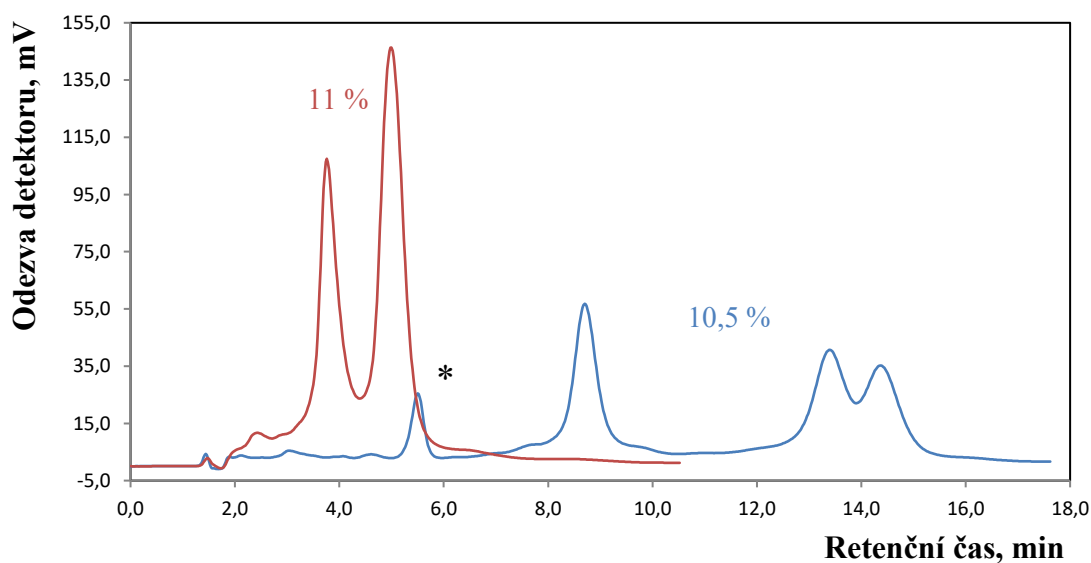
Pro separaci oligonukleotidů s isokratickou elucí byla zvolena mobilní fáze tvořená 0,1 mol/dm³ TEAA o pH 7 ve směsi s 5 % a 15 % acetonitrilu, která byla poté míchána na požadovaná procenta acetonitrilu pro jednotlivé separace směsí oligonukleotidů. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Teplota separace byla v termostatu nastavena na 60 °C a teplota vzorku v autosampleru na 4 °C. Na Obr. 24, 25 a 26 jsou výsledné chromatogramy těchto směsí.



Obr. 24 Analýzy směsí krátkých oligonukleotidů (~60 % GC) při 8,5 % ACN, 9 % ACN a 9,5 % ACN v mobilní fázi. 50x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min, ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



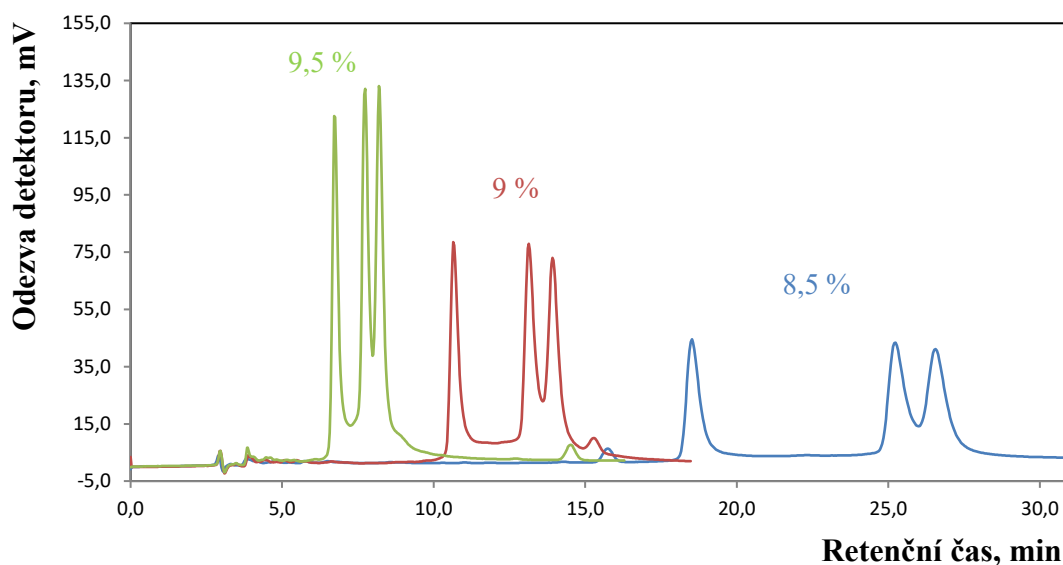
Obr. 25 Analýzy směsi krátkých oligonukleotidů (~40 % GC) při 9 % ACN, 9,5 % ACN a 10 % ACN. 50x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, 0,4 ml/min, oplach 3 min ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm. (* - systémový pík).



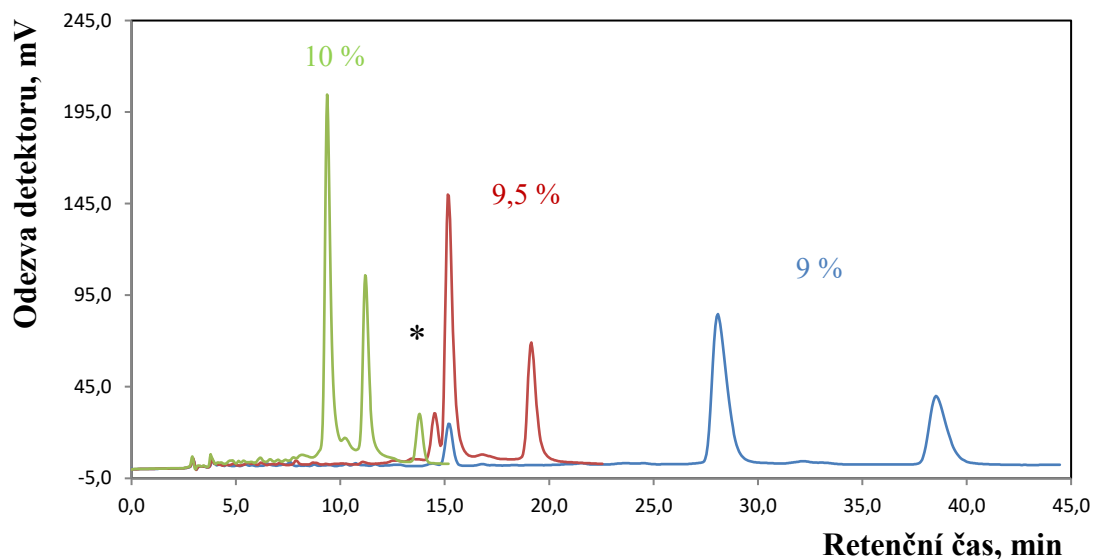
Obr. 26 Analýzy směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) při 10,5 % ACN a 11 % ACN. 50x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm. (* - systémový pík).

