

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Šímová

Separace peptidů na nové stacionární fázi na bázi
cyklofruktanu, charakterizace separačního systému

Separation of peptides on a newly designed cyclofructan-
based stationary phase, characterization of separation
system

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

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

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

V Praze dne 6. května 2013.

Podpis

Abstrakt

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se používá k separaci polárních látek jako alternativa k reverznímu módu HPLC, ve kterém jsou tyto látky obtížně separovatelné nebo mají velmi nízké retence. V současné době existuje mnoho komerčně dostupných stacionárních fází a další se stále vyvíjí. V této práci byly porovnávány separační a interakční vlastnosti chromatografických systémů se silikagelovou stacionární fází a se stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu za podmínek hydrofilní interakční kapalinové chromatografie. Byly optimalizovány metody pro separace směsí čtyř pentapeptidů a pěti nonapeptidů na těchto dvou stacionárních fázích. Následně byly studovány interakce, které se významně uplatňují v optimalizovaných separačních systémech modelem lineárních vztahů volných energií. Interakce významně ovlivňující retenci analytů na obou stacionárních fázích jsou interakce prostřednictvím vodíkové vazby a na stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu také disperzní a elektrostatické interakce.

Klíčová slova: peptidy, cyklofruktan, LFER, HILIC

Abstract

Hydrophilic interaction liquid chromatography is in the present time very often used for separation of polar compounds which are complicated separated in reverse phase HPLC or they are not sufficiently retained. Various stationary phases suitable for HILIC are commercially available and new stationary phases are still developing. In this work bare silica and isopropyl cyclofructan modified silica stationary phases were compared. Chromatographic behavior of sets of four pentapeptides and five nonapeptides was tested in detail under hydrophilic interaction liquid chromatography. Additionally, mobile phase composition changes the types of interaction and their strengths were studied using linear free energy relationship method. Obtained results denoted that the main role in the retention mechanism on the isopropyl cyclofructan stationary phases play hydrogen bond acidity and dipolarity/polarizability, while dispersion interactions are preferred in the mobile phase. On the other hand, bare silica stationary phase provides only one interaction type - hydrogen bond acidity.

Key words: peptides, cyclofructan, LFER, HILIC

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za poskytnuté téma, všestrannou pomoc, cenné rady, ochotu a především trpělivost. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemné atmosféry v laboratoři.

Práce vznikla za finanční podpory grantů KONTAKT AM 2010 LH11018, CEEPUS CIII-RO-0010-07-1213, GAUK 356411 a MŠMT ČR 0021620857.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1. Úvod	8
2. Teoretický úvod	9
2.1. Separační módy vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	9
2.1.1. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie.....	9
2.1.1.1. Historie	10
2.1.1.2. Mechanismus separace.....	10
2.1.1.3. Stacionární fáze pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii	12
2.1.1.3.1. Cyklofruktanové stacionární fáze	14
2.1.1.3.2. Silikagelová stacionární fáze.....	15
2.2. Testování chromatografických kolon.....	16
2.2.1. Waltersův test	17
2.2.2. Modely lineárních vztahů volných energií	17
2.2.2.1. Metoda lineárních vztahů volných energií.....	18
2.3. Statistické zpracování dat.....	20
2.3.1. Mnohorozměrná lineární regrese	20
2.4. Peptidy.....	21
2.4.1. Pentapeptidy.....	21
2.4.2. Nonapeptidy.....	22
3. Experimentální část.....	23
3.1. Přístroje a pomůcky.....	23
3.2. Použité chemikálie	24
3.3. Příprava vzorků	26
3.4. Příprava pufu.....	26
3.5. Použité mobilní fáze.....	26
3.6. Separační podmínky	27
3.7. Výpočty chromatografických parametrů.....	28
4. Výsledky a diskuze	29
4.1. Optimalizace separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů	29
4.1.1. Separace směsi pentapeptidů	29
4.1.2. Separace směsi nonapeptidů	37
4.2. Charakterizace separačních systémů.....	43
4.2.1. Waltersův test	43
4.2.2. Model lineárních vztahů volných energií	44
4.2.2.1. Porovnání regresních koeficientů.....	44
4.2.2.2. Vhodnost použitého modelu lineárních vztahů volných energií.....	48
4.2.2.3. Vztah mezi výsledky modelu lineárních vztahů volných energií a retencí peptidů.....	51
5. Závěr	52
Použitá literatura.....	54

Seznam zkratk a symbolů

A	Charakteristika proton-donorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
ACN	Acetonitril
A_S	Faktor asymetrie
B	Charakteristika proton-akceptorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
a_0, a_1, a_n	Člen rovnice mnohorozměrné lineární regrese
CF	Cyklofruktan
c	Úsek rovnice LFER
C.M.	Kompletní LFER model
CI	Interval spolehlivosti
E	Rozsah molární refrakce
f	Vzdálenost maxima píku od šířky píku v 5 % výšky
H_0, H_1	Nulová a alternativní hypotéza
HI	Index hydrofobicity
HILIC	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
k	Retenční faktor
LFER	Model lineárních vztahů volných energií (linear free energy relationship model)
LSER	Model lineárních vztahů solvatačních energií (linear solvation energy relationship)
$\log k_{calc}, \log k_{exp}$	Logaritmus retenčního faktoru vypočtený pomocí rovnice LFER, logaritmus změřeného retenčního faktoru
$\log P$	Logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi n -oktanol a vodu
Mpa	Merkaptopropionová kyselina
NCSS	Statistický program
NPLC	Kapalinová chromatografie na normálních fázích
p -hodnota	Nejmenší hladina, na které je zamítnuta hypotéza
QSAR	Kvantitativní vztah mezi strukturou a účinností (quantitative structure-activity relationships)
QSPR	Kvantitativní vztah mezi strukturou a vlastnostmi (quantitative structure-property relationships)
QSRR	Kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí (QSRR - quantitative structure-retention relationships)
R	Korelační koeficient
R_S	Rozlišení
RPLC	Kapalinová chromatografie na reverzních fázích
S	Dipolarita/polarizibilita
SF	Stacionární fáze
SI	Silanolový index
t_M	Mrtvý čas kolony
t, t_{R1}, t_{R2}	Retenční časy analytů
V	McGowanův charakteristický objem solutu
$w_1, w_2, w_{0,05}$	Šířky píků v polovině výšky a v 5 % výšky
x_1, x_n	Člen rovnice mnohorozměrné lineární regrese
a, b, e, s, v	Regresní koeficienty v rovnici LFER

1. Úvod

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se v posledních letech dostává do popředí metod využívaných pro separaci polárních látek. Výhoda této chromatografie spočívá v tom, že umožňuje separaci polárních látek, které jsou obtížně separovatelné nebo rozpustné v obou běžně používaných módech (reverzním a normálním). Tato metoda se používá zejména jako alternativa ke kapalinové chromatografii na reverzních fázích, protože vysoce polární látky zde nejsou dostatečně zadržovány.

Cílem této diplomové práce je optimalizovat separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů metodou hydrofilní interakční kapalinové chromatografie na nové stacionární fázi na bázi isopropylovaného cyklofruktanu. Porovnat separace peptidů na této stacionární fázi se separacemi na silikagelové stacionární fázi. Následně popsat interakce, které se uplatňují v daných systémech a mají vliv na retenci analytů v optimalizovaném separačním systému metodou lineárních vztahů volných energií a porovnat tyto interakce na obou stacionárních fázích.

Teoretická část této práce zahrnuje představení hydrofilní interakční kapalinové chromatografie a metod používaných k charakterizaci separačních systémů, zejména možných interakcí uplatňujících se v chromatografických separačních systémech.

2. Teoretický úvod

2.1. Separační módy vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je dnes jednou z nejvíce používaných separačních technik. Využívá se k separaci širokého spektra různorodých látek. V současné době se využívá několik separačních módů kapalinové chromatografie.

Kapalinová chromatografie, která používá polární stacionární fázi (SF) a nevodnou nepolární mobilní fázi, je obvykle nazývána jako kapalinová chromatografie na normálních fázích (NPLC). Charakteristické eluční pořadí v tomto případě je od méně polárních analytů k více polárním analytům. Další možností je tzv. kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RPLC), která využívá nepolární neboli hydrofobní stacionární fázi a polárnější mobilní fázi. Separační pořadí je pak obrácené než u NPLC, a to od polárnějších analytů k méně polárním. RPLC je v současné době nejvíce rozšířenou kapalinovou chromatografií, zejména kvůli široké selektivitě, reprodukovatelnosti, možnosti použití k analýze biologických materiálů a vhodnosti detekce pomocí hmotnostního spektrometru.¹

2.1.1. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC) je charakteristické použití hydrofilní stacionární fáze, např. silikagel nebo silikagel modifikovaný polárními skupinami (např. diolové, kyano, amidové skupiny) nebo celými polárními molekulami (např. cyklodextrin, cyklofruktan).² Mobilní fázi tvoří organická fáze minimálně z 60-70 % (zejména acetonitril) a zbytek vodné fáze (voda nebo pufr), která je zastoupena minimálně z 2,5 %.³ Vyšší eluční sílu v tomto módu má vodná složka mobilní fáze. Eluční pořadí analytů je stejné jako u NPLC.⁴

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se v posledních letech stává stále více rozšířenou metodou pro separaci polárních, ionizovatelných látek a také biologicky aktivních látek.⁵ Nahrazuje tak metodu separace v RP módu, ve kterém jsou tyto látky obtížně separovatelné nebo vykazují velmi nízké retence.

2.1.1.1. Historie

Již v roce 1975 Linden a Lawhead⁶ úspěšně popsali separaci sacharidů při použití modifikovaného silikagelu amino- skupinami jako stacionární fázi a jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu s vodou (ACN/H₂O 75/25, 77/23, 80/20, 85/15, 90/10 (v/v)). Jako první popsal a pojmenoval hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii v roce 1990 Alpert⁷ jako chromatografickou techniku, kde se uplatňuje interakce analytů s hydrofilní stacionární fází s následnou elucí relativně hydrofobní mobilní fází s určitým zastoupením vodné fáze. Tato technika je tedy variantou NPLC. Alpert použil hydrofilní polymerní stacionární fázi k separaci aminokyselin. Eluční pořadí aminokyselin bylo obrácené, než zjištěné pořadí v RPLC.⁷

V dnešní době se již HILIC řadí mezi často používané separační módy.^{8, 9, 10, 11}

2.1.1.2. Mechanismus separace

Mechanismus separace v HILIC není zcela popsán a dosud je tato problematika diskutovaným tématem.¹²

Nejprve se separační mechanismus vysvětloval pouze pomocí separačního mechanismu v NPLC a to tak, že dochází k interakci hydroxylových skupin analytu s polárními skupinami na povrchu stacionární fáze. To znamená, že dochází k adsorpci analytu na povrch stacionární fáze. Tato teorie však byla omezená pouze na analyty obsahující hydroxylové skupiny ve své struktuře.¹³

V roce 1990 Alpert⁷ navrhl komplexní separační mechanismus v HILIC módu, který je dodnes uznávaný. Polární skupiny upevněné na různých typech stacionárních fází vážou molekuly vody, které tvoří vodnou vrstvu na povrchu

stacionární fáze. Polární analyty rozpuštěné v mobilní fázi se rozdělují mezi dvě kapalné fáze, kterými jsou vrstva vodné fáze částečně imobilizovaná na povrch stacionární fáze a mobilní fáze, která také obsahuje vodnou složku. Polární analyty mají větší afinitu a jsou lépe rozpustné ve vrstvě vodné fáze než v převážně organické mobilní fázi. To vede ke zvyšování interakce s vodnou vrstvou a také zvyšování retence analytů.¹²

Hermström a Irgum¹⁴ odvodili, že retence analytů se snižuje s rostoucím obsahem vodné složky v mobilní fázi. Jelikož se separace řídí rozdělováním mezi dvě složky, rovnováha tohoto rozdělování závisí na rozpustnosti látek a vzrůstajícím množství vodné složky v mobilní fázi. Jak obsah vodné složky v mobilní fázi vzrůstá, tím víc se podobá zadržované vodné vrstvě na povrchu stacionární fáze. To má za následek snížení retence. To znamená, že retence látek je přímo úměrná polaritě látek, polaritě stacionární fáze a nepřímo úměrná polaritě mobilní fáze, jejíž polarita stoupá s obsahem vodné fáze.¹⁵

Dále bylo navrženo a později také ověřeno, že mnoho polárních analytů interaguje se stacionární fází také prostřednictvím vodíkové vazby, interakce dipól-dipól nebo elektrostatických interakcí.¹⁶

Předpokládá se tedy, že retenční mechanismus v HILIC je pravděpodobně ovlivněn rozdělováním analytu mezi vrstvou vodné fáze částečně imobilizované na povrch stacionární fáze a mobilní fázi, a dále adsorpcí analytu na povrch stacionární fáze.¹⁷

Převládající mechanismus v HILIC se může lišit pro odlišné analyty a pro použité stacionární a mobilní fáze.¹⁸

2.1.1.3. Stacionární fáze pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii

Pro separace v HILIC módu může být použito v podstatě jakéhokoli polárního chromatografického povrchu. Typickou stacionární fází pro toto použití je silikagel, který ale může být modifikován různými polárními funkčními skupinami, popř. celými polárními molekulami. Také je možné použít stacionární fáze založené na polymerních nosičích.² Některé stacionární fáze mohou mít duální charakter, to znamená, že je lze použít pro HILIC i pro systém RPLC.¹⁹ Dnes již existuje mnoho komerčně dostupných kolon navržených speciálně pro separace v HILIC módu.¹⁴ V tabulce č. 1 jsou pro ukázkou uvedeny aplikace různých HILIC stacionárních fází pro separaci různých druhů látek.

Dále budou podrobněji popsány pouze stacionární fáze použité v experimentální části této práce (SF na bázi cyklofruktanu a čistě silikagelová SF).

