

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**VYUŽITÍ VYLUČOVACÍ CHROMATOGRFIE
K URČENÍ HMOTNOSTI NEZNÁMÉ LÁTKY**

**APPLICATION OF SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY
TO MASS DETERMINATION OF AN UNKNOWN COMPOUND**

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233148852

Praha 2009

Tereza Hlavsová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. J. Sobotníkové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Podpis

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

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce, RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D., a Mgr. Lucii Janečkové za odborné vedení a pomoc s touto bakalářskou prací. Poděkování patří i mé rodině za podporu během studia.

Předmětová hesla

Vylučovací chromatografie proteinů

Gelová permeační chromatografie

Určení molekulové hmotnosti neznámé látky

Bílkoviny

Klíčová slova

SEC

HPLC

Hema-Bio

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Vylučovací chromatografie	8
2.2. Stacionární fáze ve vylučovací chromatografii	8
2.3. Chromatografická data a kalibrace kolony	10
2.4. Proteiny použité pro kalibraci kolony	11
3. Experimentální část	13
4. Výsledky a diskuse	16
5. Závěr	26
6. Seznam použité literatury	27

Seznam zkratek a symbolů

ACN	acetonitril
BSA	hovězí sérový albumin
Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
k	retenční faktor
K_d	rozdělovací konstanta
MeOH	methanol
M	molekulová hmotnost
SEC	vylučovací chromatografie
t_M	mrtvý retenční čas (min)
t_R	retenční čas analytu (min)
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
V_i	objem eluentu v pórech gelu (ml)
V_M	mrtvý objem kolony (ml)
V_R	retenční objem analytu (ml)

1. Úvod

Chromatografie byla objevena v devadesátých letech 19. století. I přes velký úspěch byla zapomenuta a „znovu objevena“ v první polovině 20. století. Poté následoval její rychlý vývoj s rozvojem chemického průmyslu po druhé světové válce.

Chromatografické metody umožňují jak dělení velmi složitých směsí látek, tak i identifikaci a kvantitativní analýzu jednotlivých látek. Používají se také k izolaci látek ve velmi čistém stavu, k analytické kontrole čistoty barviv, léčiv, rozpouštědel, k přečištění chemikálií apod. [1,2].

Chromatografické metody jsou založeny na postupném ustavování rovnováhy dělených látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Nepohyblivá, tj. stacionární fáze je tvořena materiálem, který je umístěn v chromatografické koloně. Pohyblivou mobilní fázi představuje eluční činidlo, tj. kapalina nebo plyn, kterými jsou jednotlivé složky z kolony vymývány. Dělené látky jsou různě zadržovány na stacionární fázi a jsou různou rychlostí unášeny ve směru toku pohyblivé fáze. Tím dochází k rozdělení směsi látek.

Chromatografické metody jsou rozděleny podle fyzikálního principu na chromatografii adsorpční, afinitní, iontoměničovou, gelovou a rozdělovací nebo podle způsobu provedení na chromatografii na papíře, na tenké vrstvě a chromatografii sloupcovou nebo-li kolonovou. Většina chromatografických analýz se uskutečňuje v kolonovém uspořádání rozdělovací vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s využitím systému reverzních stacionárních fází [1,2,3,4].

Cílem této bakalářské práce bylo využití vylučovací chromatografie k určení molekulové hmotnosti M neznámé látky. K tomuto účelu byla použita vylučovací kolona Hema-Bio 40, u které byla posuzována její využitelnost pro určování M neznámé látky metodou vylučovací chromatografie. Kolona byla kalibrována na látky o známé M , kterými byly vybrané proteinové standardy. Jejich změřené retenční časy byly poté srovnávány s retenčními časy neznámých látek, získanými za stejných experimentálních podmínek, jako probíhala kalibrace vylučovací kolony.

2. Teoretická část

2.1. Vylučovací chromatografie

Vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography = SEC) je také označována jako gelová permeační chromatografie (GPC) nebo gelová filtrace. Je typem kolonové kapalinové chromatografie, při které se látky přítomné ve vzorku dělí především podle velikosti svých molekul. Řídicím dělicím mechanismem při vylučovací chromatografii je sterická exkluze, také se mohou uplatňovat difuze a adsorpce, které ovšem mohou ovlivňovat eluční pořadí analytů [2,5,6]. Dělené látky prochází gelem (molekulárním sítem) o různé velikosti pórů, které tvoří stacionární fázi. Molekuly větší než póry gelu nemohou do pórů pronikat a procházejí kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze nebo-li eluční roztok. Objeví se tedy v eluátu ihned po vytečení intersticiální kapaliny z kolony. Dochází k tzv. exkluzi větších molekul. Naopak malé molekuly pronikají do pórů gelu, ve kterých eluční roztok neprotéká a neunáší je. Pokud se molekuly dostanou difuzí ven z částice gelu, pak je proud elučního roztoku odnese k další gelové částici, do níž opět proniknou. Látky eluují podle zmenšujících se rozměrů molekul, podle klesající molekulové hmotnosti. Velké molekuly procházejí kolonou rychleji a malé molekuly tedy pomaleji

Gelová chromatografie se využívá pro skupinovou separaci látek, např. pro odsolení bílkovin, peptidů, polysacharidů, tedy pro oddělení vysokomolekulárních látek od nízkomolekulárního znečištění. Dále se používá pro frakcionaci a izolaci jednotlivých složek o nepříliš odlišné molekulové hmotnosti z jejich směsi a v neposlední řadě lze SEC využít k určení molekulové hmotnosti neznámé látky [2,4]. Hlavní aplikační využití gelové chromatografie je především v biochemii a v oblasti přípravy a dalšího studia syntetických polymerů, syntetických vysokomolekulárních látek.

2.2. Stacionární fáze ve vylučovací chromatografii

Pro vylučovací nebo-li gelovou chromatografii se nejčastěji jako stacionární fáze používají gely dvojího typu – xerogely a aerogely [2,5,6,7]. Xerogely jsou tvořeny

makromolekulami s póry určité velikosti. V použitém rozpouštědle tyto gely bobtnají na objem, který je mnohonásobně větší než původní. Xerogely tvoří dvě hlavní skupiny:

- hydrofilní gely, jako např. dextranový gel, různé agarosové gely, glykolmethakrylátové a polyakrylamidové gely, které se hodí pro dělení ve vodě rozpustných látek
- hydrofobní gely pro dělení ve vodě nerozpustných látek, vhodné pro práci v prostředí organických rozpouštědel, např. styren-divinylbenzenové gely, zesítené akrylátové gely a polyvinylacetátové gely.

