

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**MONOLITICKÉ KOLONY
PRO
KAPILÁRNÍ KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHII**

Diplomová práce

Praha 2007

Adéla Svobodová

Předmětová hesla : analytická chemie, separační metody

Klíčová slova : kapilární kapalinová chromatografie, monolitické kolony, peptidy

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Jany Suchánkové, Ph.D. a konsultanta Doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D., 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...*2.5.2007*.....

Adéla Svoboda
.....
podpis

Poděkování

Úvodem této práce bych ráda poděkovala za odborné rady a připomínky RNDr. Janě Suchánkové, Ph.D., Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D., RNDr. Janu Grafnetterovi, Ph.D. a dále své rodině za podporu a pochopení.

Tato práce byla finančně podporována MSMT ČR (projekt MSM 0021620857).

OBSAH

POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	6
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Mikrokapalinová chromatografie	9
2.2 Kapilární monolitické kolony	10
2.2.1 Monolitické kolony na bázi styrenu	15
2.2.2 Příprava monolitických kolon na bázi styrenu	17
2.3 Přehled studovaných peptidů	19
2.3.1 Enkefaliny a jejich deriváty	20
2.3.2 Nonapeptidy	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Chemikálie	24
3.2 Přístroje a materiál	25
3.3 Příprava vzorků a mobilních fází	25
3.4 Použité vztahy a vzorce	26
3.5 Postup přípravy styrenových monolitických kolon	28
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1 Příprava monolitických kolon na bázi styrenu	31
4.2 Chování nízkomolekulárních látek na připravených kolonách	31
4.3. Vliv složení polymerizační směsi na retenci nízkomolekulárních látek na styrenovém monolitu	35
4.4 Chování vysokomolekulárních látek na připravených monolitických kolonách	38
4.4.1. Určení optimální průtokové rychlosti pro separace derivátů enkefalinů	40
4.4.2. Závislost separace derivátů enkefalinů na pH vodné složky mobilní fáze	42
4.5. Kvantifikace pentapeptidu a hexapeptidu	47
4.6. Objasnění separačního mechanismu monolitických kolon na bázi styrenu	55
5. ZÁVĚR	57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58

POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

<i>A</i>	člen van Deemtrovy rovnice (příspěvek turbulentní difúze)
<i>a</i>	přílehlá pološířka v 10 % výšky píku
<i>A_F</i>	asymetrický faktor
AIBN	α , α' -azobisisobutyronitril
Arg	arginin, aminokyselina
Asn	asparagin, aminokyselina
<i>B</i>	člen van Deemtrovy rovnice (příspěvek molekulové difúze)
<i>b</i>	odlehlá pološířka v 10 % výšky píku
BMA	butyl-methakrylát
<i>C</i>	člen van Deemtrovy rovnice (odpor proti převodu hmoty)
CEC	kapilární elektrochromatografie
CH ₃ CN	acetonitril
CLC	kapilární kapalinová chromatografie
Cys	cystein, aminokyselina
D-Ala	D-alanin, aminokyselina
EDMA	ethylenglykoldimethakrylát
ESI-MS	hmotnostní detektor s elektrosprejovou ionizací
Gln	glutamin, aminokyselina
Gly	glycin, aminokyselina
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP-RP-HPLC	iontově párová reverzní vysokoúčinná chromatografie
Ile	isoleucin, aminokyselina
<i>k_i</i>	retenční faktor
<i>L</i>	délka kolony
LC	kapalinová chromatografie
LCL	dolní kritická mez
Leu	leucin, aminokyselina
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovení
LWL	dolní varovná mez

γ -MAPS	3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylát (γ -methakryloyloxypropyl)trimethoxysilan
Met	methionin, aminokyselina
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
n	počet teoretických pater
p.a.	pro analýzu
PEEK	polyetheretherketon
Phe	fenylalanin, aminokyselina
Pro	prolin, aminokyselina
RP-HPLC	reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie
R_s	rozlišení vzhledem k předchozímu píku
RSD	relativní směrodatná odchylka
SEC	vylučovací chromatografie
TFA	kyselina trifluoroctová
t_M	mrtvý retenční čas
t_R	retenční čas
Tyr	tyrosin, aminokyselina
u	lineární průtoková rychlost
UCL	horní kritická mez
UV	ultrafialový
UWL	horní varovná mez
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky
w_b	šířka píku při základně

1. ÚVOD

Kapilární kapalinová chromatografie (CLC) je miniaturizovaná separační metoda, která se ve srovnání s konvenční vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií vyznačuje určitými výhodami, jako je například malé množství potřebné stacionární fáze a nízká spotřeba mobilní fáze a vzorku. Monolitické kolony, někdy nazývané jako stacionární fáze čtvrté generace, jsou dalším vývojovým stupněm, a tedy moderní alternativou k náplňovým kapilárním kolonám pro CLC. Polymerizací vhodného monomeru uvnitř kapiláry vzniká monolit s póry sloužící jako stacionární fáze.

V literatuře byla popsána řada úspěšných separací na kapilárních monolitických kolonách na bázi styrenu. Monolity připravené v kapiláře o vnitřním průměru 320 μm ještě nebyly připraveny ve formátu separační kolony, byly využity pouze jako koncové frity pro náplňové kolony.

Cílem této diplomové práce byla příprava kapilárních monolitických kolon na bázi styrenu o vnitřním průměru 320 μm , otestování těchto kolon pomocí testu pro reverzní fáze a nalezení optimálních podmínek pro separace biologicky aktivních peptidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrokapalinová chromatografie

Prvních úspěchů v oblasti miniaturizace kolon pro kapalinovou chromatografii dosáhl Horváth a kolektiv v roce 1967 [1, 2], kdy použili částicemi plněné ocelové kolony o vnitřním průměru 0,5–1,0 mm na separaci ribonukleotidů. Až do konce šedesátých let minulého století se výzkumy v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie zaměřovaly na náplňové kolony s vnitřním průměrem 4,6 mm. Nicméně, ani ne v polovině sedmdesátých let Ishii a kolektiv předvedli využití náplňových teflonových kolon o vnitřním průměru 0,5 mm v řadě publikací [2, 3, 4], což vyvolalo průlom v rozvoji mikrokolonové kapilární chromatografie (mikro-LC). Za klíčové práce týkající se mikro-LC můžeme označit publikace Novotného [6, 7], Scotta [8, 9, 10] a Yanga [11], které popisují dosažení vysoké účinnosti a rychlosti separace na náplňových mikrokolonách o vnitřním průměru 1 mm. Hlavním důvodem miniaturizace vnitřních průměrů kolon a ostatních mimokolonových částí mikrokapalinového chromatografu byla snaha o zvýšení separační účinnosti a urychlení doby analýzy.

V klasické vysokoúčinné chromatografii (HPLC) se setkáváme s kolonami o vnitřním průměru jednotek milimetrů (4-6 mm), v mikro-LC se vnitřní průměry kolon pohybují v rozmezí 0,5-1,0 mm, v kapilární kapalinové chromatografii (CLC) v rozmezí 100-500 μm a v nanokapalinové chromatografii (nanoscale-LC) se používají kolony s vnitřními průměry 10-100 nm.

Miniaturizace v kapalinové chromatografii přináší ve srovnání s běžně používanou HPLC řadu výhod:

1. malé množství potřebné stacionární fáze,
2. velmi malou spotřebu mobilní fáze,
3. nízkou spotřebu vzorku,
4. kratší analýzy s menším tlakovým spádem,
5. dosažení vysokého rozlišení u delších kolon,
6. vzrůst citlivosti detekce související s menším naředěním vzorku,
7. možnost přímého zapojení s hmotnostním spektrometrem.

Malá spotřeba stacionární fáze v mikro-LC umožňuje použití netradičních nebo drahých materiálů při přípravě kapilárních kolon. Nízká spotřeba mobilní fáze dovoluje použití toxických nebo méně obvyklých mobilních fází jakými jsou např. nižší alkany nebo oxid uhličitý, užívaný též při superkritické fluidní chromatografii. Celkovým snížením spotřeby chemikálií se mikro-LC stává ohleduplnější k životnímu prostředí.

I přes použití menšího množství vzorku lze v mikrokapalinové chromatografii dosáhnout stejné koncentrační citlivosti jako u běžné HPLC. Menší míra naředění vzorku usnadňuje kombinaci se spektrálními metodami.

V počátcích mikrokapalinové chromatografie patřila k nejčastěji užívaným detekčním technikám UV-spektrometrická detekce, vedle které byly využívány i detekce fluorescenční a elektrochemická. Dnes je publikováno stále více prací využívajících přímého spojení s hmotnostním detektorem [12, 13], což je umožněno použitím kolon malého vnitřního průměru a nízkých průtokových rychlostí.

Mikro-LC nalézá široké uplatnění v nejrůznějších odvětvích. V současné době je nejčastěji aplikována při analýzách biologických vzorků, výzkumu proteinů a peptidů [12, 13, 14, 15, 16]. Dalšími aplikacemi jsou chirální separace [12, 17] a analýzy průmyslových vzorků, jakými jsou polymery a různá aditiva.

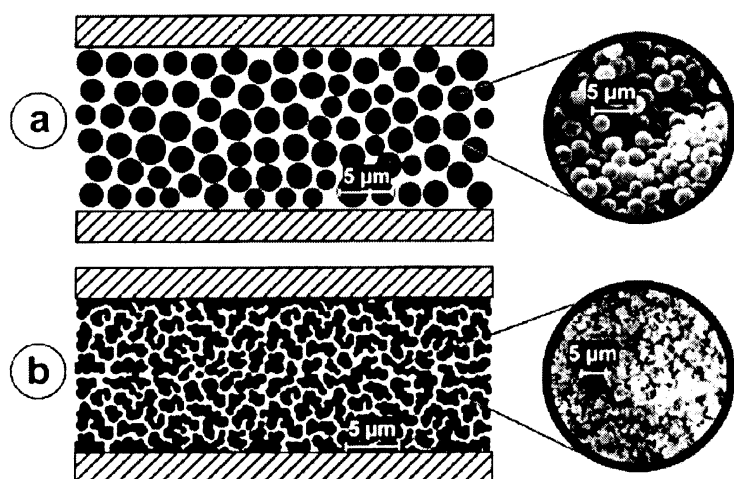
I přesto, že jsou výhody miniaturizace neoddiskutovatelné, zmenšení přináší i některé nevýhody. Z nich lze například jmenovat vyšší technické nároky na přístrojovou techniku, jakými jsou mimokolonové části a detekční cely.

2.2 Kapilární monolitické kolony

Monolity jsou zvláštní separační média, která si lze představit jako jednu velkou částici sorbentu zaplňující zcela vnitřek separační kolony. Oproti typickým kolonám plněným drobnými částicemi monolity neobsahují interpartikulární prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku, jak je znázorněno na **obr. 2.1**. Tato absence mezičásticových prostor donutí veškerou mobilní fázi protékat póry monolitu.

Monolity obsahují dva typy pórů. Prvním typem jsou póry difúzní, analogické jako u běžných sorbentů. Ty mají za úkol zajistit dostatečnou sorpční kapacitu sorbentu. Druhým typem jsou póry průtočné, díky kterým dochází ke konvektivnímu toku

mobilní fáze separačním médiem [18]. Na rozdíl od difúze, která je hlavní hnací silou přenosu hmoty z kapaliny proudící podél částic v běžné koloně do jejich pórů, konvekce póry umožňuje značné zrychlení separací především velkých molekul, jako jsou bílkoviny či nukleové kyseliny, jejichž difúze je pomalá. Podrobná teorie popisující přenos hmoty v monolitických médiích byla nedávno vypracována Liapisem [19].



Obr. 2.1 Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně [20]

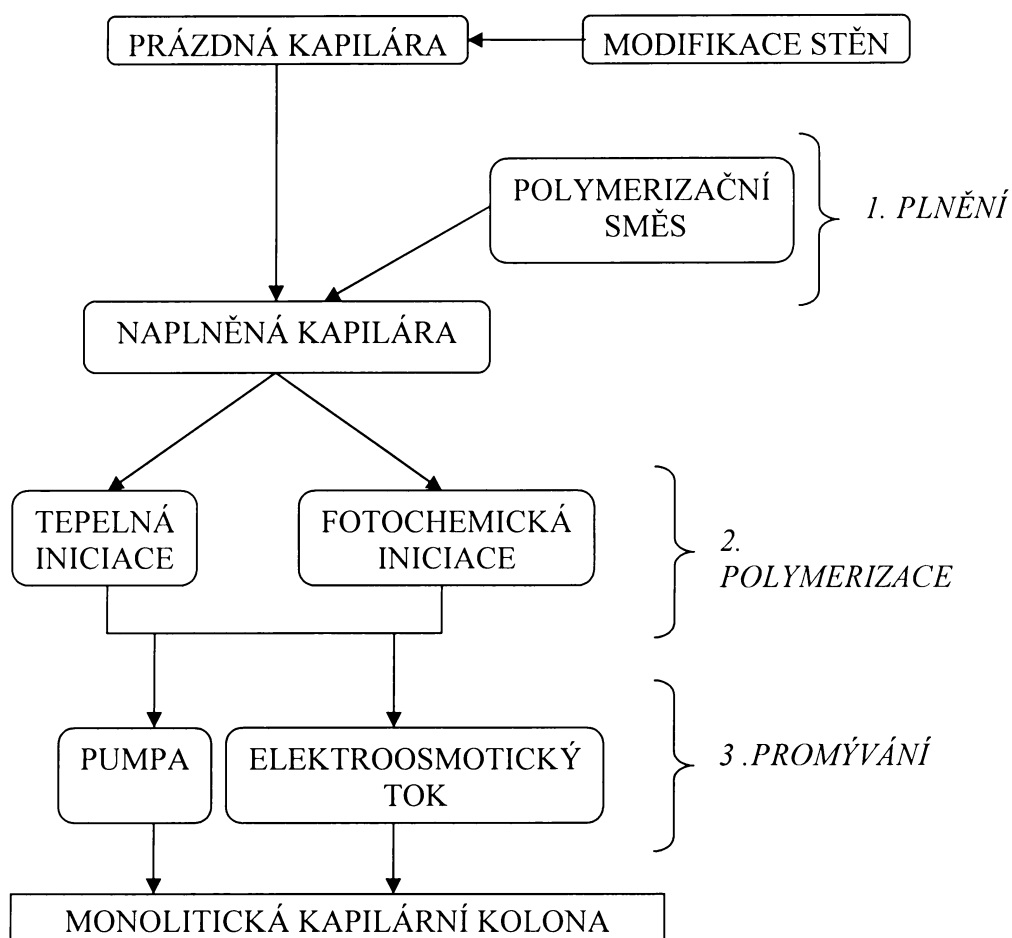
První pokusy o vytvoření „jednokusové“ stacionární fáze se datují na počátek sedmdesátých let. Díky velmi malé průchodnosti použitého materiálu (pouhé 4 ml h^{-1}) a nízké účinnosti při separacích snahy o praktické využití ztroskotaly. V roce 1989 Hjertén a kolektiv [21] představili pod názvem „kontinuální polymerní lože“ stlačený polyakrylamidový gel, kterého úspěšně využili při chromatografické separaci proteinů. Švec a Fréchet [22] na počátku devadesátých let popsali přípravu nových stacionárních fází založených na makroporézním polymeru.

Vzrůstající zájem o monolitická separační média vyvolala především jejich snadná příprava a vysoká účinnost při separacích, srovnatelná s účinností klasických náplňových kolon. Lze je připravit v libovolně dlouhých kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů. Při přípravě monolitických kolon odpadají obtíže spojené s plněním klasických i kapilárních HPLC kolon chemicky modifikovanými sorbenty. Na rozdíl od náplňových kolon používaných v konvenční HPLC a CLC nemusí být monolitické kolony opatřeny na konci fritami, které jsou spojovány se snížením

separační účinnosti a mohou být zodpovědné za tvorbu vzduchových bublin během analýzy. Díky absenci frit nachází monolitické kolony rozsáhlé uplatnění kromě CLC i v kapilární elektrochromatografii (CEC) [23, 24, 25, 26, 27, 28].

Polymerizací vhodných monomerních jednotek uvnitř kapiláry vzniká blok porézního polymeru sloužící jako stacionární fáze. Při výběru polymerizační směsi můžeme volit z rozmanité škály monomerů, a to hydrofobních, hydrofilních, nabitých nebo „šitých na míru“ dle zaměření očekávané separace. Tato rozmanitost nabízí široký výběr stacionární fáze, a to podle specifických interakcí mezi stacionární fází a separovanými látkami. Vhodnou volbou polymerizační směsi při přípravě monolitických kolon lze ovlivnit intenzitu elektroosmotického toku generovaného v CEC [29].