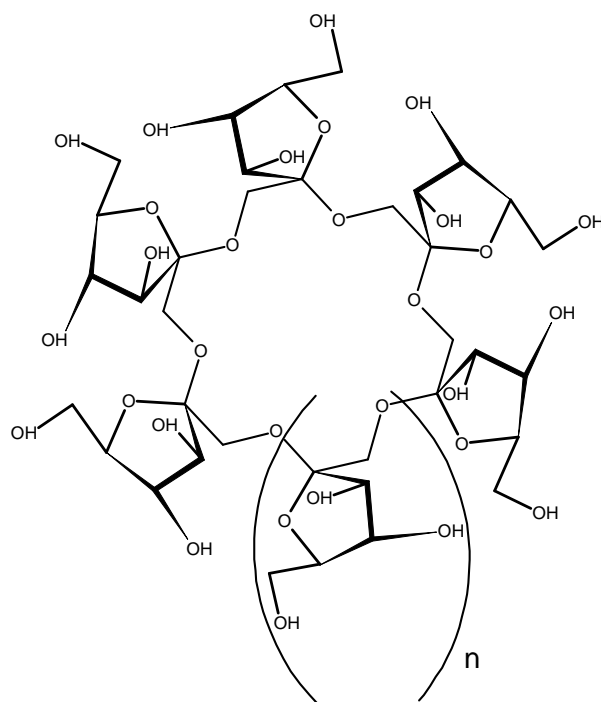
Tabulka č. 1: Příklady používaných stacionárních fází v HILIC pro různorodé analyty.

Analyty	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Ref.
Pteriny	Aminopropyl vázaný na silikagelovém nosiči	ACN/10mM octan amonný, pH=6,0 (isokratická eluce)	20
Směs cefalosporinů	β -cyklodextrin vázaný na silikagelovém nosiči	ACN/100mM mravenčan amonný, pH=6,8 (gradientová eluce)	21
Směs pesticidů	Poly(2-hydroxyethyl aspartamid) vázaný na silikagelovém nosiči	ACN/voda okyselená kyselinou octovou, pH=3,0 (gradientová eluce)	8
Aminokyseliny	Amid vázaný na silikagelovém nosiči	ACN/5mM octan amonný s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí (gradientová eluce)	9
Směs aminoglykosidů	Polymerní sulfoalkylbetaine - zwitterionická funkční skupina (ZIC-HILIC)	ACN/2mM octan amonný s přidavkem 0,2 % kyseliny mravenčí (gradientová eluce)	22
Oligosacharidy	Maltosa vázaná na silikagelovém nosiči	ACN/voda, ACN/100mM mravenčan amonný, pH=3,0 (gradientová eluce)	23
Aminokyseliny, glukóza a fruktóza z medu	Diolové skupiny vázané na silikagelovém nosiči	ACN/voda, ACN/voda s přidavkem 0,1 % triethylaminu (isokratické eluce)	24
Syntetické alifatické α -helikální peptidy	Poly(2-sulfoethyl aspartamid) vázaný na silikagelovém nosiči	ACN/triethylamin/chloristan sodný, pH=3,0 (gradientová eluce)	25

2.1.1.3.1. Cyklofruktanové stacionární fáze

Cyklofruktany (CF) jsou relativně malá skupina makrocyklických oligosacharidů. První záznam o těchto molekulách přinesl Kawamura a Uchiyama v roce 1989. ^{cit. 26} Nejprve byly tyto látky používány v průmyslu zejména jako aditiva do různých spotřebitelských produktů (např. do jídla a pití k potlačení hořkosti).²⁷

Jak je ukázáno na obrázku č. 1 ^{cit. 28}, cyklofruktan se skládá z šesti nebo více D-fruktofuranosových jednotek, které jsou k sobě vázány vazbou β -(2 \rightarrow 1).²⁹ Podle počtu fruktofuranosových jednotek v cyklu se cyklofruktany označují jako CF6, CF7, CF8 (tj. 6, 7, 8 fruktofuranosových jednotek).³⁰ Každá jednotka obsahuje jednu primární hydroxylovou skupinu a dvě sekundární, které zodpovídají za hydrofilní charakter této molekuly. Tyto hydroxylové skupiny mohou být využité k derivatizaci cyklofruktanu.³¹



Obrázek č. 1: Struktura cyklofruktanů.

V roce 2009 byly cyklofruktany poprvé použity jako chirální stacionární fáze prof. Armstrongem.²⁷ Derivatizované cyklofruktanové chirální stacionární fáze byly použity pro enantioseparace různých chirálních sloučenin.^{30, 32, 33} Cyklofruktany mohou být derivatizované řadou alifatických i aromatických

funkčních skupin, které mohou zlepšit separační vlastnosti (účinnost) chromatografického systému při chirálních separacích.³⁴

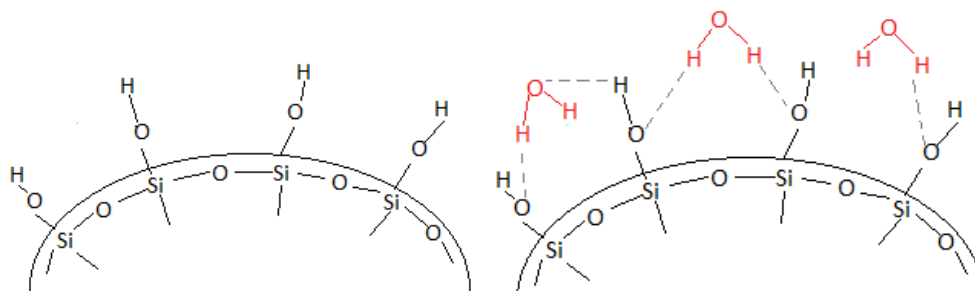
Nederivatizované cyklofruktany nemají vysoký potenciál pro chirální separace v HPLC, ale jejich unikátní struktura dává možnosti jejich využití pro achirální separace v HILIC módu.³⁵ Derivatizovaný cyklofruktan, použitý pro separaci xantinů, β -blokátorů, aminokyselin a dalších polárních látek v HILIC módu, byl CF6 derivatizovaný sulfonovými skupinami.¹⁶ V této práci je pro separaci peptidů v HILIC módu použit isopropylovaný CF, který byl dosud použit pouze k chirálním separacím v polárně organickém a normálním módu HPLC.^{30, 36}

2.1.1.3.2. Silikagelová stacionární fáze

Nejvíce používanou stacionární fází v HILIC módu byla silikagelová SF.^{37, 38, 39} Komerčně dostupné silikagelové kolony se liší v čistotě silikagelu (závisí na technologii jeho přípravy), velikosti částic, pórů apod. Proto tyto kolony od různých výrobců vykazují rozdíly v retenci, účinnosti a tvaru píků.⁴⁰

Retenční mechanismus na silikagelové SF, který závisí na typu analytu, složení mobilní fáze a vlastnostech nosiče, je přisuzován rozdělování, adsorpci a iontově výměnným interakcím.¹⁹ Ačkoliv vodná vrstva imobilizovaná na povrchu silikagelové stacionární fáze, při použití v HILIC módu, chrání její povrch, nepůsobí proti disociaci silanolových skupin a kationtově výměnným vlastnostem doprovázejícím disociaci. Naopak právě přítomnost vody může podporovat tvorbu volných silanolů a také usnadňovat disociaci. Pufr se přidává pro kontrolu smíšeného separačního módu, který zvyšují disociované silanolové skupiny.¹⁴

Na obrázku č. 2 ^{cit. 41} je znázorněn povrch silikagelové stacionární fáze bez navázané vody a s navázanou vodou.



Obrázek č. 2: Struktura nehydratovaného silikagelu a hydratovaného silikagelu.

2.2. Testování chromatografických kolon

Při současném množství dostupných chromatografických stacionárních fází je důležité věnovat pozornost správnému výběru SF pro specifické použití. Výběr mohou značně ulehčit testovací metody stacionárních fází. Tyto metody byly navrženy především pro systém RPLC⁴², ale je možné je využít pro určení základních charakteristik dalších separačních módů.

V současnosti používané testovací metody mohou být rozděleny do následujících pěti skupin:

1. Určování fyzikálně chemických vlastností stacionární fáze.
2. Spektroskopické techniky, které se staly nezbytným nástrojem při syntéze stacionárních fází a také přispívají k lepšímu pochopení retenčního mechanismu, např. infračervená spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, nukleární magnetická rezonance.
3. Vyhodnocování chromatografických dat pomocí statistických metod. Používají se chemometrické metody, např. analýza hlavních komponent, faktorová analýza.
4. Termodynamická měření, která odhalují informace o chromatografické retenci a selektivitě, např. Van't Hoffovy závislosti.
5. Chromatografické testovací metody, které, jak se ukazuje, poskytují přímé a praktické informace o vhodnosti SF pro specifické aplikace.⁴³

I přes výhody, které poskytují výše uvedené testovací metody (1. - 4.), je zřejmé, že k adekvátnímu výběru chromatografické stacionární fáze pro dané aplikace musí být použity chromatografické testovací metody. Tyto metody se dělí do několika skupin. Jsou to empirické testy, termodynamicky založené testy a testy založené na základě retenčního modelu.⁴⁴

Empirické testy jsou založené na aplikaci konkrétních testovacích analytů a eluentů. Zjišťuje se především, zda interakce mezi analytem a stacionární fází jsou ovlivňovány z větší části silanolovou aktivitou nebo hydrofobicitou. Mezi tyto testy patří např. Waltersův test, Engelhardtův test, Tanakův test.⁴⁵ Mezi testy založené na základě retenčního modelu patří např. Horváthův model, Janderův model interakčních indexů, Galushkův model, modely založené na lineárním vztahu volných energií (LFER).⁴²

2.2.1. Waltersův test

Waltersův test patří mezi chromatografické empirické testy, které se využívají k charakterizaci chromatografických stacionárních fází. Byl navržen pro RPLC, ale můžeme ho využít i pro základní charakteristiku HILIC SF. Pomocí tohoto testu se vypočítá silanolový index a index hydrofobicity při použití specifických analytů za definovaných podmínek (viz kapitoly 3.6. a 4.2.1.).^{42, 46} Tento test je vhodný zejména pro vzájemné porovnání stacionárních fází.

2.2.2. Modely lineárních vztahů volných energií

V roce 1975 Kamlet a Taft⁴⁷ uvedli metodu k hodnocení relativní polaridy rozpouštědel. Tato teorie byla adaptována na použití v chromatografických technikách Abrahamem a spol.⁴⁸ a byla nazvána jako model lineárních vztahů volných energií (LFER). Princip je založen na jednoduchém a koncepčně jasném modelu interakcí (disperzní, polarita/polarizibilita, dva typy vodíkových vazeb). Tyto interakce se uplatňují mezi analytem a mobilní fází a také mezi analytem a stacionární fází v chromatografii. Retence analytu je pak výsledek rozdílů interakcí mezi analytem a jednotlivými fázemi.⁴⁹

Modely LFER jsou založené na strukturním popisu analytů a byly používány především v RPLC k předpovídání retence analytů.⁵⁰ Mezi tyto modely patří kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí (QSRR - quantitative structure-retention relationships) a kvantitativní vztah mezi strukturou a vlastnostmi (QSPR - quantitative structure-property relationships), které patří pod model kvantitativního vztahu mezi strukturou a účinností (QSAR - quantitative structure-activity relationships). Tyto modely jsou používány především v toxikologii a farmakologii, kde dochází ke korelaci retence analytu s rozdělovacím koeficientem mezi *n*-oktanol a vodu ($\log P$).⁵¹ Také je mezi modely LFER zahrnut model lineárních vztahů solvatačních energií (LSER - linear solvation energy relationship), tzv. solvatochromní rovnice.⁵²

LSER metoda byla v poslední době použita Schusterem a Lindnerem⁵³ k charakterizaci dvaceti dvou HILIC stacionárních fází.

2.2.2.1. Metoda lineárních vztahů volných energií

Pomocí metody LFER je možné získat informace o molekulárních interakcích ovlivňujících retenci a separaci ve zvoleném chromatografickém systému a objasnit rozdíly specifických interakcí analyt - stacionární fáze a analyt - mobilní fáze, které mají významný vliv na retenci analytů v daných chromatografických systémech. Metoda LFER je založena na vztahu mezi přenosem analytu mezi fázemi (stacionární a mobilní) a změnou Gibbsovy energie (ΔG) systému. Změna Gibbsovy energie může být rozdělena do několika členů, které charakterizují jednotlivé nezávislé typy molekulárních interakcí zodpovědné za přenos mezi fázemi.⁵⁴

Rovnice LFER (1)^{31, 55} vyjadřuje vztah mezi určitou charakteristikou retence (logaritmus retenčního faktoru) pro reprezentativní sadu analytů v daném separačním systému a základními vlastnostmi těchto analytů, tzv. deskriptory.

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

k	retenční faktor (závisle proměnná)
E, S, A, B, V	deskriptory analytů (nezávisle proměnné)
e, s, a, b, v	regresní koeficienty rovnice
c	úsek rovnice LFER ⁵⁶

Deskriptory analytů nezávisí na typu použité stacionární nebo mobilní fáze, ale popisují fyzikálně chemické vlastnosti látek a kvantitativně popisují strukturní odlišnosti mezi nimi. Deskriptory jsou vztaženy ke změně Gibbsovy energie a byly publikovány Abrahamem⁴⁸ v roce 1993 pro velký počet látek. Jednotlivé deskriptory charakterizují:^{55, 57}

E - rozsah molární refrakce, schopnost interagovat pomocí n - a π - elektronů,

S - parametr dipolarity/polarizibility, popisuje elektrostatické interakce,

A - celkovou nebo efektivní aciditu vodíkové vazby, popisuje proton-donorovou schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu,

B - celkovou nebo efektivní bazicitu vodíkové vazby, popisuje proton-akceptorové schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu,

V - McGowanův charakteristický objem solutu, popisuje schopnost tvorby kavity analytu s chromatografickým systémem, popisuje kohezivní a disperzní interakce.

