

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

**Moderní reverzní stacionární fáze na bázi silikagelu,  
oxidu zirkoničitého a organických monolitů;  
využití v analýze biologicky aktivních látek**

Synopse k disertační práci

Praha 2008

Klára Soukupová

Tato disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2003 – 2008.

Autor: Mgr. Klára Soukupová

Školitelé: RNDr. Jana Suchánková-Sobotníková, Ph.D

Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2008

## **OBSAH**

1. Úvod	2
2. Cíle disertační práce	3
3. Výsledky a diskuze	4
4. Shrnutí	12
5. Citace	14
Příloha 1: Seznam publikací, přednášek a plakátových sdělení	15
Příloha 2: Curriculum Vitae	17

# 1. Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní instrumentální metodou se širokým spektrem využití převážně v oblasti aplikací analytické chemie. Z běžně používaných separačních módů je nejdominantnější reverzní kapalinová chromatografie (RP HPLC). Tato metoda je velmi žádaná především díky své separační účinnosti, spolehlivosti a velkému výběru stacionárních fází s odlišnými vlastnostmi.

Nejpoužívanější stacionární fáze v RP HPLC jsou chemicky vázané fáze, které mají řadu výhod, mezi které patří jejich dobrá dostupnost, velké aplikační pole, rychlé ustavování rovnováhy a možnost kombinace s vodnými mobilními fázemi<sup>1</sup>. Klasickým nosičem těchto fází je silikagel. Silikagel má mnoho výhod (např. nesmršťuje se, nebobtná), ale na druhé straně vykazuje omezenou chemickou a teplotní stabilitu<sup>2</sup>. Na základě těchto faktů je snahou modifikovat silikagel<sup>3</sup> nebo jej nahradit zcela jiným nosičem, např. oxidem zirkoničitým<sup>4, 5</sup> nebo organickými polymery<sup>6</sup>. Samostatnou skupinu moderních stacionárních fází tvoří materiály na bázi silikagelových a organických monolitů. Nová generace reverzních stacionárních fází vykazuje lepší stabilitu, jak chemickou, tak teplotní, vyšší selektivitu a separační účinnost. Hlavní předností těchto fází je, že jsou na nich výrazně potlačeny nežádoucí interakce typické pro látky bazické povahy.

Významným trendem je v současné době miniaturizace nejen kolon, ale i ostatních částí kapalinového chromatografu<sup>7, 8</sup>. Výhodou miniaturizované HPLC, např. kapilární kapalinové chromatografie (cLC), je velmi malá spotřeba vzorku, malý průtok mobilní fáze, s tím spojená její nižší spotřeba, a menší chromatografické zředění vzorku v koloně, což přináší vyšší citlivost detekce. V cLC se používají kolony, respektive stacionární fáze jako v klasické HPLC, ale liší se velikostí vnitřního průměru, délkou kolony, případně velikostí částic a pórů sorbentu.

RP HPLC a RP cLC jsou důležité a účinné metody identifikace a kvantifikace peptidů a proteinů, jejich derivátů nebo jejich metabolitů. Peptidy a proteiny jsou častým předmětem bioanalytického, farmaceutického a lékařského výzkumu, proto se úkolem analytického chemika stává vývoj účinné a vysoce selektivní separační metody, která umožní dělení velmi složitých směsí biologicky aktivních látek.

Tato disertační práce je zaměřena na studium chromatografického chování vybraných biologicky aktivních pentapeptidů a nonapeptidů na třech odlišných typech stacionárních fází.

## 2. Cíle disertační práce

V disertační práci byla pozornost zaměřena na studium chromatografického chování vybraných biologicky aktivních pentapeptidů a nonapeptidů (*Tabulka 2.1*) na různých reverzních stacionárních fázích (*Tabulka 2.2*), a to na bázi silikagelu, oxidu zirkoničitého a organických monolitů, v různých systémech mobilní fáze. Na základě získaných dat byly stacionární fáze kriticky porovnány a byla zhodnocena vhodnost jejich použití respektive jejich omezení pro analýzu peptidů.

### Tabulka 2.1

Přehled použitých pentapeptidů a nonapeptidů.

<b>Pentapeptidy</b>	<b>Sekvence aminokyselin</b>
methionin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
leucin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
D-alanin <sup>2</sup> ,leucin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu
leucin <sup>5</sup> -enkefalinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH <sub>2</sub>

<b>Nonapeptidy</b>	<b>Sekvence aminokyselin</b>
arginin <sup>8</sup> -vasopresin (AVP)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>
lysin <sup>8</sup> -vasopresin (LVP)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-GlyNH <sub>2</sub>
oxytocin (OXT)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH <sub>2</sub>
arginin <sup>8</sup> -oxytocin (AVT, vasotocin)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>
isotocin (ISO)	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-GlyNH <sub>2</sub>
deaminoCys <sup>1</sup> ,D-arginin-vasopresin (dDAVP, desmopresin)	Mpa <sup>*</sup> -Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-GlyNH <sub>2</sub>

\* 3-merkaptopropionová kyselina; Vasopresinové analogy mají mezi Cys 1 a Cys 6 disulfidický můstek.