Aerogely jsou tvořeny maticí s pevnou inertní strukturou, jež obsahuje póry určité velikosti, které jsou v suchém stavu naplněné vzduchem. Při naplnění kolony nedochází k objemovým změnám, rozpouštědlo vytěsňuje vzduch z pórů gelu, přičemž vlastní matrice nebobtná. Představitelem tohoto typu gelu jsou různě modifikované silikagely či porézní skla.

Řada dalších velmi často používaných gelů mají vlastnosti obou základních typů, a to jak xerogelu, tak i aerogelu. Jsou nazývány hybridními gely nebo také nehomogenními gely. Příkladem je Styragel nebo československý výrobek Spheron [6].

Gel, který je vhodný jako stacionární fáze v SEC, by měl mít následující vlastnosti [2,8]:

- inertní maticí gelu pro dělení složky i pro eluční roztoky
- chemickou stabilitu gelu po dlouhou dobu, při různém pH a různé teplotě
- mechanickou stabilitu gelu, aby nedocházelo k jeho deformaci při vyšším tlaku mobilní fáze
- velikost gelových částic nesmí být příliš malá (rozdělení je přesnější, ale pomalé), ani příliš velká (rozdělení je rychlejší, ale může být nepřesné).

V dnešní době je většina aplikací gelové chromatografie realizována v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie, což klade zvýšené nároky na vlastnosti stacionární fáze. První účinnou stacionární fází pro vysokoúčinnou SEC byl silikagel, ale nestabilita při vysokém nebo naopak nízkém pH a tepelná labilita brzdily jeho další chromatografické využití. Proto se zkoumaly jiné materiály, které by sloužily jako lepší vylučovací stacionární fáze pro HPLC. Začala se zkoumat možnost využití organických polymerů jako stacionární fáze pro SEC. Asi před třiceti lety byl uveden hydroxyethyl methakrylátový sorbent patřící mezi vhodné organické polymery pro kapalinovou

vylučovací chromatografii proteinů. V roce 1973 byl popsán sférický porézní kopolymer HEMA složený z 2-hydroxyethyl methakrylátu a ethylen dimethakrylátu. Osvědčil se jako vhodná stacionární fáze pro vylučovací chromatografii s odolností tlaku do 20 MPa, širokým rozsahem pH a snášenlivostí s většinou organických rozpouštědel [9,10].

2.3. Chromatografická data a kalibrace kolony

Po nástřiku vzorku do chromatografické kolony je mobilní fází unášen tzv. eluční pás (směsná zóna) a na stacionární fázi dochází k rozdělení vzorku na jednotlivé složky. Při výstupu jednotlivých složek z kolony indikuje detektor jejich přítomnost v eluátu a zaznamenává graficky eluční pík. Poloha píku v chromatogramu udává dobu, kterou separovaná složka setrvá v koloně, tj. eluční nebo-li retenční čas a je kvalitativním průkazem přítomnosti dané složky. Plocha nebo výška píku udává množství složky obsažené v separované směsi [1,11].

Dělení látek probíhá při SEC na jemnozrnném pórovitém materiálu, nejčastěji zesít'ovaném organickém kopolymeru (gelu), který je zbobtnalý v eluentu, v pórech tedy obsahuje molekuly eluentu. Gel má takovou strukturu, že pro největší molekuly nejsou jeho póry vůbec přístupné a tyto molekuly procházejí v prostoru mezi částicemi gelu. Eluční objem, tedy množství elučního rozpouštědla nutné k eluci těchto molekul, se potom rovná objemu eluentu v prostorech mezi zrnny gelu, tj. mrtvému objemu kolony V_M . Pro dostatečně malé molekuly jsou prostory v pórech gelu přístupné a tyto molekuly jsou vymývány objemem, který odpovídá celkovému objemu eluentu v koloně, tj. mrtvému objemu kolony V_M a objemu eluentu v pórech gelu V_i [5,6,12].

Pro retenční (eluční) objem dané látky V_R platí, že

$$V_R = V_M + K_d \cdot V_i \quad (1)$$

kde K_d je rozdělovací konstanta vyjadřující distribuci látky mezi mobilní a stacionární fází [6].

Pro rozdělovací konstantu můžeme psát:

$$K_d = \frac{V_R - V_M}{V_i} \quad (2)$$

Pokud jsou molekuly tak velké, že jsou pro ně póry zrn gelu nepřístupné, pak rozdělovací konstanta je nulová a eluční objem těchto molekul je roven mrtvému objemu kolony, jak plyne z rovnice 1. Všechny molekuly s nulovou hodnotou distribuční konstanty se vyskytují v oblasti, která se označuje jako oblast totální exkluze a nelze je tedy v daném chromatografickém systému rozdělit. Velikost relativně nejmenších molekul s nulovou hodnotou K_d se označuje jako horní vylučovací limit gelu. Velikost relativně největších molekul s hodnotou $K_d = 1$ se označuje jako spodní vylučovací limit gelu. Látky s velikostí molekul menší než je spodní vylučovací limit gelu nelze tudíž v daném chromatografickém systému také rozdělit. Spousta gelů má určité množství mikroskopických pórů, které jsou přístupné i velmi malým molekulám, a proto není většinou spodní vylučovací limit gelu definován. U těchto gelů se potom udává pouze vylučovací limit (horní vylučovací limit) určující velikost molekul, které již nebudou pronikat do pórů gelu a nebudou tedy separovány na vylučovací koloně [1,6,11,13].

Metoda kalibrace kolony ve vylučovací chromatografii se provádí pomocí látek (standardů) o známých molekulových hmotnostech M [14]. Jsou zaznamenávány jejich retenční časy (retenční faktory), které jsou buď přímo srovnávány s retenčními časy t_R (retenčními faktory k) separovaných vzorků a tak je určena molekulová hmotnost nebo je molekulová hmotnost neznámých vzorků určena metodou kalibrační křivky.

2.4. Proteiny použité pro kalibraci kolony

V této bakalářské práci byly jako standardy pro kalibraci kolony použity bílkoviny myoglobin, α -laktalbumin, ovalbumin, β -laktoglobulin, hovězí sérový albumin (BSA) a cytochrom c.