4.4.2 Výsledky separace směsí na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18

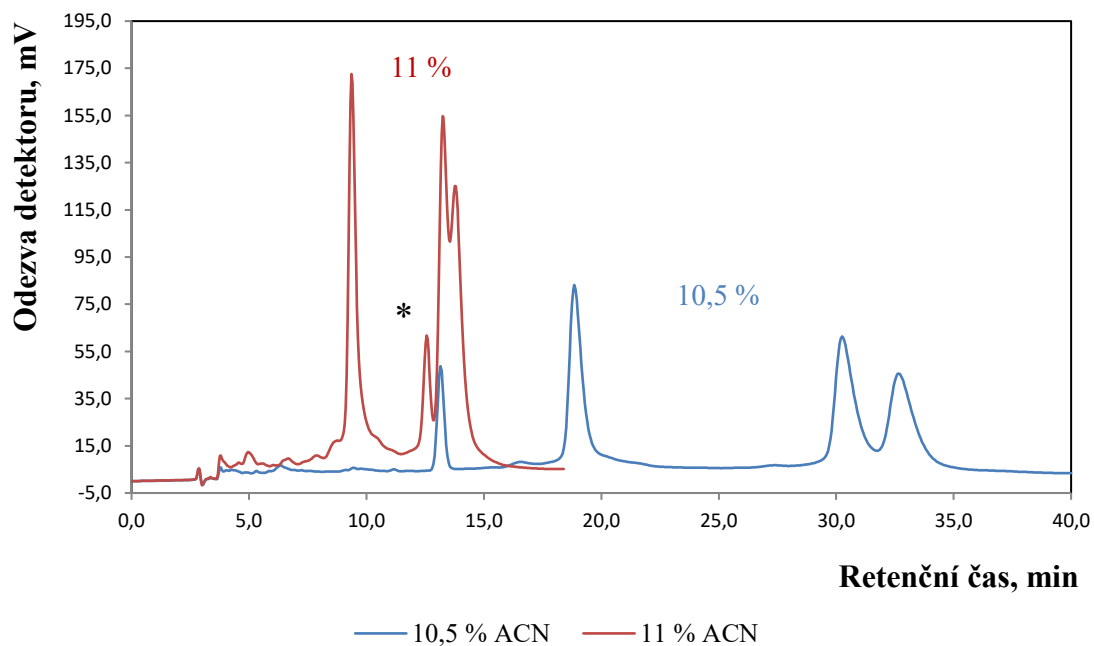
Předpokladem úspěšné aplikace recyklování je, že eluující analyty nedostihnou po znovu-nanesení analyty, které eluují pomaleji. Délka kolony tak musí být optimálně zvolena. V této kapitole bude ukázáno, jak vypadala separace směsí v optimalizovaných podmínkách z krátké kolony na dlouhé koloně. Na Obr. 27, 28 a 29 jsou zobrazeny směsi oligonukleotidů pro stejná vybraná zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, jako na krátké koloně. Je zde patrné prodloužení retenčních časů, ale také zlepšení rozlišení separace. K úplné separaci nerozdělených píků ale ani tak nedošlo.



Obr. 27 Analýza směsi krátkých oligonukleotidů (~60 % GC) při 8,5 % ACN, 9 % ACN a 9,5 % ACN v mobilní fázi na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. 25x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



Obr. 28 Analýza směsi krátkých oligonukleotidů (~40 % GC) při 9 % ACN, 9,5 % ACN a 10 % ACN v mobilní fázi na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. 25x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm. (* - systémový pík).



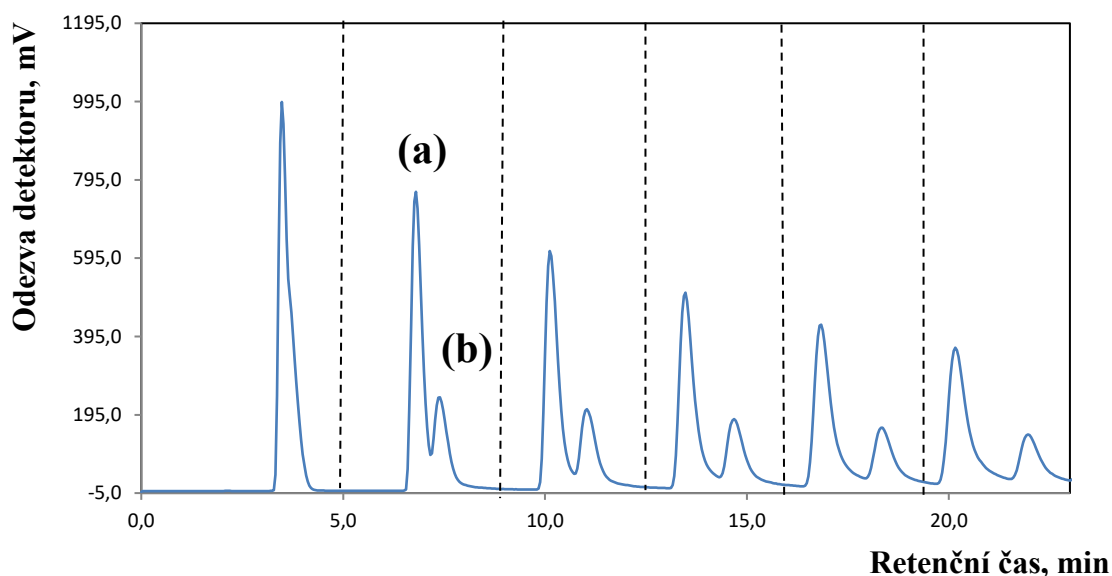
Obr. 29 Analýza směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) při 10,5 % ACN a 11 % ACN v mobilní fázi na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. 25x ředěné standardy. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm. (* - systémový pík).

4.5 Separace směsí oligonukleotidů s využitím recyklace

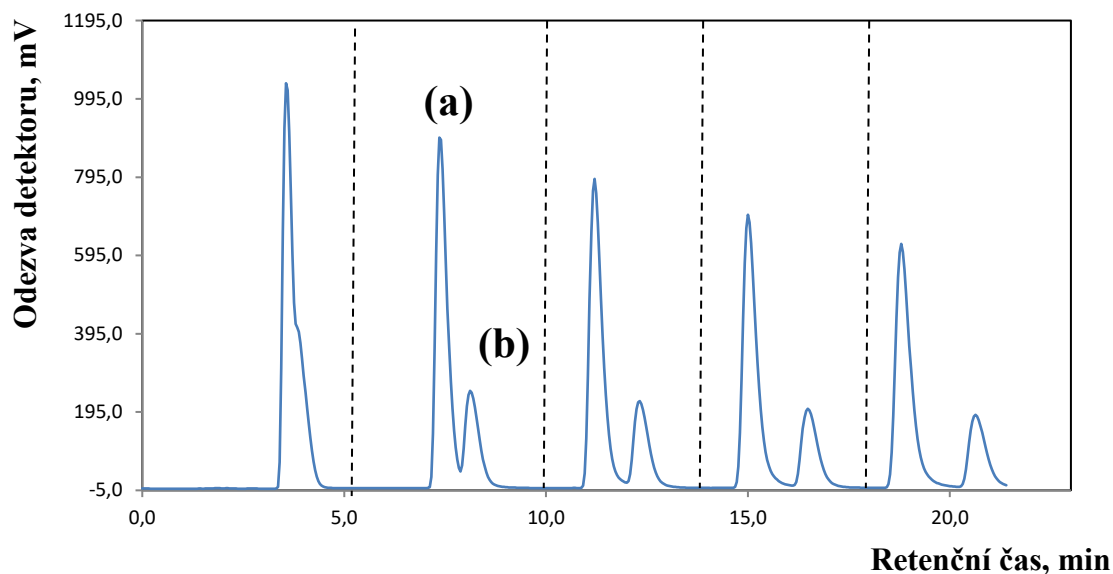
V této kapitole budou charakterizovány vlastnosti recyklačního modulu Repetto a bude ukázáno jeho využití v separacích oligonukleotidů.