### Tabulka 2.2

Přehled testovaných kolon a jejich fyzikálně-chemických vlastností.

<b>Kolona</b>	<b>Nosič</b>	<b>Vázaná fáze</b>	<b>Tvar částic</b>	<b>Velikost pórů (Å)</b>	<b>Specifický povrch (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Teplotní limit (°C)</b>	<b>Rozsah pH</b>
<b>Supelcosil C18</b>	silikagel	C18	kulovitý	120	170	60	2–7
<b>Discovery HS F5</b>	silikagel	pentafluor-fenylpropyl	kulovitý	120	300	70	2–8
<b>Discovery Zr PBD</b>	ZrO <sub>2</sub>	poly-butadien	kulovitý	300	30	150	1–13
<b>Monolit</b>	–	–	kompaktní materiál	200	24	–	–

Monolity jsou novým materiálem a všechny jeho vlastnosti nebyly ještě potvrzeny, proto jsou některé kolonky nevyplněné

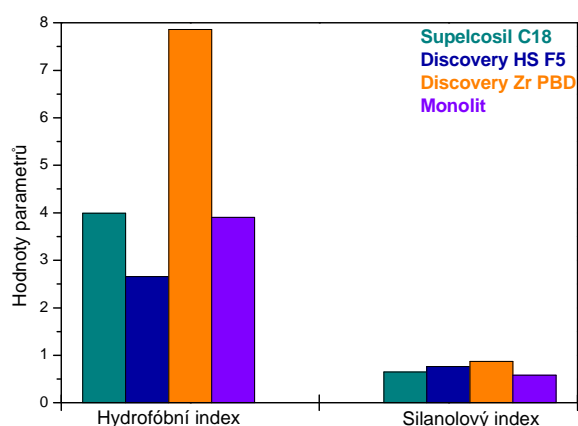
### 3. Výsledky a diskuse

Experimentální výsledky popsané a shrnuté v disertační práci lze rozdělit do 4 částí. V první části je popsán Waltersův test a jeho výsledky získané pro použité stacionární fáze. Další 3 části se dělí podle typu stacionární fáze, která byla použita pro studium chromatografického chování vybraných pentapeptidů a nonapeptidů. V druhé části jsou tedy popsány výsledky chromatografického chování peptidů na komerčně dostupných reverzních stacionárních fázích na bázi silikagelu, konkrétně na kolonách Supelcosil C18 a Discovery HS F5. Třetí část tvoří výsledky získané s využitím moderní komerčně dostupné fáze na bázi oxidu zirkoničitého, Discovery Zr PBD a ve čtvrté části byl využit butyl-methakrylátový monolit jako stacionární fáze pro cLC, který byl připraven na Katedře analytické chemie PŘF UK v Praze.

#### 3.1 Waltersův test

K charakterizaci a klasifikaci stacionárních fází byla navržena řada testovacích metod. Důvodem pro testování fází je jejich velká variabilita a obtíže při výběru fází pro separaci především problematických analytů, např. bazických látek.

Před započítáním experimentů byly všechny používané kolony otestovány Waltersovým testem, který slouží k charakterizaci stacionárních fází na základě dvou převládajících interakcí v RP HPLC, hydrofobní a polární interakce. Na základě tohoto testu bylo zjištěno, že vybrané stacionární fáze mají rozdílné hodnoty hydrofobního indexu (HI) a liší se i ve své polaritě (SI) (*obr. 3.1.1*). Tento výběr kolon s odlišnými vlastnostmi vytváří prostor k dobré charakterizaci separačního chování vybraných peptidů a vytváří prostor pro možnou dvou (více) dimenzionální separaci.



*Obr. 3.1.1*

Srovnání kolon podle dosažených hodnot hydrofobního indexu a indexu polaritě.

Dále byl Waltersův test prováděn po skončení jednotlivých optimalizačních kroků, tedy vždy po skončení používání vybrané pufované mobilní fáze. Z výsledků vyplývá, že používané pufrы,

vodné složky mobilní fáze, neměly výrazný vliv na vlastnosti (HI, SI) testovaných kolon. Jedinou výjimkou byla zirkoniová kolona Discovery Zr PBD, kde vlivem používaných pufrů, fosforečnanového a octanového, v mobilní fázi došlo k poklesu HI (o 25 %) a nárůstu indexu polarity (o 31 %).

### 3.2 Silikagelové stacionární fáze

První celek tvoří experimenty prováděné na silikagelových komerčně dostupných stacionárních fázích. Jedná se o kolony Supelcosil C18 a Discovery HS F5 od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA). První zmiňovaná kolona je klasická C18 kolona, speciálně deaktivovaná pro analýzu bazických látek. Druhá kolona Discovery HS F5 je relativní novinkou na trhu. Jde o silikagelovou stacionární fázi s navázanou pentafluorfenylpropylovou skupinou. Tento typ kolon vykazuje, dle údajů výrobce, dobré tvary píků, velkou stabilitu a kompatibilitu s MS detekcí.