Pro kalibraci vylučovací kolony, tzn. pro zjištění vztahu mezi retenčním časem (elučním objemem) a molekulovou hmotností analytu, se používají většinou vybrané

proteiny o známé molekulové hmotnosti. U těchto proteinových standardů se zjistí průměrné hodnoty retenčních časů, které se poté vynesou do kalibračního grafu ve formě t_R vs. $\log M$. Takto okalibrovanou kolonu lze následně využít pro zjištění molekulové hmotnosti neznámé látky s využitím zkonstruovaného kalibračního grafu a změřené retence neznámé látky.

Myoglobin je hemový protein o molekulové hmotnosti 17 600 Da a je lokalizován v cytoplazmě. **Je to kyslík vázající protein příčně pruhovaného svalstva** [15]. Obsahuje 153 aminokyselinových zbytků [16].

α -laktalbumin je malý, globulární protein nacházející se v mléku, tzv. syrovátkový protein. Je to metaloprotein o molekulové hmotnosti 14 200 Da. Obsahuje několik kovových iontů včetně vápníku, který hraje roli v regeneraci přirozeného α -laktalbuminu z redukované, denaturované formy. Je jedním z hlavních mléčných alergenů [16,17].

Ovalbumin je hlavní protein vaječného bílku, zároveň je také jeho hlavním alergenem, obsahující 385 aminokyselinových zbytků. Je to fosforylovaný glykoprotein o molekulové hmotnosti 44 300 Da [16].

β -laktoglobulin je syrovátkový protein obsažený v mléku, tvořený 162 aminokyselinovými zbytky o molekulové hmotnosti 18 400 Da. Stejně jako α -laktalbumin patří mezi hlavní alergeny mléka [16,17].

Molekulová hmotnost hovězího sérového albuminu je 66 400 Da. BSA je tvořen jednoduchým polypeptidovým řetězcem obsahujícím asi 583 aminokyselinových zbytků. Často je používán jako standard při analýzách proteinů [16].

Cytochrom c o molekulové hmotnosti 12 300 Da obsahuje 104 aminokyselinových zbytků. Je součástí mitochondriálního elektronového transportního řetězce, přenáší elektrony mezi dvěma enzymatickými systémy [16].

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

V této bakalářské práci byly použity následující chemikálie o uvedené čistotě:

- acetonitril (ACN); čistota pro HPLC, Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- methanol; čistota pro HPLC, Sigma Aldrich
- dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát; p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát; p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- deionizovaná voda, připravena systémem Milli Pore, (Mosheim, Francie)
- trihydrogenfosforečná kyselina (H₃PO₄); čistota pro HPLC, Sigma Aldrich
- hydroxid sodný (NaOH), čistota > 98%, Sigma Aldrich

- Analyty:
 - cytochrom c, čistota > 95%, Sigma Aldrich
 - α -laktalbumin, čistota > 95%, Sigma Aldrich
 - myoglobin, čistota > 95%, Sigma Aldrich
 - β -laktoglobulin, čistota > 90%, Sigma Aldrich
 - ovalbumin, čistota > 98%, Sigma Aldrich
 - BSA, čistota > 98%, Sigma Aldrich
 - pepsin, čistota > 98%, Sigma Aldrich

3.2. Přístroje a pomůcky

K měření byl používán kapalinový chromatograf Unicam skládající se ze dvou částí, a to vysokotlaké pumpy LC-XPD pump a UV spektrofotometrického detektoru LC-UV detector, obojí od firmy Pye Unicam (Cambridge, Velká Británie).

Pro dávkování vzorků bylo použito dávkovacího ventilu Rheodyne (Cotati, Kalifornie, USA) model 7725i s vnější dávkovací smyčkou o objemu 10 μ l.

Vzorky na kolonu byly dávkovány pomocí injekční stříkačky Hamilton (Reno, Nevada, USA) o celkovém objemu 10 μ l a 25 μ l.

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30M (Singen, Německo) sloužila k odplynění mobilní fáze.

K měření pH při přípravě pufrů byl používán pH-metr firmy Jenway, model 3510 (Dunmow Essex, Anglie).

Pro navážení chemikálií sloužily analytické váhy APX-100 od firmy Denver Instrument (Göttingen, Německo).

K vlastní separaci byla použita kolona Hema-Bio 40 od firmy Tessek Ltd. (Praha, Česká republika) s rozměry 8 x 250 mm, naplněna hydroxyethylmethakrylátovým sorbentem o velikosti částic 10 μ m. Vylučovací limit této kolony je 40-80 kDa.

Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit počítačový program Chromatography Station CSW32 od firmy Data Apex (Praha, Česká republika) a pro grafickou prezentaci naměřených dat byl použit program Microcal Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

3.3. Příprava vzorků, mobilních fází a podmínky měření

Příprava vzorků

Roztoky vzorků proteinových standardů byly připraveny navážením 1 mg příslušného proteinu a jeho rozpuštěním v 1 ml deionizované vody. Roztoky vzorků byly skladovány v mrazáku při teplotě -18 °C.

Příprava mobilních fází

Na přípravu hydrogenfosforečnanového pufru a dihydrogenfosforečnanového pufru bylo odváženo příslušné množství chemikálie, které bylo rozpuštěno v odměrné baňce v deionizované vodě a bezprostředně před doplněním po rysku bylo pH pufru upraveno 85% kyselinou trihydrogenfosforečnou nebo 1 M hydroxidem sodným na požadovanou hodnotu. Roztok byl poté doplněn v odměrné baňce deionizovanou vodou po rysku. Pufry byly skladovány v lednici při teplotě 5 °C.

Mobilní fáze pro měření ve vylučovací chromatografii byly připraveny smícháním odměřeného množství ACN nebo MeOH s příslušným pufrům o určité koncentraci a pH.

Podmínky měření

Při studiu retenčního chování analytů byly použity následující mobilní fáze: vodný roztok hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7, směs ACN a vodného roztoku hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7 a 10, směs ACN a vodného roztoku dihydrogenfosforečnanového pufru o pH 2 a 5, směs MeOH a vodného roztoku hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7. Obsah organické složky v mobilní fázi byl měněn v rozsahu 5 až 20 objemových procent ACN / MeOH a také koncentrace pufru v mobilní fázi byla měněna. Cílem optimalizace složení mobilní fáze bylo dosáhnout reprodukovatelné retenční časy jednotlivých proteinových standardů, které umožní sestavení kalibrační křivky využitelné pro určení molekulové hmotnosti neznámé sloučeniny .

