

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

**SEPARACE SLOŽEK NUKLEOVÝCH KYSELIN  
NA MONOLITICKÝCH KOLONÁCH CIM<sup>®</sup>**

Separation of nucleic acid components on CIM<sup>®</sup>  
monolithic columns

Diplomová práce

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Hudeček CSc.

Praha 2009

Veronika Vášová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru  
MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele  
Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 4. května 2009.



## Poděkování

Především děkuji mému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi CSc. za odborné vedení při vypracování mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky, kterých využiji nejenom v oblasti chemie. Také velice děkuji RNDr. Václavu Martínkovi Ph.D., že mi umožnil pracovat na HPLC v laboratoři katedry učitelství a didaktiky chemie. Dále děkuji všem z katedry biochemie, kteří byli velice ochotní a poradili mi, když jsem potřebovala. A konečně děkuji své rodině, že mi umožnili studovat a po celou dobu studia mě podporovali.

## Předmětová slova:

analytické separační metody

vysokoučinná kapalinová chromatografie

## Klíčová slova:

anion-výměnná chromatografie

monolitické stacionární fáze

CIM (convective interaction media)

dělení nukleotidů

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>9</b>
2.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	9
2.1.1 Retenční charakteristiky .....	9
2.1.2 Rozdělovací konstanta.....	10
2.1.3 Účinnost chromatografické kolony.....	11
2.1.4 Rozlišení píků $R_{i,j}$ .....	15
2.2 IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE.....	15
2.2.1 Princip iontově výměnné chromatografie.....	15
2.2.2 Charakteristika ionexů .....	16
2.3 MONOLITICKÉ MATERIÁLY .....	18
2.3.1 Charakteristika a vlastnosti monolitických materiálů.....	18
2.3.2 Typy monolitických materiálů z hlediska chemie .....	20
2.4 CIM <sup>®</sup> MONOLITICKÉ KOLONY .....	23
2.4.1 CIM <sup>®</sup> DEAE monolitický disk .....	25
2.4.2 CIM <sup>®</sup> RP-SDVB monolitický disk.....	26
2.5 NUKLEOTIDY .....	27
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>30</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	31
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	32
4.3 SEPARACE SMĚSI NUKLEOTIDŮ NA CIM <sup>®</sup> DEAE MONOLITICKÉM DISKU .....	33
4.3.1 Separace směsi nukleotidů 1 a 2 .....	33
4.3.2 Separace směsi 3 .....	36
4.4 SEPARACE BAZÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN NA CIM <sup>®</sup> RP-SDVB MONOLITICKÉM DISKU	37
4.5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	37
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
5.1 SEPARACE SMĚSI NUKLEOTIDŮ NA CIM <sup>®</sup> DEAE MONOLITICKÉM DISKU .....	38
5.1.1 Separace směsi 1 - ATP, ADP, AMP.....	38
5.1.2 Separace směsi 2 - GTP, GDP, GMP.....	43
5.1.3 Separace směsi 3 – kys. adenylová a UMP .....	47
5.2 POKUS O SEPARACI BAZÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN NA CIM <sup>®</sup> RP-SDVB MONOLITICKÉM DISKU .....	48
5.3 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	50
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>51</b>

## **Seznam použitých symbolů a zkratek**

$A, B, C$  – konstanty van Deemterovy rovnice (příspěvky pro vířivou difúzi, molekulovou difúzi a odpor proti převodu hmoty)

$A$  – absorbance

ADP – adenosin-5'-difosfát

AMP – adenosin-5'-monofosfát

ATP – adenosin-5'-trifosfát

C4 – butylové skupiny navázané na stacionární fázi

CIM<sup>®</sup> – Convective Interaction Media, obchodní značka monolitických stacionárních fází (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko)

CLC – spojená kapalinová chromatografie (Conjoint Liquid Chromatography)

$(c_i)_s$  – koncentrace  $i$ -té složky ve stacionární fázi

$(c_i)_m$  – koncentrace  $i$ -té složky v mobilní fázi

CTP – cytosin-5'-trifosfát

CZE – kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)

DEAE – diethylaminová skupina navázaná na stacionární fázi

DNA – deoxyribonukleová kyselina

$F_m$  – objemový průtok mobilní fáze

GC- plynová chromatografie (Gas Chromatography)

GDP – guanosin-5'-difosfát

GMP – guanosin-5'-monofosfát

GTP – guanosin-5'-trifosfát

$H$  – výškový ekvivalent teoretického patra

$h$  – výška

$H_M, H_L, H_F$  – výškový ekvivalent teoretického patra pro odpor proti převodu hmoty, molekulovou difúzi a vířivou difúzi

$H_{min}$  – minimum vyznačené na van Deemterově závislosti

HETP – výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to one theoretical plate)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

$k$  – retenční faktor

$k_1$  – rychlostní konstanta adsorpce

$k_2$  – rychlostní konstanta desorpce

$K_D$  – rozdělovací (distribuční) konstanta  
 $L$  – délka kolony  
 $L_{1,2}$  – interval spolehlivosti  
 $\lambda$  – vlnová délka  
 $\lambda_{[\max]}$  – maximální vlnová délka  
 $n$  – počet teoretických pater  
 $p$  – tlak  
 $Q_l$  – kritérium rozdílu nejmenších výsledků souboru  
 $Q_n$  – kritérium rozdílu největších výsledků souboru  
 $R$  – rozpětí souboru  
 $R_{i,j}$  – rozlišení dvou látek, separační faktor  
 $r_{i,j}$  – relativní retence  
RP-SDVB – poly(styren-*co*-divinylbenzenová) stacionární fáze pro chromatografii na reverzní fázi  
SO<sub>3</sub> – sulfonylová skupina navázaná na stacionární fázi  
 $s$  – směrodatná odchylka  
 $s_r$  – relativní směrodatná odchylka  
TEOS - tetraethoxysilan  
TMOS – tetramethoxysilan  
 $t_M$  – mrtvý čas kolony  
 $t_R$  – retenční čas  
 $t'_R$  – redukovaný retenční čas  
 $u$  – lineární průtoková rychlost  
UMP – uridin-5'-monofosfát  
UV – ultrafialové světlo  
 $V_M$  – mrtvý objem  
 $V_R$  – retenční objem  
 $V'_R$  – redukovaný retenční objem  
 $w_{1/2}$  - šířka píku v polovině jeho výšky  
 $x_m$  – medián

# 1. ÚVOD

Podíváme-li se do historie rozvoje chemie, zjistíme, že s přibývajícím roky dochází ve všech jejích oblastech ke stále novým objevům. Z počátku byl rozvoj chemie spíše zdrženlivý, ale postupem času si získávala stále větší a nezastupitelné místo ve světě. Její rozvoj se začal rapidně zrychlovat.

Nejprve byly objevovány základní molekuly, struktury, složení a vlastnosti látek až se tato věda dostala k takovým výsledkům, jako je objasnění podstaty řady důležitých chemických a biochemických procesů, vypracování diagnostických postupů umožňujících včas odhalit závažné onemocnění, vývoj nových materiálů s vynikajícími užitnými vlastnostmi, které jsme si neuměli v minulosti ani představit, příprava a výroba účinných léčiv proti nejrůznějším chorobám a mnoho dalšího [1].

Díky pochopení základů přírodních věd dnes existují metody založené na chemických, fyzikálních a fyzikálně-chemických principech. Významnou skupinou jsou metody instrumentální, zejména pak metody separační. Separační metody jsou charakterizovány vysokou selektivitou a jsou vhodné zejména pro analýzu vzorků se složitou matricí [2]. Mezi separační metody patří kromě jiných i metody kapalinové chromatografie. Ve své práci se budu zabývat převážně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), která zaujímá spolu s plynovou chromatografií (GC) a kapilární zónovou elektroforézou (CZE) nejvýznamnější postavení v separačních technikách [3].

Chromatografické metody se stále zdokonalují a vylepšují tak, aby analýzy trvaly co nejkratší dobu. Zároveň je kladen důraz na schopnost analyzovat velmi malé množství vzorku, a to v řádech nanogramů a dosáhnout vysoké separační účinnosti. Proto jsou separační kolony stále zdokonalovány a upravovány. Jejich délka se zkracuje, obsahují stále menší a menší částice mající co nejpravdělnější tvar, nebo je průměr kolon zmenšován [4].

Mezi perspektivní materiály v oblasti chromatografie se řadí monolitické materiály. Jejich předností je snadná příprava, nízký tlak na koloně a malý odpor proti převodu hmoty, díky čemuž dochází k rychlé analýze s vysokou účinností. Samozřejmě, že mají monolity i své nevýhody, mezi něž může patřit např. špatná reprodukovatelnost [5,6].



## 2. Přehled literatury

### 2.1 Kapalinová chromatografie

Za zakladatele kapalinové kolonové chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvet [7], který jako první rozdělil rostlinná barviva sloupcovou chromatografií.

O historicky první krok vedoucí k vývoji vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zasloužili A. J. P. Martin a R. L. M. Synge, kteří použili kolonu s malými částicemi (o průměru 100 až 200  $\mu\text{m}$ ) a vysoký tlak, aby tím docílili lepší separace. [8]

#### 2.1.1 Retenční charakteristiky [2,9,10,11]

Jednotlivé složky vzorku aplikované na chromatografickou kolonu stráví na této koloně různě dlouhou dobu. Tato doba se v chromatografické terminologii nazývá retenční čas  $t_R$  [min]. Retenční čas se měří od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima příslušné složky. Je složen z mrtvého času kolony  $t_M$  [min], což je čas, který složka stráví pouze v mobilní fázi a z času redukovaného  $t'_R$  [min], což je doba, kterou složka stráví ve stacionární fázi. Mrtvý čas kolony je totožný s retenčním časem látky, která se ve stacionární fázi vůbec nezadržuje. Součtem redukovaného a mrtvého času získáme základní retenční rovnici

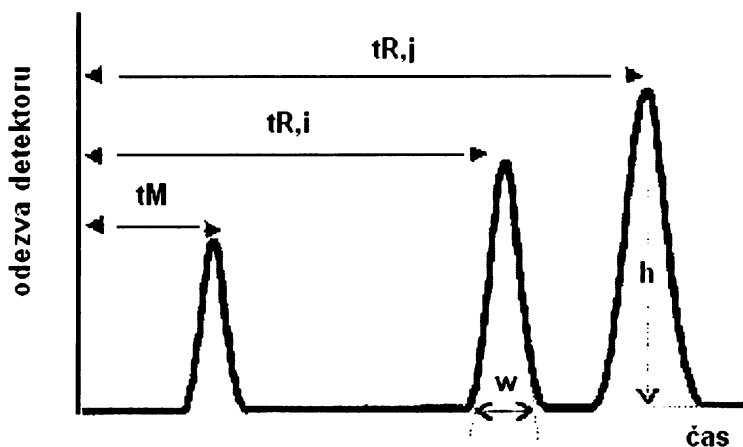
$$t_R = t'_R + t_M$$

Tyto veličiny jsou využívány v kvalitativní analýze, kdy lze prostřednictvím těchto časů za stanovených podmínek charakterizovat danou látku. Na obr. 1 je znázorněn postup určení elučních parametrů z chromatogramu [9].

Retence složek lze vyjádřit i prostřednictvím objemu mobilní fáze tzv. retenčním objemem  $V_R$  [ml], který proteče kolonou za dobu retenčního času. Je to tedy objem potřebný k eluci dané složky a s retenčním časem souvisí vztahem

$$V_R = t_R \cdot Fm$$

kde  $Fm$  [ml/min] je objemový průtok mobilní fáze.



Obr. 1: Schematické znázornění postupu určení elučních parametrů z chromatogramu [2].

### 2.1.2 Rozdělovací konstanta

Celý proces separace prochází neustálým ustavováním a porušováním fázové rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Koncentrace složky v mobilní fázi  $(c_i)_m$  a koncentrace složky ve stacionární fázi  $(c_i)_s$  se v okamžiku ustavení rovnováhy rovnají a poměr těchto koncentrací v mobilní a stacionární fázi je v ideálním případě konstantní a nazývá se *rozdělovací (distribuční) konstanta*  $K_D$ . Rozdělovací konstanty dvou různých složek se musí od sebe lišit, aby došlo k jejich rozdělení. Hodnotu distribuční konstanty lze vypočítat ze vztahu

$$K_{D,i} = (c_i)_s / (c_i)_m$$

Selektivitu chromatografického systému lze charakterizovat pomocí *relativní retence*  $r_{i,j}$ . Čím je hodnota  $r_{i,j}$  větší, tím je systém selektivnější. Hodnota  $r$  je termodynamická veličina, která za konstantní teploty závisí pouze na fyzikálně-chemických vlastnostech systému. Relativní retence pro látky  $i$  a  $j$  je definována vztahem

$$r_{i,j} = k_j/k_i = V'_{Rj}/V'_{Ri} = K_{Dj}/K_{Di}$$

kde  $k$  je retenční faktor, který udává, jakého násobku mrtvého objemu je potřeba k eluci příslušné látky [10]. Lze ho vypočítat ze vztahu

$$k = (V_{R,i} - V_M) / V_M$$

### 2.1.3 Účinnost chromatografické kolony

Prvním a nejjednodušším modelem charakterizujícím účinnost chromatografické kolony byla představa teoretického patra pocházející od Martina a Syngeho [8]. Tato teorie vychází z koncepce vyvinuté pro popis destilace. Jedná se o představu o koncentraci rozpuštěné látky v libovolném čase a místě na koloně a také o způsobu, jakým výsledek dělení závisí na délce kolony.

Chování kolony je v této teorii popsáno počtem teoretických pater  $n$ . V každém teoretickém patře se ustavuje dokonalá rovnováha mezi dvěma fázemi. Teoreticky má chromatografický pík tvar Poissonova rozdělení, které se pro vysoký počet teoretických pater (velký počet stupňů volnosti) blíží normálnímu (Gaussovu) rozdělení.

Počet teoretických pater (který je mírou účinnosti kolony) lze tedy vypočítat z tvaru píku (a retenčního času). Teoreticky zdůvodněné je použití hodnot šířky píku při základně (definované průsečíky tečen v inflexních bodech se základní linií) nebo v  $1/e$  ( $e$  je základ přirozených logaritmu) celkové výšky, prakticky se nejčastěji vychází z hodnot šířky píku v polovině jeho výšky. Použití tohoto přístupu omezuje vliv neidealit chromatografického píku (který se nejsilněji projevuje v blízkosti základní linie). Celkový počet teoretických pater kolony lze pak vypočítat ze vztahu

$$n = 5,545 \cdot (t_{R,i} / w_{1/2,i})^2$$

kde  $t_{R,i}$  je retenční čas  $i$ -té složky ve směsi,  $w_{1/2,i}$  je šířka píku v polovině jeho výšky.

Délka odpovídající jednomu teoretickému patru kolony ( $H = L/n$ ) se nazývá *výškový ekvivalent teoretického patra*  $H$  [mm]. Jde o charakteristiku kolony, nezávislou na její délce. Proto je možné porovnat účinnost různě dlouhých kolon. Čím vyšší počet teoretických pater a čím nižší výškový ekvivalent teoretického patra kolona má, tím je její účinnost větší [9,10].

V modelu ideální chromatografie podle Martina a Synge nebyly brány v úvahu faktory, které způsobují neideální chování, jejichž důsledkem je rozšiřování zón separované látky (chromatografického píku). Jde o působení faktorů mimokolonových i

neidealitu samotného dělení na koloně. Zde se uplatňují zejména tři faktory: vířivá difúze, molekulová (podélná) difúze a odpor proti převodu hmoty (příčná difúze).