4.5.1 Frekvence přepínání pozic ventilů

Důležitým parametrem nastavení recyklačního modulu Repetto je rychlost přepínání mezi pozicemi dvou ventilů. Tato frekvence určuje velikost segmentů vzorku při přepínání a má vliv na rozmývání píků. Při rychlosti přepínání každé 3 s na Obr. 30 je vidět větší rozmytí píků než při rychlosti přepínání každou sekundu, jak je vidět na Obr. 31.



Obr. 30 Efekt vlivu rychlosti přepínání pozic ventilů každé 3 s na rozmytí píků při recyklaci směsi acenaftenu a antracenu. (a) Acenaften. (b) Antracen. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze H₂O/ACN (15:85, v/v), 1 ml/min, laboratorní teplota, nástřik vzorku 6 µl, UV detekce při 254 nm.

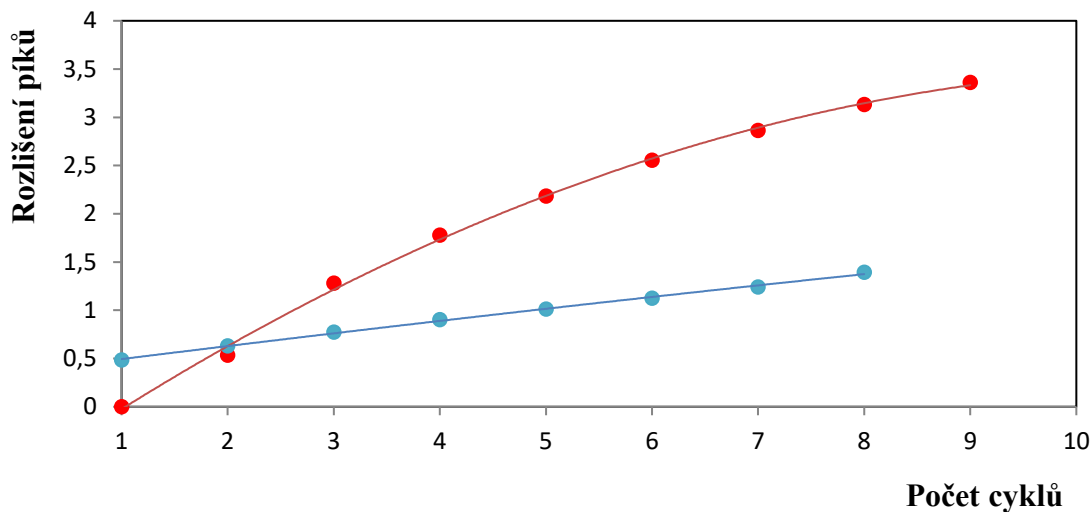


Obr. 31 Efekt vlivu rychlosti přepínání pozic ventilů jednou za sekundu na rozmytí píků při recyklaci směsi acenaftenu a antracenu. (a) Acenaften. (b) Antracenu. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze H₂O/ACN (15:85, v/v), 1 ml/min, laboratorní teplota, nástřík vzorku 6 µl, UV detekce při 254 nm.

4.5.2 Vliv recyklace na parametry separace

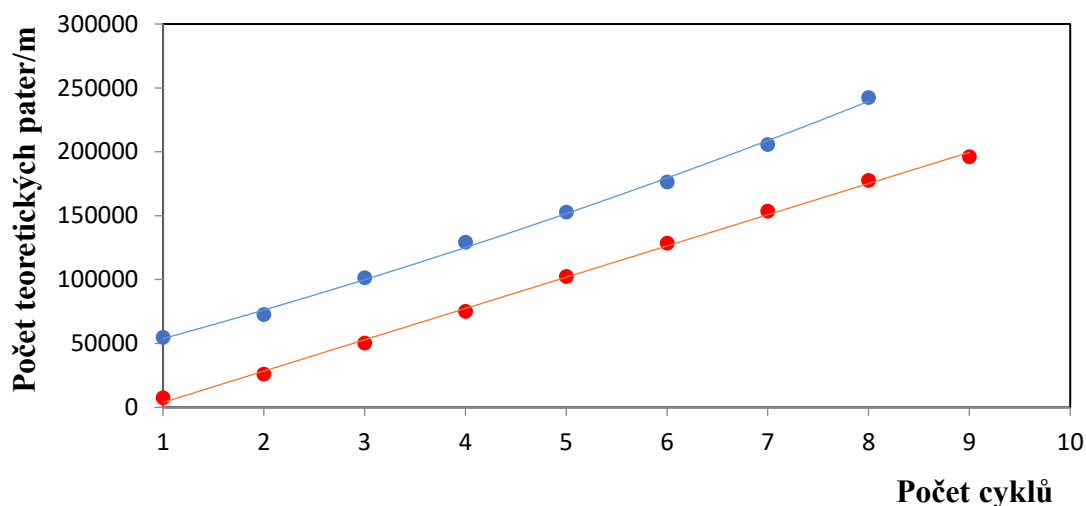
Hlavním účelem využití recyklační chromatografie je zlepšení rozlišení separace. To znamená možnost rozdělit analyty, které bez recyklace (i přes optimalizaci metody) zůstaly nerozdělené a také zvýšit účinnost separace.

Na Obr. 32 a 33 jsou znázorněny grafy závislosti parametrů separace (rozlišení a počtu pater kolony na metr) na počtu cyklů při recyklaci. Pro ověření funkčnosti recyklace byla změřena směs acenaftenu a antracenu, které mají velmi blízké eluční časy, ale separace probíhá pomocí reverzní HPLC bez iontové párového módu. Poté byly průběhy výše zmíněných závislostí porovnány s hodnotami z iontové párového systému separace oligonukleotidů. V obou systémech bylo patrné zlepšení rozlišení píků i účinnosti separaci.



● Acenaften, DeltaSil 125x4 mm ● Dlouhé oligonukletidy (~40 % GC), DeltaSil 50x4 mm

Obr. 32 Zlepšení rozlišení píků po recyklaci s využitím recyklačního principu Repetto. Graf závislosti rozlišení píků na počtu cyklů recyklace směsi acenaftenu a antracenu v porovnání se směsí dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC). Obě křivky vykazují téměř lineární závislost rostoucího rozlišení na zvyšujícím se počtu cyklů.

