

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Aliya Shtikova

Retenční chování polárních peptidů na vybraných kolonách v hydrofilní
interakční kapalinové chromatografii

Retention behavior of polar peptides on selected columns in hydrophilic
interaction liquid chromatography

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2019

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.

V Praze dne 14. května 2019

Abstrakt

Peptidy hrají významnou roli v mnoha metabolických pochodech a stávají se také perspektivními pro terapeutické účely. Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem retenčního chování sedmi biologicky aktivních peptidů na dvou různých UHPLC kolonách, a to HALO Penta-HILIC a Acquity BEH Amide v podmínkách hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC). Na základě testování vlivu obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci studovaných analytů na obou kolonách bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování analytů mezi hydratovanou stacionární fázi a mobilní fázi, tak i adsorpce analytů na povrch stacionární fáze. Obě kolony poskytovaly symetrické úzké píky všech studovaných peptidů kromě angiotensinů, jejichž píky silně chvostovaly. Též obě kolony vykazovaly odlišnou selektivitu pro dvojice analytů Lys8 Vasopresin/Arg8 Vasotocin a Angiotensin I/Angiotensin II. Byl ukázán separační potenciál obou kolon v HILIC podmínkách při analýze polárních peptidů.

Klíčová slova: HPLC, LC/MS, HILIC, proteomika, separace, peptidy, HALO Penta-HILIC, Acquity BEH Amide

Abstract

Peptides play a major role in a variety of metabolic pathways and become perspective compounds for therapeutic purposes. This bachelor thesis deals with the study of retention behavior of seven biologically active peptides on two different UHPLC columns, namely HALO Penta-HILIC and Acquity BEH Amide in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) conditions. On the basis of testing the effect of acetonitrile content in the mobile phase on the retention of studied analytes on both columns, it was found that both the distribution of analytes between the hydrated stationary phase and the mobile phase and the adsorption of analytes on the stationary phase surface contribute to the retention mechanism. Both columns provided symmetrical narrow peaks of all studied peptides except angiotensins whose peaks were strongly tailed. Also, both columns showed different selectivity for the Lys8 Vasopressin/Arg8 Vasotocin and Angiotensin I/Angiotensin II analyte pairs. The separation potential of both columns in HILIC conditions for polar peptide analysis was shown.

Keywords: HPLC, LC/MS, HILIC, proteomics, separation, peptides, HALO Penta-HILIC, Acquity BEH Amide

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za poskytnuté téma, velkou trpělivost, cennou pomoc, významné komentáře a rady k této práci. Také děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemné a přátelské atmosféry v laboratoři.

Obsah

Seznam zkratek a symbolů.....	6
1.1 ÚVOD	8
1.2 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.2.1 Peptidy	9
1.2.2 Peptidy studované v této práci	10
1.2.3 Analýza peptidů a proteinů	11
1.2.4 Trendy v analýze peptidů a proteinů.....	13
1.2.5 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie	14
1.2.6 Hmotnostní spektrometrie.....	14
1.2.7 HILIC.....	15
1.2.7.1 Princip a mechanismus.....	16
1.2.7.2 Stacionární fáze	17
1.2.7.3 Stacionární fáze studované v této práci	18
1.2.7.4 Testování chromatografických HILIC kolon	20
1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
1.3.1 Použité chemikálie	21
1.3.2 Přístroje a pomůcky	21
1.3.3 Příprava roztoků.....	22
1.3.4 Podmínky separace a detekce	22
1.4 VÝSLEDKY A DISKUSE	23
1.4.1 Detekce peptidů pomocí ESI-MS	23
1.4.2 Separace peptidů a zjištění hlavního retenčního mechanismu	26
1.5 ZÁVĚR	35
1.6 LITERATURA.....	36

Seznam zkratk a symbolů

ACE	angiotensin-konvertující enzym (angl. angiotensin-converting enzyme)
ACN	acetonitril
ADH	antidiuretický hormon
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric-pressure chemical ionization)
APLI	laserová ionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure laser ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure photoionization)
ATI	angiotensin I
ATII	angiotensin II
BEH	technologie hybridů s ethylenovými můstky (angl. ethylene bridged hybrid)
ENK	enkefaliny
ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (angl. fourier-transform ion cyclotron resonance)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (angl. hydrophilic interaction chromatography)
IEC	iontově výměnná chromatografie (angl. ion exchange chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (angl. liquid chromatography)
LIT	lineární iontová past (angl. linear ion trap)
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
NP-LC	chromatografie s normálními fázemi (angl. normal-phase liquid chromatography)
PTM	posttranslační modifikace
QIT	kvadrupólová iontová past (angl. quadrupole ion trap)
RNA	ribonukleová kyselina (angl. ribonucleic acid)

RP-LC	chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi (angl. reversed phase liquid chromatography)
SEC	vylučovací chromatografie (angl. size exclusion chromatography)
SF	stacionární fáze
TDA	„top-down“ analýza
TOF	průletový analyzátor (angl. time of flight)
U(H)PLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. ultra-high performance liquid chromatography)
VP	vasopresin
VT	vasotocin
k	retenční faktor
ϕ	objemový podíl vody v mobilní fázi
A, B, C	koeficienty rovnice
k_w	předpokládaný retenční faktor, kdy je mobilní fáze tvořena pouze vodou
A_s	plocha průřezu tvořená molekulou rozpouštědla na povrchu
n_w	plocha průřezu tvořená molekulami vody
N_w	molární zlomek vody v eluentu

1.1 ÚVOD

V posledních letech stále roste zájem o výzkum peptidů. Na jedné straně hrají velkou roli v celé řadě biochemických pochodů v organismech – například působí jako hormony a neurotransmitery. Na druhou stranu tvoří peptidy unikátní skupinu léků s potenciálem pro terapeutické zásahy, které přirozeně ovlivňují různé fyziologické pochody. S tím souvisí rozsáhlá potřeba jejich analýzy, kterou se zabývá proteomika. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu v současné době proteomika nejčastěji využívá hmotnostní spektrometrii ve spojení s kapalinovou chromatografií. Proteomické chromatografické metody převážně používají chromatografii s reverzními fázemi, která je pro většinu polárních peptidů nevhodná. Obecně je pro analýzu polárních látek vhodná hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). Na trhu se objevují stále nové stacionární fáze určené pro HILIC, které jsou používány pro analýzu malých polárních látek, ale mohou být též vhodné pro analýzu polárních peptidů.

Cílem této práce bylo testování a porovnání kolony Penta-HILIC obsahující jako stacionární fázi polyhydroxylový pěti uhlíkatý řetězec s kolonou BEH amid obsahující amidovou stacionární fázi v analýze vybraných polárních peptidů. Byl testován vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci studovaných peptidů. Na základě výsledků byl odhadnut základní retenční mechanismus.

1.2 TEORETICKÁ ČÁST

1.2.1 Peptidy

Peptidy plní v organismech mnoho důležitých funkcí. Většinou jsou známy jako hormony, neurotransmitery a růstové faktory. Ale poslední výzkumy ukázaly, že také podporují a stimulují procesy hojení kostí nebo mají neuroprotektivní vlastnosti. Celkem více než 100 peptidů se podílí na regulaci činnosti centrálního a periferního nervového systému, ale také kardiovaskulárního, imunitního systému a trávicího traktu [1–3].

I přes velký rozvoj organické chemie i biologie ve 20. století, nebyl zájem o výzkum peptidů příliš velký až do počátku 40. let. Do té doby byly známy pouze peptidy glutathion (objevený v roce 1888), karnosin (izolovaný v roce 1900) a gramicidin S. To bylo způsobeno problematickou izolací peptidů z přírodních zdrojů: většinou se jejich maximální koncentrace pohybuje v rozmezí 10^{-15} až 10^{-12} mol/mg tkáně [4]. Kromě toho samotný zdroj peptidů není obvykle dostupný ve velkém množství, obzvlášť v případě lidského těla. Objevení nových, citlivějších analytických metod a technik izolace a purifikace umožnily další pokrok ve výzkumu peptidů. Po zavedení chromatografických metod, zejména papírové chromatografie, bylo objeveno velké množství peptidů v přírodních zdrojích, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové. Díky účinnější izolaci a separaci byl umožněn výzkum takových důležitých peptidů jako jsou např. insulin, glukagon, oxytocin atd. Objev struktury insulinu a syntéza oxytocinu se staly prvními kroky celosvětového růstu výzkumu peptidů. Obecně mohou být peptidy získány různými způsoby: izolací z přírodních zdrojů, chemickou syntézou nebo rekombinantní syntézou [4].

Strukturně jsou peptidy krátké polymerní řetězce, sestavené z méně než 50 aminokyselinových zbytků spojených peptidovou vazbou. Podle počtu monomerních jednotek se dají peptidy rozdělit na dvě skupiny: oligopeptidy, mající méně než 20 aminokyselin a polypeptidy, které jich mají více než 20. Přírodní peptidy obvykle obsahují různé aminokyseliny: nachází se v nich nejen standardní sada 20 aminokyselin, ale i vzácný selenocystein a pyrrolysin. Kromě toho se objevují aminokyseliny, které se nachází v D-konfiguraci, produkované primárně mikroorganismy, které používají neribosomální mechanismus syntézy peptidů [4]. Podle rozšíření v přírodě se peptidy dělí na dvě kategorie: v první se nachází ty, které jsou široce rozšířeny všude, téměř ve všech živých buňkách nezávisle na tom, jestli se jedná o rostlinu, živočicha nebo bakterii (např. glutathion). Do druhé skupiny patří peptidy, které jsou charakteristické jenom pro určitý druh organismu. Například

vasopresin se nachází v neurohypofýze u vyšších živočichů, nebo peptidová antibiotika jsou charakteristická pro určitý druh bakterií [5].

1.2.2 Peptidy studované v této práci

V této práci byly využity následující biologicky aktivní peptidy (viz Tab. 1):

Lys8 Vasopresin (VP, ADH)

Známý také jako antidiuretický hormon. Je to hormon neurohypofýzy, který byl zjištěn ve dvou formách: izolovaný z vepřových žláz obsahuje lysin, hovězí obsahuje arginin. Je syntetizován buňkami v jádrech hypotalamu, dále je transportován do zadní hypofýzy, kde se uvolňuje na základě stimulu zvýšení osmolarity nad 300 mOsm/l. Vasopresin má antidiuretické účinky, ve vyšších koncentracích zvyšuje krevní tlak, což přispívá k regulaci osmotické kardiiovaskulární homeostázy. Jeho deficit vyvolává diabetes insipidus, při kterém člověk denně vylučuje až 20 litrů moči [5,6].

Arg8 Vasotocin (VT)

Poprvé byl vasotocin syntetizován v roce 1958 jako peptid s kruhem oxytocinu a postranním řetězcem vasopresinu (přitom se dá také rozlišovat Lys8 Vasotocin a Arg8 Vasotocin podle typu prekurzoru vasopresinu). Později bylo zjištěno, že se tento peptid nachází v hypofýze ptáků, plazů a v epifýze savců. Vasotocin se podílí na regulaci metabolismu vody a minerálních látek [5,6].

Enkefaliny (ENK)

Jsou to pentapeptidy objevené v roce 1975. Mají silnou, morfinu podobnou aktivitu díky působení na opiátové receptory v mozku. Jejich využití jako analgetických léků je omezeno jejich nízkou stabilitou a neschopností proniknout přes hematoencefalickou bariéru. Vznikají odštěpením od prekurzoru syntetizovaného v hypofýze. Rozlišuje se Leu-enkefalin a Met5-enkefalin [5,6].

Angiotensiny (AT)

Dříve byly známy jako angiotoniny nebo hyperensiny. Jsou to tkáňové peptidové hormony: deka-peptid Angiotensin I a okta-peptid Angiotensin II. Pod vlivem reninu

z plasmatického proteinu angiotensinogenu dochází k odštěpení dekaeptidu Angiotensinu I, který se dále štěpí pomocí angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE) na dipeptid H-His-Leu-OH a Angiotensin II. Angiotensin II má vasokonstrikční účinky, indukuje uvolňování aldosteronu a retenci sodíku a vody [5,6].