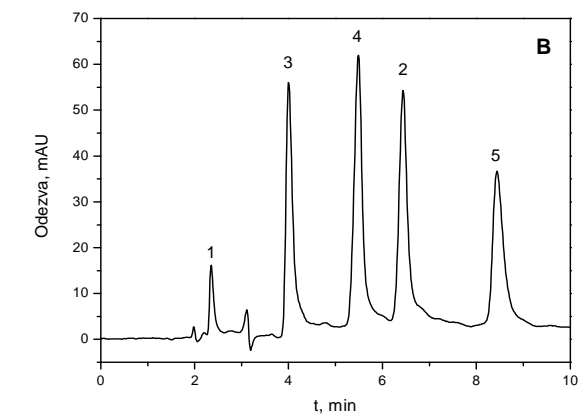
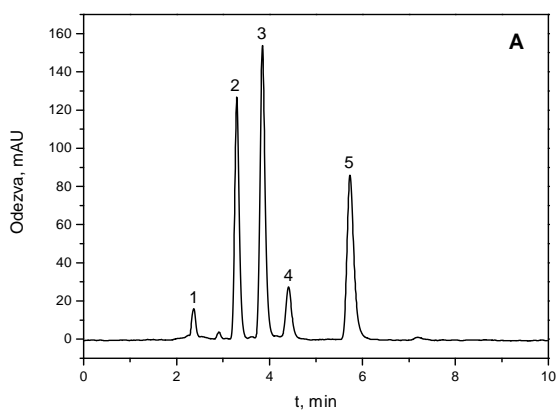
Na obou kolonách bylo sledováno chromatografické chování vybraných pentapeptidů a nonapeptidů v různých mobilních fázích, které byly tvořeny organickou složkou, acetonitrilem (ACN), a vodnou složkou, fosforečnanovým, octanovým nebo mravenčanovým pufrům. Cílem bylo dosáhnout rychlé a účinné separace studovaných analytů.

#### 3.2.1 Pentapeptidy

První skupinu studovaných analytů tvoří směs 4 pentapeptidů (viz. *Tabulka 2.1*). Pro nalezení podmínek, vhodných pro separaci této směsi, byly postupně optimalizovány následující parametry: pH a koncentrace pufru, jako vodné složky mobilní fáze, a také poměr organické složky, ACN, a vybraného pufru.

Vyhodnocením naměřených dat bylo zjištěno, že směs pentapeptidů byla nejlépe separována v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN} \cdot 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v) na koloně Supelcosil C18. Separace směsi na této koloně proběhla do 7 min (*Obr. 3.2.1.1 A*) a všechny sledované parametry separace byly vyhovující (rozlišení ( $R_s$ )  $\geq 2,8$ ; symetrie píků ( $A_s$ )  $\leq 1,3$ ; účinnost vyjádřená počtem pater na metr kolony (tp/m)  $\sim 38\ 000$ ). Směs pentapeptidů byla na koloně Discovery HS F5 nejlépe separována v mobilní fázi  $\text{ACN} \cdot 8 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 22/78 (v/v) (*Obr. 3.2.1.1 B*). V této mobilní fázi separace proběhla do 10 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 2,8$ ) a symetrií ( $A_s \leq 1,7$ ). Vypočítaná účinnost separace, vyjádřená počtem pater na metr kolony, se pohybovala okolo 26 000 v závislosti na analytu.

Porovnáním získaných výsledků byla pro separaci směsi pentapeptidů nesporně lepší kolona Supelcosil C18, tedy klasická C18 stacionární fáze.



### Obr. 3.2.1.1 A

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN-5·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v)

### Obr. 3.2.1.1 B

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN-8·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5 22/78 (v/v)

Experimentální podmínky: teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10 µl; UV detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) D-Ala,Leu-enkefalin; (3) Met-enkefalin; (4) Leu-enkefalin; (5) Leu-enkefalinamid

## 3.2.2 Nonapeptidy

Druhou skupinou analytů, u kterých bylo studováno retenční chování, byly vybrané nonapeptidy (viz *Tabulka 2.1*). Jde o látky strukturně odlišné od pentapeptidů. Struktura nonapeptidů je tvořena cyklickou částí uzavřenou disulfidickým můstkem a zbývajících 3 aminokyselinami, které tvoří volný a pro interakce dobře přístupný konec.

Analogicky jako v případě enkefalinů byl nejprve sledován vliv pH a koncentrace použitých pufrů, a vliv poměru ACN a pufrů v mobilní fázi na retenční chování studovaných nonapeptidů – vasopresinů. Vodné složky mobilní fáze byly tvořeny fosforečnanovým a octanovým pufrům.