Regresní koeficienty LFER rovnice odrážejí rozdílnost molekulárních interakcí uplatňujících se v separačním systému mezi analyty a stacionární fází a analyty a mobilní fází. Vztahují se tedy k rozdílům mezi vlastnostmi stacionární a mobilní fáze. Pokud je regresní koeficient kladný, znamená to, že interakce, kterou popisuje, je silnější mezi analytem a stacionární fází. Naopak pokud je regresní koeficient záporný, znamená to, že interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází. Regresní koeficienty jsou získány mnohorozměrnou lineární regresí. Regresní koeficienty popisují:^{54, 57}

e - rozdíl ve schopnosti stacionární a mobilní fáze interagovat s *n*- a π - elektrony analytu,

s - rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází, schopnost účastnit se interakcí dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól,

a - rozdíl v akceptorové bazicitě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu,

b - rozdíl v donorové aciditě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu,

v - rozdíl v „hydrofobicitě“ mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na rozdílu kohezivity mezi fázemi a rozsahu disperzních interakcí mezi analytem a fázemi,

c - úsek rovnice LFER, nepopisuje žádnou konkrétní interakci, zahrnuje ostatní vlivy podílející se na retenci analytů (např. fázový poměr systému).^{54, 57}

Celková retence analytů je dána součtem jednotlivých příspěvků interakcí, které se podílejí na retenci. Vlastnosti separačního systému se testují pomocí sady analytů, která obsahuje strukturně odlišné látky, jejichž deskriptory široce pokrývají možné interakce uplatňující se v separačním systému.

2.3. Statistické zpracování dat

Pomocí statistických programů (např. NCSS, Minitab 16, Statistica, Design-Expert) se mnohorozměrnou lineární regresí získávají regresní koeficienty rovnice LFER. Určují se jejich bodové odhady a střední chyby. Dále se provádí test o významnosti proměnných včetně dosažených hladin pravděpodobnosti (tzv. p -hodnoty).⁵⁸

2.3.1. Mnohorozměrná lineární regrese

Mnohorozměrná lineární regresní analýza udává závislost střední hodnoty závisle proměnné na několika nezávisle proměnných. Používá se také jako predikční model k předpovídání retence v případě modelu LFER. K tomu je zavedená následující rovnice:⁵⁹

$$\log k = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n \quad (2)$$

k	retenční faktor
a_0	úsek rovnice
a_1, a_n	neznámé regresní koeficienty
x_1, x_n	známé vlastnosti
n	počet vlastností

Regresní koeficienty se odhadují metodou nejmenších čtverců, tak aby reziduální součet čtverců byl minimální.⁵⁸

Tento model obecně testuje nulovou hypotézu (H_0) oproti alternativní hypotéze (H_1). V případě LFER modelu nulová hypotéza udává, že regresní koeficient do regrese nepřispívá, zatímco alternativní hypotéza říká, že regresní koeficient do regrese významně přispívá. Při testování hypotéz je důležité mít k dispozici tabulky kritických hodnot normálního rozdělení. Při použití statistického softwaru jsou na výstupu testu uvedené tzv. p -hodnoty (probability level) místo kritických hodnot.

p -hodnota udává nejmenší hladinu, na které se nulová hypotéza už zamítá. Běžně se volí na hladině významnosti 5 %, to znamená, že porovnáváme p -hodnotu s číslem 0,05. Pokud je $p \leq 0,05$ nulová hypotéza se zamítne, pokud je $p > 0,05$ nulová hypotéza se nezamítá.⁶⁰

2.4. Peptidy

2.4.1. Pentapeptidy

Mezi pentapeptidy se řadí skupina enkefalinů. Jedná se o peptidy, které jsou složené z pěti aminokyselin spojených peptidovou vazbou, produkované neuroendokrinním systémem. Enkefaliny jsou známé jako opioidní neuropeptidy, které mají významnou biologickou funkci.⁶¹ Endogenní opiátový peptidový systém tvoří tři řady: enkefaliny, endorfiny a dynorfiny. Skupina enkefalinů zahrnuje především leucin enkefalin a metionin enkefalin.⁶²

Leucin enkefalin a metionin enkefalin byly také první endogenní opioidní peptidy objevené u různých zvířecích druhů v centrálním nervovém systému.⁶³ Enkefaliny se vyskytují kromě centrálního nervového systému také v gastrointestinálním traktu, kde se váží preferenčně k δ -opiátovým receptorům. Kromě toho, že snižují citlivost k bolesti, mají také významné účinky při kontrole dýchání, kardiovaskulárního systému, gastrointestinálních funkcí a neuroendokrinních regulací.⁶⁴

Narušení jejich syntézy může vést k vážným mentálním onemocněním. Enkefaliny jsou v současné době intenzivně studované ve spojitosti s autismem, Alzheimerovou nemocí a Parkinsonovou nemocí.⁶⁵

Enkefaliny byly separovány např. kapalinovou chromatografií^{66, 67} nebo kapilární elektroforézou.⁶⁸

2.4.2. Nonapeptidy

Nonapeptidy jsou látky strukturně i funkčně si podobné a jsou složeny z devíti aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Tyto nonapeptidy mají významnou biologickou aktivitu nejen v lidském organismu.⁶⁹

Vasopresin, známý jako antidiuretický hormon, má fyziologickou úlohu v ledvinách, kde reguluje zadržování vody a zvyšuje její zpětné vstřebávání. Působí také vasokonstrikčně, tudíž zvyšuje krevní tlak. Používá se také k léčbě diabetes insipidus, což je onemocnění způsobující narušení hospodaření těla s vodou.⁷⁰

Oxytocin je hormon využívaný především v porodnictví, protože jeho hlavním účinkem je vliv na frekvenci a sílu kontrakce hladké svaloviny dělohy. Toho se využívá zejména k indukci porodu. Také podporuje ejekci mléka v mléčné žláze.^{70, 71}

Oxytocin a vasopresin pocházejí ze dvou vývojových linií ovlivňujících sociální a reprodukční chování. Linie oxytocinu je zodpovědná za sociálně-reprodukční chování samic ryb, ptáků, obojživelníků a savců.⁷² Linie vasopresinu za toto chování zodpovídá u samců savců. Tyto linie jsou si strukturně velice podobné. Jiné studie ukazují, že další fyziologické funkce těchto hormonů se týkají procesů učení, paměti, agresivity nebo hrají významnou roli při depresivních a úzkostných stavech.^{73, 74}

Vasotocin je vývojově starší hormon, vyskytující se u samců ryb a obojživelníků. Tento hormon je zodpovědný za jejich chování podobně jako vasopresin u savců.⁷⁵

Nonapeptidy mohou být separovány např. pomocí kapilární elektroforézy⁷⁶ nebo kapalinové chromatografie.^{69, 77, 78}

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a pomůcky

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Pro separace byl použit systém HPLC od firmy Agilent Technologies, Waldbroon, Německo. Systém byl složen z pumpy Agilent Technologies 1200 series, odplyňovače mobilní fáze, automatického dávkovače Agilent Technologies 1260 infinity, termostatu na vzorky a termostatu kolony Agilent Technologies 1290 infinity, detektoru diodového pole Agilent Technologies 1260 infinity.

Pro zpracování dat byl použit software Chemstation, Agilent Technologies, Waldbroon, Německo, a následně program Origin, verze 6.1.

Pro zpracování statistických údajů byl použit program NCSS, Kaysville, USA.

Chromatografické kolony

Kolona Larihc CF6-P (stacionární fáze - isopropylovaný cyklofruktan 6 vázaný na silikagelovém nosiči) o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 5 μm. Kolona byla dodána firmou AZYP, Arlington, USA.

Kolona 2 (silikagelová stacionární fáze - obsahující stejný silikagel, který byl použit při přípravě kolony Larihc CF6-P), o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 5 μm. Kolona byla připravená v oddělení chemie a biochemie, Texaské univerzity v Arlingtonu, Arlington, USA.

Ultrazvuková lázeň

Pro odvzdušnění mobilních fází byla použita ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo.

Váhy

K navážení chemikálií byly použity analytické váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko.

pH metr

Hodnoty pH pufrů byly zjištěny pomocí pH metru PHM 240, Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie. Od stejné firmy byly dodány i kalibrační pufrů.

3.2. Použité chemikálie

Standardy pentapeptidů a nonapeptidů byly získány od firmy Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA.

Pentapeptidy:

Leucin enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, čistota > 95 %),

Leucin enkefalin amid (Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH₂, čistota > 98 %),

[Met⁵]enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, čistota > 95 %),

[D-Ala²]-Leucin enkefalin (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu, čistota > 97 %).

Nonapeptidy:

[Lys⁸]vasopresin (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly, čistota > 98 %),

[Arg⁸]vasopresin (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly, čistota > 95 %),

[deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin (Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly, čistota > 98 %),

[Arg⁸]vasotocin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly, čistota > 97 %),

Oxytocin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly, čistota > 97 %).

Analyty pro LFER byly získány od firmy Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Analyty pro Waltersův test: benzen, anthracen a *N,N*-diethyl-*m*-toluamid byly získány od firmy Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA.

Acetonitril (ACN) R Chromasolv® pro HPLC, octan amonný (čistota > 98 %) a kyselina octová (čistota > 99,8 %) byly dodány od výrobce Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA.

Deionizovaná voda byla upravená zařízením pro přípravu ultra čisté vody deionizací Ultrapur od výrobce Watrex®, Praha, Česká republika.

Tabulka č. 2: Sada analytů pro LFER a jejich deskriptory.⁸⁰

Analyt	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>
Fenol	0,810	0,890	0,600	0,300	0,775
Benzamid	0,990	1,500	0,490	0,670	0,973
2-Naftol	1,520	1,080	0,610	0,400	1,144
Resorcinol	0,980	1,000	1,100	0,580	0,834
Benzofenon	1,447	1,500	0,000	0,500	1,481
Hydrochinon	1,000	1,000	1,160	0,600	0,834
1,2-Kresol	0,840	0,860	0,520	0,310	0,916
Benzonitril	0,742	1,110	0,000	0,330	0,871
1,3-Kresol	0,822	0,880	0,570	0,340	0,916
Benzylalkohol	0,803	0,870	0,330	0,560	0,916
Benzene	0,610	0,520	0,000	0,140	0,716
Naftalen	1,340	0,920	0,000	0,200	1,085
Pyrokatechol	0,970	1,070	0,850	0,520	0,834
Dibenzothiofen	1,959	1,310	0,000	0,180	1,379
Toluen	0,600	0,520	0,000	0,140	0,857
1,2-Toluidin	0,966	0,920	0,230	0,450	0,957
Fenantren	2,055	1,290	0,000	0,260	1,454
1,2,3-Trichlorobenzen	1,030	0,860	0,000	0,000	1,084
1,2-Dichlorobenzen	0,872	0,780	0,000	0,040	0,961
3-Nitrotoluen	0,874	1,100	0,000	0,250	1,032
1,2-Xylen	0,663	0,560	0,000	0,160	0,998
Bromobenzen	0,882	0,730	0,000	0,090	0,891
2-Nitrotoluen	0,866	1,110	0,000	0,270	1,032
1,3-Xylen	0,623	0,520	0,000	0,160	0,998
Chlorobenzen	0,718	0,650	0,000	0,070	0,839
1,4-Xylen	0,613	0,520	0,000	0,160	0,998
2-Chlorofenol	0,853	0,880	0,320	0,310	0,898
3-Chlorofenol	0,909	1,060	0,690	0,150	0,898
4-Chlorofenol	0,915	1,080	0,670	0,210	0,898
2-Nitrofenol	1,015	1,050	0,050	0,370	0,949
3-Hydroxybenzaldehyd	0,990	1,380	0,740	0,400	0,932
Aceton	0,179	0,700	0,040	0,490	0,547
Anilin	0,955	0,960	0,260	0,410	0,816
Tetrachlorbenzen	1,180	0,920	0,000	0,000	1,206
Pyren	2,810	1,710	0,000	0,290	1,585
1,4-toluidin	0,923	0,950	0,230	0,450	0,957
Etylacetát	0,106	0,620	0,000	0,450	0,747
Kofein	1,500	1,600	0,000	1,330	1,364
Teofylin	1,500	1,600	0,540	1,340	1,222
4-Nitrofenol	1,070	1,720	0,820	0,260	0,949

3.3. Příprava vzorků

Každý roztok vzorku peptidu byl připraven navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml mobilní fáze. Dále byl každý roztok filtrován 0,45 μ m filtrem.

Směs pentapeptidů pro následné analýzy obsahovala 100 μ l leucin enkefalinu ($c = 1$ mg/ml), 100 μ l leucin enkefalin amidu ($c = 1$ mg/ml), 100 μ l [Met⁵]enkefalinu ($c = 1$ mg/ml) a 50 μ l [D-Ala²]-Leucin enkefalinu ($c = 1$ mg/ml) a 500 μ l mobilní fáze.

Směs nonapeptidů pro následné analýzy obsahovala 200 μ l [Arg⁸] vasotocinu ($c = 1$ mg/ml), 200 μ l [Arg⁸]vasopresinu ($c = 1$ mg/ml), 200 μ l [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresinu ($c = 1$ mg/ml), 200 μ l [Lys⁸]vasopresinu ($c = 1$ mg/ml) a 200 μ l oxytocinu ($c = 1$ mg/ml).

Pevné vzorky pro LFER a Waltersův test byly připraveny navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml acetonitrilu. Kapalné vzorky byly připraveny rozpuštěním 10 μ l standardu v 990 μ l ACN. Následně byly vzorky naředěny acetonitrem tak, aby vykazovaly přibližně stejné odezvy detektoru.

