UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Výhody a nevýhody zvýšené teploty při separaci peptidů na obrácených fázích

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2019 **Tomáš Šemlej**

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne…… . Podpis…….

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, předání zkušeností, cenné rady a věnovaný čas po celou dobu vypracování mé práce. Dále bych chtěl poděkovat všem pracovníkům katedry analytické chemie za pomoc a vstřícné jednání. Také bych rád poděkoval doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za věcné připomínky, ochotu a čas strávený především na začátku mé práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Tomáš Šemlej
Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.
Název diplomové práce: Výhody a nevýhody zvýšené teploty při separaci peptidů na obrácených fázích

V současné době jsou pro LC-MS analýzy proteinů dostupné velice výkonné hmotnostní spektrometry, díky kterým lze v rámci jedné tzv. bottom-up analýzy identifikovat až několik tisíc proteinů. Nedávno však bylo zjištěno, že jejich možnosti nemohou být plně využity bez zvýšení účinnosti chromatografické separace peptidů. Účinnost separace peptidů může být zvýšena velmi jednoduchým, ale mnohdy opomíjeným způsobem, a sice pomocí vyšší teploty kolony. Vyšší teplota přispívá k účinnější separaci především lepší difuzí peptidů. Na druhou stranu použití vyšších teplot pro účinnější separace omezuje stabilita jak stacionární fáze, tak separovaných peptidů. V rámci diplomové práce jsme nejprve ověřovali vliv teploty na účinnost separace peptidů na kolonách naplněných buď plně porézními částicemi, nebo povrchově porézními částicemi. Zvýšená teplota kolony s plně porézními částicemi poskytla užší píky, zatímco rozdíly v šířce píků na koloně s povrchově porézními částicemi byly minimální. Dále jsme pomocí modelového proteinu zkoumali tepelnou stabilitu peptidových vazeb během interakce se stacionární fází. Již kombinace teploty 45 °C a 0,1% kyseliny mravenčí v mobilních fázích vedla k detekci prvního degradačního produktu. Na závěr jsme zkoumali tepelnou stabilitu aminokyselin během interakce modelových peptidů se stacionární fází. Zjistili jsme, že zvýšená teplota kolony indukuje očekávatelné, ale i některé netypické, modifikace aminokyselin. Naše výsledky potvrzují, že zvýšená teplota může v závislosti na charakteru částic zlepšit účinnost separace peptidů. Teplota však musí být vzhledem ke stabilitě peptidových vazeb a postranních řetězců aminokyselin používána citlivě, zejména při dlouhých LC-MS analýzách.

Klíčová slova: Proteomická analýza, peptidy, teplota, stabilita, účinnost separace, obrácená fáze, LC-MS

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical Chemistry

Candidate: Tomáš Šemlej
Supervisor: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.
Title of diploma thesis: Pros and cons of using elevated temperature for peptide separation using reversed phases

Nowadays, powerful mass spectrometers are available for bottom-up LC-MS proteomic analyses. They allow to identify up to several thousand proteins in one bottom-up analysis. It has been recently demonstrated, however, that their capabilities cannot be fully exploited without significant improvements in peptide separation. One of the easiest, but often neglected, ways to enhance peptide separation efficiency is to increase column temperature. Elevated column temperature may contribute to more efficient separation especially by increasing low diffusivity of peptides. On the other hand, stability of both a stationary phase and peptides limits increasing column temperature to values affording maximum effect on separation efficiency. In this thesis, we explored the effect of increased column temperature on peptide separation efficiency using columns packed either with superficially porous particles or with fully porous particles. Elevated column temperature narrowed peaks for peptides eluted from fully porous particles whereas peak widths of peptides eluted from superficially porous particles did not changed remarkably. Subsequently, using a protein model we examined on-column thermal stability of peptide bonds. Surprisingly, combination of 0.1% formic acid in mobile phases and temperature 45 °C led to detection of first degradation product already. Lastly, we explored on-column chemical stability of amino acid residues at elevated temperatures. Some modifications were expectable, but we also identified some atypical modifications. In conclusion, our results demonstrate that depending on type of particles, temperature can improve peptide separation efficiency. However, column temperature must be used wisely, particularly during long LC-MS analyses.

Keywords: Proteomic analysis, peptides, temperature, stability, separation efficiency, reversed phase, LC-MS

OBSAH

1 ÚVOD **8**

2 CÍL PRÁCE **9**

3 TEORETICKÁ ČÁST **10**

3.1 Proteiny 10

3.1.1 Proteinogenní aminokyseliny *11*

3.1.2 Struktura proteinů *14*

3.1.3 Modifikace proteinů *15*

3.2 Analýza proteinů pomocí kapalinové chromatografie 16

3.2.1 Chromatografie na obrácené fázi (RPLC) *18*

3.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) *19*

3.2.3 Molekulová vylučovací chromatografie (SEC) *19*

3.2.4 Iontově výměnná chromatografie (IEC) *20*

3.3 Podmínky pro analýzu peptidů pomocí RPLC 21

3.3.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie *21*

3.3.2 Mobilní fáze *21*

3.3.3 Aditiva mobilní fáze *22*

3.3.4 Gradient *23*

3.3.5 Stacionární fáze *24*

3.3.6 Průměr kolony *25*

3.3.7 Průtok mobilní fáze *26*

3.3.8 Typ a velikost částic stacionární fáze *26*

3.3.9 Teplota kolony *28*

3.3.10 Detekce *29*

4 PRAKTICKÁ ČÁST **34**

4.1 Materiál 34

4.1.1 Chemikálie *34*

4.1.2 Přístroje *34*

4.1.3 Kolony *34*

4.2 Experimentální část 35

4.2.1 Příprava mobilních fází *35*

4.2.2 Parametry LC analýz na systému Dionex UltiMate 3000 ..... *35*

4.2.3 Parametry analýzy chemických modifikací aminokyselin *39*

4.2.4 Příprava vzorků *40*

4.2.5 Softwarová analýza LC-MS dat v programu Preview *42*

5 VÝSLEDKY A DISKUZE **43**

5.1 Ověřování vlivu teploty na účinnost separace směsi peptidů 43
5.1.1 Testování připravené směsi iRT peptidů 43
5.1.2 Vlastní ověřování vlivu teploty na účinnost separace peptidů..... 44
5.2 Ověření stability peptidových vazeb při zvýšené teplotě na koloně..... 46
5.2.1 Pilotní experimenty s kolonou Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm 47
5.2.2 Připojení druhé pumpy pro kombinovaný gradient..... 47
5.2.3 Testování stability peptidových vazeb kombinovaným gradientem 48
5.2.4 Pilotní experimenty s kolonou BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm 50
5.2.5 Volba velikosti nástřiku referenční protilátky NIST na kolonu BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm..... 52
5.2.6 Finální ověření vlivu teploty na stabilitu peptidových vazeb na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm..... 53
5.3 Ověření vlivu teploty na chemickou stabilitu postranních řetězců aminokyselin 57

6 ZÁVĚR 58

7 SEZNAM ZKRATEK 59

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 61

1 ÚVOD

Počet terapeuticky používaných látek biologické povahy se v dnešní době zvyšuje rychleji než počet nových nízkomolekulárních léčiv. Oproti malým molekulám, které v klinické praxi stále dominují, se analýza terapeutických proteinů stala pro složitost jejich struktury opravdovou výzvou. Existuje mnoho způsobů, jakými lze analýzu terapeutických proteinů provádět. Jedním ze zásadních nástrojů pro jejich analýzu je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS, z angl. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry).

Tato diplomová práce vycházela z hypotézy, že zlepšení chromatografických podmínek může být pro bottom-up analýzu proteinů přínosnější než další zvyšování výkonnosti hmotnostních spektrometrů [1]. Pro LC-MS analýzu proteinů jsou k dispozici stále výkonnější hmotnostní spektrometry, ale pokud je zanedbávána chromatografická separace, není již možné pomocí těchto přístrojů získat více dat. Nás zaujal potenciál teploty kolony pro zlepšení účinnosti separace peptidů, jelikož dříve se zvýšená teplota při analýze peptidů používala více méně pouze pro snížení zpětného tlaku na koloně. Zvýšená teplota kolony má však i další přínosy. Přispívá k lepší účinnosti separace především zvýšenou difuzí peptidů. Tím jsou píky užší a vyšší, což vyjadřuje vztah mezi plochou pod píkem, jeho šířkou a výškou. Zlepšení je dáno přímo přes parametry van Deemterovi křivky, ale také přes lepší návratnost, výhodnější kinetiku izomerizace peptidů bohatých na prolin nebo snížením vlivu sekundárních interakcí mezi peptidy a stacionární fází.

Vyšší teplota má i určité nevýhody. Separace peptidů s detekcí na hmotnostním spektrometru (MS, z angl. Mass Spectrometry) probíhá nejčastěji v prostředí s 0,1% kyselinou mravenčí (FA, z angl. Formic Acid). Bylo prokázáno, že v takovém prostředí může docházet k degradaci peptidů, což může znehodnocovat výsledky proteomických analýz [2]. Podobná degradace byla prokázána u proteinů, i když v prostředí s kyselinou trifluoroctovou (TFA, z angl. Trifluoroacetic Acid), která má výrazně nižší pKa [3]. Dlouhý čas LC-MS analýz a vyšší teploty kolony mohou výrazně přispívat k degradaci analyzovaných látek. Je proto třeba detailně charakterizovat stabilitu peptidů zachycených na stacionární fázi kolony, která je temperována na vyšší teploty.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jak velký problém představuje termostabilita peptidů zachycených na stacionární fázi chromatografické kolony v mobilních fázích okyselených 0,1% FA při několikahodinových LC-MS analýzách. Na základě výsledků by mělo být možné určit, jaká teplota je díky účinnější chromatografické separaci pro počet identifikovaných peptidů v bottom-up LC-MS analýzách ještě přínosná a při jaké teplotě již může kvůli degradaci počet identifikovaných peptidů začít klesat. Z výše uvedeného vyplývají následující konkrétní úkoly k řešení:

- Znovu ověřit vliv teploty na účinnost separace peptidů na obou typech částic obrácené stacionární fázi.

- Ověřit stabilitu peptidových vazeb během interakce se stacionární fází.

- Ověřit chemickou stabilitu postranních řetězů aminokyselin.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Proteiny

Proteiny hrají nepostradatelné role u všech živých organismů. Jsou zodpovědné za téměř všechny biologické funkce a molekulární pochody, které jsou důležité pro jejich přežití. Analýza proteinů tak může zodpovědět některé zásadní otázky ohledně molekulárních základů života. Právě biologické aplikace pokročilých metod analýzy proteinů daly před dvěma dekádami vzniknout novému oboru – proteomice [4].

Proteomika, která se dnes řadí mezi nejprogresivnější vědní disciplíny, mapuje projev genomu a faktorů prostředí do fenotypu. Tím navazuje na genomiku a transkriptomiku. Z pohledu analýzy je studium proteinů složitý proces vyžadující komplexní pojetí, ze kterého můžeme získat informace o jejich struktuře, vlastnostech, vzájemných interakcích, funkčních vztazích, kvalitativní i kvantitativní změně během různých biologických procesů a jejich celkovém množství. Lidský proteom je velmi složitý a rozsáhlý, ale má také omezenou životnost v buňce. Analýzu proteinů navíc komplikují posttranslační modifikace proteinů, díky nimž se proteiny vyskytují v mnoha různých formách.

Proteiny jsou důležitými biomolekulami ve farmacii, protože na ně cílí převážná část léčiv. Stále rostoucí trh s bioléčivy se navíc zaměřuje právě na molekuly, které mají povahu proteinů. Mezi tato bioléčiva patří monoklonální protilátky, fúzní proteiny, bispecifické protilátky, růstové faktory, cytokiny, hormony a další podobné látky. Běžně jsou již využívány k léčbě některých vzácných chorob či onkologických a autoimunitních onemocnění. Proteinová bioléčiva mají jednak lepší toleranci, snížený počet vedlejších účinků, zvýšenou účinnost a mnoho dalších výhod. Na druhou stranu je z bezpečnostních důvodů třeba najít vhodné analytické metody a plně charakterizovat jejich strukturu, která je oproti malým molekulám řádově komplikovanější. Dokonce vlastní výroba komplexních proteinových bioléčiv je možná díky výrazným pokrokům v analytice, neboť přesné analytické metody umožňují hodnotit tzv. kritické atributy kvality. Veliký význam analytického hodnocení je v oblasti biosimilars, kdy během výroby pokročilého biologika je nutno sledovat až 200 kritických atributů kvality [5–9].

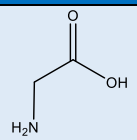
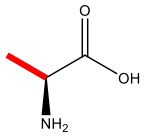
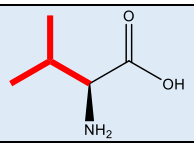
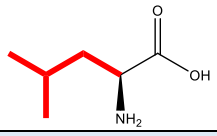
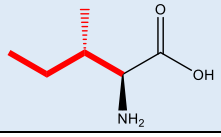
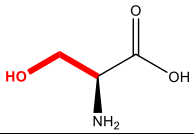
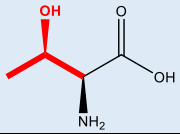
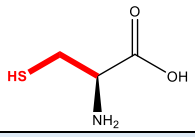
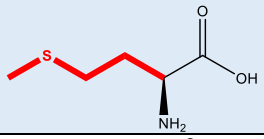
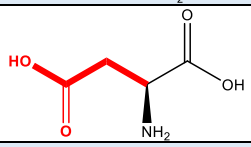
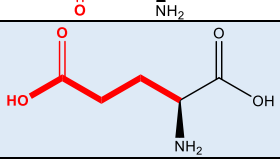
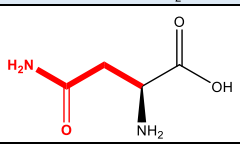
3.1.1 Proteinogenní aminokyseliny

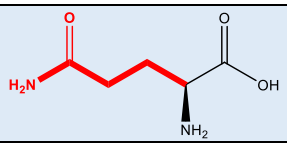
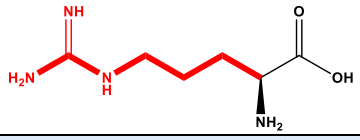
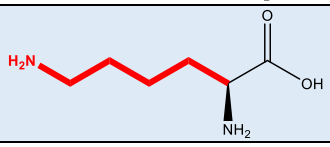
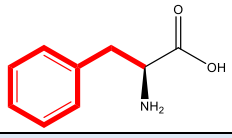
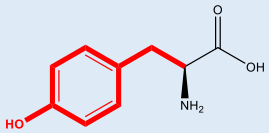
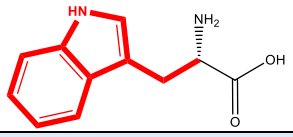
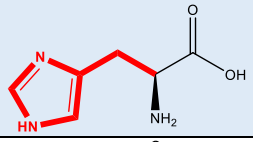
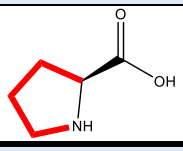
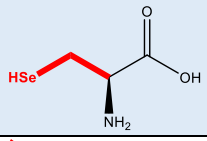
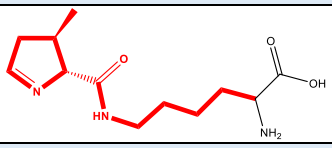
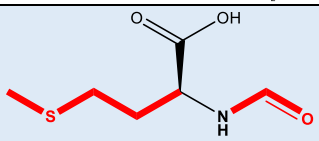
Běžně se u živých organismů vyskytuje 20 základních proteinogenních aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou společně kombinovány a vytvářejí polypeptidové řetězce. Za velmi specifických translačních mechanismů se do proteinů syntetizují další tři nekanonické proteinogenní aminokyseliny: selenocystein, pyrolysin a N-formylmethionin. Například N-formylmethionin je první aminokyselinou, kterou je u prokaryotických buněk zahájena proteosyntéza na ribozomech.

Proteinogenní aminokyseliny, které se vyskytují u živých organismů, jsou kromě glycinu L-α-aminokyseliny. Obsahují aminoskupinu (NH_2) a karboxylovou kyselinu (COOH), které jsou připojeny na α-uhlík. Jednotlivé aminokyseliny se liší postranním řetězcem (R′ v tabulce níže zvýrazněn červeně), který je také připojen k α-uhlíku. Zvláštní vlastnosti má díky své odlišné struktuře aminokyselina prolin, protože aminoskupina na α-uhlíku je součástí cyklu s postranním řetězcem. Navíc se prolin nevyskytuje v sekundárních strukturách proteinů jako α-helix nebo β-skládaný list, ale velmi často tvoří tzv. β-otáčky. *Trans* konfigurace prolinu je v peptidové vazbě nahrazena *cis* konfigurací, čímž se mění směr otáčení peptidového řetězce.

Aminokyseliny se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jakými jsou kupříkladu molekulová hmotnost, polarita a acidobazicita. Právě acidobazicita umožňuje aminokyselinám, aby se chovaly buď jako kyseliny, nebo jako zásady. Aminokyseliny tak mají amfoterní charakter. Další charakteristikou aminokyselin je izoelektrický bod. To je hodnota pH, při které se aminokyselina chová celkově neutrálně. Všechny tyto vlastnosti se dají využít v jejich analýze, včetně analýzy pomocí LC-MS. Názvy aminokyselin jsou zkracovány na třípísmenný kód, ale z kapacitních důvodů se častěji používá kód jednopísmenný [6][10–15]. Přehledné srovnání aminokyselin je v tabulce 1.

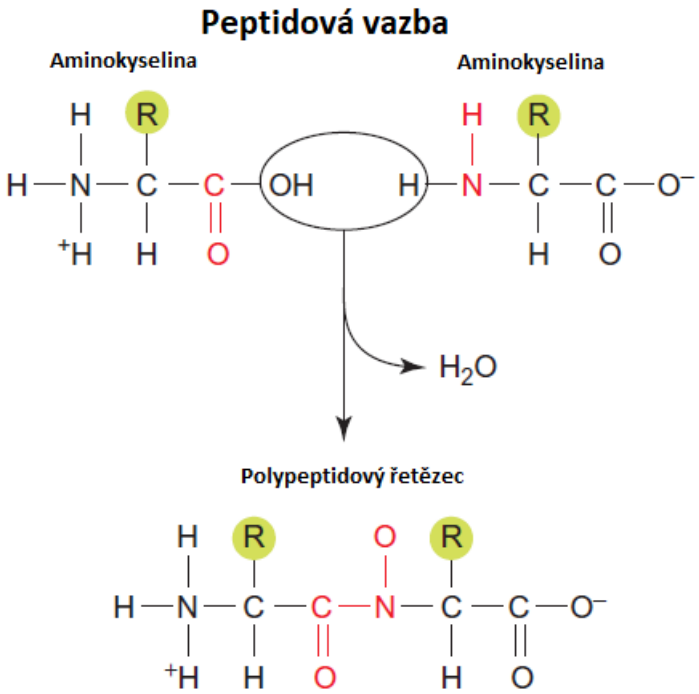
Tabulka 1. Přehled aminokyselin (přepracováno dle [7]).

Charakteristika	Aminokyselina	Kód	Struktura
Nepolární	Glycin	Gly (G)	
Nepolární	Alanin	Ala (A)	
Nepolární	Valin	Val (V)	
Nepolární	Leucin	Leu (L)	
Nepolární	Izoleucin	Ile (I)	
Polární (nenabitá)	Serin	Ser (S)	
Polární (nenabitá)	Threonin	Thr (T)	
Polární (nenabitá)	Cystein	Cys (C)	
Polární (nenabitá)	Methionin	Met (M)	
Kyselá	Kys. asparagová	Asp (D)	
Kyselá	Kys. glutamová	Glu (E)	
Polární (nenabitá)	Asparagin	Asn (N)	

Polární (nenabitá)	Glutamin	Gln (Q)	
Zásaditá	Arginin	Arg (R)	
Zásaditá	Lysin	Lys (K)	
Nepolární	Fenylalanin	Phe (F)	
Nepolární	Tyrosin	Tyr (Y)	
Nepolární	Tryptofan	Trp (W)	
Zásaditá	Histidin	His (H)	
Nepolární	Prolin	Pro (P)	
Polární (nenabitá)	Selenocystein	Sec (U)	
Nepolární	Pyrolysin	Pyr (O)	
Polární (nenabitá)	N-formyl methionin	fMet	

Proteiny vznikají spojením aminokyselin kondenzační reakcí mezi karboxylovou kyselinou jedné aminokyseliny a aminoskupinou druhé aminokyseliny. Výsledkem je kovalentní peptidová vazba (Obrázek 1). V živém organismu je k takovéto reakci potřeba informaci, která je zakódovaná v deoxyribonukleové kyselině (DNA, z angl. Deoxyribonucleic Acid). Genetická informace je z DNA nejprve pomocí transkripce

přepsána do sekvence mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA z angl. Messenger Ribonucleic Acid). Informace z mRNA je následně dekódována na ribozomech, kde probíhá překlad informace z mRNA do sekvence proteinů. Ke zdárnému průběhu translace je nutná energie ve formě guanosintrifosfátu. Peptidy a krátké proteiny lze též získat chemickou syntézou. Takovým způsobem mohou být do peptidové sekvence inkorporovány i neobvyklé aminokyseliny s různými postranními řetězci. V závislosti na různých zdrojích je definice proteinů a peptidů odlišná. Podle definice převzaté z organické chemie jsou proteiny považovány za látky obsahující 100 a více aminokyselin spojených peptidovými vazbami. Jestliže se řetězec aminokyselin skládá z 11 až 100 aminokyselin, nazývá se polypeptid. Pokud obsahuje 2 až 10 aminokyselin, je nazýván oligopeptid. V analýze proteinů je jejich definice jednodušší. Štěpením proteinů jsou získávány peptidy, které jsou složeny z aminokyselin [6–8][10–15].