Tabulka 1. Aminokyselinová sekvence a molekulová hmotnost studovaných peptidů

Název peptidu	Sekvence	Molekulová hmotnost
Lys8 Vasopresin	H-Cys ⁽¹⁾ -Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys ⁽¹⁾ -Pro-Lys-Gly-NH ₂	1056,22
Arg8 Vasotocin	H-Cys ⁽¹⁾ -Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys ⁽¹⁾ -Pro-Arg-Gly-NH ₂	1050,22
Leu-enkefalinamid	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH ₂	554,64
Leu-enkefalin	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	555,63
Met5-enkefalin	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	573,67
Angiotensin II	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	1046,20
Angiotensin I	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	1296,50

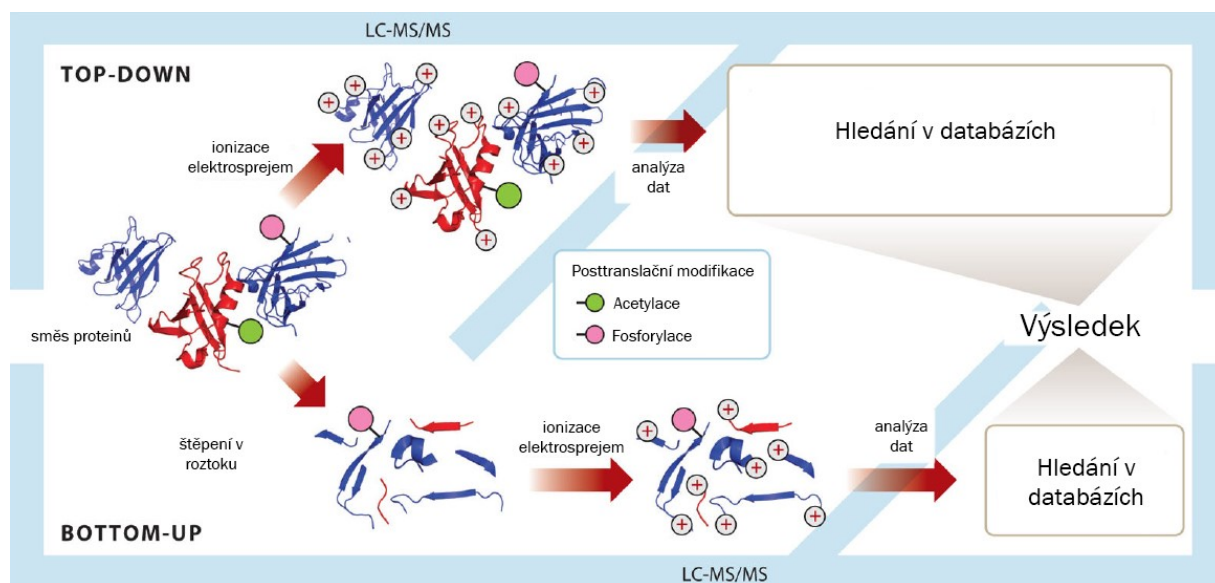
⁽¹⁾ vyznačeny disulfidové můstky

1.2.3 Analýza peptidů a proteinů

Analýza peptidů a proteinů není jednoduchým úkolem a vyžaduje řadu analytických přístupů. V závislosti na původu vzorku je potřeba zařadit kroky pro homogenizaci a purifikaci proteinů z biologických zdrojů. Po počátečních procesech srážení, čištění a předběžných separacích jsou většinou vzorky dále separovány pomocí kapalinové chromatografie. Pro separaci jsou používány různé metody, z nichž nejběžnější je chromatografie s reverzními fázemi (RP-LC). Dalšími typy chromatografie v analýze peptidů a proteinů jsou iontově výměnná chromatografie (IEC), vylučovací chromatografie (SEC) a afinitní chromatografie. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie umožňuje analýzu posttranslačních modifikací (glykosylace, fosforylace atd.).

Separace se provádí i pomocí elektroforetických technik. Například důležitou roli hraje 2-D gelová elektroforéza. Elektroforéza, kde v první dimenzi dochází k dělení na základě izoelektrického bodu a v druhé podle molekulové hmotnosti – poskytuje rozlišení kolem 3000-

4000 polypeptidů. To umožňuje porovnání místa výskytu peptidu s peptidy, již dříve touto metodou analyzovanými, čímž je můžeme identifikovat. Automatizace tohoto procesu umožnila využívat databáze proteinů pro identifikace. Klíčovou roli nicméně hraje polohová reprodukovatelnost: vše musí být prováděno přesně podle experimentálního protokolu, aby se zabránilo chybám [7,8]. Na druhou stranu se po gelové elektroforéze dají určité skvrny vyjmout, a následně je možné provést proteolýzu, eluce a dále analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) [7]. Jsou rozlišeny dvě základní metody identifikace proteinů a peptidů (viz Obr. 1) a charakterizace jejich sekvence: „bottom-up“ a „top-down“ analýza. Tyto přístupy se liší pouze jedním krokem, ve kterém se buď provádí proteolýza nebo je vynechána. Poté se provádí separace pomocí kapalinové chromatografie a dále následuje analýza MS [9].



Obrázek 1. „Top-down“ a „bottom-up“ přístup v proteomice [9].

„Bottom-up“ analýza

Tento typ analýzy funguje na úrovni peptidů, a proto je jejím základem štěpení zkoumaných proteinů proteolytickými enzymy. Nejčastěji používané enzymy jsou trypsin, chymotrypsin, Asp-N endopeptidasa. Menší peptidy jsou analyzovány pomocí LC-MS nebo LC-MS/MS. Výhodou je snazší práce ve srovnání s druhým typem analýzy: peptidy se lépe solubilizují, jsou lépe separovány a snadněji disociovány na fragmenty pro práci v MS [9,10].

„Top-down“ analýza

V případě této analýzy není zařazen krok proteolýzy a protein je hned analyzován pomocí MS. Takovým způsobem jsou analyzovány malé a středně velké proteiny. Omezením je nutnost použití vysokorozlišovacích hmotnostních spektrometrů kvůli velkému počtu fragmentů proteinu. Díky zlepšování různých přístrojů MS, obzvláště objevu ESI (ionizace elektrosprejem), se „top-down“ analýza (TDA) stává rutinní technikou i pro charakterizaci větších proteinů v komplexních směsích. Tento typ analýzy je užitečný pro studium proteoform – umožňuje získat informaci o posttranslačních modifikacích (PTM) nebo o alternativních sestřizích RNA transkriptů. Většina PTM je stabilní během fragmentace proteinů v „top-down“ analýze [9,10].

1.2.4 Trendy v analýze peptidů a proteinů

V moderní době se častěji setkáváme s potřebou hledání nových sloučenin, které mají užitečné (např. terapeutické) vlastnosti a při tom mají menší četnost nežádoucích účinků. Jednou takovou perspektivní skupinou jsou peptidy a proteiny, což vede k růstu zájmu o jejich analýzu pomocí různých metod. Každodenně se můžeme setkat s analýzou pomocí LC-MS a LC-MS/MS. To bylo umožněno tím, že byla zavedena do praxe ionizace pomocí ESI a MALDI [11]. Kromě toho „bottom-up“ a „top-down“ přístupy spolu s využitím širokých databází umožnily efektivní analýzu proteinů a peptidů. Důležité jsou i modifikace proteinů (glykosylace, fosforylace atd.), hrající kritickou roli v regulaci různorodých procesů. Proto jsou vytvořené různé strategie analýzy PTM. Například v analýze glykopeptidů se jedná o provádění TDA celkové molekuly nebo se využívá separační krok s následující LC-MS [11]. Pomocí MS a speciálních technik, zahrnujících výměnu vodíku a deuteria a metody kovalentního značení, se dají získat určité informace i o struktuře biomolekul [12].

Jedním z trendů je také „zmenšování“ chromatografických kolon, vedoucí k zvětšení účinnosti analýzy. Prvním krokem k účinnějším separacím bylo zavedení částic menších než 2 μm spolu s vysokotlakým čerpadlem, což je základem ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) [13]. Dalším zmenšením se dosahuje zvětšení kapacitních faktorů analytů [14]. Velká citlivost analýzy v nano-měřítku dovoluje zkoumat analyty ve velmi nízkých koncentracích (jako jsou biologické vzorky). Tím se postupně tento typ analýzy stává jedním z nepostradatelných nástrojů pro rutinní analýzu biomolekul [13].

1.2.5 Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie

Zavedení UHPLC do výzkumu peptidů a proteinů umožnilo jejich rychlou a citlivou analýzu. Díky tomu se tento typ chromatografie stal jednou z nejdůležitějších technik v proteomice, nejenom při charakterizaci biologických procesů, ale i při vývoji léků založených na peptidech a proteinech. Možnosti aplikace UHPLC se každým rokem rychle rozšiřují [15]. V roce 2004 Waters představily UPLC, systém, ve kterém se používají částice s malým poloměrem (pod 2 μm) a kde je možné pro účinnou separaci použití vysokých tlaků [16]. UPLC a UHPLC jsou synonyma, s tím rozdílem, že UPLC je chráněnou obchodní značkou Waters [17]. Účinnost UHPLC se nedá vysvětlit pouze použitím menších částic. Pro efektivní separaci jsou důležité také malé objemy gradientového zpoždění a mimokolonové příspěvky k rozšiřování píků, které napomáhají minimalizovat rozmytí píků [16,18]. HPLC s reverzními fázemi je nejběžnější technikou v praxi. Stacionární fáze (SF) je méně polární než mobilní fáze (MF). SF jsou nejčastěji dlouhé uhlovodíkové řetězce na pevném povrchu a mají vysoce hydrofobní charakter (např. C18, C8). Mobilní fáze je směs organického rozpouštědla (jako acetonitril, metanol, isopropanol) a vody nebo pufu. Hlavní typ interakce jsou hydrofobní síly, což vysvětluje výjimečnou užitečnost RP-LC: většina sloučenin má ve své struktuře alespoň některé skupiny s hydrofobními vlastnostmi [16,18,19].

1.2.6 Hmotnostní spektrometrie

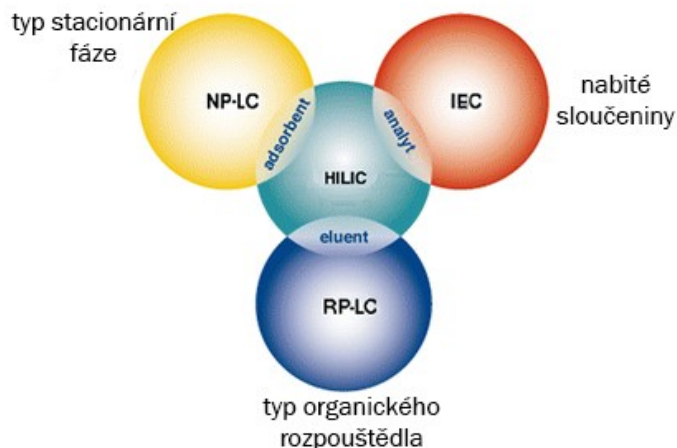
MS poskytuje široké možnosti kvantitativní a kvalitativní analýzy peptidů: od zjištění sekvencí a molekulové hmotnosti po zkoumání různorodých posttranslačních modifikací. Před samotným rozdělením podle poměrů m/z je potřeba provést ionizaci analytu. Existují různé metody, které se dají rozdělit podle toho, jestli jsou prováděny za atmosférického tlaku nebo ne. Výhoda ionizačních metod za atmosférického tlaku je relativní jednoduchost ve spojení s LC. Nejznámější jsou čtyři metody: ESI, APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku), APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku), APLI (laserová ionizace za atmosférického tlaku). Každá má své výhody a nevýhody a funguje v určité oblasti: APLI je zlatý standard pro analýzu polycyklických aromatických uhlovodíků, ESI je nejvhodnější pro polární analyty a ionty, v případě nepolárních látek se používá APPI nebo APCI [20]. Obzvlášť použití ESI umožnilo citlivou a důvěryhodnou analýzu proteinů. Díky vytvoření vícenásobných nabitých iontů vzniká optimální poměr m/z [18,21]. Další používanou ionizační metodou pro biopolymery je MALDI

(matrix-assisted laser desorption/ionization). Má detekční limity v rámci 10–15 molu a při spojení s průletovým analyzátozem (TOF) je hmotnostní rozsah nad 500 kDa [11].

