

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**2008**

**Klára SOUKUPOVÁ**

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Moderní reverzní stacionární fáze na bázi silikagelu, oxidu  
zirkoničitého a organických monolitů; využití v analýze  
biologicky aktivních látek**

Disertační práce

Klára Soukupová

Školitelé: RNDr. Jana Suchánková–Sobotníková, PhD.

Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2008

Tato disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2003–2008.

Prohlašuji, že všechny výsledky použité a publikované v této disertační práci jsou získány vlastní experimentální činností a veškerá použitá literatura je citována a uvedena v seznamu literatury.

Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Praha, 17.6.2008

Klára Soukupová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelkám, RNDr. Janě Suchánkové–Sobotníkové, PhD. a Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc., za odborné vedení, cenné připomínky a pomoc během celého mého působení na Katedře analytické chemie.

Dále děkuji všem kolegům z Katedry analytické chemie za jejich pomoc a podporu. Především ale děkuji svým rodičům a blízkým za jejich trpělivost, porozumění a podporu během studia.

Tato disertační práce byla finančně podporována grantem 335/2005/B–CH/PřF Grantové agentury Univerzity Karlovy a výzkumným záměrem MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

## **Předmětová hesla**

Biologicky aktivní látky

Pentapeptidy

Nonapeptidy

Optimalizace separace

## **Klíčová slova**

HPLC

cLC

Kolony na bázi silikagelu, oxidu zirkoničitého a organických monolitů

## *Shrnutí*

Chemická analýza biologicky aktivních látek hraje důležitou roli v analytické chemii. K separaci těchto látek se nejčastěji používá reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (RP HPLC).

Většina analýz v RP HPLC využívá jako stacionární fáze silikagel s kovalentně vázanou oktadecylovou (C18) nebo oktylovou (C8) skupinou. Nevýhodou silikagelových fází obecně je jejich omezená chemická a teplotní stabilita, proto je snaha silikagel modifikovat a nebo jej zcela nahradit stabilnějšími materiály.

Mezi moderní stacionární fáze na bázi silikagelu lze zařadit jeho modifikaci pentafluorfenylpropylovými ligandy. Takovéto stacionární fáze jsou vhodnou alternativou ke klasickým C18 fázím. Dalšími vhodnými materiály jako nosiči pro reverzní stacionární fáze jsou různé oxidy kovů, jako oxid zirkoničitý, titaničitý, hlinitý. Hlavně oxid zirkoničitý, který se uplatňuje jako vhodný nosič, vykazuje dobrou chemickou (v rozmezí pH 1 – 14) i teplotní stabilitu (do 150 °C).

Trendem posledních let je miniaturizace separačních systémů, a tedy i kolon. Náplňové kolony pro kapilární kapalinovou chromatografii (cLC) obsahují stejnou stacionární fázi, sorbent o stejných vlastnostech jako klasické kolony pro HPLC, jen se kolony vzájemně liší svými rozměry (vnitřní průměr a délka). Novým typem stacionárních fází vhodných pro cLC jsou monolitické stacionárních fází. Separace na těchto typech fází naznačují dobrý trend a vzrůstá i obliba jejich použití, především díky jejich poměrně snadné přípravě.

V této disertační bylo studováno retenční chování vybraných skupin biologicky aktivních peptidů v různých systémech stacionární a mobilní fáze. Z velké nabídky komerčních kolon byly vybrány typově odlišné moderní stacionární fáze; dvě na bázi silikagelu, konkrétně s navázanou oktadecylovou skupinou Supelcosil C18 a pentafluorfenylpropylovými ligandy Discovery HS F5 a dále stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého modifikovaného polybutadienem Discovery Zr PBD. Posledním typem používané stacionární fáze byla butyl-methakrylátová monolitická kapilární kolona. Tento typ stacionárních fází je dlouhodobě vyvíjen na Katedře analytické chemie PřF UK v Praze. V rámci této disertační práce byly používané stacionární fáze nejprve testovány Waltersovým testem, k určení hodnoty hydrofobního, respektive silanolového indexu. Bylo zjištěno, že vybrané kolony se výrazně liší ve svých

vlastnostech a poskytují tak dobrou možnost nejen k podrobnému studiu retenčního chování zvolených analytů, ale následně mohou umožnit i snadnou optimalizaci separace konkrétní směsi biologicky aktivních peptidů v jednom i vícedimenzionálním systému. Následně byl sledován vliv složení mobilní fáze (pH, koncentrace pufrů, obsah organického modifikátoru) a teploty na retenci analytů, separační účinnost, rozlišení a symetrii píků. Výsledky získané v rámci této disertační práce byly kriticky porovnány a zhodnoceny a byly vyvozeny zobecňující závěry.