3.4. Příprava pufru

Octanový pufr byl připraven navážením příslušného množství octanu amonného, jeho rozpuštěním ve vodě a následnou úpravou kyselinou octovou na příslušnou hodnotu pH a doplněním vodou na objem 1 l.

3.5. Použité mobilní fáze

V tabulce č. 3 jsou uvedeny použité mobilní fáze pro optimalizaci separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů.

Pro LFER byly použity mobilní fáze: ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v) a ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v).

Pro Waltersův test byly použity mobilní fáze: 100% ACN a ACN/H₂O 65/35 (v/v).

Tabulka č. 3: Přehled použitých mobilních fází pro optimalizaci separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů.

Pentapeptidy	Nonapeptidy
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 70/30 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 75/25 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 70/30 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 75/25 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 90/10 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 83/17 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 83/17 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 65/35 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 85/15 (v/v)	ACN/25mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 86/14 (v/v)	ACN/15mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 87/13 (v/v)	ACN/10mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)
ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 80/20 (v/v)
ACN/25mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 80/20 (v/v)
ACN/15mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	
ACN/10mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	
ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 88/12 (v/v)	
ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 88/12 (v/v)	

3.6. Separační podmínky

Separace směsí peptidů probíhala při teplotě kolony 25 °C, teplotě vzorků 20 °C a rychlosti průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Dávkovaný objem byl 10 µl. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 220 nm, 230 nm a 210 nm. Tlak mobilní fáze na kolonu se měnil v závislosti na použité mobilní fázi.

Pro LFER metodu probíhalo měření při teplotě kolony 25 °C, teplotě vzorků 10 °C (nižší teplota byla zvolena kvůli těkavosti některých vzorků, separace probíhaly v nastavených sekvencích přes noc) a rychlosti průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Dávkovaný objem byl 10 µl. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 254 nm.

Pro Waltersův test probíhalo měření při teplotě kolony 40 °C, teplotě vzorků 20 °C a rychlosti průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Dávkovaný objem byl 10 µl. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 254 nm.

3.7. Výpočty chromatografických parametrů

Chromatografické parametry, popisující separaci, použité v kapitole Výsledky a diskuze jsou: retenční faktor (k), faktor asymetrie (A_S) a rozlišení (R_S). Pro výpočet těchto parametrů byl použit software Chemstation, (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Výpočty jsou popsány následujícími rovnicemi.

Retenční faktor:

$$k = \frac{t - t_M}{t_M} \quad (3)$$

t retenční čas analytu

t_M mrtvý čas kolony

Faktor asymetrie:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (4)$$

$w_{0,05}$ šířka píku v 5 % výšky

f poměr šířky píku vzestupné k sestupné části píku v 5 % výšky píku

Rozlišení:

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (5)$$

t_{R1}, t_{R2} retenční čas

w_1, w_2 šířka píku v polovině výšky

4. Výsledky a diskuze

4.1. Optimalizace separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů

Pro optimalizaci separace směsi čtyř pentapeptidů a pěti nonapeptidů byla použita kolona Larihc CF6-P a následně pro srovnání separační účinnosti byla použita kolona 2.

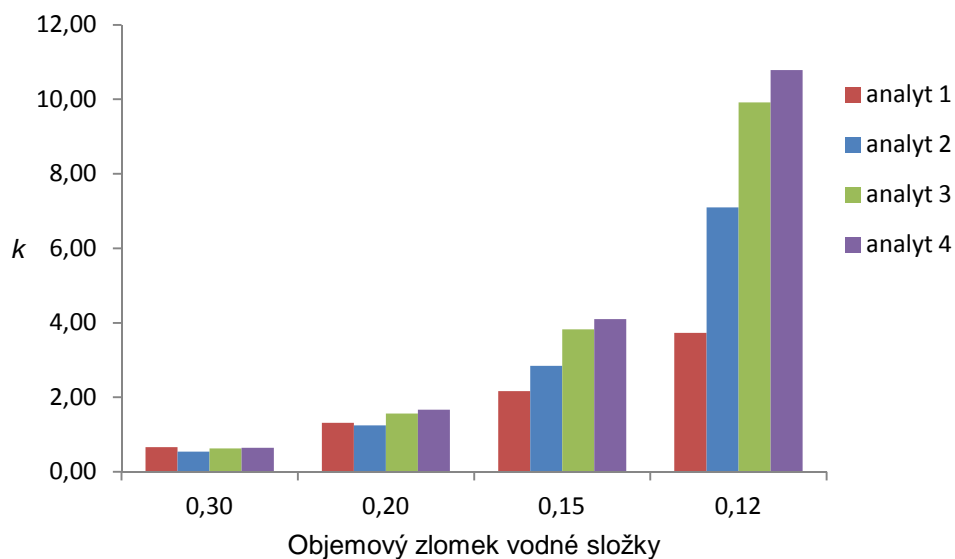
Mrtvý čas kolon byl zjištěn z prvního systémového píku. Často se k zjištění mrtvého času v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii používá toluen, který ale v tomto případě interaguje se stacionárními fázemi.

4.1.1. Separace směsi pentapeptidů

Při optimalizaci separace směsi pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P bylo nejdříve zjištěno eluční pořadí jednotlivých pentapeptidů, které bylo zjištěno při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 85/15 (v/v). Každý vzorek pentapeptidu byl dávkován zvlášť.

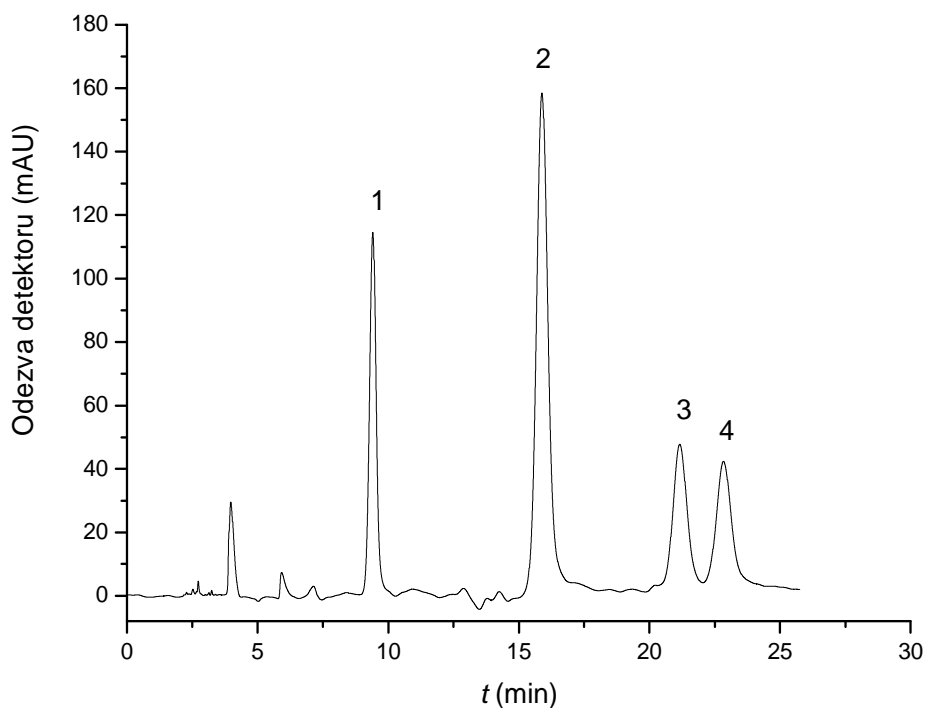
Na obrázku č. 3 je ukázána závislost retence jednotlivých pentapeptidů na složení mobilní fáze při použití 20mM octanového pufru, pH=4,00. Z obrázku je zřejmé, že při použití mobilní fáze s větším obsahem vodné složky (pufru), jako první eluoval [D-Ala²]-leucin enkefalin a jako druhý eluoval leucin enkefalin. S klesajícím obsahem vodné složky se jejich pořadí vyměnilo a dále se neměnilo.

Eluční pořadí pentapeptidů je následující: leucin enkefalin, [D-Ala²]-leucin enkefalin, leucin enkefalin amid, [Met⁵]enkefalin při použití mobilní fáze s obsahem vodné složky ≤ 15 objemových procent.



Obr. č. 3: Závislost retenčních faktorů pentapeptidů na množství vodné složky (pufr) při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 (v/v), kolona Larihc CF6-P, analyt 1 - leucin enkefalin, analyt 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, analyt 3 - leucin enkefalin amid, analyt 4 - [Met⁵]enkefalin.

Jako nejvhodnější mobilní fáze pro separaci směsi pentapeptidů byla vyhodnocena mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v). Na koloně Larihc CF6-P došlo k úplnému rozdělení směsi pentapeptidů na základní linii do 25 minut, jak je ukázáno na obrázku č. 4. Píky vykazují velmi dobrou symetrii a rozlišení. Retenční faktory, rozlišení a faktory asymetrie píků při separaci na koloně Larihc CF6-P s výše uvedenou mobilní fází jsou uvedeny v tabulce č. 4.



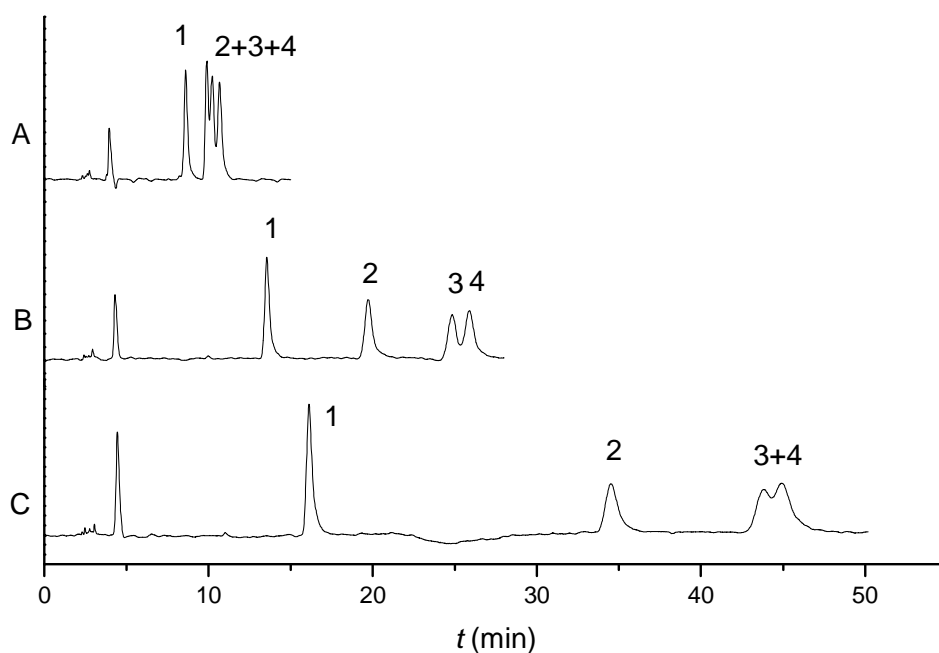
Obrázek č. 4: Separace směsi pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v), detekce při vlnové délce 220 nm, separační pořadí: 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Tabulka č. 4: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při separaci v mobilní fázi ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v) na koloně Larihc CF6-P, 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Pentapeptid	k	R_S	A_S
1	3,18		0,99
2	6,06	10,21	0,90
3	8,41	5,93	0,92
4	9,15	1,68	0,94

Silikagelová stacionární fáze, v porovnání se stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu, nebyla příliš vhodná k rozdělení směsi pentapeptidů při použití stejné mobilní fáze, kde došlo ke koeluci leucin enkefalin amidu a [Met⁵]enkefalinu, jak ukazuje obrázek č. 5. Eluční pořadí jednotlivých pentapeptidů bylo za těchto podmínek stejné jako na koloně Larihc CF6-P.

Při změně poměru organické a vodné složky mobilní fáze na poměr ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 90/10 (v/v) při separaci na silikagelové stacionární fázi došlo k prodloužení retenčních časů všech pentapeptidů, ale vliv na separaci leucin enkefalin amidu a [Met⁵]enkefalinu se neprojevil, jak ukazuje obrázek č. 5. Z tohoto obrázku je tudíž patrná prodlužující se retence s rostoucím obsahem organické složky mobilní fáze. V tabulce č. 5 jsou shrnuty chromatografické parametry separace na této stacionární fázi.



Obrázek č. 5: Porovnání separace na koloně 2 při použití různých poměrů organické a vodné složky mobilní fáze, složení mobilních fází: A - ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 83/17 (v/v), B - ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v), C - ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 90/10 (v/v), detekce při vlnové délce 220 nm, separační pořadí: 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Tabulka č. 5: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při separaci na koloně 2 za použití různých mobilních fází, 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 83/17 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 90/10 (v/v)		
	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
Pentapeptid									
1	2,88		1,52	5,10		1,53	6,26		1,61
2	3,46	3,26	-	7,88	8,89	1,40	14,55	18,02	1,55
3	3,60	0,70	-	10,19	5,35	-	18,74	5,08	-
4	3,81	0,88	-	10,66	0,95	-	19,24	0,47	-

- nelze spočítat z důvodu koeluce píků

Z tabulek č. 4 a č. 5 je zřejmé, že při separaci na koloně Larihc CF6-P mají píky mnohem lepší symetrii, která se blíží jedné, než při separaci na koloně 2. Při separaci na koloně 2 jsou z chromatogramu zřejmé píky s chvostem, jejichž faktor asymetrie je větší než jedna.