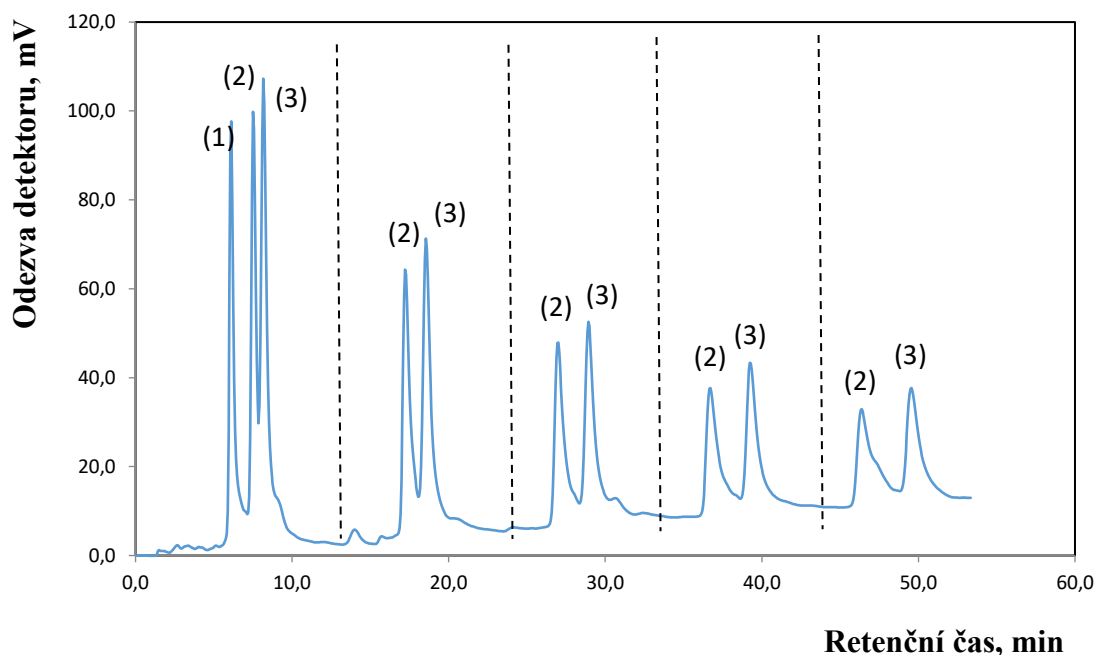


● Acenaften, DeltaSil 125x4 mm ● Dlouhé oligonukletidy (~40 % GC), DeltaSil 50x4 mm

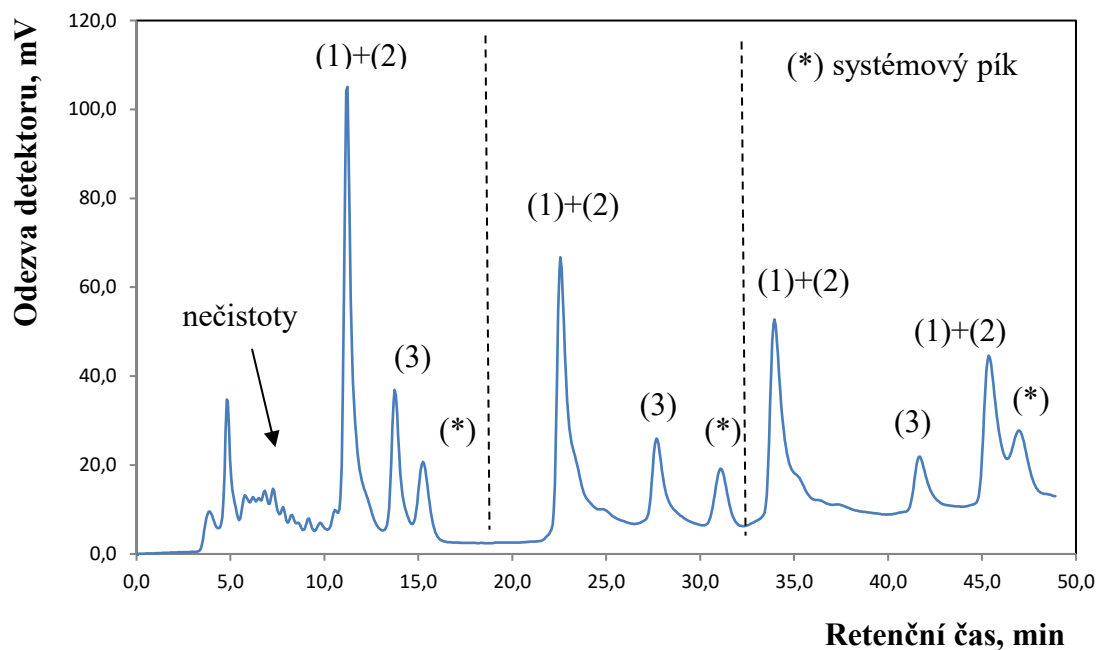
Obr. 33 Zlepšení účinnosti separace po recyklaci s využitím recyklačního principu Repetto. Graf závislosti počtu pater na metr kolony na počtu cyklů recyklace směsi acenaftenu a antracenu v porovnání se směsí dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC). Obě křivky vykazují téměř lineární závislost rostoucího počtu pater kolony na zvyšujícím se počtu cyklů.

4.5.3 Recyklace směsí oligonukleotidů na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18

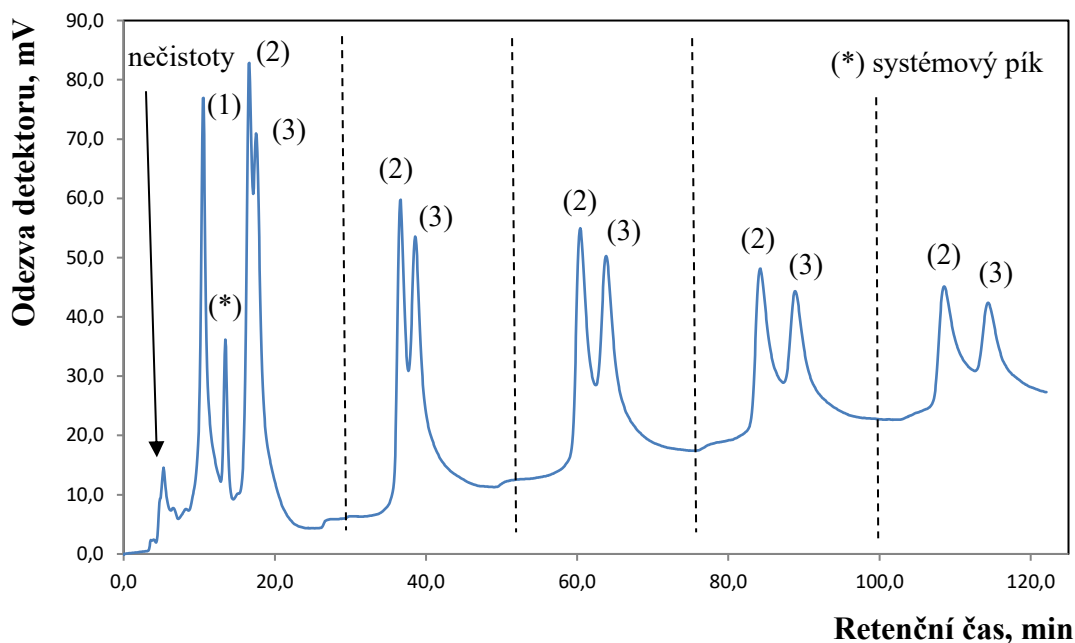
Jak již bylo uvedeno, pro recyklaci je vhodné využití delší kolony z toho důvodu, aby se píky nezačaly předbíhat. Na Obr. 34, 35 a 36 jsou znázorněny chromatogramy směsí krátkých oligonukleotidů s ~60 % GC, se ~ 40 % GC a dlouhých oligonukleotidů se ~ 40 % GC s opakovanou recyklací. Ve všech případech je zcela jasně znatelné postupné vylepšení separace, kdy analyty, které při jednom průchodu kolonou vykazují pouze částečné rozlišení, jsou po recyklaci zcela oddělené.