Obrázek 1. Vznik peptidové vazby. (Převzato z [12])

3.1.2 Struktura proteinů

Výsledkem translace je dlouhý polypeptidový řetězec složený z aminokyselin. Každý řetězec má určitou primární strukturu, tedy specifickou sekvenci aminokyselin. Toho se využívá při charakterizaci rozmanitých funkcí, kterou sekvence zastává. Již při záměně jediné aminokyseliny může dojít ke změně funkce proteinu, což může vést k žádoucí i nežádoucí reakci. Každý protein má svoji N-terminální aminokyselinu

tvořenou aminoskupinou a C-terminální aminokyselinu obsahující karboxylovou skupinu.

Geometrickým uspořádáním a volnou rotací kolem jednoduchých vazeb α-uhlíku polypeptidového řetězce je utvářena sekundární struktura, která je navíc stabilizována vodíkovými vazbami mezi aminoskupinou ($-NH_2$) a karbonylovou ($-C=O$) skupinou. Sekundární struktura je většinou v přírodě pozorována buď jako α-helix, nebo β-skládaný list. V případě α-helix je struktura uspořádána do pravotočivé šroubovice, přičemž závity jsou stabilizovány vodíkovými vazbami a postranní řetězce směřují vně šroubovice. β-skládaný list je tvarován do podoby složeného listu papíru. Jednotlivé polypeptidové řetězce jsou rovněž stabilizovány vodíkovými vazbami a postranní řetězce směřují nad a pod rovinu skládaného listu.

Různé kombinace sekundární struktury dávají možnost vzniknout terciární proteinové struktuře. Terciární struktura je definována jako 3D prostorové uspořádaní jednotlivých polypeptidových řetězců obsahujících jednu nebo více sekundárních struktur, které přispívají k finální podobě konformace. Výsledný tvar je pak typicky globulární nebo fibrilární. Jednotlivé části řetězce jsou k sobě vázány disulfidickými vazbami vznikající oxidací postranních řetězců dvou cysteinů, ke kterým se přidávají van der Waalsovy síly, vodíkové a iontové vazby. Pokud protein obsahuje více než jeden polypeptidový řetězec, vytvářejí se tzv. podjednotky, které ve výsledné konfiguraci formují kvarterní strukturu proteinu [6][17–19].

3.1.3 Modifikace proteinů

3.1.3.1 Posttranslační modifikace proteinů

Aby proteiny v živých organismech mohly správně vykonávat svoji molekulární funkci, jsou po translaci často upravovány tzv. posttranslačními modifikacemi (PTM). Vznik PTM je velmi obvyklý, enzymaticky katalyzovaný jev, ke kterému dochází většinou krátce po syntéze proteinu, v průběhu života proteinu nebo před jeho degradací. Bezchybně provedené modifikace jsou zodpovědné za celou řadu dějů. Převládající je regulace funkce proteinů a jejich lokalizace v buňce v reakci na environmentální a fyziologické změny. PTM souvisí i s jejich účinností, stabilitou, bezpečností, buněčným metabolismem, regulací genové exprese a potenciální imunogenitou. Alternativně mohou být PTM použity pro označení proteinu k degradaci. PTM jsou důvodem, proč přibližně 20 000 lidských genů vytváří okolo jednoho milionu různých proteinů. Jeden

z mechanismů PTM spočívá v přidání funkčních skupin k postranním řetězcům aminokyselin nebo k N-terminálnímu konci řetězce. Mezi nejčastější modifikace patří fosforylace, která ovlivňuje konformaci proteinů, čímž umožňuje regulovat jejich aktivitu. Tyto proteiny se často podílí na signalizační kaskádě, pomocí níž buňky komunikují. Další významné PTM jsou disulfidický můstek, glykosylace, acetylace, deamidace, methylace, nitrosylace, sumoylace a ubikvitinace [20–24].

3.1.3.2 Chemické modifikace proteinů

Dalším typem modifikací proteinů jsou chemické modifikace proteinů, nazývané také jako arteficiální modifikace nebo post-izolační modifikace. Tyto modifikace mohou vznikat během přípravy vzorku nebo v průběhu analýzy, a tím komplikují vyhodnocování hmotnostních spektra. Některé arteficiální modifikace jsou naopak pro analýzu proteinů nezbytné. Disulfidový můstek vzniklý oxidací sulfhydrylových skupin cysteinu, je během přípravy vzorku na analýzu obvykle redukován redukčními činidly, jakými jsou dithiothreitol a tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP, z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine). Aby se zamezilo znovuvytvoření disulfidického můstku, je potřeba volné thiolové skupiny cysteinu zablokovat. Toho je možné dosáhnout reverzibilně pomocí methylmethanthiosulfonátu nebo ireverzibilně amidem kyseliny 2-jodoctové. Jednou z nejčastějších modifikací *in vitro* je oxidace u methioninu. Další nežádoucí modifikací, zvláště při hodnotách pH 10 a vyšší, je riziko deamidace postranních řetězců asparaginu a glutaminu vedoucí k tvorbě aspartátu a glutamátu. Modifikací glutaminu je ještě tvorba kyseliny pyroglutamové na N-konci. Nedávno objevené typy *in vitro* modifikací zahrnují ethylace aspartátu a glutamátu, esterifikace aspartátu a glutamátu při použití glycerolu, ztrátu 19 Da na lysinu nebo naopak přídavek 108 Da na cysteinu [25–28].

3.2 Analýza proteinů pomocí kapalinové chromatografie

Proteiny i peptidy obsahují desítky až stovky reaktivních skupin a díky své velikosti jsou méně stabilní než klasické molekuly. Nestabilita peptidové vazby může mít za následek rozpad na menší fragmenty během přípravy vzorku nebo při jeho samotné analýze. Analýza proteinů tudíž vyžaduje komplexní pojetí, a tím se odlišuje od analýzy malých molekul. Velikost proteinu, způsob produkce, složitá identifikace a labilita vazby jsou důvody, které znesnadňují analýzu a představují tak opravdovou výzvu.

Existuje více důvodů, proč je důležité věnovat pozornost právě separaci a analýze proteinů, resp. peptidů. Analýza přispívá k ověření jejich čistoty, identifikaci získaných peptidů z různých zdrojů v medicíně, jejich modifikací, zjištění struktury, regulace a funkce proteinů, čímž významně přispívá k pochopení vzájemných vztahů v biologických systémech. Využití nalézá rovněž při kontrole kvality ve farmaceutickém průmyslu. Často je nutná kombinace více způsobů separace a opakovaných chromatografických módů. V analýze proteinů dominuje chromatografie na obrácené fázi (RPLC, z angl. Reversed Phase Liquid Chromatography). V menší míře, ale stále používané módy jsou hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, z angl. Hydrophilic Interaction Chromatography), iontově výměnná chromatografie (IEC, z angl. Ion Exchange Chromatography) a molekulová vylučovací chromatografie (SEC, z angl. Size Exclusion Chromatography).

Proteiny a peptidy jsou zkoumány z hlediska jejich vlastností, struktury a interakcí, které určují způsob a typ chromatografické separace. Charakter postranního řetězce hraje hlavní roli při chromatografii na obrácených fázích. Díky velkému množství nábojů ve struktuře proteinů se používá iontově výměnná chromatografie využívající izoelektrický bod. Na základě velikosti, se kterou souvisí i terciární struktura a tvar proteinu, pracuje vylučovací chromatografie. Obzvláště vlivem teploty, vysokého nebo nízkého pH a různých detergentů může dojít ke změnám v prostorovém uspořádání makromolekul známé jako denaturace.

Vzhledem k velikosti a kompozici celé struktury se pro zjednodušení analýz používá enzymatická nebo chemická hydrolýza, která rozštěpí protein na několik menších peptidů, a ty jsou následně pohodlněji analyzovány. Jedním z používaných způsobů je kompletní kyselá hydrolýza proteinu, pomocí které je pořízen záznam o celkovém zastoupení aminokyselin v proteinu. Další velmi využívanou technikou je mapovaní peptidů, při kterém je protein podroben nejčastěji enzymatickému štěpení. To vede k získání zástupných peptidů, jejichž analýza poskytuje detailní informace. Jiná úroveň analýzy proteinů zahrnuje použití enzymu, kterým lze specificky odštěpit PTM. Nejčastěji se takto využívá enzym peptidová N-glykosidáza F pro analýzu N-glykanů a získání glykosylačního profilu proteinu [28–31].

3.2.1 Chromatografie na obrácené fázi (RPLC)

Chromatografie na obrácené fázi se stala standardem ve farmaceutické analýze a je nejpoužívanější chromatografický mód pro separaci peptidů, kde nachází nespočet aplikací. Hlavní využití je při analýze na úrovni intaktních proteinů a hlavních fragmentů, nebo mapování peptidů až na úroveň aminokyselin.

Stacionární fáze pro chromatografii s obrácenou fází má hydrofobní charakter. Mobilní fáze je hydrofilní a nejčastěji je tvořena směsí složenou z vody a polárních organických rozpouštědel, jako jsou alkoholy nebo acetonitril. Stacionární fáze je typicky tvořená dlouhým alkylovým řetězcem C_{18} nebo C_8, který je navázán na povrch silikagelu. Princip retence pracuje na základě slabých interakcí mezi hydrofobní stacionární fází a hydrofobními skupinami peptidů. Síla retence je nejslabší u látek s nábojem, následovaná polárními neutrálními látkami a nejvíce jsou zadržovány látky hydrofobní povahy.

Úspěch RPLC jako separační techniky je dán vynikající rozlišovací schopností, která je odvozena od její vysoké chromatografické účinnosti. Rozmanité parametry stacionárních a mobilních fází, které mohou být změněny a optimalizovány, usnadňují oddělení širokého spektra analytů. Klíčovým parametrem RPLC vyžadující pozornost při analýze peptidů je jejich kinetika odporu proti přenosu hmoty. Částice stacionární fáze jsou porézní a mobilní fáze uvnitř pórů stagnuje. Aby molekuly analytu vstoupily do pórů, pohybují se stagnantní mobilní fází pouze difúzí. Ty látky, které proniknou hlouběji do pórů, budou v tomto bodě drženy na různých místech déle. To odpovídá C členu van Deemterovy rovnice. Doba zadržení analytu na stacionární fázi je variabilní, což opět způsobuje změnu doby eluce a rozšíření zóny. Tyto účinky mohou být minimalizovány zmenšením průměru částic, aby byly dráhy uvnitř pórů co nejmenší. Účinky odporu proti přenosu hmoty jsou nižší při menší lineární rychlosti mobilní fáze.

RPLC nabízí nespočet výhod oproti ostatním chromatografickým módům. Výhodou je především zvýšená účinnost, díky které může být analyzováno mnoho látek najednou za relativně krátký čas a ve velmi malých koncentracích. Další výhodou je robustnost chromatografického módu, přesnost metod a přístrojů, předvídatelné retence a eluce analyzovaných látek. RPLC je využitelná pro široké množství látek od nepolárních po polární, někdy také nabité látky. Posledním důležitým parametrem, který může ovlivnit výsledek analýzy, je použití správné detekční techniky. S výhodou se v dnešní době používá přímé spojení s hmotnostním spektrometrem [34–37].

3.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie využívá polární stacionární fázi a převážně organickou mobilní fázi, ve které je obsah vody silným rozpouštědlem. Mechanismus HILIC není stále zcela jasný. Předpokládá se, že vzhledem k polární povaze stacionární fáze se molekuly vody koncentrují na jejím povrchu. K retenci dochází, když se analyt rozděluje mezi objemnou mobilní fází a vodnou vrstvou, která hydratuje hydrofilní stacionární fázi. Stejně tak se na rozdělování analytů v HILIC podílí i jiné molekulární interakce. K nim patří vodíkové můstky a elektrostatické interakce, pomocí kterých jsou analyty schopny interagovat přímo se stacionární fází. Metoda HILIC je považována za alternativu chromatografie na normálních fázích, a i když nenabízí tak širokou selektivitu ve srovnání s RPLC, je stále docela účinnou technikou. Využívá se schopnosti oddělit a rozlišit významné počty píků, dostatečně robustním způsobem. Polární analyty jsou více zadržovány na koloně, tedy v opačném pořadí než v případě RPLC.

Mobilní fáze je typicky tvořena organickou složkou, ale zároveň obsahuje minimálně 3% vodného roztoku. Pokud by obsahovala méně než toto množství, retence by byla obtížná. Nebylo by k dispozici dostatečné množství vody pro vytvoření vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. Rovněž by mělo být dodrženo, aby byla mobilní fáze složena z maximálně 60% vodného roztoku. Větší množství by zapříčinilo, že mobilní fáze by byla příliš polární na to, aby podporovala vypuzování rozpuštěné látky do vrstvy bohaté na vodu.

Při analýze proteinů se HILIC využívá především k hodnocení glykanů. Glykany jsou sacharidové části vázané na protein, který se pak nazývá glykoprotein. Glykosylace proteinových bioléčiv je atributem kritické kvality ovlivňující jejich bezpečnost, účinnost a biologický poločas. Typická analýza spočívá v uvolnění glykanů vhodným enzymem například pomocí již zmiňované peptidové N-glykosidázi F. Výhodou pro analýzu polárních látek pomocí HILIC je možnost přímého spojení s hmotnostním spektrometrem [33][38–40].

3.2.3 Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)

Molekulová vylučovací chromatografie je v oblasti kapalinové chromatografie jedinečná metoda, protože nevyžaduje přímou fyzikálně-chemickou interakci analytu se stacionární fází. Princip SEC je založen na tom, že menší molekuly mohou vstupovat do menších pórů polymerního gelu a jsou v něm tedy déle zadržovány. Analyzované látky

jsou přístupné separaci, jakmile se dostanou k pórům částic na koloně. Proteiny a peptidy jsou objemnější látky a mohou přistupovat pouze k větším pórům. Větší molekuly jsou eluovaných jako první, tudíž mají nejnižší retenční časy.

SEC se rozděluje do dvou dílčích kategorií. První z nich je gelová permeační chromatografie, kde je organická mobilní fáze použita pro transport analytů skrz kolonu a je využitelná pro polymerní látky. Druhá kategorie je gelová filtrační chromatografie, kde se naopak používá vodná mobilní fáze pro transport analytů skrz kolonu. Gelová filtrační chromatografie je použitelná pro separaci polárních látek, tím pádem je vhodná pro separaci peptidů.

SEC je často využívána pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů a pro identifikaci proteinových agregátů. Může být také použita pro potvrzení fragmentace proteinu. Limitacemi masivnějšího používání této metody jsou nízká selektivita, vyšší doba analýzy, malá objemová a hmotnostní kapacita [29][34][35].

3.2.4 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Iontově výměnná chromatografie funguje na základě elektrostatických interakcí. Skupiny na povrchu analyzované látky s určitým nábojem se dostávají k opačným nábojům na stacionární fázi. K dispozici jsou stacionární fáze s negativním nábojem pro udržení pozitivně nabitých látek, nebo jsou stacionární fáze s kladným nábojem pro zadržení záporně nabitých látek. Nejběžnějším způsobem, jak přerušit silnou elektrostatickou interakci mezi analytem a stacionární fází, je použití solného gradientu. Ten poskytuje dostatečně velký počet protiiontů, které mohou interagovat se stacionární fází přednostně před iontovou skupinou analyzované látky. Může být použit i alternativní protiiont, který má větší afinitu pro výměnu iontů a nemusí být v mobilní fázi nutně ve vyšší koncentraci. Dalším způsobem je použití gradientu pH, který deionizuje iontovou skupinu na stacionární fázi nebo na analytu.

Peptidy se skládají z nabitých aminokyselin, které mají jak pozitivní, tak i negativní náboj. Rozpuštěná látka se vstřikuje do mobilní fáze a udržuje náboj na peptidu, který je opačný k tomu na povrchu částic kolony. IEC může být použita jako alternativní technika k RPLC. Využití při analýze peptidu nalézá především k hodnocení posttranslačních modifikací. Ovšem vzhledem k velkému množství přítomných solí se iontově výměnná chromatografie nepoužívá pro přímé spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie [3][43].

3.3 Podmínky pro analýzu peptidů pomocí RPLC

Nejzásadnějšími parametry, které ovlivňují výsledky analýzy peptidů pomocí RPLC, jsou složení mobilní fáze, její polarita, povaha vzorku, typ organického modifikátoru, teplota kolony, typ stacionární fáze, velikost částic stacionární fáze, délka kolony, průtok mobilní fáze a také způsob detekce. Principy a důležité parametry pro optimální výsledek analýzy s typickými operačními podmínkami shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2. Typické podmínky analýzu peptidů (Převzato z [7])

Systém:	**Systém pro ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii**
Kolona:	250 mm × 2,1 mm < 2 µm FPP nebo < 3 µm SPP, C_{18}
Mobilní fáze A:	0,1% TFA
Mobilní fáze B:	0,1% TFA s ACN
Průtok:	300 µl/min
Gradient:	0-2 min: 1% B, 2-35 min: 1-45% B
Teplota na koloně:	60 °C
Detekce:	UV: 214 a 280 nm

3.3.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Současným trendem v kapalinové chromatografii je získání výsledků co nejrychleji, pokud možno při zachování nebo zlepšení citlivosti, účinnosti a rozlišení. K analýze jsou upřednostňovány systémy pro ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC, z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography) ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Standardní HPLC (z angl. High Performance Liquid Chromatography) systém je použitelný pro tlaky do 400 bar. Hlavní požadavek pro práci UHPLC systému je schopnost analýzy za vysokých tlaků, často přesahujících 800 bar, čemuž musí být přizpůsobeny ostatní části včetně spojů, těsnění a nástřikového ventilu. UHPLC je upřednostňována, protože oproti klasickému HPLC systému má vyšší účinnost díky použití kolon s menšími částicemi, užšímu systému kapilárního spojení a optimalizovaným mimokolonovým objemům. Výhodou UHPLC je i nižší spotřeba rozpouštědel, vzorku a jednoduchý transfer metod vyvinutých pro HPLC [44–46].