Vyhodnocením získaných výsledků byly jako nejvhodnější systémy pro separaci směsi nonapeptidů vybrány tyto:

### kolona **Supelcosil C18**

ACN-1·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v)

ACN-3·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 5,0 20/80 (v/v)

### kolona **Discovery HS F5**

ACN-7·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v)

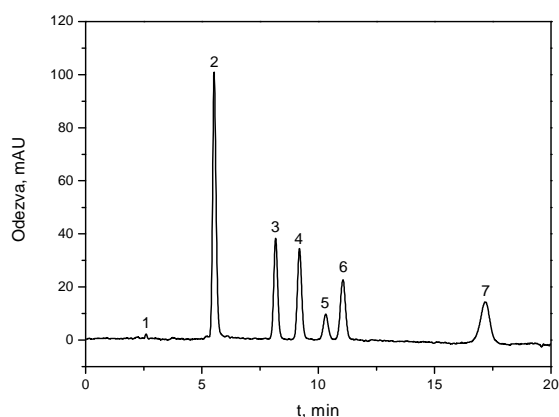
ACN-5·10<sup>-2</sup> mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 6,5 21/79 (v/v)



Z výsledků pro kolonu Supelcosil C18 vyplývá, že výsledné mobilní fáze mají při použití rozdílných pufrů podobné hodnoty pH, koncentrace i poměru ACN a pufru, ale výsledné separace se značně liší. Separace v mobilní fázi ACN-fosforečnanový pufr se podařila do 26 min, ale nedošlo k rozdělení Arg- a Lys-vasopresinu ( $R_s \sim 0,6$ ). V systému ACN-octanový pufr nedošlo ani v optimalizované mobilní fázi k oddělení isotocinu od uracilu ( $t_m$ ), ostatní analyty byly rozděleny do 10 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,2$ ). V této mobilní fázi se změnilo eluční pořadí analytů isotocinu, oxytocinu a desmopresinu oproti mobilní fázi ACN-fosforečnanový pufr. Tento fakt ukazuje na odlišnou selektivitu separačního systému kolony Supelcosil C18 a mobilní fáze ACN-octanový pufr. Vypočítaná účinnost byla v rozmezí 15 000 – 22 000 tp/m v závislosti na analytu pro mobilní fázi ACN-fosforečnanový pufr a 18 000 – 24 000 tp/m v závislosti na analytu pro mobilní fázi ACN-octanový pufr.

Výsledky na koloně Discovery HS F5 ukazují, že v mobilní fázi ACN-fosforečnanový pufr došlo k rozdělení všech 6 vasopresinů do 18 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,8$ ) a dobrou symetrií píků ( $A_s \leq 1,3$ ). Ve druhé mobilní fázi tvořené ACN-octanovým pufr se nepodařilo úplně rozdělit analyty isotocin a Arg-vasotocin a Lys- a Arg-vasopresin až na základní linii. V této mobilní fázi opět došlo ke změně elučního pořadí, kdy isotocin eluoval jako první. Vypočítaná účinnost byla v rozmezí 37 000 – 47 000 tp/m v závislosti na analytu pro mobilní fázi ACN-fosforečnanový pufr a 17 000 – 30 000 tp/m v závislosti na analytu pro mobilní fázi ACN-octanový pufr.

Z dosažených výsledků vyplývá, že nejvhodnější pro separaci směsi vasopresinů se jeví kolona Discovery HS F5 a mobilní fáze  $\text{ACN} \cdot 7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v) viz *Obr. 3.2.2.1*. Dalším výsledovaným faktem je značná nestabilita základní linie při použití mobilní fáze obsahující octanový pufr, což je dáno velkou UV absorpcí tohoto pufru.



#### Obr. 3.2.2.1

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze  $\text{ACN} \cdot 7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Arg-vasotocin; (3) Lys-vasopresin; (4) Arg-vasopresin; (5) isotocin; (6) oxytocin; (7) desmopresin.

### 3.3 Zirkoniová stacionární fáze

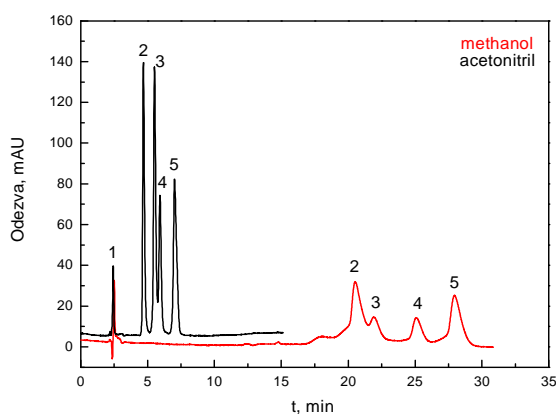
Přínos zirkoniových kolon spočívá především v jejich vynikající chemické stabilitě a jejich teplotní stabilitě. Separační mechanismus je zcela odlišný od silikagelových kolon a je založen na Lewisově teorii kyselin a zásad.

Zirkoniová kolona Discovery Zr PBD byla použita pro optimalizaci separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů s mobilními fázemi obsahujícími ACN nebo MetOH jako organickou složku a fosforečnanový nebo octanový pufr jako vodnou složku. Tyto pufrы, zvláště fosforečnanový, působí jako silné lewisovské báze, které na těchto stacionárních fázích vykazují vysokou eluční sílu. Teplota byla zařazena jako další optimalizační parametr, protože zirkoniové kolony vykazují větší teplotní stabilitu v porovnání se silikagelovými stacionárními fázemi.

#### 3.3.1 Pentapeptidy

Zirkoniové kolony jsou na trhu relativní novinkou, proto nebyl v odborné literatuře nalezen žádný odkaz týkající se zirkoniových fází a separace peptidů. Z tohoto důvodu byl jako první zkoušen vliv organického modifikátoru, ACN a MetOH, na retenční chování analytů.