Obr. 34 Chromatogram směsí krátkých oligonukleotidů (~60 % GC) po recyklaci na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. Po několika cyklech recyklace je patrná lepší separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (55:45, v/v, 9,5 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.



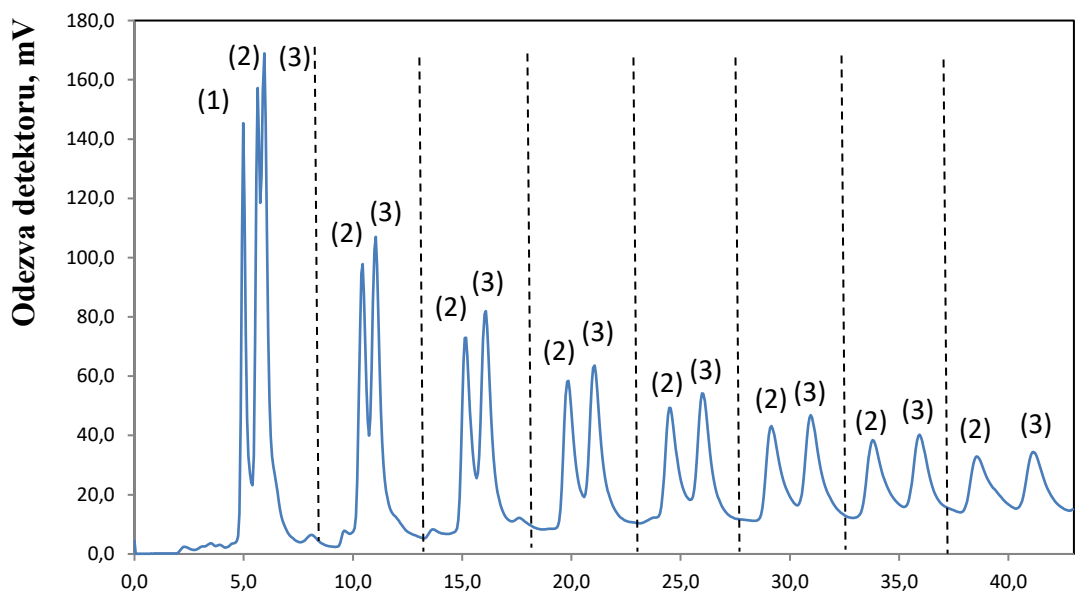
Obr. 35 Chromatogram směsi krátkých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. Recyklace prokázala možnost snadno odstranit nečistoty elující před píky analytů a tyto nečistoty již nejsou po recyklaci na chromatogramu přítomny. Pík (1)+(2), který byl zájmem recyklace a snahy o separaci jednotlivých oligonukleotidových řetězců, eluoval před odděleným píkem (3) a systémovým píkem, proto recyklaci tyto píky narušují. Řešením by byla parkovací smyčka, do které by bylo možné pík (1)+(2) zaparkovat a poté ho vpustit na kolonu až po eluci píku (3) a (*). Parkovací smyčka v tomto zapojení Repetta nebyla zahrnuta. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (50:50, v/v, 10 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.



Obr. 36 Chromatogram směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na dlouhé koloně Watrex DeltaSil C18. Recyklace prokázala možnost snadno odstranit nečistoty eluující před píky analytů a tyto nečistoty již nejsou po recyklaci na chromatogramu přítomny. Po recyklaci došlo ke zlepšení separace pík (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 125x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (40:60, v/v, 11 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 7 min (1,5 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřík vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.

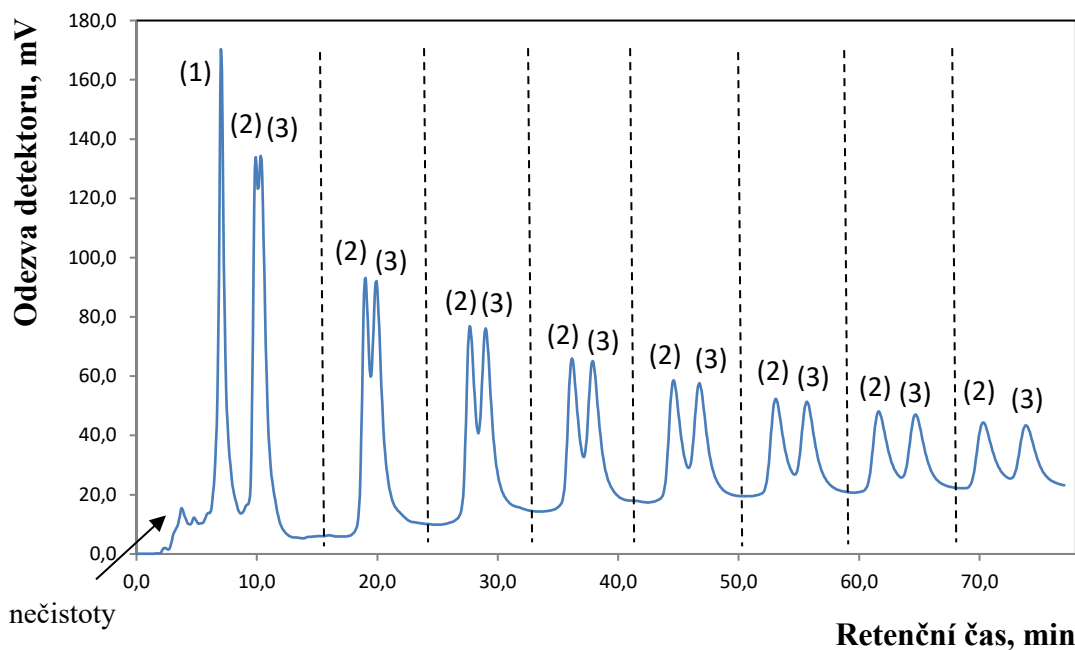
4.5.4 Recyklace směsi oligonukleotidů na krátké koloně Watrex DeltaSil C18

Ačkoliv výsledky na koloně 125x4 mm, byly velmi uspokojivé, recyklace směsí oligonukleotidů byly vyzkoušeny i na kratších kolonách společností Watrex a Waters, neboť právě tyto krátké (5 cm) kolony jsou při analýzách či přečištění syntetických oligonukleotidů standardně používány. Pozitivem krátkých kolon jsou přirozeně kratší retenční časy. Negativem, které se projevilo zejména na směsi krátkých oligonukleotidů (~40 % GC), bylo již avizované předbíhání pík. Na Obr. 37, 38 a 39 jsou zobrazeny chromatogramy směsí oligonukleotidů na koloně Watrex s označením DeltaSil C18 o rozměrech 50x4 mm s velikostí částic 3 µm.