3.3.2 Mobilní fáze

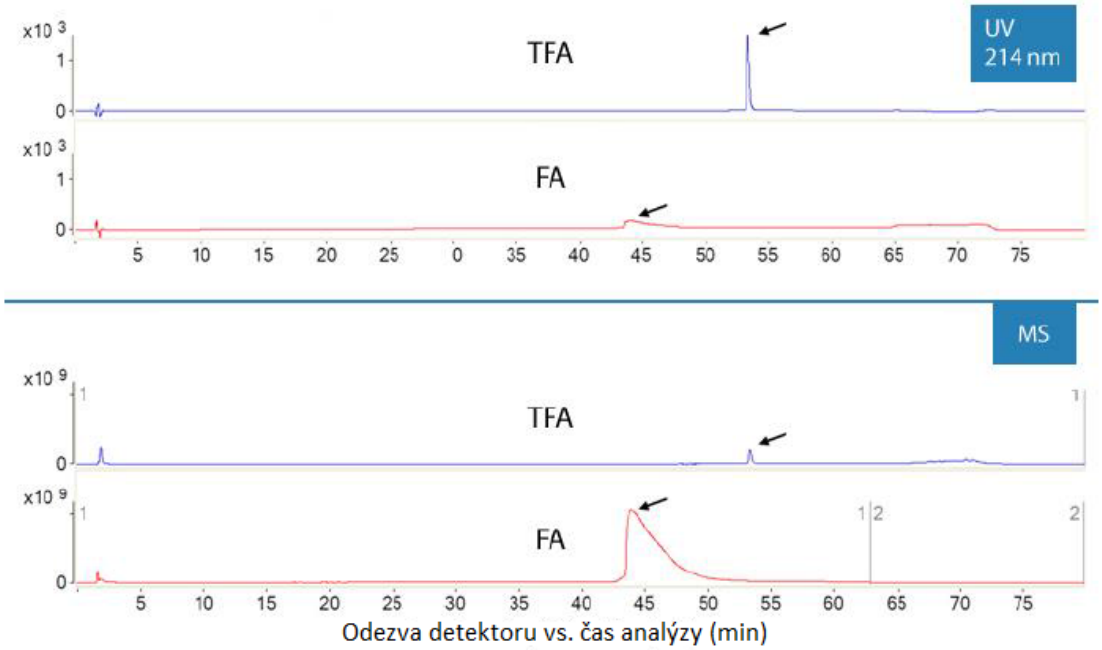
Mobilní fáze je první parametr, kterým lze ovlivnit separaci peptidů. S výhodou jsou používány polární mobilní fáze. Dominantní postavení má stále čistá voda. Při

analýze peptidů je mobilní fáze nejméně měněný parametr, v porovnání s analýzou malých molekul, kde je obměna velmi častá. Mnohdy je to zanedbávaný parametr, který má zajisté vliv na chromatografickou selektivitu a účinnost. Především použití organického modifikátoru jako složka mobilní fáze B může pozitivně ovlivnit výsledek separace. Nejrozšířenější je použití acetonitrilu (ACN), který je metodou volby a je využíván téměř univerzálně. ACN redukuje viskozitu, snižuje polaritu a je možné jej používat pro UV (z angl. Ultraviolet) detekci v krátkých vlnových délkách. Pokud není dosaženo dostatečné selektivity prostřednictvím ACN, může být nahrazen nebo kombinován s přídavkem propanolu. Úplná náhrada je však výjimečná. Chromatografická selektivita analytu je spíše poháněna jeho rozpustností v mobilní fázi než sklonem k interakci se stacionární fází [7][37][47].

3.3.3 Aditiva mobilní fáze

Velmi častou modifikací v oblasti mobilní fáze je přídavek aditiv. V analýze peptidů se s výhodou používá kyselina trifluoroctová. Jako další aditivum se používá kyselina mravenčí. Přídavek TFA do mobilní fáze má při separaci peptidů mnoho výhod. Zaprvé udržuje nízké pH, aby se zajistilo, že aminokyseliny jsou v jediné iontové formě. V podstatě snižuje pH dostatečně pod pKa všech zbytkových silanolových zbytků na povrchu kolon a inhibuje nežádoucí sekundární interakce mezi protonovanými bazickými skupinami a povrchem deprotonovaného oxidu křemičitého, který může vést k chvostování píku. TFA jako aditivum mobilní fáze má navíc významný přínos v podpoře retence vytvořením iontového páru. Existují dvě běžně přijímané teorie, kterými je vysvětlováno fungování iontového páru. Prvním způsobem je spojení s nabitým analytem a tvorbou neutrálního nebo méně nabitého páru v roztoku. Toto snížení celkového náboje zvyšuje hydrofobicitu, a tím i retenci analytu. Upřednostňovaná alternativní teorie udává, že hydrofobní část iontově párového činidla přítomného v obrovském přebytku se váže na ligand stacionární fáze. To umožňuje zvýšenou retenci prostřednictvím interakce iontové výměny nabité části iontově párového činidla a nabitých míst na analytu. V porovnání obou aditiv při UV detekci poskytuje TFA jasně lepší výsledky než FA. Situace je však odlišná při MS detekci, jak je vidět na obrázku 2. TFA potlačuje tvorbu iontů při ionizaci elektrosprejem. K tomu dochází, když TFA zůstává spojená s ionty rozpuštěných látek po přechodu z kapaliny do plynné fáze v iontovém zdroji. To vede k výraznému snížení odezvy MS ve srovnání s FA a odpovědi

detektoru s použitím FA jsou v průměru řádově vyšší než u TFA. Kyselina mravenčí je vhodnější volbou, protože je dostatečně těkavá a disociuje z rozpuštěného iontu, když se dostává do fázového rozhraní z kapaliny na plyn. Navíc 0,1% FA má o něco vyšší pH než 0,1% TFA a vytváří méně agresivní prostředí pro analýzu [7][48].



Obrázek 2. Porovnání odezvy UV a MS detektoru při použití TFA a FA. (Převzato z [7])

3.3.4 Gradient

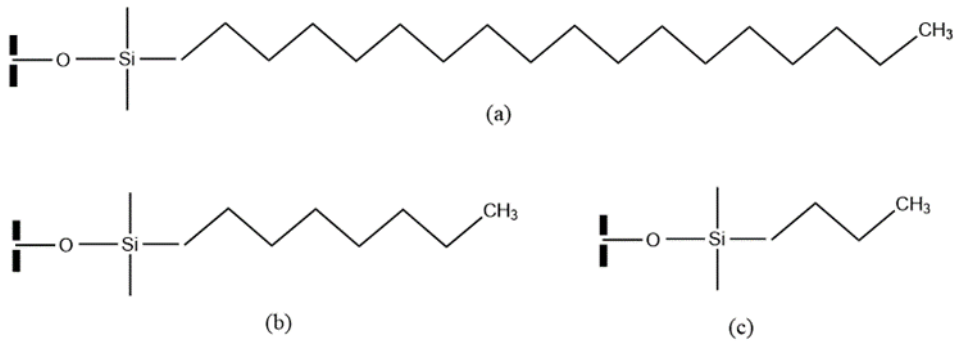
Podle povahy separovaných analytů může probíhat jejich separace za podmínek izokratické nebo gradientové eluce. Při izokratické eluci je složení mobilní fáze po celou dobu separace stejné. Při gradientové eluci se složení mobilní fáze během analýzy mění a je zvyšován obsah složky s vyšší eluční účinností. Gradient se využívá při dělení směsi analytů s rozdílnými elučními vlastnostmi. Zvyšování obsahu složky mobilní fáze s vyšší eluční účinností vede ke zkrácení neúměrně dlouhých analýz. Získané píky jsou užší, lépe se hodnotí a spotřeba organických rozpouštědel je nižší.

Platí přímá úměra, čím větší je molekulová hmotnost analytu, tím více může být ovlivněna separace již malými změnami gradientu. Malé molekuly nejsou tak náchylné ke změnám, jako ty středně až velké molekuly, ke kterým se peptidy řadí. Stupeň, kterým jsou analyty ovlivněny, je řízen jejich hodnotou parametru s. Tato hodnota je definovaná jako směrnice přímky v grafu, kde je vynesen logaritmus retenčního faktoru látky proti změně složení mobilní fáze.

Kapacita píku neboli počet píků, které mohou být teoreticky odděleny během chromatografického módu, je nepřímo úměrná době trvání. Čím menší je tedy změna mobilní fáze nebo delší doba trvání gradientu, tím větší je rozlišovací schopnost. Tento vztah však není lineární. Zhruba po 100 minutách je přínos maximální kapacity mnohem menší, jak doba gradientu stále roste a po 150 minutách je již zanedbatelná. Může se zdát, že ideální výchozí nastavení času je 150 minut, ovšem produktivita je výrazně snížena. Proto se doporučuje, aby doba gradientu a jeho složení byly empiricky optimalizovány pro každou separaci [48][49].

3.3.5 Stacionární fáze

Stacionární fáze tvoří základní složku chromatografického systému a je charakterizována jako nepohyblivá část, na které dochází k separaci analytů. Standardní metoda volby pro analýzu peptidů je chromatografie na obrácené fázi. To znamená použití stacionární fáze obsahující silikagel s chemicky vázanými dlouhými alkylovými řetězci. Řetězce mohou být různě dlouhé od 2 uhlíků až do 30 uhlíků. Jsou to univerzálně použitelné stacionární fáze vhodné pro analýzu polárních i nepolárních látek. Ligandy stacionární fáze s přímým alkylovým řetězcem jsou nejběžnější. Nejpoužívanější je stále chemicky vázaný alkyl C_{18} (oktadecylsilikagel), následovaný alkylem C_8 a C_4 (Obrázek 3). Obecně platí, že čím větší je analyt, tím je vhodnější použití kratšího uhlíkového řetězce.



Obrázek 3. Nejčastěji užívané chemicky vázané stacionární fáze: (a) C_{18}, (b) C_8, (c) C_4.

Existuje několik alternativ ve složení stacionární fáze, které mohou nabídnout lepší podmínky pro separaci. Difenylová stacionární fáze obsahuje krátký alkylový řetězec usnadňující hydrofobní interakci, ale hlavní mechanismus retence je přes fenylové funkční skupiny. Konkrétně se jedná o π-π interakce mezi aromatickými skupinami

a skupinami obsahujícími dipól. To umožňuje zvýšenou retenci polárních a aromatických zbytků.

Prakticky každá chemicky vázaná stacionární fáze má zbytkové polární silanolové skupiny. I přes to, že většina volných silanolových skupin je stericky nedostupných pro separované látky, některé jsou dostupné pro interakce s analytem a mobilní fází pomocí vodíkového můstku, interakce dipól-dipól a iontové výměny. Vlivem těchto jevů jsou především bazické látky déle zadržovány na koloně a mají tendenci k chvostování píků. S rostoucí hodnotou pH mobilní fáze je vliv zbytkových silanolových skupin větší. Jedním z řešení, jak předcházet těmto nežádoucím jevům je modifikace stacionární fáze zvaná endcapping. Jedná se o fyzikálně-chemický proces, který eliminuje množství volných silanolových skupin na nepolární fázi často reakcí s trimethylchlorsilanem. Trimethylchlorsilan je menší molekula než oktadecylchlrosilan, lépe se tak dostane k volným silanolovým skupinám a dokáže tyto skupiny zastínit. Jelikož s takto modifikovanou stacionární fází existuje větší riziko hydrolýzy navázaných ligandů, je aplikována dvojvazná modifikace bidentátní vazbou pomocí propylenového můstku.

Zvýšení stability zejména proti nízkým hodnotám pH mobilní fáze je možné dosáhnout zastíněním volných silanolových skupin objemnými alkyly jako diisobutyl nebo diisopropyl.

Stacionární fáze by měla splňovat obecné požadavky, především chemickou a teplotní stabilitu. Při styku s mobilní fází by nemělo docházet ke změně vlastností, které by mohly vést ke změnám citlivosti detekce. K nežádoucím změnám ve vlastnostech samotné stacionární fáze může docházet použitím nevhodných mobilních fází nebo vysokých teplot [7][47][50].

3.3.6 Průměr kolony

Vnitřní průměr kolony je další parametr, kterým se dá ovlivnit separace. Jakmile průměr kolony klesá, zvyšuje se mez stanovitelnosti a klesá spotřeba rozpouštědel. To je způsobeno snížením mimokolonového objemu doprovázeného menším ředěním vzorku a podélnou difúzí, ale také v důsledku nižších objemových průtoků. Nárůst koncentrace píků téměř až o čtyři řády je teoreticky dosažitelný na nanoLC. I když lze dosáhnout významné zvýšení citlivosti, tak velmi malé objemy a požadované vybavení jsou problematické pro separaci. Ale vzhledem k tomu, že v biofarmaceutické analýze je

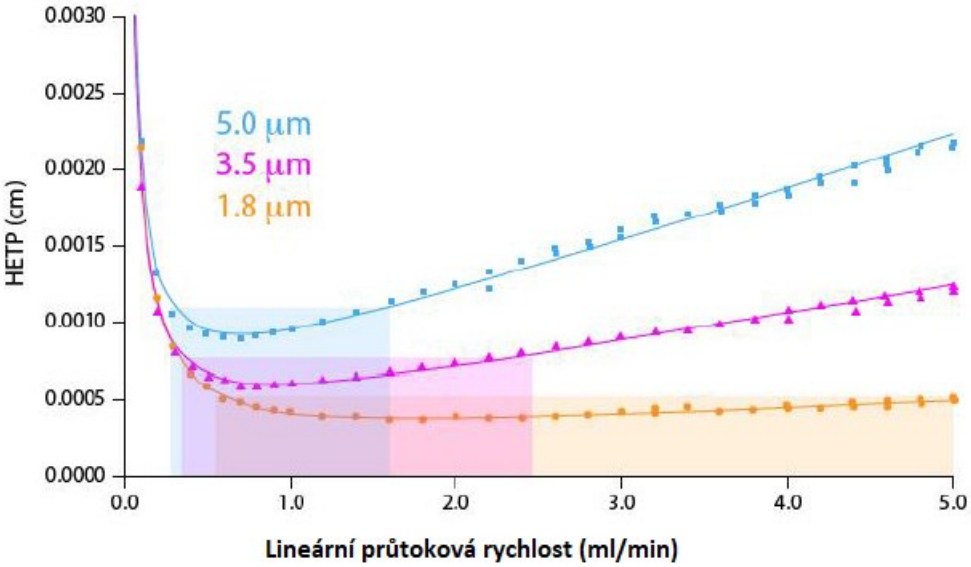
k dispozici větší množství vzorků, jsou výhody nanoLC zanedbatelné. Zejména pokud jsou kombinovány různé techniky separace [7].

3.3.7 Průtok mobilní fáze

Rychlost průtoku mobilní fáze, nebo také lineární rychlost toku mobilní fáze, je další parametr vyžadující empirickou optimalizaci. Zvýšení rychlosti průtoku má přímý vliv na zlepšení účinnosti separace. Nelze s jistotou říct jaký průtok je nejlepší. Rychlost průtoku by měla být vždy empiricky studována a optimalizována. Mnohem více záleží na velikosti částic uvnitř kolony a vnitřním průměru kolony. Obvyklé průtoky pro separaci peptidů jsou 200 až 300 µl/min pro 2,1 mm kolony. Pro kolony s širšími vnitřními průměry je nutné používat adekvátně vyšší hodnoty průtoku [3][44].

3.3.8 Typ a velikost částic stacionární fáze

Co se týče chromatografické účinnosti, rychlosti a schopnosti pracovat při vyšších objemových průtocích jsou s výhodou využívány malé, kulovité, plně porézní částice (FPP, z angl. Fully Porous Particles). Zvýšená účinnost vlivem menších částic může být znázorněna van Deemterovými křivkami (Obrázek 4). Z obrázku vyplývá, že při použití menších částic je dosaženo nižšího výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP, z angl. High Equivalent to a Theoretical Plate), tím pádem i vyšší separační účinnosti.



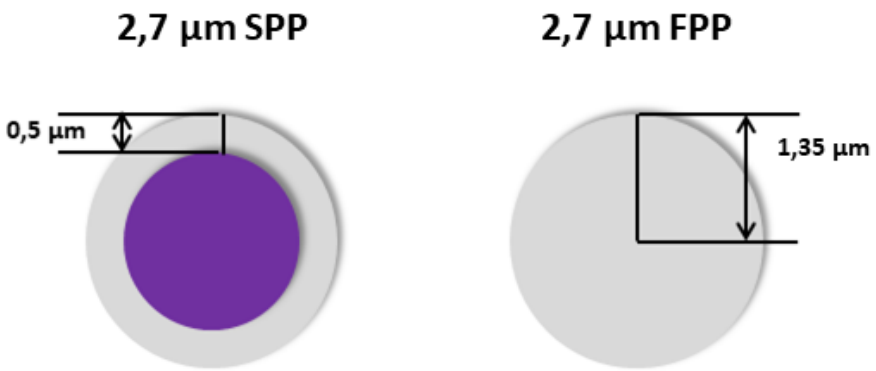
Obrázek 4. Van Deemterova křivka pro různě veliké plně porézní částice. Oblasti vybarvení příslušnou barvou znázorňují optimální průtok pro dosažení maximální separační účinnosti. (Převzato z [7])

Další výhoda částic s menším průměrem spočívá v tom, že při získání nejnižšího HETP se jeho velikost při vyšších průtocích zvyšuje mnohem méně než u větších částic. Toho se v praxi může využít pro zkrácení analýzy za použití vyššího průtoku při zachování vysoké separační účinnosti. Nevýhodou je naopak zvětšení zpětného tlaku, jelikož částice s menším průměrem vytvářejí větší odpor vzhledem k toku mobilní fáze.

Jak bylo zmíněno výše, zmenšování částic až pod 2 µm přináší zvýšení účinnosti, ale také zvyšuje zpětný tlak v systému. Výhodou povrchově porézních částic (SPP, z angl. Superficially Porous Particles) oproti plně porézním částicím, je podobná účinnost jako u FPP částic menších než 2 µm. Ale protože jsou SPP zhruba o polovinu větší, tak pracují při nižších zpětných tlacích a mohou být použity delší kolony. Moderní SPP se skládají z velmi tenké vrstvy 0,5 µm, která je potažena na přibližně 2,7 µm pevné kulovité jádro.

Důležitým faktorem, který je při separaci peptidů také třeba vzít v úvahu, je střední šířka pórů částic. Pro hodnotu velikosti pórů se využívá jednotka Ångström, značená symbolem Å (1 Å = 0,1 nm). Většina separací malých molekul se provádí na částicích s šířkou pórů 80–120 Å. To umožňuje snadný vstup, pohyb a výstup rozpuštěných látek menších jak 1000 Da z pórů. Při analýze peptidů a malých proteinů se obecně doporučuje velikost pórů v rozmezí 100–300 Å. Minimální velikost pórů pro separaci objemných proteinů je navrhována 300 Å. Pokud je velikost pórů příliš malá, dochází k rozšíření píku. Je to proto, že póry nejsou dostatečně široké, aby umožnily vstup analytů a tím pádem nejsou molekuly proteinu náležitě zadrženy na koloně.

Skutečný přínos SPP se týká v prvé řadě separací větších molekul, včetně peptidů. Výrazné snížení hloubky pórů redukuje difuzní dráhu. Porovnání obou typů částic je na obrázku 5.

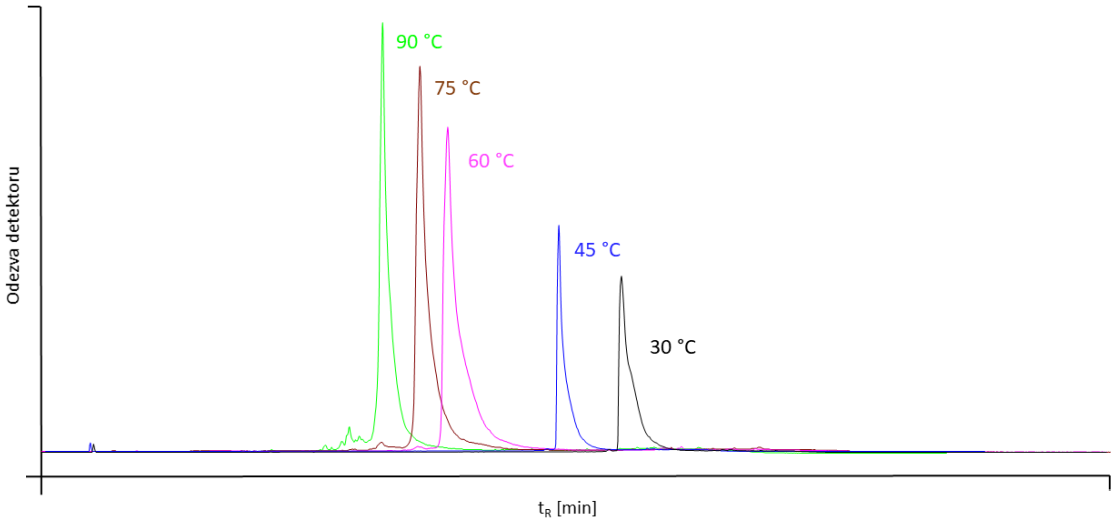


Obrázek 5. Porovnání 2,7 µm SPP a FPP částice.

Tyto výhody jsou optimálně využívány při vyšších než standardních objemových průtocích a umožňují nepřetržitý nárůst průtoku s pouze minimálními dopady na účinnost [3][47][51].

3.3.9 Teplota kolony

Teplota kolony, nebo přesněji teplota mobilní fáze uvnitř kolony, je další klíčový parametr, který vyžaduje pro zvýšení účinnosti citlivou optimalizaci. Pro zlepšení podmínek separace byl v minulosti tento aspekt často zanedbáván. Zvýšená teplota byla při analýze peptidů používána zejména pro snížení zpětného tlaku na koloně a další výhody byly opomíjeny. Možná to bylo způsobeno tím, že stabilita klasického silikagelu nebyla vhodná pro analýzy za vyšších teplot. Hlavním přínosem zvýšené teploty je zrychlená difuze velkých molekul, protože teplota přímo nebo nepřímo přes viskozitu mobilní fáze difúzní koeficient výrazně snižuje. Další výhody vyšší teploty kolony zahrnují zlepšenou *cis*/*trans* izomerizaci prolinu a účinnější vymytí látek z kolony. Jelikož klesající viskozita má vliv na zpětný tlak v systému, je s výhodou možné použití vyššího průtoku a delší kolony obsahující menší částice. Zvýšená teplota tedy významně zvyšuje účinnost analýzy, tím pádem jsou píky vyšší, užší a celkový čas analýzy může být kratší (Obrázek 6).