Proteiny a peptidy jsou obvykle analyzovány v režimu pozitivních iontů a náboj je tvořen většinou na bazických aminokyselinách a na N-konci řetězce. Centrální roli v MS hraje hmotnostní analyzátor. V proteomice jsou nejvíce užívány čtyři typy analyzátorů a také jejich hybridní kombinace. Základní jsou kvadrupól (Q), iontová past (QIT, LIT), průletový analyzátor a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Po měření m/z poměru peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie se výsledná informace porovnává s databází proteinů, resp. s informací o peptidu, které byly získány v jiné analýze. Velkou výhodou je možnost automatizace procesu vyhledávání. Na druhou stranu databáze neobsahuje informace pro všechny existující peptidy a proteiny [22–24].

1.2.7 HILIC

HILIC se používá pro separaci polárních látek na polární SF. Poprvé byl HILIC představen v 70. letech a zpočátku byl HILIC brán jako jeden z druhů kapalinové chromatografie s normálními fázemi. HILIC je ale svými vlastnostmi poměrně odlišný a má jiný mechanismus separace. RP-LC nestačila rostoucí potřebě analýzy polárních sloučenin a zvyšující se složitosti vzorků. Proto začal být režim HILIC více zkoumán a časem bylo objeveno mnoho možností aplikace a jeho univerzální charakter. Kromě toho je díky vysokému obsahu organické složky v mobilní fázi kompatibilní s hmotnostní spektrometrií, zvyšuje citlivost v ESI-MS a ve vodné složce se dobře rozpouští polární analyty. Na obrázku 2 je vidět, že HILIC kombinuje charakteristiky několika jiných druhů LC. Jako v chromatografii s normálními fázemi (NP-LC) jsou používány SF polární (silikagel, polární vázané fáze: amino, kyano). Mobilní fáze je převážně z organické fáze s přídavkem vody (nebo pufru) a je tedy více podobná té, která se používá v RP-LC. Mezi možné analyzované látky se dají zařadit nabitě sloučeniny, což je více charakteristické pro iontově výměnnou chromatografii [25–28].

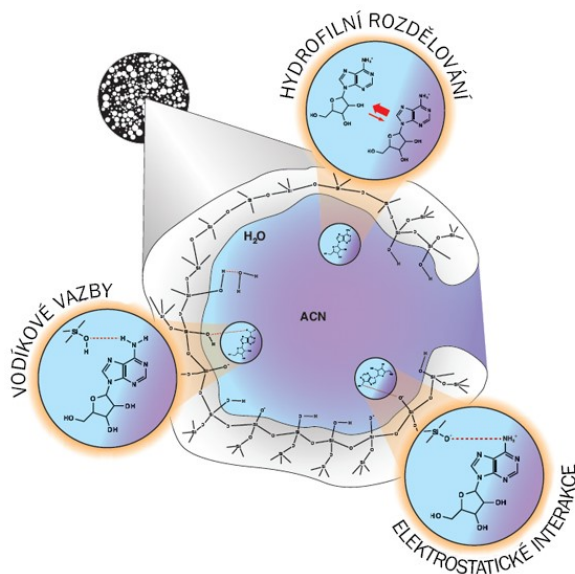


Obrázek 2. Společné charakteristiky HILIC a jiných metod LC [29].

1.2.7.1 Princip a mechanismus

Mechanismus separace HILIC je založen na tom, že když do organické fáze (nejčastěji acetonitril) dáme malou část polární fáze (voda, pufr), vytvoří se na povrchu SF vodná vrstva. Tato hydrofilní vrstva se účastní procesu rozdělování polárních analytů mezi ni a organickou část MF. Díky tomu se při zvýšení organického podílu MF retence zvyšuje. Při gradientové eluci má počáteční mobilní fáze vysoký obsah organického rozpouštědla a koncentrace polární (vodné) složky se časem zvyšuje. I když teoreticky může být organická fáze jakákoliv, acetonitril (ACN) je nejběžnější. Organická rozpouštědla s větší polaritou se dají použít pro promývání HILIC kolon, protože se zvětšením polarity retence klesá [26,27]. Celkově je retenční mechanismus složitý a je kombinací mechanismů (viz Obr. 3):

- rozdělování – přenos analytů mezi polárním stacionárním rozpouštědlem (vodná vrstva u povrchu) a relativně nepolární organickou mobilní fází;
- Van der Waalsovy interakce – dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól atd.;
- vodíkové vazby mezi polárními funkčními skupinami analytu a SF;
- iontová výměna s ionizovanými povrchovými silanolovými skupinami [26,29].



Obrázek 3. Předpokládaný mechanismus interakce při metodě HILIC [30].

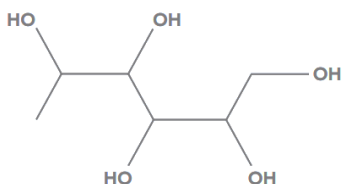
1.2.7.2 Stacionární fáze

V HILIC je používáno široké spektrum stacionárních fází: od tradičně používaných v chromatografii s normálními fázemi silikagelu, amino- a kyanoskupin po komplexnější směsné struktury, vázané na některý povrch. Poslední dobou výrobci dodávají na trh mnoho různých stacionárních fází, které mohou být cílené pro selektivní a reprodukovatelnou analýzu určitých skupin látek a vyrobené konkrétně pro HILIC. Celkem se dá SF klasifikovat na klasický silikagel, modifikovaný silikagel a stacionární fáze na bázi polymeru. Nemodifikovaný silikagel používaný v režimu HILIC je používán pro analýzu polárních bazických sloučenin díky disociaci volných silanolových skupin. Vázané fáze se obvykle připravují chemickou modifikací povrchu silikagelu. Aminopropylová vázaná SF byla první, která se rutinně používala pro separace sacharidů v režimu HILIC. Jednou z jejích výhod je zvýšení rychlosti mutarotace, což zabraňuje tvorbě dvojitých píků. Zároveň má omezenou stabilitu, vedoucí k rychlému uvolnění ligandů a zhoršení tvarů píků. Amidová skupina je méně reaktivní než amin a má nižší bazicitu. Retence na těchto kolonách je tedy méně citlivá na pH mobilní fáze. Vykazuje dobrou stabilitu a regeneraci. Dioly mají vysokou polaritu nejvíc podobnou nemodifikovanému silikagelu a také tvoří vodíkové vazby. Vázaný cyklodextrin je složen z pěti nebo více 1=>4 spojených α -D-glukopyranosidových jednotek. Má chirální vlastnosti, užitečné při separaci opticky aktivních látek [25,28,31,32].

1.2.7.3 Stacionární fáze studované v této práci

Kolona HALO Penta-HILIC

Kolona HALO Penta-HILIC má SF vhodnou pro separaci vysoce polárních sloučenin. Na částicích s pevným jádrem se nachází pentan s pěti hydroxylovými skupinami (viz Obr. 4), tvořících vysoce polární stacionární fázi. Pevné jádro poskytuje vyšší účinnost separace [33]. Efekt iontové výměny se zbytkovými silanoly je potlačen díky vysoké hustotě vazeb. To zlepšuje tvar píku a reprodukovatelnost analýzy. Díky malé velikosti částic může kolona pracovat v UHPLC režimu. Penta-HILIC kolona má svá omezení oproti druhé použité koloně: jednak v rozmezí používaných pH (2-9), a také v menší teplotní (max. 60°C) i mechanické stabilitě (do 600 bar) [34–36].

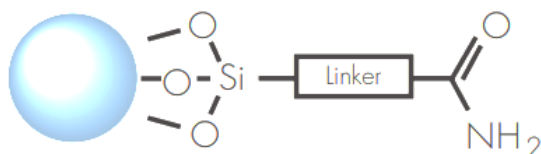


Obrázek 4. Kolona HALO Penta-HILIC obsahující 5 hydroxylových skupin vázaných na nosiči [34].

Autoři Badgett M.J., Boyes B., Orlando R. na této koloně analyzovali pomocí gradientové eluce chování 297 peptidů. Gradient byl tvořen 95–30 % obj. ACN (s 0,1 % kyseliny mravenčí) po dobu 90 minut. Na základě získaných dat byly vypočítány koeficienty pro každou aminokyselinu a vytvořen model, který dobře předpovídá retenci peptidů v modu HILIC na této koloně [37]. Kolona byla také úspěšně použita v analýze glykopeptidů. Výhodou v tomto případě je, že je analýza nejvíce ovlivněna glykanovou částí. To dovoluje v některých případech rozdělit i takové glykoformy, které se liší jenom pozicí jedné fukosy. To bylo prokázáno v práci autorů Kozlík P., Goldman R., Sanda M. v HILIC režimu s MF 2 % ACN s 0,1 % kyseliny mravenčí (A) a 100 % ACN s 0,1 % kyseliny mravenčí (B) za podmínek gradientové eluce. Také jimi byla pozorována zákonitost, že se zvyšujícím se počtem monosacharidových jednotek se zvyšuje retence glykopeptidů [38].

Kolona Acquity BEH Amide

Tento typ kolony je založen na technologii ethylene bridged hybrid (BEH). Je to hybridní organický / anorganický materiál, ve kterém jsou dva volné silanoly spojeny ethylenovým můstkem, takže je odstraněna téměř jedna třetina povrchových silanolů [39]. To zvyšuje chemickou stabilitu hybridních částic, a proto je lze použít v širším rozmezí pH (2-11). Malá velikost částic 1,7 μm dovoluje využití této kolony v UHPLC systému - vydrží tlaky do 1000 bar.



Obrázek 5. Amidová skupina kolony Acquity BEH Amide vázaná na nosič [40].

Na povrchu částice je navázán amid (viz Obr. 5). Tato polární skupina společně se širokým rozmezím chemické stability dovoluje separovat vysoce polární látky. Jednou z takových skupin látek jsou sacharidy, a proto je tato kolona doporučována pro separaci různých mono-, oligo- a polysacharidů. Účinná separace byla například získána při rozdělení fruktosy, glukosy, sacharosy, maltosy, malta- triosy/tetraosy/pentosy/hexosy/heptosy za podmínek gradientové eluce 0-60 % obj. A (během 5 minut), kde A: 30 % ACN/ 70 % H₂O s 0,1 % hydroxidem amonným, B: 80 % ACN/ 20 % H₂O s 0,1 % hydroxidem amonným [40–42].

Při analýzách vykazuje kolona BEH Amide dobrou retenci a odlišnou selektivitu pro různé typy sloučenin ve srovnání s kolonami BEH HILIC a Atlantis HILIC Silica. Toto bylo prokázáno v práci Jablonský J.A.M. analýzou acenaftenu, thyminu, 5-fluororotové kyseliny, adeninu, cytosinu za podmínek izokratické eluce (MF 90 % obj. ACN s 12 mM mravenčan amonný, pH=3) [43]. Kromě toho se pomocí této kolony ve spojení s LC-MS/MS podařilo v biologické matrici (plazma a moč krysy) rychle kvantifikovat 19 aminokyselin. Autoři použili gradientovou eluci s mobilní fází A: voda s 0,2 % kyseliny mravenčí a B: acetonitril s 0,2 % kyseliny mravenčí. Gradient začal při 10 % obj. A, pak lineárně narůstal do 26 % obj. během 4,5 min, dále na 45 % obj. A po dobu 1 min a byl udržován další 1 min [44]. Le Maux S., Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. v režimu HILIC-MS/MS provedli analýzu 153 di- až tetrapeptidů. Analýza se prováděla za podmínek gradientové eluce s mobilní fází A: 97 %

ACN/3 % H₂O/0,1 % TFA a B: 40 % ACN/60 % H₂O/0,1 % TFA. Gradient byl tvořen takto: 100 % obj. A na počátku, které se během 120 min snižovalo na 50 % obj. Na základě získaných dat autoři vytvořili model předpovědi retenčního času se spolehlivostí $R^2 = 0,992$ [45].