Jednotlivé analýzy probíhaly při laboratorní teplotě, při průtoku mobilní fáze 0,5 ml / min a detekční vlnové délce 215 nm. Detekční vlnová délka i průtok mobilní fáze byly zvoleny na základě údajů v článku z J. Chromatogr. A, viz [18].

4. Výsledky a diskuse

V rámci této bakalářské práce byly nejdříve hledány vhodné experimentální podmínky, které by umožnily dostatečné rozdělení směsi šesti proteinových standardů o známé molekulové hmotnosti, jejich eluci z kolony podle klesající molekulové hmotnosti a následné určení molekulové hmotnosti u dvou neznámých proteinů na základě kalibrace vylučovací kolony Hema-Bio 40 pomocí zvolených proteinových standardů.

Při kalibraci vylučovací kolony Hema-Bio 40 byly postupně proměřovány retenční charakteristiky jednotlivých proteinových standardů v optimalizované mobilní fázi.

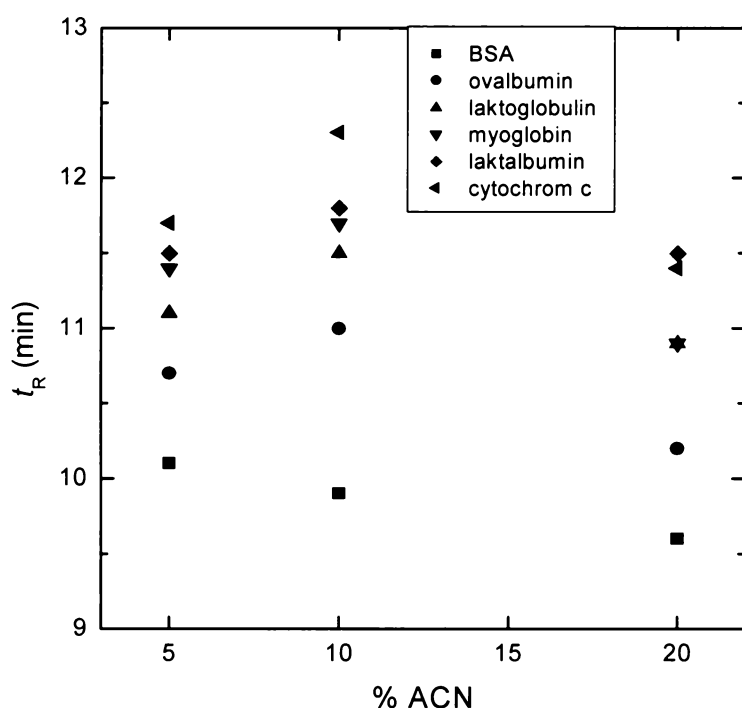
Prvotním zdrojem informací o složení mobilní fáze vhodné pro kolonu Hema-Bio 40 byl článek z *J. Chromatogr. A - Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components* [18]. Na základě údajů z tohoto článku byl zvolen jako organický modifikátor acetonitril.

Při optimalizaci složení mobilní fáze byl sledován vliv typu a obsahu organického modifikátoru a také pH a koncentrace vodné složky mobilní fáze na retenční chování proteinových standardů.

Při sledování vlivu obsahu organického modifikátoru na retenční chování proteinových standardů byly použity tři mobilní fáze:

- směs 5 % obj. ACN a 95 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0
- směs 10 % obj. ACN a 90 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0
- směs 20 % obj. ACN a 80 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0

Na obr. 1 je uvedena závislost retenčních časů proteinových standardů na obsahu ACN v mobilní fázi.



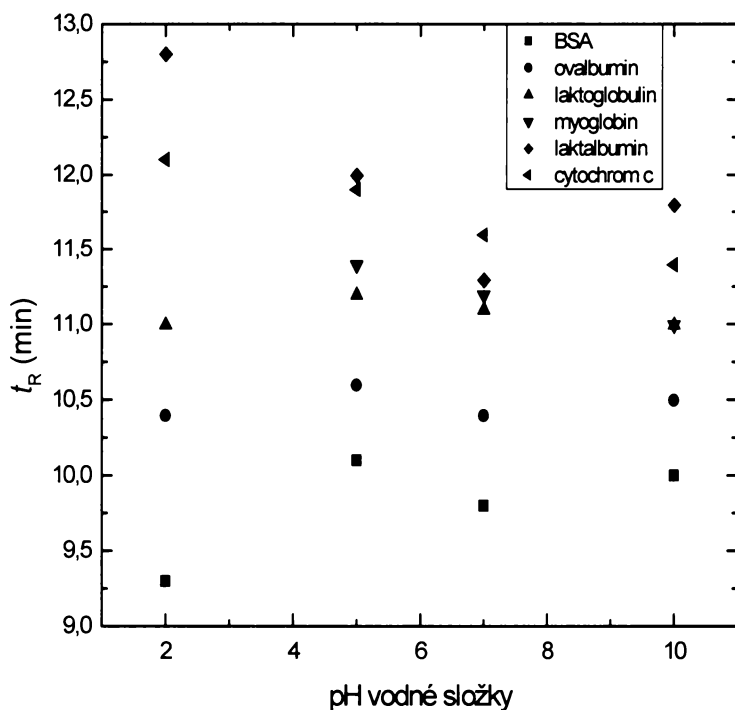
Obr. 1: Závislost retenčních časů proteinových standardů na obsahu organické složky v mobilní fázi. Mobilní fáze: směs ACN a 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0 v obj. poměrech 5/95, 10/90 a 20/80. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

Podle změřených retenčních časů analytů při různém obsahu ACN v mobilní fázi byla za vhodnou mobilní fázi vybrána ta o složení 10 % obj. ACN / 90 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0. Při tomto složení mobilní fáze dochází k nejlepšímu rozdělení analytů v rámci studovaných tří mobilních fází. Eluční pořadí standardů odpovídá pořadí podle jejich klesajících molekulových hmotností. 5% obsah ACN v mobilní fázi odpovídá také správnému elučnímu pořadí analytů, ale retenční časy analytů nejsou tak odlišné jako u 10% obsahu ACN v mobilní fázi. Při 20% obsahu ACN v mobilní fázi došlo ke koeluci β -laktoglobulinu a myoglobinu a bylo také přehozeno eluční pořadí α -laktalbuminu a cytochromu c, proto nebyla tato mobilní fáze dále studována.