*Vířivá difúze* je způsobena různou lineární rychlostí mobilní fáze v různých místech kolony. Dochází k tomu, že molekuly se v mobilní fázi nepohybují stejnou rychlostí, některé se zpožďují vlivem porézního prostředí a jiné jsou zrychlovány. Vířivou difúzi ovlivňuje velikost zrn, uspořádání stacionární fáze na koloně a rychlost mobilní fáze. Příspěvek vířivé difúze k rozmývání zón lze vyjádřit vztahem mezi výškovým ekvivalentem teoretického patra pro vířivou difúzi  $H_F$  a konstantou  $A$  závislou na velikosti částic a celkovém uspořádání stacionární fáze:

$$H_F = A$$

*Molekulová difúze* je dána difúzním koeficientem v mobilní fázi a může být ovlivněna tvarem pórů ve stacionární fázi. Při molekulové difúzi dochází k tomu, že některé molekuly putují proti proudu mobilní fáze a tím jsou oproti ostatním opožděny. Děje se tak hlavně při malých rychlostech. V důsledku malých hodnot difúzních koeficientů je vliv molekulové difúze při vyšších průtokových rychlostech k celkové účinnosti systému zanedbatelný. Příspěvek molekulové difúze je dán vztahem

$$H_L = B/u$$

kde  $H_L$  je výškový ekvivalent teoretického patra pro molekulovou difúzi,  $B$  je konstanta závislá na hodnotě difúzního koeficientu separované látky a geometrickém uspořádání stacionární fáze,  $u$  je lineární průtoková rychlost mobilní fáze [cm/min].

Molekuly putující v mobilní fázi difundují do pórů stacionární fáze, dostávají se až do stagnantní mobilní fáze, ve které nějakou dobu setrvávají. Některé molekuly se dostanou hlouběji do pórů a některé zůstávají na povrchu. Tím dochází k jejich zpoždování a k nežádoucímu rozšiřování zón. Tento děj se nazývá *odpor proti převodu hmoty*, nebo též příčná difúze. Je důsledkem toho, že při určité rychlosti mobilní fáze se nemůže ustavit dokonalá rovnováha mezi stacionární a mobilní fází. Rychlost převodu hmoty závisí na velikosti a tvaru zrn, na tvaru povrchu náplně a na tloušťce vrstvy stacionární fáze.

Při nevhodné stacionární fázi se tvoří chvosty. Velikost příspěvku odporu proti převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi je dán vztahem

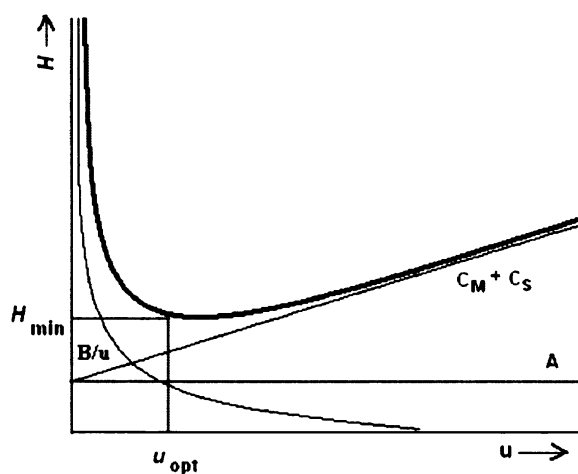
$$H_M = (C_M + C_S)u$$

kde  $H_M$  je výškový ekvivalent teoretického patra pro odpor proti převodu hmoty,  $C_M$  a  $C_S$  jsou konstanty závislé na difúzních koeficientech separované látky v mobilní a stacionární fázi,  $u$  je lineární průtoková rychlost mobilní fáze.

Součtem jednotlivých příspěvků dostaneme celkový výškový ekvivalent teoretického patra obohacený o faktory zodpovědné za neideální chování látek. Zároveň z těchto příspěvků vyplývá vliv rychlosti mobilní fáze na účinnost kolony, která je dána van Deemterovou rovnicí.

$$H = A + B/u + (C_M + C_S) u$$

Na obr. 2 je grafické znázornění van Deemterovy závislosti. Nejvyšší účinnost vykazuje kolona v minimu křivky ( $H_{min}$ ), které odpovídá optimální průtokové rychlosti ( $u_{opt}$ ). Za těchto podmínek dochází v ideálním případě k nejmenšímu rozšiřování zón [9,10,11].



Obr. 2: Grafické znázornění závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$ , na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze  $u$  (van Deemterova závislost;  $A$ ,  $B/u$ ,  $C_M + C_S$  – konstanty příspěvků pro vířivou difúzi, molekulovou difúzi a odporu proti převodu hmoty) [2].

Závislosti získané experimentálně neodpovídají ideální van Deemterově křivce, byla proto navržena řada alternativních rovnic (Giddingsova, Horváthova, Huberova, Knoxova), které berou v úvahu další faktory (např. závislost členu A na průtokové rychlosti).

Podrobněji je o těchto modelech pojednáno v literatuře [12].

Kromě výše zmíněných neidealit mohou mít vliv na tvar píku i tzv. mimokolonové děje. Jedná se např. o děje způsobené detektorem, kapilárami pro mobilní fázi či elektronikou. Všechny tyto neidealities mohou mít větší či menší vliv na tvar a symetrii eluční křivky. Asymetrie píku se vyznačuje buď rozmyváním píku vzadu (tzv. chvostování neboli tailing) nebo rozmyváním píku vpředu (tzv. fronting) [10].

Jednou z hlavních příčin „tailingu“ může být předávkování kolony, kdy dochází k tomu, že píky eluují dříve než by měly, protože adsorpční kapacita kolony se s předávkováním snižuje. Další příčinou může být heterogenní kinetika převodu hmoty. K této situaci dochází v případě, že povrch adsorbentu je pokryt dvěma různými typy adsorpčních míst. První typ místa má široký specifický povrch, slabou adsorpční energii a retenci, a rychlou kinetiku převodu hmoty. Druhý typ místa zaujímá pouze malé procento celkového povrchu sorbentu, má silnou retenci a pomalou kinetiku převodu hmoty. Celkový tvar eluční křivky může být ovlivněn kombinací obou zmíněných vlivů [13].

Pro monolitické systémy je důležitý poměr velikosti pórů a charakter monolitického povrchu. Monolit by měl být homogenně pokrytý stacionární fází, ve které dochází k fyzikální adsorpci, nebo k chemické vazbě. Tyto parametry mají vliv na interakce dělených sloučenin se stacionární fází a nosičem a mohou ovlivnit tvar píku. Velikosti pórů a množství nabitých funkčních skupin v monolitických materiálech mají vliv na průtok mobilní fáze [14].

## 2.1.4 Rozlišení píků $R_{i,j}$

K vyhodnocení rozdělení dvou látek  $i$  a  $j$  slouží rozlišení  $R_{i,j}$ , které můžeme vyhodnotit přímo z příslušného chromatogramu. Rozlišení je dáno vztahem

$$R_{i,j} = 2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j}) / (w_i + w_j)$$

kde  $R_{i,j}$  je rozlišení dvou látek  $i$  a  $j$ ,  $t_{R,i}$  je retenční čas  $i$ -té složky ve směsi,  $t_{R,j}$  je retenční čas  $j$ -té složky ve směsi,  $w_i$  je šířka píku při základně  $i$ -té složky ve směsi,  $w_j$  je šířka píku při základně  $j$ -té složky ve směsi.

Při hodnotě  $R_{i,j} = 1$  se vzdálenost mezi maximy obou píků rovná střední šířce píku a píky se nepatrně překrývají, jen asi ze 2 %. Při hodnotě  $R_{i,j} = 1,5$  dochází prakticky k dokonalému rozdělení obou píků až na základní linii. Větší rozlišení prodlužuje dobu analýzy a není tedy žádoucí. Uvedené hodnoty rozlišení platí za předpokladu gaussovského tvaru píku [9,10].

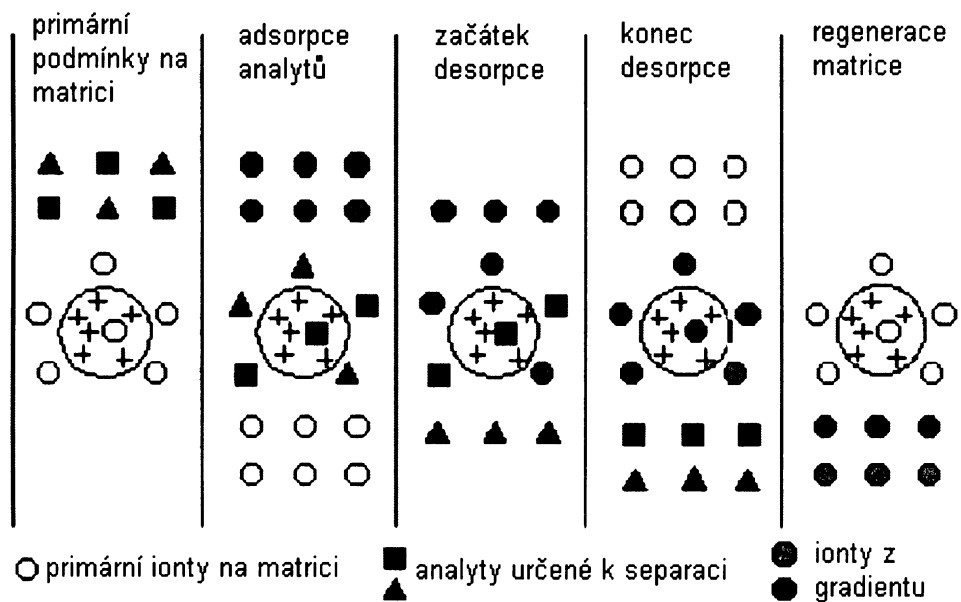
## 2.2 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je separační metoda, při které dochází k separaci analytů na základě rozdílu v interakci mezi separovanou látkou a ligandem imobilizovaným v matici. Je pravděpodobně nejčastěji používanou chromatografickou technikou pro separaci a purifikaci proteinů, polypeptidů, nukleových kyselin, polynukleotidů a dalších rozměrných biomolekul [15].

### 2.2.1 Princip iontově výměnné chromatografie

Ionty jsou k matici přitahovány určitou elektrostatickou silou. Dostane-li se k matici jiný iont, dojde díky vodné mobilní fázi k disociaci původních iontů, které jsou nahrazeny ionty analytů, majících k matici vyšší afinitu. Gradientovou elucí následuje postupná desorpce těchto iontů na základě rozdílné afinity k matici. Konečným krokem je

vždy reekvilibrace matrice, čímž se na své místo dostanou opět ionty, které tam byly původně navázané. Na obr. 3 je zobrazen princip iontové výměnné chromatografie.



Obr. 3: Princip iontové výměnné chromatografie (solný gradient) [15].

### 2.2.2 Charakteristika ionexů

Ionexy mohou být organického či anorganického, přírodního či syntetického původu. Základem ionexů je tzv. nosič. Mezi anorganické nosiče lze zařadit hlinitokřemičitany, jejichž základními jednotkami jsou tetraedry  $AlO_4$  nebo  $SiO_4$ . Dále to mohou být silikagely nebo dihydrogenfosforečnan zirkoničitý.

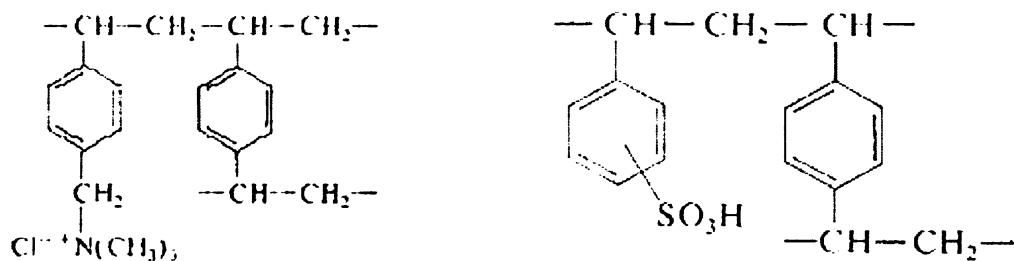
Z přírodních ionexů se velmi často používají polysacharidy či jejich deriváty, tyto hydrofilní stacionární fáze mají velký význam zejména v biochemii, kde slouží k nedenedurujícím purifikacím biopolymerů [16]. Často používaným nosičem je Sepharosa (na bázi lineární agarosy), dále dextran, složený z glukosových jednotek uspořádaných do zesíťované struktury. Příkladem často používaného dextranového nosiče je Sephadex. Obě látky jsou sice chemicky stabilní, ale jejich mechanická stabilita je nízká. Používá se i modifikovaná celulóza, polymer D-glukosových jednotek. Je snadno dostupná, chemicky stabilní a levná, ale má nepříliš dobré hydrodynamické vlastnosti. Např. vláknitá celulóza



se používá pro vazbu DNA (tzv. DNA celuloza). Bohužel všechny tyto přírodní materiály jsou málo odolné vůči tlaku, a proto je nelze použít v HPLC [17].

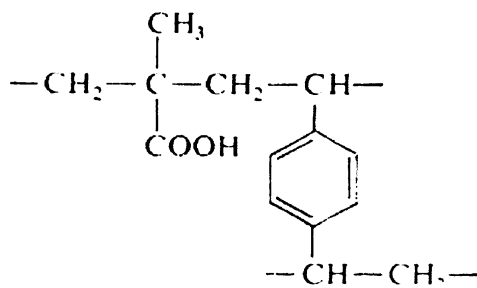
Z organických derivátů se asi nejvíce používají ionexové pryskyřice na bázi polystyrenu a polyakrylamidu. Tyto pryskyřice lze připravit v různorodém tvaru, porozitě či chemickém složení. Jsou vysoce acidostabilní a vydrží teploty až do 100 °C. Na nosiče jsou navázány ionogenní skupiny, které z něho tvoří separační médium tzv. ionex. Podle ionogenních skupin lze ionexy rozdělit na katexy a anexy. V případě katexu jsou na nosiči zakotveny anionty a dochází k výměně kationtů, a v případě anexu jsou na nosiči zakotveny kationty a dochází k výměně aniontů. Podle typů ionogenních skupin mohou být ionexy silné, střední a slabé.

Styrenové ionexy jsou složené ze styrenu, kde je síťovacím činidlem divinylbenzen [18]. Příklad polystyrénového silně bazického anexu a silně kyselého katexu je na obr. 4.



Obr. 4: Polystyrenové ionexy: a) silně bazický anex, b) silně kyselý katex [19].

Akrylátové ionexy jsou methakrylátové estery, v nichž je síťovacím činidlem divinylbenzen nebo ethylendimethakrylát. Příklady methakrylátového slabě kyselého katexu je na obr. 5.



Obr. 5: Methakrylátový slabě kyselý katex [19].

## 2.3 Monolitické materiály

Slovo *monolit*, které je použito v nadpise, pochází z řečtiny a je kombinací dvou slov, a to *μονο* (jednotný) a *λίθος* (kámen). Nebylo zvykem výraz monolit v chromatografii, ale ani v celé chemii používat pro materiály, které by se vlastně mezi monolity daly zařadit. Takovéto materiály, vyvinuté nezávisle v různých laboratořích, byly pojmenovávány různými názvy. Například jako „celistvý polymerní nosič“, což byl kopolymer tvořený kyselinou akrylovou a N,N'-methylenbisakrylamidem. Takový nosič byl připraven v roce 1989 S. Hjértenem a kol. Tento polymer byl otestován směsí proteinů za použití vyšších průtokových rychlostí, než u náplňových kolon [20]. Alternativním názvem pro organický polymer byly „makroporézní polymerní membrány“. Šlo o makroporézní methakrylátový polymer, který byl vyroben v roce 1990 a byl také použit pro separaci proteinů [21]. Byl navržen také název „celistvé polymerní tyče“. Jednalo se o porézní polymer založený na poly(glycidylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylátu) a použitý v iontově výměnné chromatografii pro separaci směsi proteinů. Tento nosič lze, oproti náplňové koloně, poměrně snadno připravit [22]. „Porézní silikonové tyče“ byly připraveny v roce 1996 Minakuchim a kol. Základem těchto nosičů je siliková kostra, která je modifikovaná skupinami C18 [23].