Princip přípravy kapilárních monolitických kolon vychází z postupu přípravy monolitických kolon pro HPLC. Metoda přípravy „in situ“ je demonstrována schématem na **obr. 2.2**. Nejprve dochází k modifikaci vnitřních povrchů kapiláry. Poté je prázdná kapilára naplněna polymerizační směsí, která se skládá z funkčního monomeru, síťujícího monomeru, iniciátoru polymerizace a porogenního rozpouštědla. Následuje iniciace vlastní polymerizace UV zářením nebo zvýšením teploty. Výsledný monolit se promývá mobilní fází, čímž dochází k vymytí porogenního rozpouštědla a nezabudovaných monomerních jednotek. Takto připravenou kolonu můžeme použít pro separace v mikro-LC či CEC.



Obr. 2.2 Schéma přípravy kapilárních monolitických kolon

Obecně se monolitické kolony dělí do dvou základních skupin [30, 31, 32]. Do první skupiny spadají kolony na bázi silikagelu. Tyto monolity byly poprvé syntetizovány Tanakou [33]. Nejčastěji je používána sol-gelová technika k vytvoření kontinuální silikagelové sítě v celé koloně. Tato technika zahrnuje postupné kroky jako je hydrolyza a kondenzační reakce s následnou polykondenzací křemenného prekursoru (např. tetramethoxysilanu) [34, 35]. Další možností je spečení částic oxidu křemičitého za zvýšené teploty a následná modifikace oktadecylovými skupinami [36]. Do druhé skupiny se řadí monolitické kolony na bázi organických polymerů. Polymerní síť je tvořena postupnou řetězovou polymerizací uvnitř kapiláry. Ve srovnání s kolonami na bázi oxidu křemičitého mají zpravidla nižší účinnost. Některé druhy vykazují menší odolnost a stabilitu v organických rozpouštědlech. Značnou výhodou organických

polymerů je možnost práce v širokém rozsahu jednotek pH a velice dobrá kompatibilita s biologickými vzorky.

V literatuře [37] byly popsány čtyři hlavní typy monolitických kapilárních kolon na bázi organických polymerů.

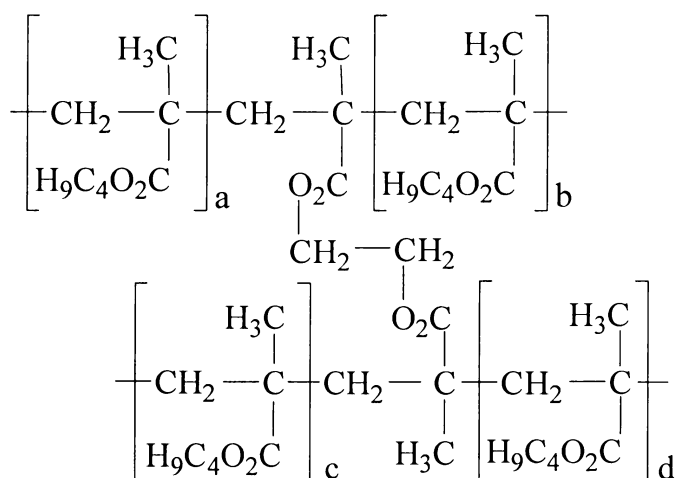
Monolity na bázi akrylamidu [38, 39] se připravují polymerizací akrylamidu či jeho derivátů a síťujícího methylenbisakrylamidu.

Monolity na bázi norbornenu [40] se připravují polymerizací norbornenu a síťujícího hexahydrodimethanonafthalenu.

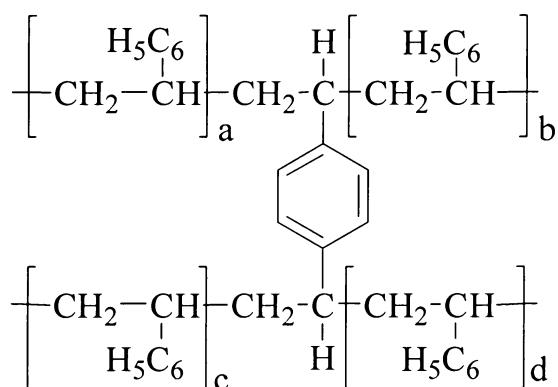
Monolity na bázi methakrylátu [41, 42, 43, 44] se připravují polymerizací butyl-methakrylátu či jiných derivátů kyseliny methakrylátové a síťujícího ethylen-dimethakrylátu. Struktura butyl-methakrylátového monolitu je uvedena na **obr. 2.3**.

Monolity na bázi styrenu [45, 46, 47, 48, 49, 50] se připravují polymerizací styrenu nebo jeho derivátů a síťujícího divinylbenzenu. Výsledná struktura kopolymeru je znázorněna na **obr. 2.4**.

Monolitické kolony jsou v posledních letech předmětem rozsáhlého výzkumu. Byla prozkoumána řada aplikací, kterými je extrakce na pevné fázi [51], prekoncentrace vzorků [51, 52] a separace v takovém odvětví jako je farmacie a životní prostředí [53]. Nejčastějším uplatněním monolitů jsou separace aminokyselin a peptidů [27, 54, 55, 56, 57], proteinů [22, 26, 44], oligosacharidů [38] nebo nukleových kyselin [20, 40]. Lze je ovšem také použít při separaci látek s malou molekulovou hmotností [25, 35, 39, 41, 42] jako například derivátů styrenu.



Obr. 2.3 Struktura kopolymeru butyl-methakrylátu a ethylen-dimethakrylátu



Obr. 2.4 Struktura kopolymeru styrenu a divinylbenzenu

2.2.1 Monolitické kolony na bázi styrenu

Makroporézní styren-divinylbenzenové kopolymery jsou široce využitelné pro celou řadu aplikací jako jsou například polymerní nosiče pro katalyzátory, polymerem imobilizovaná extrakční činidla, výchozí materiály pro syntézu iontoměničových pryskyřic nebo chromatografické náplně pro vylučovací chromatografii (SEC) [30].

Jejich nespornou výhodou je jejich stabilita přes široký rozsah pH (1-14), což běžné materiály náplňových kolon nesnesou. Díky přirozeně vysoké hydrofobnosti lze polymery použít jako reverzní stacionární fáze bez předchozích úprav, a to především pro separace nepolárních makromolekul. Pro analýzu menších molekul je vhodné povrch monolitu chemicky modifikovat a zvýšit tak možnost interakcí mezi stacionární fází a analytem. Existují dvě možnosti jak zabudovat alkylové skupiny do povrchu polymeru [30]. V prvním případě je monomer, např. alkylstyren, již přítomen v polymerizační směsi, v druhém případě dochází k alkylosti až na hotovém monolitu za použití silného Friedel-Craftsova katalyzátoru.

Za první, kdo začali využívat monolity na bázi styrenu, jsou považováni Švec a Fréchet [46]. Na počátku devadesátých let položila tato skupina základy v oblasti, již je dnes rozsáhlý výzkum kapilárních kolon pro HPLC. V prvních experimentech byly přidávány k porogennímu rozpouštědлу dodekanolu monomery styren a divinylbenzen.

Jako iniciátor tepelně iniciované polymerizace byl vybrán α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN). Touto směsí byla naplněna kolona z nerezové oceli o vnitřním průměru 8 mm, která byla termostatována na 70 °C po dobu 24 hodin. Za použití RP-HPLC s gradientovou elucí byly získány pozoruhodné výsledky. Separace směsi čtyř proteinů proběhla s vysokou účinností v čase kratším než jedna minuta. Tato nová stacionární fáze vykazovala také velice slabou závislost mezi průtokem mobilní fáze a rozlišením analytů.

V roce 1994 byl pro analýzu malých molekul přidán do porogenní směsi toluen [47]. Separace alkylbenzenů proběhla úspěšně, účinnost však nebyla srovnatelná s dělením těchto látek na konvenčních chromatografických kolonách. O dva roky později byly tyto kolony použity k separaci polymerů [48, 49].

V roce 1998 Moore a kol. z Beckmanova výzkumného institutu [50] separovali na monolitických kolonách obsahujících jako polymer směs styrenu, divinylbenzenu, 1-dodekanolu a toluenu směsi peptidů a proteinů. Křemenné kapiláry měly vnitřní průměr 150 μm . Separace byla prováděna metodou on-line LC-MS za použití gradientové eluce. Mobilní fáze obsahovala acetonitril (CH_3CN) a kyselinu trifluoroctovou (TFA).

V roce 1999 Horváth a kol. [58] představili chemicky modifikované monolitické kolony na bázi styrenu za účelem využití pro CEC a mikro-HPLC. N-oktylové řetězce a kvarterní amoniové skupiny byly navázány na povrch stacionární fáze. Tato procedura zahrnovala substituci styrenu vinylbenzyl-chloridem. Porogenními rozpouštědly byly v tomto případě *n*-propanol a formamid.

V roce 2000 skupina Premstallera, Oberachera a Hubera [45] představila řadu vynikajících aplikací založených na bázi polystyrenu. Porogelem byla v tomto případě směs tetrahydrofuranu a dekanolu. Díky této směsi vznikly mezopóry pro separaci a makropóry pro rychlou analýzu směsi. Separovali oligodeoxynukleotidy a fragmenty DNA na kapilárních monolitických kolonách pomocí iontově párové reverzní vysokoúčinné kapalínové chromatografie (IP-RP-HPLC). Monolitické kolony byly připraveny kopolymerizací styrenu a divinylbenzenu v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 200 μm . Byla použita gradientová eluce a mobilní fáze obsahovala 100 mM roztok triethyloctanu amonného v acetonitrilu. Detekce byla provedena „on line“ zapojeným hmotnostním detektorem s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). Separace

probíhala v poměrně krátkém čase a s vysokou účinností (190 000 teoretických pater na metr kolony).

O rok později byly monolitické kolony na stejné bázi použity v reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografii (RP-HPLC) pro separaci peptidů a proteinů jako jsou enzym kataláza, transferrin či membránové proteiny [59]. K detekci zde sloužil UV detektor, který pracoval při vlnové délce 214 nm a detektor ESI-MS. Byla použita gradientová eluce a mobilní fáze obsahovala CH₃CN a 0,05% TFA v H₂O.

Ve stejném roce Chirica a kol. [60] separovali na monolitických kolonách připravených in situ polymerizací styrenu a divinylbenzenu proteiny a peptidy. Tyto kolony byly použity pro separace jak v CEC, tak pro CLC. Směs proteinů obsahovala insulin, aprotinin, ribonukleázu A, lysozym, cytochrom c a myoglobin. Směs peptidů obsahovala Phe-Gly-Phe-Gly, Phe-Leu-Glu-Glu, Angiotensin I a Angiotensin II. Separace byly prováděny gradientovou elucí, kdy mobilní fáze A obsahovala 0,1% vodný roztok TFA a mobilní fáze B obsahovala 0,1% roztok TFA v CH₃CN. V obou případech byla použita UV detekce při 210 nm. Monolitické kolony byly připravovány v kapilárách o vnitřním průměru 250 μm.

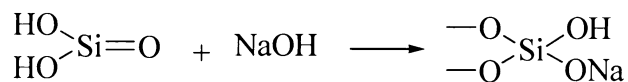
V roce 2002 vyvinul Huang a spol. [61] metodu postupné alkylace povrchu polystyrenových kolon oktadecylovými řetězci (C-18). Polymerizační směs se skládala z monomerů styrenu a divinylbenzenu a porogenní směsi 1-propanolu a formamidu. Za použití silného Friedel-Craftsova katalyzátoru, chloridu hlinitého a alkylhalogenidu v organickém rozpouštědle bylo dosaženo úspěšné alkylace monolitu jak v koloně z oceli, PEEKu (polyetheretherketon), tak i v křemenné kapiláře o vnitřních průměrech 75 a 125 μm. Tím vzniklo kvalitní separační médium pro chromatografické separace v obráceném módu. Z této práce vyplývá, že pro separace proteinů není nutné provádět alkylaci povrchu, neboť výsledky u nemodifikovaných kolon jsou srovnatelné s kolonami, jejichž příprava alkylaci zahrnovala. U separace peptidů na HPLC-ESI-MS došlo k úplnému rozdělení směsi až za použití takto chemicky modifikovaných kolon.

2.2.2 Příprava monolitických kolon na bázi styrenu

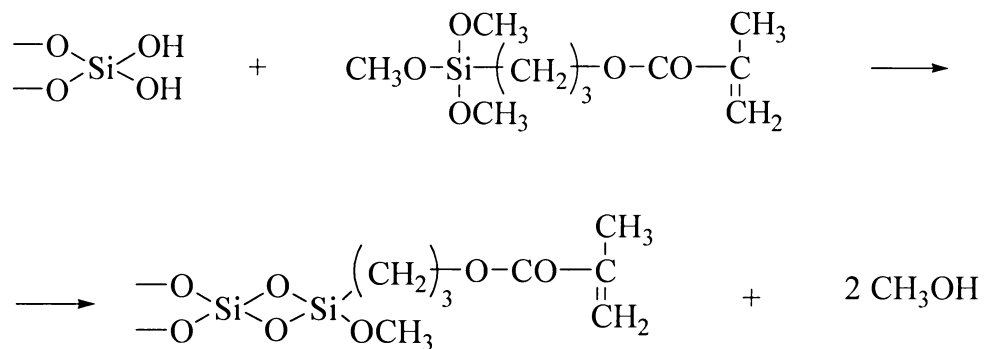
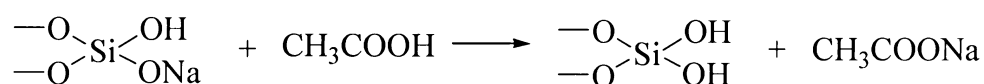
Již několik let se na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy pracuje na vývoji a optimalizaci monolitických kolon na bázi butyl-

methakrylátu. Díky dosažení kvalitních výsledků při separacích na těchto kolonách, se přistoupilo k vývoji dalších monolitických médií, a to monolitických kolon na bázi styrenu.

Velkou výhodou monolitických kolon obecně je jejich snadná příprava. Křemennou kapiláru lze použít přímo bez předchozí chemické modifikace vnitřního povrchu kapiláry. Tohoto postupu se především využívá při přípravě kolon pro CEC, kde není mobilní fáze hnána kapilárou tlakem, ale kde je využíváno elektroosmotického toku. Při přípravě kolon pro kapilární kapalinovou chromatografii je nutné zajistit pevné uchycení stacionární fáze k vnitřnímu povrchu kapiláry, aby nedošlo k jejímu následnému vytlačení tlakem mobilní fáze. Toto uchycení zprostředkovává kovalentní vazba mezi vnitřní stěnou kapiláry a monolitem. Proto se vnitřní stěna kapiláry nejprve aktivuje hydroxidem sodným, jak je znázorněno na **obr. 2.5**. Dochází tak k převedení siloxanových skupin povrchu kapiláry na skupiny silanolové, které jsou následně silanizovány, jak je vidět na **obr. 2.6**. Pro silanizaci monolitických kolon na bázi styrenu se využívá 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátu jako silanizačního činidla. Silanizace napomáhá dokonalejší přilnavosti monolitu k povrchu kapiláry, a tím zabraňuje vytlačení monolitu ven z kapiláry při vyšších tlacích mobilní fáze.

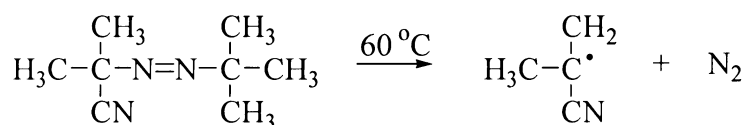


Obr. 2.5 Aktivace vnitřního povrchu křemenné kapiláry



Obr. 2.6 Silanizace vnitřní stěny křemenné kapiláry

Kapilára se naplní polymerizační směsí, která se skládá z monomerní a porogenní směsi. Připravená polymerizační směs obsahuje látku poskytující volné radikály, kterou je α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN) [23]. Tato látka zajišťuje stabilitu polymerizační směsi za laboratorní teploty a umožňuje jednodušší manipulaci, aniž by došlo k samovolnému spuštění polymerizace [62]. Vlastní radikálová polymerizace je spuštěna až působením zvýšené teploty jak je vidět na **obr. 2.7**, nebo UV zářením.



Obr. 2.7 Tvorba radikálů z AIBN za zvýšené teploty

2.3 Přehled studovaných peptidů

Stavebními jednotkami peptidů a proteinů jsou aminokyseliny [63]. Jedná se o organické látky obsahující karboxylovou a aminovou skupinu. Přestože se v živých organismech vyskytuje pouze dvacet různých aminokyselin, z nichž některé jsou esenciální, počet jejich variací je obrovský. Reakcí dvou aminokyselin, při níž reaguje α -aminoskupina jedné aminokyseliny s α -karboxylovou skupinou druhé, vzniká peptidová vazba. Touto vazbou lze spojit i více aminokyselinových zbytků. Jestliže není spojeno více než deset aminokyselin, mluvíme o oligopeptidech, při vyšším počtu se jedná o polypeptidy. Řetězce složené z více než sta aminokyselinových zbytků se nazývají proteiny (bílkoviny).