1.2.7.4 Testování chromatografických HILIC kolon

Charakterizace kolon je důležitá kvůli nutnosti správného výběru kolony pro daný cíl. Poprvé byla charakterizace prováděna pro RP-LC režim, ale použité testy se dají využít i v charakterizaci HILIC kolon. Existuje mnoho různých metod hodnocení. Ty základní zahrnují měření fyzikálních vlastností, spektroskopickou analýzu, statistické metody, termodynamická měření a chromatografické metody. Spektrometrické metody (jako např. NMR) poskytují rozsáhlé informace o skupinách přítomných na substrátu a o chemicky modifikovaných povrchích. Termodynamickým měřením získáváme informace o hnacích silách v procesu separace v závislosti na experimentálních podmínkách. Pro zjištění fyzikálních vlastností byla vytvořena celá řada testů. Např. v protokolu Tanaka se získává retenční faktor pentylnbenzenu charakterizující povrchové pokrytí vázané fáze a retenci v režimu RP-LC. Měří se hydrofobní, tvarová selektivita, schopnost tvořit vodíkové vazby atd. [31,46].

Retence peptidů je založena na jejich aminokyselinovém složení. To umožňuje tvořit modely, předpovídající retence peptidů. Od počátku byly tyto modely tvořeny pro RP-LC, ale díky vzrůstajícímu zájmu o metodu HILIC počaly být zkoumány i pro ni. Modely odvozují koeficienty pro každou aminokyselinu, ty vystihují jejich hydrofilní nebo hydrofobní charakter. Koeficienty dohromady napomáhají předpovídat chování peptidů na konkrétní koloně za definovaných podmínek. Způsob tvorby modelu je různý: v jednom případě se využívá lineární regrese analýza, v druhém se mohou v syntetickém peptidu provádět substituce různých aminokyselin [37].

Pro zjištění hlavního retenčního mechanismu na koloně se provádí separace za různých podmínek (změna poměru vodné/organické složky MF). Tím jsou získány retenční faktory, které jsou použity jako jeden z parametrů regrese analýzy. V prvním případě se vytvoří závislost logaritmu retenčních faktorů různých peptidů na objemovém podílu vodné složky v MF. Schoenmakers navrhl empirickou rovnici druhého řádu $\log k = A\phi^2 + B\phi + C$, kde k - retenční faktor, ϕ - objemový podíl vody v MF. Tato rovnice popisuje interakce ze strany mechanismu rozdělování [47].

Pro popis vlivu adsorpčního mechanismu na interakce analytu se SF je potřeba vytvořit závislost logaritmu retenčního faktoru na logaritmu molárního podílu vody v MF. Adsorpční proces je popsán rovnicí $\log k = \log k_w - (A_s/n_w) * \log N_w$, kde k_w – předpokládaný retenční faktor, kdy je MF tvořena pouze vodou, A_s a n_w jsou plochy průřezu tvořené molekulou rozpouštědla na povrchu a molekulami vody, N_w je molární zlomek vody v eluentu. Výsledkem regrese jsou koeficienty determinace, jejichž srovnáním se dá posoudit mechanismus separace na zkoumané koloně [31,48–50].

1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1.3.1 Použité chemikálie

Mravenčan amonný 70221-25G-F, čistota $\geq 99.0\%$, SigmaAldrich (St. Louis, USA)

Acetonitril LC-MS CHROMASOLV™, čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Riedel-de Haen

Deionizovaná voda byla upravena pomocí zařízení pro přípravu ultra čisté vody deionizací Rowapur a Ultrapur (výrobce Watrex, Praha, Česká republika)

Kyselina mravenčí LC-MS grade, SigmaAldrich (St. Louis, USA)

Peptidy byly pořízeny od společnosti Sigma–Aldrich (St. Louis, USA):

Lys8 Vasopresin V6879-1MG, čistota $\geq 98\%$

Arg8 Vasotocin V0130-1MG, čistota $\geq 97\%$

Leu–enkefalinamid E3756-1MG, čistota $\geq 97\%$

Leu–enkefalin E5008-1MG, čistota $\geq 97\%$

Met–enkefalin M6638-1MG, čistota $\geq 95\%$

Angiotensin II A9525-1MG, čistota $\geq 93\%$

Angiotensin I A9650-1MG, čistota $\geq 90\%$

1.3.2 Přístroje a pomůcky

Vysokoučinný kapalinový chromatograf: systém UHPLC 1290 Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole LC/MS. Byly použity programy Agilent MassHunter Software

Použité kolony: kolona HALO Penta-HILIC o rozměrech 2,1 x 150 mm, velikost částic 2,7 μ m od společnosti Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, USA; kolona ACQUITY UPLC BEH Amide o rozměrech 2,1 x 100 mm, velikost částic 1,7 μ m od společnosti Waters, Milford, MA, USA

Váhy: analytické váhy Sartorius Lab Instruments GmbH & Co, ENTRIS224I-1S, Germany

pH metr: pH metr/konduktometr stolní 3540 | JENWAY, P-LAB

Ultrazvuková lázeň: Elmasonic S 15 H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany

Automatické pipety: Acura[®] manual 825, Socorex Isba S.A, Switzerland

1.3.3 Příprava roztoků

Příprava mobilních fází pro analýzu na kolonách HALO Penta-HILIC a BEH Amide

Mobilní fáze A: 50 mM mravenčan amonný pH =3,5. Navážka mravenčanu amonného byla rozpuštěna v kádince s deionizovanou vodou. Roztok byl kvantitativně převeden do lahve pro MF a doplněn deionizovanou vodou do 500 ml. Za stálého míchání byla po kapkách přidávána cca 50% kyselina mravenčí dokud nebylo pH rovno 3,5. Dále následovala filtrace přes 0,45 µm celulosový filtr.

Mobilní fáze B: 100% ACN

Příprava zásobních roztoků peptidů

Pro každý peptid se připravoval zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml. Navážka odpovídajících peptidů byla rozpuštěna v roztoku ACN/pufr 80/20 % obj., kde pufr - 50 mM mravenčan amonný pH 3,5. Z výše uvedených roztoků byly připraveny dvě směsi: směs 7 peptidů a směs 5 peptidů. Směsi byly připraveny smícháním 30 µl každého peptidu v LC vialce. V případě směsi 5 peptidů byly vynechány Angiotensin I a Angiotensin II.

1.3.4 Podmínky separace a detekce

Pro měření byly použity kolony HALO Penta-HILIC 2,1 x 150 mm, 2.7µm a ACQUITY UPLC BEH Amide 2,1 x 100 mm, 1.7µm. V termostatu byla nastavena teplota 30°C, v autosampleru 10°C. Měření se provádělo za podmínek izokratické eluce. Postupně se měnily poměry složek A a B od 28/72 % obj. do 10/90 % obj. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Nástřík na kolonu Penta-HILIC se rovnal 1 µl, v případě kolony BEH Amide – 1 µl (pro poměry 28/72 % obj. až 18/82 % obj.) a 4 µl (pro poměry 16/84 % obj. až 10/90 % obj.). Detekce se prováděla pomocí ESI-MS s trojitým kvadrupólem.

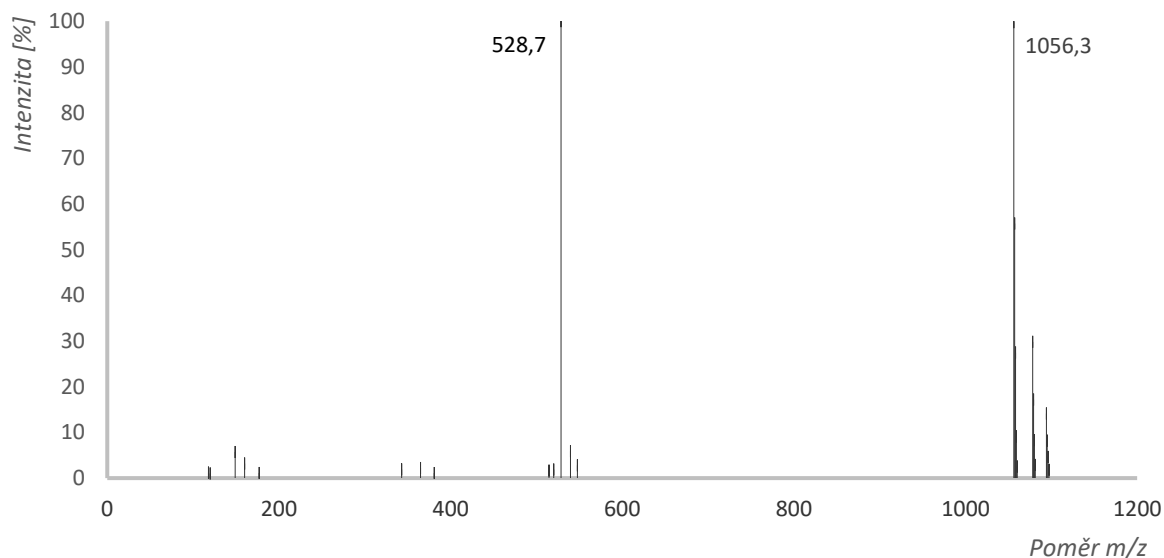
1.4 VÝSLEDKY A DISKUSE

1.4.1 Detekce peptidů pomocí ESI-MS

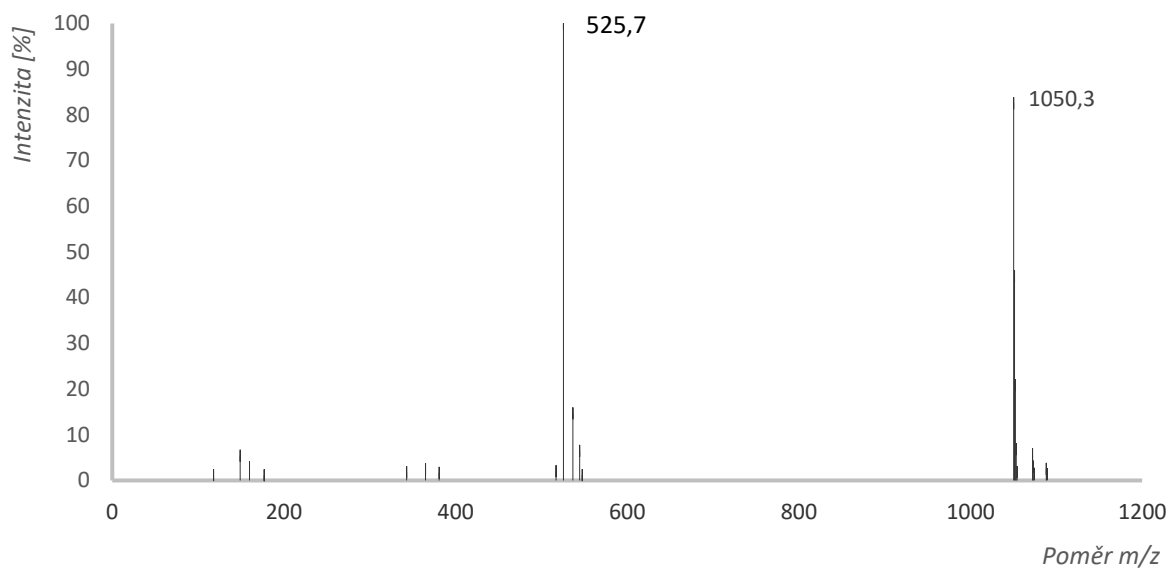
Bylo provedeno měření každého analytu v scan-módu MS od 100 do 1500 m/z. Záznamy jednotlivých MS spekter pro každý analyt jsou zobrazeny na obrázcích 6 až 12. Pro další chromatografická měření byl sledován vždy záznam charakteristického iontu daného analytu. Ionty, které byly monitorovány pro studované analyty jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Analyzované peptidy a poměr m/z charakteristických iontů v MS spektru