Retenční čas, min

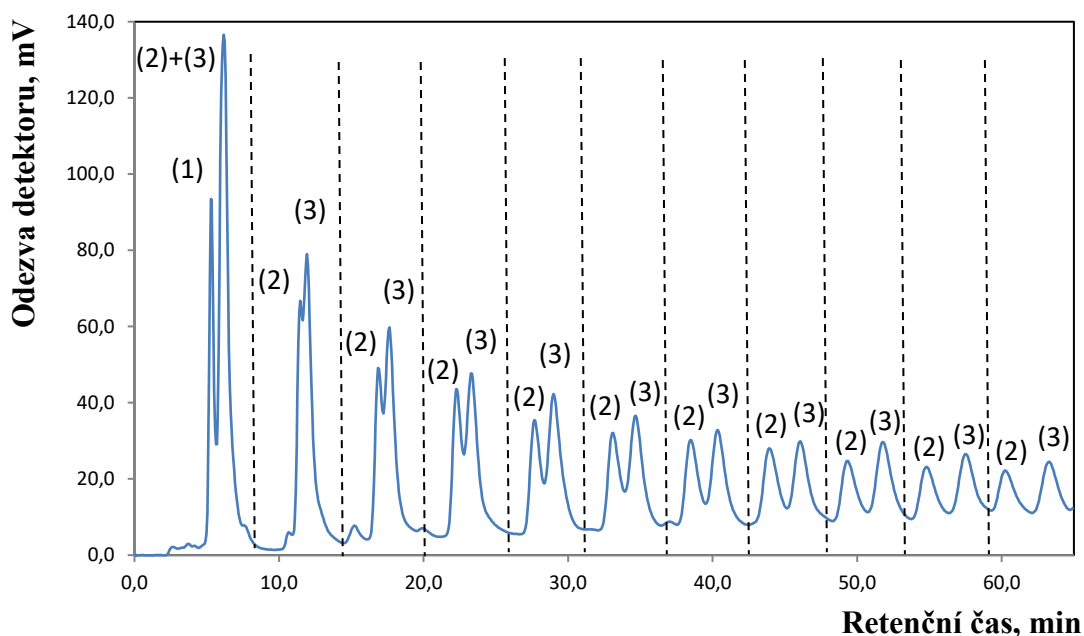
Obr. 37 Chromatogram směsi krátkých oligonukleotidů (~60 % GC) po recyklaci na krátké koloně Watrex DeltaSil C18. Po několika cyklech recyklace je patrná lepší separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 µm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (55:45, v/v, 9,5 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



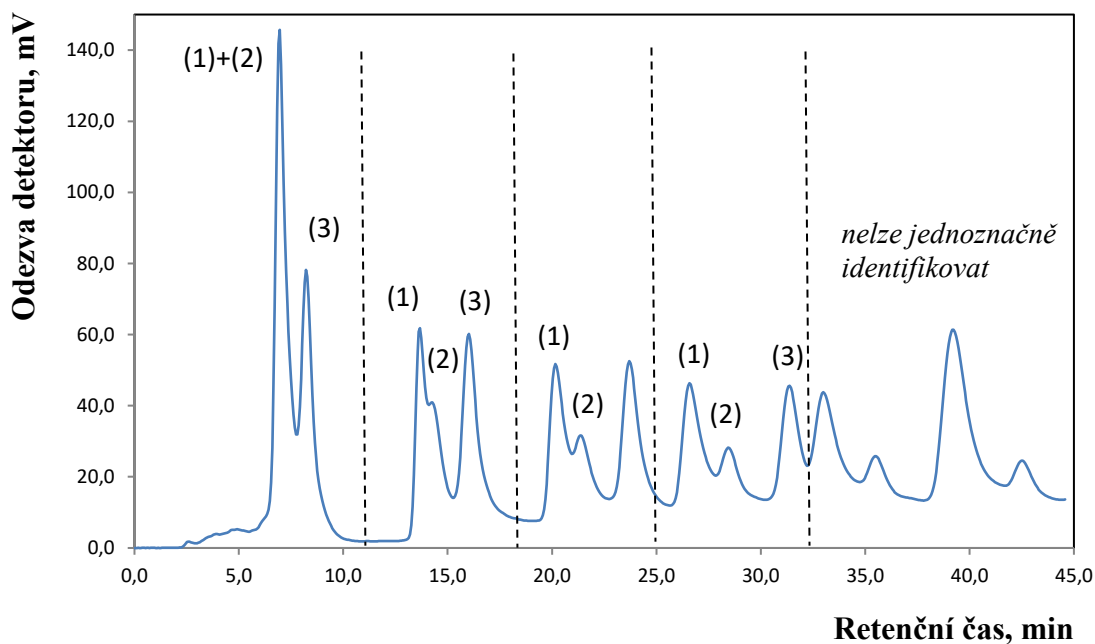
Obr. 39 Chromatogram směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na krátké koloně Watrex DeltaSil C18. Recyklace prokázala možnost snadno odstranit nečistoty eluující před píky analytů a tyto nečistoty již nejsou po recyklaci na chromatogramu přítomny. Po recyklaci došlo ke zlepšení separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Watrex DeltaSil C18, 50x4 mm, 100 Å, 3 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (40:60, v/v, 11 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřík vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

4.5.5 Recyklace směsí oligonukleotidů na krátké koloně Waters XTerra C18

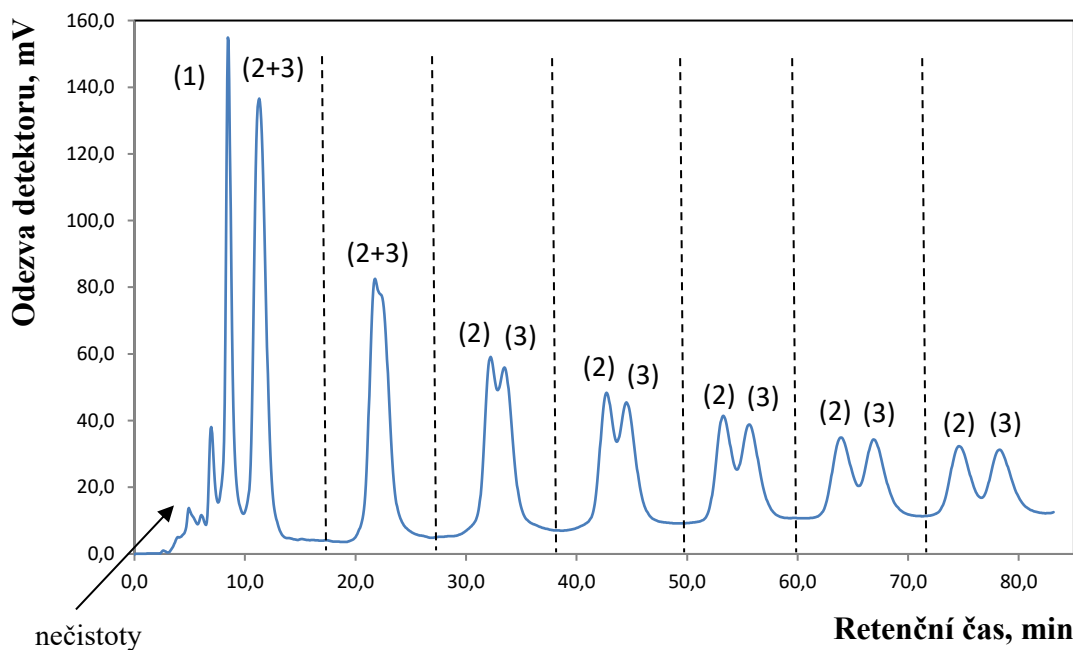
Recyklace směsí oligonukleotidů byly provedeny také na koloně od společnosti Waters s označením XTerra o rozměrech 50x4,6 mm s velikostí částic 2,5 μm . Dle výrobce měla tato kolona být pro separace oligonukleotidů díky vylepšené technologii aplikované stacionární fáze vhodnější. Separace na kolonách Watrex a Waters o podobných rozměrech se příliš nelišily, ale u směsi krátkých oligonukleotidů s ~40 % GC je patrný náznak separace u píku, který se při dřívějších experimentech nepodařilo rozdělit. Na Obr. 40, 41 a 42 jsou zobrazeny chromatogramy recyklace směsí oligonukleotidů na koloně XTerra.