V dalších optimalizačních krocích byla tedy používána mobilní fáze o složení

10 % obj. ACN / 90 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru, u kterého bylo měněno pH. Byly studovány celkem čtyři mobilní fáze; dvě s dihydrogenfosforečnanovým pufrům o pH 2,0 a pH 5,0 a dvě s hydrogenfosforečnanovým pufrům o pH 7,0 a pH 10,0.

Na obr. 2 je vynesena závislost retenčních časů proteinových standardů na změně pH fosforečnanového pufru v mobilní fázi.



Obr. 2: Závislost retenčních časů proteinových standardů na pH fosforečnanového pufru v mobilní fázi. Mobilní fáze: směs 10 % obj. ACN a 90 % obj. 100 mM dihydrogenfosforečnanového pufru o pH 2,0 a pH 5,0; směs 10 % obj. ACN a 90 % obj. 100 mM hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0 a pH 10,0. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

V mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr o pH 10,0 došlo k přehození elučního pořadí cytochromu c a α -laktalbuminu, což neodpovídá elučnímu pořadí podle jejich molekulových hmotností. Tato mobilní fáze nebyla dále využívána, protože docházelo pravděpodobně k uplatnění nežádoucích procesů (např. adsorpce na stacionární fázi), které ve vylučovací chromatografii mohou způsobovat záměnu elučního pořadí analytů.

Při použití mobilní fáze složené z ACN a kyselého fosforečnanového pufru o pH 2,0

nebyla pro myoglobin zaznamenána odezva detektoru ani při opakovaných aplikacích čerstvě připraveného roztoku analytu. Pravděpodobně došlo k výraznému prodloužení retence myoglobinu při použití kyselé mobilní fáze, které způsobilo rozmytí zóny vzorku a tu poté nebylo možné detegovat nebo mohlo dojít ke změně vlastností myoglobinu, které způsobily jeho nedetegovatelnost při 215 nm. Použitím tohoto pufru došlo opět k záměně elučního pořadí analytů podle jejich molekulové hmotnosti, neboť cytochrom c eluoval před α -laktalbuminem.

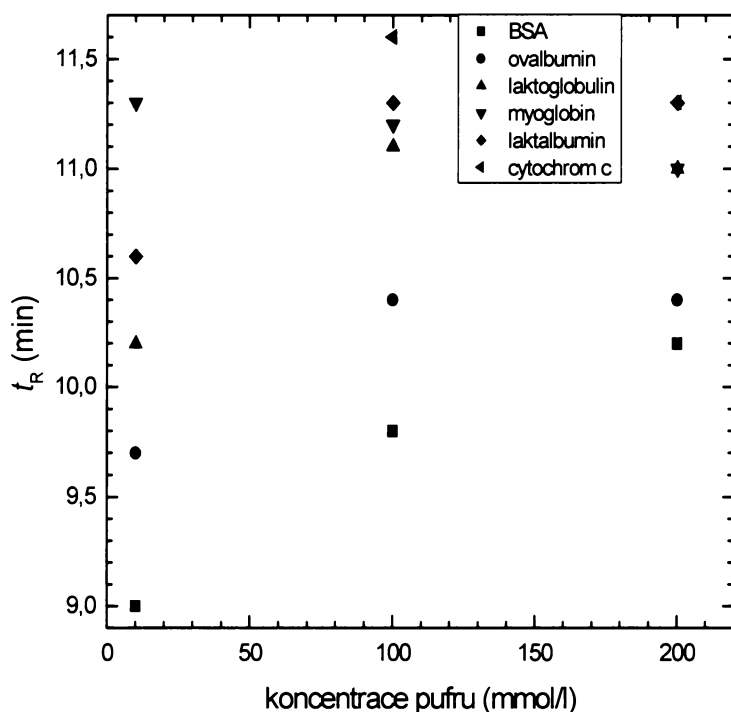
Také v mobilní fázi obsahující vodnou složku o pH 5,0 došlo k záměně elučního pořadí cytochromu c a α -laktalbuminu. Odezva detektoru pro myoglobin a α -laktalbumin byla v této mobilní fázi velmi nízká. Pro posledně jmenované analyty byl získán nesymetrický pík o malé výšce.

Z výše uvedených důvodů nebyly mobilní fáze s fosforečnanovým pufrům o pH 2,0, 5,0 a 10,0 vhodné pro další optimalizační kroky. Mobilní fáze o složení 10 % obj. ACN / 90 % obj. 100 mM hydrogenufosforečnanového pufru o pH 7,0 byla nejvhodnější pro následnou práci i přes to, že rozdíl retenčních časů jednotlivých analytů nebyl příliš velký. Důležité v této fázi optimalizace bylo, že analyty eluovaly v pořadí odpovídajícím jejich molekulovým hmotnostem.

Dále byly studovány mobilní fáze o složení 10 % obj. ACN / 90 % obj. fosforečnanového pufru o pH 7,0 a měněna byla koncentrace pufru. Mobilní fáze obsahovaly fosforečnanový pufr o koncentraci 10 mM, 100 mM a 200 mM.

Na obr. 3 je znázorněna změna retenčního chování proteinových standardů při různých koncentracích fosforečnanového pufru v mobilní fázi.

1. Cytochrom c 12 300 Da
2. α -laktalbumin 14 200 Da
3. myoglobin 17 600 Da
4. β -laktoglobulin 18 400 Da
5. ovalbumin 44 300 Da
6. BSA 66 400 Da