## ***Abstract***

Chemical analysis of biologically active compounds is an important field in nowadays analytical chemistry. For separation of such complex mixtures of analytes reversed-phase (RP) mode HPLC is advantageous.

The most widely used carrier for RP HPLC stationary phases is silica with covalently attached C18 or C8 groups. Chemical and temperature limitations of silica gel are well known. A variety of other materials has been investigated as supports in an effort to develop alternatives to silica to overcome the above mentioned limitations.

Among the recently introduced stationary phases belong phases based on silica gel modified with pentafluorophenylpropyl ligands. These types of stationary phases are used as a good alternative to classical C18 phases. In pursuit of replacing the silica-based reversed phases by more stable and selective support materials, various metal oxides such as zirconia, titania and alumina oxides were investigated and characterized. Mainly zirconia-based stationary phases have shown promising stability and physicochemical properties, namely stability in a wide pH range (1-14) and at temperatures up to 150 °C.

The trend of the recent years is miniaturization of HPLC. Capillary liquid chromatography (cLC) exploits the same stationary phases like in classical HPLC but dimensions are smaller. Promising new stationary phases used mainly in cLC are monolithic columns. These monolithic phases have become popular thanks to their quite easy preparation.

In this PhD thesis, retention behaviour of biologically active peptides on different stationary and mobile phases was tested. Four different reversed stationary phases were tested; two silica-bonded stationary phases - one with chemically bonded octadecyl groups (C18), Supelcosil C18, and the second one pentafluorophenylpropylsilane, Discovery HS F5. The third tested stationary phase was zirconia based phase modified by polybutadiene, Discovery Zr PBD and the fourth used stationary phase was buthyl-methacrylate monolithic phase, which was developed at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague. The influence of composition of mobile phases (buffer pH and concentration, contents of organic modifier) and temperature was tested as variables affecting retention, separation efficiency, resolution and peak symmetry of selected pentapeptides and



nonapeptides. Behaviour of analytes on the various columns was compared and the differences were discussed.

**Obsah**

1 Úvod	<b>6</b>
2 Peptidy	<b>8</b>
2.1 Pentapeptidy	9
2.2 Nonapeptidy	10
3 Separční techniky používané k analýze peptidů a proteinů	<b>14</b>
3.1 Separace analogů enkefalinu a vasopresinu reverzní vysokoučinnou kapalinovou chromatografií	14
3.2 Kapilární kapalinová chromatografie	20
3.3 Reverzní stacionární fáze	20
4 Experimentální část	<b>26</b>
4.1 Použité kolony	26
4.2 Použité přístroje	26
4.3 Použité chemikálie	27
4.4 Příprava mobilních fází a podmínky HPLC a cLC měření	29
4.5 Experimentální podmínky Waltersova testu	29
5 Výsledky a diskuse	<b>31</b>
5.1 Waltersův test	31
5.1.1 Výsledky	32
5.1.2 Závěr	35
5.2 Silikagelové reverzní stacionární fáze	36
5.2.1 Supelcosil C18	36
5.2.1.1 Pentapeptidy	37
5.2.1.2 Nonapeptidy	40
5.2.1.2.1 Fosforečnanový pufr	41
5.2.1.2.2 Octanový pufr	43
5.2.1.2.3 Mravenčanový pufr	46
5.2.1.3 Shrnutí	50
5.2.2 Discovery HS F5	52
5.2.2.1 Pentapeptidy	53
5.2.2.2 Nonapeptidy	56
5.2.2.2.1 Fosforečnanový pufr	56
5.2.2.2.2 Octanový pufr	59

---

5.2.2.3 Shrnutí	62
5.2.3 Závěr	64
5.3 Zirkoniová reverzní stacionární fáze	66
5.3.1 Pentapeptidy	66
5.3.2 Nonapeptidy	72
5.3.2.1 Fosforečnanový pufr	73
5.3.2.2 Octanový pufr	76
5.3.3 Závěr	81
5.4 Butyl–methakrylátové monolitické stacionární fáze	83
5.4.1 Příprava butyl–methakrylátových monolitů	83
5.4.2 Nonapeptidy	84
5.4.2.1 Fosforečnanový pufr	85
5.4.2.2 Octanový pufr	86
5.4.2.3 Tetraboritanový pufr	90
5.4.3 Závěr	93
6 Celkový závěr	<b>96</b>
7 Použitá literatura	<b>99</b>
Příloha 1 Seznam publikací a prezentací	<b>107</b>