Peptidy jsou předmětem výzkumu především v bioanalytickém, biochemickém a lékařském výzkumu [64]. Řada z nich je biologicky aktivní a nejen v lidském těle vykonává speciální funkce. Peptidy mají vliv na biochemické a fyziologické děje v organismu a slouží jako přenašeče nervového vzruchu, hormony, toxiny či antibiotika. Tyto biologicky aktivní látky se stále více stávají vedle proteinů jednou z nejvíce

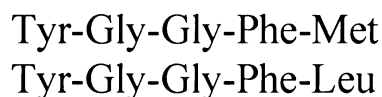
studovaných skupin sloučenin. Mnoho přípravků na bázi peptidů je klinicky využíváno a nespočet dalších je studován pro své potenciální léčebné účinky.

2.3.1 Enkefaliny a jejich deriváty

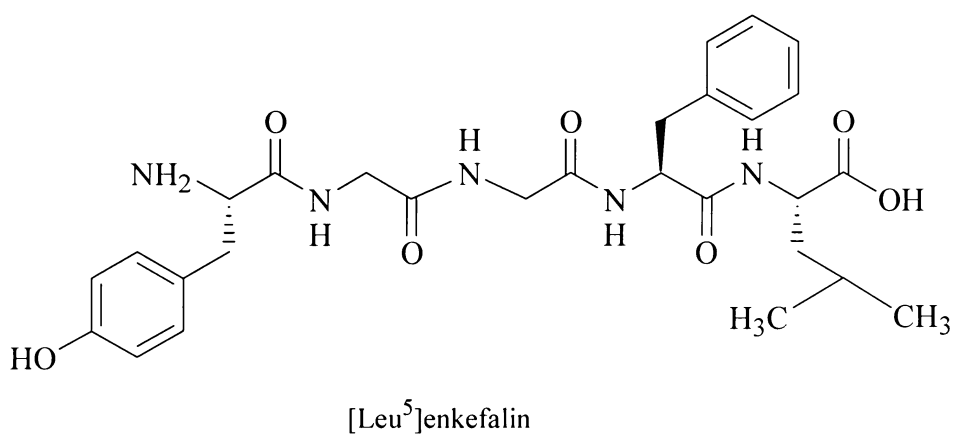
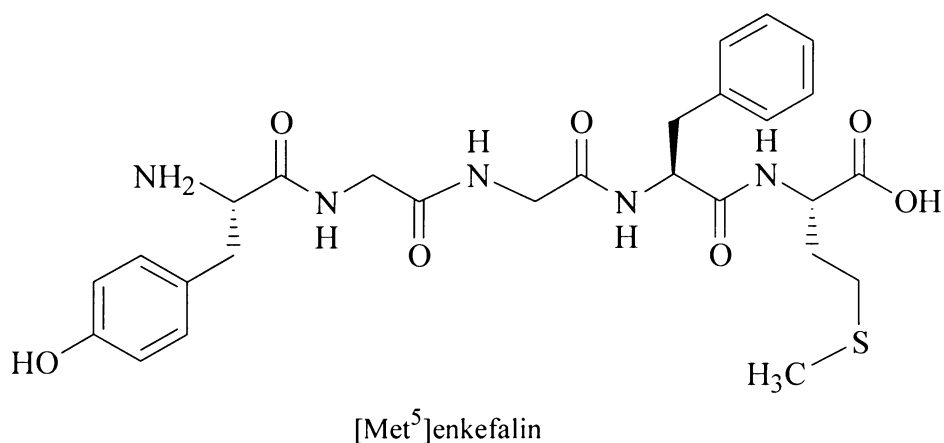
Do první skupiny studovaných peptidů patří deriváty enkefalinů. Jsou složeny z pěti či šesti aminokyselinových zbytků. Enkefaliny (pentapeptidy) patří do skupiny neurotransmiterů peptidové povahy. Uplatňují se jako přenašeči nervového vzruchu mezi nervovými buňkami. Mezi neurotransmitery patří např. acetylcholin, serotonin, dynorfin, endorfin a již zmiňovaný enkefalin [65].

Enkefaliny jsou známy jako „hormony štěstí“. Vznikají v emocionálně vypjatých situacích a účastní se při vzniku velmi pozitivních pocitů jako je pocit štěstí, při fyzické námaze nebo mlsání. Hrají důležitou úlohu při regulaci pocitu bolesti. Protože se v mozku váží na stejné receptory jako opiáty (morfium), je možné je využít jako náhražky opiátových drog. Jsou studovány ve spojení s duševními poruchami jako je Alzheimerova choroba nebo schizofrenie [64].

Enkefaliny jsou charakterizovány následujícím pořadím aminokyselin:



První se nazývá methionin-enkefalin ($[\text{Met}^5]$ enkefalin), druhým je leucin-enkefalin ($[\text{Leu}^5]$ enkefalin), lišící se pátým aminokyselinovým zbytkem. Jejich strukturní vzorce jsou uvedeny na **obr. 2.8**. Deriváty enkefalinů, studované na monolitických kolonách na bázi styrenu, se liší druhým aminokyselinovým zbytkem, kdy glycin je nahrazen D-alaninem v molekule $[\text{D-Ala}^2, \text{Leu}^5]$ enkefalinu a $[\text{D-Ala}^2, \text{Met}^5]$ enkefalinu či připojením šesté aminokyseliny u dynorfinu ($[\text{Leu}^5]$ enkefalin[Arg]) a dalarginu ($[\text{D-Ala}^2, \text{Leu}^5]$ enkefalin[Arg]).

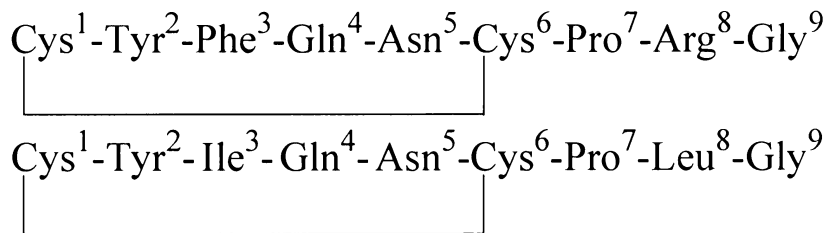


Obr. 2.8 Strukturální vzorce [Met⁵]enkefalinu a [Leu⁵]enkefalinu

2.3.2 Nonapeptidy

Studované nonapeptidy, vasopresin a oxytocin, patří do skupiny neurosekrečních hormonů [63]. Jsou produkovány z peptidových prekurzorů v hypotalamu. Jedná se o peptidy o devíti aminokyselinových zbytcích, které obsahují disulfidický můstek. Ačkoliv jsou tyto peptidy chemicky velice příbuzné, mají velmi odlišné fyziologické vlastnosti.

Nonapeptidy jsou charakterizovány následujícím pořadím aminokyselin:

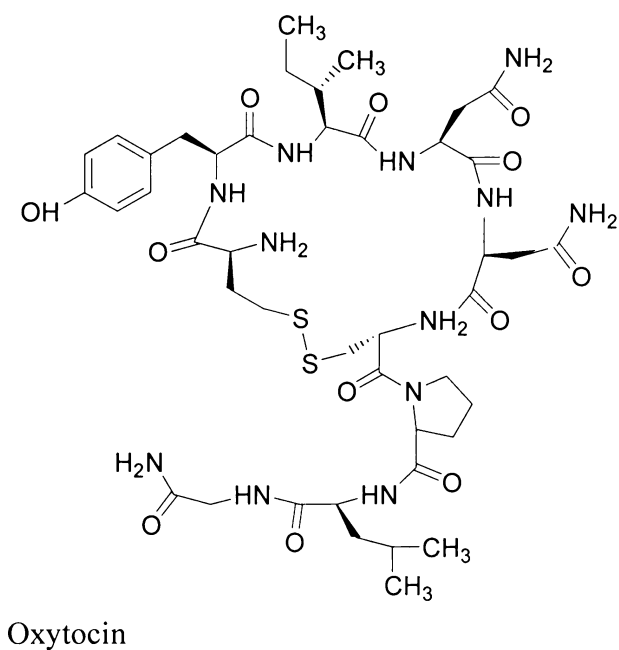
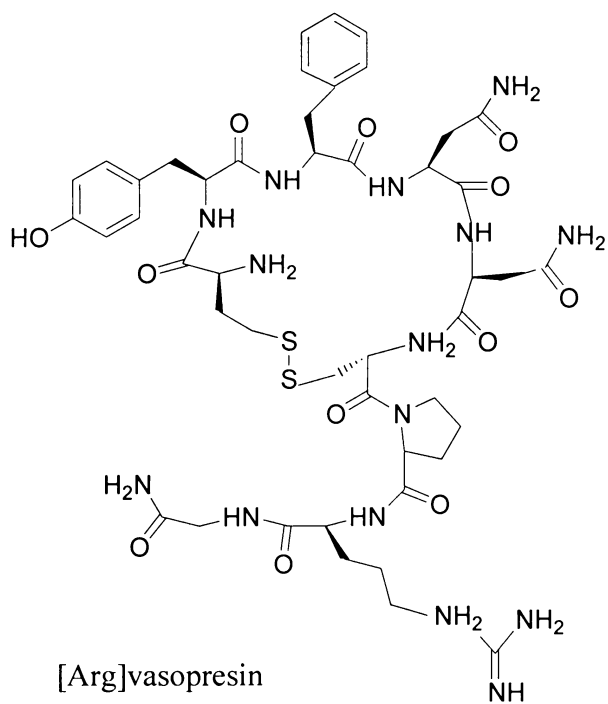


První se nazývá vasopresin, (přesněji řečeno [Arg]vasopresin), druhým je oxytocin. Jak je patrné z aminokyselinových sekvencí, liší se pouze v poloze 3 a 8. Oba mají mezi Cys v poloze 1 a 6 disulfidický můstek. Jejich struktury jsou zobrazeny na **obr. 2.9**.

Vasopresin je znám pod pojmem antidiuretický hormon (ADH) [63]. Podílí se na regulaci krevního tlaku a hraje důležitou roli v ledvinách. Brzdí diuresu, tzn. podporuje zpětnou resorpci vody, a tím zakoncentrování moči. Porucha tvorby vasopresinu vede k onemocnění diabetes insipidus (cukrovky žíznivky), při němž se vylučuje velké množství velmi zředěné moči. Injekcí hormonu se dají příznaky odstranit.

Oxytocin hraje důležitou roli při porodu (vyvolání porodních stahů) [63]. Působí na hladké svalstvo dělohy a podporuje její kontrakci. Dále má vliv na vylučování mateřského mléka.

Vasotocin ([Arg]vasotocin) patří mezi vývojové předky vasopresinu a oxytocinu [63]. Vyskytuje se místo vasopresinu a oxytocinu u plazů, obojživelníků a ryb.



Obr. 2.9 Strukturní vzorce [Arg]vasopresinu a oxytocinu

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Při přípravě monolitických kolon byly použity následující chemikálie o uvedené čistotě:

hydroxid sodný (p.a.), Lachema (Brno, Česká republika)

3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylát (γ -MAPS) (99%), Fluka (Buchs, Švýcarsko)

kyselina octová (99%), Fluka

α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN) (98%), Fluka

1,4-butandiol (99%), Fluka

1-propanol (99%), Fluka

ethylenglykoldimethakrylát (EDMA) (98%), Merck (Darmstadt, Německo)

butyl-methakrylát (99%), Merck

styren (pro syntézu), Merck

divinylbenzen (pro syntézu), Merck

1-dodekanol (pro syntézu), Merck

tetrahydrofuran (99%), Merck

Při testování monolitických kolon byly použity následující chemikálie o uvedené čistotě:

benzen 99%, Lachema (Brno, Česká republika)

anthracen (98%), Fluka (Buchs, Švýcarsko)

uracil (99%), Sigma (St. Louis, USA)

fenol (p.a.), Sigma

anilin (98%), Sigma

toluen (99%), Sigma

Aminokyseliny, peptidy, proteiny (99%), Sigma (St. Louis, USA):

Leu, Arg, Tyr, D,L-Ala-D,L-Ala; D,L-Ala-D,L-Ser; L-Ala-L-Ala; D-Ala-D-Ala; β -Ala-L-Ala; Gly-D,L-Ala; Ala-Ala-Ala, [Met⁵]enkefalin, [Leu⁵]enkefalin, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg], [Leu⁵]enkefalin[Arg], [Arg]vasopresin, [Arg]vasotocin, oxytocin, cytochrom c, myoglobin

Pro přípravu mobilních fází byly použity:

acetonitril - Chromasolv[®] pro HPLC, čistota gradient grade, Sigma

kyselina trifluoroctová (99%), Sigma

deionizovaná voda – Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)

3.2 Přístroje a materiál

Pro přípravu monolitických kapilárních kolon byla použita kapilára o vnitřním průměru 320 μm a vnějším průměru 450 μm s vnější vrstvou polyamidu vyrobená firmou Supelco (Bellefonte, USA).

Pro termostatování kapilár byla použita sušárna UL 400 od firmy Memmert (Schwabach, Německo). Při testování připravených monolitických kolon bylo použito čerpadlo mobilní fáze typu „syringe pump“ MHPP 20 od firmy Laboratorní přístroje (Praha, Česká republika). Lineární dávkovač mobilní fáze byl spojen s dávkovacím ventilem Valco C6W od firmy Valco Europe (Schenkon, Švýcarsko) s vnitřní dávkovací smyčkou o objemu 100 nl. Kapilární monolitická kolona byla připojena k dávkovacímu ventilu pomocí trubičky a šroubu s ferulkou, vše z polyetheretherketonu (PEEK). Pomocí převlečné teflonové trubičky byla k separační kapiláře připojena prázdná křemenná kapilára o vnitřním průměru 100 μm , vnějším průměru 375 μm a délce 6,5 cm k vypálenému detekčnímu okénku. K detekci byl použit UV detektor PU 4225 od firmy Philips (Eindhoven, Nizozemí).

Veškerá měření na monolitických kolonách byla prováděna za laboratorní teploty. Chromatogramy byly zaznamenány a vyhodnoceny počítačem pomocí programu Clarity od firmy DataApex (Praha, Česká republika). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel.

3.3 Příprava vzorků a mobilních fází

Testovací látky byly rozpuštěny v mobilní fázi o koncentracích uracil ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$), fenol ($2,0 \text{ mg ml}^{-1}$), anilin ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$), benzen ($2,0 \text{ mg ml}^{-1}$), toluen ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) a anthracen ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$).

Vzorky peptidů, proteinů a aminokyselin byly bez dalších úprav rozpuštěny v deionizované vodě, čímž byly získány zásobní roztoky o koncentracích 1 mg ml⁻¹ a 0,5 mg ml⁻¹. Z těchto zásobních roztoků byla připravena směs k analýze peptidů a také sada roztoků pro kvantifikaci vybraného peptidu. Vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C. Dávkování bylo prováděno 25 µl injekční stříkačkou od firmy Hamilton, USA.

Mobilní fáze obsahovala deionizovanou vodu a acetonitril jako organický modifikátor. V případě biologicky aktivních látek byla přidávána ještě kyselina trifluoroctová (TFA) jako iontově párové činidlo. Úprava pH mobilní fáze byla kontrolována pH metrem 3510 pH meter, Jenway (Velká Británie). Před použitím byla mobilní fáze filtrována přes membrány Nylon 66 o velikosti pórů 0,45 µm od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), a vždy odplyněna po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni Ultrasonic LC30H, Elma (Česká republika).

Veškerá vážení se prováděla na analytických vahách APX-100, Denver Instrument (USA).

3.4 Použité vztahy a vzorce

Základní veličinou charakterizující chromatografický systém a analyzovanou látku je retenční faktor k , který je dán výrazem:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (1)$$

kde t_R je retenční čas [min], t_M je mrtvý čas [min].

Selektivitu chromatografického systému udává separační faktor α daný vztahem:

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

kde t_{R_2} je retenční čas látky 2 a t_{R_1} je retenční čas látky 1.

Separací účinnost kolony je charakterizována počtem teoretických pater n a výškovým ekvivalentem teoretického patra H [mm]. Tyto veličiny umožňují porovnat účinnost kolon různých délek. Tyto veličiny jsou dány vztahy:

$$n_i = 16 \cdot \left(\frac{t_{R_i}}{w_b} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_{R_i}}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3)$$

kde w_b je šířka píku při základně [min], $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky [min].

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \cdot \left(\frac{w_b}{t_R} \right)^2 = \frac{L}{5,545} \cdot \left(\frac{w_{1/2}}{t_R} \right)^2 \quad (4)$$

kde L je délka separační kolony.

Rozlišení dvou separovaných látek $R_{1,2}$ je dáno rozdílnou vzdáleností těžišť elučních křivek, jak udává vztah:

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{b_1} + w_{b_2}} \quad (5)$$

Důležitou charakteristikou píku je asymetrický faktor A_F , který je definován:

$$A_F = \left(\frac{b_i}{a_i} \right)_{0,1} \quad (6)$$

kde hodnota a_i představuje vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky, b_i je pak vzdáleností mezi kolmicí z vrcholu píku a sestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky.

Při sestrovování a vyhodnocování kalibračních závislostí bylo využito následujících závislostí a vztahů:

Lineární závislostí dvou náhodných proměnných vznikají kalibrační křivky, v tomto případě jde o závislost analytického signálu a koncentrace analytu; závislost je vyjádřena obecným vztahem:

$$y = A_0 + A_1 x \quad (7)$$

kde A_0 je úsek (posunutí), A_1 je směrnice kalibrační křivky.