Poprvé bylo použito slovo *monolit* pro pojmenování tuhých makroporézních polymerů připravovaných polymerizací v uzavřené formě [24]. Od té doby se stal výraz *monolit* průmyslovým standardem a dnes se pod ním vyskytují všechny typy a formy obdobných materiálů [25].

### 2.3.1 Charakteristika a vlastnosti monolitických materiálů

Monolit je celistvý blok pórovitého materiálu, který má dostatečně veliký specifický povrch pro navázání velkého množství rozpuštěných látek. Při průtoku mobilní fáze tímto monolitem dochází ke značnému zadržování rozpuštěných látek, právě díky velkému povrchu. Monolitické materiály jsou podobné membránám, které jsou tvořeny vysoce propojenými kanálky o průměru 1  $\mu\text{m}$ . Na rozdíl od membrán lze monolity připravit v různých tvarech a rozměrech [26]. Dnes existují rozmanité typy monolitů. Mají rozdílné formy a jsou syntetizovány rozdílnými preparačními procesy [27].

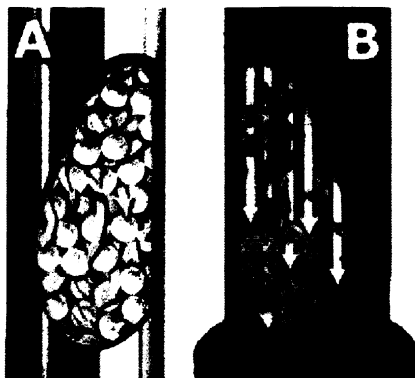
Monolity musí zcela zaplňovat vnitřek separační kolony a nesmí obsahovat žádné volné prostory. Těmito prostory je myšleno např. místo mezi samotným monolitickým nosičem a chromatografickou kolonou, ve které je tento nosič uložen. V klasických kolonách se právě těmito prostory uskutečňuje velká část průtoku. Veškerá mobilní fáze musí protékat póry monolitu. Za monolit můžeme považovat například i kazetu naplněnou vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny.

Jednou z významných charakteristik monolitických materiálů je rychlý přenos hmoty na koloně. Díky konvektivnímu toku póry dochází ke zrychlenému přenosu hmoty na koloně. Jedná se o proudění mobilní fáze, jejíž částice se chovají neuspořádaně, ale zároveň se posouvají ve směru proudění. Veškerá mobilní fáze protéká všemi póry monolitu. V plněné koloně je hlavní hnací silou přenosu hmoty difúze. Mobilní fáze proudí kolem částic a rozpuštěné látky difundují do pórů. Konvektivní tok póry u monolitických kolon umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery, jejichž difúze je pomalá [28]. Některé dřívější studie kinetického chování monolitických kolon studují závislost účinnosti kolony na rychlosti toku mobilní fáze [29].

Výhodnými vlastnostmi monolitických materiálů tedy jsou (a) přenos hmoty na základě proudění, (b) extrémně vysoká porosita (více než 50 % a v některých případech až 90 %), (c) levnější příprava v porovnání s obvyklými matricemi, (d) jednoduché a reprodukovatelné plnění kolon a (e) vysoká kapacita pro extrémně velké biomolekuly [26].

Dnes jsou monolity používány i v plynové chromatografii [30] dále při prekoncentracích v HPLC, elektrochromatografii, elektroforéze [32] a v proteolytice [32].

Na obr. 6 lze vidět chování mobilní fáze při průtoku klasickou náplňovou kolonou a kolonou monolitickou.



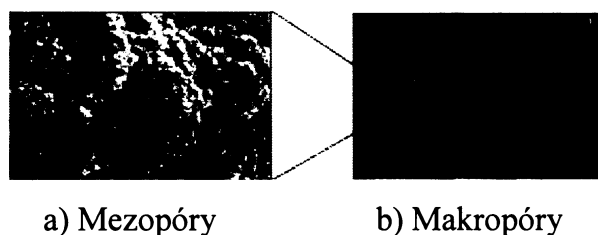
Obr. 6: Chování mobilní fáze při průtoku kolonou: A - klasickou náplňovou, B - monolitickou kolonou [33].

### 2.3.2 Typy monolitických materiálů z hlediska chemie

#### *Monolity na základě siliky*

Jak jsem již uvedla v kapitole 2.3.1, tak největším rysem monolitů, respektive silikových monolitů je, že se jedná o jeden kus skládající se z kostry a vnitřních průchozích pórů (makropórů). Vnější porozita monolitu je velice rozmanitá a poměr velikosti kostry ku makropórům je o mnoho větší (1-4), než jakého dosahuje klasická kolona naplněná částicemi (0,25-0,4) [34].

Silikové monolitické kolony mají třídimensionální strukturu sítě, kde siliková kostra má v průměru 0,5-2  $\mu\text{m}$  a makropóry mají velikost 1-8  $\mu\text{m}$  [35,36]. Jsou připravovány za použití tetramethoxysilanu (TMOS) nebo tetraethoxysilanu (TEOS) [37,38]. Vnější porozita se u monolitických kolon pohybuje v rozmezí 60-80 % a u náplňových je kolem 40 %. Navíc ještě siliková kostra obsahuje velké množství mezopórů, které dosahují velikostí od 10 do 30 nm [34,39]. Na obr. 7 je vidět siliková kostra složená z makropórů a mezopórů.



a) Mezopóry

b) Makropóry

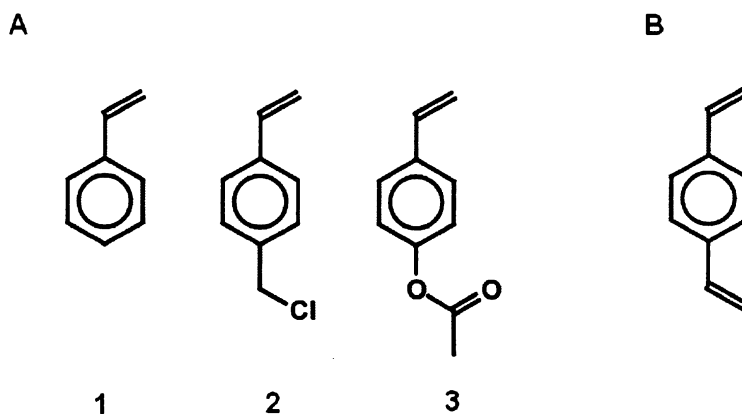
Obr. 7: Siliková kostra složená a) mezopórů, b) vnitřních pórů (makropórů) [37].

Silikové monolity nemohou být, na rozdíl od organických monolitů, připravovány *in situ*, protože po ztuhnutí monolitu dochází k zmenšení jeho objemu. Pro představu: máme-li formu o průměru 6 mm, tak získáme silikovou tyčinku o průměru 4,6 mm, tedy o dost menší. Proto je nutné monolit po vložení do kolony řádně utěsnit. Nakonec se provádí jeho chemická modifikace. Většinou se na tento silikový monolit navazují C18 skupiny [28].

### **Polystyrenové monolity**

Monolity na základě polystyrenu, polymethakrylátu a polyakrylamidu vznikají polymerizací organických monomerů za přítomnosti síťovacího činidla a jsou používány především v kapilární chromatografii.

Monomery používané při přípravě polystyrenových monolitů jsou obvykle styren, 4-chlormethylstyren, 4-acetoxystyren a další v přítomnosti síťovacího činidla, nejčastěji divinylbenzenu [40]. Polystyrenové monolity patří mezi silně hydrofobní materiály [41]. Na obr. 8 jsou struktury monomerů a síťovacího činidla používaných ke vzniku polystyrenového monolitu.

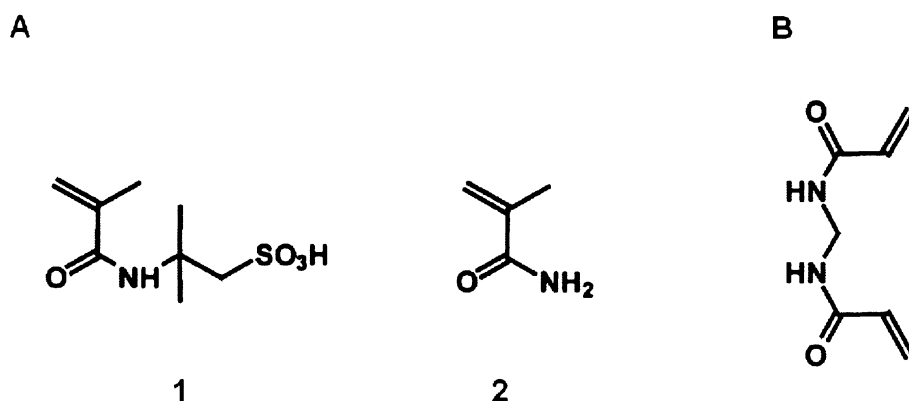


Obr. 8: Sloučeniny používané při výrobě polystyrenových monolitů. A1,2,3 monomery (A1 - styren, A2 - 4-chlormethylstyren, A3 - 4-acetoxystyren) B síťovací činidlo (divinylbenzen) [42].

## *Polyakrylamidové monolity*

Monolity na základě akrylamidu jsou hydrofilního charakteru. Vznikají polymerizační reakcí akrylamidu a jeho derivátů. Síťovacím činidlem je zde methylenbisakrylamid.

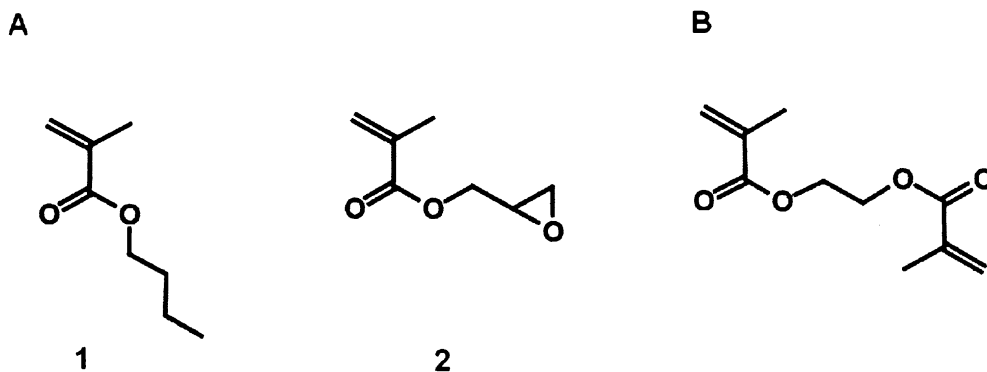
Na obr. 9 jsou ukázány struktury některých monomerů a síťovacího činidla.



Obr. 9: A. Sloučeniny používané při výrobě polyakrylamidových monolitů. A1,2 monomery (A1 - 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina, A2 – akrylamid), B síťovací činidlo (N,N'-methylenbisakrylamid) [42].

## *Polymethakrylátové monolity*

První monolitickou kolonu na bázi methakrylátu připravili v roce 1995 Švec a Fréchet [43]. Byla to chromatografická kolona z poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylátu), který byl určený pro použití v iontové výměnné chromatografii. Monolity na základě methakrylátu jsou středně polárního charakteru a nejčastěji používanými monomery jsou glycidylmethakrylát či butylmethakrylát. Jako síťovací činidlo je nejvíce používán ethylendimethakrylát. Na obr. 10 jsou struktury zmíněných látek.



Obr. 10: Sloučeniny používané při výrobě polymethakrylátových monolitů. A1,2 monomery (A1 - butylmethakrylát, A2 – glycidylmethakrylát), B síťovací činidlo (ethylendimethakrylát) [42].

## 2.4 CIM<sup>®</sup> monolitické kolony

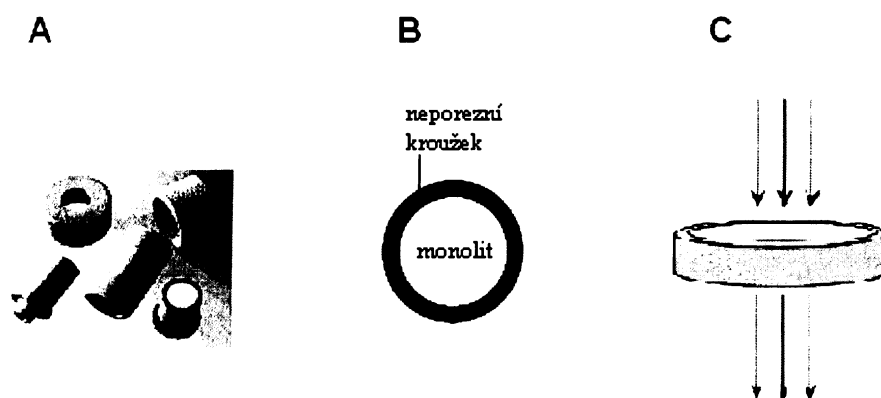
Monolitické kolony CIM<sup>®</sup> (Convective Interaction Media, produkt firmy BIA Separation, Ljubljana, Slovinsko) patří k nové generaci stacionárních fází používaných v kapalinové chromatografii. CIM<sup>®</sup> nosiče jsou navrženy jako homogenní fáze, které poskytují vysokou rychlost přenosu hmoty při nízkých tlacích.

Kromě rychlosti přenosu hmoty dovoluje struktura pórů snadnou propustnost a malá délka kolony je příčinou optimálního čištění velkých molekul. Během separačních procesů také dochází ke snižování tlaku na kolonu, nespecifických vazeb, degradace produktu a drobných strukturálních změn v biomolekulách. CIM<sup>®</sup> monolitické nosiče se proto jeví jako výhodné nosiče v metodách dělení peptidů, proteinů, oligonukleotidů a dokonce nanočástic, jako jsou DNA plasmidy a viry [44].

Tato media se vyznačují vysokou mechanickou stabilitou spojenou s vysokou propustností (umožňující práce při vysokých průtokových rychlostech) a chemickou odolností (umožňující dostatečnou regeneraci a čištění) [45].

CIM<sup>®</sup> chromatografická kolona se skládá z disku a speciálního držáku (housing), který slouží ke snadnému umístění disku. Díky držáku vykazuje kolona malý mrtvý objem a bez problémů ji lze napojit k HPLC separačnímu systému viz obr. 11 A. Disk se skládá z monolitické části, tedy samotného nosiče, která těsně vyplňuje vnitřek neporézního kroužku viz obr. 11 B. Díky tomuto uspořádání dochází pouze k axiálnímu toku přes disk

viz obr. 11 C a nemělo by docházet k žádnému unikání vzorku a mobilní fáze mimo monolit. Průměr disku je 16 mm a šířka 3 mm. Objem disku činí 0,34 ml, nastavená maximální rychlost může být až 10 ml/min, tlak až 50 bar, teplota 50 °C a pH rozmezí je od 1 do 14 [46].



Obr. 11: A. Držák (housing)- rozložený, B. Monolitický disk CIM<sup>®</sup>, C. Schematické znázornění axiálního toku mobilní fáze a vzorku přes CIM<sup>®</sup> disk [45].