Obrázek 6. Porovnání vlivu teploty na účinnost separace.

Zvýšená teplota má i pozitivní vliv na použití menšího množství organických modifikátorů v mobilní fázi, což šetří životní prostředí a finanční prostředky. Bylo prokázáno, že zvýšení teploty o 2 až 6 °C může snížit přídavek organického modifikátoru

o 1%. Běžně používané teploty se pohybují okolo 40 °C, ale nezvyklé nejsou ani použité teploty přes 100 °C.

Nicméně je důležité zmínit také nevýhody zvýšené teploty. Stacionární fáze, peptidové vazby a postranní řetězce aminokyselin mohou být při delších analýzách za zvýšené teploty náchylné k degradaci [44][48][52][53].

3.3.10 Detekce

Pro úspěšnou chromatografickou analýzu je vyžadován správný výběr detektoru. Moderní chromatografické systémy nabízejí možnost připojit více detektorů, které splňují nároky na univerzálnost, reprodukovatelnost, citlivost, linearitu odezvy a v případě gradientové eluce nezávislost odezvy na složení mobilní fáze. V současné době je hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením pro analýzu peptidů detekční technikou volby. Mezi další široce používané detektory patří spektrofotometrické detektory a univerzální detektory na bázi aerosolu [54][55].

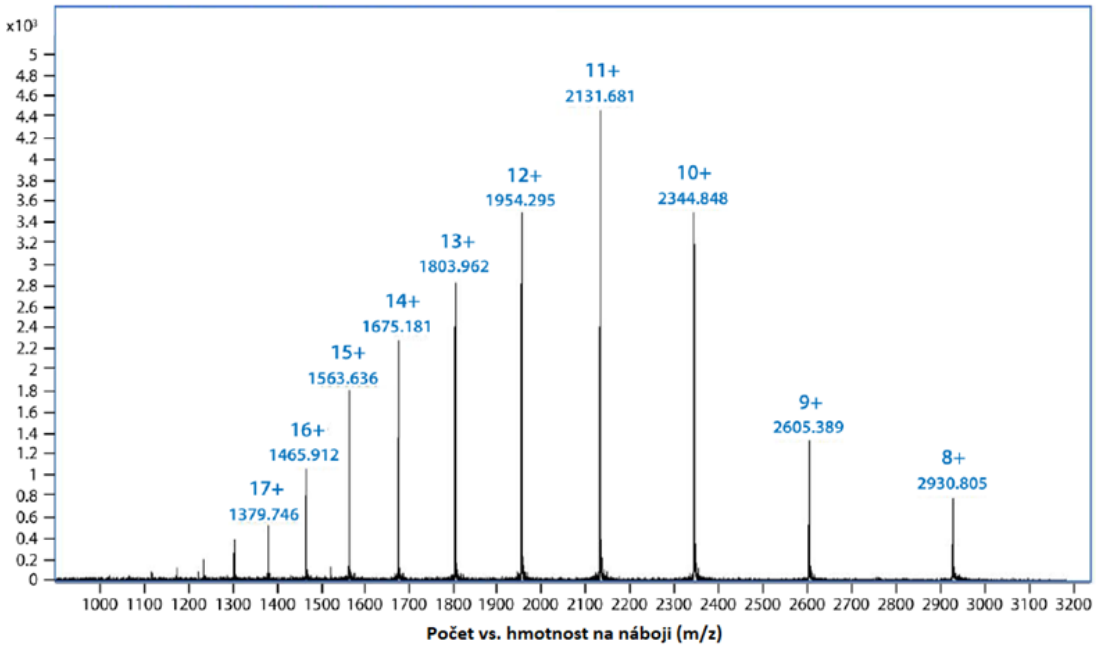
3.3.10.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie hraje důležitou roli v analýze a charakterizaci peptidů. Princip hmotnostního spektrometru spočívá v tom, že analyzované látky jsou převedeny na ionty a ty jsou separovány podle poměru relativní molekulové hmotnosti a počtu nábojů (*m/z*). Pomocí MS může být charakterizována přesná molekulová hmotnost, sekvence aminokyselin, popis N- a C-konce, disulfidové můstky, glykanová struktura, profil posttranslačních modifikací a další. Tyto analýzy vyžadují přístroje s vysokým rozlišením s možnostmi provádění MS/MS experimentů. Zkušenosti s technologiemi MS vedly ke zvýšenému používání hybridních systémů. Tradičně to bývalo spojení kvadrupólu s analyzátorem doby letu. V dnešní době je pro analýzu peptidů preferována harmonická orbitální past, pro kterou se mezi uživateli vžilo označení orbitrap.

MS je často spojena s celou řadou chromatografických a elektroforetických technik, a to buď on-line, nebo již méně často off-line. Zatímco RPLC a HILIC jsou přímo kompatibilní s MS, tak IEC a SEC chromatografie pro přímé spojení nejsou vhodné. IEC a SEC využívají netěkavých solí vyžadující odsolování nebo použití dvoudimenzionální chromatografické separace.

Proteiny nesou velký počet nábojů, proto spektrum nevykazuje jen jednu hodnotu *m/z* a vytváří charakteristickou obálku (Obrázek 7). Čím větší je molekula, tím vyšší je počet nábojů. Spektra jsou charakterizována normálním rozložením intenzit kolem

základního piku a zvýšeným odstupem mezi píky s rostoucí hodnotou *m/z*. Proto při vyšších hodnotách *m/z* každý pík představuje o jeden náboj méně než jeho bezprostřední soused.



Obrázek 7. Ukázka typického spektra proteinu s distribucí různých nábojových stavů. (Převzato z [7])

Spektrum může být použito pro výpočet molekulové hmotnosti proteinů na základě sousedních hodnot *m/z*. Ve skutečnosti je u velkých molekul stav náboje často neznámý. Nicméně, když vezmeme v úvahu, že dva sousední píky se liší jedním nábojem, stav nabití může být ze spektra snadno vypočítán. V současné době je stanovení molekulové hmotnosti proteinů dosahováno automaticky pomocí softwaru.

Analýzy pomocí MS můžou být provedeny na intaktních proteinech nebo jejich fragmentech a jsou kategorizovány jako top-down, middle-down, middle-up nebo bottom-up v závislosti na typu analýzy a finální povaze látek, ze kterých je MS nebo MS/MS spektrum získáno. Analýza intaktních proteinů poskytuje informace o proteinu jako celku, v některých případech včetně terciární a kvartérní struktury. Pro získání informací o modifikacích musí být protein rozštěpen na menší části za použití enzymů nebo redukčních činidel. Tyto kratší úseky pak mohou být analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru a jsou nazývané jako up metody. Naopak metody typu down analyzují celý protein fragmentací přímo v plynné fázi uvnitř hmotnostního spektrometru. Menší fragmenty jsou přístupnější chromatografické a MS analýze, a tím usnadňují identifikaci modifikací na konkrétních místech. Každá technika má své výhody

a nevýhody z hlediska poskytovaných strukturálních informací, pokrytí sekvence, spotřeby vzorků a jednoduchosti analýzy. Kvůli komplementárnosti informací se plná charakterizace proteinů často provádí s použitím různých metod [51][56–59].

Způsoby ionizace

Většina MS aplikací používá elektrosprejovou ionizaci (ESI, z angl. Electrospray Ionization), která se normálně provádí za denaturačních podmínek v prostředí organických rozpouštědel a kyselin. V poslední době roste zájem také o nativní ESI, která používá těkavé pufry s neutrálním pH. ESI je optimální technika pro ionizaci velkých makromolekul a umožnuje vícenásobné nabití. V případě peptidů jsou aminy vynikající akceptory protonů. Peptidy a proteiny jsou typicky analyzovány s použitím pozitivního ESI. Pozitivní náboje se tvoří na N-konci řetězce a na vedlejších aminokyselinových řetězcích. Karboxylové kyseliny mohou darovat kyselý proton z hydroxylové skupiny za vzniku negativního iontu a slouží k pořízení negativního záznamu. Ionizace pomocí laserové desorpce za účasti matrice (MALDI, z angl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) byla také aplikována na studium peptidů, ale tato technika je dnes spíše na ústupu. Omezené nabíjení proteinů v MALDI zdroji vyžaduje pro detekci vysokých hodnot *m/z* použití hmotnostních analyzátorů doby letu (ToF, z angl. Time of Flight) v lineárním režimu s nízkým rozlišením [55][16].

Analyzátor doby letu (ToF)

Ve srovnání s mnoha jinými typy analyzátorů jsou základní principy analyzátoru doby letu relativně jednoduché. Ionty jsou produkovány v krátkých dávkách uvnitř zdroje iontů a jsou vystaveny zrychlujícímu napětí. Jakmile se ionty uvolní ze zdroje, začnou se pohybovat rychlostí, která závisí na jejich hmotnosti a náboji. Ionty pak letí v evakuované trubici o stanovené délce. Obecně platí pro jednou nabité ionty (z=1), že čím větší je hmotnost iontu, tím pomaleji bude letět k detektoru. Proces je velmi rychlý v širokém rozmezí *m/z*, díky čemuž je možná analýza vysokomolekulárních látek. Aby bylo dosaženo vysokého rozlišení, musí být instrument vybaven tzv. reflektronem. Pro ionty se stejnou hodnotou *m/z* funguje k vyrovnání různé počáteční kinetické energie. Jednoduchý ToF není konstruován k provádění fragmentací. To je možné jen v tandemovém uspořádání jako ToF/ToF nebo v hybridním systému s kvadrupólem [60][16].

Harmonická orbitální past (orbitrap)

Princip orbitrapu je založen na orbitální oscilaci iontů. Ionty se pohybují kolem centrální elektrody a zároveň oscilují podél horizontální osy. Orbitrap je složený ze dvou speciálně tvarovaných elektrod, a to střední vřetenovité a vnější soudkové elektrody. Obě elektrody jsou připojeny na nezávislé napájecí zdroje. Vnější elektroda je rozdělena na dvě části, jednu pro excitaci iontů a druhou pro detekci. Prostor mezi vnitřní a vnější elektrodou tvoří měřicí komora, která je spojena s vakuovým systémem. Pokud je vyžadován dobrý signál a vysoké rozlišení, pak ionty každé hmoty musí mít koherentní pohyb, čehož je dosaženo vstřikováním ve velmi krátkých intervalech. Po aplikaci napětí ionty s dostatečnou tangenciální rychlostí krouží kolem a podél vřetenovité elektrody. Orbitrap pracuje s dobrou citlivostí, přesností a vysokou rozlišovací schopností [3][61].

Analyzátor s Fourierovou transformací iontové cyklotronové rezonance

Analyzátor s Fourierovou transformací iontové cyklotronové rezonance určuje poměr hmotnosti k náboji na základě cyklotronové frekvence iontů v silném magnetickém poli a poskytuje bezkonkurenční rozlišení s vysokou přesností hmoty. Mohou být použity různé ionizační techniky včetně MALDI, elektrospreje, nebo chemické ionizace. Než jsou ionty transportovány do cely, jsou zaostřeny a akumulovány s použitím řady hexapólů a kvadrupólů. V cele jsou ionty zadrženy, analyzovány a detekovány. Cela je umístěna v silném magnetickém poli, které je generováno pomocí supravodivého magnetu. Nabité částice se pohybují cyklotronovým pohybem v přítomnosti magnetického pole a rychlostní složky, která je kolmá k ose magnetického pole a je známá jako Lorentzova síla. Frekvence cyklotronu souvisí s poměrem *m/z*. K detekci dochází, když ionty procházejí dvěma destičkami detektoru. Protože frekvence cyklotronu je vztažena k hodnotě *m/z*, je možné vytvořit graf a provést kalibraci. Výsledkem je hmotnostní spektrum s intenzitou signálu vynesenou jako funkce *m/z* [43][56].

3.3.10.2 Spektrofotometrický detektor

UV nebo VIS (z angl. Visible) detektor se řadí mezi spektrofotometrické detektory, které pracují na základě absorpce záření v rozmezí vlnových délek 190 až 800 nm. Tyto detektory disponují dobrou citlivostí a vysokou robustností pro velké množství látek, které obsahují ve své struktuře chromofor. Zdrojem záření pro UV oblast

(200-400 nm) je deuteriová výbojka a pro VIS oblast wolframová lampa. Monochromátor slouží k výběru monochromatického záření vybrané vlnové délky.

První detektory byly s fixní vlnovou délkou, ale v současnosti se již téměř nepoužívají. Zdrojem záření byla rtuťová výbojka, která umožnovala detekci látek o vlnové délce 254 nm. Dalším typem jsou detektory s proměnnou vlnovou délkou, které umožňují změnu vlnové délky během analýzy pro dosažení nejvyšší citlivosti a selektivity. Složitějším typem jsou detektory s diodovým polem, které se skládají z pole fotodiod, obvykle v počtu 512 nebo 1024. Výhodou těchto detektorů je, že během analýzy dokáží pořídit záznam celého spektra a zvolit nejlepší vlnovou délku pro detekci libovolného analytu. Takové detektory dovolují objevit eventuální koeluci a zjistit čistotu píku [47][54][62][63].

3.3.10.3 Detektor nabitého aerosolu

Detektor nabitého aerosolu (CAD, z angl. Charged Aerosol Detector) se řadí spolu s odpařovacím detektorem rozptylu světla a nano kvantitativním analytovým detektorem mezi univerzální detektory na bázi aerosolu. Výhodou těchto moderních detektorů je, že umožňují detekci nezávisle na fyzikálně-chemických vlastnostech analytů. To je výhodné zvláště u analytů s absencí chromoforu. Fungování detektoru se skládá z několika fází. Při nebulizaci je eluát z kolony zmlžen proudem dusíku. Kapky aerosolu jsou následně proudem dusíku neseny do odpařovací komůrky, kde je rozpouštědlo zcela odpařeno. Z tohoto důvodu musí být v mobilních fázích používána jen těkavá aditiva. V další fází dochází k nabití částeček analytu korónovým výbojem. V kolektoru předávají nabité částice náboj za vzniku proudu, který je zaznamenáván elektrometrem [54][55][64–66].

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Acetonitril pro LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)
Voda pro LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina trifluoroctová pro LC-MS, čistota ≥ 99,8% (Merck KGaA, Německo)
Kyselina mravenčí pro LC-MS, čistota ≥ 98% - 100% (Merck KGaA, Německo)
iRT peptidy, čistota ≥ 98% (Shanghai Royobiotech, Čínská lidová republika)
Hovězí sérový albumin, čistota ≥ 98% (Sigma-Aldrich, USA)
Koňský myoglobin, čistota ≥ 90% (Sigma-Aldrich, USA)
Ramucirumab, léčivý přípravek Cyramza 10 mg/ml (Eli Lilly and Company, USA)
NIST referenční materiál monoklonální protilátky č. 8671 (National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce, USA)

4.1.2 Přístroje

UHPLC systém s CAD detektorem Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA).
Ze systému byly v rámci diplomové práce použity tyto moduly:
UltiMate 3000 RS Pump HPG-3400RS
UltiMate 3000 RS Autosampler WPS-3000TRS
UltiMate 3000 RS Column Compartment TCC-3000RS
Corona ultra (CAD detektor)
UltiMate 3000 RS Pump HPG-3200RS (externí pumpa)
Ovládací software: Chromeleon console

UHPLC systém Vanquish Horizon spojený s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X (Thermo Scientific, USA)

4.1.3 Kolony

Kolona s plně porézními částicemi:
Acquity UPLC CSH C_{18} 130Å, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm (Waters, USA)

Kolony s povrchově porézními částicemi:

Poroshell 120 SB-C_{18} 120Å, 2,7/0,5 µm*, 2,1 × 100 mm (Agilent Technologies, USA)

bioZen Peptide XB-C_{18} 100Å, 1,7/0,2 µm*, 2,1 × 150 mm (Phenomenex, USA)

Halo Protein ES-C_{18} 400Å, 3,4/0,2 µm*, 2,1 × 150 mm (Advanced Materials Technology, USA)

BioResolve RP mAb Polyphenyl 450Å, 2,7/0,4 µm*, 2,1 × 150 mm (Waters, USA)

* Průměr částic/hloubka porézní vrstvy

Dále budou pro zjednodušení uváděny údaje o koloně bez velikosti pórů a velikosti částic.

4.2 Experimentální část

4.2.1 Příprava mobilních fází

- Mobilní fáze A: H_2O + 0,1% FA (0,1% TFA)

K přípravě 400 ml 0,1% roztoku kyselin bylo k vodě v odměrném válci přidáno 400 µl kyseliny mravenčí nebo 400 µl TFA. Objem byl poté doplněn vodou na 400 ml.

- Mobilní fáze B: ACN + 0,1% FA (0,1% TFA)

K přípravě 400 ml 0,1% roztoku kyselin bylo k acetonitrilu v odměrném válci přidáno 400 µl kyseliny mravenčí nebo 400 µl TFA. Objem byl poté doplněn acetonitrilem na 400 ml.

4.2.2 Parametry LC analýz na systému Dionex UltiMate 3000

4.2.2.1 Ověření vlivu teploty na účinnost separace iRT peptidů

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit vliv teploty na účinnost separace peptidů na dvou typech stacionární fáze. Použité zásobníky mobilní fáze korespondovaly se zadáním v metodě, tzn. A: vodná fáze, B: organická fáze. Aby byla v pumpách rychle obnovena mobilní fáze a byly odstraněny případné bubliny při každé výměně zásobních lahví s mobilními fázemi, pumpy byly 120 s promyty průtokem 8 ml/min. Tok za pumpami byl odkloněn do odpadu, aby nedošlo k překročení maximálního tlaku systému. Vzniku bublin během analýz zamezoval předřazený odplyňovač mobilních fází. Následovala příprava programu gradientové separace v ovládacím softwaru dle tabulky 3.

Tabulka 3. Program gradientové separace v rámci 22 min metody.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B
0,0	0,3	100	0
12,0	0,3	52	48
12,5	0,3	40	60
13,5	0,3	40	60
14,0	0,3	100	0
22,0	0,3	100	0

Analýza byla prováděna na třech kolonách Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm, Poroshell 120 SB-C_{18} 2,7 µm, 2,1 × 100 mm a bioZen Peptide XB-C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm při pěti teplotách 30, 45, 60, 75, 90 °C. Separace probíhala v mobilní fázi A o složení H_2O s 0,1% FA a v mobilní fázi B o složení ACN s 0,1% FA. Vzorek peptidů o velikosti nástřiku 1 µl byl vstřikován do mobilní fáze s průtokem 0,3 ml/min a výsledek separace byl detekován pomocí CAD.

4.2.2.2 Ověření stability peptidových vazeb na modelových proteinech pomocí kombinace mobilních fází s FA a TFA

Aby mohlo být na koloně Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm indukováno štěpení peptidových vazeb modelových proteinů v prostředí 0,1% FA a zároveň mohly být z kolony účinně eluovány proteiny, byla vyzkoušena možnost využití dvou binárních pump. Do systému byla připojena externí pumpa, která nám umožnila dávkovat další dvě mobilní fáze. Mobilní fáze A byla vodná složka a mobilní fáze B byla tvořena ACN. První pumpa doručovala gradient tvořený mobilními fázemi s 0,1% FA a druhá pumpa doručovala gradient tvořený mobilními fázemi s 0,1% TFA, kterými měly být z kolony eluovány proteiny. Program gradientů je popsáno v tabulkách 4 a 5 umístěných níže. Externí pumpou byla usnadněna separace degradačních produktů i parentní látky. Separace byla prováděna při teplotě 90 °C a velikost nástřiku byla 1,0 µl. Způsob detekce byl stejný jako u předchozí analýzy na detektoru CAD.