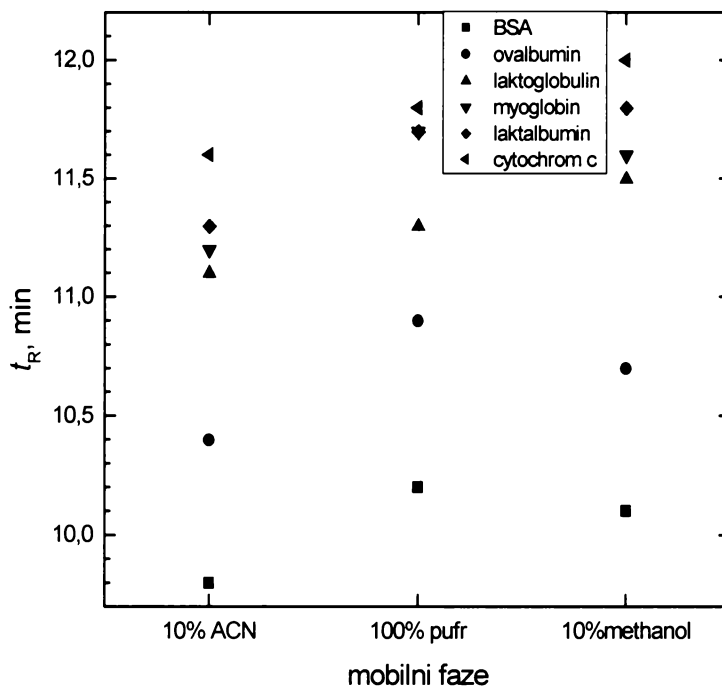
Obr. 3: Vliv koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi na retenční časy proteinových standardů. Mobilní fáze: směs 10 % obj. ACN a 90 % obj. hydrogenfosforečnanového pufru o pH 7,0 a koncentraci 10 mM, 100 mM a 200 mM. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

Mobilní fáze s fosforečnanovým pufrům o koncentraci 10 mM byla pro další měření nevhodná z důvodu záměny elučního pořadí myoglobinu a α -laktalbuminu. Při této koncentraci byla získána odezva cytochromu c ve formě rozmytého, nízkého píku s četnými výběžky. Cytochrom c se za použitých experimentálních podmínek pravděpodobně rozkládá.

Fosforečnanový pufr o koncentraci 200 mM jako vodná složka mobilní fáze také nebyl pro další měření vhodný, protože retenční časy pro cytochrom c a α -laktalbumin a pro myoglobin a β -laktoglobulin byly stejné.

Za vhodnou mobilní fázi byla vybrána ta, která obsahovala 100 mM fosforečnanový pufr, tedy mobilní fáze o složení 10 % obj. ACN / 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0.

V posledním optimalizačním kroku byl sledován vliv druhu organického modifikátoru (ACN nebo MeOH) či jeho nepřítomnost, tedy použití čistě vodné mobilní fáze, na retenční chování studovaných proteinových standardů. Byly srovnávány mobilní fáze o složení 10 % obj. ACN / 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0, 10 % obj. MeOH / 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0 a 100% 100 mM fosforečnanový pufr o pH 7,0. Výsledky získané v tomto optimalizačním kroku jsou graficky znázorněny na obr. 4.



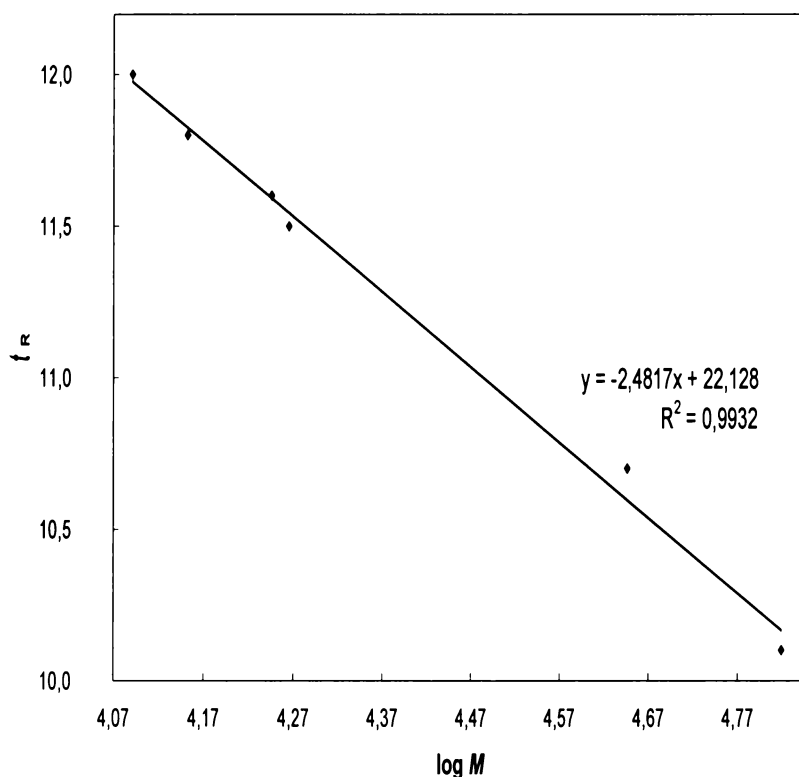
Obr.4: Vliv organického modifikátoru na retenční chování proteinových standardů. Mobilní fáze: směs 10 % obj. ACN a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0, směs 10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0 a 100% 100 mM fosforečnanový pufr o pH 7,0. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

Použití mobilní fáze tvořené 100% 100 mM fosforečnanovým pufrům o pH 7,0 není vhodné z důvodu koeluce myoglobinu a α -laktalbuminu, které ~~dosahovaly stejného retenčního času~~. Zbytečně; koeluce = myoglobin a laktalbumin = stejné t_R