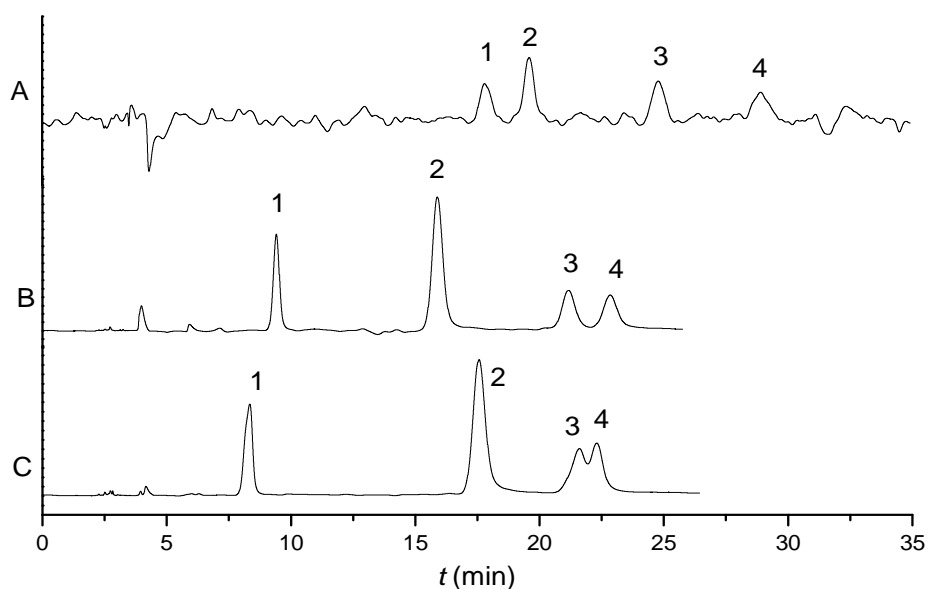
Dále byl studován vliv koncentrace octanového pufru o stejném pH (pH=4,00) na retenci pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P při použití mobilní fáze ACN/octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v). Faktory asymetrie píků mají lepší hodnoty při použití 20mM octanového pufru než při použití 10mM, 15mM a 25mM octanového pufru. Hodnoty retenčních faktorů, rozlišení a faktory asymetrie jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při použití různě koncentrovaného octanového pufru k separaci na koloně Larihc CF6-P, 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Mobilní fáze	ACN/10mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)			ACN/15mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)		
Pentapeptid	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
1	3,76		0,93	3,57		0,97
2	6,71	10,31	0,90	6,78	11,28	0,87
3	9,03	5,76	0,94	9,28	6,06	0,87
4	9,80	1,73	0,95	10,06	1,70	0,83
Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)			ACN/25mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)		
Pentapeptid	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
1	3,18		0,99	4,31		1,18
2	6,06	10,21	0,90	6,72	4,94	1,25
3	8,40	5,93	0,92	9,40	4,72	1,08
4	9,15	1,68	0,94	10,31	1,53	1,07

Z tabulky č. 6 je zřejmé, že při použití octanového pufru o koncentraci 10 mM, 15 mM a 20 mM jsou hodnoty faktoru asymetrie píků menší než jedna (tzv. frontující píky). Naopak při separaci octanovým pufrem o koncentraci 25 mM jsou hodnoty faktoru asymetrie píků větší než jedna (tzv. píky s chvostem).

Vliv hodnoty pH pufru na separaci směsi pentapeptidů byl studován na koloně Larihc CF6-P při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr 88/12 (v/v). Z obrázku č. 6 je patrné, že při použití 20mM octanového pufru o pH=3,00 se výrazně zvýší šum základní linie, zhorší se poměr signálu k šumu a dojde k zvýšení retence. Při použití 20mM octanového pufru o pH=5,00 dochází ke koeluci leucin enkefalin amidu a [Met⁵]enkefalinu. Z výše uvedených důvodů byl vybrán 20mM octanový pufr o pH=4,00 jako nejvhodnější vodná složka mobilní fáze. Chromatografické parametry separace jsou uvedeny v tabulce č. 7, z které je zřejmé, že i hodnoty rozlišení a symetrie jsou nejpříznivější pro separaci směsi pentapeptidů mobilní fází ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v).



Obrázek č. 6: Vliv pH pufru na separaci směsi pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P, složení mobilních fází: A - ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 88/12 (v/v), B - ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v), C - ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 88/12 (v/v), detekce při vlnové délce 220 nm, separační pořadí: 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

Tabulka č. 7: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při použití 20mM octanového pufru o různých hodnotách pH k separaci na koloně Larihc CF6-P, 1 - leucin enkefalin, 2 - [D-Ala²]-leucin enkefalin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - [Met⁵]enkefalin.

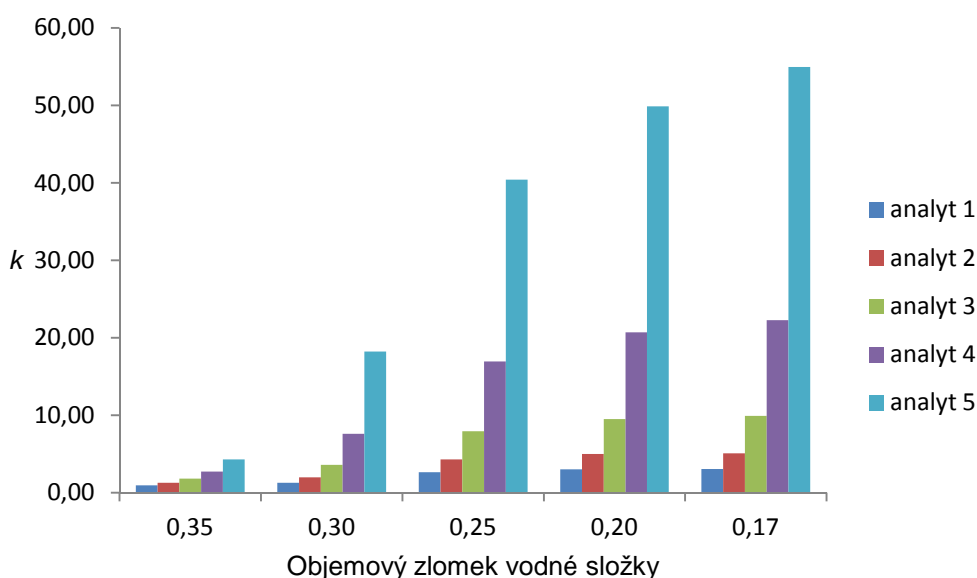
Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 88/12 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 88/12 (v/v)		
	k	R	A_S	k	R	A_S	k	R	A_S
Pentapeptid									
1	6,89		0,71	3,18		0,99	2,71		0,93
2	7,69	2,10	0,89	6,06	10,21	0,90	6,81	11,77	0,80
3	9,99	5,73	0,88	8,40	5,93	0,92	8,60	3,77	-
4	11,82	3,59	0,77	9,15	1,68	0,94	8,91	0,62	-

- nelze spočítat z důvodu koeluce píků

4.1.2. Separace směsi nonapeptidů

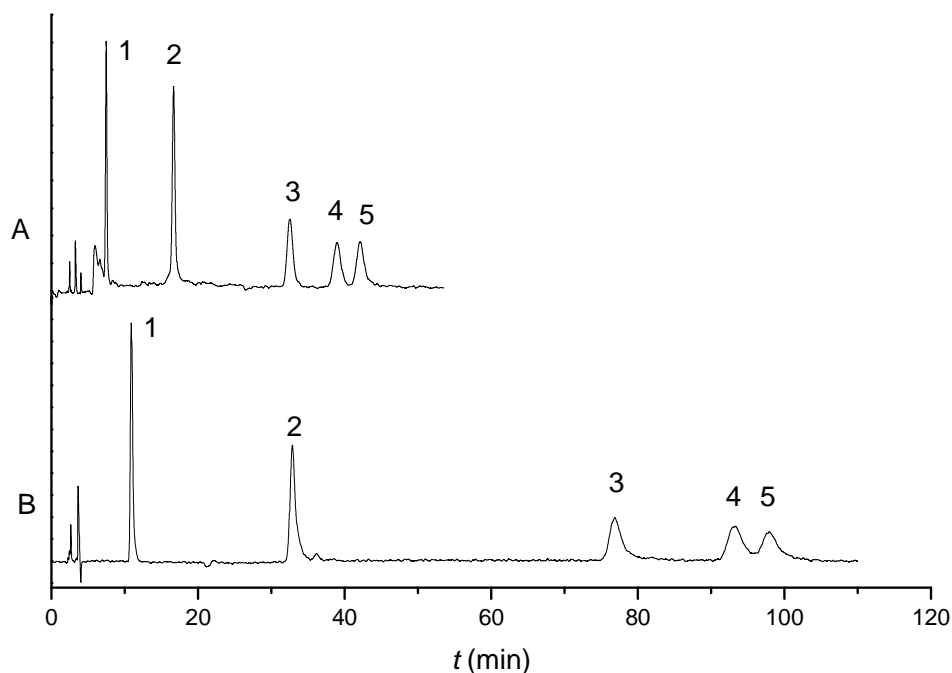
Eluční pořadí jednotlivých nonapeptidů na obou stacionárních fázích bylo zjištěno při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v), kdy byl každý nonapeptid dávkován zvlášť. Na obrázku č. 7 je ukázána závislost retence na složení mobilní fáze při použití 20mM octanového pufru, pH=4,00. Eluční pořadí se na obou kolonách při používání různých mobilních fází neměnilo.

Eluční pořadí nonapeptidů je následující: oxytocin, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, [Arg⁸]vasopresin, [Arg⁸]vasotocin, [Lys⁸]vasopresin.



Obrázek č. 7: Závislost retenčních faktorů nonapeptidů na množství vodné složky (pufr) při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 (v/v), kolona Larihc CF6-P, analyt 1 - oxytocin, analyt 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, analyt 3 - [Arg⁸]vasopresin, analyt 4 - [Arg⁸]vasotocin, analyt 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Jako vhodnější pro separaci směsi nonapeptidů se ukázala kolona Larihc CF6-P, než kolona 2. Optimalizované složení mobilní fáze je následující: ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v). Na obrázku č. 8 je ukázána separace směsi nonapeptidů na koloně Larihc CF6-P a na koloně 2 za stejných chromatografických podmínek.



Obrázek č. 8: Separace směsi nonapeptidů A - kolona Larihc CF6-P, B - kolona 2, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v), detekce při vlnové délce 220 nm, separační pořadí: 1 - oxytocin, 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, 3 - [Arg⁸]vasopresin, 4 - [Arg⁸]vasotocin, 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Kolona 2 je pro separaci směsi nonapeptidů méně vhodná než kolona Larihc CF6-P za výše uvedených podmínek. Doba analýzy je přes 100 minut a analyty [Arg⁸]vasotocin a [Lys⁸]vasopresin nejsou rozlišeny až na základní linii. Při použití mobilní fáze s vyšším obsahem acetonitrilu (85%) analyty [Arg⁸]vasotocin a [Lys⁸]vasopresin neeluovaly do 180 minut. Retenční faktory, rozlišení a faktory asymetrie píků obou separací jsou uvedené v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Porovnání retenčních faktorů (k), rozlišení (R_S) a faktorů asymetrie (A_S) při separaci na koloně 2 a koloně Larihc CF6-P, 1 - oxytocin, 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, 3 - [Arg⁸]vasopresin, 4 - [Arg⁸]vasotocin, 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)					
Kolona	Larihc CF6-P			Kolona 2		
Nonapeptid	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
1	2,32		0,91	3,83		1,55
2	6,41	16,79	0,97	13,55	22,17	1,58
3	13,46	14,41	0,84	33,03	19,00	1,38
4	16,32	3,85	0,87	40,29	4,31	-
5	17,72	1,70	0,80	42,35	1,16	-

- nelze spočítat z důvodu koeluce píků

Z tabulky č. 8 je patrné, že při separaci směsi nonapeptidů na koloně Larihc CF6-P jeví píky lepší symetrii, která se blíží jedné pro dříve eluující analyty. Při použití kolony 2 mají píky faktor asymetrie větší než jedna, tzv. píky s chvostem, a poslední dva analyty nebyly rozlišeny až na základní linii.

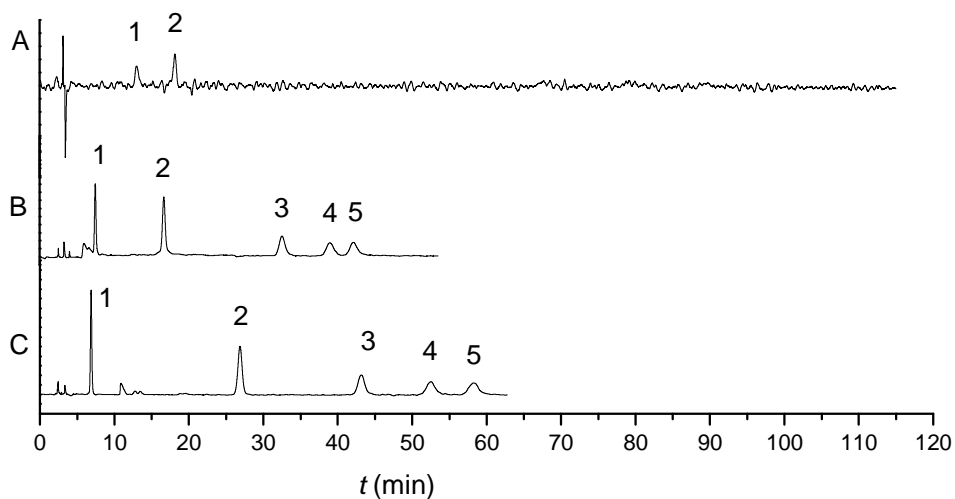
Jedním ze zkoumaných vlivů na separaci směsi nonapeptidů na koloně Larihc CF6-P byly různé hodnoty koncentrací octanového pufru o stejné hodnotě pH=4,00 při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr 80/20 (v/v). Nejkratší doba separace probíhala při použití 20mM octanového pufru a došlo k rozdělení směsi na základní linii. I při použití pufru o koncentracích 10 mM, 15 mM a 25 mM se podařilo směs rozseparovat na základní linii, ale analyty mají delší retenci a některé píky jeví horší symetrii než při použití 20mM octanového pufru. Tabulka č. 9 uvádí získané chromatografické parametry separací směsi nonapeptidů.