Základním polymerem monolitického disku CIM<sup>®</sup> je buď poly(styren-*co*-divinylbenzen) (tento je použit pouze u RP-SDVB disku) a nebo poly(glycidylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylát) pro ostatní. Tyto disky existují v mnoha modifikacích. Tak např. pro iontovou výměnu jsou to kvartérní amin, diethylamin, ethylendiamin, sulfonyl nebo karboxymethyl. Pro afinitní chromatografii to jsou Protein A, Protein G či kovový chelát. Pro hydrofobní interakce to jsou ethyl, butyl, hydroxyl a v aktivačních interakcích lze využít modifikovaného disku skupinami epoxy, karboxydiimin nebo ethylendiamin. Mimo to, dnes lze již připravit disk s imobilizovanými enzymy.

Do jednoho držáku lze umístit až 4 disky, čímž se délka kolony prodlouží ze 3 mm na 12 mm. Za použití stejných disků se zvýší kapacita kolony. Výhodou těchto kolon je snadná a rychlá výměna stacionární fáze a možnost vložit do jednoho držáku dva či více disků různě chemicky modifikovaných. Pak lze na takovémto systému dělit látky, které se na koloně zadržují na základě jiné chemické interakce. Tento postup je výrobcem nazýván jako spojená kapalinová chromatografie (CLC) [47]. Tato metoda byla vyzkoušena např.

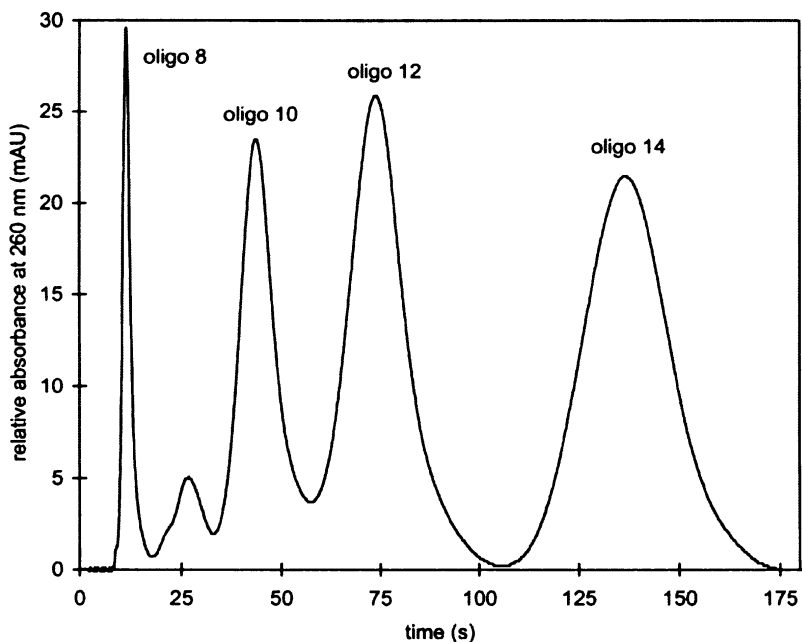


při dělení směsi králíčích polyklonálních protilátek krevního séra [48], nebo k rozdělení transferinu a albuminu od imunoglobulinu G. V tomto experimentu byly použity dva CIM<sup>®</sup> Protein G disky a jeden CIM<sup>®</sup> QA disk (kvartérní amin). Byla to tedy kombinace dvou chromatografických módů: afinitní a iontově výměnné chromatografie. Po zvolení vhodných chromatografických podmínek došlo k rozdělení všech tří proteinů do 5 minut. Tato metoda byla úspěšně validována [49].

#### **2.4.1 CIM<sup>®</sup> DEAE monolitický disk**

Základní nosič tohoto CIM<sup>®</sup> disku je poly(glycidylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylátový) makropézni polymer, který je modifikovaný anion výměnnými skupinami diethylaminoethanu. Je to tedy slabý anion výměnný ionex. Tuto kolonu lze použít pro rychlé a účinné separace velkých molekul, jako jsou proteiny, DNA, viry, stejně tak pro separace malých molekul, jako jsou např. peptidy. Velice malá délka monolitu a speciálně navržená vysoce porézní struktura umožňuje pracovat při velkých průtokových rychlostech až do 10 ml/min a malých tlacích na kolonu. Rozměry monolitu jsou u všech disků totožné, tedy průměr 16 mm, tloušťka 3 mm a mrtvý objem 0,34 ml. Pracovní rozsah pH se u tohoto disku doporučuje 3-9 [50].

Monolitický disk CIM<sup>®</sup> DEAE byl použit např. k separaci směsi tří standardních proteinů myoglobinu, konalbuminu a inhibitoru sojového trypsinu, dále k purifikaci lipasy UL a purifikaci spalničkového viru a viru příušnic [51]. Podgornik a kol. dělili na DEAE disku několik oligonukleotidů s délkami řetězců 8, 10, 12 a 14 nukleotidů. Výsledek izokratické separace této směsi oligonukleotidů je na obr. 12 [52].



Obr. 12: Ukázka izokratické separace oligonukleotidů na CIM® DEAE monolitickém disku. Podmínky: Mobilní fáze: 0,46 M NaCl v 20 mM Tris-HCL pufru, pH 8,5; Průtoková rychlost 9 ml/min; Vzorek: 50 µg/ml oligo 8, 150 µg/ml oligo 10, 450 µg/ml oligo 12 a 750 µg/ml oligo 14 rozpuštěné v pufru; Aplikovaný objem: 20 µl; Detekce: UV při 260 nm [52].

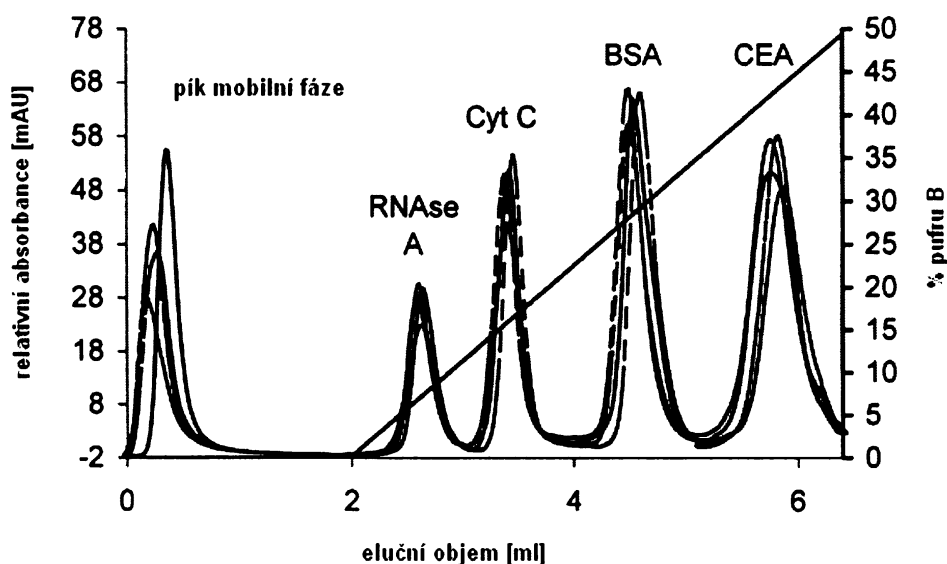
## 2.4.2 CIM® RP-SDVB monolitický disk

Monolitické nosiče s reverzní fází na základě styren-divinylbenzenu byly poprvé představeny v roce 1993 jako polymer připravený volnou radikálovou polymerací [53].

Materiál CIM® RP-SDVB diskové monolitické kolony je makroporézní styren-co-divinylbenzenový (SDVB) polymer. Tvar monolitu RP-SDVB monolitického disku je stejný, jako ve všech CIM® diskových monolitických kolonách, založených na jiných chemických interakcích. Přestože je disk označený jako reverzní fáze, má nosič na svém povrchu vázány skupiny C4. Tento disk může být použit v reverzní chromatografii proteinů, DNA či peptidů a oligonukleotidů. Díky struktuře a chemické stabilitě SDVB monolitu lze použít průtokových rychlostí až 30 ml/min a pracovní rozsah pH je u tohoto disku doporučován od 1 do 13.

Jediná zatím publikovaná práce s využitím RP-SDVB disku se zabývá separací proteinů na tomto nosiči a studiem vlivu na separaci biomolekul po vložení různého počtu disků do držáku, čímž je kolona záměrně prodlužována. V tomto experimentu byla studována směs 4 proteinů (ribonukleasy A (RNase A), cytochromu C (Cyt C), hovězího

sérového albuminu (BSA) a ovalbuminu (CEA)). Do držáku byly vloženy nejprve 4 poté 3, 2 a na konec 1 disk viz obr. 13. Délka kolony se tedy měnila od maximální délky, tedy 12 mm až na 3 mm. Tlak vyvíjený na kolonu (ve 20 % acetonitrilu při průtokové rychlosti 10 ml/min) s rostoucím počtem disků v držáku vzrůstal lineárně. S každým diskem přidaným na kolonu vzrostl tlak přibližně o 3 bar [54].



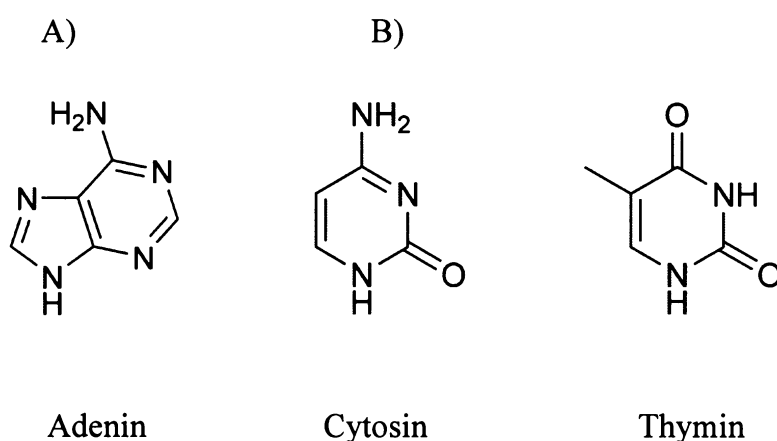
Obr. 13: Vliv délky kolony na kvalitu gradientové separace proteinů. Podmínky: stacionární fáze: RP-SDVB monolitická kolona různé délky (3, 6, 9 a 12 mm); pufr A 20 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; pufr B: 70 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; průtoková rychlost: 10 ml/min; gradient je vyznačen na obrázku; detekce: UV při 280 nm; teplota: pokojová; aplikovaný objem 20  $\mu$ l; kontrola průtoku: digitální průtokometr (K-3773, Fázové separace, VB); vzorky 1,5 mg/ml ribonukleasa A (RNase A), 0,5 mg/ml cytochrom C (Cyt C), 2,5 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a 3,0 mg/ml ovalbuminu (CEA), všechny rozpuštěny ve vysoce čisté vodě [54].

## 2.5 Nukleotidy

Nukleotidy jsou hlavní deriváty heterocyklických bází purinu a pyrimidinu a jsou základními stavebními jednotkami nukleových kyselin. Hlavními purinovými bázemi jsou adenin a guanin, pyrimidinovými bázemi jsou cytosin, thymin a uracil (viz obr. 14). Jednou z hlavních úloh purinových a pyrimidinových nukleotidů je účast v četných fosfotransferových reakcích. V organismu mají nukleotidy velké množství funkcí. Např.

adenosinové deriváty jako je adenosin-5'-difosfát (ADP) je substrát a adenosin-5'-trifosfát (ATP) je produkt oxidativní fosforylace a ATP slouží jako hlavní biologický přenašeč volné energie. Guanosinové nukleotidy se účastní přeměny sukcinyl-CoA na sukcinát, tedy reakce spojené s fosforylací ADP na ATP. Z cytosinových derivátů např. cytosin-5'-trifosfát (CTP) je potřebný pro syntézu některých fosfoacylglycerolů v živočišných tkáních. Uracilové deriváty se účastní epimerací sacharidů, biosyntézy glykogenu, syntézy glykoproteinových a proteoglykanových oligosacharidů a mnoho dalšího. Mimo těchto základních derivátů bází nukleových kyselin se v organismu vyskytují i deriváty vzácnější, ale stejně potřebné, jako je např. inosin-5'-trifosfát (ITP) a mnoho dalších [55].

Na obr. 15, str. 28 jsou znázorněny struktury některých nukleotidů používaných v mé experimentální práci.

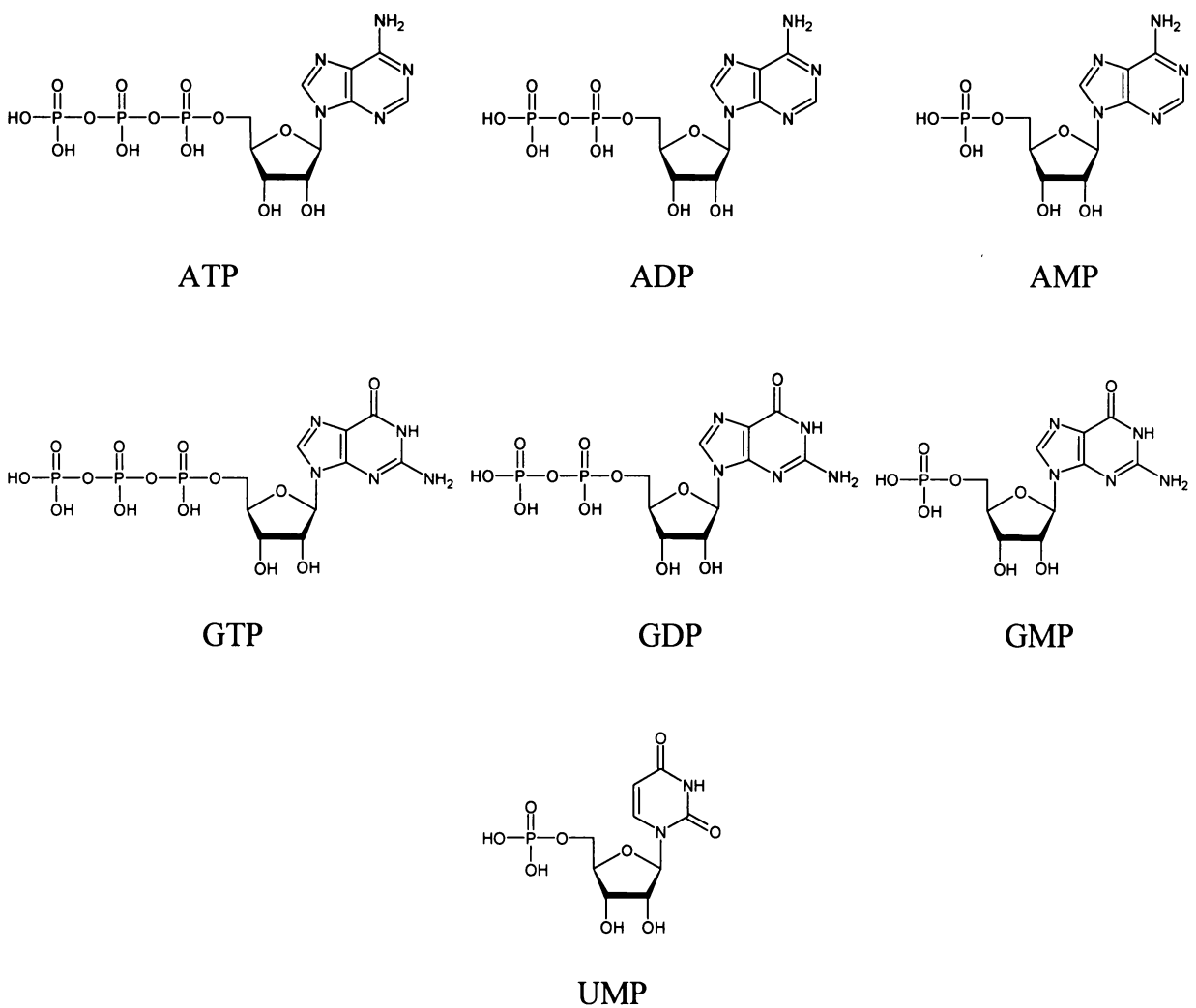


Obr. 14: A) Chemická struktura purinové báze nukleových kyselin a B) pyrimidinových bází nukleových kyselin použitých v experimentu.