Byly pozorovány velké rozdíly mezi oběma testovanými modifikátory (*Obr. 3.3.1.1*). Z obrázku je patrné, že v mobilní fázi obsahující MetOH došlo ke značnému prodloužení retenčních časů a píky byly nesymetrické. Na základě naměřených výsledků byl pro další měření jako organický modifikátor používán ACN.



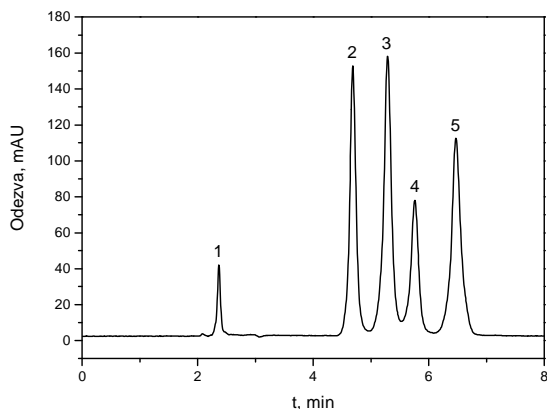
*Obr. 3.3.1.1*

Vliv organického modifikátoru na retenční chování studovaných analytů. Mobilní fáze obsahovala MetOH / ACN a  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 2,0 50/50 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkovaný objem 10  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 214 nm. Identifikace píků : (1) uracil, (2) D-Ala-Leu-enkefalin, (3) Met-enkefalin, (4) Leu-enkefalin, (5) Leu-enkefalinamid

Dále bylo optimalizováno pH a koncentrace fosforečnanového pufru, a poměr ACN a tohoto pufru v mobilní fázi. Jak již bylo uvedeno, zirkoniové stacionární fáze jsou díky svým vlastnostem vhodné pro použití za vyšší teploty, proto byla sledována i teplota jako další optimalizační parametr.

Z výsledků optimalizace vyplývá, že nejvhodnější podmínky pro separaci směsi 4 pentapeptidů na zirkoniové koloně jsou ACN- $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v) při teplotě 70 °C (*Obr. 3.3.1.2*). Za těchto podmínek došlo k rozdělení všech 4 enkefalinů téměř na základní linii do 7 min ( $R_s$  1,9-2,9;  $A_s \leq 1,4$ ;  $t_p/m \sim 20\,000$ ). Oproti silikagelové koloně Supelcosil C18 došlo

k záměně elučního pořadí D-Ala, Leu-enkefalinu, který na silikagelové koloně eluuje jako druhý v pořadí a na koloně Discovery Zr PBD jako předposlední. Výhodou zirkoniové kolony Discovery Zr PBD je možnost použití silně kyselé mobilní fáze (pH 2,0) bez nebezpečí poškození kolony, jak je tomu u silikagelových kolon.



### Obr. 3.3.1.2

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze  $\text{ACN} \cdot 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v); teplota 70 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Met-enkefalin; (3) Leu-enkefalin; (4) D-Ala,Leu-enkefalin; (5) Leu-enkefalinamid.

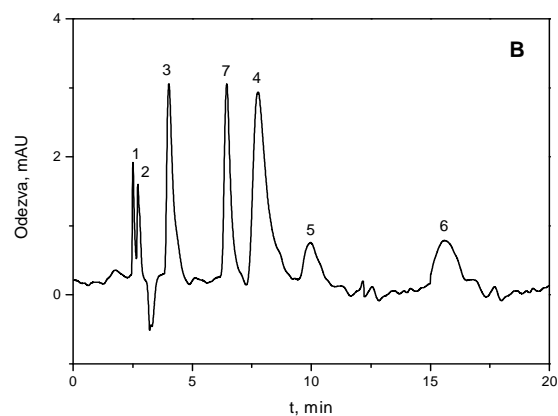
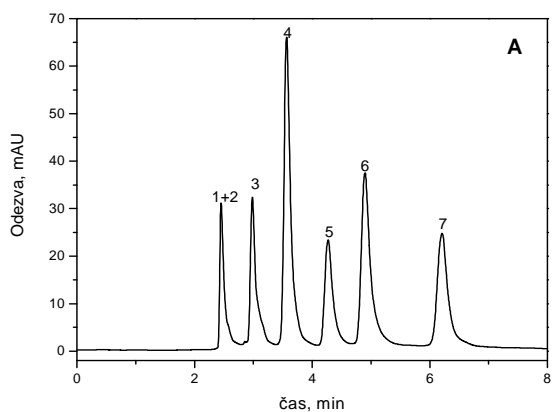
### 3.3.2 Nonapeptidy

Druhou skupinou peptidů, u kterých byl na koloně Discovery Zr PBD studován vliv optimalizačních parametrů (pH, typ a koncentrace pufru, poměr ACN a pufru) na retenční chování, byly nonapeptidy. Mobilní fáze byla složena z ACN, jako organického modifikátoru, a vodné složky, reprezentované fosforečnanovým nebo octanovým pufrem. Z naměřených dat vyplývá, že v testovaných systémech mobilních fází bylo dosaženo úspěšné separace nonapeptidů na koloně Discovery Zr PBD, konkrétně v těchto mobilních fázích:

$\text{ACN} \cdot 7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v), teplota 50 °C (*Obr. 3.3.2.1 A*)

$\text{ACN} \cdot 6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 18/82 (v/v), teplota 40 °C (*Obr. 3.3.2.1 B*)

Z porovnání chromatogramů vyplývá, že mobilní fáze obsahující ACN-fosforečnanový pufr je pro separaci nonapeptidů výhodnější. Isotocin sice eluoval v mrtvém čase ( $t_m$ ), ale ostatních 5 analytů bylo separováno do 7 min s dobrým rozlišením ( $R_s$  min 2,9), symetrií píků ( $A_s$  max 2,0) a vypočítaná účinnost kolony se pohybovala v rozmezí 24 000 – 33 000 tp/m v závislosti na analytu. Separace všech 6 vasopresinů v mobilní fázi obsahující ACN-octanový pufr proběhla do 20 min, ale píky nemají příliš dobrou symetrii ( $A_s$  1,1 – 2,9), na druhé straně došlo k částečnému oddělení isotocinu od uracilu ( $t_m$ ). V mobilní fázi obsahující octanový pufr je opět patrný výraznější šum základní linie, a proto je i celková odezva detektoru podstatně nižší. Vypočítaná účinnost kolony pro tuto mobilní fázi byla v rozmezí 5 000 – 22 000 tp/m v závislosti na analytu.



#### Obr. 3.3.2.1 A

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze  $\text{ACN-7}\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v) teplota 50 °C

#### Obr. 3.3.2.1 B

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze  $\text{ACN-6}\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 18/82 (v/v) teplota 40 °C

Experimentální podmínky: průtok 1ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 214 a 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) oxytocin; (4) Arg-vasotocin; (5) Arg-vasopresin; (6) Lys-vasopresin; (7) desmopresin

### 3.4 Butyl-methakrylátové monolitické stacionární fáze

Poslední část disertační práce je věnována studiu chromatografického chování nonapeptidů na moderním separačním médiu, monolitu. Monolitické kolony mají své významné místo v kapilární kapalinové chromatografii (cLC). Separace na těchto stacionárních fázích naznačuje dobrý trend a vzrůstá i jejich použití díky poměrně snadné přípravě<sup>9</sup>.

U monolitických materiálů na bázi butyl-methakrylátu se předpokládá větší chemická a teplotní stabilita než u silikagelových částicových materiálů. Nevýhodou těchto fází je zatím jejich menší separační účinnost oproti silikagelovým fázím.

Příprava butyl-methakrylátových monolitických stacionárních fází spočívá v naplnění vhodně promyté a připravené křemenné kapiláry polymerizační směsí. Tato směs se skládala z 0,4 % hm. 2,2-azobisisobutyronitrilu jako iniciátoru; 17,8 % hm. butyl-methakrylátu jako funkčního monomeru; 21,8 % hm. ethylen-dimethakrylátu jako síťovacího monomeru; 42,0 % hm. propan-1-olu a 18,0 % hm. butan-1,4-diolu jako porogenního činidla. Po polymerizaci byly kapiláry upraveny na konečnou délku 15 cm a následně použity pro separaci peptidů v modu cLC.

### 3.4.1 Nonapeptidy

Pro získání experimentálních dat bylo postupováno stejně jako při studiu retenčního chování analytů na silikagelových fázích a zirkoniové stacionární fázi. Byl tedy sledován vliv typu pufru (fosforečnanový, octanový a tetraboritanový), jeho pH, koncentrace a poměr ACN a příslušného pufru v mobilní fázi.

Použitím mobilní fáze obsahující ACN-fosforečnanový pufr byly získány celkem slibné výsledky, podařilo se oddělit jednotlivé vasopresiny, i když doba analýzy byla dlouhá ~ 40 min. Bohužel v prostředí tohoto pufru došlo k porušení vazeb mezi monolitem a stěnou kapiláry a tím pádem k vytlačení monolitu z kapiláry. Následně byly hledány jiné vhodnější pufrы. Na základě předchozích experimentů v rámci této práce byly vybrány dva, a to octanový a tetraboritanový pufr. Tetraboritanový pufr umožňuje měření v silně bazické oblasti, která se pro separaci vasopresinu osvědčila na koloně Discovery Zr PBD.

Dle získaných výsledků se jako nejvhodnější mobilní fáze jevila fáze tvořená ACN- $3 \cdot 10^{-2}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanovým pufrem pH 4,5 3/97 (v/v) nebo ACN- $7 \cdot 10^{-2}$  mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritanový pufr pH 7,7 8/92 (v/v).

V mobilní fázi obsahující ACN-octanový pufr se podařilo rozdělit všech 6 nonapeptidů do 45 min. Záznam byl však opět zatížen značným šumem základní linie. V mobilní fázi ACN-tetraboritanový pufr byly sice rozděleny všechny analyty do 25 min, ale rozlišení píků nebylo dostatečné a ani symetrie píků nebyla dobrá.