Tabulka č. 9: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při použití různě koncentrovaného octanového pufru při separaci na koloně Larihc CF6-P, 1 - oxytocin, 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, 3 - [Arg⁸]vasopresin, 4 - [Arg⁸]vasotocin, 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Mobilní fáze	ACN/10mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)			ACN/15mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)		
Pík	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
1	2,77		0,89	2,68		0,94
2	8,42	20,12	0,86	7,84	19,05	1,05
3	18,47	16,67	0,80	16,96	15,73	0,76
4	22,64	4,43	0,94	20,69	4,05	0,73
5	24,49	1,86	0,84	22,47	1,99	0,75
Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)			ACN/25mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)		
Pík	k	R_S	A_S	k	R_S	A_S
1	2,33		0,91	2,60		0,96
2	6,41	16,79	0,97	7,21	17,66	1,02
3	13,46	14,41	0,84	15,70	15,86	0,87
4	16,32	3,85	0,87	19,27	4,27	0,63
5	17,72	1,70	0,80	20,79	1,89	0,57

Dále byl zkoumán vliv pH octanového pufru na separaci směsi nonapeptidů na koloně Larihc CF6-P při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr 80/20 (v/v). Z obrázku č. 9 je vidět, že nekratší doba separace probíhala při použití 20mM octanového pufru o pH=4,00. Při použití 20mM octanového pufru o pH=3,00 neeluovaly poslední tři analyty ([Arg⁸]vasopresin, [Arg⁸]vasotocin, [Lys⁸]vasopresin) do 120 min (ověřeno dávkováním jednotlivých standardů nonapeptidů o koncentraci 1 mg/ml). Při separaci pufrům o pH=5,00 mají analyty

delší retenci než při separaci pufrům o pH=4,00. Tabulka č. 10 porovnává retenční faktory, rozlišení a symetrii píků při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr 80/20 (v/v) o různé hodnotě pH pufru.



Obrázek č. 9: Porovnání separace směsi nonapeptidů při použití různých hodnot pH octanového pufru na koloně Larihc CF6-P, složení mobilních fází: A - ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 80/20 (v/v), B - ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v), C - ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 80/20 (v/v), detekce při vlnové délce 220 nm, separační pořadí: 1 - oxytocin, 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, 3 - [Arg⁸]vasopresin, 4 - [Arg⁸]vasotocin, 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Tabulka č. 10: Retenční faktory (k), rozlišení (R_S) a faktory asymetrie (A_S) při použití různých hodnot pH octanového pufru na koloně Larihc CF6-P, 1 - oxytocin, 2 - [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, 3 - [Arg⁸]vasopresin, 4 - [Arg⁸]vasotocin, 5 - [Lys⁸]vasopresin.

Mobilní fáze	ACN/20mM octanový pufr, pH=3,00 80/20 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)			ACN/20mM octanový pufr, pH=5,00 80/20 (v/v)		
	k	R	A_S	k	R	A_S	k	R	A_S
1	4,78		0,68	2,33		0,91	2,06		0,95
2	7,07	6,18	0,94	6,41	16,79	0,97	10,95	28,13	0,99
3	*			13,46	14,41	0,84	18,19	11,45	1,03
4	*			16,32	3,85	0,87	22,35	4,78	1,22
5	*			17,72	1,70	0,80	24,90	2,50	1,06

* analyty neeluovaly do 120 min

4.2. Charakterizace separačních systémů

4.2.1. Waltersův test

Waltersův test byl navržen pro charakterizaci stacionárních fází pro reverzní mód HPLC.⁴⁶ Nicméně tento test může pomoci při charakterizaci a porovnání základních vlastností HILIC stacionárních fází. Waltersův test udává index hydrofobicity (HI) a index silanolový (SI).

Index hydrofobicity se vypočítá jako poměr retenčních faktorů anthracenu a benzenu v mobilní fázi: ACN/H₂O 65/35 (v/v) při teplotě kolony 40 °C.

Silanolový index se vypočítá jako poměr retenčních faktorů *N*, *N*-diethyl-*m*-toluamidu a anthracenu v mobilní fázi tvořené 100 % ACN při teplotě kolony 40 °C.^{46, 42}

Získané hodnoty obou indexů pro testované stacionární fáze jsou uvedeny v tabulce č 11.

Tabulka č. 11: Hodnoty indexu hydrofobicity a silanolového indexu pro SF na bázi isopropylovaného cyklofruktanu a silikagelovo SF.

Stacionární fáze	Na bázi isopropylovaného cyklofruktanu	Silikagelová
Index hydrofobicity	0,69	0,73
Silanolový index	2,37	2,46

Oba indexy vyšly téměř shodně u obou stacionárních fází. Nízký index hydrofobicity znamená, že kolony jsou hydrofilního charakteru a tato hodnota ukazuje významnost použití v HILIC módu. Vyšší hydrofilní charakter má kolona Larihc CF6-P, což je pravděpodobně způsobeno derivatizací polárním isopropylovaným cyklofruktanem (pro porovnání - hodnoty HI indexu pro stacionární fáze používané v reverzním módu se pohybují v rozmezí 2-4^{cit. 79}). Vyšší hodnotu HI indexu vykazuje silikagelová stacionární fáze, což se shoduje s výsledky LFER (bude diskutováno v následující kapitole).

SI index obecně poskytuje informace o interakcích analytů s nosičem, resp. s volnými silanolovými skupinami silikagelového nosiče. Vysoký SI je ve shodě se strukturou stacionární fáze a je zřejmé, že modifikace silikagelu má jen nepatrný vliv na výsledek SI indexu. Nicméně modifikace silikagelu isopropylovaným cyklofruktanem významně ovlivňuje vlastnosti stacionární fáze (viz separace peptidů).

4.2.2. Model lineárních vztahů volných energií

K popisu interakcí, které se uplatňují v testovaných separačních systémech, byl použit model lineárních vztahů volných energií (LFER).

Sada čtyřiceti testovacích analytů (viz tabulka č. 2, kapitola 3.2.) byla vybrána na základě hodnot jejich deskriptorů, které široce pokrývají interakce, které se mohou uplatňovat v chromatografických separačních systémech.⁸⁰

Měření retencí testovacích analytů probíhalo za stejných podmínek na obou stacionárních fázích. Při použití fixní mobilní fáze lze porovnávat přímo interakce na jednotlivých stacionárních fázích.

Složení mobilních fází pro metodu LFER bylo vybráno na základě optimalizovaných systémů pro separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů na koloně Larihc CF6-P, tj. ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v) a ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v).

4.2.2.1. Porovnání regresních koeficientů

Rozložení hodnot statisticky významných regresních koeficientů je velice podobné jako jejich zastoupení v NP módu HPLC, protože stacionární fáze v HILIC jsou více polární než mobilní fáze jako je tomu u NP módu HPLC.¹⁴

Z obrázků č. 10 a 11 a tabulky č. 12 je patrné, že nejvyšší kladnou hodnotu pro všechny čtyři studované chromatografické systémy má koeficient b , z čehož lze usuzovat, že retenci analytů nejvíce zvyšuje interakce prostřednictvím vodíkové vazby. U čistě silikagelové stacionární fáze jsou hodnoty regresního

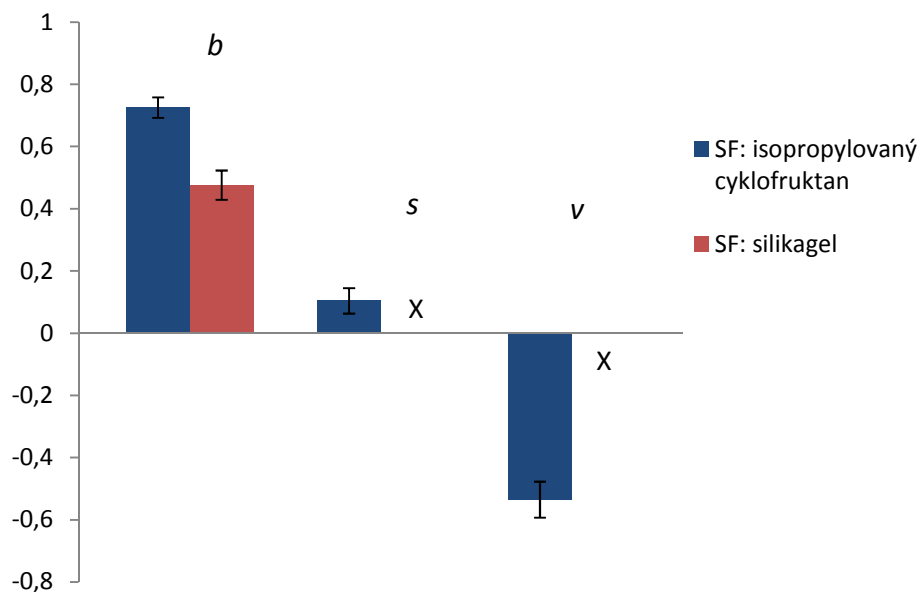
koeficientu b menší než u stacionární fáze na bázi isopropylovaného cyklofruktanu při použití stejné mobilní fáze. Modifikace silikagelu isopropylovaným cyklofruktanem přinese další skupiny, které se mohou podílet na tomto typu vodíkové vazby, což vede k vyšší hodnotě regresního koeficientu b . Koeficient b vzrostl se zvýšeným obsahem vodné složky v mobilní fázi zejména v separačním systému se stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu. V separačním systému se silikagelovou stacionární fází se téměř nezměnil.

V separačním systému se stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu se dále významně uplatňují disperzní interakce, zastoupené regresním koeficientem v . Záporná hodnota tohoto koeficientu značí interakci, která je silnější mezi analytem a mobilní fází než analytem a stacionární fází. Tento typ interakce snižuje retenci analytů, které se mohou účastnit tohoto typu interakce. V separačním systému se silikagelovou stacionární fází se tato interakce významně neuplatňuje (regresní koeficient v je statisticky nevýznamný), to znamená, že je srovnatelná ve stacionární i mobilní fází.

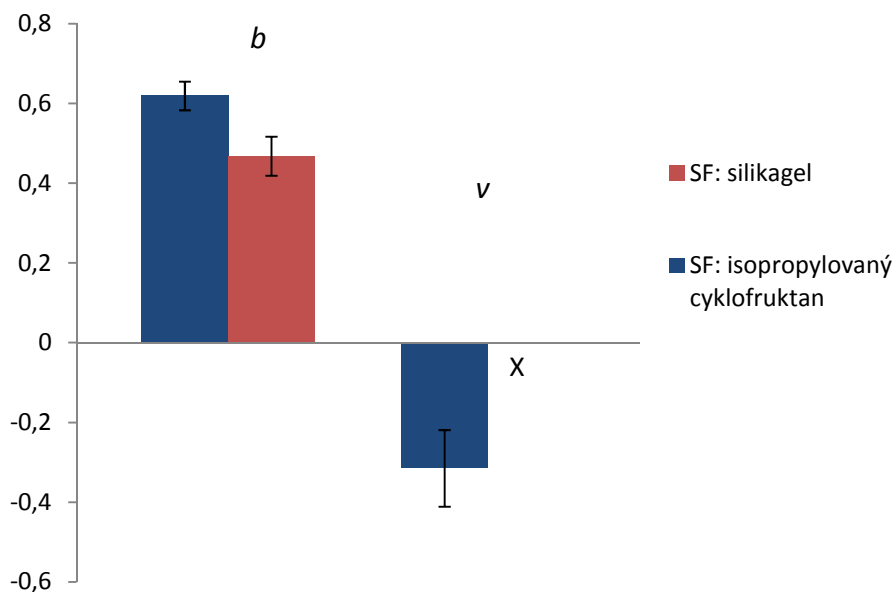
V separačním systému se stacionární fází na bázi isopropylovaného cyklofruktanu se také slabě uplatňují elektrostatické interakce popsané regresním koeficientem s , ale jen při použití mobilní fáze s vyšším obsahem vodné složky. Regresní koeficient s má oproti ostatním statisticky významným koeficientům nejmenší hodnotu. V separačních systémech se silikagelovou stacionární fází se tato interakce neuplatňuje, tudíž se nepodílí na ovlivňování retence analytů.

Regresní koeficienty a a e nejsou statisticky významné, proto se v použitých separačních systémech významně neuplatňují interakce, které zastupují.

Regresní koeficient c neodpovídá za žádnou konkrétní interakci. V tomto koeficientu mohou být zahrnuty jiné vlivy na retenci, které nepopisují ostatní regresní koeficienty LFER rovnice.



Obr. č. 10: Porovnání velikosti regresních koeficientů pro obě stacionární fáze při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v), chybové úsečky jsou střední chyby regresních koeficientů, *b*, *s*, *v* označují regresní koeficienty, X značí statisticky nevýznamné interakce.



Obr. č. 11: Porovnání velikosti regresních koeficientů pro obě stacionární fáze při použití mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v), chybové úsečky jsou střední chyby regresních koeficientů, *b*, *v* označují regresní koeficienty, X značí statisticky nevýznamnou interakci.