Nukleotidy se skládají z báze, cukru a kyseliny fosforečné. Protože báze nukleových kyselin neionizují, je v iontově výměnné chromatografii pro separaci nukleotidů ze všech tří částí nejdůležitější kyselina fosforečná. V zásaditém pH jsou zbytky kyseliny fosforečné záporně nabitě a proto mohou interagovat se silným, ale i slabým anexem. Je také důležité, kolik zbytků kyseliny fosforečné molekula obsahuje. Trifosfáty obsahují tři zbytky kyseliny fosforečné, a proto jsou k anexu přitahovány největší silou a jsou nejdéle zadržovány na ve stacionární fázi. Naopak difosfáty a monofosfáty jsou přitahovány slaběji a proto eluují dříve.

Často se k separaci nukleotidů používají stacionární fáze s ionogenními skupinami diethylaminu (DEAE), nebo kvartérního aminu (QA). Porovnáním rozdělení dvanácti purinových a pyrimidinových ribonukleotidů (mono-, di- a trifosfátů) na DEAE a QA anexech se zabýval Cihlár a Rosenberg [56]. Nejlepšího výsledku rozdělení všech komponent dosáhli do 50 minut na silně bazickém anexu QA.

Nukleotidy je možné dělit také na reverzní fázi. Zatímco anion-výměnná chromatografie je vhodná spíše pro vysoce nabitě nukleotidy, reverzní fázi lze použít pro méně nabitě molekuly nukleosidů, bazí, ale i některých nukleotidů. Zhao J. a kol. se ve svém experimentu zabývali rozdělením směsi 21 nukleotidů, nukleosidů a bazí na reverzní fázi. Analýza v tomto případě trvala 35 minut [57].



Obr. 15: *Struktury nukleotidů RNA používaných v experimentální části práce.*

### **3. Cíl práce**

Cílem této práce bylo sledovat možnosti dělení složek nukleových kyselin - směsí nukleotidů na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku a směsi bazí nukleových kyselin na CIM<sup>®</sup> RP-SDVB monolitickém disku (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko) a najít optimální podmínky pro jejich rozdělení.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Přístrojové vybavení

Zdrojem konstantního průtoku mobilní fáze bylo gradientové čerpadlo *BETA 10*. Maximální provozní tlak je 40 MPa s rozsahem průtoku mobilní fáze 0,01-9,99 ml/min.

Pro sledování eluce dělených látek byl použit spektrometrický UV-VIS detektor *SAFÍR 800* s proměnnou vlnovou délkou v rozsahu 190-800 nm a úrovní šumu  $\pm 0,5 \times 10^{-5}$  AU.

Jako dávkovací zařízení byl použit analytický smyčkový ventil typu *D* s dávkovací vnější nerezovou smyčkou o objemu 20  $\mu$ l.

Na odplynění mobilní fáze byl používán on-line čtyřcestný vakuový degasser *DG 3014*.

Součástí chromatografické aparatury byl kolonový termostat *LCO 102* s regulovatelnou teplotou od okolní teploty po 99 °C, který nebyl použit, protože bylo pracováno při laboratorní teplotě. Všechny tyto součásti byly ovládané on-line pomocí osobního počítače a chromatografického softwaru ECOMAC. Všechny dosud zmíněné součásti pochází od firmy ECOM spol s r.o., Praha [58].

Na měření spekter vzorků byl použit UV-VIS spektrální fotometr *SPECORD M 40* od firmy CarlZeiss, Jena.

K přípravě mobilních fází byly používány elektrické předváhy KERN, elektrické míchadlo VARIOMAG<sup>®</sup> monotherm a magnet. K změření pH mobilní fáze byl používán pH metr firmy ATI Orion, model 370 s kombinovanou elektrodou Orion 91-05 (USA).

K přípravě vzorků byly používány analytické váhy s maximální možnou navázkou 110 g a minimální možnou navázkou 10 mg (firmy OHAUS<sup>®</sup>). K namíchání směsi vzorku byla používána automatická pipeta se schopností dávkovat objem v rozsahu 200-1000  $\mu$ l (firma Biohit proline). Vzorky byly filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m (Millex<sup>®</sup>-GV).

Byly používány dvě kolony a) monolitický disk CIM<sup>®</sup> DEAE a b) monolitický disk CIM<sup>®</sup> RP-SDVB (oba od firmy BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko) o průměru 12 mm a délce 3 mm, umístěné v pouzdře dodávaném výrobcem.

Data byla zpracována softwarem ECOMAC, dále byla exportována a zpracována v programu Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, USA). Absorpční spektra vzorků byla zpracována digitalizačním programem Windig.

## 4.2 Použité chemikálie

Jako vzorky byly používány tyto nukleotidy: adenosin-5'-trifosfát (ATP), adenosin-5'-difosfát (ADP) a adenosin-5'-monofosfát (AMP) (Reanal, Budapešť, Maďarsko), guanosin-5'-trifosfát (GTP), guanosin-5'-difosfát (GDP) (Reanal, Budapešť, Maďarsko), guanosin-5'-monofosfát (GMP) (Sigma-Aldrich, Německo), uridin-5'-monofosfát (UMP) (Reanal, Budapešť, Maďarsko), kyselina adenylová (neznámý výrobce, přesný obsah).

Na přípravu mobilních fází byly použity tyto chemikály: chlorid sodný p.a. (NaCl) Lach-Ner s.r.o., Česká Republika; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-HCl) Fluka, Sigma-Aldrich; kyselina chlorovodíková (HCl) Lach-Ner s.r.o., Česká Republika; kalibrační pufr: 1) pH 7,00 ± 0,01, 2) pH 4,00 ± 0,01, firma Hamilton, Švýcarsko; dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Lachema o.p., Brno, Česká republika; hydroxid draselný (KOH), Fluka; methanol pro HPLC, Lach-Ner s.r.o., Česká Republika.

Dále byly použity báze nukleových kyselin: adenin, cytosin, thymin (Sigma-Aldrich, Německo).



## 4.3 Separace směsi nukleotidů na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku

Pro dělení nukleotidů byl zvolen CIM<sup>®</sup> DEAE monolitický disk (slabý anex), jehož základem je polymer poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát) a ionogenní skupiny zde tvoří terciární amin.

Byly děleny celkem tři směsi nukleotidů. První směs byla složena z nukleotidů adeninu (ATP, ADP, AMP), druhá směs byla složena z nukleotidů guaninu (GTP, GDP, GMP), třetí směs obsahovala dva nukleotidy (kyselinu adenylovou a UMP). Experimenty byly prováděny na gradientovém analytickém systému, jehož všechny části jsou uvedeny v kapitole 4.1 na str. 30.

U směsí 1 a 2 byly ze získaných dat vyhodnoceny retenční časy jednotlivých píků ( $t_R$ ), mrtvý čas kolony ( $t_M$ ), výška píku ( $h$ ), šířka píku v polovině výšky ( $w_{1/2}$ ) a dále byly vypočteny mrtvý objem kolony ( $V_M$ ), redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ), retenční objem ( $V_R$ ), redukovaný retenční objem ( $V'_R$ ), počet teoretických pater ( $n$ ), výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) a rozlišení píků ( $R$ ).

### 4.3.1 Separace směsí nukleotidů 1 a 2

#### *Příprava vzorků a mobilních fází pro analýzu*

Směs 1 byla složena z nukleotidů ATP, ADP a AMP. Směs 2 obsahovala nukleotidy GTP, GDP, GMP. Do odměrných baněk o objemu 50 ml byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých nukleotidů mono-, di- a trifosfátů adeninu a guaninu. Koncentrace trifosfátových nukleotidů byly připraveny na hodnotu 150  $\mu\text{g/ml}$ , difosfátové nukleotidy měly koncentraci 400  $\mu\text{g/ml}$  a koncentrace monofosfátových nukleotidů měla hodnotu 700  $\mu\text{g/ml}$ . Část zásobního roztoku byla odebrána a proměřena na UV/VIS spektrálním fotometru *M 40*, abychom zjistili absorpční maximum potřebné k nastavení vhodné vlnové délky na detektoru HPLC aparatury.

Před aplikací vzorků do HPLC systému byla vždy ze zásobních roztoků vytvořena směs nukleotidů, vždy od jedné báze mono-, di-, trifosfátu. Z každého bylo odebráno

automatickou pipetou 0,5 ml a smícháno. Celkový objem směsi tedy činil 1,5 ml a původní koncentrace zásobních roztoků se snížily o dvě třetiny. V tab. 1 jsou uvedeny pracovní koncentrace nukleotidů ve směsi 1 (ATP, ADP, AMP). Pro směs 2 (GTP, GDP, GMP) platí tytéž.

Pracovalo se v gradientovém módu a jako pufr A byl zvolen 20 mM Tris-HCl, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. Pufr B byl 20 mM Tris-HCl obsahující NaCl o různých koncentracích (1 M, 0,75 M, 0,5 M, 0,3 M), pH pufru bylo upraveno vždy na hodnotu 7,4. pH mobilních fází bylo po celou dobu experimentu neměnné.

Tab. 1: *Hodnoty původních koncentrací jednotlivých nukleotidů ve vzorku a hodnoty konečných koncentrací jednotlivých nukleotidů v analyzované směsi.*

	Nukleotid	Koncentrace zásobního roztoku [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Použitý objem [ml]	Koncentrace nukleotidu ve směsi [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Směs 1	ATP	150	0,5	50
	ADP	400	0,5	134
	AMP	700	0,5	234

### ***Experimentální podmínky***

Pracovalo se na monolitické koloně - CIM<sup>®</sup> DEAE disk (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko). Průměr disku je 12 mm a délka 3 mm a je umístěn v pouzdře dodávaném výrobcem.

Bylo používáno tři různých průtokových rychlostí (1,5; 2,5; 3,5 ml/min) a v případě dělení směsi ATP, ADP, AMP bylo použito i vyššího průtoku (5,0 a 7,0 ml/min), aby byla otestována schopnost kolony dělit látky při takto vysokých průtocích.

Analýzy probíhaly při laboratorní teplotě, tedy obvykle 25 °C. Mobilní fáze byly kontinuálně odplyňovány na degaseru (součást HPLC aparatury).

Vzorky byly před použitím filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Aplikovaný objem vzorku na kolonu byl 20  $\mu\text{l}$ . Byl používán lineární gradient. Po skončení každé analýzy byla kolona ještě nejméně 3 minuty promývána pufrům B a poté 5 minut pufrům A při průtokové rychlosti 2,5 ml/min pro její reekvilibraci. Tím byly

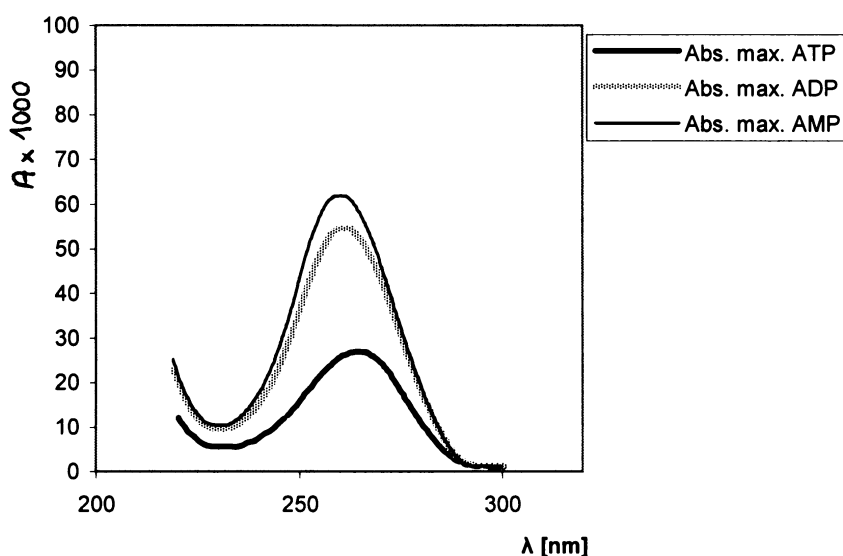
vymyty z kolony všechny případné nežádoucí látky a byla stabilizována základní linie systému pro další aplikace.

Každá analýza byla prováděna třikrát, tj. pro každou průtokovou rychlost a každou koncentraci NaCl pufru.

### ***Molekulová absorpční spektrometrie vzorků v UV oblasti***

Roztoky nukleotidů byly proměřeny na UV/VIS spektrálním fotometru. Nastavený rozsah vlnových délek na spektrometru byl 220-300 nm. Spektra byla zaznamenána a absorpční maxima byla opsána z automaticky generovaného záznamu. Na obr. 16 je vyobrazen záznam spekter nukleotidů adeninu. Spektrum s nejvyšším píkem náleží AMP, střední pík ADP a nejnižší pík patří ATP. Hodnota absorpčních maxim uvedených látek byla téměř totožná, tedy  $\lambda_{(\max)} = 260$  nm.

Také absorpční maxima tří nukleotidů GTP, GDP a GMP mají téměř stejnou hodnotu 254 nm.



Obr. 16: Absorpční spektra vzorků ATP, ADP a AMP naměřená na spektrálním fotometru SPECORD UV/VIS M 40. Původní záznam spekter byl převeden do digitální formy pomocí počítačového programu.

Původní záznam byl naskenován a data spekter byla převedena do digitální formy pomocí počítačového programu Windig. Z digitálních dat byl sestrojen v programu Microsoft Excel graf na obr. 16.

### 4.3.2 Separace směsi 3

#### *Příprava vzorků a mobilních fází pro analýzu*

Směs 3 obsahovala kyselinu adenylovou a UMP. Do odměrných baněk o objemu 100 ml byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých látek. Koncentrace zásobních roztoků kyseliny adenylové byla 450  $\mu\text{g/ml}$  a UMP 150  $\mu\text{g/ml}$ . Zásobní roztoky byly proměřeny na UV/VIS spektrálním fotometru *M 40*, abychom zjistili absorpční maxima jednotlivých látek a mohli nastavit vhodnou vlnovou délku na detektoru HPLC aparatury. Ze zásobních roztoků bylo odebráno po 1 ml a byla vytvořena směs, která byla aplikována do systému.

Nejprve byl pro separaci používán gradientový mód, ale na konec jsme dospěli k izokratické separaci. Pracovalo se tedy v izokratickém módu a jako pufr byl zvolen 20 mM Tris-HCl, jenž obsahoval NaCl o koncentracích 0,05 M a 0,03 M. pH pufru bylo upraveno vždy na hodnotu 7,4. pH mobilní fáze bylo po celou dobu experimentu neměnné.