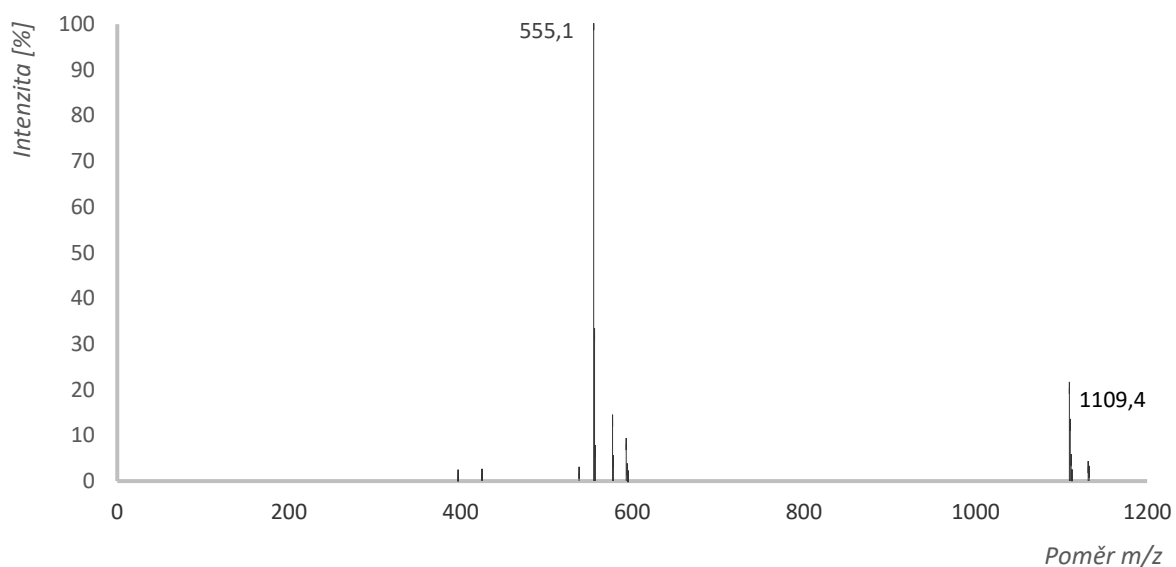
Název analytu	Hodnota poměru m/z
Lys8 Vasopresin	1056,3
Arg8 Vasotocin	1050,3
Leu-enkefalinamid	555,1
Leu-enkefalin	556,2
Met5-enkefalin	574,1
Angiotensin II	1046,4
Angiotensin I	1296,6



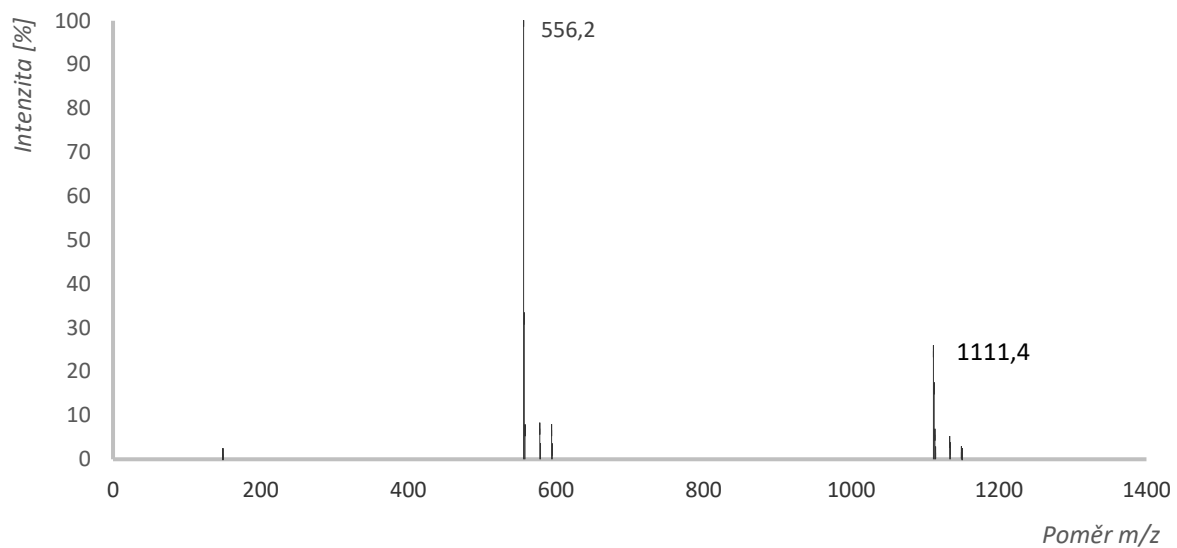
Obrázek 6. Hmotnostní spektrum Lys8 Vasopresinu získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



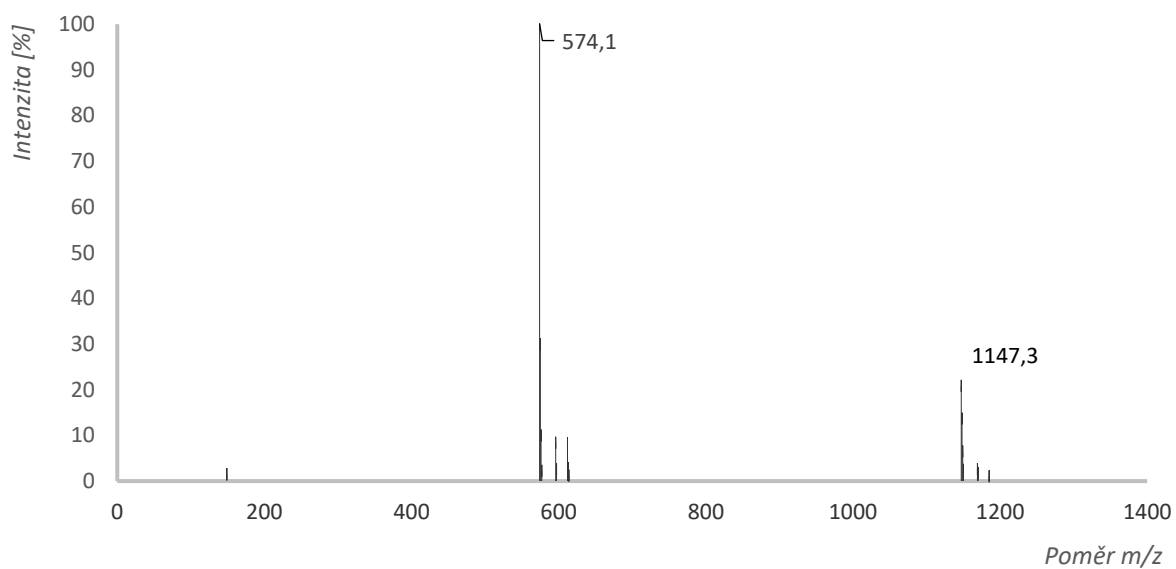
Obrázek 7. Hmotnostní spektrum Arg8 Vasotocinu získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



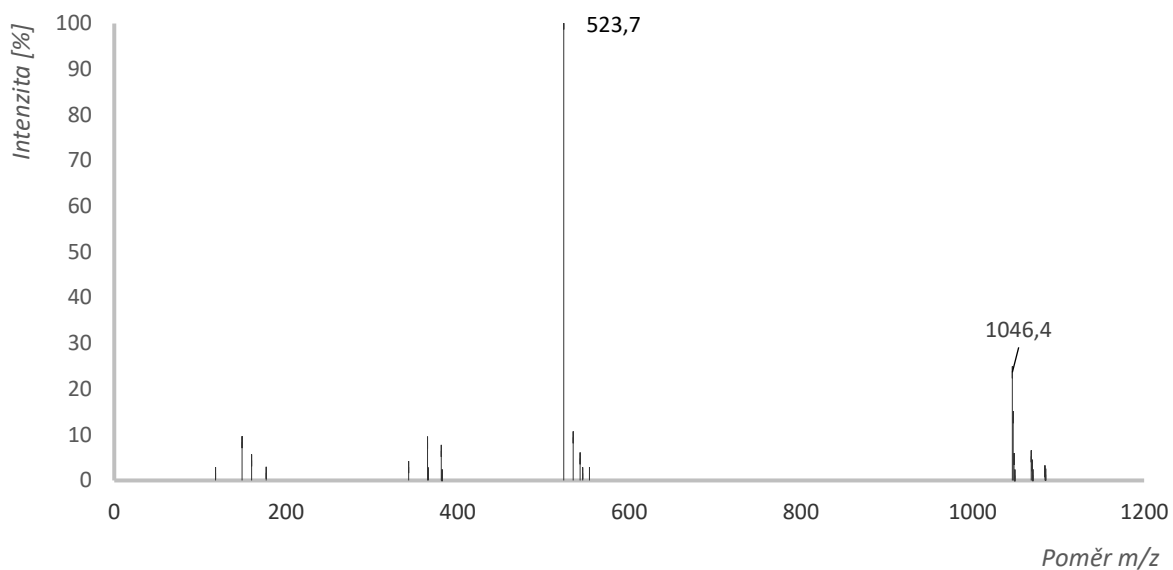
Obrázek 8. Hmotnostní spektrum Leu-enkefalinamidu získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



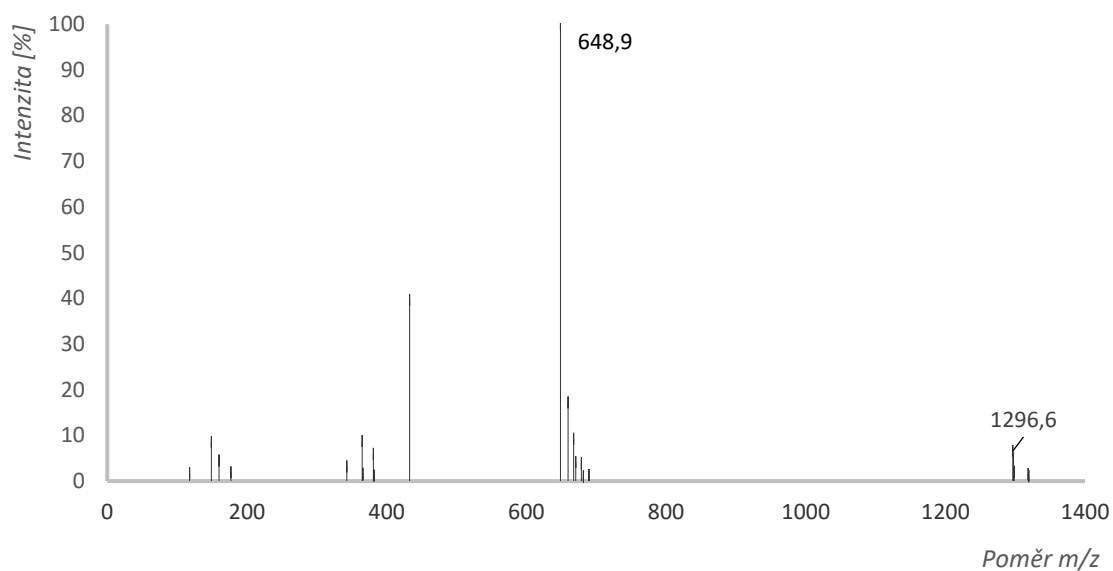
Obrázek 9. Hmotnostní spektrum Leu-enkefalinu získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



Obrázek 10. Hmotnostní spektrum Met5-enkefalinu získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



Obrázek 11. Hmotnostní spektrum Angiotensinu II získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu



Obrázek 12. Hmotnostní spektrum Angiotensinu I získáno pomocí ESI-MS v pozitivním módu

1.4.2 Separace peptidů a zjištění hlavního retenčního mechanismu

Byly provedeny separace směsi peptidů za podmínek izokratické eluce na dvou kolonách HALO Penta-HILIC a ACQUITY BEH Amide v HILIC režimu. Pro směs 7 peptidů byly využity poměry pufr/organická složka od 28/72 % obj. do 14/86 % obj. Kvůli vysoké retenci

angiotensinů byla pro měření retenčních časů za vysokého podílu organické složky v mobilní fázi (12/88 % obj. a 10/90 % obj.) použita směs bez oněch angiotensinů.