Porovnáním separace studovaných analytů na butyl-methakrylátovém monolitu se separací na koloně Supelcosil C18 v mobilní fázi ACN-octanový pufr došlo u monolitu ke značnému prodloužení retenčních časů a nepodařilo se od sebe oddělit Arg- a Lys-vasopresin. Změnila se i selektivita tohoto systému oproti silikagelovým kolonám Supelcosil C18 i Discovery HS F5. Vypočítaná účinnost na butyl-methakrylátových monolitech byla z testovaných stacionárních fází nejnižší (2 400 – 10 000 tp/m), ale vzhledem k tomu, že se jedná o experimentální kolonu, je zde možný další vývoj a prostor pro zlepšení.

## 4. Shrnutí

Cílem této disertační práce bylo studium retenčního chování dvou skupin peptidů, pentapeptidů a nonapeptidů, v různých separačních systémech tvořených rozdílnými stacionárními a mobilními fázemi. Na základě podrobného experimentálního popisu separačních systémů lze následně zvolit nejvhodnější separační systém pro vybranou směs analytů.

Do disertační práce byly vybrány typově odlišné kolony, Supelcosil C18, Discovery HS F5, Discovery Zr PBD a butyl-methakrylátový monolit, které jsou zástupci silikagelových a zirkoniových náplňových stacionárních fází, a také moderního monolitického separačního média na bázi polymeru. Zvolené kolony jsou typově relativně nové a představují nové možnosti v separacích biologicky aktivních látek.

Nejprve byly všechny používané kolony otestovány Waltersovým testem, který slouží k charakterizaci reverzních stacionárních fází. Ve skupině studovaných stacionárních fází jsou zastoupeny na základě výsledků Waltersova testu jak kolony s odlišnou polaritou, tak i s rozdílnou hydrofobností. Tento výběr kolon s dostatečně odlišnými vlastnostmi vytváří prostor k dobré charakterizaci separačního chování zvolených analytů případně k následné optimalizaci podmínek pro separaci peptidů v dvou- nebo více-dimenzionálním systému.

Retenční pořadí separovaných pentapeptidů bylo na všech studovaných stacionárních fázích stejné. Výjimku tvořil D-Ala, Leu-enkefalin, který na koloně Supelcosil C18 eluoval jako první v pořadí a na kolonách Discovery HS F5 a Discovery Zr PBD jako třetí. Změna retence daného analytu zřejmě souvisí s rozdílnou polaritou daných stacionárních fází, neboť více je zmiňovaný enkefalin zadržován na polárnějších stacionárních fázích. Nejlepší separace z hlediska rozlišení ( $R_s \geq 2,8$ ), symetrie píků ( $A_s \leq 1,3$ ), účinnosti kolony ( $\sim 38\ 000$  tp/m) a doby analýzy (do 7 minut) byla dosažena na koloně Supelcosil C18 v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN} \cdot 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v).

Při studiu retenčního chování nonapeptidů na různých typech stacionárních fází byly pozorovány následující důležité zobecňující poznatky: isotocin téměř ve všech studovaných separačních systémech, kromě kombinací Discovery HS F5/fosforečnanový pufr a Supelcosil C18/fosforečnanový pufr, eluoval v mrtvém čase. Druhým poznatkem bylo problematické dělení nonapeptidů Lys-vasopresinu a Arg-vasopresinu, které se liší pouze jednou aminokyselinou (lysin nebo arginin) umístěnou v poloze 8 aminokyselinového řetězce. Tuto dvojici analytů se nepodařilo rozdělit až na základní linii v žádném z následujících systémů Supelcosil C18/fosforečnanový pufr a Supelcosil C18/mravenčanový pufr, Discovery HS F5/octanový pufr ani butyl-methakrylátový monolit/octanový pufr. Z popsané skutečnosti vyplývá, že nejlepší studovaný separační systém pro nonapeptidy je tvořen kolonou Discovery HS F5 a mobilní fází obsahující  $\text{ACN} \cdot 7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,5 20/80 (v/v). V tomto separačním systému došlo k rozdělení všech šesti vasopresinů do 20 min

s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,8$ ) a symetrií píků ( $A_s \sim 1,1$ ). Vypočítaná účinnost kolony v optimalizované mobilní fázi se pohybovala v intervalu 37 000 – 47 000 (tp/m) pro daný analyt .

Nejcitlivějším analytem na změnu složení mobilní fáze byl desmopresin, jehož retenční chování vykazovalo nejintenzivnější závislost na změně pH a koncentrace vybraného pufru. Desmopresin se odlišuje od ostatních analyzovaných nonapeptidů přítomností 3-merkaptopropionové kyseliny na začátku svého aminokyselinového řetězce, tedy na C konci. Absence aminokyseliny cysteinu v pozici 1, která byla nahrazena karboxylovou kyselinou obsahující síru, je pravděpodobně zodpovědná za jeho odlišné chování.

Na závěr lze říci, že nové stacionární fáze v daném případě modifikované silikagelové, zirkoniové nebo monolitické, jsou dobrou a zajímavou možností pro separaci biologicky aktivních peptidů ke „klasickým“ C18 fázím.