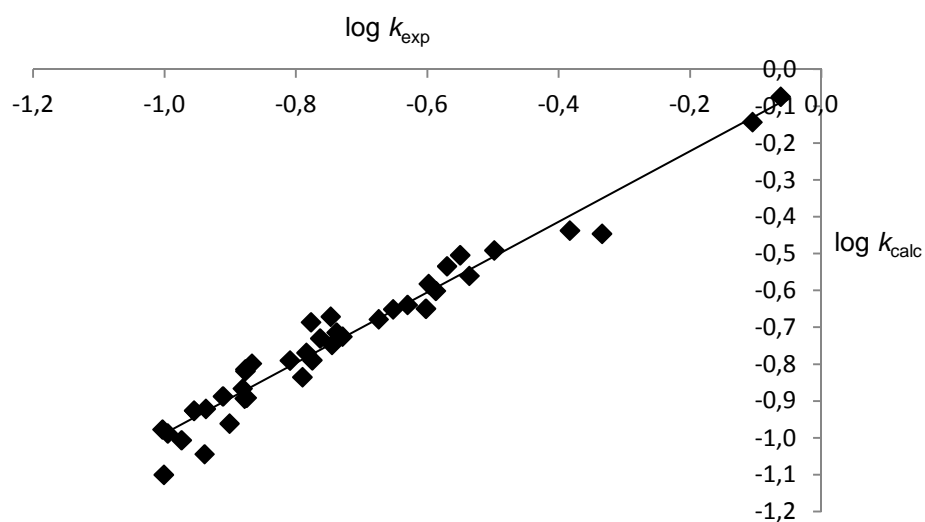
Tabulka č. 12: Regresní koeficienty rovnice LFER, jejich p -hodnoty, interval spolehlivosti (CI) a korelační koeficienty (R).

Stacionární fáze	Mobilní fáze		e	s	a	b	v	c	R
Na bázi isopropylovaného cyklofruktanu	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	C.M.	x	x	x	0,619	-0,315	-0,567	0,97
		p -hodnota	0,722	0,093	0,892	0,000	0,002	0,000	
		\pm CI				0,072	0,194	0,127	
	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)	C.M.	x	0,104	x	0,725	-0,535	-0,575	0,98
		p -hodnota	0,616	0,024	0,435	0,000	0,000	0,000	
		\pm CI		0,090		0,071	0,191	0,125	
Silikagelová	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)	C.M.	x	x	x	0,468	x	-0,637	0,91
		p -hodnota	0,833	0,604	0,742	0,000	0,865	0,000	
		\pm CI				0,100		0,176	
	ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)	C.M.	x	x	x	0,476	x	-0,698	0,91
		p -hodnota	0,827	0,808	0,524	0,000	0,757	0,000	
		\pm CI				0,095		0,167	

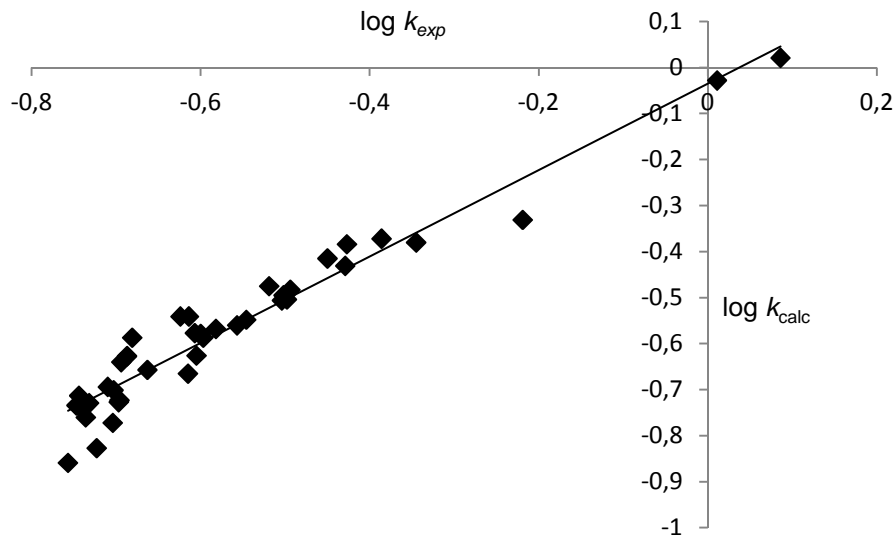
x - statisticky nevýznamné interakce

4.2.2.2. Vhodnost použitého modelu lineárních vztahů volných energií

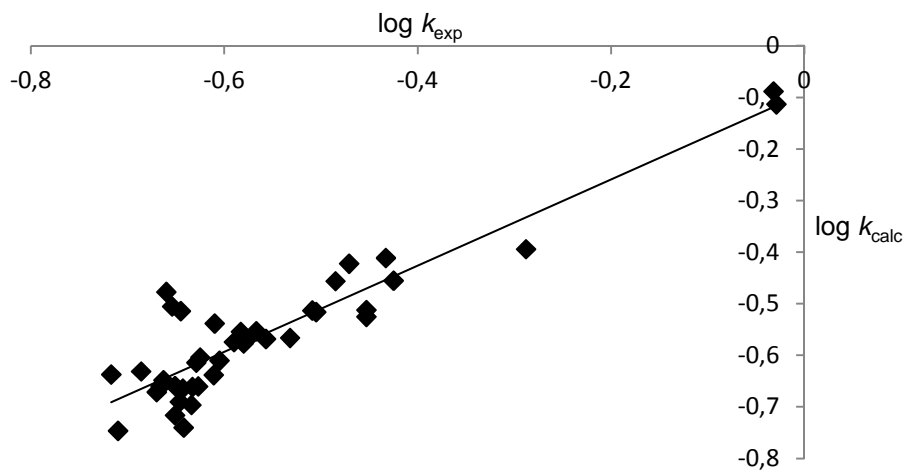
Vhodnost použití modelu LFER je ukázána na obrázcích č. 12, 13, 14 a 15, kde jsou znázorněny regresní přímky závislosti hodnot $\log k_{\text{calc}}$ vypočtených pomocí rovnice LFER na experimentálně zjištěných hodnotách $\log k_{\text{exp}}$ na jednotlivých stacionárních fázích.



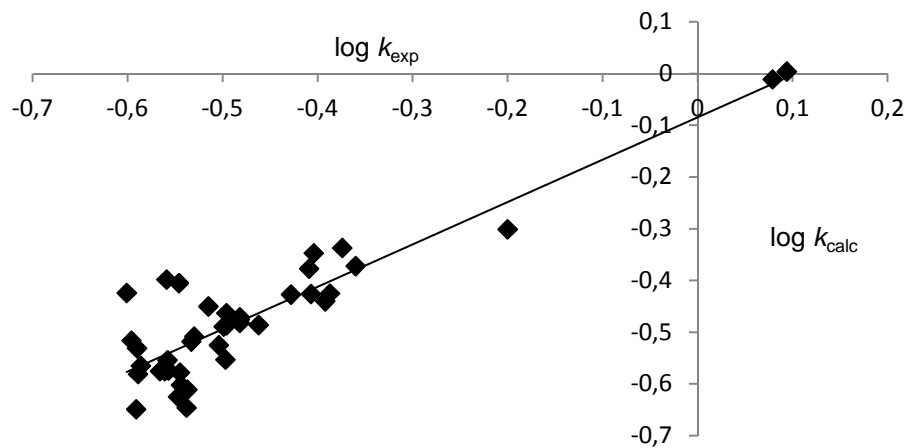
Obr. č. 12: Porovnání vypočtených a experimentálně zjištěných hodnot logaritmů retenčních faktorů na koloně Larihc CF6-P, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v). Rovnice lineární regrese má tvar: $\log k_{\text{calc}} = 0,958 \log k_{\text{exp}} - 0,031$. Korelační koeficient nabývá hodnoty $R = 0,979$.



Obr. č. 13: Porovnání vypočtených a experimentálně zjištěných hodnot logaritmů retenčních faktorů na koloně Larihc CF6-P, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v). Rovnice lineární regrese má tvar: $\log k_{\text{calc}} = 0,939\log k_{\text{exp}} - 0,035$. Korelační koeficient nabývá hodnoty $R = 0,970$.



Obr. č. 14: Porovnání vypočtených a experimentálně zjištěných hodnot logaritmů retenčních faktorů na koloně 2, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v). Rovnice lineární regrese má tvar: $\log k_{\text{calc}} = 0,835\log k_{\text{exp}} - 0,092$. Korelační koeficient nabývá hodnoty $R = 0,914$.



Obr. č. 15: Porovnání vypočtených a experimentálně zjištěných hodnot logaritmů retenčních faktorů na koloně 2, složení mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v). Rovnice lineární regrese má tvar: $\log k_{\text{calc}} = 0,819\log k_{\text{exp}} - 0,085$. Korelační koeficient nabývá hodnoty $R = 0,905$.

Z uvedených rovnic lineárních regresí vyplývá, že model není zatížen systematickou chybou, protože směrnice přímek se blíží jedné. Ze získaných hodnot korelačních koeficientů je patrná trochu nižší korelace mezi naměřenými a vypočítanými hodnotami $\log k$ pro systémy se silikagelovou stacionární fází.

4.2.2.3. Vztah mezi výsledky modelu lineárních vztahů volných energií a retencí peptidů

Ačkoliv adsorpce tvoří jen část separačního mechanismu v HILIC, výsledky modelu LFER mohou pomoci objasnit chromatografické chování pentapeptidů a nonapeptidů.

Na stacionární fázi na bázi isopropylovaného cyklofruktanu došlo k separaci čtyř pentapeptidů pomocí mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v) a pěti nonapeptidů pomocí mobilní fáze ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v) až na základní linii. Na silikagelové stacionární fázi nedochází k separaci směsi pentapeptidů až na základní linii (mobilní fáze: ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v)), zatímco směs nonapeptidů je možno téměř rozseparovat až na základní linii, ale doba analýzy je přes 100 minut (mobilní fáze: ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v)). Na této stacionární fázi se na retenci analytů významně podílí pouze jeden typ interakce podle LFER, vodíková vazba, při použití obou mobilních fází. Rozdělování analytu a vodíková vazba v systémech se silikagelovou stacionární fází poskytují dostatečnou retenci peptidů, ale nedostatečnou selektivitu. Po navázání isopropylovaného cyklofruktanu na silikagelový nosič se na retenci analytů podílejí vedle vodíkové vazby ještě disperzní interakce a při použití mobilní fáze s vyšším obsahem vodné složky také elektrostatické interakce. Dále se zvýší příspěvek interakce prostřednictvím vodíkové vazby (vyšší hodnota regresního koeficientu b).

Modifikace silikagelu polárními molekulami isopropylovaného cyklofruktanu vede ke zlepšení selektivity a separační účinnosti stacionárních fází.

5. Závěr

Vhodné optimální podmínky pro separaci směsí pentapeptidů (leucin enkefalin, [D-Ala²]-leucin enkefalin, leucin enkefalin amid, [Met⁵]enkefalin) a nonapeptidů (oxytocin, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin, [Arg⁸]vasopresin, [Arg⁸]vasotocin, [Lys⁸]vasopresin) metodou HILIC byly nalezeny na stacionární fázi na bázi isopropylovaného cyklofruktanu. Tyto separace byly porovnány se separacemi na silikagelové stacionární fázi za těchto optimálních podmínek. Do vývoje vhodných podmínek separace byly zahrnuty tyto vlivy: poměr organické a vodné složky v mobilní fázi, koncentrace použitého pufru a pH pufru.

Pro separaci směsi pentapeptidů na stacionární fázi isopropylovaného cyklofruktanu byla nalezena optimální mobilní fáze o složení ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 88/12 (v/v). Na silikagelové stacionární fázi nedošlo k rozlišení leucin enkefalin amidu a [Met⁵]enkefalinu na základní linii při separaci v uvedených podmínkách. Tyto analyty se nepodařilo rozdělit ani při použití jiného složení mobilní fáze.

Pro separaci směsi nonapeptidů na stacionární fázi na bázi isopropylovaného cyklofruktanu byla nalezena optimální mobilní fáze o složení ACN/20mM octanový pufr, pH=4,00 80/20 (v/v). Silikagelová stacionární fáze nebyla vhodná pro separaci směsi nonapeptidů, protože doba separace byla při těchto podmínkách přes 100 minut a došlo ke koeluci [Arg⁸]vasotocinu a [Lys⁸]vasopresinu. Použitím mobilní fáze s vyšším obsahem acetonitrilu (85 obj. %) tyto analyty neeluovali do 180 minut.

Metodou LFER byly zjištěny interakce, které se uplatňují při separacích v uvedených optimálních podmínkách pro kolonu Larihc CF6-P na obou stacionárních fázích. I když LFER popisuje pouze adsorpci, to znamená pouze část mechanismu v HILIC, byly zjištěny rozdíly v interakčních možnostech jednotlivých separačních systémů.

Na silikagelové stacionární fázi při použití obou mobilních fází se významně uplatňuje pouze interakce prostřednictvím vodíkové vazby mezi analyty a stacionární fází. Na stacionární fázi na bázi isopropylovaného cyklofruktanu se uplatňují kromě vazby prostřednictvím vodíkové vazby také disperzní interakce

mezi analyty a mobilní fází a při použití mobilní fáze s vyšším obsahem pufru se významně uplatňují také elektrostatické interakce mezi analyty a stacionární fází.

Ze získaných výsledků je patrné, že modifikace silikagelu isopropylováním cyklofruktanem přináší další interakční možnosti a zvyšuje separační účinnost HILIC stacionárních fází.

Použitá literatura

- ¹ Wang, Ch., Jiang, Ch., Armstrong, D. W.: Considerations on HILIC and polar organic solvent-based separations: Use of cyclodextrin and macrocyclic glycopeptide stationary phases. *Journal of Separation Science* 31 (2008), 1980-1990.
- ² Buszewski, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012), 231-247.
- ³ McCalley, D. V.: Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reverse-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?. *Journal of Chromatography A* 1171 (2007), 46-55.
- ⁴ Boersema, P. J., Mohammed, S., Heck, A. J. R.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008), 151-159.
- ⁵ Heaton, J., Gray, N., Cowan, D. A., Plumb, R. S., Legido-Quigley, C., Smith, N. W.: Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine. *Journal of Chromatography A* 1128 (2012), 329-337.
- ⁶ Linden, J. C., Lawhead, C. L.: Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography* 105 (1975), 125-133.
- ⁷ Alpert, A. J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* 499 (1990), 177-196.
- ⁸ Noga, S., Felinger, A., Buszewski, B.: Hydrophilic interaction liquid chromatography and per aqueous liquid chromatography in fungicides analysis. *Journal of AOAC International* 95 (2012), 1362-1370.
- ⁹ Xu, Y., Yang, L., Yang, F., Xiong, Y., Wang, Z., Hu, Z.: Metabolic profiling of fifteen amino acids in serum of chemical-induced liver injured rats by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Metabolomics* 8 (2012), 475-483.