Porovnáním výsledků získaných v mobilních fázích o složení 10 % obj. ACN / 90 %

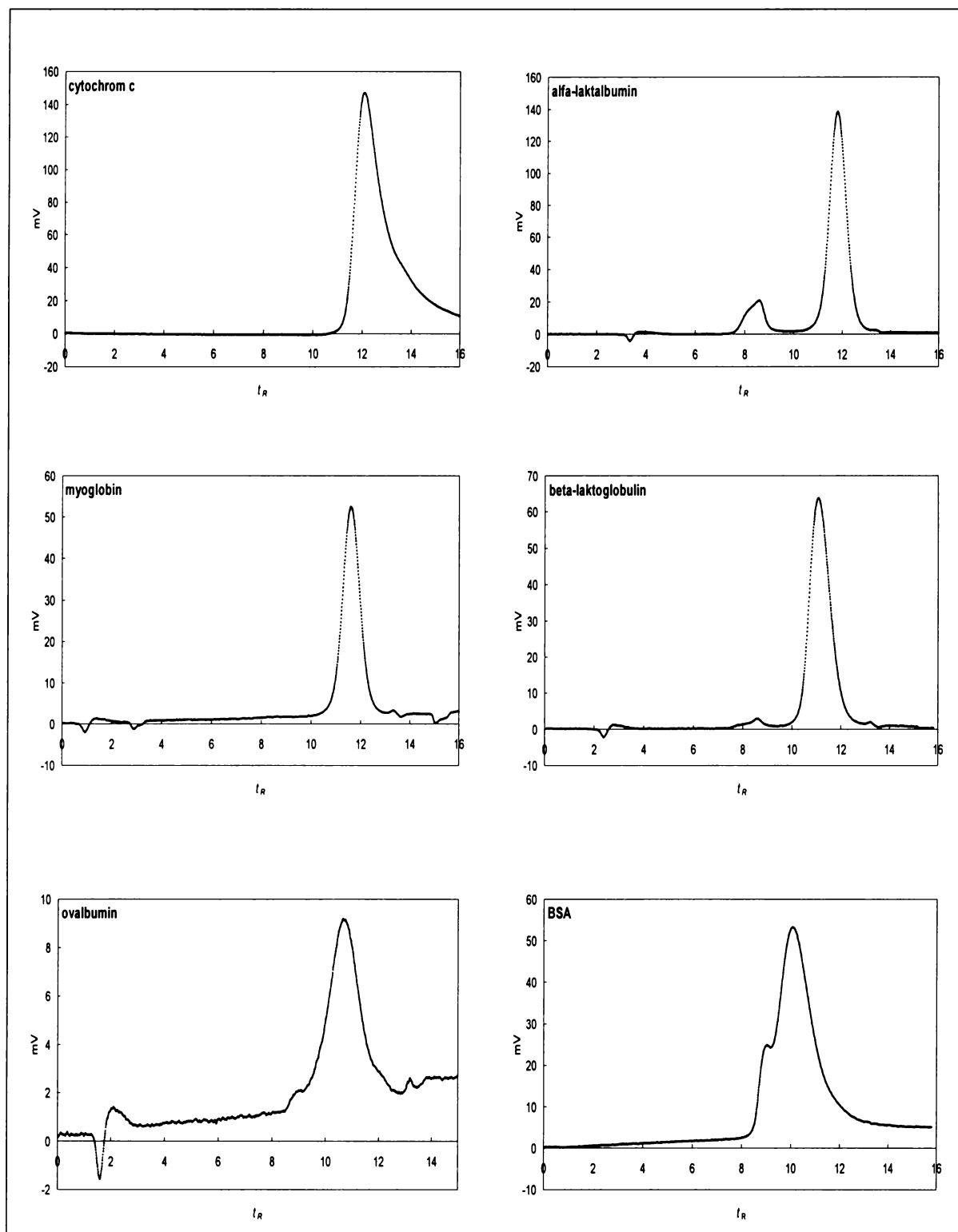
obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0 a 10 % obj. MeOH / 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0 byla jako vhodnější vybrána mobilní fáze s obsahem 10 % obj. MeOH. Mobilní fázi s obsahem 10 % obj. ACN by bylo možné také použít, zaručuje také správné eluční pořadí proteinových standardů, ale analyty α -laktalbumin, myoglobin a β -laktoglobulin mají velmi podobné retenční časy.

Na obr. 5 je znázorněna kalibrační křivka vylučovací kolony Hema-Bio 40 získaná ze závislosti retenčního času t_R proteinových standardů na logaritmu jejich molekulové hmotnosti v optimalizované mobilní fázi o složení 10 % obj. MeOH / 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0. Získaná kalibrační závislost je ve studovaném rozsahu molekulových hmotností lineární, koeficient determinace R^2 dosahuje hodnoty 0,9932. Tato kalibrační křivka je tedy vhodná pro další krok, kterým je zjištění hmotnosti neznámých vzorků na základě jejich retenčního chování v optimalizované mobilní fázi.



Obr. 5: Kalibrace vylučovací kolony vyjádřená ve formě závislosti retenčního času t_R proteinových standardů na logaritmu jejich molekulové hmotnosti. Mobilní fáze: směs 10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

Na obr. 6 jsou vybrané chromatogramy proteinových standardů pro mobilní fázi s obsahem methanolu.



Obr. 6: Chromatogramy proteinových standardů. Mobilní fáze: směs 10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0. Průtok mobilní fáze 0,5 ml / min, dávkování 10 μ l, UV detekce při 215 nm.

V optimalizované mobilní fázi byly na koloně Hema-Bio 40 proměřeny dva neznámé vzorky, vzorek 1 a vzorek 2, za účelem určení jejich molekulové hmotnosti. Vzorek 1 byl náhodně vybraný jeden z proteinových standardů, se kterými byla prováděna kalibrace kolony a vzorek 2 byl neznámý protein o neznámé molekulové hmotnosti, ovšem ležící v rozsahu molekulových hmotností kalibrační křivky. Pro neznámý vzorek 1 byl v optimalizované mobilní fázi (10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0) naměřen retenční čas 11,9 min. Po dosazení do rovnice kalibračního grafu pro vylučovací kolonu Hema-Bio 40 tento retenční čas odpovídá molekulové hmotnosti

vzorek 1 13 224 Da. Pro neznámý vzorek 2 byl za optimalizovaných experimentálních podmínek zjištěn retenční čas 12,4 min, který odpovídá molekulové hmotnosti 8 313 Da. Na základě těchto výsledků vykazuje neznámý vzorek 1 molekulovou hmotnost blízkou α -laktalbuminu a vzorek 2 leží mimo rozsah molekulových hmotností kalibračního grafu. $\log M = 3,9$

Pro zvýšení spolehlivosti identifikace neznámých vzorků bylo zvoleno srovnání relativní retence neznámých vzorků s proteinovými standardy. Toto srovnání by mělo minimalizovat změny retenčních časů způsobené například změnou laboratorní teploty či nekonstantností průtoku mobilní fáze kolonou. K určení relativní retence byl vybrán jako srovnávací protein BSA, který za všech experimentálních podmínek eluoval z kolony jako první a nebyla u něj tedy zaznamenána záměna elučního pořadí vzhledem k jeho molekulové hmotnosti. Jeho molekulová hmotnost spadá do oblasti vylučovacího limitu použité stacionární fáze, která je výrobcem udávána mezi 40 až 80 kDa.