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max} \quad (8)$$

kde h_{\max} je maximální kolísání základní linie slepého pokusu v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro odezvu meze stanovení (LOQ) platí:

$$y_S = 10 \cdot h_{\max} \quad (9)$$

3.5 Postup přípravy styrenových monolitických kolon

Při přípravě kapilárních monolitických kolon na bázi styrenu byl zvolen identický postup jako u kolon butyl-methakrylátových.

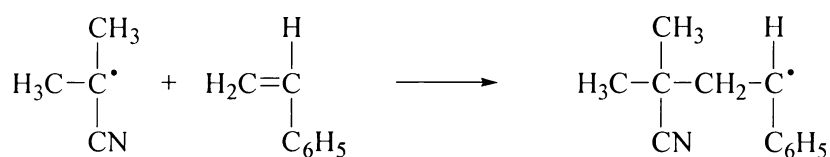
Příprava monolitické kolony o vnitřním průměru 320 μm byla následující:

1. aktivace vnitřního povrchu kapiláry-proplachováním roztokem 1M NaOH po dobu 6 hodin,
2. promytí kapiláry deionizovanou vodou po dobu 1 hodiny,
3. pokrytí povrchu kapiláry vinylovými skupinami pomocí silanizačního roztoku obsahujícího 40 μl γ -MAPS v 6 M CH_3COOH , konce kapiláry ponořeny do malého množství tohoto silanizačního roztoku v polypropylenových mikrozumavkách,
4. termostatování kapiláry na 60°C po dobu 20 hodin,
5. propláchnutí deionizovanou vodou po dobu 1 hodiny,
6. příprava polymerizační směsi,
7. ultrazvukování polymerizační směsi po dobu 10 minut,
8. profukování kapiláry a polymerizační směsi dusíkem po dobu 5 minut,
9. naplnění kapiláry polymerizační směsí,
10. termostatování kapiláry na 60°C po dobu 20 hodin,
11. odříznutí koncových částí a zkrácení kapiláry na požadovanou délku.

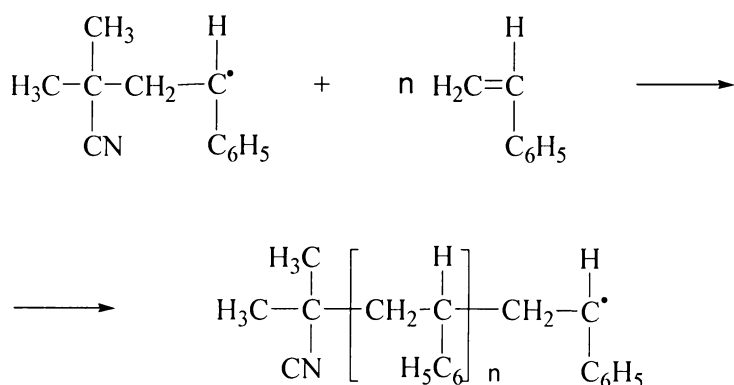
V průběhu polymerizace dochází ke smrštění polymeru, proto byla polymerizace prováděna ve stočené poloze a konce kapiláry byly ponořeny do polymerizační směsi v polypropylenových mikrozkušavkách [66]. Z mikrozkušavek s polymerizační směsí může dojít k vtažení malého objemu směsi do kapiláry během procesu polymerizace. Promývání kapilár bylo prováděno hydrodynamickým způsobem. Plnění kapilár bylo prováděno pouze způsobem gravitačním.

Složení polymerizační směsi bylo převzato z literatury [67]. Polymerizační směs se skládala z monomerní směsi (43 % hm.) a porogenní směsi (57 % hm.). Monomerní směs byla zastoupena styrenem jako funkčním monomerem a divinylbenzenem jako síťujícím monomerem. Jako primární zdroj radikálů byl použit AIBN. Složení monomerní směsi odpovídalo 21 % hm. styrenu, 21 % hm. divinylbenzenu a 1,0 % hm. AIBN. Porogenní směs se skládala z 49 % hm. 1-dodekanolu a 8 % hm. tetrahydrofuranu. Sled reakcí probíhajících během polymerizace je znázorněn na **obr. 3.1a, b, c**.

Iniciace polymerizace:

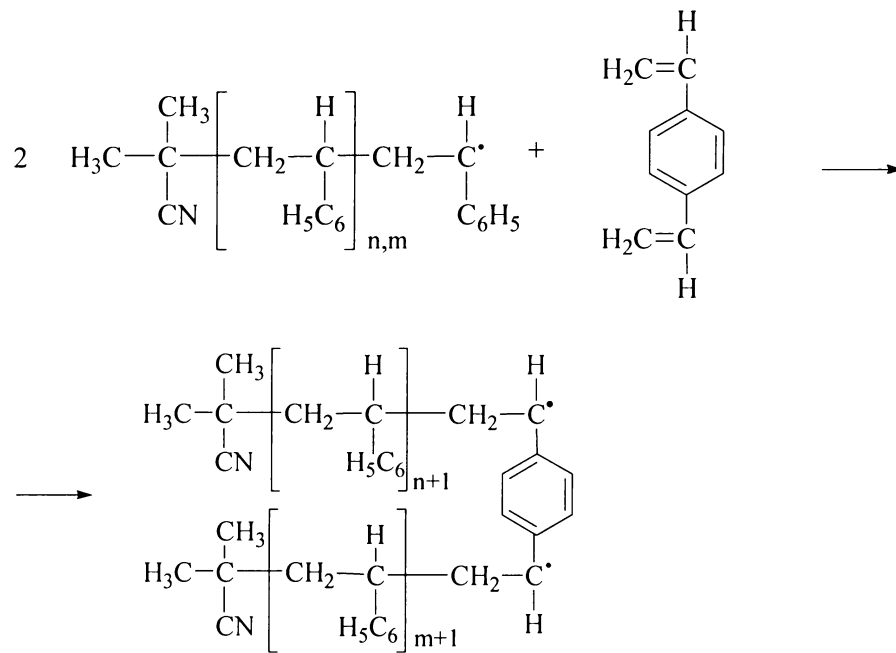


Propagace polymerizace:



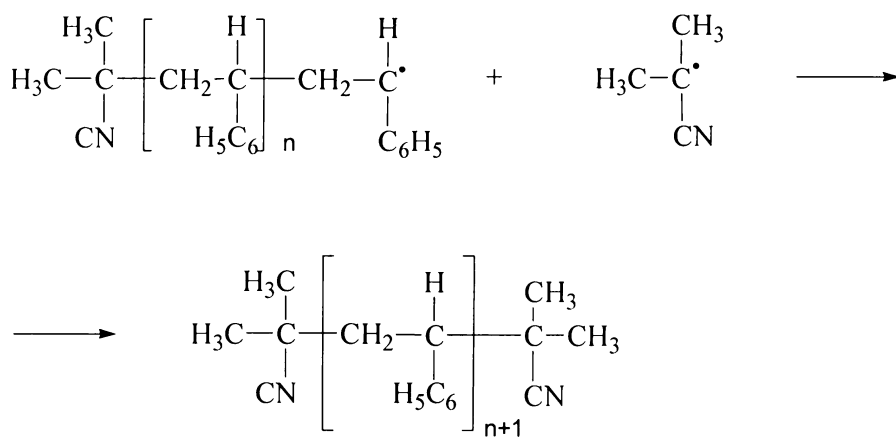
Obr. 3.1a Iniciace a propagace při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu

Síťování:



Obr. 3.1b Síťování při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu

Terminace polymerizace:



Obr. 3.1c Terminace při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Příprava monolitických kolon na bázi styrenu

Pro přípravu kapilárních monolitických kolon na bázi styrenu a divinylbenzenu byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 320 μm a délce 25 cm. Polymerizační směs se skládala ze 43 % hm. monomerní směsi a 57 % hm. porogenní směsi. Monomerní směs obsahovala 21 % hm. styrenu, 21 % hm. divinylbenzenu a 1,0 % hm. AIBN. Porogenní směs obsahovala 49 % hm. 1-dodekanolu a 8 % hm. tetrahydrofuranu.

Podmínky polymerizace byly nejprve voleny identické jako u butyl-methakrylátových kolon, které se zároveň shodovaly s postupem přípravy polystyrenových frit pro náplňové kolony [67]. Současně byla prováděna polymerizace v polypropylenových mikrozkuvkách a v kapiláře. Při vizuální kontrole polymerizační směsi v polypropylenových mikrozkuvkách byla zjištěna nehomogenost, což bylo potvrzeno i při promývání kapiláry, kdy došlo k vymytí monolitu. Dále nebylo možné kolonu testovat a bylo nutné přistoupit k modifikaci postupu.

Při procesu optimalizace přípravy styrenových monolitů byla nejdříve zvýšena teplota z 60 na 70 $^{\circ}\text{C}$. Po této modifikaci byla směs stále nehomogenní. V dalším kroku byla prodloužena doba polymerizace z 20 na 24 hodin. Kolony připravené dle modifikovaného postupu byly nejméně po dobu 24 hodin promývány mobilní fází za průtoku 1 $\mu\text{l min}^{-1}$. Ani za postupného zvýšení průtoku mobilní fáze na 4 $\mu\text{l min}^{-1}$ nedošlo k vymytí monolitu. Bylo možné přistoupit k testování takto připravených monolitických polystyrenových kolon.

4.2 Chování nízkomolekulárních látek na připravených kolonách

Pro testování syntetizovaných monolitických styrenových kolon byl zvolen jeden z chromatografických testů, Waltersův test, který byl již úspěšně použit pro testování kolon butyl-methakrylátových. Tento test se běžně používá pro určení základních charakteristik reverzních stacionárních fází. Jeho pomocí lze zjistit

hydrofobnost stacionární fáze, aktivitu silanolových skupin a účinnost kolony. V případě styrenových monolitických kolon bylo hlavním předmětem testování zjištění, zda se malé organické molekuly v připraveném monolitu zadržují a jaká je tedy míra hydrofobních interakcí tohoto materiálu. Aktivita silanolových skupin nebyla u polystyrenového materiálu samozřejmě určována, neboť polystyrenový monolit silanolové skupiny neobsahuje.

Pro zjištění míry hydrofobních interakcí byly použity testovací látky, kterými byl uracil, benzen, toluen a anthracen. Uracil se na kolonách s reverzní fází nezadržuje, proto se používá k určení mrtvého času. Z retenčních faktorů benzenu a anthracenu se vypočítá index hydrofobnosti. Retenční čas a šířka píku toluenu slouží k výpočtu účinnosti kolony.

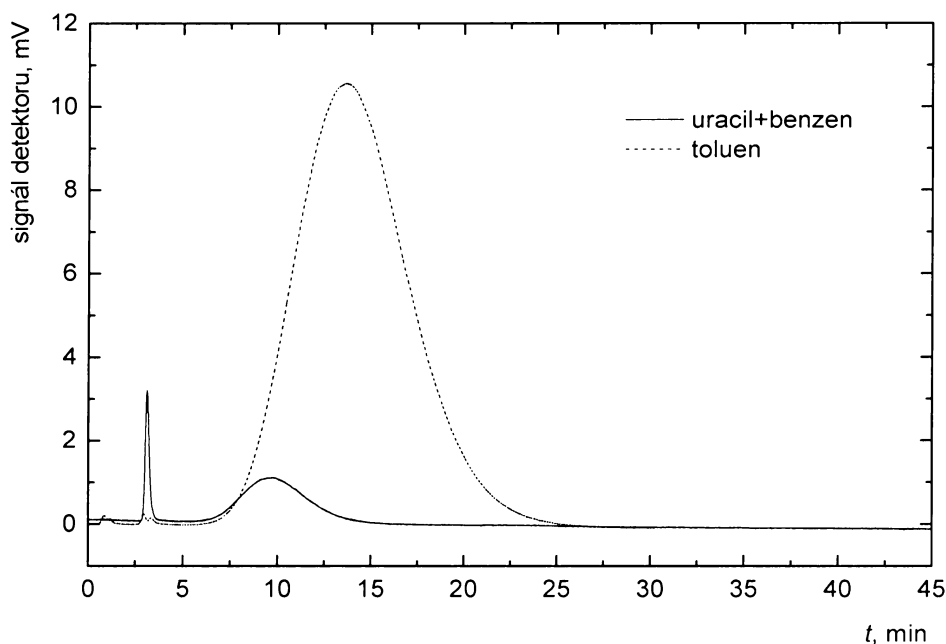
Waltersův test byl prováděn s mobilní fází o složení 65:35 % obj. CH₃CN:H₂O při průtokové rychlosti 4 μl min⁻¹ a s detekcí 214 nm. Postupně byly dávkovány všechny látky testovací směsi. Pro jednotlivé látky byl vypočten asymetrický faktor A_F a výškový ekvivalent teoretického patra H , které jsou shrnuty v **tab. 4.1**. U anthracenu byla dokonce afinita ke stacionární fázi natolik vysoká, že v průběhu 50 minut nebylo možno v důsledku silného rozmytí zaznamenat maximum nadávkované látky.

Tab. 4.1 Hodnoty retenčních časů t_R , výškových ekvivalentů teoretického patra H a asymetrických faktorů A_F pro látky z Waltersova testu; monolitická kolona o délce 21 cm; složení mobilní fáze 65:35 % obj. CH₃CN:H₂O; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

testovaná látka	t_R Min	H μm	A_F
uracil	3,26	206	1,31
benzen	10,54	5000	1,31
toluen	13,61	9090	1,38
anthracen	–	–	–

Z Waltersova testu vyplývá, že hydrofobnost připravených kapilárních monolitických kolon nelze přirovnat ke konvenčním náplňovým reverzním kolonám.

Ve směsi bylo možné rozdělit pouze polární (nezadržovanou) látku od značně rozmytých nepolárních, jak je patrné z **obr. 4.1**. Proto nebylo možné vypočítat index hydrofobnosti, a tím kolonu z hlediska hydrofobnosti charakterizovat. Výsledkem je, že na zhotovené kolony na bázi styrenu není možné jednoduše aplikovat Waltersův test pro reverzní stacionární fáze.



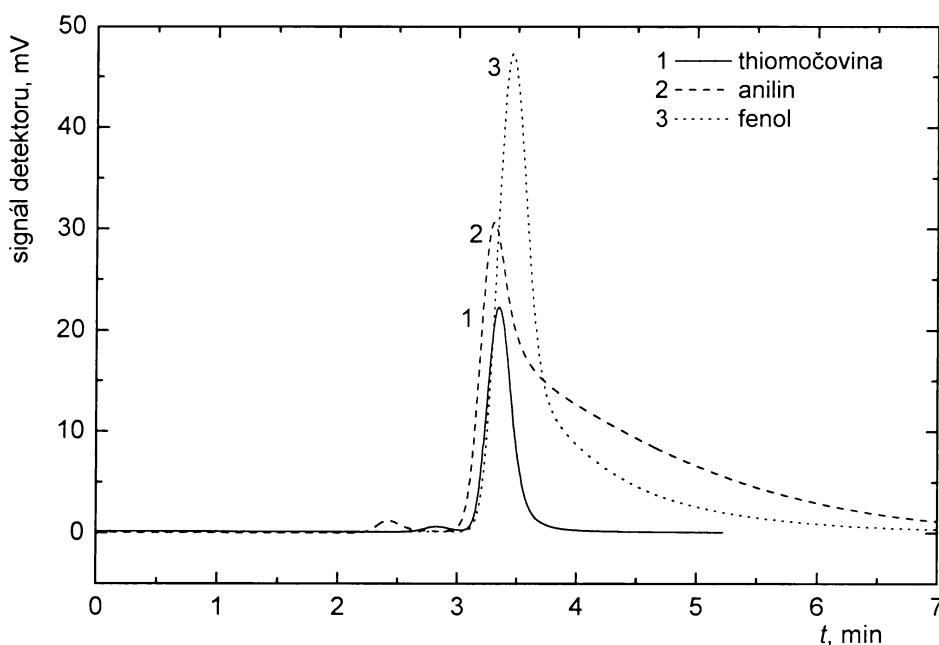
Obr. 4.1 Chromatogramy směsi uracilu s benzenem a toluenu; monolitická kolona o délce 21 cm; složení mobilní fáze 65:35 % obj. $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$; průtoková rychlost $4 \mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Z důvodu silné afinity nepolárních látek k připravenému monolitu a silnému rozmytí jejich píků bylo také sledováno retenční chování polárních látek.

Polárními látkami, jejichž chování bylo sledováno na syntetizované monolitické koloně na bázi styrenu, byly thiomocovina, fenol a anilin. Thiomocovina je reprezentantem látek, které se na reverzní koloně nezadržují. Slouží tedy jako značkovač mrtvého času. Fenol byl vybrán jako zástupce polárních látek kyselého a anilin bazického charakteru.