#### *Experimentální podmínky*

Pro dělení této směsi byla opět používána monolitická kolona CIM<sup>®</sup> DEAE. Byly použity průtokové rychlosti 3,0 a 5,0 ml/min. Analýza probíhala při laboratorní teplotě a mobilní fáze byly kontinuálně odplyňovány na degaseu (součást HPLC aparatury). Vzorky byly před použitím filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Aplikovaný objem na kolonu byl 20  $\mu\text{l}$ . Separace této směsi probíhala v izokratickém módu. Po skončení každé analýzy byla kolona nejméně 3 minut promývána puftrem obsahujícím 1 M NaCl, aby byly z kolony vymyty případné nežádoucí látky. Poté byla kolona ještě 5 minut promývána elučním puftrem při průtokové rychlosti 2,5 ml/min pro její reekvilibraci. Každá analýza byla prováděna třikrát, tj. pro každou průtokovou rychlost a koncentraci NaCl v pufru.

## 4.4 Separaceází nukleových kyselin na CIM<sup>®</sup> RP-SDVB monolitickém disku

### *Příprava mobilních fází a vzorků pro analýzu*

Zází nukleových kyselin byly použity pro přípravu vzorků adenin, cytosin, thymin. Pracovalo se na stejném gradientovém analytickém systému v gradientovém módu. Pufrem A byl 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, jehož pH bylo nastaveno na hodnotu 6,3 za použití 1 M KOH. Roztok B byl roztok methanolu v destilované vodě (60%, v/v).

Jednotlivé báze nukleových kyselin byly rozpuštěny v 0,01 M HCl. Koncentrace jednotlivých vzorků byly zvoleny tak, aby bylo zřejmé, který pík náleží té které bázi. Báze byly v HCl celkem dobře rozpustné, thymin a adenin bylo nutné mírně zahřát pod tekoucí teplou vodou. Rozpuštěné báze byly posléze přelity do odměrných baněk o objemu 50 ml a doplněny připraveným pufrem A po rysku. Koncentrace adeninu byla 150 µg/ml, koncentrace cytosinu byla 200 µg/ml a koncentrace thyminu byla 100 µg/ml. Poté byla proměřena spektra vzorků stejným způsobem jako u nukleotidů v rozmezí vlnových délek 200-300 nm. Absorpční maximum pro adenin bylo 263 nm, pro cytosin 276 nm a pro thymin 265 nm. Na detektoru byla zvolena hodnota 264 nm jako nejvhodnější pro současné měření všech tří látek.

## 4.5 Statistické vyhodnocení

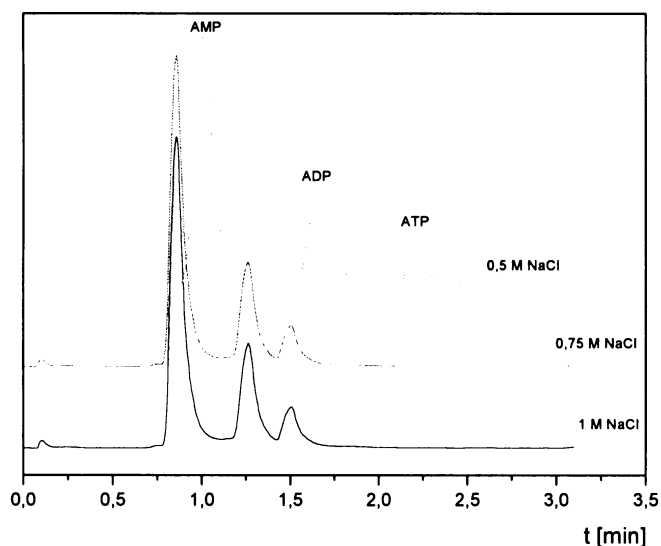
Byly vyhodnoceny střední hodnoty souborů ( $x_m$ ) retenčních časů jednotlivých píků. Dále byly vyhodnoceny relativní směrodatné odchylky ( $s_r$ ), variační rozpětí ( $R$ ) a kritériální hodnoty ( $Q_1$ ,  $Q_n$ ). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí kalkulačky a na papír podle [59].

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Separace směsi nukleotidů na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku

#### 5.1.1 Separace směsi 1 - ATP, ADP, AMP

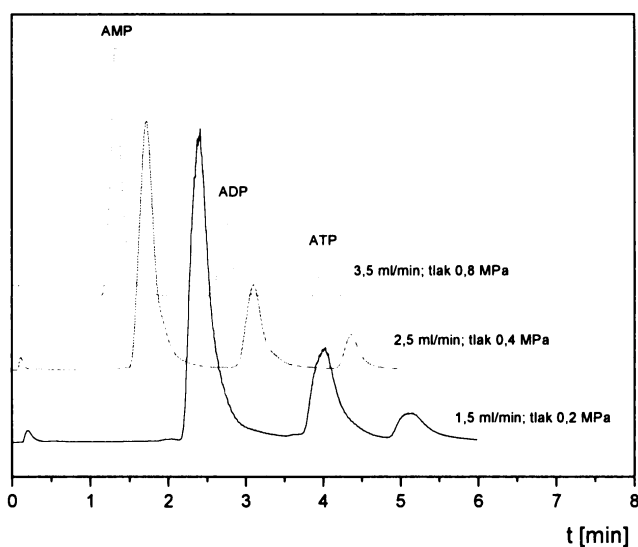
Vzorek obsahující směs ATP, ADP, AMP byl separován při různých průtokových rychlostech mobilní fáze a také bylo použito různých koncentrací NaCl v 20 mM Tris-HCl o pH 7,4. Vliv koncentrace NaCl na separaci složek směsi ATP, ADP, AMP při průtokové rychlosti mobilní fáze 3,5 ml/min je na obr. 17. Z obrázku je patrné, že s rostoucí koncentrací NaCl v pufru se sice snižuje retenční čas složek směsi, ale k jejich rozdělení až na základní linii nedochází v žádném z těchto případů.



Obr. 17: Rozdělení nukleotidů ATP, ADP a AMP na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku za použití lineárního gradientu 0% - 100% B. Pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 1 M; 0,75 M a 0,5 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234 µg/ml), ADP (134 µg/ml) ATP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl, gradient 3,5 min.

Po snížení koncentrace NaCl v pufru na hodnotu 0,3 M se prodloužily retenční časy analytů, ale zároveň došlo k lepšímu rozdělení jednotlivých složek. Na obr. 18 je vidět vliv průtokové rychlosti na separaci složek směsi. Při průtokové rychlosti mobilní fáze 1,5 ml/min se čas analýzy a zároveň retenční časy analytů prodlužují. K rozdělení složek až na základní linii při takto nízké průtokové rychlosti nedochází. Po zvýšení průtokové

rychlosti na 3,5 ml/min již k rozdělení na základní linii došlo. Tyto podmínky, tedy 0,3 M NaCl v pufru a průtoková rychlost 3,5 ml/min se zdají být optimálními.



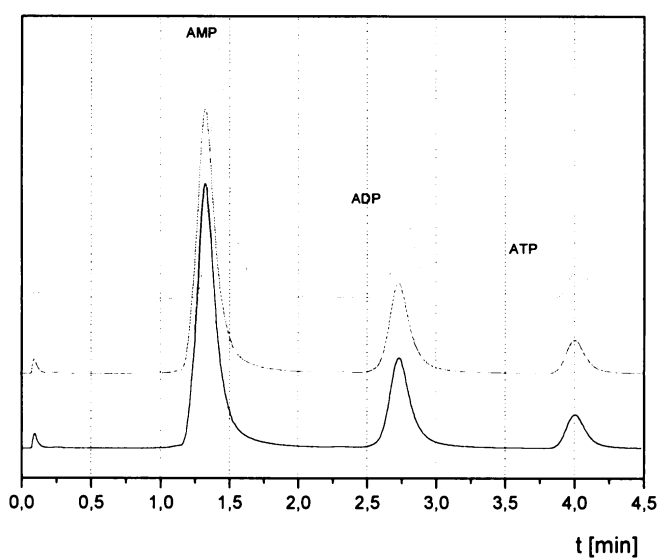
Obr. 18: Rozdělení nukleotidů ATP, ADP a AMP na CIM® DEAE monolitickém disku za použití lineárního gradientu 0% - 100% B. Pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtokové rychlosti 1,5; 2,5 a 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234 µg/ml), ADP (134 µg/ml) ATP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl, gradient 3,5 min

Abychom se přesvědčili, že jsou analyty od sebe odělené až na základní linii, vypočítali jsme rozlišení píků. Při podmínkách pro koncentraci 1 a 0,75 M NaCl v pufru a průtokových rychlostech 1,5 a 2,5 ml/min nebylo třeba rozlišení zjišťovat, protože již ze získaných chromatogramů bylo patrné, že píky se od sebe nerozdělily až na základní linii. V případě koncentrace 0,5 M NaCl v pufru a průtokové rychlosti 3,5 ml/min se z daného chromatogramu nedalo s určitostí zjistit, zda k dokonalému rozdělení došlo, nebo ne. Proto jsme, i pro tyto podmínky, rozlišení vypočetli. Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v tab. 2. Z tabulky je zřejmé, že rozlišení píků pro 0,3 M NaCl a průtok 3,5 ml/min má hodnotu blízkou 1,5 a můžeme konstatovat, že došlo k dokonalému rozdělení analytů až na základní linii. Pro koncentraci NaCl 0,5 M se rozlišení pohybuje kolem 1, což znamená, že se píky ještě nepatrně překrývají.

Tab. 2: Rozlišení píků pro koncentraci NaCl v pufru 0,5 M a 0,3 M.

Rozlišení píků	0,5 M NaCl v 20 mM Tris-HCl, pH 7,4	0,3 M NaCl v 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
$R_{(AMP,ADP)}$	1,06	1,71
$R_{(ADP,ATP)}$	0,99	1,68

Dále jsme chtěli otestovat opakovatelnost analýzy za optimálních podmínek. V tab. 3 (str. 41) jsou vyhodnoceny retenční charakteristiky chromatogramů získaných ze tří měření. Na obr. 19 můžeme porovnat opakovatelnost tří analýz provedených za optimálních podmínek. Z obrázku je patrné, že největší variabilita připadá na nukleotid AMP.



Obr. 19: Porovnání tří analýz rozdělení nukleotidů ATP, ADP a AMP na CIM® DEAE monolitickém disku provedených za těchto podmínek: lineární gradient 0%-100% pufr B; pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234 µg/ml), ADP (134 µg/ml) ATP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl, gradient 3,5 min

To nám potvrdilo i statistické vyhodnocení retenčních časů píků (viz kap. 5.3 str. 50, tab. 6). Porovnáme-li hodnoty směrodatné odchylky všech analytů ve směsi, zjistíme, že se

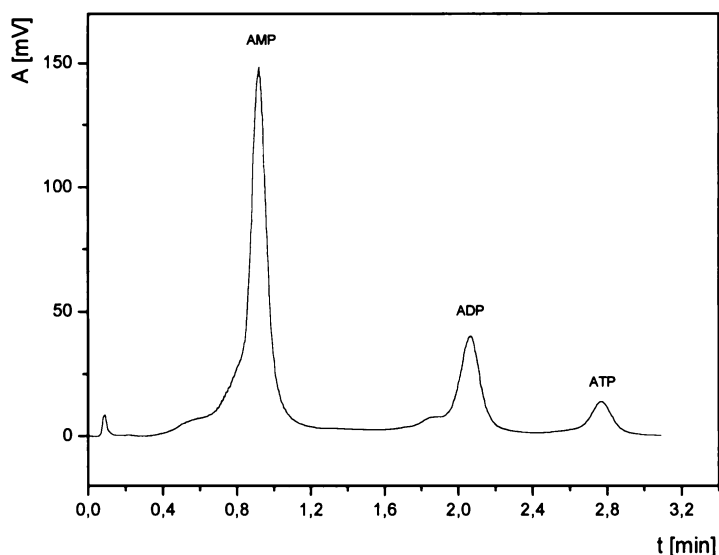


snižují v pořadí AMP, ADP, ATP. To je pravděpodobně způsobeno složením jednotlivých analytů. Molekula AMP je ze všech nejméně nabitá, protože obsahuje pouze jeden fosfát. Naopak molekula ATP obsahuje tři fosfáty a je tedy nejvíce nabitá. To souvisí s jejich afinitou ke stacionární fázi. AMP je ke stacionární fázi přitahován nejmenší silou a je možné, že je jeho chování ke stacionární fázi pokaždé trochu odlišné. Afinita molekuly ATP je oproti AMP o dva fosfáty větší a tedy je jeho chování ve stacionární fázi téměř pokaždé stejné. Proto je i jeho směrodatná odchylka velmi nízká.

Tab. 3: Vyhodnocení chromatografických píků směsi ATP, ADP, AMP. Kolona CIM<sup>®</sup> DEAE monolitický disk dlouhý 3 mm. Podmínky: lineární gradient 0%-100% pufr B: pufr A: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B: pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234 µg/ml), ADP (134 µg/ml), ATP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl.

Pík	Analyt	$t_M$ [min]	$V_M$ [ml]	$t_R$ [min]	$t'_R$ [min]	$V_R$ [ml]
1.	AMP			1,37	1,27	4,80
2.	ADP	0,10	0,35	2,75	2,65	9,63
3.	ATP			4,02	3,92	14,07
Pík	Analyt	$V'_R$ [ml]	$h$ [mV]	$w_{1/2}$ [min]	$n$	$H$ [µm]
1.	AMP	4,45	176,53	0,14	530,99	5,65
2.	ADP	9,28	59,21	0,16	1638,05	1,83
3.	ATP	13,72	22,17	0,16	3500,37	0,85

Dále jsme zkoumali průběh separace při vyšších průtokových rychlostech. Použili jsme průtokové rychlosti 5,0 a 7,0 ml/min. Koncentrace NaCl v pufru byla 0,3 M. Celková délka analýzy se sice zkrátila na 3 minuty, ale píky byly rozmyté a nedokonale oddělené (viz obr. 20 na str. 42). Tato rychlost byla zřejmě pro naše analyty příliš vysoká. Nejlepší tvar má pík patřící ATP, což zřejmě opět souvisí s jeho nejvyšším celkovým nábojem ze všech molekul. Vyhodnocení retenčních charakteristik této analýzy je v tab. 4 na str. 43 a statistické vyhodnocení retenčních časů píků je v kap. 5.3 (str. 50, tab. 7). Rozlišení píků bylo při této průtokové rychlosti 1,16 pro píky AMP, ADP a 0,98 pro píky ADP, ATP. Pohybovalo se tedy kolem 1, což znamená, že se píky překrývají.



Obr. 20: Rozdělení nukleotidů ATP, ADP a AMP na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku za použití lineárního gradientu 0%-100% pufr B; pufr A: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B: pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234  $\mu\text{g/ml}$ ), ADP (134  $\mu\text{g/ml}$ ), ATP (50  $\mu\text{g/ml}$ ); aplikovaný objem vzorku 20  $\mu\text{l}$ , gradient 3,5 min.

Z chromatogramu je patrná asymetrie píku tzv. fronting. Příčinou v tomto případě není předávkování kolony ani mimokolonové děje, protože při předchozích analýzách, získaných za nižších průtokových rychlostí (3,5 ml/min) a se stejnými koncentracemi analytů, k žádnému obdobnému rozmývání nedochází. Pravděpodobnou příčinou je zde zvolená průtoková rychlost, která je pro tento systém, tzn. slabý anex a nukleotidy s jedním až třemi fosfáty, příliš vysoká. Pík AMP je nejvíce rozmytý. Pravděpodobně to souvisí s přítomností pouze jedné fosfátové skupiny v jeho struktuře. Rychlost průtoku je tak vysoká, že je analyt strhnut z povrchu stacionární fáze proudem mobilní fáze, aniž by se pevně navázal ve stacionární fázi. Pík ADP je již méně rozmytý, protože má, oproti AMP, větší afinitu ke stacionární fázi. Konečně pík ATP je nejméně rozmytý. Trifosfát v této molekule pravděpodobně má již dostatečnou afinitu k ionexu, takže se i při vysoké průtokové rychlosti může pevně navázat ve stacionární fázi.