Hodnoty retenčních faktorů analyzovaných peptidů pro všechny měřené poměry ACN v MF pro obě kolony jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Na obrázcích 13 a 14 jsou pak uvedeny chromatogramy studovaných peptidů při poměru 18/82 % obj. pro obě kolony. Je z nich patrné, že kolona Penta-HILIC více zadržuje angiotensiny a enkefaliny. Lys8 Vasopresin a Arg8 Vasotocin jsou naopak více zadržované na koloně BEH Amide. Z tabulky 4 vidíme, že tento trend platí při všech poměrech ACN v MF. U Leu-enkefalinamidu nelze jednoznačně určit, na které koloně dochází k zadržování více. Při poměrech od 28/72 % obj. do 22/78 % obj. je více zadržován na koloně Penta-HILIC. Při vyšších poměrech organické složky je více zadržován na koloně BEH Amide (viz Tab. 3, 4).

Tabulka 3. Hodnoty retenčních faktorů peptidů na koloně HALO Penta-HILIC

Název peptidu	Poměr 50 mM mravenčan amonný/ACN									
	28/72	26/74	24/76	22/78	20/80	18/82	16/84	14/86	12/88	10/90
Lys8 Vasopresin	0,96	1,30	1,78	2,50	3,67	5,78	9,54	18,05	38,60	96,04
Arg8 Vasotocin	0,96	1,29	1,77	2,48	3,62	5,66	9,30	17,54	37,40	93,15
Leu-enkefalinamid	0,25	0,27	0,33	0,38	0,43	0,51	0,57	0,69	0,95	1,33
Leu-enkefalin	0,42	0,49	0,58	0,70	0,88	1,16	1,59	2,32	3,81	6,88
Met5-enkefalin	0,47	0,54	0,65	0,78	0,99	1,31	1,78	2,62	4,28	7,68
Angiotensin II	2,14	3,07	4,59	7,16	11,88	21,55	41,83	95,18		
Angiotensin I	1,81	2,63	4,01	6,39	10,84	20,20	40,63	96,75		

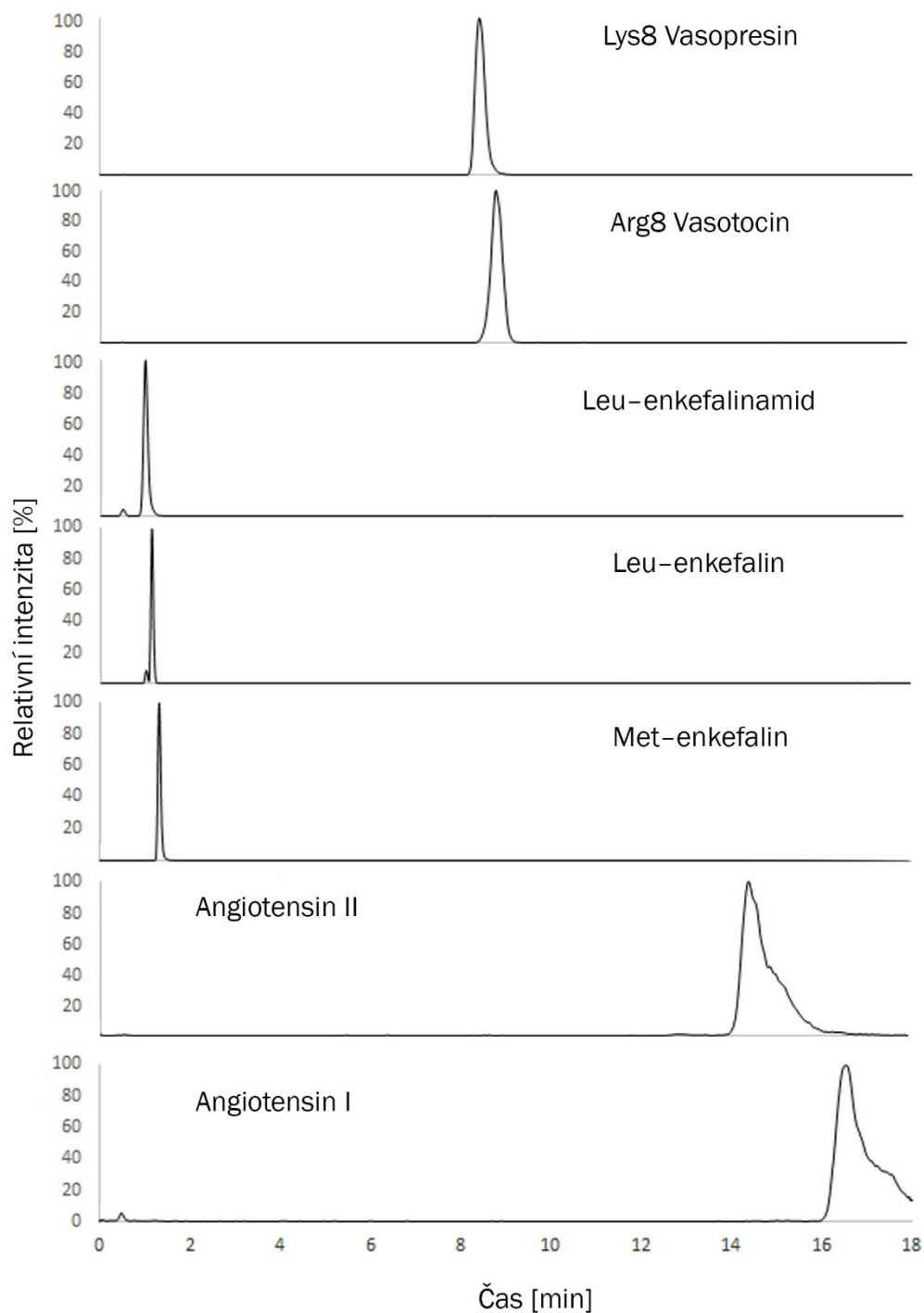
Tabulka 4. Hodnoty retenčních faktorů peptidů na koloně BEH Amide

Název peptidu	Poměr 50 mM mravenčan amonný/ACN									
	28/72	26/74	24/76	22/78	20/80	18/82	16/84	14/86	12/88	10/90
Lys8 Vasopresin	1,28	1,71	2,36	3,35	5,00	7,96	13,55	24,83	50,48	124,39
Arg8 Vasotocin	1,37	1,80	2,48	3,52	5,26	8,39	14,39	26,62	55,05	136,60
Leu-enkefalinamid	0,24	0,28	0,33	0,38	0,44	0,55	0,71	0,95	1,36	1,98
Leu-enkefalin	0,24	0,28	0,33	0,38	0,52	0,68	0,92	1,35	2,20	3,92
Met5-enkefalin	0,31	0,36	0,42	0,52	0,64	0,84	1,15	1,72	2,79	4,93
Angiotensin II	1,40	1,98	2,93	4,55	7,57	13,99	28,48	64,99		
Angiotensin I	1,51	2,14	3,21	5,08	8,55	16,12	33,01	76,70		

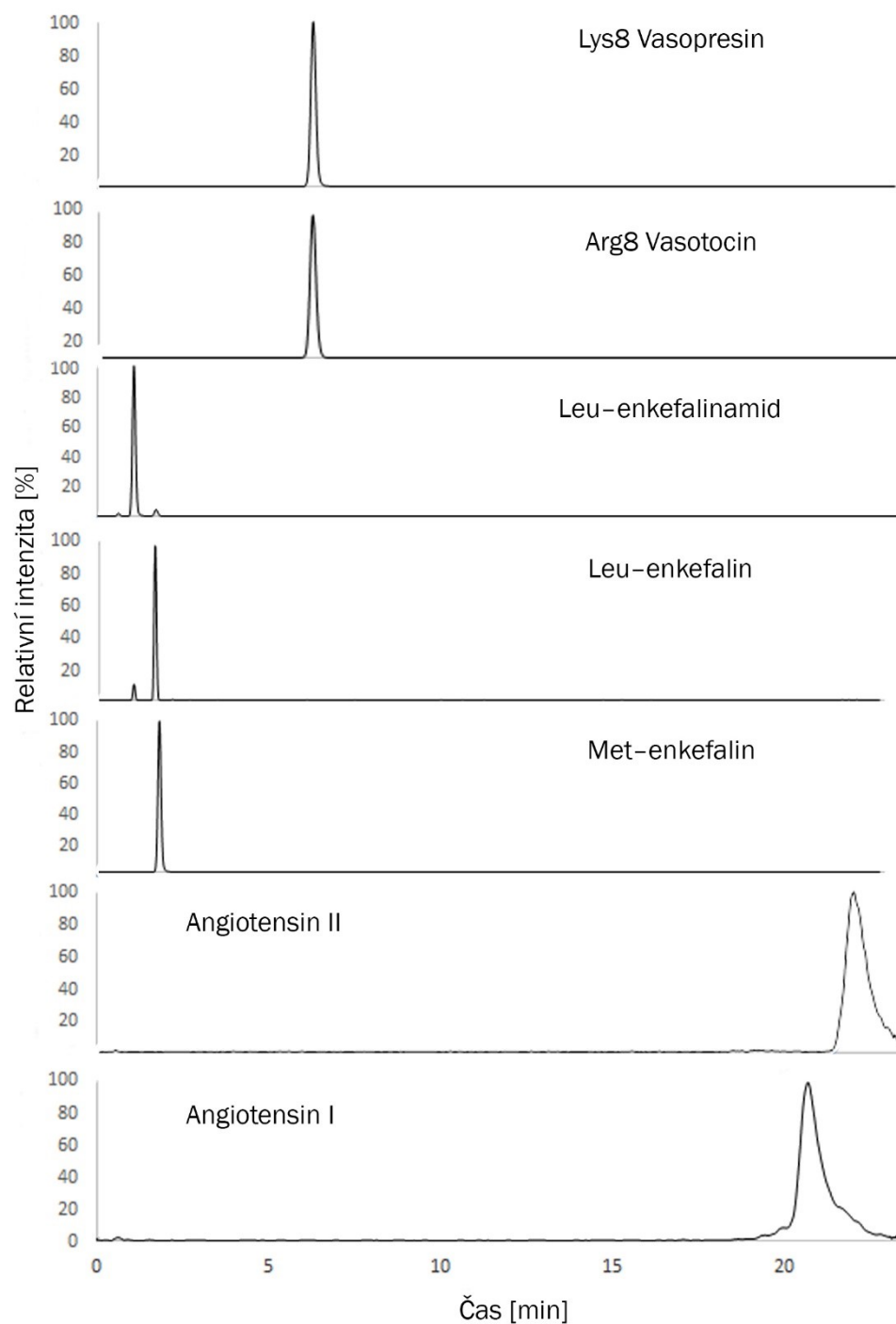
Jak je patrné z obrázků 13 a 14 všechny analyty mají úzké a symetrické píky kromě angiotensinů tvořících chvostující píky. To platí při všech poměrech pufru a organické složky MF. Píky na koloně Penta-HILIC jsou užší a separace na ní je lepší.

Eluční pořadí peptidů se na obou kolonách liší (viz Obr. 13, 14). V případě kolony Penta-HILIC při poměrech od 28/72 % obj. do 16/84 % obj. je pořadí Leu-enkefalinamid, Leu-enkefalin, Met5-enkefalin, Arg8 Vasotocin, Lys8 Vasopresin, Angiotensin I, Angiotensin II, při vyšším obsahu organické složky se eluční pořadí posledních dvou vyměnilo, jak je patrné z tabulky 3. Na koloně BEH Amide je při všech poměrech eluční pořadí stejné: první tři peptidy (Leu-enkefalinamid, Leu-enkefalin, Met5-enkefalin) eluují ve stejném pořadí jako u předchozí kolony, dále eluují Lys8 Vasopresin, Arg8 Vasotocin, Angiotensin II a Angiotensin I (viz Tab. 4).