Nejprve byly testované látky jednotlivě dávkovány za použití stejné mobilní fáze jako u Waltersova testu, která se skládala z 65 % obj. acetonitrilu a 35 % obj. vody. Při

této mobilní fázi nedocházelo k zadržování látek, retenční časy fenolu a anilinu byly srovnatelné s mrtvým retenčním časem, charakterizovaným retenčním časem thiomčoviny. U fenolu a anilinu docházelo k výraznému rozmývání píku, jak je vidět na **obr. 4.2**. Snižování eluční síly mobilní fáze z 65 % CH₃CN obj. na 30 % obj. CH₃CN nevedlo k výraznému posunu v retenci zkoumaných látek, ale mělo rozhodující vliv na zhoršení symetrie píků jak je vidět v **tab. 4.2**. U anilinu byla již při 65% obj. CH₃CN hodnota asymetrického faktoru vyšší než deset, proto u této látky již dále vliv složení mobilní fáze nebyl sledován. Při 10 % obj. CH₃CN již nebylo možné vyhodnotit sledované parametry ani u fenolu. Vyšší zastoupení CH₃CN v mobilní fázi nebylo sledováno, protože snahou bylo zvýšit zadržení analytů na monolitu a byl předpokládán reverzní mód separace, kdy retence stoupá s klesajícím obsahem CH₃CN v mobilní fázi.



Obr. 4.2 Chromatogramy thiomčoviny, anilinu a fenolu; monolitická kolona o délce 21 cm; složení mobilní fáze 65:35 % obj. CH₃CN:H₂O; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Tab. 4.2 Přehled retenčních časů t_R , výškových ekvivalentů teoretických pater H a asymetrických faktorů A_F pro thiomocovinu a fenol v závislosti na obj. % CH_3CN v mobilní fázi; průtoková rychlost $4 \mu\text{l min}^{-1}$, dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm.

CH_3CN % obj.	H_2O % obj.	thiomocovina			fenol		
		t_R min	H Mm	A_F	t_R min	H μm	A_F
65	35	3,35	179	1,33	3,26	242	2,38
55	45	3,15	190	1,21	3,44	212	5,10
50	50	3,14	180	1,22	3,40	223	6,38
40	60	3,27	216	1,19	3,33	292	11,57
30	70	3,37	215	1,25	3,71	292	21,55
10	90	3,40	231	1,27	–	–	–

4.3 Vliv složení polymerizační směsi na retenci nízkomolekulárních látek na styrenovém monolitu

Zastoupením jednotlivých složek v porogenní směsi a obsahem porogenní směsi v celkové polymerizační směsi je možné ovlivnit velikost pórů monolitu, a tím měnit separační vlastnosti připravované stacionární fáze. Nejen porogenní směs je však odpovědná za porozitu výsledného monolitu. Mezi další významné parametry, kterými můžeme porozitu ovlivnit, patří teplota polymerizace a obsah síťovacího monomeru. V další fázi procesu optimalizace byl tedy zkoumán vliv zastoupení jednotlivých složek polymerizační směsi na chromatografické chování nízkomolekulárních látek.

Byly připraveny kolony A, B, C, D o délce 21 cm, jejichž složení polymerizační směsi je uvedeno v **tab. 4.3**. Při přípravě kolony A se vycházelo z publikovaného složení polymerizační směsi, která byla použita pro výrobu koncových frit pro náplňové kolony [67]. Tato směs byla již použita při přípravě kolon pro předchozí experimenty. U kolon B, C a D se měnilo procentuální zastoupení jednotlivých složek monomerní či

porogenní směsi. Procentuální zastoupení AIBN v monomerní směsi bylo u všech připravovaných kolon rovno 1 % hm.

Tab 4.3 Přehled složení polymerizačních směsí u jednotlivých připravených kolon

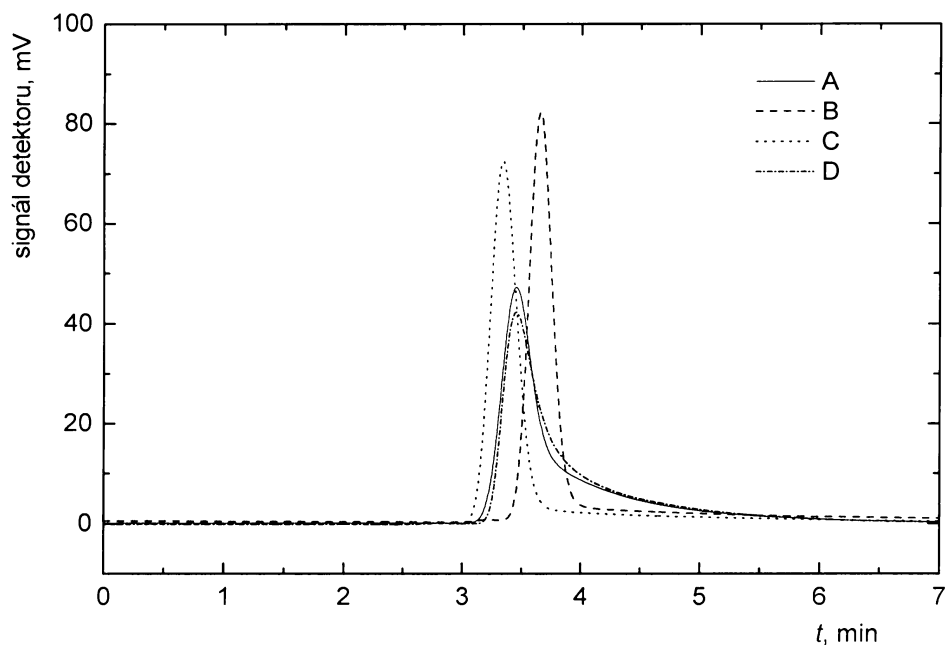
kolona	styren % obj.	divinylbenzen % obj.	dodekanol % obj.	tetrahydrofuran % obj.
A	21	21	49	8
B	16	26	49	8
C	21	21	51	6
D	21	21	47	10

Testovacími látkami byly v tomto případě thiomočovina jako značkováč mrtvého času, fenol jako zástupce polárních a toluen jako zástupce nepolárních látek.

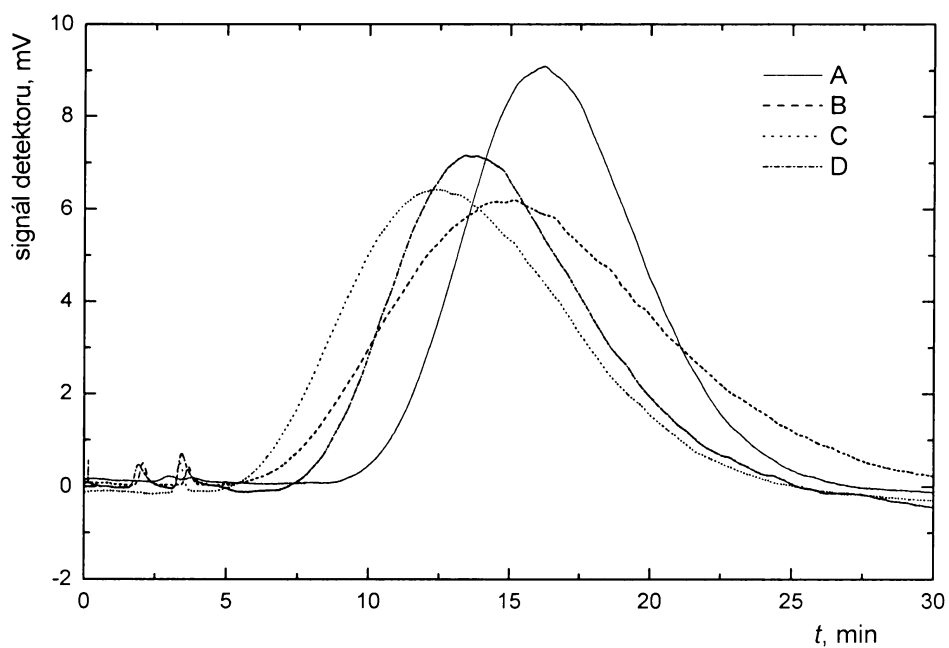
Nejprve byla testována kolona A. Tato kolona poskytovala relativně symetrické píky u thiomočoviny a toluenu ($A_F = 1,3$). Pík toluenu byl sice symetrický, ale velmi široký, šířka píku při základně byla rovna 15 minutám. U fenolu docházelo k rozmývání, což potvrzuje hodnota asymetrického faktoru 2,4. Další kolony byly vždy porovnávány s parametry výchozí kolony A.

Se zvýšením procentuálního zastoupení síťujícího monomeru, divinylbenzenu, ve směsi (kolona B) došlo ke zlepšení symetrie píku u thiomočoviny a fenolu, u toluenu ovšem docházelo ještě k výraznějšímu rozmytí píku a zároveň ke zvýšení hodnoty asymetrického faktoru. Při zvýšení procentuálního zastoupení jednoho z porogenních rozpouštědel, 1-dodekanolu, ve směsi (kolona C) bylo možné pozorovat stejné změny jako u kolony B. U kolony D, kde byl snížen procentuální obsah 1-dodekanolu za současného zvýšení obsahu tetrahydrofuranu, bylo pozorováno zhoršení symetrie a rozmytí nejen u zástupců polárních a nepolárních látek, ale také u thiomočoviny, která charakterizovala mrtvý čas kolony. Chromatogramy fenolu a toluenu na kolonách A, B, C a D jsou uvedeny na **obr. 4.3a, b**.

Změny v procentuálním zastoupení složek monomerní či porogenní směsi neměly výrazný vliv na retenci jednotlivých analytů. Ani u jedné z kolon nedošlo k zadržení fenolu, jeho retenční čas se prakticky shodoval s retenčním časem thiomočoviny. U toluenu nelze mluvit o prodloužení či zkrácení retence, neboť maximum píku není ostré a šířka píku při základně se pohybovala v desítkách minut.



Obr. 4.3a Chromatogramy fenolu na monolitických kolonách A, B, C a D o délce 21 cm; složení mobilní fáze 65:35 % obj. $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$; průtoková rychlost $4 \mu\text{l min}^{-1}$, dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm



Obr. 4.3b Chromatogramy toluenu na monolitických kolonách A, B, C a D o délce 21 cm; složení mobilní fáze 65:35 % obj. $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$; průtoková rychlost $4 \mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Námi připravené kapilární monolitické kolony na bázi styrenu nejsou použitelné pro separace nízkomolekulárních látek. Vzhledem k tomu, že nízkomolekulární látky měly být nástrojem pro alespoň částečné objasnění mechanismu separace na těchto kolonách a nikoliv zkoumaným analytem, nepřistoupilo se k úpravám povrchu monolitu. Chemické modifikace pomocí alkylace by pravděpodobně kladně ovlivnily separace v důsledku zvýšení možnosti interakce mezi separačním médiem a zkoumanou látkou [61].

4.4 Chování vysokomolekulárních látek na připravených monolitických kolonách

Na monolitických kolonách na bázi styrenu byly po ukončení experimentů s nízkomolekulárními látkami uskutečněny pokusy o dělení vysokomolekulárních látek. Byly vybrány peptidy s různě dlouhým peptidovým řetězcem, tj. dipeptidy, tripeptidy, pentapeptidy a hexapeptidy. Seznam studovaných peptidů je uveden v experimentální části na str. 24.

Veškerá měření probíhala při vlnové délce 214 nm. Byly vyzkoušeny také vlnové délky 214, 254 a 280 nm, ale látky byly detegovatelné pouze při vlnové délce 214 nm.

Při hledání vhodné mobilní fáze pro separace peptidů se vycházelo z publikací, kde byla pro separace proteinů a peptidů na styren-divinylbenzenovém monolitu použita mobilní fáze skládající se z acetonitrilu (CH_3CN) a vodného roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) [60, 50, 59]. Z technických důvodů nebylo možné pracovat s gradientovou elucí, proto byly používány jednotlivé mobilní fáze se snižující se eluční silou. Přehled mobilních fází na koloně A je uveden v **tab 4.4**.

Nejprve byla na monolitické koloně A (délka 21 cm) použita mobilní fáze skládající se z CH_3CN a 0,05 % obj. TFA. Zastoupení CH_3CN se měnilo v rozmezí 50 až 20 % obj. Při použití těchto podmínek veškeré studované peptidy eluovaly v mrtvém čase, jelikož eluční síla mobilních fází byla příliš velká. Při použití mobilní fáze o složení 10:89,95:0,05 % obj. $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ došlo k zadržení pentapeptidů i hexapeptidů. Žádný z dipeptidů ani tripeptid se na koloně zadržet nepodařilo.

Dále byla vyzkoušena mobilní fáze o následujícím složení: 5:94,95:0,05 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. Při použití této mobilní fáze došlo k prodloužení retence a zároveň k výraznému rozmytí pentapeptidů a hexapeptidů. Ani při takto nízkém procentuálním obsahu organického modifikátoru nedošlo k zadržení žádného z dipeptidů ani tripeptidu na koloně. Vzhledem k tomu, že se v žádné doposud testované mobilní fázi nepodařilo na koloně zadržet dipeptidy ani tripeptid, nebyly tyto látky již dále studovány a pozornost se zaměřila na optimalizaci podmínek separace pentapeptidů a hexapeptidů.

Jako nejvhodnější se jevila poslední testovaná mobilní fáze o následujícím složení: 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. V této mobilní fázi se prodloužila retence pentapeptidů a hexapeptidů a zároveň byla zachována dostatečná účinnost separace zkoumaných peptidů.

Tab. 4.4 Přehled mobilních fází použitých pro separace derivátů enkefalinů; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹, dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

CH ₃ CN obj. %	H ₂ O obj. %	TFA obj. %	chromatografické chování peptidů
50	49,95	0,05	eluce látek v mrtvém čase
40	59,95	0,05	eluce látek v mrtvém čase
30	69,95	0,05	eluce látek v mrtvém čase
20	79,95	0,05	eluce látek v mrtvém čase
10	89,95	0,05	zadržení enkefalinů
5	94,95	0,05	prodloužení retence a snížení účinnosti separace
10	89,90	0,10	prodloužení retence za současného zachování dostatečné účinnosti separace

4.4.1 Určení optimální průtokové rychlosti pro separace derivátů enkefalinů

Před dalšími experimenty, týkajícími se separace peptidů, byla zjišťována optimální průtoková rychlost mobilní fáze pro kolonu A. Při manipulaci s kolonou došlo k jejímu ulomení a kolona byla z původní délky 21 cm zkrácena na 19,5 cm. Analyty byly zastoupeny uracilem, [D-Ala², Leu⁵]enkefalinem (pentapeptid) a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] (hexapeptid), což jsou zároveň jednotlivé složky směsi, jejíž separace byla později optimalizována. Při proměřování van Deemterovy křivky byla měněna průtoková rychlost mobilní fáze v rozmezí 1 – 5 $\mu\text{l min}^{-1}$. Měření každé průtokové rychlosti bylo provedeno alespoň třikrát za následujících experimentálních podmínek. Složení mobilní fáze bylo následující: 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA, UV detekce při vlnové délce 214 nm, dávkováno 100 nl vzorku v deionizované vodě.

Pro sestrojení van Deemterovy křivky bylo nutno vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra pro jednotlivé průtokové rychlosti. Výškový ekvivalent teoretického patra H byl počítán z hodnoty počtu teoretických pater, n , vypočítané z hodnoty šířky píku v polovině jeho výšky, jak je patrné ze vzorce (4) na str. 27.

Při chromatografickém procesu mají nezávisle na sobě na rozšíření zóny analytu vliv tři faktory: A – vířivá (turbulentní) difúze, B – podélná (molekulová) difúze a C – odpor proti převodu hmoty. Odpor proti převodu hmoty C je vhodnější vyjádřit jako součet dvou příspěvků: C_S – odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi a C_M – odpor proti převodu hmoty ve fázi mobilní.

Rozšíření zóny vlivem vířivé difúze je způsobeno odlišnými vzdálenostmi, které různé molekuly urazí ve stacionární. Je tedy úměrné pobytu látky v koloně a závislé na velikosti částic náplně kolony.

Vliv podélné molekulové difúze je způsoben pohybem molekul z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci, který má za následek rozmývání píků separovaných látek.

Odpor proti převodu hmoty zahrnuje transportní děje solutu v mobilní C_M a stacionární C_S fázi.