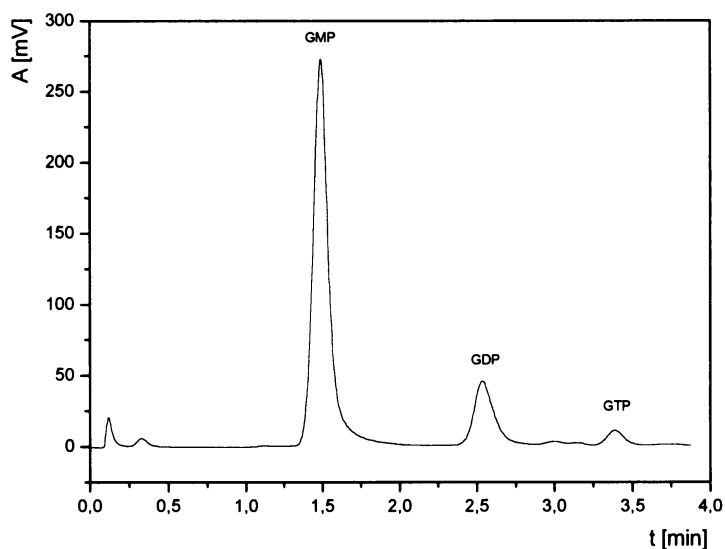
Tab. 4: Vyhodnocení chromatografických piků směsi ATP, ADP, AMP. Kolona CIM® DEAE monolitický disk dlouhý 3 mm. Podmínky: lineární gradient 0%-100% pufr B; pufr A: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B: pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 5 ml/min; vlnová délka detektoru 260 nm; vzorek: AMP (234 µg/ml), ADP (134 µg/ml), ATP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl.

Pík	Analyt	$t_M$ [min]	$V_M$ [ml]	$t_R$ [min]	$t'_R$ [min]	$V_R$ [ml]
1.	AMP			0,90	0,81	4,50
2.	ADP	0,09	0,45	2,06	1,97	10,30
3.	ATP			2,77	2,68	13,85
Pík	Analyt	$V'_R$ [ml]	$h$ [mV]	$w_{1/2}$ [min]	$n$	$H$ [µm]
1.	AMP	4,05	146,96	0,093	519,30	5,78
2.	ADP	9,85	38,89	0,130	1392,35	2,15
3.	ATP	13,40	13,40	0,137	2266,84	1,32

### 5.1.2 Separace směsi 2 - GTP, GDP, GMP

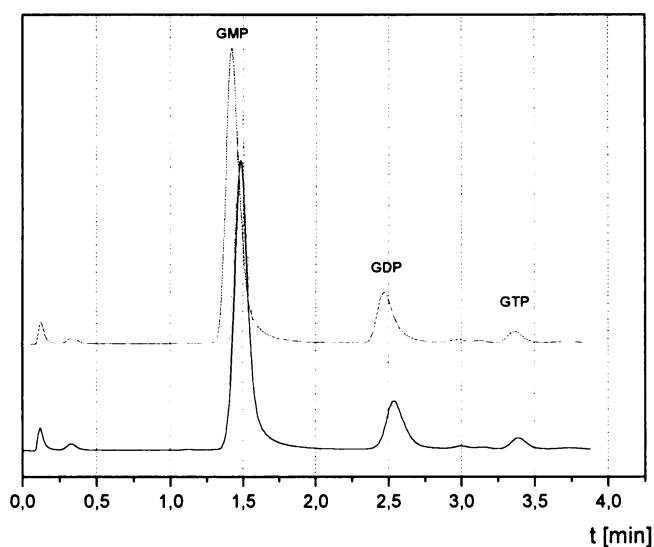
Vzorek byl tvořen směsí GTP ( $c = 50 \mu\text{g/ml}$ ), GDP ( $c = 134 \mu\text{g/ml}$ ) a GMP ( $c = 234 \mu\text{g/ml}$ ). U této směsi jsme předpokládali podobné chování jako u směsi předchozí, a proto jsme postupovali podobně. Při koncentracích 1 M; 0,75 M a 0,5 M NaCl v pufru a při průtokových rychlostech 1,5 a 2,5 ml/min probíhala separace velice podobným způsobem. Na obr. 21 můžeme vidět separaci směsi při průtokové rychlosti 3,5 ml/min a koncentraci NaCl v pufru 0,3 M.

Z chromatogramu je patrné, že celková délka analýzy je necelé 4 minuty, což je o něco menší, než při analýze první směsi. Pík posledního analytu se nepatrně rozmýval, což mohlo být způsobeno špatným vzorkem. Jelikož jsem neměla k dispozici vzorky nové, použila jsem vzorky s prošlou expirací. Nicméně, žádný větší vliv na analýzu tyto skutečnosti neměly.



Obr. 21: Rozdělení nukleotidů GTP, GDP a GMP na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku za použití lineárního gradientu 0%-100% pufr B; pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 254 nm; vzorek: GMP (234 µg/ml), GDP (134 µg/ml) GTP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl, gradient 3,5 min.

Na obr. 22 je vidět porovnání tří totožných analýz nukleotidů guaninu za optimálních podmínek, tj. při průtokové rychlosti mobilní fáze 3,5 ml/min a 0,3 M koncentrace NaCl v pufru. V kap. 5.3 (str. 50, tab. 8) je statistické zpracování retenčních časů jednotlivých píků za podmínek 0,3 M koncentrace NaCl v pufru a průtokové rychlosti 3,5 ml/min. Rozlišení jednotlivých píků bylo větší než 1,5 a došlo tedy k dokonalému rozdělení. Skutečné hodnoty rozlišení jsou uvedeny pod tab. 5 str. 46, ve které jsou vyhodnoceny chromatografické píky.



Obr. 22: Porovnání tří analýz rozdělení nukleotidů GTP, GDP a GMP na CIM® DEAE monolitickém disku za použití lineárního gradientu 0%-100% pufr B; pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 254 nm; vzorek: GMP (234 µg/ml), GDP (134 µg/ml) GTP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl; gradient 3,5 min.

K separaci směsi nukleotidů RNA na CIM® DEAE monolitické koloně docházelo při všech zvolených podmínkách. Při zvolené koncentraci NaCl v pufru A 0,5 M a průtokové rychlosti 3,5 ml/min se rozlišení pík pohybovalo kolem 1, což znamená, že píky se nepatrně, asi ze 2%, překrývají. Pouze při průtokové rychlosti 3,5 ml/min a 0,3 M koncentraci NaCl v pufru A bylo rozdělení pík dokonalé, až na základní linii. Rozlišení pík při těchto podmínkách bylo u obou směsí větší než 1,5, což znamená, že k žádnému překrytí nedochází.

Tab. 5: Vyhodnocení chromatografických píků směsi GTP, GDP, GMP. Kolona CIM<sup>®</sup> DEAE monolitický disk dlouhý 3 mm. Podmínky: lineární gradient 0%-100% pufr B; pufr A - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; pufr B - pufr A obsahující 0,3 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 3,5 ml/min; vlnová délka detektoru 254 nm; vzorek: GMP (234 µg/ml), GDP (134 µg/ml), GTP (50 µg/ml); aplikovaný objem vzorku 20 µl.

Pík	Analyt	$t_M$ [min]	$V_M$ [ml]	$t_R$ [min]	$t'_R$ [min]	$V_R$ [ml]
1.	GMP			1,46	1,34	4,69
2.	GDP	0,12	0,42	2,51	2,39	8,37
3.	GTP			3,38	3,26	11,41
Pík	Analyt	$V'_R$ [ml]	$h$ [mV]	$w_{1/2}$ [min]	$n$	$H$ [µm]
1.	GMP	4,27	269,63	0,10	1181,97	2,54
2.	GDP	7,95	46,64	0,14	1982,35	1,51
3.	GTP	11,99	11,19	0,11	5235,40	0,57

$$R_{(GMP, GDP)} = 1,75; R_{(GDP, GTP)} = 1,63$$

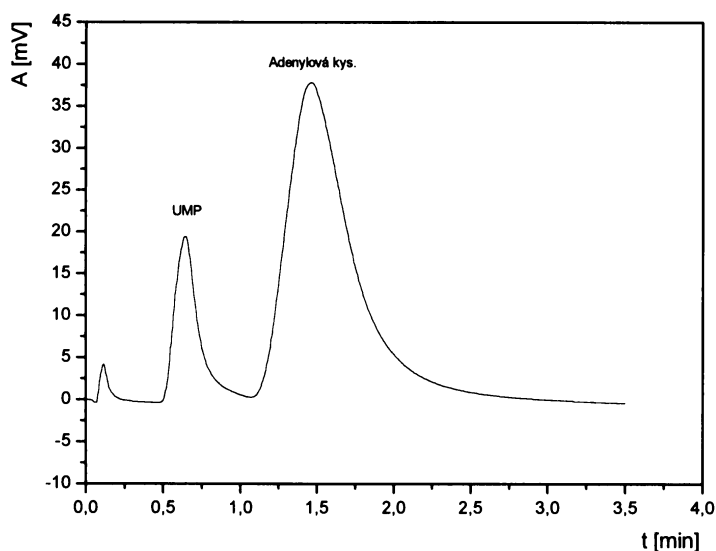
Při vyšších průtokových rychlostech (5,0 a 7,0 ml/min) bylo rozdělení nukleotidů opět nedokonalé a rozlišení píků se při těchto průtocích opět snížilo na hodnotu kolem 1.

Také bylo potvrzeno, že i při takto vysokých průtocích je tlak na koloně. Při nastaveném průtoku 7,0 ml/min činil tlak na kolonu 2,7 MPa.

Pro experiment tohoto typu jsme měli k dispozici ještě nukleotidy cytosinu. Připravili jsme si zásobní roztoky stejným způsobem, jako u směsi 1 a 2. Dělením této směsi jsme získali chromatogram, trochu jiného rázu. Píky patřící nukleotidům di- a trifosfátu byly oproti píkům di- a trifosfátů u směsi 1 a 2 velice malé. Protože jsme tyto zásobní roztoky připravovali ze vzorků s prošlou expirační lhůtou (r. 1980), je pravděpodobné, že se jejich složení během téměř 30 let mohlo změnit. Rozhodli jsme se tyto vzorky dále nepoužívat.

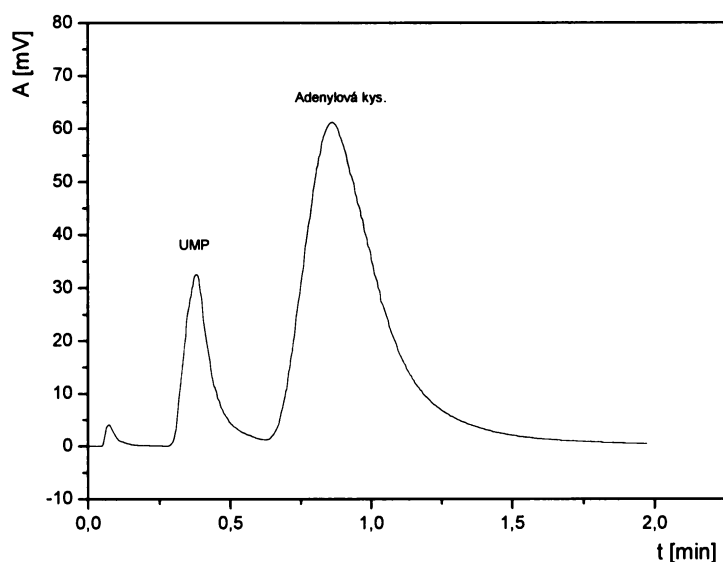
### 5.1.3 Separace směsi 3 – kys. adenylová a UMP

Pro separaci této směsi jsme zpočátku používali gradientovou eluci. Nejprve jsme použili přísadek 1 M NaCl v pufru a rychlost průtoku 1,5 ml/min, ale dostali jsme jeden pík. Z toho jsme usoudili, že koncentrace 1 M NaCl je pro rozdělení kyseliny adenylové a UMP příliš silná. Proto jsme se rozhodli snížit koncentraci NaCl na 0,5 M a na základě výsledku až na 0,1 M., avšak i při této koncentraci NaCl látky eluovaly společně. K rozdělení došlo až při použití koncentrace 0,03 M NaCl v pufru B. Protože koncentrace soli v pufru byla dosti nízká, rozhodli jsme se zkusit možnost izokratického dělení. Při použití pufru s 0,03 M NaCl dochází k separaci jak při původně použité průtokové rychlosti 2,0 ml/min, tak při rychlosti 5,0 ml/min viz obr 23.



Obr. 23 : Dělení směsi nukleotidů UMP a kyseliny adenylové v izokratickém módu na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitické koloně. Podmínky: eluční pufr – 20 mM Tris-HCl s 0,03 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 5,0 ml/min; vzorek: UMP ( $c = 75 \mu\text{g/ml}$ ); kys. adenylová ( $c = 225 \mu\text{g/ml}$ ) ve směsi; vlnová délka detektoru 260 nm.

Také při použití koncentrace NaCl 0,05 M a průtokové rychlosti 5,0 ml/min je dělení uspokojivé (viz obr. 24). Rozlišení píků za těchto podmínek je 0,9, což odpovídá částečnému překrytí obou píků, asi z 2,5%.



Obr. 24: Dělení směsi nukleotidů UMP a kyseliny adenylové v izokratickém módu na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitické koloně. Podmínky: eluční pufr – 20 mM Tris-HCl s 0,05 M NaCl, pH 7,4; průtoková rychlost 5,0 ml/min; vzorek: UMP ( $c = 75 \mu\text{g/ml}$ ); kys, adenylová ( $c = 225 \mu\text{g/ml}$ ) ve směsi; vlnová délka detektoru 260 nm.

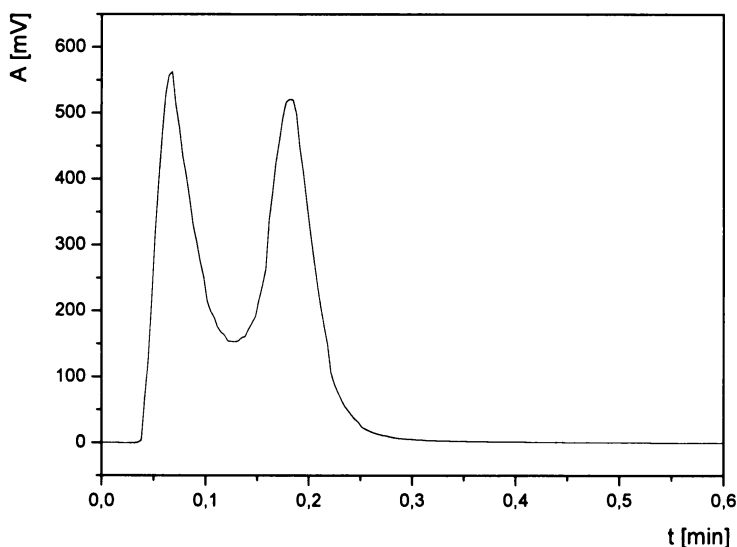
## 5.2 Pokus o separaci bazí nukleových kyselin na CIM<sup>®</sup> RP-SDVB monolitickém disku

Na HPLC systém byla připojena kolona CIM<sup>®</sup> RP-SDVB (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko), což je reverzní fáze s alkylovými řetězci C4. Nastavená průtoková rychlost byla zpočátku 1,5 ml/min. Nejprve byly na kolonu aplikovány jednotlivé báze, aby byly zjištěny jejich retenční časy. Ve všech případech jsme dostali překvapivý výsledek: dvojitý pík s téměř stejnou výškou obou píků a přibližně stejně velkou plochou (např. pro adenin viz obr. 25). Možnost, že by šlo o důsledek znečištění vzorků, jsme vyloučili na základě toho, že podobně se chovaly všechny aplikované. Dále jsem testovali, zda nejde o důsledek toho, že disk má malou kapacitu. Kdybychom použili příliš vysoké koncentrace analytů, jeden z píků by mohl být přebytek separované látky na koloně. Snížili jsme tedy koncentraci vzorku 2 krát, pak 3 krát, 5 krát a dokonce i 10 krát, ale výsledkem byly vždy dva spojené píky ve stejném poměru. Další hypotézou bylo, že dvojitý pík vzniká v důsledku velké průtokové rychlosti (analogicky k výsledkům v kapitole 5.1.1)



Proto jsme snížili průtokovou rychlost z původní hodnoty 3 ml/min postupně na 1, 0,5 a 0,2 ml/min, dvojitý pík však stále přetrvával. Možnost toho, že by šlo o kontaminaci použitým rozpouštědlem (pufr pH 6,3) jsme vyloučili na základě eluce čistou destilovanou vodou, která opět poskytuje dvojitý pík. Také eluce při vyšším pH (7,5 a 7,9) dává stejný výsledek. Pouze eluce 60% methanolem dává jeden pík, ale ve všech případech (pro všechny použité báze i jejich směs) tento pík teče v mrtvém objemu, nedochází tedy vůbec k dělení..