-
- ¹⁰ Graya, N., Heatona, J., Musengab, A., Cowana, D. A., Plumba, R. S., Smith, N. W.: Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the quantification of ephedrine using medium-resolution accurate mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1289 (2013), 37-46.
- ¹¹ Risley, D. S., Magnusson, L.-A., Morow, P. R., Aburub, A.: Analysis of magnesium from magnesium stearate in pharmaceutical tablet formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with nano quantity analyte detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78–79 (2013), 112–117.
- ¹² Gama, M. R., da Costa Silva, R. G., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G.: Hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012), 48-60.
- ¹³ Majors, R. E.: Recent advances in HPLC packings and columns. *Journal of Chromatographic Science* 18 (1980), 488-511.
- ¹⁴ Hermström, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29 (2006), 1784-1821.
- ¹⁵ Yoshida, T.: Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 60 (2004), 265-280.
- ¹⁶ Padivitage, N. L. T., Armstrong, D. W.: Sulfonated cyclodextran 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 34 (2011), 1636-1647.
- ¹⁷ Chirita, R-I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A-L., Elfakir, C.: Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 5939-5963.
- ¹⁸ Hao, Z., Xiao, B., Weng, N.: Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science* 31 (2008), 1449-1464.
- ¹⁹ Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* 692 (2011), 1-25.

-
- 20 Shi, Z.-G., Wu, Y.-B., Luo, Y.-B., Feng, Y.-Q.: Analysis of pterins in urine by HILIC. *Chromatographia* 71 (2010), 761-768.
- 21 Liu, Q., Xu, L., Ke, Y., Jin, Y., Zhang, F., Liang, X.: Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011), 623-628.
- 22 Oertel, R., Neumeister, V., Kirch, W.: Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *Journal of Chromatography A* 1058 (2004), 197-201.
- 23 Fu, Q., Liang, T., Zhang, X., Du, Y., Guo, Z., Liang, X.: Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. *Carbohydrate Research* 345 (2010), 2690-2697.
- 24 Tanaka, H., Zhou, X., Masayoshi, O.: Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 987 (2003), 119-125.
- 25 Mant, C. T., Litowski, J. R., Hodges, R. S.: Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of amphipathic α -helical peptides. *Journal of Chromatography A* 816 (1998), 65-78.
- 26 Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K.: Formation of a cyclinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. *Carbohydrate Research* 192 (1989), 83-90.
- 27 Sun, P., Wang, Ch., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Development of new HPLC chiral stationary phases based on native and derivatized cyclofructans. *Analytical Chemistry* 81 (2009), 10215-10226.
- 28 Jiang, Ch., Tong, M.-Y., Breitbach, Z. S., Armstrong D. W.: Synthesis and examination of sulfated cyclofructan as a novel class of chiral selectors for CE. *Electrophoresis* 30 (2009), 3897-3909.
- 29 Sun, P., Wang, Ch., Padivitage, N. L. T., Nanayakkara, Y. S., Perera, S., Qui, H., Zhang, Y., Armstrong D. W.: Evaluation of aromatic-derivatized cyclofructans 6 and 7 as HPLC chiral selectors. *Analyst* 136 (2011), 787-800.

-
- ³⁰ Sun, P., Armstrong, D. W.: Effective enantiomeric separations of racemic primary amines by the isopropyl carbamate-cyclofructan 6 chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010), 4904-4918.
- ³¹ Janečková, L., Kalíková, K., Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosáková, Z., Tesařová, E.: Characterization of cyclofructan-based chiral stationary phases by linear free energy relationship. *Journal of Separation Science* 34 (2011), 2639-2644.
- ³² Gondova, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W.: Stereoselective separation of spiroindoline phytoalexins on *R*-naphthyl cyclofructan 6-based chiral stationary phase. *Journal of chromatography A* 1272 (2013), 100-105.
- ³³ Aranyi, A., Bagi, A., Ilisz, I., Pataj, Z., Fueleop, F., Armstrong, D. W., Peter, A.: High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino compounds on newly developed cyclofructan-based chiral stationary phases. *Journal of Separation Science* 35 (2012), 617-624.
- ³⁴ Gondová, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W.: Stereoselective separation of spiroindoline phytoalexins on *R*-naphthylethyl cyclofructan 6-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* 1272 (2013), 100-105.
- ³⁵ Qiu, H., Loukotková, L., Sun, P., Tesařová, E., Bosáková, Z., Armstrong, D. W.: Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 270-279.
- ³⁶ Aranyl, A., Bagl, Á., Ilisz, I., Pataj, Z., Fülöp, F., Armstrong, D. W., Antal, P.: High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino compounds on newly developed cyclofructan-based chiral stationary phases. *Journal of Separation Science* 35 (2011), 617-624.
- ³⁷ Kovaříková, P., Stariat, J., Klimeš, J., Hrušková, K., Vávrová, K.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites—The cardioprotectant dexrazoxane as a model case. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 416–426.
- ³⁸ Kumar, A., Hart, J. P., McCalley, D. V.: Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 3854–3861.

-
- ³⁹ Kumar, P., Rubies, A., Companyó, R., Centrich, F.: Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides, *Journal of Separation Science* 35 (2011), 498-504.
- ⁴⁰ Guo, Y., Gaiki, S.: Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 5920– 5938.
- ⁴¹ Walkowiak, M., Zalewska, A., Jesionowski, T., Waszak, D., Czajka, B.: Effect of chemically modified silicas on the properties of hybrid gel electrolyte for Li-ion batteries. *Journal of Power Sources* 159 (2006), 449–453.
- ⁴² Claessens, H. A., van Straten, M. A., Cramers, C. A., Jezierska, M., Buszewski, B.: Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 826 (1998), 135-156.
- ⁴³ Claessens, H. A.: Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 20 (2001), 563-583.
- ⁴⁴ Vervoort, R. J. M., Ruyter, E., Debets, A. J. J., Claessens, H. A., Cramers, C. A., de Jong, G. J.: Characterization of reversed-phase liquid chromatography stationary phases for the analysis of basic pharmaceuticals: eluent properties and comparison of empirical test methods. *Journal of Chromatography A* 931 (2001), 67-79.
- ⁴⁵ Jandera, P., Bunčková, S., Halama, M., Novotná, K., Nepraš, M.: Naphtalene sulphonic acids-new test compounds for characterization of the columns for reverse-phase chromatography. *Journal of Chromatography A* 1059 (2004), 61-72.
- ⁴⁶ Walters, M. J.: Classification of octadecyl-bonded liquid chromatography columns. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 70 (1987), 465-469.
- ⁴⁷ Kamlet, M. J., Taft, R. W.: The solvatochromic comparison method. I. The β -scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. *Journal of the American Chemical Society* 98 (1976), 377-383.
- ⁴⁸ Abraham, M. H.: Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. *Chemical Society Reviews* 22 (1993), 73-83.

-
- ⁴⁹ Fatemi, M. H., Abraham, M. H., Poole, C. F.: Combination of artificial neural network technique and linear free energy relationship parameters in the prediction of gradient retention times in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1190 (2008), 241-252.
- ⁵⁰ Jiskra, J., Claessens, H. A., Cramers, C. A., Kaliszan, R.: Quantitative structure-retention relationships in comparative studies of behavior of stationary phases under high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography conditions. *Journal of Chromatography A* 977 (2002), 193-206.
- ⁵¹ Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A.: Quantitative structure-retention relationships as useful tool to characterize chromatographic systems and their potential to simulate biological processes. *Chromatographia* 76 (2013), 211-226.
- ⁵² Vitha, M., Carr, P. W.: The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *Journal of Chromatography A* 1126 (2006), 143-194.
- ⁵³ Schuster, G., Lindner, W.: Comparative characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography columns by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A* 1273 (2013), 73-94.
- ⁵⁴ Lokajová, J., Tesařová, E., Armstrong, D. W.: Comparative study of three teicoplanin-based chiral stationary phases using the linear free energy relationship model. *Journal of Chromatography A* 1088 (2005), 57-66.
- ⁵⁵ Kalíková, K., Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová, E.: Characterization of new *R*-naphthylethyl cyclofructan 6 chiral stationary phase and its comparison with *R*-naphthylethyl β -cyclodextrin-based column. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 1393-1398.
- ⁵⁶ Vonk, E. C., Lewandowska, K., Claessens, H. A., Kaliszan, R., Cramers, C. A.: Quantitative structure-retention relationships in reverse-phase liquid chromatography using several stationary and mobile phases. *Journal of Separation Science* 26 (2003), 777-792.
- ⁵⁷ Berthod, A., Mitchell, C. R., Armstrong, D. W.: Could linear solvation energy relationships give insights into chiral recognition mechanisms? 1. π - π and charge interaction in the reversed versus the normal phase mode. *Journal of Chromatography A* 1166 (2007), 61-69.

-
- 58 Zvára, K.: *Biostatistika*. Praha, Karolinum 2004, str. 157.
- 59 Quiming, N. S., Denola, N. L., Saito, Y., Jinno, K.: Retention prediction of adrenoreceptor agonists on unmodified silica phase in hydrophilic interaction chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007), 1693-1706.
- 60 Zichová, J.: *Plánování experimentů a predikční vícerozměrná analýza*. Praha, Karolinum 2007, str. 16-17.
- 61 Sha, A., Sun, H., Wang, Y.: Immunohistochemical observations of methionine-enkephalin and delta opioid receptor in the digestive system of *Octopus ocellatus*. *Tissue and cell* 45 (2013), 83-87.
- 62 Tordjman, S., et al.: Aggression and the three opioid families (endorphins, enkephalins, and dynorphins) in mice. *Behavior genetics* 33 (2003), 529-536.
- 63 Wang, Y., Sun, H.: Immunohistochemical identification of met-enkephalin in digestive system and its effect on digestive enzyme activities of the scallop *Chlamys farreri*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 16 (2010), 31-37.
- 64 Marcotte, I., Separovic, F., Auger, M., Gagné, S. M.: A multidimensional 1H NMR investigation of the conformation of methionine-enkephalin in fast-tumbling bicelles. *Biophysical Journal* 86 (2004), 1587-1600.
- 65 Soukupová, K., Krafková, E., Suchánková, J., Tesařová, E.: Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins. *Journal of Chromatography A* 1087 (2005), 104-111.
- 66 Ranc, V., Petruzzello, F., Kretz, R., Argondoña, E. G., Zhang, X., Rainer, G.: Broad characterization of endogenous peptides in the tree shrew visual system. *Journal of Proteomics* 75 (2012), 2526-2535.
- 67 Lu, W. D., Funkelstein, L., Toneff, T., Reinheckel, T., Peters, Ch., Hook, V.: Cathepsin H functions as aminopeptidase in secretory vesicles for production of enkephalin and galanin peptide neurotransmitters. *Journal of Neurochemistry* 122 (2012), 512-522.
- 68 Li, Y., Wojcik, R., Dovichi, N. J., Champion, M. M.: Quantitative multiple reaction monitoring of peptide abundance introduced via a capillary zone electrophoresis-electrospray interface. *Analytical Chemistry* 84 (2012), 6116-6121.

-
- ⁶⁹ Janečková, L., Sobotníková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z.: Využití moderních reverzních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého pro analýzu bioaktivních peptidů. *Chemické Listy* 104 (2010), 334-342.
- ⁷⁰ Hynie, S.: *Farmakologie v kostce*, 2. vydání. Praha, Triton 2011, str. 316, 336.
- ⁷¹ Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*, 5. přepracované a rozšířené vydání. Praha, Grada Publishing 2007, str. 132.
- ⁷² Keverne, B. E., Curley J. P.: Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* 14 (2004), 777-783.
- ⁷³ Goodson, J. L., Lindberg, L., Johnson, P.: Effects of central vasotocin and mesotocin manipulations on social behavior in male and female zebra finches. *Hormones and Behavior* 45 (2004), 136-143.
- ⁷⁴ Storm, E. E., Tecott, L. H.: Social circuits: Peptidoergic regulation of mammalian social behavior. *Neuron* 47 (2005), 483-486.
- ⁷⁵ Do-Rego, J.-L., et al.: Vasotocin and mesotocin stimulate the biosynthesis of neurosteroids in the frog brain. *The Journal of Neuroscience* 26 (2006), 6749-6760.
- ⁷⁶ Starkey, E. D., et al.: Determination of endogenous extracellular signal-regulated protein kinase by microchip capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 316 (2003), 181-191.
- ⁷⁷ Mabrouk, O. S., Kennedy R. T.: Simultaneous oxytocin and arg-vasopressin measurements in microdialysates using capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Neuroscience Methods* 209 (2012), 127-133.
- ⁷⁸ Schmidt, A.-Ch., Mickein, K.: Optimization of peptide and protein separation with a monolithic reversed-phase column and application to arsenic-binding studies. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 280-285.
- ⁷⁹ Jandera, P., Novotná, K., Beldean-Galea, M. S., Jíša, K.: Retention and selectivity tests of silica-based and metal-oxide bonded stationary phases for RP-HPLC. *Journal of Separation Science* 29 (2006), 856-871.

⁸⁰ Abraham, M. H., Andonian-Haftvan, J., Whiting, G. S., Leo, A., Taft, R. S.: Hydrogen bonding. Part 34. The factors that influence the solubility of gases and vapors in water at 298 K, and a new method for its determination. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 8 (1994), 1777-1791.