Vliv všech těchto faktorů na rozšíření zóny se odráží v hodnotě výškového ekvivalentu teoretického patra a tato závislost je vyjádřena van Deemterovou rovnicí (10):

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_M + C_S) \cdot u \quad (10)$$

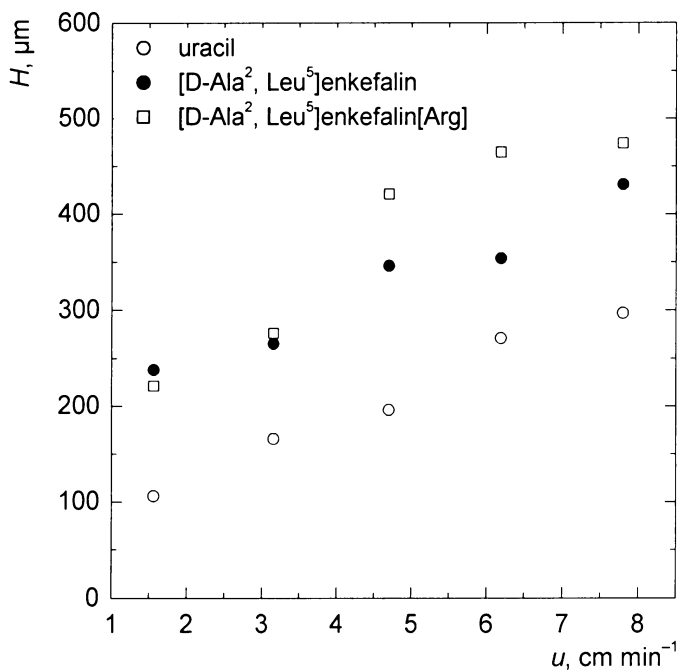
kde u je lineární průtoková rychlost mobilní fáze a je charakterizována vzorcem (11):

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (11)$$

kde L je délka kolony a t_M je mrtvý retenční čas.

V případě kapilárních kolon, které nejsou plněny částicemi stacionární fáze, odpadají problémy s nepravidelným naplněním kolony a s nestejnorodostí částic stacionární fáze. Proto je v jejich případě popis turbulentní difúze a odporu proti převodu hmoty jednodušší a jejich příspěvek k rozmytí zóny analytu nižší než u kolon náplňových.

Z obr. 4.4, znázorňujícího naměřené van Deemterovy křivky, byla jako nejvhodnější průtoková rychlost pro separaci enkefalinů vybrána rychlost $4 \mu\text{l min}^{-1}$ odpovídající lineární rychlosti $6,2 \text{ cm min}^{-1}$. Tato průtoková rychlost byla zvolena jako kompromis mezi snahou o co nejkratší dobu analýzy a co největší účinnost kolony, tzn. o co nejnižší výškový ekvivalent teoretického patra.



Obr. 4.4 Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na průtokové rychlosti mobilní fáze u vynesena pro uracil, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg], kolona A o délce 19,5 cm, složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Při zvolené průtokové rychlosti 4 μ l min⁻¹ byl výškový ekvivalent teoretického patra pro uracil roven 271 μ m, pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin 354 μ m a pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] 465 μ m.

Snížením průtokové rychlosti na hodnotu 3 μ l min⁻¹ došlo k prodloužení časů o zhruba 30% a snížení výškového ekvivalentu teoretického patra o 75 μ m pro uracil, o 8 μ m pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin a 44 μ m pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]. Zlepšení výškového ekvivalentu teoretického pro nejdéle eluující analyt bylo pouze 2 %.

4.4.2 Závislost separace derivátů enkefalinů na pH vodné složky mobilní fáze

U směsi skládající se z uracilu, [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] byl sledován vliv pH vodné složky mobilní fáze na jejich separaci. Mobilní fáze byla vždy tvořena směsným roztokem acetonitrilu a vody a její pH se

měnilo v závislosti na množství přidaného iontově párového činidla, v tomto případě kyseliny trifluoroctové (TFA).

Nejprve byla testována mobilní fáze o pH rovném 2,4, což odpovídalo složení 10:89,95:0,05 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. Uracil, značící mrtvý retenční čas, byl vymýván v čase 3,24 min, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] v čase 3,93 min [D-Ala², Leu⁵]enkefalin v retenčním čase 4,77 min.

Jako další byla zkoumána mobilní fáze o pH rovném 2,0, což odpovídalo složení 10:89,90:0,1 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. Uracil, značící mrtvý retenční čas, byl vymýván v čase 3,21 min, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] v čase 4,24 min a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin v retenčním čase 5,13 min. Snížením hodnoty pH mobilní fáze, která obsahovala vyšší procento iontově párového činidla, došlo k prodloužení retenčních časů.

Jako poslední byla testována mobilní fáze o pH rovném 1,7, což odpovídalo složení 10:89,80:0,2 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. Uracil, značící mrtvý retenční čas, byl vymýván v čase 3,16 min, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] v čase 5,03 min a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin v retenčním čase 6,12 min.

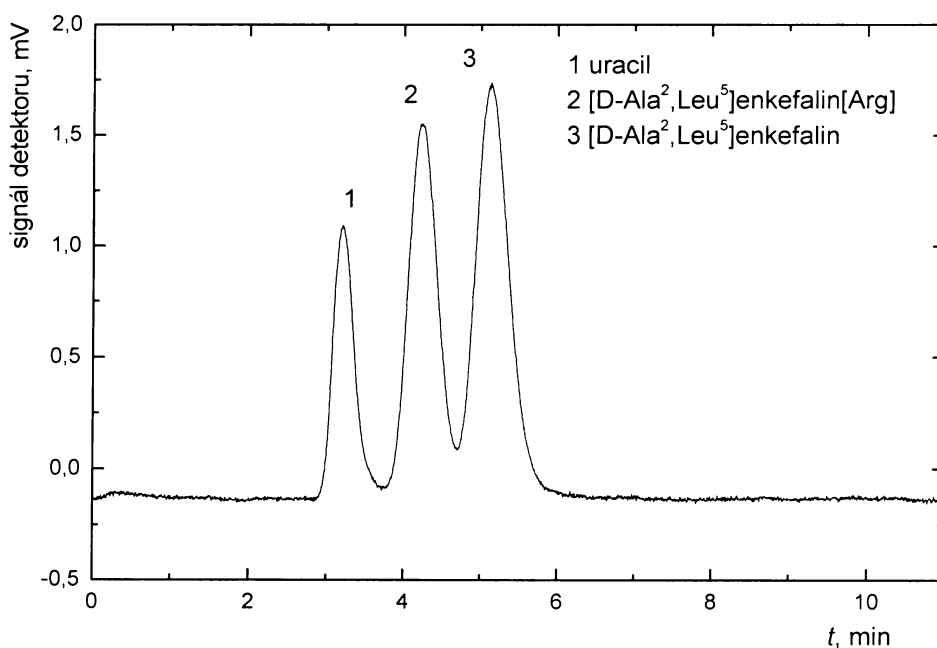
Ze získaných chromatogramů byly pro jednotlivé analyty vypočteny hodnoty retenčních faktorů k , rozlišení R a asymetrických faktorů A_F , jejichž hodnoty jsou uvedeny v **tab. 4.5**. Z této tabulky je zřejmé, že se zvyšujícím se obsahem TFA v mobilní fázi dochází k prodlužování retence hexa- i pentapeptidu. Výrazná pozitivní vliv rostoucího množství TFA byl zaznamenán u rozlišení hexapeptidu. Naopak nebylo pozorováno výrazné ovlivnění rozlišení pentapeptidu a asymetrických faktorů penta- a hexapeptidu měnícím se s obsahem TFA v mobilní fázi.

Tab. 4.5 Hodnoty retenčních faktorů, rozlišení a asymetrických faktorů pro [D-Ala², Leu⁵]-enkefalin-Arg a [D-Ala², Leu⁵]-enkefalin v závislosti na obj. % TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹, dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Obj. % TFA	[D-Ala ² , Leu ⁵]-enkefalin-Arg			[D-Ala ² , Leu ⁵]-enkefalin		
	k	R	A_F	k	R	A_F
0,05	0,22	1,18	1,21	0,47	1,14	1,29
0,10	0,32	1,65	1,36	0,60	1,16	1,19
0,20	0,58	2,01	1,34	0,89	1,18	1,27

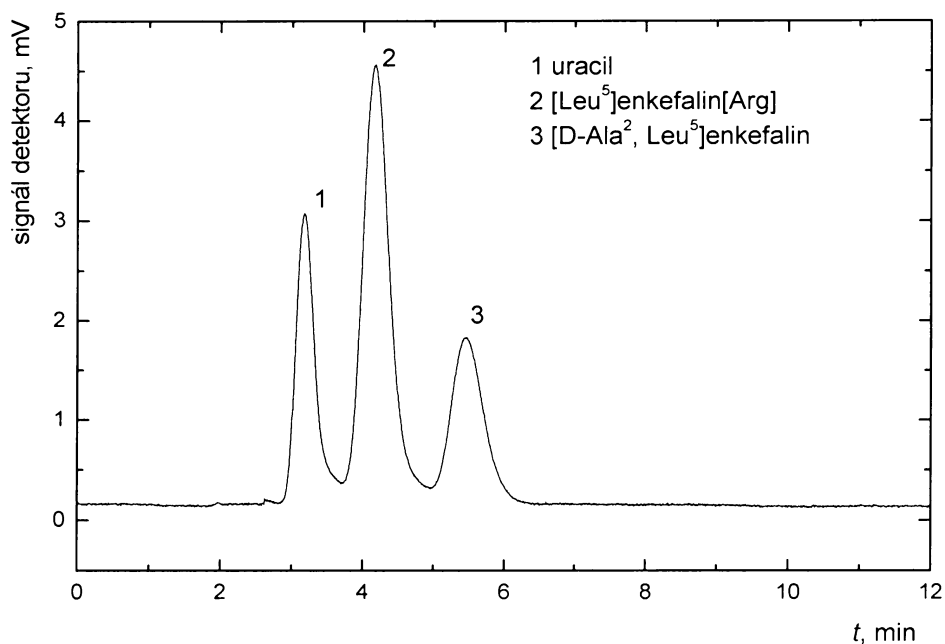
Při použití mobilní fáze o pH rovném 2,00 (0,10 % obj. TFA v mobilní fázi) bylo dosaženo uspokojivých výsledků separace. Rozlišení [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] od uracilu bylo 1,65, což je dostačující rozlišení zaručující oddělení až na základní linii. Mezi hexapeptidem a pentapeptidem bylo vypočítáno rozlišení rovné 1,16.

Jako optimalizovaná byla pro separaci derivátů enkefalinů zvolena mobilní fáze o následujícím složení 10:89,90:0,1 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA, která odpovídala pH 2. Separaci za těchto podmínek ilustruje **obr. 4.5**.



Obr. 4.5 Separace směsi uracilu, [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu a [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] na koloně A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Další směs, která byla separována, obsahovala uracil, [D-Ala², Leu⁵]enkefalin a [Leu⁵]enkefalin[Arg]. Narozdíl od předešlé směsi bylo dosaženo separace na základní linii jak mezi uracilem a [Leu⁵]enkefalin[Arg], tak mezi [Leu⁵]enkefalin[Arg] a [D-Ala², Leu⁵]enkefalinem, jak je vidět na **obr. 4.6**. Pro lepší vyhodnocení parametrů píku [Leu⁵]enkefalin[Arg] byla tato směs použita pro proměření opakovatelnosti separace.



Obr. 4.6 Separace směsi uracilu, [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu a [Leu⁵]enkefalin[Arg] na koloně A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Opakovatelnost separace byla vyhodnocována pro Leu-enkefalin-Arg. Z údajů získaných pro 11 analýz byly vypočteny průměrné relativní směrodatné odchylky plochy píků, výšky píků, retenčních faktorů a retenčních časů, které jsou uvedeny v **tab. 4.6**.

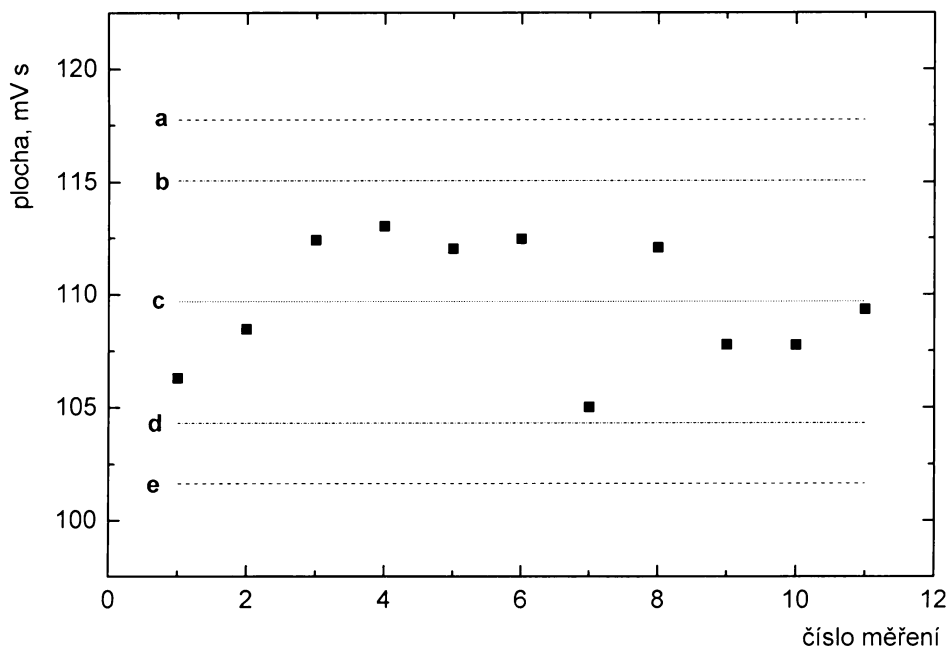
Tab. 4.6 Hodnoty průměrné relativní směrodatné odchylky pro plochu píku, výšku píku, retenční faktor a retenční čas na monolitické koloně A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

	plocha píku	výška píku	<i>k</i>	<i>t_R</i>
	mV s	mV		min
<i>RSD</i> , %	2,45	2,04	1,84	0,94

Z **tab. 4.6** vyplývá, že pro všechny sledované parametry relativní směrodatná odchylka (*RSD*) nižší než 3 %. To znamená velmi dobrou opakovatelnost separace na připravených monolitických kolonách.

Jako nástroj grafického znázornění opakovatelnosti byl vybrán regulační diagram, používaný pro sběr dat v určitém časové úseku. Z tohoto grafického znázornění je možné posoudit, zda je variabilita parametru způsobena náhodným kolísáním, či má speciální příčinu (např. vzrůst teploty v průběhu dne). V dopoledních hodinách bylo změřeno 5 po sobě jdoucích analýz, mezi kterými byly desetiminutové intervaly. V odpoledních hodinách bylo provedeno dalších 6 analýz za stejných podmínek. Analýzy byly prováděny v průběhu dne, protože kapiláru nebylo možno termostatovat a bylo nutné vyloučit vliv teploty na separaci během dne. Data z analýz byla vyhodnocena a zpracována do regulačních diagramů. Jako zástupce grafického znázornění opakovatelnosti byl zvolen regulační diagram, jehož sledovanou hodnotou byla plocha píku jak je vidět na **obr. 4.7**. Tento parametr byl zvolen právě proto, že vykazoval největší variabilitu hodnot (největší relativní směrodatnou odchylku).

Horní a dolní varovné a kritické meze (UWL/LWL a UCL/LCL) se především využívají při vyhodnocování postupně získávaných informací o jakosti velkého množství po sobě jdoucích analýz. V tomto případě byla pozornost zaměřena především na rozložení hodnot okolo průměru s tím, zda jednotlivé hodnoty nevytváří nějaký trend.



Obr. 4.7 Opakovatelnost plochy píku [Leu⁵]enkefalin[Arg] znázorněna pomocí regulačního diagramu

- | | |
|--|--|
| ■ = vnesená hodnota | c = průměr vnesených hodnot |
| a = UCL horní kritická mez | d = LWL dolní varovná mez |
| b = UWL horní varovná mez | e = LCL dolní kritická mez |

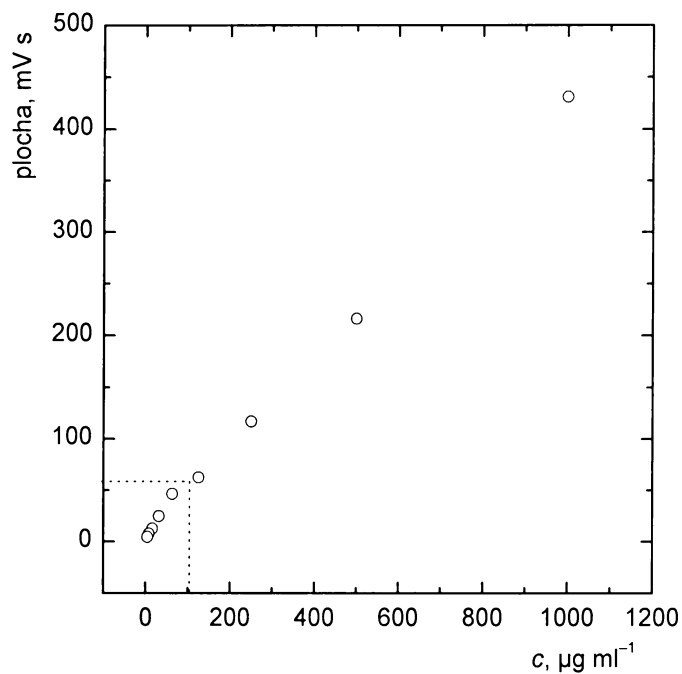
Z regulačních diagramů sestavených z hodnot ploch píků, výšek píků, retenčního faktoru a retenčního času [Leu⁵]enkefalin[Arg] nebyl patrný žádný pozorovatelný trend. Rozdíly při jednotlivých měřeních jsou pravděpodobně způsobeny náhodnými chybami.