Tabulka 4. Program gradientové separace mobilními fázemi s 0,1% FA.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B
0	0,3	100	0
2	0,3	100	0
3	0,3	100	0
4	0,05	100	0
30	0,05	100	0
31	0,3	100	0
32	0,3	100	0
34	0,3	100	0
46	0,3	52	48
46,5	0,3	40	60
50,5	0,3	40	60
51	0,3	100	0
60	0,3	100	0

Tabulka 5. Program gradientové separace mobilními fázemi s 0,1% TFA.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B
0	0,05	100	0
2	0,05	100	0
3	0,05	100	0
4	0,3	100	0
30	0,3	100	0
31	0,3	100	0
32	0,3	100	0
34	0,3	100	0
46	0,3	52	48
46,5	0,3	40	60
50,5	0,05	40	60
51	0,05	100	0
60	0,05	100	0

4.2.2.3 Výběr vhodného modelového proteinu

Pro další experiment bylo třeba vybrat ideální látku proteinové povahy k testování stability peptidové vazby za zvýšené teploty kolony. Separace probíhala na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm při teplotách 30, 45, 60 °C. Eluce byla prováděna v prostředí mobilní fáze A o složení H_2O s 0,1% FA a v mobilní fázi B o složení ACN s 0,1% FA. Program gradientu je uveden v tabulce 6. Vzorek byl detekován na CAD detektoru.

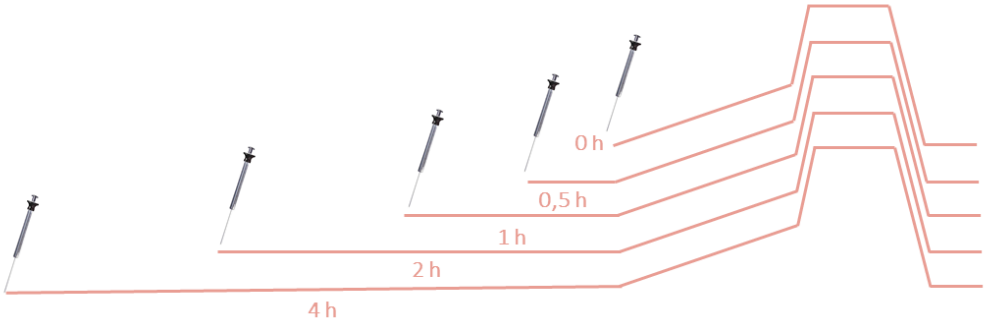
Tabulka 6. Program gradientové separace bez izokratického promytí.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B
0,0	0,3	100	0
14,0	0,3	45	55
14,5	0,3	20	80
15,5	0,3	20	80
16,0	0,3	100	0
27,0	0,3	100	0

Po první sérii nástřiků byla analýza prodloužena v posledním kroku z původních 25 minut na 27 minut, aby byla prodloužena doba ekvilibrace.

4.2.2.4 Analýza protilátky NIST

Protein vybraný v předchozích experimentech byl použit pro vlastní testování stability peptidových vazeb za zvýšené teploty při různě dlouhých izokratických inkubačních časech. Separace probíhala na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm v mobilní fází A 0,1% FA s H_2O a v mobilní fázi B 0,1% FA s ACN. Bylo připraveno 1000 ml vodné složky a 1000 ml organické fáze. Vzhledem k tomu, že analýza trvala přes 7 dní, tak bylo do zásoby připraveno dalších 1000 ml mobilní fáze 0,1% FA s H_2O a roztok mobilní fáze byl uložen do ledničky. V případě potřeby stačilo dolít mobilní fázi bez nutnosti přerušení analýzy. Pro analýzu bylo nutné vytvořit metody pro teploty 30, 45, 60, 75, 90 °C s inkubačními časy 0, 0,5, 1, 2 a 4 hodiny pro každou teplotu. Základem byla nastavena gradientová metoda trvající 27 minut, použitá při předchozí analýze k výběru proteinu. Tato metoda byla následně prodloužena o odpovídající dobu inkubace (Obrázek 8). Velikost nanášky protilátky NIST byla 2,5 µg a signál byl zaznamenáván na CAD detektoru.



Obrázek 8. Znázornění metod s různě dlouhými časy inkubace po nástřiku před nástupem gradientu.

4.2.3 Parametry analýzy chemických modifikací aminokyselin

LC-MS/MS analýza tryptických peptidů prokaryotních proteinů byla provedena Dr. Lenčem v rámci jeho protokolů JL703-JL707 pomocí kapalinového chromatografu Vanquish Horizon spojeného s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X vybaveného kvadrupólovým filtrem a harmonickou orbitální pastí. Peptidy byly separovány při průtoku 68 µl/min na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm za standardních podmínek bez izokratické inkubace pouze pomocí 40 minutového lineárního gradientu od 0,5 % mobilní fáze A (0,1% FA) do 38,5% mobilní fáze B (0,1% FA v ACN). Během 30 s zastoupení mobilní fáze B vystoupalo na 65% a tímto eluentem byla kolona 1 min promyta. Po 30 s poklesu zastoupení mobilní fáze B zpět na počátečních 0,5% se kolona nechala 18 min promývat, aby byla pro další analýzu dostatečně ekvilibrována. Pro izokratické inkubaci se peptidy po nástřiku nechaly určenou dobu na koloně promývat 0,5 % mobilní fázi B. Po určené době inkubace, byl nastříknut prázdný vzorek a peptidy zachycené na koloně byly eluovány výše popsaným gradientem. V rámci sledovaní vlivu jedné teploty kolony na stabilitu peptidů tak byly retenční časy jednotlivých peptidů stejné, ačkoliv na koloně mohly setrvat výrazně rozdílnou dobu.

Peptidy v eluátu byly ionizovány v iontovém zdroji HESI-II hmotnostního spektrometru napětím +3 kV. Odpařování mobilní fáze zajišťoval zmlžovací plyn o průtoku 30 arbitrárních jednotek a sušící plyn předehřátý na 150 °C o průtoku 6 arbitrárních jednotek. Pro oba plyny byl použít dusík připravený v generátoru dusíku. Vstupní kapilára do hmotnostního spektrometru byla vyhřívána na 275 °C. Před analýzami byl hmotnostní spektrometr kalibrován pomocí kalibračního roztoku PieceTM LTQ velos ESI Positive Ion Calibration Solution. V průběhu měření byla spektra vnitřně kalibrována na kontaminaci polysiloxanem $[(C_2H_6SiO)_6 + H]+$ s *m/z* 445.12003.

Peptidy byly analyzovány v módu závislém na informacích. Ze zaznamenaných MS1 spekter byly na základě zadaných kritérií vybrány prekurzory, které byly postupně kvadrupólem izolovány a podrobeny kolizně navozené fragmentaci. MS1 spektra byla měřena v rozmezí *m/z* 350-1500 při rozlišení 60 000 udávaných na *m/z* 200. Maximální přípustný počet nábojů v orbitrapu byl 3 miliony a maximální přípustný čas pro akumulaci tohoto množství nábojů byl 110 ms. Prekurzory s nábojovým stavem v rozmezí 2^+ až 6^+ a signálem přesahujícím intenzitu 100 000 byly izolovány kvadrupólem s izolačním oknem 1,8 *m/z* a posunem izolačního okna 0,3 *m/z*. Pro kolizně

navozenou fragmentaci prekurzorů byla použita normalizovaná kolizní energie 27 a dusík o čistotě 99.999 jako kolizní plyn. Fragmentační spektra byla zaznamenávána s rozlišením 15 000 udávaných na *m/z* 200. Maximální přípustný počet nábojů v orbitrapu byl 200 000 a maximální přípustný čas pro akumulaci tohoto množství nábojů byl 50 ms. Prekurzory byly po dobu 8 s vyloučeny z opakované fragmentace. Všechny experimenty byly zopakovány ve třech replikátech.

4.2.4 Příprava vzorků

4.2.4.1 Příprava směsi iRT peptidů

Pro ověřování vlivu teploty na účinnost separace peptidů na obrácených fázích bylo potřeba připravit směs pěti iRT peptidů, které by na CAD detektoru vykazovaly podobné signály [67]. Roztoky jednotlivých peptidů byly připraveny Dr. Lenčem v rámci experimentu JL632. Pro přípravu směsi byly do 456 µl mobilní fáze A přidávány peptidy dle rozpisu v tabulce 7. Celkem bylo připraveno 480 µl směsi. Směs peptidů byla promíchána a byla učiněna ověřovací gradientová separace s cílem zjistit, jestli peptidy v CAD detektoru vykazují podobně intenzivní signály.

Tabulka 7. Příprava směsi iRT peptidů.

Směs vzorku iRT			
Peptid	Sekvence peptidu	µl do směsi	přídavek µl
1	GAGSSEPVTGLDAK	6	4
2	YILAGVENSK	6	0
3	TPVITGAPYEYR	3	6
4	ADVTPADFSEWSK	3	8
5	GTFIIDPAAVIR	6	0

4.2.4.2 Příprava vzorku proteinů

Cílem bylo připravit vzorky proteinů pro testování stability peptidových vazeb na koloně při různých teplotách. První potenciálně vhodný protein pro tyto analýzy byl koňský myoglobin (EMg, z angl. Equine Myoglobin). Protein byl k dispozici o 9o% čistotě. Aby vznikl 10x koncentrovanější zásobní roztok o koncentraci 1 nmol/µl, navážených 3,74 mg proteinu bylo rozpuštěno v 245,1 µl mobilní fáze A. Pro přípravu finálního vzorku EMg o koncentraci 100 pmol/µl bylo 5 µl zásobního roztoku zředěno 45 µl mobilní fází A.

Jako druhý protein byl připraven vzorek hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. Bovine Serum Albumine) o koncentraci 100 pmol/µl. Protein byl k dispozici o 98% čistotě. Aby vznikl vzorek o koncentraci 100 pmol/µl, navážených 7,75 mg proteinu bylo rozpuštěno v 1190,3 µl mobilní fáze A.

4.2.4.3 Příprava redukčního činidla TCEP

TCEP je silné redukční činidlo schopné účinně redukovat disulfidické můstky v proteinech. Pro redukci byl připraven TCEP o koncentraci 50 mM. K dispozici byla substance o čistotě 98%. Pro přípravu 50 mM roztoku bylo naváženo 14,12 mg a rozpuštěno v 1005 µl H_2O.

4.2.4.4 Příprava vzorku protilátky NIST

Pro optimalizaci velikosti nástřiku redukované protilátky byl vyzkoušen nástřik 1 µg, 2,5 µg a 5 µg. Pro analýzu stability protilátky bylo použito pět různých teplot a pět různě dlouhých izokratických inkubací. U každé teploty a inkubace byly tři nástřiky o objemu 2,5 µl. Po výpočtu to znamenalo připravit 187,5 µl vzorku, ale pro jistotu bylo připraveno 400 µl. Vzorek pro nástřik bylo třeba připravit o koncentraci 1 µg/µl. Protilátka NIST o objemu 40 µl byla smíchána se 120 µl guanidin hydrochloridu, který je silné denaturační činidlo usnadňující redukci monoklonální protilátky. Vzorek byl inkubován 5 minut při 60 °C. Po inkubaci bylo k této směsi přidáno 80 µl 50mM TCEP a vzorek byl znovu inkubován po dobu 60 minut při 37 °C. Po závěrečné inkubaci bylo přidáno 160 µl roztoku 0,1% FA s H_2O a vzorek byl důkladně promíchán.

4.2.4.5 Příprava tryptických peptidů z celobuněčného lyzátu bakterie *Francisella tularensis*

Pro závěrečný experiment byl vybrán celobuněčný proteinový extrakt živého vakcinačního kmene *Francisella tularensis* připravený Dr. Lenčem v rámci protokolu JL567. Bakteriální buňky byly kompletně zlyzovány inkubací v 1% deoxycholátu sodném při teplotě 70 °C po dobu 5 min. Celková koncentrace proteinů ve vzorku byla 7,7 µg/µl.

Ze vzorku připravil Dr. Lenčo tryptické peptidy v rámci svého protokolu JL697. Proteiny v celkovém množství 1 mg byly redukovány v 5 mM TCEP při teplotě 60 °C po dobu 60 min. Volné thiolové skupiny byly zablokovány inkubací s 20 mM methylmethanthiosulfonátem po dobu 30 min. pH vzorku bylo upraveno Tris-HCl pufrem na pH 7,5 a proteiny byly štěpeny trypsinem, který byl přidán v poměru 1:50 (w/w).

Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C za mírných otáček v termomixeru. Peptidy byly přečištěny extrakcí na pevné fázi Oasis HLB 1 cc Vac Cartridge, 10 mg (Waters) a po vysušení byly rozpuštěny v 0,1% FA na koncentraci 2 µg/µl. Vzorek byl označen jako *F. tularensis* LVS Digest 0,8 mg in 0,4 ml.

4.2.5 Softwarová analýza LC-MS dat v programu Preview

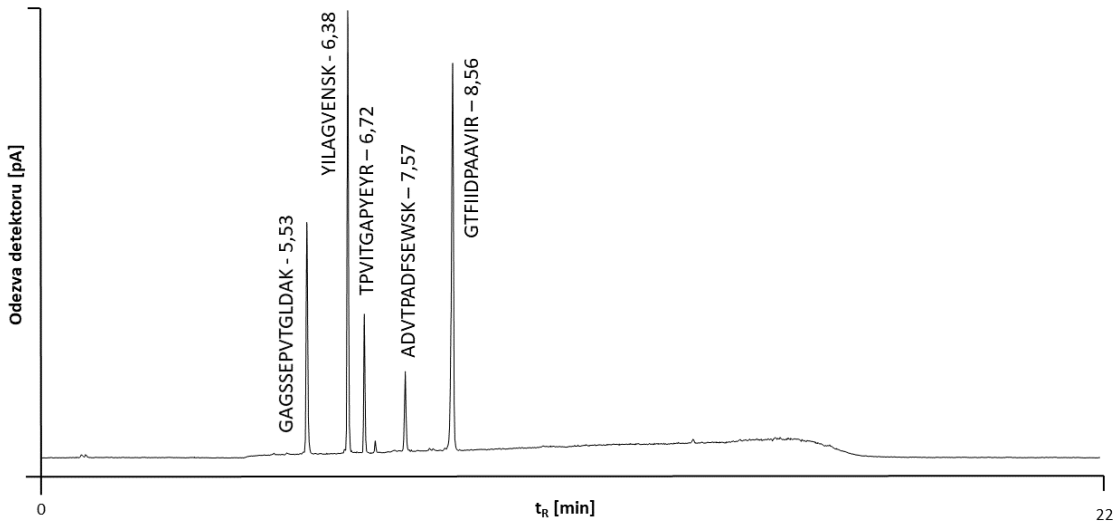
Pro stanovení chemických modifikacích na aminokyselinách proteinu *Francisella tularensis* byl použit software PMI-Preview (Protein Metrics Inc.). Program umožňuje rychlou identifikaci peptidů při použití tandemové hmotnostní spektrometrie. Je to nástroj, který dokáže vyhodnotit bottom-up proteomické analýzy získané trypsinovým digestem ve směsi komplexních proteinů. Dovoluje nastavit řadu parametrů pomocí nichž byly získány informace o *in vitro* modifikacích proteinu. MS/MS data byly získány analýzou na přístroji UHPLC Vanquish Horizon spojený s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X. Vzorek proteinu byl analyzován při pěti různých teplotách. Získaná data byly ve formátu .raw. Proteinová databáze fasta byla použita ze vzorku *Francisella tularensis* Holarctica. Parametr pro nastavení fixní modifikace byl zvolen karbamidomethylace cysteinu +57.021464 Da. Nastavení štěpení peptidů bylo ponecháno jako počáteční hodnota R/K na C konci, což znamená štěpení za argininem nebo lysinem. Pro všechny vzorku po digestu je doporučeno nastavit vyhledávání na plnou specifitu. To znamená, že oba dva terminální konce peptidu jsou přístupné štěpení. Typ fragmentace byl zvolen CID/HCD. Oba dva typy fragmentace využívají kolizně indukovanou disociaci peptidů. To má za následek štěpení peptidové vazby na fragmenty y/b nebo štěpení před peptidovou vazbou na fragmenty x/a.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

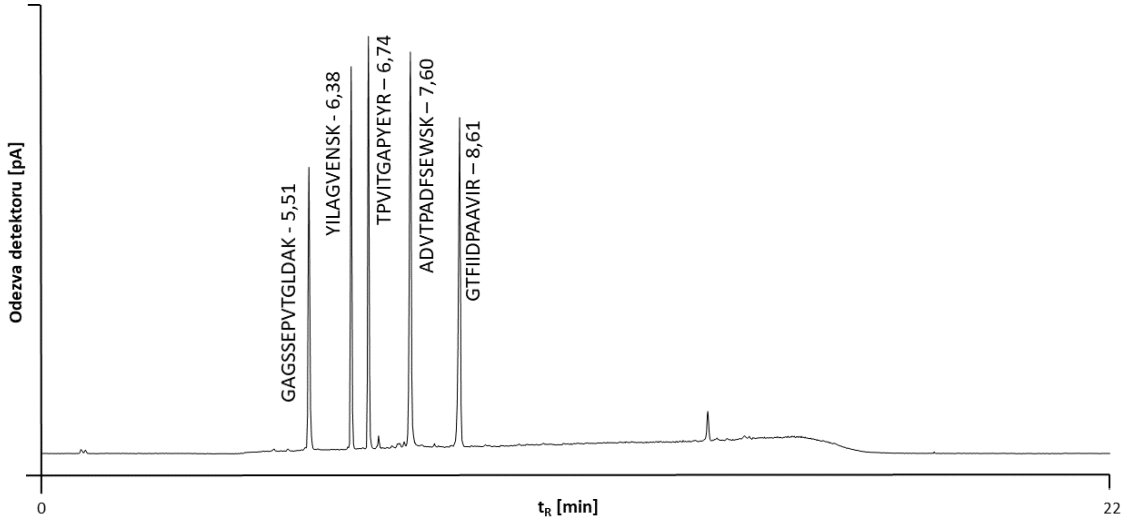
5.1 Ověřování vlivu teploty na účinnost separace směsi peptidů

5.1.1 Testování připravené směsi iRT peptidů

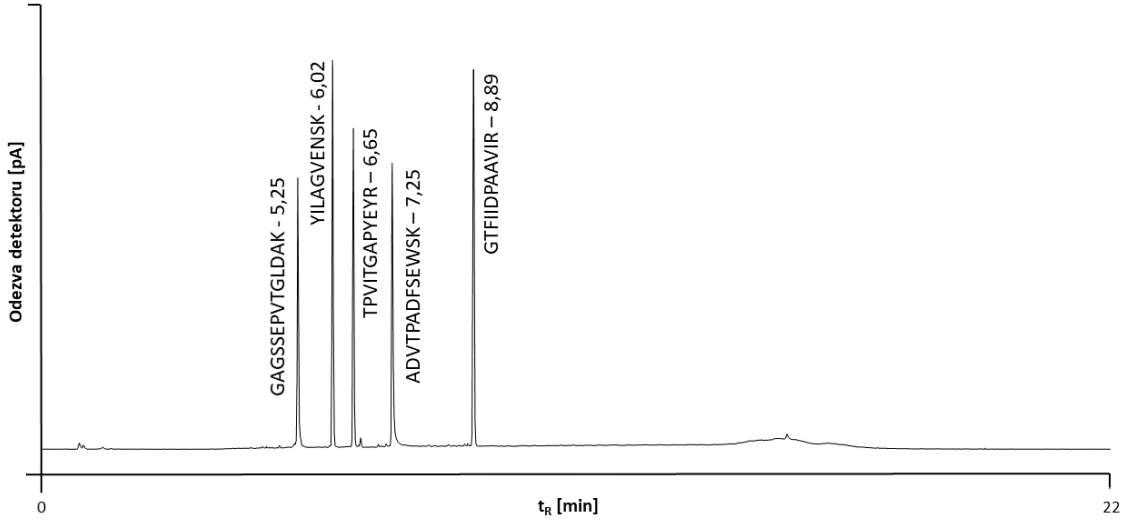
Pro sledování vlivu teploty na účinnost separace byla použita směs pěti iRT peptidů [67]. Peptidy byly smíchány tak, aby byl každý ve směsi zastoupen přibližně v koncentraci 100 pmol/µl. Po smíchání bylo sledováno, jestli byly peptidy detekovány s přibližně stejně vysokým signálem. Analýza byla prováděna na přístroji UHPLC Dionex UltiMate 3000 na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm v prostředí 0,1% FA pomocí 22 minutové gradientové metody. Jak je vidět z chromatogramu na obrázku 9, výšky jednotlivých píků nebyly na podobné úrovni. Z toho důvodu jsme vyrovnali jejich výšky dodatečným přidáním některých peptidů dle tabulky 7. Po korekci byly hladiny signálů všech peptidů na podobné úrovni a směs byla připravena k analýze (Obrázek 10). Když původní vzorek peptidů docházel, byla připravena další směs o stejném složení a smísena se zbývajícími, přibližně 200 µl původního vzorku. I takto připravený vzorek vykazoval podobné hladiny signálů všech peptidů a směs tak bylo možné použít pro další experimenty (Obrázek 11).