Obr. 40 Chromatogram směsí krátkých oligonukleotidů (~60 % GC) po recyklaci na krátké koloně Waters XTerra C18. Po několika cyklech recyklace je patrná lepší separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Waters XTerra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 μm , mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (65:35, v/v, 8,5 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl , UV detekce při 260 nm.



Obr. 41 Chromatogram směsi krátkých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na krátké koloně Waters XTerra C18. U píků (1) a (2) došlo k separaci, není však známo, zda se oddělil pík analytu nebo systémový pík, který zasahuje do separace. Na recyklaci píků se projevuje příliš malá délka kolony, která po několika kolech recyklace znemožňuje identifikaci píků. Experimentální podmínky: kolona Waters XTerra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 µm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (60:40, v/v, 9 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 µl, UV detekce při 260 nm.



Obr. 42 Chromatogram směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na krátké koloně Waters XTerra C18. Recyklace prokázala možnost snadno odstranit nečistoty elující před píky analytů a tyto nečistoty již nejsou po recyklaci na chromatogramu přítomny. Po recyklaci došlo ke zlepšení separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontově párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN. Experimentální podmínky: kolona Waters XTerra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (50:50, v/v, 10 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

5 Závěr

V této diplomové práci byla za účelem pozdějšího využití recyklace nejprve úspěšně optimalizována metoda pro separaci oligonukleotidů pomocí iontově párové HPLC s isokratickou elucí. Robustnost metody byla po experimentálních testech zajištěna především gravimetrickou přípravou nové mobilní fáze na každý den a chlazením vzorku na 4 °C. Mobilní fázi tvořilo 5 objemových % acetonitrilu v 0,1 mol/dm³ triethylammonium acetátu o pH = 7 a 15 objemových % acetonitrilu v 0,1 mol/dm³ triethylammonium acetátu o pH = 7. Tyto dvě složky byly vysokotlakým gradientem míchány do požadovaného počtu objemových % acetonitrilu pro analýzu. Po každé analýze byl proveden oplach 100% acetonitrilem k odstranění nečistot z iontově párového činidla a poté byla kolona ekvilibrována minimálně 10 ml mobilní fáze obsahující iontově párové činidlo a acetonitril v poměru požadovaném na další analýzu. Teplota kolony byla nastavena na 60 °C, což zajišťovalo denaturační teplotu pro řetězce oligonukleotidů a bylo tím zabráněno vzniku nežádoucích sekundárních struktur ovlivňujících retenci. Průtok mobilní fáze byl na základě Van Deemterových křivek zvolen 0,4 ml/min.

Takto optimalizované podmínky poskytovaly reprodukovatelné výsledky a nerozmyté píky směsí oligonukleotidů.

Ve druhé fázi byla optimální metoda použita s recyklačním modulem Repetto a byl demonstrován přínos recyklačního přístupu pro zlepšení rozlišení. Směsi byly recyklovány na dlouhé koloně o délce 125 mm a poté na dvou kratších kolonách o délkách 50 mm. Recyklace na delší koloně vedla úspěšně ke zlepšení rozlišení píků a k odstranění nečistot a systémových píků. U směsi krátkých oligonukleotidů s nízkým obsahem guaninu a cytosinu z důvodu eluce cílového píku před systémovým píkem a píkem plně odděleného oligonukleotidu nebyla recyklace v některých případech zcela efektivní, protože nebylo možné provést dostatečný počet cyklů, aniž by se píky začaly předbíhat. Řešením problému s předbíháním píků je přidání tzv. parkovací smyčky, na které mohou být cílové analyty „odstaveny“, zatímco ostatní elující píky se ponechají projít kolonou. Tento formát však nebyl cílem této práce.

Jistým problémem byla postupně rostoucí základní linie z důvodu zanášení kolony nečistotami z aminového iontově párového činidla. Řešením tohoto problému by bylo

opět zapojení parkovací smyčky, do které by byl pík směsi zaparkován, zatímco by se kolona oplachovala 100% acetonitrilem.

Závěrem lze říci, že využití recyklačního přístupu umožnilo významné zlepšení separace oligonukleotidů. Efekt je obzvlášť patrný pro analýzu dlouhých oligonukleotidů, kde separace standardními metodami v podstatě není možná – viz Obr. 42 první segment, kde píky 2 a 3 nejsou rozdělené. Tento výsledek je tak nejvýznamnějším dosaženým v předložené práci. Na jeho základě lze předpokládat i brzké zavedení do průmyslové praxe. Příslušná jednání s domácím producentem syntetických oligonukleotidů již v době sepisování práce probíhají.

6 Soupis bibliografických citací

- [1] JENKINS, A. D., Kratochvíl, P., Stepto, R. F. T., & Suter, U. W. (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), 2287-2311. doi: <https://doi.org/10.1351/pac199668122287>
- [2] DR. MANDAL, Ananya, MD. *What is an Oligonucleotide?* News Medical Life Science [online]. Feb 26, 2019 [cit. 2020-12-15]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-an-Oligonucleotide.aspx>
- [3] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0. Str. 64-69
- [4] LEHNINGER, Albert L., David L. NELSON a Michael M. COX. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2013. ISBN 978-1-4292-3414-6. Chapter 8
- [5] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, c2013. ISBN 978-0470-54784-7. Str. 40-75
- [6] Nucleic acid structure [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/content/5/Nucleic-acid-structure>
- [7] JERRY, T. How Oligos Changed the World [online]. December 12, 2017 [cit. 2020-12-16]. Dostupné z: <https://www.twistbioscience.com/blog/perspectives/how-oligos-changed-world>
- [8] ROBERTS, T.C., Langer, R. & Wood, M.J.A. *Advances in oligonucleotide drug delivery*. *NatRevDrugDiscov* 19, 673–694 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- [9] RINALDI, C., Wood, M. *Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders*. *NatRevNeurol* 14, 9–21 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
- [10] BIBA, Mirlinda. *Chromatographic Analysis and Separation of Short RNA Oligonucleotides with Novel Liquid Chromatography Methods*. Drexel, 2014. Thesis. Drexel University.
- [11] Chemical Synthesis and Purification of Oligonucleotides. IDT, Integrated DNA Technologies [online]. ©2005, 2010, and 2011 [cit. 2020-12-16]. Dostupné z:

- https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/technical-report/chemical-synthesis-of-oligos.pdf?sfvrsn=40483407_8
- [12] LÖNNBERG H. *Synthesis of oligonucleotides on a soluble support*. Beilstein J OrgChem. 2017 Jul 12;13:1368-1387. doi: 10.3762/bjoc.13.134
- [13] TORIGOE, Hidetaka a Takeshi IMANISHI. Chemical Modification of Oligonucleotides: A Novel Approach Towards Gene Targeting. MISHRA, Rajnikant, ed. Mutagenesis [online]. InTech, 2012, 2012-08-17 [cit. 2021-6-19]. ISBN 978-953-51-0707-1. Dostupné z: doi:10.5772/50393
- [14] AGARWAL, K., BÜCHI, H., CARUTHERS, M. et al. *Total Synthesis of the Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast*. Nature 227, 27–34 (1970). <https://doi.org/10.1038/227027a0>
- [15] AMARNATH, V., Broom, A., D. *Chemical synthesis of oligonucleotides*, Chemical Reviews 1977 77 (2), 183-217, doi: 10.1021/cr60306a002
- [16] CASTELÃO, Cindy Duarte. *Oligo Purification Methods: How, Why and for What?* BiteSize Bio [online]. 2017 [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/36617/oligo-purification-methods/>
- [17] ZHANG Q, Lv H, Wang L, et al. *Recent Methods for Purification and Structure Determination of Oligonucleotides*. Int J Mol Sci. 2016;17(12):2134. Published 2016 Dec 18. doi:10.3390/ijms17122134
- [18] HARTMANN, Roland K., Albrecht BINDEREIF, Astrid SCHÖN a Eric WESTHOF, ed. *Handbook of RNA Biochemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH VerlagGmbH& Co., 2014 [cit. 2020-12-19]. ISBN 9783527647064. Dostupné z: doi:10.1002/9783527647064
- [19] FOUNTAIN KJ, Gilar M, Gebler JC. *Analysis of native and chemically modified oligonucleotides by tandem ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(7):646-53. doi: 10.1002/rcm.959. PMID: 12661016.
- [20] *Oligonucleotide Purification*. Merck [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/best-purification.html>
- [21] *Purifikace oligo*. Generi biotech [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/info/purifikace-oligo/>

- [22] KANWAL F, Lu C. *A review on native and denaturing purification methods for non-coding RNA (ncRNA)*. J Chromatogr B Analyt TechnolBiomedLifeSci. 2019 Jul 1;1120:71-79. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.04.034
- [23] *Oligonucleotide Purification*. GenScript [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: https://www.genscript.com/oligo_purification.html
- [24] MCCARTHY SM, Gilar M, Gebler J. *Reversed-phase ion-pair liquid chromatography analysis and purification of small interfering RNA*. AnalBiochem. 2009 Jul 15;390(2):181-8. doi: 10.1016/j.ab.2009.03.042. Epub 2009 Apr 2.
- [25] *Method of Oligonucleotide Purification*. Biosynthesis [online]. 11/25/2013 [cit. 2020-12-20]. Dostupné z: <https://www.biosyn.com/tew/method-of-oligonucleotide-purification.aspx>
- [26] DOUŠA Michal *Teorie HPLC / Základy HPLC* [online]. Česko: c1999-2016 [cit. 2020-12-20]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [27] KANAVARIOTI, A. *HPLC methods for purity evaluation of man-made single-stranded RNAs*. SciRep 9, 1019 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37642-z>
- [28] BEVERLY, M.B. *Applications of mass spectrometry to the study of siRNA*. Mass Spectrometry Reviews [online]. 2011, **30**(6), 979 - 998 [cit. 2020-12-21]. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20260
- [29] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [30] STUDZIŇSKA, Sylwia. (2018). *Review on investigations of antisense oligonucleotides with the use of mass spectrometry*. Talanta. 176. 329-343. 10.1016/j.talanta.2017.08.025.
- [31] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1775-6.
- [32] BOMBAUGH, Karl J. a Robert F. LEVANGIE. *High Resolution Gel Permeation Chromatography-Using Recycle*. Separation Science [online]. 1970, 5(6), 751-763 [cit. 2021-6-19]. ISSN 0037-2366. Dostupné z: doi:10.1080/00372367008055537

- [33] MINARIK, Marek, Martin FRANC a Milan MINARIK. High performance liquid chromatography column efficiency enhancement by zero dead volume recycling and practical approach using park and recycle arrangement. *Journal of Chromatography A* [online]. 2018, 1554, 1-7 [cit. 2020-12-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.03.058
- [34] ZHANG, Xin, Feng WEI, Yingxian ZHAO a Qiang WANG. Fine optimization of twin-column recycling chromatography with a solvent gradient for the removal of minor impurities. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, 1609 [cit. 2020-12-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460443
- [35] GAO, Zong-ye, Qi-lei ZHANG, Ce SHI, Jin-xia GOU, Dong GAO, Hai-bin WANG, Shan-jing YAO a Dong-qiang LIN. Antibody capture with twin-column continuous chromatography: Effects of residence time, protein concentration and resin. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, 253 [cit. 2020-12-22]. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2020.117554
- [36] LIU, Qi, Junan XIAO, Jingang YU, Yixi XIE, Xiaoqing CHEN a Hua YANG. Improved enantio separation via the twin-column based recycling high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1363, 236-241 [cit. 2020-12-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.07.040
- [37] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [38] PORTER, Roger & Johnson, Julian. (1959). *Circular Gas Chromatograph*. *Nature*. 183. 391-392. 10.1038/183391a0.
- [39] VAN DER WAL, S. A limit to alternate column recycle chromatography. *Chromatographia* 22, 81–87 (1986).
<https://doi.org/10.1007/BF02257304>
- [40] GRITTI, Fabrice, Mike LEAL, Thomas MCDONALD a Martin GILAR. Ideal versus real automated twin column recycling chromatography process. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017(1508), 81-94 [cit. 2021-6-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.009>.
- [41] GRITTI, Fabrice, Sebastien BESNER, Sylvain CORMIER a Martin GILAR. Applications of high-resolution recycling liquid chromatography: From small to

large molecules. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017(1524), 108-120 [cit. 2021-6-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.054>

- [42] GILAR, Martin, Zhimin LI a Jason MACLEAN. Improved Chromatographic Analysis of Oligonucleotides with ACQUITY PREMIER Oligonucleotide BEH C18 Columns [online]. 2020 [cit. 2021-6-20]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/ph/en/library/application-notes/2020/improved-chromatographic-analysis-of-oligonucleotides-with-acquity-premier-oligonucleotide-beh-c18-columns.html>