Zirkoniové stacionární fáze jsou sice vhodnou alternativou k silikagelovým nosičům, ale v našem případě neposkytly lepší separace směsi pentapeptidů i nonapeptidů než kolony silikagelové.

Trend miniaturizace HPLC nabývá v dnešní době na významu, přesto výběr a dostupnost stacionárních fází pro cLC je oproti klasické kapalinové chromatografii stále omezený. Tento nedostatek by mohl být odstraněn i pomocí kapilárních monolitických kolon. Separace na monolitických kolonách naznačují dobrý trend a vzrůstá i jejich použití, díky poměrně snadné přípravě. Monolitické kolony ale ještě vyžadují další vývoj v oblasti technologie jejich přípravy a následně jejich aplikačního využití. Tento fakt potvrzují i nejnižší hodnoty účinnosti testované kolony zjištěné pro jednotlivé analyty.

## 5. Citace

- 1 - J.J. Kirkland, J.Chromatogr. A 1060 (2004) 9-21
- 2 - J. Nawrocki, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29-71
- 3 - N.Tanaka, Y. Tokuda, K. Iwaguchi, M. Araki., J. Chromatogr. 239 (1982) 761-772
- 4 - J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1028 (2004) 1-30
- 5 - J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1028 (2004) 31-62
- 6 - A. Palm, M. V. Novotný, Anal. Chem. 69 (1997) 4499
- 7 - J. P. C. Wissers, H. A. Claessens, C. A. Cramers, J. Chromatogr. A779 (1997) 1
- 8 - J. P. C. Wissers, J. Chromatogr. A 856 (1999) 117
- 9 - J. Grafnetter, Disertační práce, PřF UK v Praze



## **Příloha 1: Seznam publikací, prezentací a plakátových sdělení**

### **Publikace:**

K. Soukupová, J. Suchánková-Sobotníková, L. Janečková, E. Tesařová: *Application of modern silica-based and zirconia-based reversed stationary phases for separation of selected vasopressins* – ve stádiu přípravy

K. Soukupová, E. Kafková, J. Suchánková, E. Tesařová: *Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins*. *Journal of Chromatography A* 1087 (2005) 104 – 111

J. Suchánková, K. Soukupová, E. Tesařová, Z. Bosáková, P. Coufal: *Separation and Quantification of Enkephalin and Vasopressin Related Peptides in Reversed Phase Capillary Liquid Chromatography*. *Chromatographia* 60 (2004) S119 - S124

### **Přednášky:**

K. Soukupová: Comparison of zirconia-based and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins, 2<sup>nd</sup> *International conference „Modern Analytical Chemistry”*, UK Praha, 25. 1. 2005

K. Soukupová: Separace biologicky aktivních látek v RP HPLC na kolonách na bázi oxidu zirkoničitého, *SPE and HPLC seminář organizovaný firmou Sigma-Aldrich*, ÚOCHB Praha, 22.10.2004

K. Soukupová: Využití cLC pro separaci biologicky aktivních látek - peptidů, *SPE and HPLC seminář organizovaný firmou Sigma-Aldrich*, ÚOCHB Praha, 21.11.2003

### **Plakátová sdělení:**

K. Soukupová, L. Janečková, J. Suchánková, E. Tesařová: New reversed stationary phases applied to separation of selected biologically active compound, 12<sup>th</sup> *International Symposium on Separation Sciences ISSS 2006*, Lipica, Slovinsko, 27. – 29.9.2006

K. Soukupová, J. Kodeš, J. Suchánková, E. Tesařová: New reversed Stationary Phases and Their Use for separation of biologically active peptides, *11<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences ISSS 2005*, Pardubice, 12.– 14.9.2005

K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová: Comparison of separation behaviour of some biologically active compounds on zirconia- and silica-based RP-HPLC stationary phases, *25<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography*, Paříž, Francie, 4.-8. 10. 2004

K. Soukupová, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková: Capillary liquid chromatography for separation of biologically active peptides, *5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-performance Separation Methods*, Siófok, Maďarsko, 3.-5. 9. 2003

J. Suchánková, K. Soukupová, E. Tesařová : Srovnání separace biologicky aktivních peptidů na různých reverzních stacionárních fázích, *IX. konference ACP 2002 Súčasný stav a perspektivy analytické chemie v praxi*, Bratislava, Slovensko, září 2002

## **Příloha 2: Curriculum vitae**

### **Osobní data:**

Jméno: Klára Soukupová  
Datum narození: 15.11.1979  
Místo narození: Plzeň  
Adresa: Kaznějovská 23, Plzeň  
323 00, Česká Republika  
E-mail: Soukupova.Klara@seznam.cz

### **Vzdělání:**

2003 – 2006 doktorandské studium, PřF UK , Katedra analytické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2  
1998 – 2003 magisterské studium, PřF UK , Katedra analytické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2  
1994 – 1998 Gymnázium L. Pika, Plzeň

### **Zaměstnání:**

2007 – Zentiva a.s., Kontrola kvality

### **Jazykové znalosti:**

Angličtina (TOEFL)