Obrázek 9. Chromatogram ze separace původní směsi iRT peptidů prováděné na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm mobilními fázemi s 0,1% FA.



Obrázek 10. Chromatogram ze separace směsi iRT peptidů po korekci jejich množství prováděné na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm mobilními fázemi s 0,1% FA.



Obrázek 11. Chromatogram ze separace směsi peptidů iRT připravené smícháním starého a nového vzorku. Separace byla provedena na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm mobilními fázemi s 0,1% FA.

5.1.2 Vlastní ověřování vlivu teploty na účinnost separace peptidů

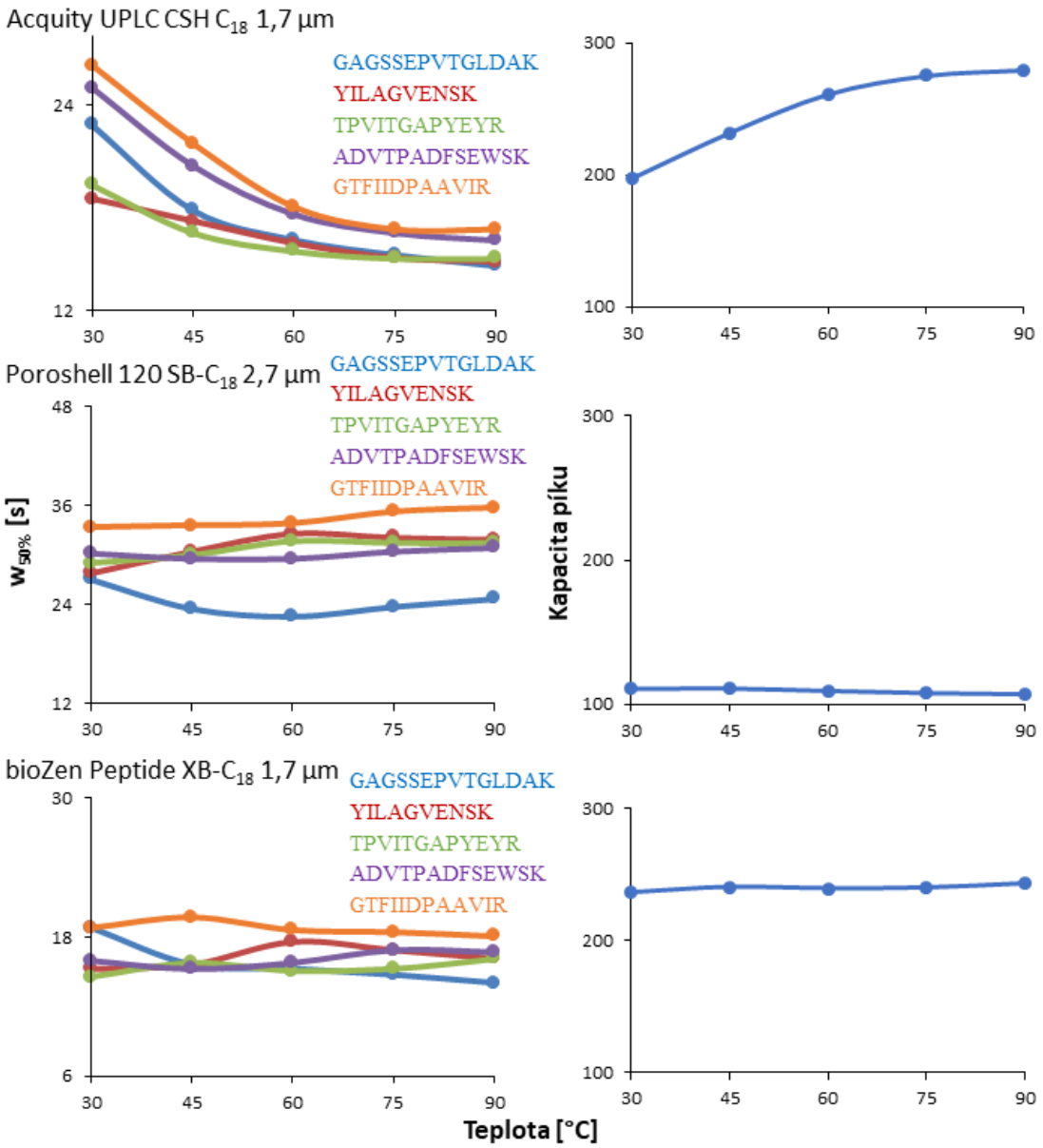
Jakmile byla připravena a otestována směs iRT peptidů, byly prováděny vlastní analýzy pro ověřování vlivu teploty na separaci. Analýzy probíhaly taktéž na přístroji UHPLC Dionex UltiMate 3000 v prostředí 0,1% FA. První testovanou kolonou byla kolona s plně porézními částicemi Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm. Kolonu výrobce doporučuje používat v rozmezí pH 1-11 při maximální teplotě 80 °C. Protože 0,1% FA má pH přibližně 2,6, troufli jsme si provádět analýzy na této koloně i při 90 °C. Po analýzách při 90 °C byly vždy provedeny kontrolní nástřiky při 30 °C,

jestli nedošlo k poškození stacionární fáze. Kolona poskytovala po analýzách při 90 °C stejné výsledky jako před nimi. Stacionární fáze tedy analýzami při 90 °C v prostředí 0,1% FA nebyla poškozena.

Pro ověřování vlivu teploty na účinnost separace peptidů byla hodnocena šířka píku v polovině jeho výšky ($w_{50\%}$). Při rostoucí teplotě se šířka píků na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm snižovala. Při zvýšené teplotě tudíž stoupala i kapacita píku a bylo tak potvrzeno, že při zvyšující se teplotě roste účinnost separace peptidů. Při teplotě 75 °C a 90 °C však byly rozdíly již velmi malé a otázkou tedy je, zdali má s ohledem na stabilitu peptidů smysl námi testovanou maximální teplotu pro dlouhé gradientové separace komplexních proteomických vzorků používat [52][68].

Druhou testovanou kolonou byla kolona s povrchově porézními částicemi Poroshell 120 SB-C_{18} 2,7 µm, 2,1 × 150 mm. Vliv teploty na účinnost separace na této koloně nebyl pozorovatelný. Abychom potvrdili naši domněnku, že vliv teploty souvisí s charakterem částic, při stejných podmínkách byla testována další kolona s povrchově porézními částicemi. Z dostupných kolon byla vybrána kolona bioZen Peptide XB-C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm. Potvrdili jsme, že u kolon naplněných tímto typem částic se účinnost analýzy vlivem vzrůstající teploty opravdu nemění. Naše pozorování nejpravděpodobněji souvisí s faktem, že povrchově porézní částice byly speciálně vyvinuty pro separaci peptidů a proteinů, protože jejich chromatografická separace je ztížená jejich nízkým difuzním koeficientem. Nízký difúzní koeficient významně zhoršuje odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi. Právě povrchově porézní částice svým charakterem odpor proti přenosu hmoty snižují. Zvýšení difuzního koeficientu peptidů zvýšenou teplotou tak na snížení odporu proti přenosu hmoty v povrchově porézní stacionární fázi nemá výrazný vliv. Je tedy na zváženou, jestli má smysl používat vyšší teploty kolon naplněných povrchově porézními částicemi, když ke zvýšení separační účinnosti nedojde. Porovnání šířky iRT peptidů ze všech tří kolon zobrazuje obrázek 12.

Ze získaných výsledků byla vypočítána kapacita píku, která vyjadřuje účinnost při gradientové eluci. Byl použit vzorec $P = 1 + \frac{t_g}{1{,}7 \cdot w_{50\%}}$, kde t_g je čas gradientu. Výpočet potvrdil, že vyšší teplota zvyšuje kapacitu píku, tím pádem je lepší i účinnost separace. Ovšem je důležité zdůraznit, že tato skutečnost platí jen u kolony s povrchově porézními částicemi.



Obrázek 12. Grafy v levém sloupci znázorňují závislost vlivu teploty na šířku píku v polovině jeho výšky. Sekvence jednotlivých peptidů je barevně znázorněna. V pravém sloupci jsou grafy v závislosti vlivu teploty na kapacitu píku.

5.2 Ověření stability peptidových vazeb při zvýšené teplotě na koloně

Po experimentech, které měly za úkol ověřit vliv teploty kolony na účinnost separace peptidů, jsme se zaměřili na zkoumání vlivu teploty na stabilitu peptidových vazeb modelových proteinů zachycených na stacionární fázi omývaných mobilními fázemi s 0,1% FA.

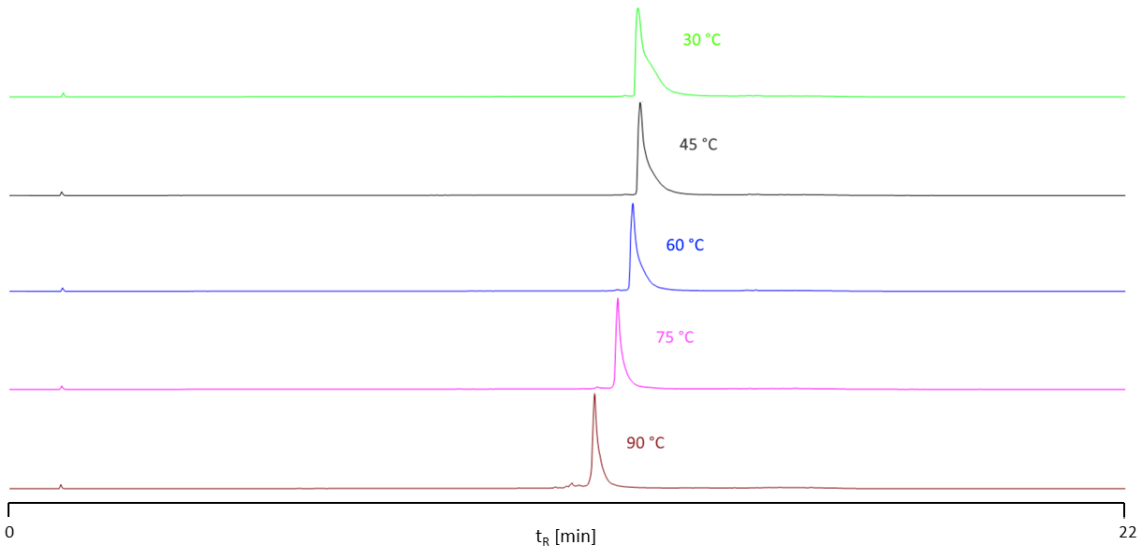
5.2.1 Pilotní experimenty s kolonou Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm

Aby výsledky co nejvěrněji napodobovaly reálné podmínky bottom-up LC-MS analýz, nejprve jsme hledali kolonu s C_{18} stacionární fází, na které by bylo možné mobilními fázemi obsahujícími 0,1% FA účinně separovat jak modelové proteiny, tak jejich potenciální degradační produkty ve formě peptidů. Na základě dostupných informací byla pro tyto účely vybrána kolona Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm.

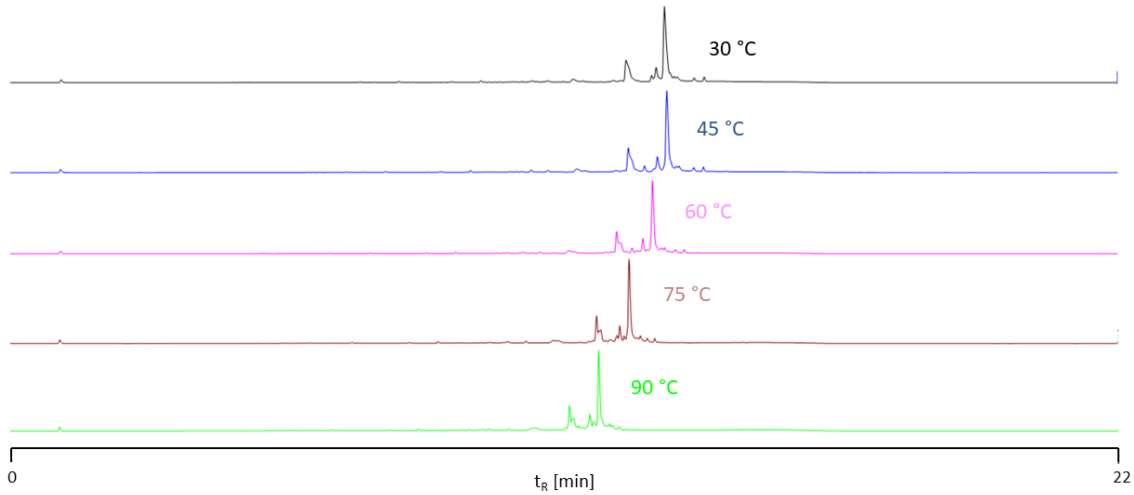
Při použití mobilní fáze s 0,1% FA se bohužel modelové proteiny BSA a EMg separovat nepodařilo. Při teplotách od 30 °C až do teploty 75 °C nebyly modelové proteiny vůbec detekovány, byly detekované až při 90 °C. FA není dostatečně silná kyselina, aby vytvořila iontový pár s proteiny, což je pro jejich separaci na obrácených fázích nezbytné. Možná řešení zahrnovala přidání amoniaku do mobilní fáze, čímž by se vytvořil mravenčan amonný, anebo nahrazení FA silnější TFA.

5.2.2 Připojení druhé pumpy pro kombinovaný gradient

Jelikož byla v UHPLC systému Dionex UltiMate 3000 k dispozici i další pumpa, uvažovali jsme také o provedení, kde by degradace proteinů byla na koloně Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm navozena mobilními fázemi s 0,1% FA doručovanými původní pumpou, a nerozložené či málo rozložené proteiny by po přepnutí ventilu před kolonou byly eluovány gradientem mobilních fází s 0,1% TFA tvořeným na druhé pumpě. Nejprve jsme prokázali, že proteiny na koloně Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm lze s mobilními fázemi s TFA skutečně separovat (Obrázky 13 a 14).



Obrázek 13. Chromatogram ze separace BSA na koloně Halo Protein ES-C18 3,4 µm, 2,1 × 150 mm při různých teplotách kolony v prostředí 0,1% TFA.



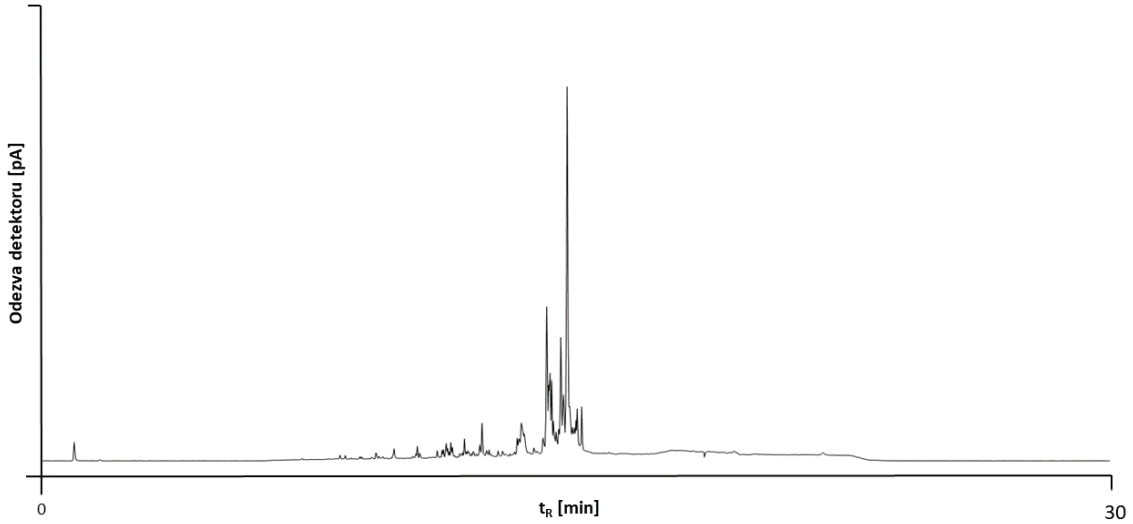
Obrázek 14. Chromatogram ze separace EMg na koloně Halo Protein ES-C18 3,4 µm, 2,1 × 150 mm při různých teplotách kolony v prostředí 0,1% TFA.

Po zapojení druhé pumpy do UHPLC systému byl proveden tlakový test systému, během kterého byl zvyšován průtok až k dosažení tlaku 800 bar. Vedení v horní pumpě nebo pumpa samotná zřejmě někde netěsnila, protože jsme tlaku 800 bar dosáhli až při průtoku 2 ml/min. K dosažení požadovaného tlaku u dolní pumpy bylo potřeba průtoku 0,7 ml/min, což byla očekávatelná hodnota. Během analýzy bylo dosaženo tlaku okolo 130 bar, tedy tlaku, za kterého se případné netěsnosti v horní pumpě systému neprojevily.

5.2.3 Testování stability peptidových vazeb kombinovaným gradientem

Požadovaná metoda využívající gradient ze dvou samostatných pump byla komplikovaná a její sestavení nebylo jednoduché. První izokratická část gradientu

tvořeného mobilními fázemi s 0,1% FA měla indukovat štěpení peptidových vazeb, a přitom zadržovat všechny degradační produkty. Druhá část gradientu tvořeného mobilními fázemi s 0,1% TFA měla účinně separovat jak vznikající degradační produkty, tak parentní nebo málo rozložené proteiny. Poslední část gradient nastolila počáteční podmínky metody. U 60 minutové metody s izokratickou inkubací 30 min bylo detekováno nezvykle mnoho píků. Je možné, že se kombinací vysoké teploty a dlouhé inkubace začal vzorek opravdu rozkládat nebo byl BSA již degradován před přípravou vzorku pro analýzy. Z žádného chromatogramu nebylo možné určit pík parentního peptidu (Obrázek 15).

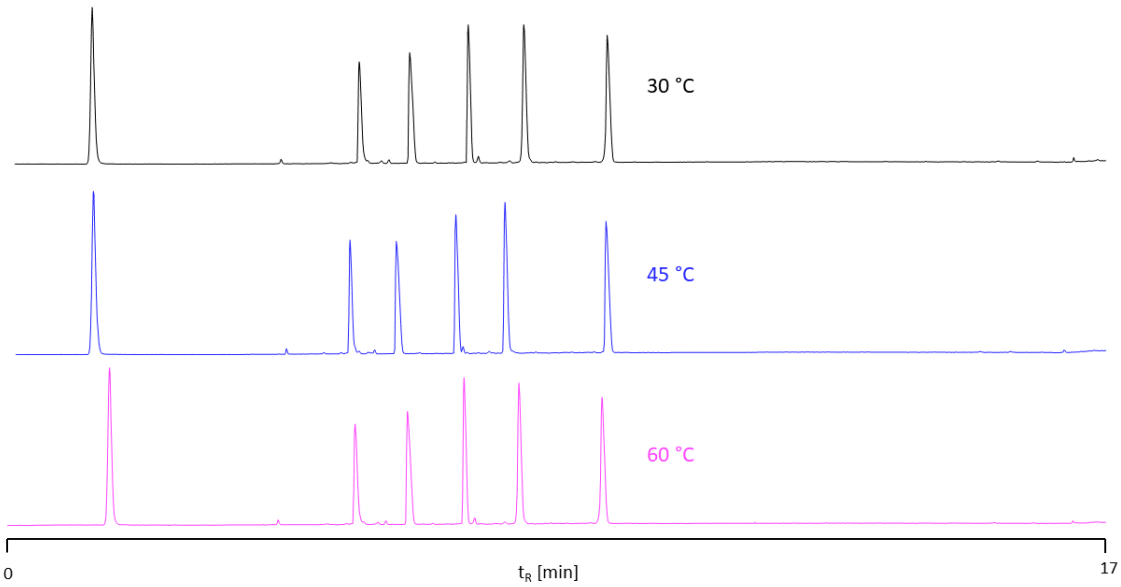


Obrázek 15. Chromatogram ze separace BSA na koloně Halo Protein ES-C18 3,4 µm, 2,1 × 150 mm kombinovaným gradientem tvořeným mobilními fázemi s 0,1% FA a 0,1% TFA.