4.5 Kvantifikace pentapeptidu a hexapeptidu

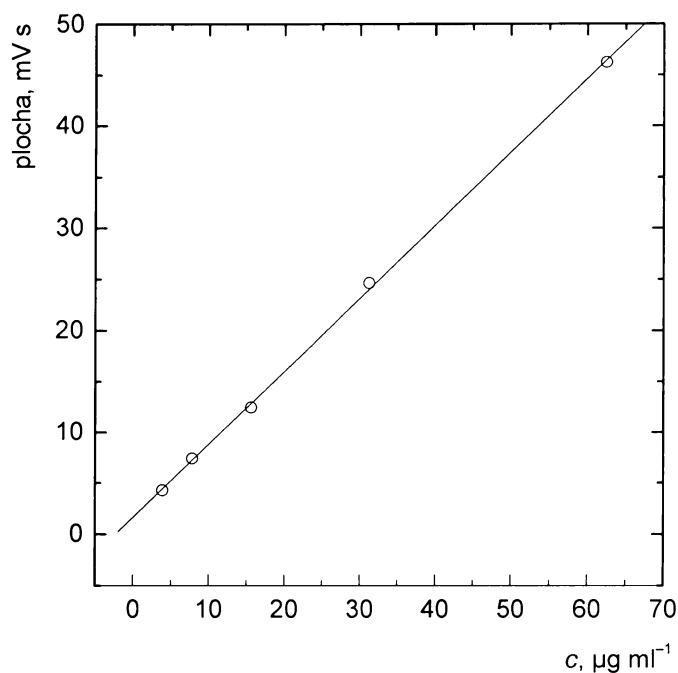
V optimalizované mobilní fázi o složení 10:89,90:0,1 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA byla na koloně A studována kvantifikace vybraných peptidů.

Prvním peptidem, u kterého byla kvantifikace prováděna, byl [D-Ala², Leu⁵]enkefalin. Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu byla proměřena v koncentračním rozmezí 3,906 – 1000 µg·ml⁻¹, což odpovídá molární koncentraci 6,856 – 1755 µmol·dm⁻³. Na **obr. 4.8** je znázorněn průběh kalibrační závislosti plochy píku [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu na koncentraci analytu. **Obr. 4.9** představuje lineární

úsek kalibrační závislosti (výřez z obr. 4.8). Parametry normální i logaritmické formy kalibrační křivky vyhodnocené z ploch píků jsou uvedeny v **tab. 4.7**



Obr. 4.8 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 µl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm



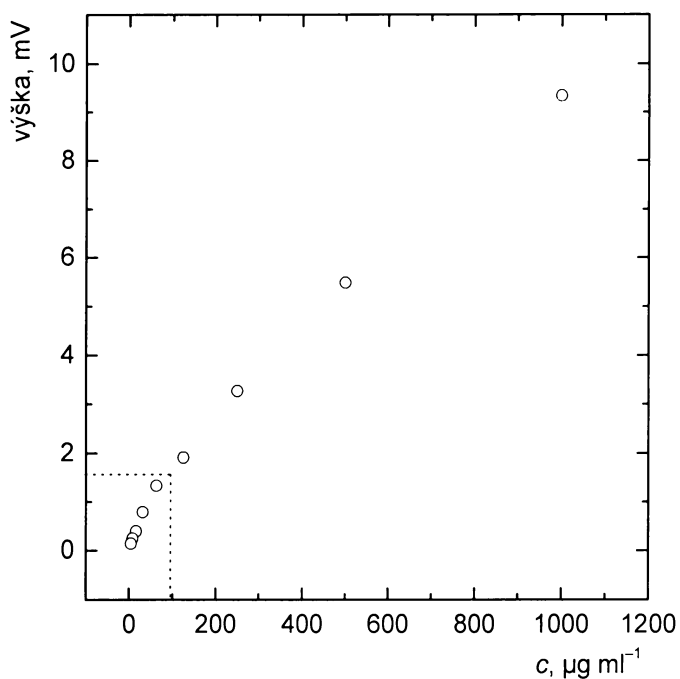
Obr. 4.9 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 µl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Tab. 4.7 Parametry normální a logaritmické formy kalibrační křivky z plochy [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu separovaného na koloně A; mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 µl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

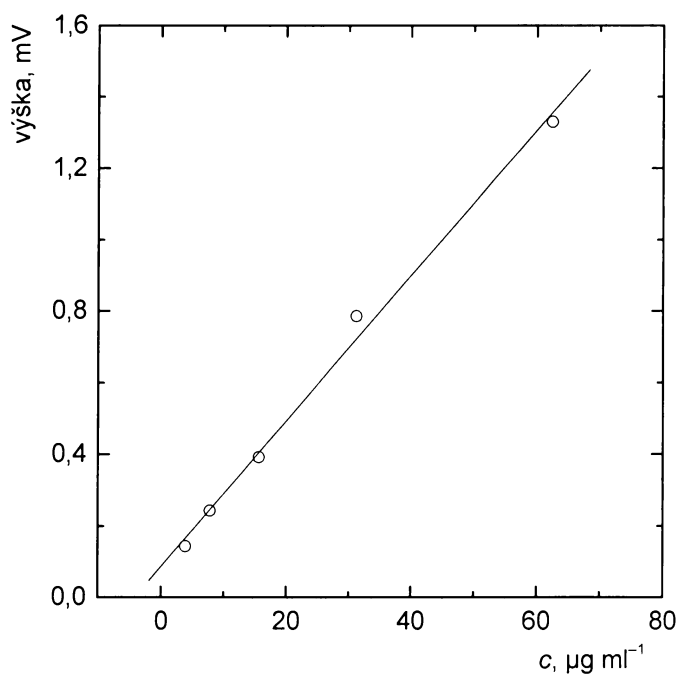
forma kalibrační křivky	směrnice přímky A ₁ (mV·s·ml·µg ⁻¹)	průsečík na ose y A ₀ (mV·s)	korelační koeficient
normální	0,72	1,64	0,9998
logaritmická	0,86	0,10	0,9986

Na **obr. 4.10** je zobrazena kalibrační závislost výšky píku na koncentraci analytu.

Obr. 4.11 představuje lineární úsek kalibrační závislosti (výřez z obr. 4.10). Parametry normální i logaritmické formy kalibrační křivky vyhodnocené z výšek píků jsou uvedeny v **tab. 4.8**. V **tab. 4.9** jsou hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovení (LOQ) vypočtené pomocí parametrů kalibrační křivky (tab. 4.8) a vzorců (8) a (9), které využívají závislosti výšky píku na koncentraci analytu.



Obr. 4.10 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 $\mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm



Obr. 4.11 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 $\mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

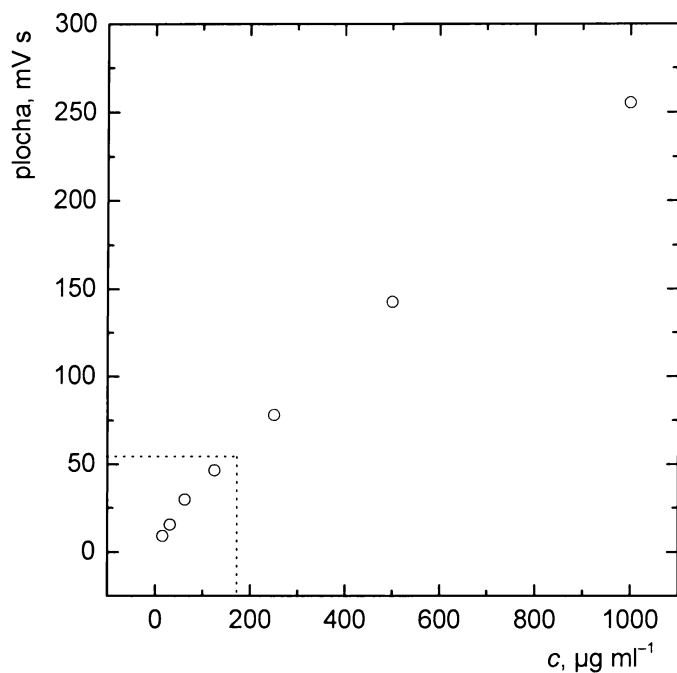
Tab. 4.8 Parametry normální a logaritmické formy kalibrační křivky z výšky [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu separovaného na koloně A; mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

forma kalibrační křivky	směrnice přímký A ₁ (mV·ml·μg ⁻¹)	průsečík na ose y A ₀ (mV)	korelační koeficient
normální	0,02	0,09	0,9971
logaritmická	0,81	-1,34	0,9982

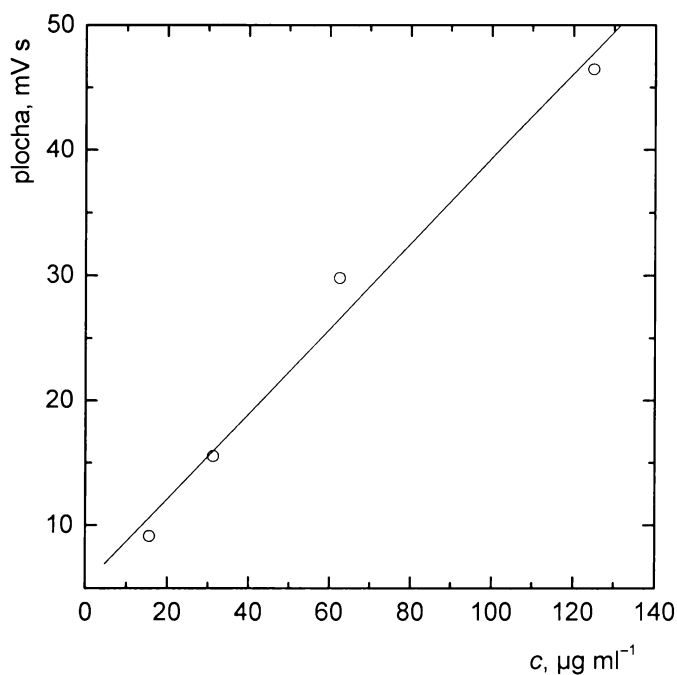
Tab. 4.9 Mez detekce (LOD) a mez stanovení (LOQ) [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu vypočtené pomocí parametrů kalibrační křivky (tab. 4.8) a vzorců (8) a (9)

analyt	LOD (μg·ml ⁻¹)	LOQ (μg·ml ⁻¹)
pentapeptid	1,47	15,40

Druhým peptidem, u kterého byla kvantifikace prováděna byl [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]. Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] byla proměřena v koncentračním rozmezí 16 – 1000 μg ml⁻¹, což odpovídá molární koncentraci 22 – 1377 μmol dm⁻³. Na **obr. 4.12** je znázorněn průběh kalibrační závislosti plochy píku [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] na koncentraci analytu. **Obr. 4.13** představuje lineární úsek kalibrační závislosti (výřez z obr. 4.12). Parametry normální i logaritmické formy kalibrační křivky vyhodnocené z ploch píků jsou uvedeny v **tab. 4.10**.



Obr. 4.12 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 $\mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

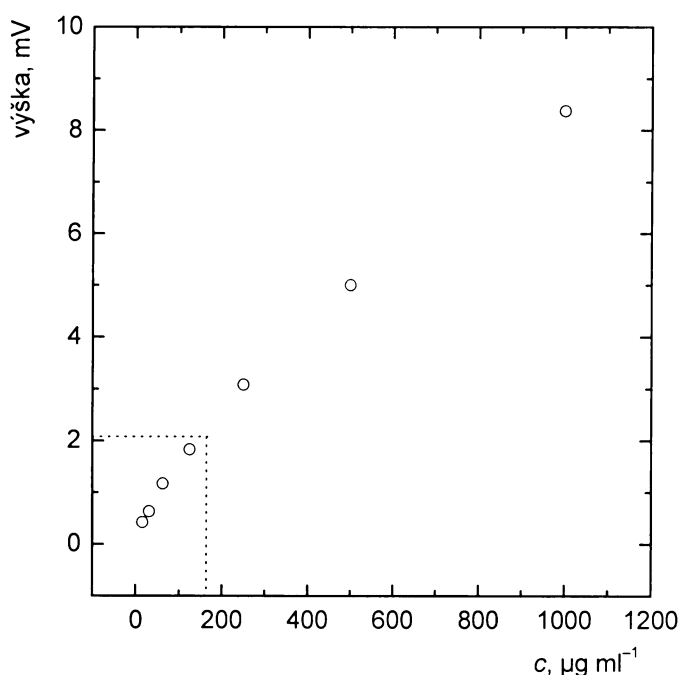


Obr. 4.13 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 $\mu\text{l min}^{-1}$; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

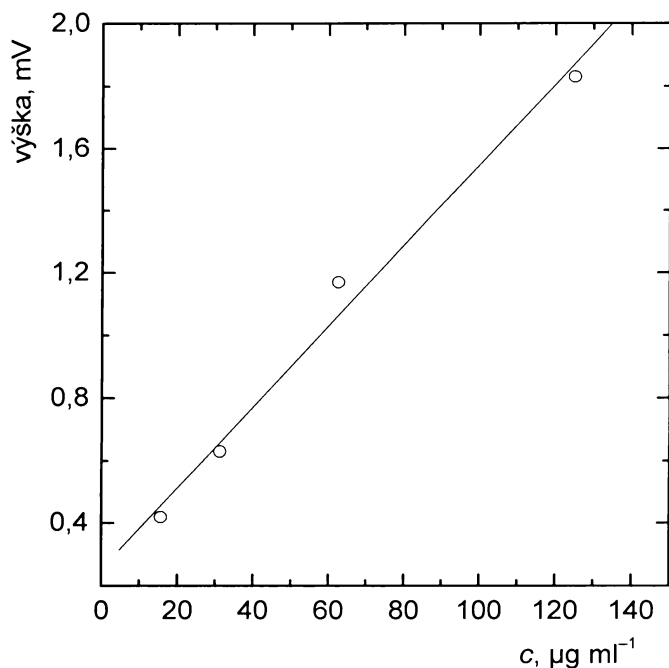
Tab. 4.10 Parametry normální a logaritmické formy kalibrační křivky z plochy [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] separovaného na koloně A; mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

forma kalibrační křivky	směrnice přímky A ₁ (mV·s·ml·μg ⁻¹)	průsečík na ose y A ₀ (mV·s)	korelační koeficient
Normální	0,34	5,32	0,9911
Logaritmická	0,80	0,01	0,9977

Na **obr. 4.14** je zobrazena závislost výšky píku na koncentraci analytu. **Obr. 4.15** představuje lineární úsek kalibrační závislosti (výřez z obr. 4.14). Parametry normální i logaritmické formy kalibrační křivky vyhodnocené z výšek píků jsou uvedeny v **tab. 4.11**. V **tab. 4.12** jsou hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovení (LOQ) vypočtené pomocí parametrů kalibrační křivky (tab. 4.11.) a vzorců (8) a (9), které využívají závislosti výšky píku na koncentraci analytu.



Obr. 4.14 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm



Obr. 4.15 Kalibrační závislost [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]; kolona A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 µl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Tab. 4.11 Parametry normální a logaritmické formy kalibrační křivky z výšky [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] separovaného na koloně A; mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 µl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

forma kalibrační křivky	směrnice přímky A ₁ (mV·ml·µg ⁻¹)	průsečík na ose y A ₀ (mV)	korelační koeficient
Normální	0,01	0,25	0,9935
Logaritmická	0,73	-1,26	0,9969

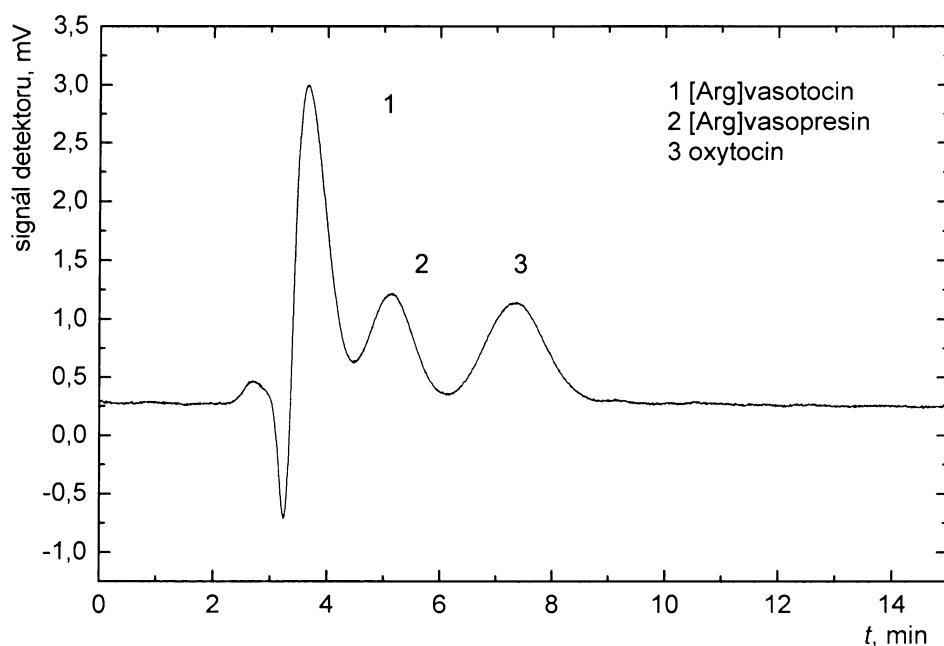
Tab. 4.12 Mez detekce (LOD) a mez stanovení (LOQ) [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] vypočtené pomocí parametrů kalibrační křivky (tab. 4.11) a vzorců (8) a (9)

analyt	LOD (µg·ml ⁻¹)	LOQ (µg·ml ⁻¹)
hexapeptid	10,80	36,00

4.6 Objasnění separačního mechanismu monolitických kolon na bázi styrenu

Monolitické kolony využívající styren-divinylbenzenového kopolymeru mohou teoreticky zahrnovat dva způsoby separace. Prvním z nich je chování jako reverzní fáze za využití hydrofobních interakcí mezi stacionární fází a analytem. Druhým způsobem je model molekulového síta, projevující se u větších molekul. Posledním bodem této diplomové práce byl pokus o podhalení převládajícího mechanismu separace na připravených kolonách. Při separaci peptidů byla totiž pozorována nižší retence hexapeptidu oproti pentapeptidu.