Při nízkém obsahu ACN Leu-enkefalinamid, Leu-enkefalin a Met5-enkefalin mají přibližně stejný retenční faktor na obou kolonách (viz Tab. 3, 4). To je způsobeno tím, že strukturně mají tyto peptidy každý jednu polární aminokyselinu (Tyrosin) a přibližně shodné molekulové hmotnosti (554, 555 a 574). Výraznější rozdíly v retenčním faktoru jsou pozorovány až při zvýšeném množství ACN v MF: 86 % obj. a více v případě kolony Penta-HILIC a 84 % obj. a více v případě BEH Amide.



Obrázek 13. Chromatogramy separací směsi 7 peptidů na koloně Acquity BEH Amide. Mobilní fáze: 50 mM mravenčan amonný/ACN; pH=3,5; poměr 18/82 % obj. Eluční pořadí: 1. Leu-enkefalinamid; 2. Leu-enkefalin; 3. Met5-enkefalin; 4. Lys8 Vasopresin; 5. Arg8 Vasotocin; 6. Angiotensin II; 7. Angiotensin I.

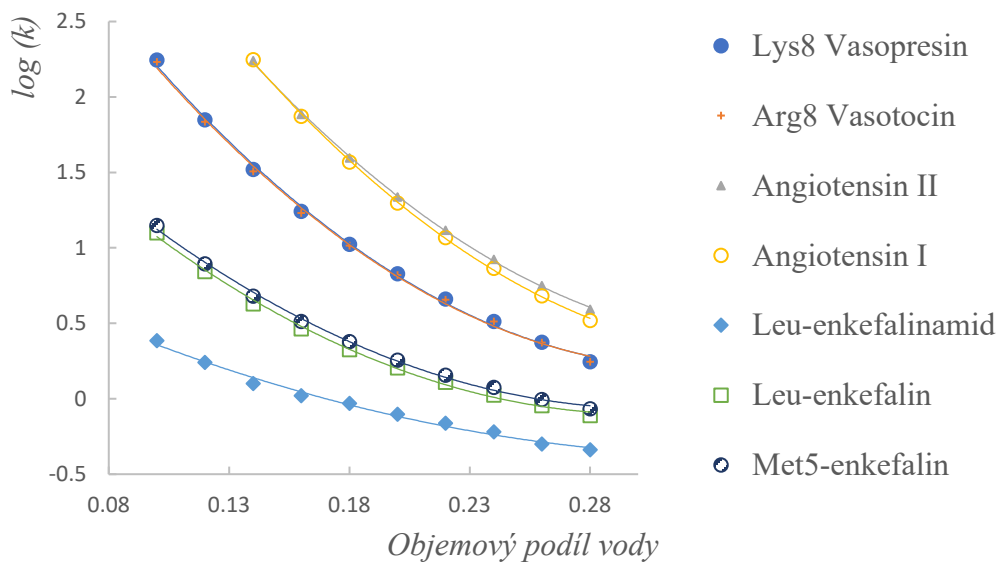


Obrázek 14. Chromatogramy separací směsi 7 peptidů na koloně HALO Penta-HILIC. Mobilní fáze: 50 mM mravenčan amonný/ACN; pH=3,5; poměr 18/82 % obj. Eluční pořadí: 1. Leu-enkefalinamid; 2. Leu-enkefalin; 3. Met5-enkefalin; 4. Arg8 Vasotocin; 5. Lys8 Vasopresin; 6. Angiotensin I; 7. Angiotensin II.

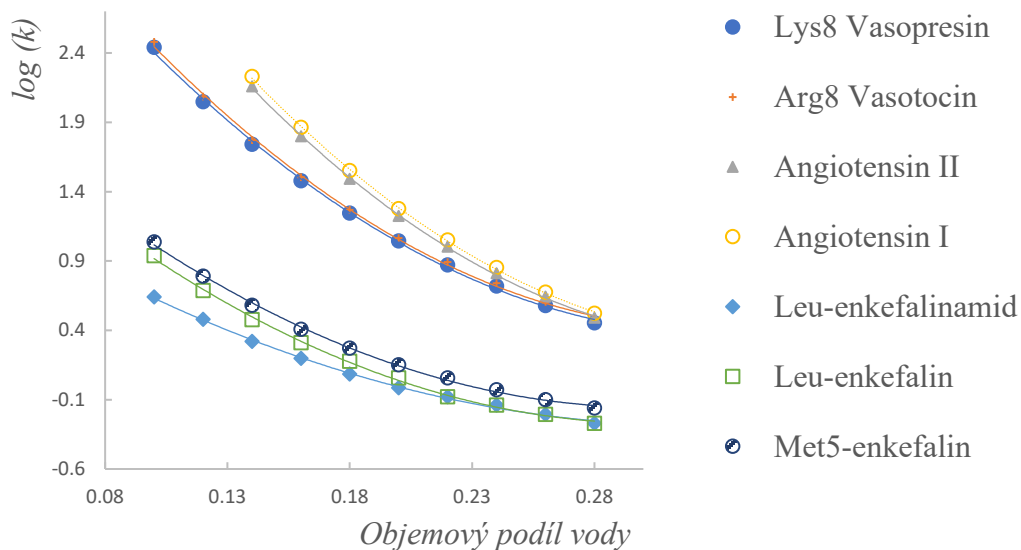
Lys8 Vasopresin a Arg8 Vasotocin mají při nízkém obsahu ACN na obou kolonách přibližně stejné retenční faktory. Např. při poměru 28/72 % obj. mají na koloně Penta-HILIC shodný retenční faktor 0,96, a na druhé koloně je rozdíl minimální – 1,28 a 1,37. Je to způsobeno tím, že ve struktuře každého z nich je 6 polárních aminokyselin, ze kterých 5 je stejných. S rostoucím obsahem ACN v MF se retenční faktory začínají více lišit, jak je patrné z tabulek 3 a 4. Rozdíly jsou přitom větší na koloně BEH Amide než na koloně Penta-HILIC.

Angiotensin I a Angiotensin II mají ve své sekvenci 5, resp. 4 polární aminokyseliny. Jejich eluční pořadí se na kolonách liší: na Penta-HILIC dříve eluuje větší peptid, na BEH Amide naopak menší Angiotensin II. Na koloně Penta-HILIC (viz Tab. 3) jsou retenční faktory odlišné už při nízkých poměrech organické složky (např. při poměru 28/72 % obj. je to 2,14 a 1,81). V případě kolony BEH Amide mají retenční faktory rozdíly menší (např. při poměru 28/72 % obj. je to 1,40 a 1,51), i zde k výraznějším rozdílům dochází se zvětšením poměru organické složky (např. při poměru 16/84 % obj. je to 28,48 a 33,01) (viz Tab. 4).

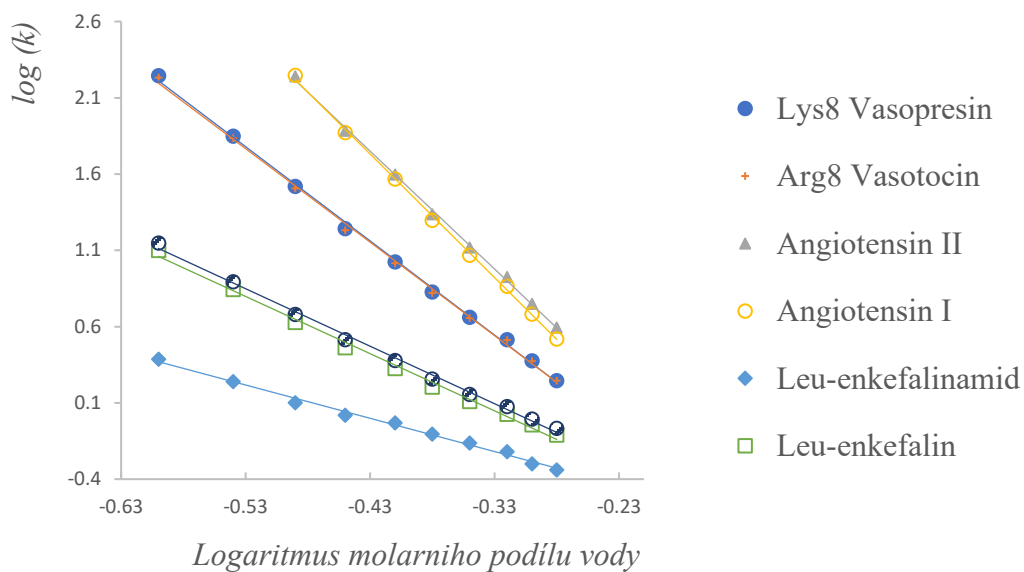
Separací, která se provádí při různých poměrech vodné/organické složky MF jsou získány retenční faktory různých peptidů na obou kolonách. Na základě těchto dat pro každou kolonu a každý peptid jsou vytvořeny závislosti, ze kterých lze usuzovat na převládající retenční mechanismus. Proložení závislostí logaritmu retenčních faktorů na objemovém podílu vody v mobilní fázi pomocí empirické rovnice dle Schoenmakerse získáme obrázky 15 a 16. A proložení závislostí logaritmu retenčních faktorů na logaritmu molárního podílu vody v mobilní fázi pomocí empirické rovnice dle Snyderse získáme obrázky 17 a 18. Koeficienty determinace pro všechny závislosti jsou uvedeny v tabulce 5.



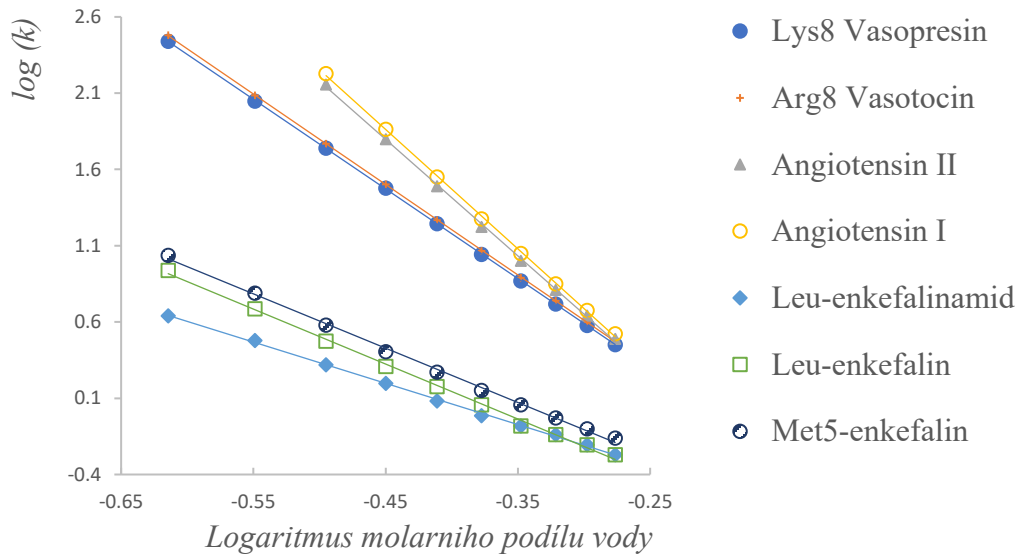
Obrázek 15. Závislost logaritmu retenčního faktoru Lys8 Vasopresinu, Angiotensinu II, Leu-enkefalinamidu, Leu-enkefalinu, Arg8Vasotocinu, Angiotensinu I, Met5-enkefalinu na objemovém podílu vodné složky v MF na koloně HALO Penta-HILIC.



Obrázek 16. Závislost logaritmu retenčního faktoru Lys8 Vasopresinu, Angiotensinu II, Leu-enkefalinamidu, Leu-enkefalinu, Arg8 Vasotocinu, Angiotensinu I, Met5-enkefalinu na objemovém podílu vodné složky v MF na koloně Acquity BEH Amide.