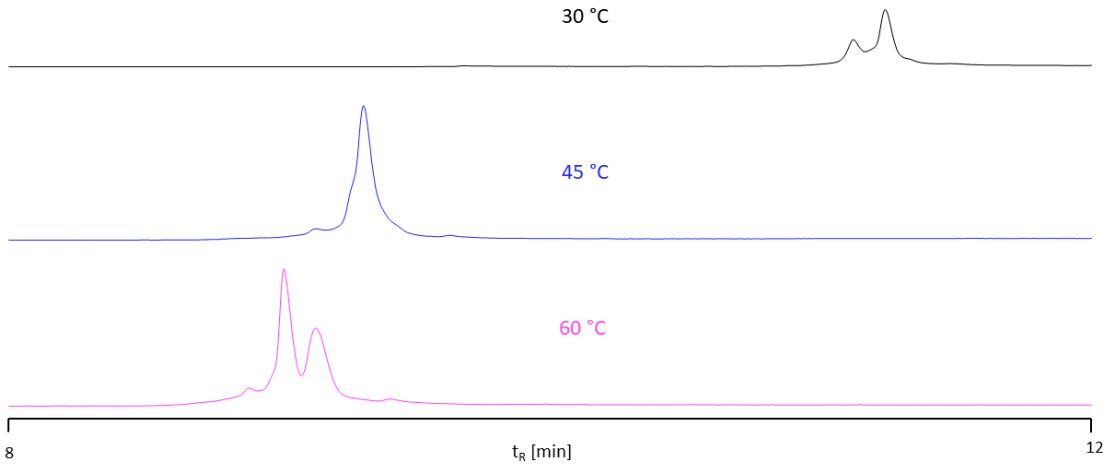
Další experimenty jsme prováděli pomocí BSA redukovaného 50 mM roztokem TCEP. Provedli jsme analýzu redukovaného BSA při různě dlouhých izokratických inkubačních časech. Při této analýze bylo zjištěno, že přepnutí ventilu před kolonou zpět na původní pozici v průběhu analýzy nebylo nastaveno optimálně. Bylo třeba upravit stávající metodu prodloužením intervalu gradientu a čas přepínání ventilu. Po úpravě metod došlo ke správnému posunu gradientu i času přepnutí ventilu, ale i tak tento přístup vyžadoval ještě další, časově náročnou optimalizaci. Vzhledem k tomu, že výsledky na koloně Halo Protein ES-C_{18} 3,4 µm, 2,1 × 150 mm nebyly zcela uspokojivé a ve stejné době Dr. Lenčo obdržel darem kolonu BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm potenciálně vhodnou pro tyto experimenty, nebyl přístup spoléhající na kombinovaný gradient mobilních fází s 0,1% FA prioritní.

5.2.4 Pilotní experimenty s kolonou BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm

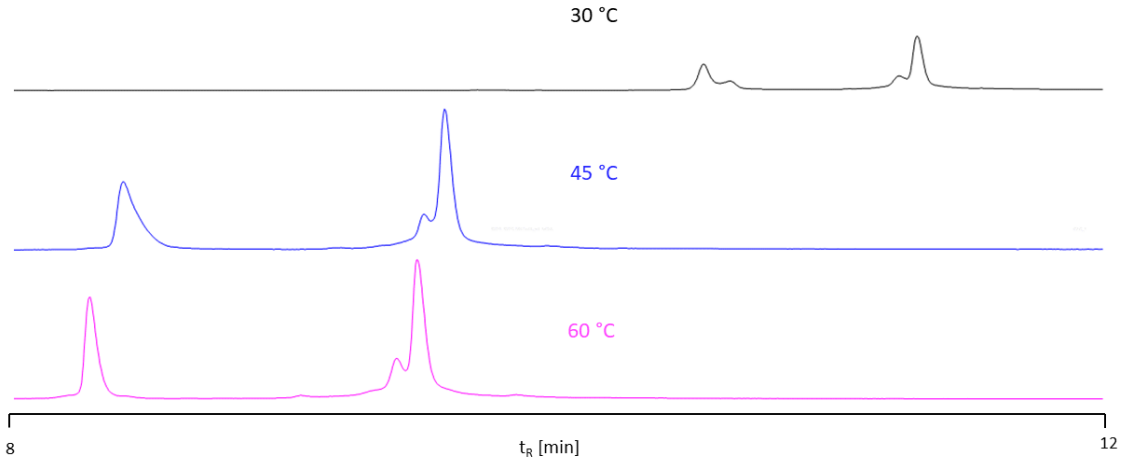
Předchozí testovaná kolona a zvolený způsob analýzy nebyl ideální, a proto byla pro otestování stability peptidové vazby jako nejsmysluplnější volba vybrána kolona BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm. Na této koloně Dr. Lenčo v pilotních pokusech prokázal, že je vhodná pro separaci proteinů mobilním fázemi s 0,1% FA. To jsme také potvrdili analýzou proteinů BSA, ramucirumab a NIST referenční protilátkou. Na směsi pěti iRT peptidů jsme také prokázali, že kolona může účinně separovat i peptidy (Obrázek 16). Experimenty probíhaly opět na přístroji UHPLC Dionex UltiMate 3000 v prostředí 0,1% FA. Jelikož modelové proteiny BSA a EMg v předchozích experimentech vykazovaly nezvykle bohaté chromatogramy, které lze alespoň z části vysvětlit nízkou čistotou zakoupených substancí, byly z projektu vyřazeny. Ve výběru jiného modelového proteinu jsme se tedy soustředili také na čistotu substancí. K dispozici jsme měli NIST referenční standard protilátky a terapeutickou protilátku ramucirumab. Jelikož jsou protilátky tvořeny dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci spojenými disulfidickými můstky, pro spolehlivou detekci jejich degradačních produktů bylo vhodné protilátky redukovat a řetězce od sebe oddělit. Jako nejlepší modelový protein pro další pokusy na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm se jevil ramucirumab (Obrázek 17). Bohužel jsme neměli dostatek tohoto proteinu pro všechny naplánované experimenty. Referenční standard protilátky NIST poskytoval také dobrý tvar píků (Obrázek 18) a tohoto proteinu jsme měli k dispozici dostatečné množství. Proto jsme pro finální experimenty použili tuto protilátku.



Obrázek 16. Chromatogram ze separace směsi peptidů iRT při různých teplotách kolony mobilními fázemi s 0,1% FA.



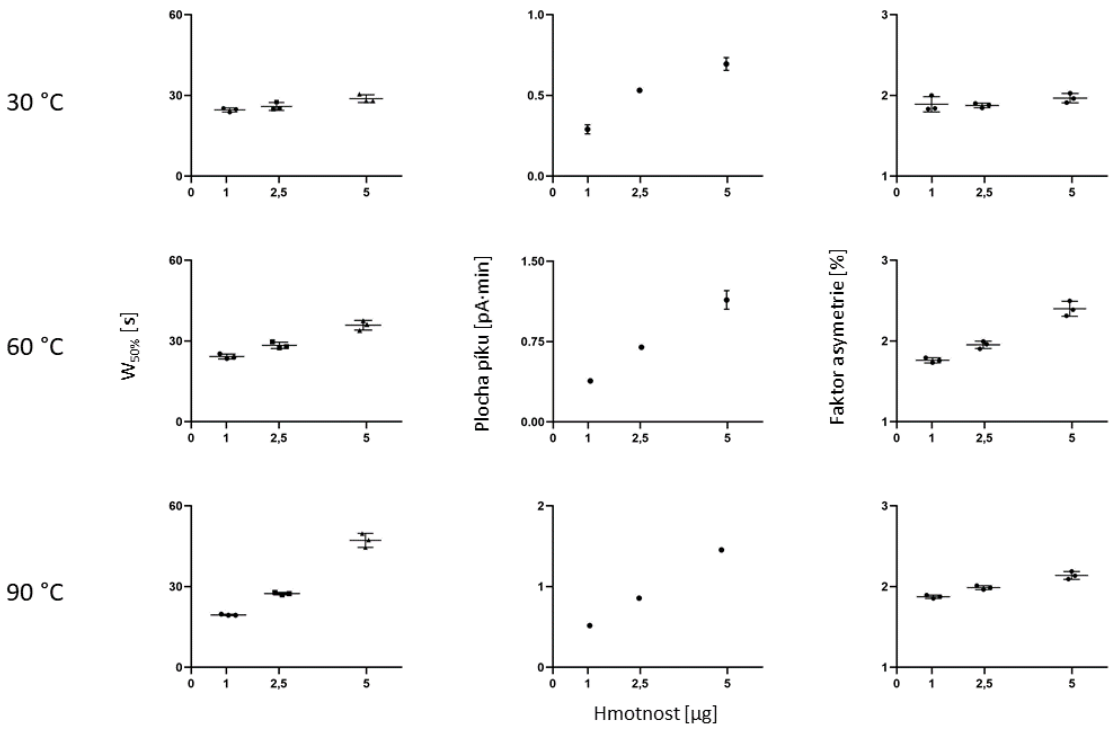
Obrázek 17. Chromatogram ze separace protilátky Ramucirumab při různých teplotách kolony mobilními fázemi s 0,1% FA.



Obrázek 18. Chromatogram ze separace protilátky NIST při různých teplotách kolony mobilními fázemi s 0,1% FA.

5.2.5 Volba velikosti nástřiku referenční protilátky NIST na kolonu BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm

Poté, co byl vybrán modelový protein pro otestování stability peptidových vazeb na koloně, byly na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm testovány různé velikosti nástřiku. Experiment byl prováděn za stejných podmínek jako předchozí separace na přístroji UHPLC Dionex UltiMate 3000. Pro finální experiment byla zvolena nanáška 2,5 µg, která byla jakýmsi kompromisem. Ačkoliv nástřik 5 µg vykazoval nejintenzivnější píky a detekce degradačních produktů by z tohoto množství byla snadnější, plocha píku při teplotě 30°C již nebyla přímo úměrná s předchozími nanáškami a asymetrie píku při 60 °C byla okolo 2,5. Třetím sledovaným parametrem byla šířka píku, u které záleží jak na velikosti nanášky, tak na teplotě kolony. Šířka píku v polovině jeho výšky byla u nanášek 1 µg a 2,5 µg srovnatelná, ale u 5 µg již byla vyšší. Posledním důvodem bylo také to, že dle pokynů od výrobce kolony BioResolve se pro optimální rozlišení doporučuje nástřik menší než 3 µg. Srovnání výsledků šířek píku, ploch pod píky a faktorů asymetrie při různých teplotách shrnuje obrázek 19.



Obrázek 19. Přehled výsledků šířek píků (levý sloupec), ploch pod píky (prostřední sloupec) a faktorů asymetrie (pravý sloupec) pro výběr nanášky referenční protilátky NIST pro teploty 30, 60 a 90 °C.

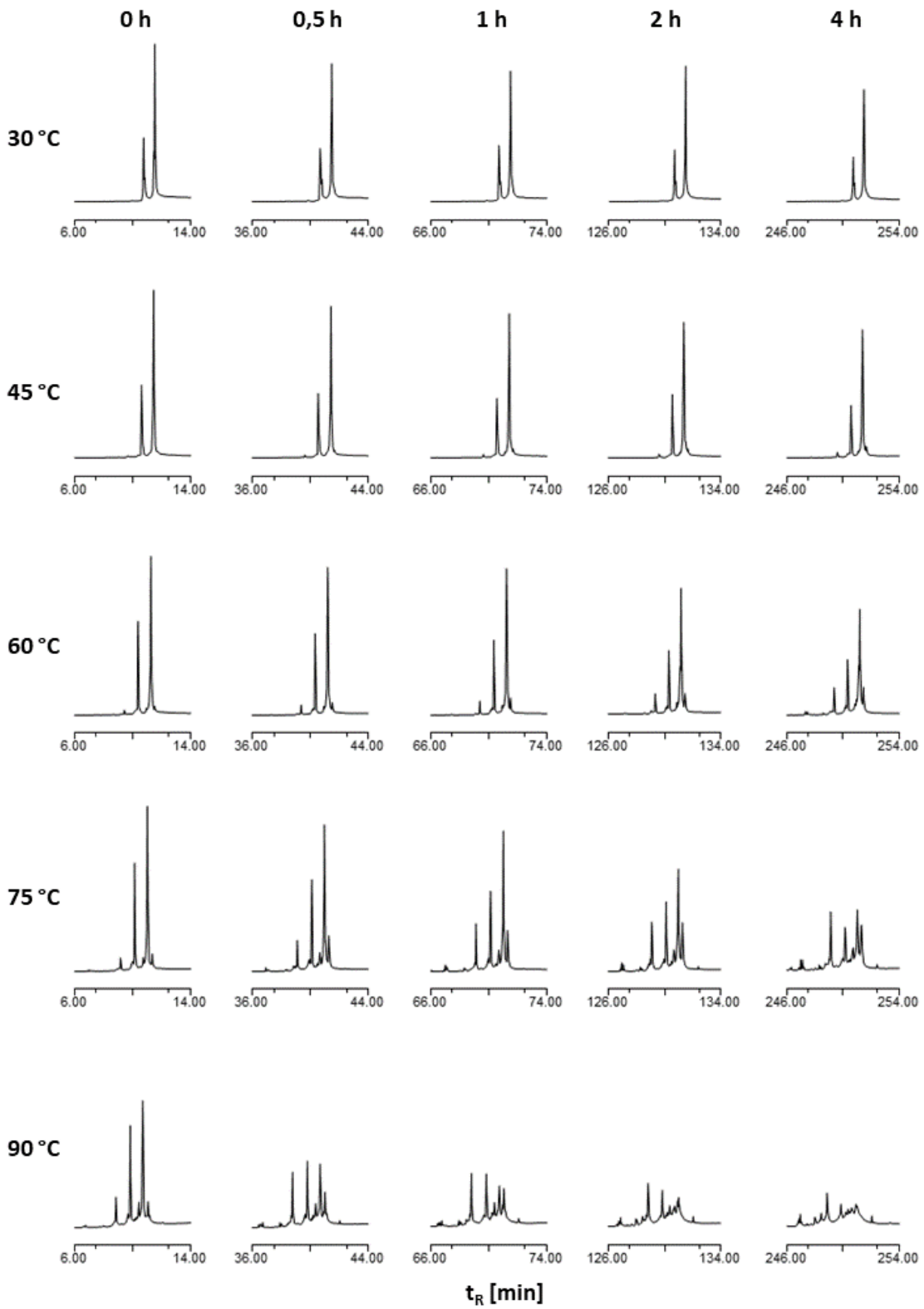
5.2.6 Finální ověření vlivu teploty na stabilitu peptidových vazeb na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 2,7 µm, 2,1 × 150 mm

Z předchozích experimentů byl vybrán vhodný modelový protein i jeho optimální nanáška 2,5 µg a mohl být tedy otestován vliv teploty na stabilitu peptidové vazby na koloně. Celá analýza byla prováděna na přístroji UHPLC Dionex UltiMate 3000 v prostředí 0,1% FA na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm.

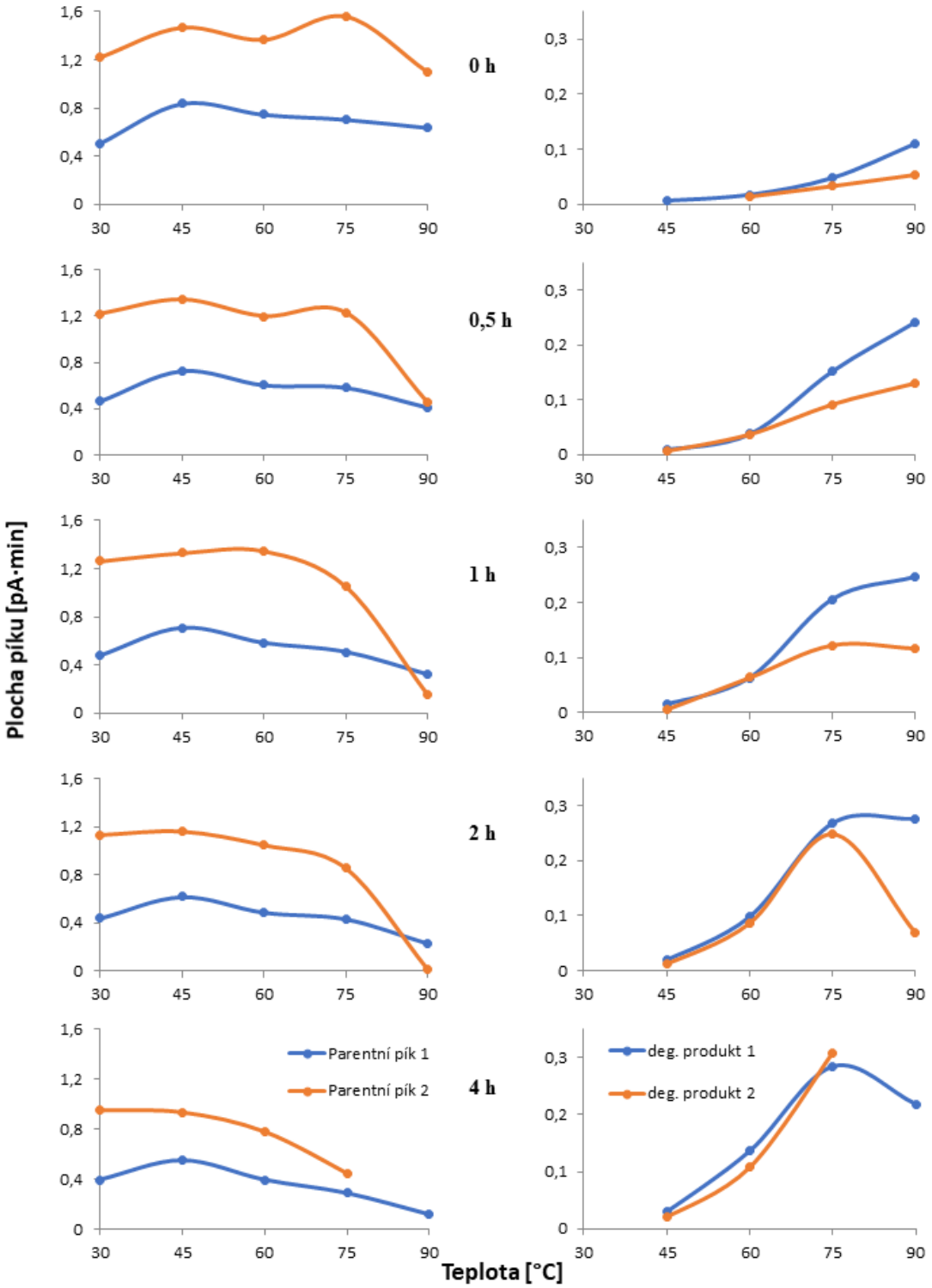
Přehledné srovnání výsledných chromatografických záznamů je shrnuto v obrázku 20. Z chromatografického záznamu můžeme vidět, že při teplotě 30 °C se plocha píků prakticky nezměnila ani po čtyřhodinové izokratické inkubaci. Překvapující naopak bylo, že první degradační produkty se začaly objevovat již při teplotě 45°C. To dokládají i grafy znázorňující plochu píků parentních řetězců a degradačních produktů (Obrázek 21). Na závislosti plochy parentních píků na vzrůstající teplotě můžeme sledovat trend, kdy se plocha píků do určité teploty zvětšuje vlivem zlepšené difuze. Jako ideální teplota pro separaci protilátky NIST se jeví 60 °C, jelikož je stále zachována vysoká účinnost a degradace protilátky je u krátkých inkubacích minimální. Při vyšších teplotách se vzorek začal degradovat a plocha píků s rostoucí teplotu zase klesá [48]. To

potvrzuje i závislost plochy degradačních produktů na teplotě, která má stoupající tendenci.

Z toho vyplývá, že s rostoucí teplotou zcela jednoznačně přibývá degradačních produktů. Dokonce po 4 hodinové inkubaci při teplotě 90°C nebylo možné detekovat parentní pík. Z toho plyne, že čím delší je doba inkubace a čím vyšší je teplota, tím je riziko štěpení peptidových vazeb v proteinech a peptidech vyšší [2]. Pozdější LC-MS/MS analýzou, již mimo rámec mé diplomové práce, bylo při 90 °C bez inkubace identifikováno přes 20 degradačních peptidů. Některé z identifikovaných peptidů šlo dohledat na základě přesné hmoty a retenčního času i ve vzorcích analyzovaných při 45 °C.