Na připravených styrenových monolitech tedy bylo prováděno testování pomocí ještě větších molekul, a to nonapeptidů, aby byl potvrzen či vyloučen model molekulového síta. Směs nonapeptidů se skládala z [Arg]vasotocinu, [Arg]vasopresinu a oxytocinu. Bylo vyzkoušeno několik mobilních fází o snižujícím se pH. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s mobilní fází o následujícím složení: 10:89,70:0,30 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA. Záznam této separace je uveden na **obr. 4.16**.



Obr. 4.16 Separace směsi [Arg]vasotocinu, [Arg]vasopresinu a oxytocinu na koloně A o délce 19,5 cm; složení mobilní fáze 10:89,70:0,30 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm

Bylo porovnáno retenční chování penta-, hexa- a nonapeptidů za stejných podmínek: složení mobilní fáze 10:89,90:0,10 % obj. CH₃CN:H₂O:TFA; průtoková rychlost 4 μl min⁻¹; dávkovací smyčka 100 nl; UV detekce při 214 nm. Retence oxytocinu (nonapeptid) byla delší než retence [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg] (hexapeptid) i [D-Ala², Leu⁵]enkefalinu (pentapeptid). Retenční čas dalšího nonapeptidu, [Arg]vasopresinu, byl srovnatelný s retenčním časem hexapeptidu. [Arg]vasotocin eluoval v kratším retenčním čase než pentapeptid i hexapeptid.

Protože výsledky separace nonapeptidů nepomohly k objasnění mechanismu separace na polystyrenových monolitech, byly dále analyzovány látky o výrazně odlišné velikosti molekul, tj. vybrané aminokyseliny a proteiny.

Jako aminokyseliny byly vybrány arginin a leucin, které byly součástí zkoumaných penta a hexa-peptidů, a tyrosin jako zástupce aminokyselin s aromatickým jádrem. Chování látek bylo sledováno při následujících vlnových délkách: 210, 214, 254, 280 a 400 nm. Ani jedna z uvedených aminokyselin se prakticky na koloně nezadržovala. Arginin a leucin opouštěly kolonu ve formě dvojitych píků, u tyrosinu docházelo k výraznému rozmývání, retenční časy byly opět prakticky totožné s mrtvým časem kolony, který byl určován uracilem.

Jako zástupce proteinů byl testován cytochrom c. Dále byly použity trypsinem natrávené bílkoviny, myoglobin a biologický vzorek rohoviny (trypsinem natrávený lidský nehet). Ani v případě proteinů nedošlo k zadržení analytů na koloně.

Z veškerých provedených měření vyplývá, že připravené kolony se chovají spíše jako běžné reverzní fáze, způsob dělení založený na modelu molekulového síta nebyl jednoznačně prokázán.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava kapilárních monolitických kolon na bázi styrenu a možnost jejich využití pro separaci biologicky aktivních látek. Připravené monolitické kolony byly nejdříve charakterizovány pomocí nízkomolekulárních látek. Byly vybrány látky nepolární povahy, které jsou součástí tzv. Waltersova testu.

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že připravené monolitické kolony nelze z hlediska hydrofobnosti přirovnat ke konvenčním kolonám. Pro vysokou afinitu nepolárních látek ke stacionární fázi nebylo možné vypočítat index hydrofobnosti. Kromě nepolárních látek bylo studováno chování i látek polárního charakteru. U nízkomolekulárních látek byl sledován vliv složení polymerizační směsi na jejich retenční chování.

V další části této diplomové práce byly připravené monolitické kolony použity pro separace biologicky aktivních látek, a to peptidů. Nejdříve byla určena optimální průtoková rychlost proměření van Deemterových křivek. Dále byl sledován vliv pH vodné složky mobilní fáze na separaci vysokomolekulárních látek. V optimalizované mobilní fázi byla provedena kvantifikace vybraného pentapeptidu a hexapeptidu a určeny meze detekce a stanovitelnosti. Meze detekce (LOD) dosahovaly $1,47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin a $10,80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg]. Meze stanovitelnosti (LOQ) dosahovaly $15,40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin a $36,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro [D-Ala², Leu⁵]enkefalin[Arg].

Ze získaných výsledků je vidět, že připravené monolitické kolony na bázi styrenu není možné použít bez předchozí chemické modifikace pro separace nízkomolekulárních látek, ale je možné je úspěšně použít pro isokratickou separaci biologicky aktivních látek, konkrétně analogů enkefalinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Horváth, C. G.; Preiss, B. A.; Lipský, S. R.: Fast liquid chromatography: An investigation of operating parameters and separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry* **39**, 1422–1428 (1967).
2. Horváth, C. G.; Lipský, S. R.: Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. *Analytical Chemistry* **41**, 1227–1234 (1969).
3. Ishii, D.; Asai, K.; Hibi, K.; Jonokuchi, T.; Nagaya, M.: A study of micro-high-performance liquid chromatography. I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **144**, 157–168 (1977).
4. Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Nagaya, M.: Studies of micro high-performance liquid chromatography. III. Development of a “micro-pre-column method” for pretreatment of samples. *Journal of Chromatography* **152**, 341–348 (1978).
5. Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Jonokuchi, T.: Studies of micro high-performance liquid chromatography. II. Application to gel permeation chromatography of techniques developed for micro high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **151**, 147–154 (1978).
6. Tsuda, T.; Novotný, M.: Band-broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **50**, 632–634 (1978).
7. Tsuda, T.; Novotný, M.: Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **50**, 271–275 (1978).
8. Scott, R. P. W.; Kučera, P.: Use of microbore columns for the separation of substances of biological origin. *Journal of Chromatography* **185**, 27–41 (1979).
9. Scott, R. P. W.; Kučera, P.: Mode of operation and performance characteristic of microbore columns for use in liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **169**, 51–72 (1979).
10. Scott, R. P. W.; Kučera, P.; Munroe, M.: Use of microbore columns for rapid liquid chromatographic separations. *Journal of Chromatography* **186**, 475–487 (1979).
11. Yang, F. J.: Fused-silica narrow-bore microparticle-packed-column high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **236**, 265–277 (1982).

12. Hermansson, J.; Hermansson, I.; Nordin, J.: Characterization of a Chiral-AGP capillary column coupled to a micro sample-enrichment system with UV and electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **631**, 79–90 (1993).
13. Prinsen, E.; Van Dongen, W.; Esmans, E. L.; Van Onckelen, H. A.: Micro and capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *Journal of Chromatography A* **826**, 25–37 (1998).
14. Kassel, D. B.; Shushan, B.; Sakuma, T.; Salyman, J. P.: Evaluation of packed capillary perfusion column HPLC/MS/MS for the rapid mapping and sequencing of enzymatic digests. *Analytical Chemistry* **66**, 236–243 (1994).
15. Yates, J. R.; Eng, J. K.; McCormack, A. L.: Mining Genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequence in nucleotide databases. *Analytical Chemistry* **67**, 3202–3210 (1995).
16. Draisci, R.; Lucentini, L.; Boria, P.; Lucarelli, C.: Micro high-performance liquid chromatography for the determination of nicarbazin in chicken tissues, eggs, poultry feed and litter. *Journal of Chromatography A* **697**, 407–414 (1995).
17. Schurig, V.; Jung, M.; Mayer, S.; Fluck, M.; Negura, S.; Jakubetz, H.: Unified enantioselective capillary chromatography on a Chirasil-DEX stationary phase. Advantage of column miniaturization. *Journal of Chromatography A* **694**, 119–128 (1995).
18. Roper, D. K.; Lightfoot, E. N.: Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A* **702**, 3–26 (1999).
19. 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. *Journal of Chromatography A* **852**, 3–23 (1999).
20. Oberacher, H.; Huber, C. G.: Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **21**, 166–174 (2002).
21. Hjertén, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R.: High performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *Journal of Chromatography* **473**, 273–275 (1989).

22. Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* **64**, 820–822 (1992).
23. Peters, E. C.; Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **69**, 3646–3649 (1997).
24. Peters, E. C.; Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation. *Analytical Chemistry* **70**, 2296–2302 (1998).
25. Ericson, Ch.; Liao, J.-L.; Nakazato, K.; Hjérten, S.: Preparation of continuous beds for electrochromatography and reversed-phase liquid chromatography of low-molecular-mass compounds. *Journal of Chromatography A* **767**, 33–41 (1997).
26. Huang, X.; Zhang, J.; Horváth, C.: Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns. *Journal of Chromatography A* **858**, 91–101 (1999).
27. Bandilla, D.; Skinner, C. D.: Capillary electrochromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A* **858**, 91–101 (1999).
28. Xiong, B. H.; Zhang, L. H.; Zhang, Y. K.; Zou, H. F.; Wang, J. D.: Capillary electrochromatography with monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene-co-methacrylic acid) as the stationary phase. *Journal of High Resolution Chromatography* **23**, 67–72 (2000).
29. Peters, E. C.; Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry. *Analytical Chemistry* **70**, 2288–2295 (1998).
30. Legido-Quigley, C; Marlin, N. D.; Melin, V.; Manz, A.; Smith, N. W.: Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science. *Electrophoresis* **24**, 917–944 (2003)
31. Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G.: Characterization of some physical and chromatographic properties of monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns. *Journal of Chromatography A* **1030**, 201–208 (2004).

- 32.** Rieux, L.; Niederländer, H.; Verpoorte, E.; Bischoff, R.: Silica monolithic columns: Synthesis, characterization and applications to the analysis of biological molecules. *Journal of Separation Science* **28**, 1628–1641 (2005).
- 33.** Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanashi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.: Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *Journal of Chromatography A* **965**, 35–49 (2002).
- 34.** Kłodzińska, E.; Moravcová, D.; Jandera, P.; Buszewski, B.: Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations. *Journal of Chromatography A* **1109**, 51–59 (2006).
- 35.** Hayes, J. D.; Malik, A.: Sol–gel monolithic columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **70**, 2296–2302 (1998).
- 36.** Asiaie, R.; Huang, X.; Farnan, D.; Horváth, C.: Sintered octadecylsilica as monolithic column packing in capillary electrochromatography and micro high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **806**, 251–263 (1998).
- 37.** Švec, F.: Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC. *Journal of Separation Science* **27**, 1419–1430 (2004).
- 38.** Palm, A.; Novotny, M. V.: Macroporous polyacrylamide-poly(ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **69**, 4499–4507 (1997).
- 39.** Fujimoto, Ch.; Kino, J.; Sawada, H.: Capillary electrochromatography of small molecules in polyacrylamide gels with electroosmotic flow. *Journal of Chromatography A* **716**, 107–113 (1995).
- 40.** Mayr, B.; Hölzl, G.; Eder, K.; Buchmeiser, M. R.; Huber, C. G.: Hydrophobic, pellicular, monolithic capillary columns based on cross-linked polynorbornen for biopolymer separations. *Analytical Chemistry* **74**, 6080–6087 (2002).
- 41.** Messina, A.; Desiderio, C.; De Rossi, A.; Bachechi, F.; Sinibaldi, M.: Capillary electrochromatography on methacrylate based monolithic columns: Evaluation of column performance and separation of polyphenols. *Chromatographia* **62**, 409–416 (2005).

42. Coufal, P.; Čihák, M.; Suchánková, J.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: Methacrylate monolithic columns of 320 μm I.D. for capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **946**, 99–106 (2002).
43. Buszewski, B.; Szumski, M.: Study of bed homogeneity of methacrylate-based monolithic columns for micro-HPLC and CEC. *Chromatographia* **60**, 261–267 (2004).
44. Jandera, P.; Urban, J.; Moravcová, D.: Polymethacrylate and hybrid interparticle monolithic columns for fast separations of proteins by capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1109**, 60–73 (2006).
45. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Huber, C. G.: High-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns. *Analytical Chemistry* **72**, 4386–4393 (2000).
46. Wang, Q. C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Analytical Chemistry* **65**, 2243–2248 (1993).
47. Wang, Q. C.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly(styrene–co-divinylbenzene). *Journal of Chromatography A* **669**, 230–235 (1994).
48. Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Molded continuous poly(styrene–co-divinylbenzene) rod as a separation medium for the very fast separation of polymers. Comparison of the chromatographic properties of the monolithic rod with columns packed with porous and non-porous beads in high-performance liquid chromatography of polystyrenes. *Journal of Chromatography A* **752**, 59–66 (1996).
49. Petro, M.; Švec, F.; Gitsov, I.; Fréchet, J. M. J.: Molded monolithic rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene) as a separation medium for HPLC of synthetic polymers: ‘On-column’ precipitation–redissolution chromatography as an alternative to size exclusion chromatography of styrene oligomers and polymers. *Analytical Chemistry* **68**, 315–321 (1996).
50. Moore, R. E.; Licklider, L.; Schumann, D.; Lee, T. D.: A microscale electrospray interface incorporating a monolithic, poly(styrene–divinylbenzene) support for on-line liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides and proteins. *Analytical Chemistry* **70**, 4879–4884 (1998).

51. Yu, C.; Davey, M. H.; Švec, F.; Fréchet, J. M. J.: Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Analytical Chemistry* **73**, 5088–5096 (2001).
52. Quirino, J. P.; Dulay, M. T.; Zare, R. N.: On-line preconcentration in capillary electrochromatography using a porous monolith together with solvent gradient and sample stacking. *Analytical Chemistry* **73**, 5557–5563 (2001).
53. Schulte, M.; Dingenen, J.: Monolithic silica sorbents for the separation of diastereomers by means of simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* **923**, 17–25 (2001).
54. Shediak, R.; Ngola, S. M.; Throckmorton, D. J.; Anex, D. S.; Shepodd, T. J.; Singh, A. K.: Reversed-phase electrochromatography of amino acids and peptides using porous polymer monoliths. *Journal of Chromatography A* **925**, 251–263 (2001).
55. Zhang, S. H.; Huang, X.; Zhang, J.; Horváth, C.: Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith. *Journal of Chromatography A* **887**, 465–477 (2000).
56. Luo, Q. Z.; Zou, H. F.; Xiao, X. Z.; Guo, Z.; Kong, L.; Mao, X. Q.: Chromatographic separation of proteins on metal immobilized aminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). *Journal of Chromatography A* **926**, 255–264 (2001).
57. Zhang, J.; Zhang, S. H.; Horvath, C.: Capillary electrochromatography of peptides on a column packed with tentacular weak cation-exchanger particles. *Journal of Chromatography A* **953**, 239–249 (2001).
58. Gusev, I.; Huang, X.; Horváth, C.: Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **855**, 273–290 (1999).
59. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Walcher, W.; Timperio, A. M.; Zolla, L.; Chervet, J. P.; Cavusoglu, N.; van Dorsselaer, A.; Huber, C. G.: High-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies. *Analytical Chemistry* **73**, 2390–2396 (2001).
60. Chirica, G. S.; Remcho, V. T.: Novel monolithic columns with templated porosity. *Journal of Chromatography A* **924**, 223–232 (2001).

61. Huang, X. A.; Zhang, S.; Schultz, G. A.; Henion, J.: Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**, 2336–2344 (2002).
62. Švec, F.; Peters, E. C.; Sýkora, D.; Yu, C.; Fréchet, J. M. J.: Monolithic stationary phases for capillary chromatography based on synthetic polymers: Designs and applications. *High resolution Chromatography* **23**, 3–18 (2000).
63. Karlson, P.: *Základy biochemie*. 2. dopln. vyd. Praha, Academia 1971
64. Soukupová, K.: „Diplomová práce“, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Praha 2003.
65. Vodrážka, Z.: *Biochemie II*, Academia, Praha 1999.
66. Grafnetter, J.: „Diplomová práce“, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Praha 2003.
67. Legido-Quigley, C.; Smith, N. W.: Study of short polystyrene monolith-fritted micro-liquid chromatography columns for analysis of neutral and basic compounds. *Journal of Chromatography A* **1042**, 61–68 (2004).