Obrázek 17. Závislost logaritmu retenčního faktoru Lys8 Vasopresinu, Angiotensinu II, Leu-enkefalinamidu, Leu-enkefalinu, Arg8 Vasotocinu, Angiotensinu I, Met5-enkefalinu na logaritmu molárního podílu vodné složky v MF na koloně HALO Penta-HILIC.



Obrázek 18. Závislost logaritmu retenčního faktoru Lys8 Vasopresinu, Angiotensinu II, Leu-enkefalinamidu, Leu-enkefalinu, Arg8 Vasotocinu, Angiotensinu I, Met5-enkefalinu na logaritmu molárního podílu vodné složky v MF na koloně Acquity BEH Amide.

Tabulka 5. Hodnoty koeficientů determinace peptidů, získané ze závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém podílu vody a na logaritmu molárního podílu vodné složky v MF na kolonách HALO Penta-HILIC a Acquity BEH Amide.

Kolona HALO Penta-HILIC		
Peptid	Koeficient determinace	
	Závislost logaritmu retenčního faktoru na objemovém podílu vodné složky v MF	Závislost logaritmu retenčního faktoru na logaritmu molárního podílu vodné složky v MF
Lys8 Vasopresin	0,9982	0,9986
Arg8 Vasotocin	0,9980	0,9984
Leu-enkefalinamid	0,9911	0,9943
Leu-enkefalin	0,9979	0,9957
Met5-enkefalin	0,9982	0,9964
Angiotensin II	0,9995	0,9988
Angiotensin I	0,9995	0,9988
Kolona Acquity BEH Amide		
Lys8 Vasopresin	0,9989	1,0000
Arg8 Vasotocin	0,9990	1,0000
Leu-enkefalinamid	0,9984	0,9991
Leu-enkefalin	0,9985	0,9976
Met5-enkefalin	0,9985	0,9979
Angiotensin II	0,9996	0,9994
Angiotensin I	0,9997	0,9996

Jak je patrné z tabulky 5, koeficienty determinace pro obě závislosti jsou vyšší než 0,9911, z čehož lze usuzovat, že na retenčním mechanismu studovaných analytů na obou testovaných kolonách se podílí jak rozdělování, tak i adsorpce a nelze říci, který z těchto dvou retenčních mechanismů je převládající.

1.5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo studováno retenční chování sedmi biologicky aktivních peptidů na dvou různých UHPLC kolonách, a to HALO Penta-HILIC a Acquity BEH Amide v HILIC podmínkách. Na základě testování vlivu obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci studovaných analytů na obou kolonách bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování analytů mezi hydratovanou stacionární fázi a mobilní fázi, tak i adsorpce analytů na povrch stacionární fáze. Vliv množství acetonitrilu v mobilní fázi na retenci studovaných peptidů byl testován v rozsahu od 72 do 90 % obj. V tomto rozmezí bylo potvrzeno typické retenční chování pro HILIC – se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi roste retence studovaných polárních peptidů. Retenční pořadí analytů se řídilo jejich polaritou. Nejnižší retenci měly enkefaliny, dále vasopresin a vasotocin a nejvíce byly na obou kolonách zadržovány angiotensiny.

Obě kolony poskytují odlišnou selektivitu. U dvojice analytů Lys8 Vasopresin/Arg8 Vasotocin bylo pozorováno opačné eluční pořadí, kdy na koloně HALO Penta-HILIC nejprve eluoval Lys8 Vasopresin a následně Arg8 Vasotocin, přičemž na koloně Acquity BEH Amide tomu bylo naopak. U kolony HALO Penta-HILIC došlo ke změně elučního pořadí angiotensinů u nejvyššího poměru acetonitrilu v mobilní fázi. Obě kolony poskytovaly symetrické úzké píky všech studovaných peptidů kromě angiotensinů, jejichž píky silně chvostovaly.

Ze získaných výsledků vyplývá, že obě testované kolony jsou vhodné pro analýzu polárních peptidů v HILIC podmínkách.

1.6 LITERATURA

- 1 Murray, R. K.: Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd., Praha: Galén 2012. Přeložil Bohuslav Matouš.
- 2 Pountos, I.; Panteli, M.; Lampropoulos, A.; Jones, E.; Calori, G. M.; Giannoudis, P. V.: The role of peptides in bone healing and regeneration: a systematic review. *BMC Med* 14: 103; (2016).
- 3 Fernández-Susavila, H.; Rodríguez-Yáñez, M.; Dopico-López, A.; Arias, S. et al.: Heads and Tails of Natriuretic Peptides: Neuroprotective Role of Brain Natriuretic Peptide. *Journal of the American Heart Association* 6:12; (2017).
- 4 Sewald, N.; Jakubke, H.D.: *Peptides: Chemistry and Biology* 2nd ed., Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2009).
- 5 Wieland, T.; Bodanszky, M.: *The World of Peptides: A Brief History of Peptide Chemistry*, Springer 1991.
- 6 Jakubke, H.D.; Sewald, N.: *Peptides from A to Z*. Wiley-VCH 2008.
- 7 Rabilloud, T.; Lelong, C.: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* 74:10; 1829–1841 (2011).
- 8 Celis, J. E.; Gromov, P.; Østergaard, M.; Madsen, P.; Honoré, B.; Dejgaard, K.; Olsen, E.; Vorum, H.; Kristensen, D. B.; Gromova, I. et al.: Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease. *FEBS Letters* 398:2–3; 129-134 (1996).
- 9 Toby, T. K.; Fornelli, L.; Kelleher, N. L.: Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu Rev Anal Chem* 9:1; 499–519 (2016).
- 10 Haramija, M.; Jovanovic, M.: *Introduction to Mass Spectrometry for Biomolecules*. Nova Science Publishers, 2016.
- 11 Chen, G.; Pramanik, B. N.: LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. *Expert Review of Proteomics* 5:3, 435–444 (2008).
- 12 Becker, C. H.; Bern, M.: Recent developments in quantitative proteomics. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 722:2, 171–182 (2011).
- 13 Zhou, F.; Lu, Y.; Ficarro, S. B.; Webber, J. T.; Marto, J. A.: A Nanoflow Low Pressure High Peak Capacity Single Dimension LC MS/MS Platform for High Throughput In Depth Analysis of Mammalian Proteomes. *Anal Chem* 84:11, 5133–5139 (2012).

- 14 MacNair, J. E.; Patel, K. D.; Jorgenson, J. W.: Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography: Isocratic and Gradient Elution Using Columns Packed with 1.0- μ m Particles. *Analytical Chemistry* 71:3, 700–708 (1999).
- 15 Aguilar, M.I.: *HPLC of Peptides and Proteins*. Humana press 2003.
- 16 Stavros Kromidas et al.: *The HPLC Expert II: Find and Optimize the Benefits of your HPLC/UHPLC*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2017.
- 17 What is the Difference Between UHPLC and UPLC? *Chromatography Today*, Jul 04 2014. URL: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754> [cit. 21. března, 2019].
- 18 Stavros Kromidas et al.: *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. Wiley-VCH 2017.
- 19 Ferey, L.; Gaudin, K.; Somé, I.T.; Yabré, M.: Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules* 23:5 (2018)
- 20 Li, D.X.; Gan, L.; Bronja, A.; Schmitz, O. J.: Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Analytica Chimica Acta* 891, 43–61 (2015).
- 21 Norková, R.; Jaklová, J.: Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chem. Listy* 107, 949–955 (2013)
- 22 Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R.: An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5:11, 976–989 (1994).
- 23 Mótyán, J. A.; Tóth, F.; Tózsér, J.: Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* 3:4, 923–942 (2013).
- 24 Kelleher, N.L.; Savaryn, J.P.; Toby, T.K.: A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics* 16:18, 2435–2443 (2016)
- 25 Buszewski, B.; Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 402:1, 231–247 (2012).
- 26 Alpert, A.J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 499, 177-196 (1990)
- 27 Bensaddek, D.; Lamond, A.I.; Nicolas, A.: Evaluating the use of HILIC in large-scale, multidimensional proteomics: Horses for courses? *Int J Mass Spectrom.* 391, 105-114 (2015)

- 28 Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* 391:1, 151–159 (2008).
- 29 Buszewski, B.; Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 402:1, 231–247 (2012).
- 30 A Practical Guide to HILIC Mechanisms, Method Development and Troubleshooting. HILIC Separations Technical Guide, Thermo Scientific 2014. URL: https://www.researchgate.net/profile/Christian_Fernandes/post/How_much_of_a_water_layer_is_required_in_HILIC_column_to_effectively_bind_hydrophobic_compounds/attachment/59d6587579197b80779ae5fe/AS%3A538468254220289%401505392244375/download/Thermo%2C+HILIC+Separations+-+A+Practical+guide+to+HILIC+mechanisms%2C+method+development+and+trouble+shooting.pdf [cit. 26. března, 2019].
- 31 Hemström, P.; Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29:12, 1784–1821 (2006).
- 32 Guo, Y.; Gaiki, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074:1-2, 71–80 (2005).
- 33 Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H.: Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1357, 36–52 (2014).
- 34 HALO_PentaHILIC. URL: https://www.hplc.eu/Downloads/HALO_PentaHILIC.pdf [cit. 23. března, 2019].
- 35 Badgett, M. J.; Boyes, B.; Orlando, R.: The Separation and Quantitation of Peptides with and without Oxidation of Methionine and Deamidation of Asparagine Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (HILIC-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28:5, 818–826 (2017).
- 36 Kirkland, J. J.; Schuster, S. A.; Johnson, W. L.; Boyes, B. E.: Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 3:5, 303–312 (2013).
- 37 Badgett, M. J.; Boyes, B.; Orlando, R.: Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1537, 58–65 (2018).

- 38 Kozlik, P.; Goldman, R.; Sanda, M.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Anal. Bioanal. Chem.* 410:20, 5001–5008 (2018).
- 39 Simon, R.; Enjalbert, Q.; Biarc, J.; Lemoine, J.; Salvador, A.: Evaluation of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) versus C-18 reversed-phase chromatography for targeted quantification of peptides by mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* 1264, 31–9 (2012).
- 40 ACQUITY UPLC BEH Amide Columns. URL: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003122en.pdf> [cit. 18. března, 2019].
- 41 Bowman, M.J.; Costello, C. E.; Hitchcock, A. M.; Lau, J. M.; Leymarie, N.; Miller, C.; Naimy, H.; Staples, G. O.; Shi, X.; Zaia, J.: A Chip-based Amide-HILIC LC/MS Platform for Glycosaminoglycan Glycomics Profiling. *Proteomics* 9:3, 686–695 (2009)
- 42 Ge, Y.; Tang, Y.; Guo, S.; Liu, X.; Zhu, Z.; Liu, P.; Duan, J.: Comparative Analysis of Amino Acids, Nucleosides, and Nucleobases in *Thais clavigera* from Different Distribution Regions by Using Hydrophilic Interaction Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, Research article (2015).
- 43 Jablonski, J. A. M.: Preparative Scale Chromatography of a Hydrophilic Peptide using Hydrophilic Interaction Chromatography, Waters. URL: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004283en.pdf> [cit. 22. března, 2019].
- 44 Wen, Y.; Yuan, X.; Qin, F.; Zhao, L.; Xiong, Z.: Development and validation of a hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of 19 free amino acids in rat plasma and urine. *Biomed. Chromatogr.* 33:1, (2019).
- 45 FitzGerald, R. J.; Le Maux, S.; Nongonierma, A. B.: Improved short peptide identification using HILIC–MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry* 173, 847–854 (2015).
- 46 Henk, A. C.: Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability, Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven (1999).

- 47 Braumann, T.: Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *Journal of Chromatography A* 373, 191–225 (1986).
- 48 Snyder, L. R.; Poppe, H.: Mechanism of solute retention in liquid - solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation. *Journal of Chromatography A* 184:4, 363–413 (1980).
- 49 Chirita, R.I.; West, C.; Zubrzycki, S.; Finaru, A.L.; Elfakir, C.: Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 218:35, (2011).
- 50 Kozlik, P.; Bosáková Z.; Kalíková K.; Símová, V.; Tesarova E.; Armstrong D.W.: Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases. *Journal of chromatography* 1257:58-65, (2012).