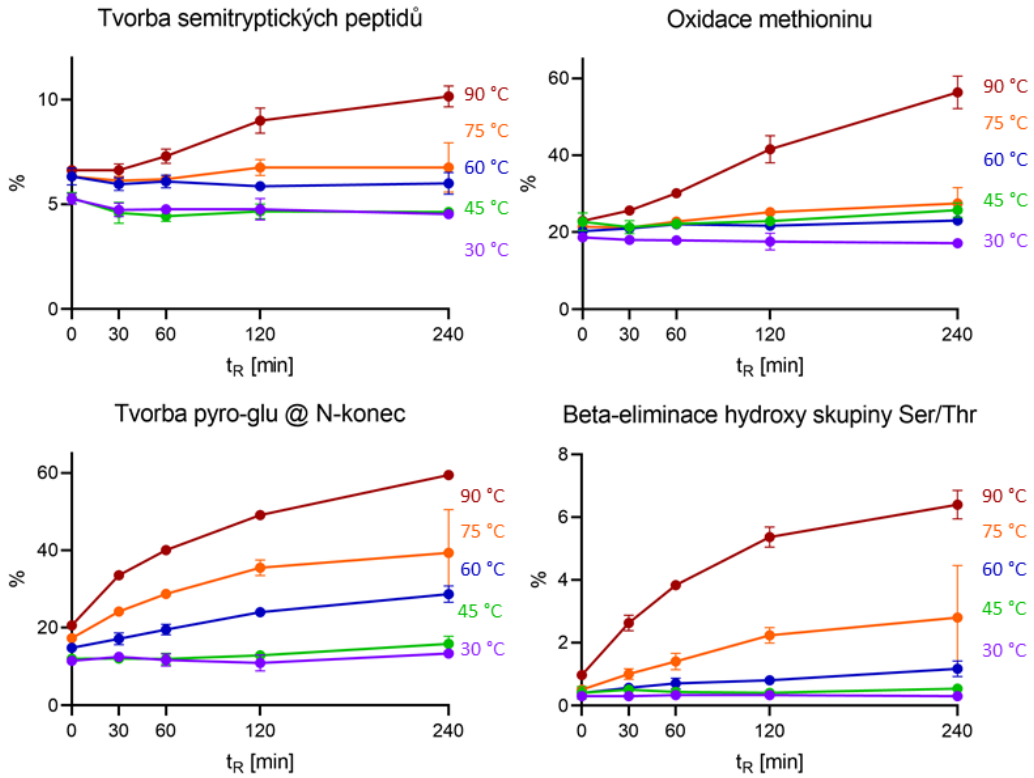
Obrázek 20. Chromatogramy znázorňující vliv teploty na stabilitu redukované protilátky NIST v prostředí 0,1% FA na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl, 2,7 µm, 2,1 × 150 mm.



Obrázek 21. Grafy porovnávající plochy parentních píků v závislosti na teplotě (levý sloupec) a plochy píků degradačních produktů v závislosti na teplotě (pravý sloupec).

5.3 Ověření vlivu teploty na chemickou stabilitu postranních řetězců aminokyselin

Po předchozí analýze, kde jsme sledovali vliv teploty na stabilitu peptidových vazeb, jsme se zaměřili na sledování chemických modifikací na fragmentech proteinu *Francisella tularensis*. Analýza byla prováděna pomocí kapalinového chromatografu Vanquish Horizon spojeného s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X s kvadrupólovým filtrem a harmonickou orbitální pastí na koloně Acquity UPLC CSH C_{18} 1,7 µm, 2,1 × 150 mm. Na modelových tryptických peptidech jsme pomocí softwaru Preview sledovali stabilitu aminokyselinových zbytků při pěti různých teplotách, které byly stejné jako u předchozích experimentů [69][70]. Software Preview pokrýval přes 30 modifikací, z nichž jsme vybrali čtyři statisticky nejvýznamnější. Jedná se o oxidaci methioninu, tvorbu semitryptických peptidů, tvorbu pyroglutamátu na N-konci a beta-eliminaci hydroxyskupiny na serinu a threoninu. Ve všech čtyřech případech můžeme vidět, že vlivem rostoucí teploty a délky analýzy vzrůstá množství modifikací aminokyselin (Obrázek 22).



Obrázek 22. Grafy znázorňující nárůst statisticky nejvýznamnějších chemických modifikací aminokyselin vlivem teploty.

6 ZÁVĚR

Tato práce vycházela z poznatků, že zvýšená teplota kolony může výrazně přispět k účinnější gradientové separaci peptidů. Dřívější studie používali jako přídavek mobilní fáze kyselinu trifluoroctovou [53][71]. My jsme se rozhodli zkoumat tento problém v prostředí kyseliny mravenčí, jelikož je slabší kyselina než TFA a je tak vhodná pro přímé spojení s MS. Efekt teploty na separaci peptidů byl ověřován na několika různých kolonách s obrácenými fázemi při teplotách 30, 45, 60, 75 a 90 °C. Zatímco zlepšená účinnost byla jednoznačně prokázaná u kolony s plně porézními částicemi, tak u kolon s povrchově porézními částicemi byl efekt nepozorovatelný. Výsledky rovněž potvrzují trend, ze kterého je jasné, že zvýšená teplota přispívá k užším píkům, tím pádem i k vyšší účinnosti.

Pomocí redukované modelové monoklonální protilátky jsme testovali stabilitu peptidových vazeb při zvýšené teplotě na koloně. Byly použity teploty 30, 45, 60, 75 a 90 °C a různé časy inkubace. Zvýšená teplota zvyšuje účinnost separace. Překvapivě z výsledků vyplývá, že k degradaci peptidových vazeb dochází rychle již při teplotě 45 °C. Nevýhodou zvýšené teploty a delší doby separace je větší riziko degradace peptidů a stacionární fáze.

Dalším zjištěním bylo, že zvýšená teplota má vliv na chemickou stabilitu aminokyselin na koloně. Kombinace zvýšené teploty s 0,1% FA v mobilní fází zapříčinila některé chemické modifikace, které se podařilo objevit pomocí hmotnostního spektrometru. Jednalo se zejména o oxidaci methioninu, tvorbu pyroglutamátu na N-konci a beta-eliminaci hydroxylové skupiny ze serinu a threoninu.

Celkově z našich výsledků vyplývá, že teplota kolony je jedním z jednoduše nastavitelných parametrů, kterým lze potencionálně zvýšit počet identifikovaných peptidů v bottom-up proteomických analýzách. S ohledem na její vliv na degradaci peptidů, je však nutné vyšší teplotu používat opatrně a její úroveň volit velice pečlivě.

7 SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CAD	Detektor nabitého aerosolu (z angl. Charged Aerosol Detector)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
EMg	Koňský myoglobin (z angl. Equine Myoglobin)
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. Electrospray Ionization)
FA	Kyselina mravenčí (z angl. Formic Acid)
FPP	Plně porézní částice (z angl. Fully Porous Particles)
HETP	Výškový ekvivalent teoretického patra (z angl. High Equivalent to a Theoretical Plate)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (z angl. Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (z angl. Ion Exchange Chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)
mAb	Monoklonální protilátka (z angl. Monoclonal Antibody)
MALDI	Ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. Messenger Ribonucleic Acid)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
PTM	Posttranslační modifikace
RPLC	Chromatografie na obrácené fázi (z angl. Reversed Phase Liquid Chromatography)
SEC	Molekulová vylučovací chromatografie (z angl. Size Exclusion Chromatography)
SPP	Povrchově porézní částice (z angl. Superficially Porous Particles)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin (z angl. Tris(2-carboxyethyl)phosphine)

TFA	Kyselina trifluoroctová (z angl. Trifluoroacetic Acid)
ToF	Analyzátor doby letu (z angl. Time of Flight)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialové záření (z angl. Ultraviolet)
VIS	Viditelné záření (z angl. Visible)

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] E. Shishkova, A.S. Hebert, J.J. Coon, Commentary Now , More Than Ever , Proteomics Needs Better Chromatography, Cell Syst. 3 (2016) 321–324. doi:10.1016/j.cels.2016.10.007.

[2] J. Lenčo, M. Vajrychová, K. Pimková, M. Prokšová, M. Benková, J. Klimentová, V. Tambor, O. Soukup, Conventional-Flow Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Exploratory Bottom-Up Proteomic Analyses, Anal. Chem. 90 (2018) 5381–5389. doi:10.1021/acs.analchem.8b00525.

[3] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: Salt gradient approach, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 33–44. doi:10.1016/J.JPBA.2014.08.035.

[4] F. Battistoni, From genomics to proteomics in, 422 (2006) 193–197.

[5] M.S. Ardejani, E.T. Powers, W. Kelly, Using Cooperatively Folded Peptides To Measure Interaction Energies and Conformational Propensities Published as part of the Accounts of Chemical Research special issue " Chemical Biology of Peptides " ., (2017). doi:10.1021/acs.accounts.7b00195.

[6] A. Acids, 1 Amino Acids , Peptides , Proteins, (2009) 8–92.

[7] Chromacademy, [Online] http://chromacademy.com/index.html (accessed March 24, 2019) [Citace 21. 2. 2019].

[8] D. Penque, Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery, (2009) 155–172. doi:10.1002/prca.200800025.

[9] M. Schiestl, J. Li, A. Abas, A. Vallin, J. Millband, K. Gao, J. Joung, S. Pluschkell, T. Go, H.-N. Kang, The role of the quality assessment in the determination of overall biosimilarity: A simulated case study exercise, Biologicals. 42 (2014) 128–132. doi:10.1016/J.BIOLOGICALS.2013.11.009.

[10] W. Grosch, Amino Acids , Peptides , Proteins 1 Amino Acids , Peptides , Proteins, (2014). doi:10.1007/978-3-540-69934-7.

[11] C. Objectives, I. Points, Chapter 26: biomolecules: amino acids, peptides, and proteins, (n.d.) 9–10.

[12] B.I. Wagner, New Naturally Occurring Amino Acids"", 22 (1983) 816–828.

[13] L.P. Kozlowski, Proteome-pI : proteome isoelectric point database, (2016) 1–5. doi:10.1093/nar/gkw978.

[14] L. Johansson, G. Gafvelin, E.S.J. Arnér, Selenocysteine in proteins - Properties and biotechnological use, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1726 (2005) 1–13. doi:10.1016/j.bbagen.2005.05.010.

[15] Y. Zhang, V.N. Gladyshev, High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm Olavius algarvensis, Nucleic Acids Res. 35 (2007) 4952–4963. doi:10.1093/nar/gkm514.

[16] A. Resemann, D. Wunderlich, U. Rothbauer, B. Warscheid, H. Leonhardt, J. Fuchser, K. Kuhlmann, D. Suckau, Top-Down de Novo Protein Sequencing of a 13 . 6 kDa Camelid Single Heavy Chain Antibody by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight / Time-of-Flight Mass Spectrometry, 82 (2010) 3283–3292. doi:10.1021/pr901008d.(13).

[17] P. Disease, A.D. Of, P. Conformational, Chapter 4, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-383864-3.00004-1.

[18] M. Kouza, N. Children, Maksim Kouza Dissertation directed by : Associate

Professor Mai Suan Li Dissertation submitted to the Institute of Physics Polish, (2015).
[19] D.P. Clark, N.J. Pazdernik, M.R. McGehee, D.P. Clark, N.J. Pazdernik, M.R. McGehee, Protein Structure and Function, Mol. Biol. (2019) 445–483. doi:10.1016/B978-0-12-813288-3.00014-8.
[20] H. Lin, K.S. Caroll, Introduction: Posttranslational Protein Modification, Chem. Rev. 118 (2018) 887–888. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00756.
[21] D.L. Swaney, J. Villén, Proteomic Analysis of Protein Posttranslational Modifications by Mass Spectrometry, (2016) 207–210. doi:10.1101/pdb.top077743.
[22] D.T. Hess, J.S. Stamler, Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification, J. Biol. Chem. 287 (2012) 4411–4418. doi:10.1074/jbc.R111.285742.
[23] G. Slupphaug, R. Steinacher, A. Kuśnierczyk, Z. Barekati, P. Schär, P. Botev, SUMOylation coordinates BERosome assembly in active DNA demethylation during cell differentiation, EMBO J. 38 (2018) e99242. doi:10.15252/embj.201899242.
[24] D. Fass, C. Thorpe, Chemistry and Enzymology of Disulfide Cross-Linking in Proteins, Chem. Rev. 118 (2018) 1169–1198. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00123.
[25] C.D. Spicer, B.G. Davis, Selective chemical protein modification, Nat. Commun. 5 (2014) 1–14. doi:10.1038/ncomms5740.
[26] D. Ren, G. Pipes, G. Xiao, G.R. Kleemann, P. V Bondarenko, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Reversed-phase liquid chromatography – mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments, 1179 (2008) 198–204. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.088.
[27] and Y.Z. Gang Xing, Junmei Zhang, Yue Chen, Identification of Four Novel Types of in Vitro Protein Modifications, 7 (2010) 4603–4608. doi:10.1021/pr800456q.Identification.
[28] C.J. Krusemark, B.L. Frey, L.M. Smith, P.J. Belshaw, Complete chemical modification of amine and acid functional groups of peptides and small proteins, (2013) 1–15. doi:10.1007/978-1-61779-148-2.
[29] Q. Gao, A.G. Madian, X. Liu, J. Adamec, F.E. Regnier, Coupling protein complex analysis to peptide based proteomics, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 7661–7668. doi:10.1016/J.CHROMA.2010.09.071.
[30] M. Careri, A. Mangia, Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1000 (2003) 609–635. doi:10.1016/S0021-9673(03)00237-1.
[31] M. Kessler, D. Goldsmith, H. Schellekens, Immunogenicity of biopharmaceuticals, Nephrol. Dial. Transplant. 21 (2006) 9–12. doi:10.1093/ndt/gfl476.
[32] K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, J. Chromatogr. A. 1335 (2014) 81–103. doi:10.1016/J.CHROMA.2013.11.057.
[33] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, J. Chromatogr. A. 499 (1990) 177–196. doi:10.1016/S0021-9673(00)96972-3.
[34] R. Khalaf, D. Baur, D. Pfister, Optimization of reversed-phase chromatography methods for peptide analytics, J. Chromatogr. A. 1425 (2015) 198–203. doi:10.1016/J.CHROMA.2015.11.042.
[35] V. D'Atri, R. Pell, A. Clarke, D. Guillarme, S. Fekete, Is hydrophobic interaction

chromatography the most suitable technique to characterize site-specific antibody-drug conjugates?, J. Chromatogr. A. 1586 (2019) 149–153. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.12.020.
[36] F. Gritti, G. Guiochon, Thermodynamics of adsorption of binary aqueous organic liquid mixtures on a RPLC adsorbent, J. Chromatogr. A. 1155 (2007) 85–99. doi:10.1016/J.CHROMA.2007.04.024.
[37] C.F. Poole, N. Lenca, Applications of the solvation parameter model in reversed-phase liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1486 (2017) 2–19. doi:10.1016/J.CHROMA.2016.05.099.
[38] M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, Hydrophilic interaction chromatography, 2012. doi:10.1016/j.trac.2012.03.009.
[39] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent, J. Chromatogr. A. 1216 (2009) 2362–2370. doi:10.1016/J.CHROMA.2009.01.012.
[40] M. Guerrouache, A. Pantazaki, M.C. Millot, B. Carbonnier, Zwitterionic polymeric monoliths for HILIC/ RP mixed mode for CEC separation applications, J. Sep. Sci. 33 (2010) 787–792. doi:10.1002/jssc.200900681.
[41] T.-Y. Huang, L.-M. Chi, K.-Y. Chien, Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation, J. Chromatogr. A. 1571 (2018) 201–212. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.08.020.
[42] P. Hong, S. Koza, E.S.P. Bouvier, A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 35 (2012) 2923–2950. doi:10.1080/10826076.2012.743724.
[43] K. Muneeruddin, M. Nazzaro, I.A. Kaltashov, Characterization of Intact Protein Conjugates and Biopharmaceuticals Using Ion-Exchange Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Top-Down Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem. 87 (2015) 10138–10145. doi:10.1021/acs.analchem.5b02982.
[44] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1836–1848. doi:10.1002/jssc.200600189.
[45] D. Åsberg, M. Leśko, J. Samuelsson, K. Kaczmarski, T. Fornstedt, Method transfer from high-pressure liquid chromatography to ultra-high-pressure liquid chromatography. I. A thermodynamic perspective, J. Chromatogr. A. 1362 (2014) 206–217. doi:10.1016/j.chroma.2014.08.051.
[46] D. Åsberg, M. Chutkowski, M. Leśko, J. Samuelsson, K. Kaczmarski, T. Fornstedt, A practical approach for predicting retention time shifts due to pressure and temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1479 (2017) 107–120. doi:10.1016/j.chroma.2016.11.050.
[47] J.W.D. Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition, 2009.
[48] Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase, (2012) 3113–3123. doi:10.1002/jssc.201200297.
[49] J. Pavel, Gradient Elution in column liquid, J. Chromatogr. 31 (1985) 67–79.
[50] M. Road, M.A. Van Straten, H.A. Claessens, Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, 70 (1998) 4344–4352.
[51] S. Fekete, A. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, Trends Anal. Chem. 42

(2013) 74–83. doi:10.1016/j.trac.2012.09.012.
[52] T. Teutenberg, Analytica Chimica Acta Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency — A review, 643 (2009) 1–12. doi:10.1016/j.aca.2009.04.008.
[53] A.R. Blackler, A.E. Speers, C.C. Wu, Chromatographic benefits of elevated temperature for the proteomic analysis of membrane proteins, (2008) 3956–3964. doi:10.1002/pmic.200800210.
[54] M. Swartz, M. Swartz, HPLC DETECTORS : A BRIEF REVIEW, 6076 (2010). doi:10.1080/10826076.2010.484356.
[55] J.P. Hutchinson, J. Li, W. Farrell, E. Groeber, R. Szucs, G. Dicinoski, P.R. Haddad, Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 1646–1655. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.062.
[56] S. Forcisi, F. Moritz, B. Kanawati, D. Tziotis, R. Lehmann, P. Schmitt-Kopplin, Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling, J. Chromatogr. A. 1292 (2013) 51–65. doi:10.1016/J.CHROMA.2013.04.017.
[57] J.S. Becker, A. Matusch, B. Wu, Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review, Anal. Chim. Acta. 835 (2014) 1–18. doi:10.1016/J.ACA.2014.04.048.
[58] C.D. DeHaven, A.M. Evans, H. Dai, K.A. Lawton, Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries, J. Cheminform. 2 (2010) 9. doi:10.1186/1758-2946-2-9.
[59] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, (2016). doi:10.1021/acs.analchem.5b04561.
[60] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen, P. Development, T. Oaks, I. Introduction, MASS SPECTROMETRY FOR STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THERAPEUTIC ANTIBODIES, (2009) 147–176. doi:10.1002/mas.
[61] W. Lu, B.D. Bennett, J.D. Rabinowitz, Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics, J. Chromatogr. B. 871 (2008) 236–242. doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.031.
[62] G. Michael, A.A. Cardoso, P.C. Hauser, Absorbance detector for high performance liquid chromatography based on a deep-UV Light-Emitting Diode at 235nm, J. Chromatogr. A. (2017). doi:doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.029.
[63] C. Regl, T. Wohlschlager, J. Holzmann, C.G. Huber, C. Regl, T. Wohlschlager, J. Holzmann, C.G. Huber, A Generic HPLC Method for Absolute Quantification of Oxidation in Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins Using UV and MS Detection A Generic HPLC Method for Absolute Quantification of Oxida- tion in Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins Using, (2017). doi:10.1021/acs.analchem.7b01755.
[64] K. Takahashi, S. Kinugasa, M. Senda, K. Kimizuka, Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography, 1193 (2008) 151–155. doi:10.1016/j.chroma.2008.04.012.
[65] M. Eckardt, M. Kubicova, T.J. Simat, Universal response quantification approach using a Corona Charged Aerosol Detector (CAD) – Application on linear and cyclic oligomers extractable from polycondensate plastics polyesters , polyamides and polyarylsulfones, J. Chromatogr. A. 1572 (2018) 187–202. doi:10.1016/j.chroma.2018.08.051.

[66] J.P. Hutchinson, J. Li, W. Farrell, E. Groeber, R. Szucs, G. Dicinoski, P.R. Haddad, Universal response model for a corona charged aerosol detector, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 7418–7427. doi:10.1016/j.chroma.2010.09.056.
[67] C. Escher, L. Reiter, B. Maclean, R. Ossola, F. Herzog, M.J. Maccoss, O. Rinner, Measurement of Peptides, 12 (2014) 1111–1121. doi:10.1002/pmic.201100463.Using.
[68] S. Heinisch, J. Rocca, Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography, 1216 (2009) 642–658. doi:10.1016/j.chroma.2008.11.079.
[69] C. Liu, E. Topchiy, T. Lehmann, F. Basile, Characterization of the dehydration products due to thermal decomposition of peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 50 (2015) 625–632. doi:10.1002/jms.3570.
[70] B. Xiong, L. Garcowski, L. Wright, B. Nofsinger, M. Allen, # T3336 . Degradation of Synthetic Peptides Caused by Thermal Denaturation during Targeted Proteomics Sample Preparation and Its Impact on LC-MS / MS Assay Accuracy, (2015) 3336.
[71] P. Sandra, G. Vanhoenacker, Elevated temperature-extended column length conventional liquid chromatography to increase peak capacity for the analysis of tryptic digests, J. Sep. Sci. 30 (2007) 241–244. doi:10.1002/jssc.200600329.