Na základě těchto výsledků jsme usoudili, že příčinou výskytu dvojitého píku je nejspíš špatné utěsnění monolitu v neporézním kroužku. V prostoru mezi monolitem a neporézním kroužkem se tedy vyskytuje "kanálek", kterým protéká téměř polovina vzorku, jenž se tak do stacionární fáze vůbec nedostane a na kolně se nezadržuje. Při eluci methanolem jsme dostali jeden pík nejspíš proto, že methanol je oproti elučnímu pufru více nepolární a báze se v něm lépe rozpouštějí, na kolně se vůbec nezadržují. V dalších experimentech na této koloně jsme proto již nepokračovali.



Obr. 25: Čistý vzorek adeninu aplikovaný na CIM<sup>®</sup> RP-SDVB monolitický disk. Podmínky: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,3; rychlost průtoku 1,5 ml/min; koncentrace adeninu 150 µg/ml, vlnová délka detektoru 263 nm.

### 5.3 Statistické vyhodnocení

Statistiky byly vyhodnoceny retenční časy píků směsi 1 a 2. Byly vyhodnoceny :

$x_m$  – medián,  $s$  – směrodatná odchylka,  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka,  $R$  – rozpětí souboru,  $Q_1$  – kritérium rozdílu nejmenších výsledků souboru,  $Q_n$  – kritérium rozdílu největších výsledků souboru,  $L_{1,2}$  – interval spolehlivosti souboru výsledků

Tab. 6: Statistické vyhodnocené retenčních časů pro píky ATP, ADP, AMP, průtokovou rychlost 3,5 ml/min a koncentraci NaCl v pufru A 0,3 M.

Pík	$x_m$ [min]	$s$	$s_r$ [%]	$R$	$Q_1$	$Q_n$	$L_{1,2}$
$t_M$	0,09	$4,8 \cdot 10^{-3}$	5,3	0,008	0,10	0,98	0,010
AMP	1,37	$59,0 \cdot 10^{-3}$	4,3	0,100	0,50	0,50	0,130
ADP	2,75	$23,7 \cdot 10^{-3}$	0,9	0,040	0,50	0,50	0,052
ATP	4,02	$13,0 \cdot 10^{-3}$	0,3	0,022	0,86	0,14	0,029

Tab. 7: Statistické vyhodnocené retenčních časů pro píky ATP, ADP, AMP, průtokovou rychlost 5 ml/min a koncentraci NaCl v pufru A 0,3 M.

Pík	$x_m$ [min]	$s$	$s_r$ [%]	$R$	$Q_1$	$Q_n$	$L_{1,2}$
$t_M$	0,09	$2,4 \cdot 10^{-3}$	2,62	0,004	0,20	0,70	0,005
AMP	0,91	$23,7 \cdot 10^{-3}$	2,59	0,040	0,81	0,19	0,052
ADP	2,06	$7,1 \cdot 10^{-3}$	0,34	0,012	0,48	0,56	0,016
ATP	2,77	$9,5 \cdot 10^{-3}$	0,34	0,016	0,03	0,98	0,021

Tab. 8: Statistické vyhodnocené retenčních časů pro píky GTP, GDP, GMP, průtokovou rychlost 3,5 ml/min a koncentraci NaCl v pufru A 0,3 M.

Pík	$x_m$ [min]	$s$	$s_r$ [%]	$R$	$Q_1$	$Q_n$	$L_{1,2}$
$t_M$	0,12	$7,1 \cdot 10^{-3}$	5,9	0,012	0,66	0,52	0,016
GMP	1,47	$39,6 \cdot 10^{-3}$	2,7	0,067	0,69	0,31	0,089
GDP	2,51	$40,2 \cdot 10^{-3}$	1,6	0,068	0,59	0,43	0,088
GTP	3,37	$13,6 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,023	0,48	0,52	0,030

## 6. Závěr

Optimální podmínky pro separaci zkoumaných směsí nukleotidů 1 (AMP, ADP, ATP) a 2 (GMP, GDP, GTP) na CIM<sup>®</sup> DEAE monolitickém disku jsou průtoková rychlost 3,5 ml/min a koncentrace 0,3 M NaCl v pufru 20 mM Tris-HCl o pH 7,4, kdy dochází k dokonalému rozdělení. Pro separaci směsi 3 (kys. adenylová a UMP) byly nejlepšími podmínkami izokratická eluce 20 mM Tris-HCl s 0,05 M NaCl o pH 7,4.

Tlak vyvíjený na kolonu při vyšších průtokových rychlostech je v porovnání s náplňovou kolonou nízký a analýzy probíhají velmi rychle. V mém případě trvala analýza směsi při optimálních podmínkách max. 4,5 minut.

K separaci směsi bazí nukleových kyselin vůbec nedošlo pravděpodobně proto, že zvolený CIM<sup>®</sup> RP-SDVB monolitický disk byl poškozený. Příčinou nejspíš byla nějaká netěsnost mezi monolitem a neporézním kroužkem. Polovina vzorku pak protékla netěsností a polovina monolitem. Z tohoto důvodu jsme již dále disk nepoužili.

## *Použitá literatura*

- [1] Neufingerl, F.; Urban, O.; Viehhauser, M.: *Chemie 1, Obecná a anorganická chemie*, Nakladatelství Wahlberg Praha 1979.
- [2] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.; *Základní analytická chemie*, Nakladatelství Karolinum, Praha 2003.
- [3] Tůma, P.; Opekar, F.; Jelínek, I.: Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu, *Chem. Listy* 93; 533-535 (1999).
- [4] Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanská, M.; Volánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chem. Listy* 101, 190-199, (2007).
- [5] Meyers, J. J.; Liapis, A. I.: Network modeling of the convective flow and diffusion of molecules adsorbing in monoliths and in porous particles packed in a chromatographic column, *J. Chromatogr. A* 852, 3-23, (1999).
- [6] Liapis, A. I.; Meyers, J. J.; Crosser, O. K.: Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths. Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *J. Chromatogr. A* 865, 13-25, (1999).
- [7] Churáček, J.; Jandera, P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*, SNTL 1985.
- [8] Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases, *Biochem. J.* 35, 1358-1368 (1941).
- [9] Pacáková, V.; Štulík, K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. SPN Praha, 1986.
- [10] Kadoš, E.; Berek, D.: *Základy kvapalinovej chromatografie*. Alfa, Bratislava 1979.
- [11] [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/gc/GC02.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf) (dostupné 24.4.2009)
- [12] Scott, R. P. W., Dispersion in Chromatography Columns, dostupné na url: <http://www.chromatography-online.org/Dispersion/Alternative-Equations/Giddings/rs65.html>
- [13] Fornstedt, T.; Zhong, G.; Guiochon, G.: Peak tailing and slow mass transfer kinetics in nonlinear chromatography, *J. Chromatogr. A* 742, 55-68, (1996).
- [14] Szumski, M.; Klodzińska, E.; Jarmalavičienė, R.; Maruška, A.; Buszewski, B.: Considerations on influence of charge distribution on determination of biomolecules and microorganisms and tailoring the monolithic (continuous bed) materials for bioseparations, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 107-115, (2007).

[15] Ion Exchange chromatography, Principles and Methods

[http://sbio.uct.ac.za/Sbio/documentation/Ion\\_exchange\\_chromatography.pdf](http://sbio.uct.ac.za/Sbio/documentation/Ion_exchange_chromatography.pdf)

(dostupné 23.3.2009)

[16] Halčák, L.: Ionexová chromatografia, v knize: Biochemické laboratórne metódy (M. Ferenčík, B. Škárka a kol., str. 180-193, ALFA/SNTL, Bratislava, 1981).

[17] Vařilová, T.: Stacionární fáze v afinitní chromatografii, Chem. Listy 99, 570-577, (2005).

[18] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf> (dostupné 23.3.2009)

[19] Marhol, M.: Ion exchangers in analytical chemistry, Academia, ČAV Praha 1982.

[20] Hjärten, S.; Li, L. J.; Rong, Z.: High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, J. Chromatogr. 431 (1), 273-275, (1989).

[21] Tennikova, T., B.; Belenkii, B., G.; Svec, F.: High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation, J.Liquid Chromatogr. 13 (1), 63-70, (1990).

[22] Svec, F.; Fréchet, J., M., J.: Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, Anal. Chem. 68, 820-822, (1992).

[23] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tahala, N.: Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. Anal. Chem. 68, 3498-3501, (1996).

[24] Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Irgum, K.: Monolithic "molded" porous materials with high flow characteristics for separation, catalysis, or solid phase chemistry: Control of porous properties during polymerization, Chem. Mater. 8, 744-750, (1996).

[25] Svec, F.: My favorite materials: Porous polymer monoliths, J. Sep. Sci. 32, 3-9, (2009).

[26] Barut, M.; Podgornik, A.; Brne, P.; Štrancar, A.: Convective interaction media short monolithic columns: Enabling chromatographic supports for the separation and purification of large biomolecules, J. Sep. Sci. 28, 1876-1892, (2005).

[27] Miyabe, K.; Guiochon, G.: Characterization of monolithic columns for HPLC. J. Sep. Sci. 27, 853-873, (2004).

[28] Švec, F.: Monolitické stacionární fáze pro HPLC. Místo narození: Praha, Chem. Listy 98, 232-238 (2004).

[29] Hahn, R.; Hansen, E.; Mollerup, J.; Jungbauer, A.: Mass transfer properties of monoliths, Sep. Sci. And Technol. 37 (7), 1545-1565, (2002).

- [30] Svec, F.; Kurganov A. A.: Less common applications of monoliths III. Gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1184, 281-296, (2008).
- [31] Svec, F.: Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid phase extraction, *J. Chromatogr. B* 841, 52-64, (2006).
- [32] Svec, F.: Less common applications of monoliths I: Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports, *Electrophoresis* 27, 947-961, (2006).
- [33] <http://chromservis.cz/item/ONYX-phase?lang=cz> (dostupné 18.3.2009)
- [34] Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Kimura, H.; Hara, T.; Tokuda, D., Tanaka, N.: Properties of monolithic silica columns for HPLC, *Analytical Science* 22, 491-501, (2006).
- [35] Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T; and Tanaka, N.: Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 960, 85-96, (2002).
- [36] Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Jinnai, H.; Hosoya, K.; Ikegami, T; and Tanaka, N.: Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 960, 53-63, (2002).
- [37] Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N.: Monolithic LC columns, *Anal. Chem.* 73, 420-429, (2001).
- [38] Nakanishi, K.: Pore structure control of silica gels based on phase separation, *J. Porous. Mater.* 4, 67-112, (1997).
- [39] Al-Bokari, M.; Cherrak, D.; and Guiochon, G.: Determination of the porosities of monolithic columns by inverse size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A* 975, 275-284, (2002)
- [40] Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q.: Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 954, 5-32, (2002).
- [41] Štulík, K.; Pacáková, V.; Suchánková, J.; Coufal, P.: Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *J. Chromatogr. B* 841, 79-87, (2006).
- [42] Svec, F.: Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths, *J. Sep. Sci.* 27, 747-766, (2004).

- [43] Svec, F.; Fréchet, J. M. J.: Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative- scale ion-exchange chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 702, 89-95, (1995).
- [44] BIA Separations d.o.o., Pioneer in Monolith Separation Technology, CIM Convective Interaction Media<sup>®</sup> For Biochromatography, Publication CPB10402, Slovenia 2002; [www.monoliths.com](http://www.monoliths.com) (dostupné 19.2.2007).
- [45] Barut, M.; Podgornik, A.; Brne, P.; Štrancar, A.: Convective Interaction Media short monolithic columns: Enabling chromatographic supports for the separation and purification of large biomolecules. *J. Sep. Sci.* 28, 1876-1892, (2005).
- [46] BIA Separations; Product description dostupné na <http://www.monoliths.com/documents/products/cimdisks.asp> (19.2.2007)
- [47] BIA Separations, CIM Convective Interaction Media<sup>®</sup>; Rapid Chromatography for Large Biomolecules; Publication CPB11106; Slovenia 2006, [http://www.monoliths.com/Library/pdf/bia\\_brochure%2006%20final.pdf](http://www.monoliths.com/Library/pdf/bia_brochure%2006%20final.pdf) ; (dostupné 19.2.2007)
- [48] Ostryanina, N. D.; Vlasov, P.; Tennikova, T. B.: Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. *J. Chromatogr. A* 949, 163-171, (2002).
- [49] Branovic, K.; Lattner, G.; Barut, M.; Strancar, A.; Josic, Dj.; Buchacher, A.: Very fast analysis of impurities in immunoglobulin concentrates using conjoint liquid chromatography on short monolithic disks, *Journal of Immunological Methods* 271, 47-58, (2002)
- [50] <http://www.monoliths.com/products.asp?FolderId=247>; (dostupné 20.3.2009)
- [51] <http://www.monoliths.com/products.asp?FolderId=247&TabId=301> (dostupné 20.3.2009)
- [52] Podgornik, A.; Barut, M.; Jančar, J.; Štrancar, A.: Isocratic separations on thin glycidyl methacrylate-ethylenedimethacrylate monoliths, *J. Chromatogr. A* 848, 51-60, (1999).
- [53] Tennikova, T. B. and Svec, F.: High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. *J. Chromatogr. A* 646, 279-288, (1993).
- [54] Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Jakša, S.; Zigon, M.; Štrancar, A.: High Performance Reversed-Phase Liquid Chromatography using Novel CIM RP-SDVB Monolithic Supports. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 24 (16), 2429-2443, (2001).

[55] Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.: Harperova biochemie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, (2002).

[56] Cihlár, T.; Rosenberg, I.: Efficient separation of natural ribonucleotides by low-pressure anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 644, 299-305, (1993).

[57] Zhao, J.; Bryan, T.; Graham, H., F.: Separation of ribonucleotides, ribonucleosides, deoxyribonucleotides, deoxyribonucleosides and bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 673, 167-171, (1994).

[58]

[http://www.ecomsro.cz/files/products/5/574/cs/Info\\_SE\\_03\\_Gradient\\_analytical\\_system-cz.pdf](http://www.ecomsro.cz/files/products/5/574/cs/Info_SE_03_Gradient_analytical_system-cz.pdf) (dostupné 20.3.2009)

[59] <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/praktika.html> (dostupné 24.4.2009).