V optimalizované mobilní fázi (10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0) byl kromě retenčního času vzorku 1 a vzorku 2 zjištěn také retenční čas srovnávacího proteinu BSA a to 10,4 min. Relativní retence byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$\text{relativní retence} = \frac{t_R - t_{R(\text{BSA})}}{t_{R(\text{BSA})}} \quad (3)$$

Tabulka 1: Vypočítané hodnoty relativní retence proteinových standardů a neznámých vzorků

analyt	Relativní retence
ovalbumin	0,060
β -laktoglobulin	0,140
myoglobin	0,150
α -laktalbumin	0,170
cytochrom c	0,190
vzorek 1	0,150
vzorek 2	0,192

Vzorek 1 byl srovnáním relativních retencí s proteinovými standardy identifikován jako protein myoglobin o molekulové hmotnosti 17 600 Da. Určení molekulové hmotnosti vzorku 2 nebylo možné. Naměřený retenční čas byl vyšší než rozsah retenčních časů standardů a tedy ani relativní retence vzorku 2 nezapadala do rozsahu získaného při kalibraci vylučovací kolony. Podle zjištěného retenčního času by hmotnost vzorku 2 odpovídala hodnotě 12 460 Da (je velice blízká hodnotě pro cytochrom c), což je 36 % skutečné molekulové hmotnosti neznámého proteinu. Jednalo se totiž o pepsin s molekulovou hmotností 35 000 Da. Zpomalení průchodu vzorku 2 kolonou Hema-Bio 40 bylo zřejmě způsobeno uplatněním nespecifických interakcí proteinu s použitou stacionární fází.

5. Závěr

V této bakalářské práci byla využita metoda vylučovací vysokoúčinné kapalinové chromatografie na koloně Hema-Bio 40, naplněné hydroxyethyl methakrylátovým gelem jako stacionární fází, pro určení molekulové hmotnosti dvou neznámých proteinů. Následně byla provedena identifikace těchto dvou proteinů na základě zjištěné molekulové hmotnosti.

Pro kalibraci vylučovací kolony byla zvolena sada proteinových standardů s rozsahem molekulových hmotností mezi 12 300 Da a 66 400 Da. Nejdříve byla provedena optimalizace složení mobilní fáze s ohledem na typ a množství organického modifikátoru a obsah, koncentraci a pH vodné složky mobilní fáze, která byla tvořena fosforečnanovým pufrům. Cílem optimalizace složení mobilní fáze bylo dosáhnout co největšího rozdílu v retenčních časech jednotlivých kalibračních standardů a také dostatečnou opakovatelnost výsledků analýz. Tyto podmínky splňovala mobilní fáze složená z 10 % obj. MeOH a 90 % obj. 100 mM fosforečnanového pufru o pH 7,0. V této optimalizované mobilní fázi byla provedena kalibrace vylučovací kolony. Byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost retenčního času standardů na dekadickém logaritmu jejich molekulové hmotnosti, která měla lineární průběh s koeficientem determinace 0,9932. V téže mobilní fázi byly zjištěny retenční časy dvou neznámých vzorků. Pro zvýšení spolehlivosti identifikace neznámých proteinů byla porovnávána jejich relativní retence s relativní retencí standardů. Na základě zjištěných retenčních charakteristik byl vzorek 1 identifikován jako protein myoglobin o molekulové hmotnosti 17 600 Da. Retenční čas vzorku 2 byl velice blízký hodnotě pro cytochrom c. Byl ovšem vyšší než rozsah retenčních časů standardů, proto nelze spolehlivě určit molekulovou hmotnost tohoto vzorku. Extrapolací kalibračního grafu byla určena hmotnost vzorku 2 o hodnotě 12 460 Da, což je 36 % skutečné molekulové hmotnosti proteinu, který představoval vzorek 2. Jednalo se totiž o protein pepsin s molekulovou hmotností 35 000 Da. Značná nepřesnost při určení molekulové hmotnosti vzorku 2 při použití kolony Hema-Bio 40 byla zřejmě způsobena uplatněním nespecifických interakcí proteinu s použitou stacionární fází.

6. Seznam použité literatury

1. Bilyk, I.; Nemeč, R.: Vybrané laboratorní metody, Avicentrum, 1.vydání, Praha, 1988
2. Doležalová, V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 4. přeprac. vydání, Brno, 1995
3. Prokeš, J.; Černý, B.: Chemické principy metod klinické biochemie, 1. vydání, Praha, 2002
4. Mant, C., Hodges, R.: High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analysis, and conformation, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991
5. Feltl, L., Štulík, K.: Teoretické základy separačních metod, Univerzita Kalova v Praze, 1. vydání, Praha, 1985
6. Churáček, J. a kol.: Analytická separace látek, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1. vydání, Praha, 1990
7. Šimeková, M.; Berek, D.: Studies on high-performance size-exclusion chromatography of synthetic polymers, I. Volume of silica gel column packing pores reduced by retained macromolecules, J. Chromatogr. A, 1084 (2005) 167-172
8. Anzenbacher, P.; Kovář, J.: Metody chemického výzkumu pro biochemiky, Ministerstvo školství ČSR, 1.vydání, Praha, 1986
9. Čoupek, J.; Vinš, I.: Hydroxyethyl methacrylate-based sorbents for high-performance liquid chromatography of proteins, J. Chromatogr. A, 658 (1994) 391-398
10. Janoš, P.; Zatlépková, I.: High-performance size-exclusion chromatography of humic substance on the hydroxyethyl methacrylate column, J. Chromatogr. A, 1160 (2007) 160-165
11. Irvine, B.: Molecular-weight estimation for native proteins using size-exclusion high-performance liquid chromatography, Methods in Molecular Biology, 32 (1994) 267-274
12. Eltekov, A.: Liquid chromatography of dextrans on porous silica beds, J.

- Chromatogr. A, 1100 (2005) 15-19
13. García-Lopera, R.; Irurzun, I.; Abad, C.; Campos, A.: Fractal calibration in size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 996 (2003) 33-43
 14. Hagel, L.: Size-exclusion chromatography in an analytical perspective, *J. Chromatogr. A*, 648 (1993) 19-25
 15. Tichý, M.; Čápová, E. a kol.: *Lékařské zprávy LF UK v Hradci Králové, Karolinum, 1.vydání, Praha, 1998*
 16. <http://www.sigmaaldrich.com>, navštíveno 17. 8. 2008
 17. Monaci, L.; Hengel, A. J.: Development of a method for the quantification whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 1192 (2008) 113-120
 18. Pacáková, V.; Štulík, K.; Pham Thai Hau; Jelínek, I.; Vinš, I.; Sýkora, D.: Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components, *J. Chromatogr. A*, 700 (1995) 187-193