***Seznam symbolů a zkratek***

AC	afinitní chromatografie
ACN	acetonitril
ADH	antidiuretický hormon
AIBN	2,2–azobisisobutyronitril
Ala	alanin
AMK	aminokyselina
Arg	arginin
A <sub>s</sub>	asymetrie píku
Asn	asparagin
AV ČR	Akademie věd České republiky
AVP	arginin–vasopresin
B.E.T.	metoda sorpce a desorpce dusíku
BMA	butyl–methakrylát
C18	oktadecyl
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
cLC	kapilární kapalinová chromatografie
Cys	cystein
CZE	kapilární zónová elektroforéza
D–Ala	D–alanin
dAVP	deamino arginin–vasopresin
dDAVP	desmopresin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDMA	ethylen–dimethakrylát
ESI+	ionizace elektrosprejem v pozitivním modu
EtOH	ethanol
Gln	glutamin
Gly	glycin
HI	hydrofobní index
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS	„high surface“ – velký specifický povrch

---

IČ	spektroskopie v infračervené oblasti spektra
I.D.	vnitřní průměr
IEC	iontově výměnná chromatografie
Ile	isoleucin
ISO	isotocin
ITP	izotachoforéza
<i>k</i>	retenční faktor
Leu	leucin
LSD	diethylamin kys. lysergové
LVP	lysin–vasopresin
Lys	lysin
max	maximální hodnota
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
Met	methionin
MetOH	methanol
min	minimální hodnota
Mpa	merkaptopropionová kyselina
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NBD–F	4–fluor–7–nitro–2,1,3–benzoxadizol
N,N–DETA	N,N–diethyl– <i>m</i> –toluamid
n/a	nedostupná informace
NMR	nukleární magnetická resonance
NP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v normálním modu
ODS	oktadecylsilikagel
OXT	oxytocin
PBD	polybutadien
PFPP	pentafluorfenylpropyl
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
QSRR	„Quantitative Structure Retention Relationship“, tj. kvantitativní vztah mezi strukturou a působením (účinností)
RP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním modu

---

RP LC	kapalinová chromatografie v reverzním modu
PS–DVB	polystyren divinylbenzen
$R_s$	rozlišení píků
SEC	vylučovací chromatografie
Ser	serin
SI	silanolový index/index polarity
SPE	extrakce pevnou fází
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
$t_m$	mrtvý čas
tp/m	počet teoretických pater na metr kolony
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
% v	objemová procenta
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření

## 1 Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní instrumentální technika se širokým spektrem využití převážně v oblasti aplikací analytické chemie. HPLC se stala oblíbenou metodou nejen na poli vědeckém, ale úspěšně se používá i v průmyslu především farmaceutickém, potravinářském nebo při analýze složek životního prostředí. Z běžně používaných separačních modů je nejdominantnější reverzní kapalinová chromatografie (RP HPLC). Přestože se HPLC začala používat už v 60. letech minulého století, až později se stala velmi populární a žádanou především díky spolehlivé instrumentaci a velkému výběru komerčně dostupných stacionárních fází s různými vlastnostmi.

Většina stacionárních fází v RP HPLC využívá jako nosiče silikagel, který se vyznačuje řadou vynikajících mechanických vlastností (např. nesmršťuje se, nebobtná), avšak na druhou stranu vykazuje omezenou chemickou a teplotní stabilitu. Z tohoto důvodu je snaha silikagel modifikovat anebo jej zcela nahradit jiným nosičem, např. oxidem titaničitým, oxidem zirkoničitým nebo organickými polymery. Zcela samostatnou skupinu moderních stacionárních fází tvoří materiály na bázi organických či silikagelových monolitů. Nová generace reverzních stacionárních fází vykazuje lepší stabilitu, jak chemickou, tak i tepelnou, vyšší selektivitu a separační účinnost. Hlavní výhodou těchto fází je, že jsou na nich výrazně potlačeny nežádoucí interakce pro látky bazické povahy.

Trendem posledních let je miniaturizace kolon, ale i ostatních částí kapalinového chromatografu. Výhodou miniaturizované HPLC v porovnání s klasickou HPLC je velmi malá spotřeba vzorku, malý průtok mobilní fáze, s tím spojena její nižší spotřeba, a menší chromatografické zředění vzorku v koloně, což přináší vyšší citlivost detekce. V kapilární kapalinové chromatografii (cLC) se používají kolony, respektive stacionární fáze jako v klasické HPLC, ale liší se velikostí vnitřního průměru, délkou kolony, případně velikostí částic a pórů sorbentu.

V bioanalytickém a farmaceutickém výzkumu se dnes techniky RP HPLC a cLC běžně používají. Studie spojené s tímto výzkumem jsou často zaměřeny na identifikaci a kvantifikaci proteinů a peptidů, jejich derivátů či metabolitů. Peptidy a proteiny hrají důležitou roli při vývoji nových chemoterapeutik. Úkolem analytického chemika se tedy stává vývoj účinné a vysoce selektivní analytické metody, která umožní separaci velmi složitých směsí biologicky aktivních látek.

Cílem této disertační práce bylo studium chromatografického chování vybraných biologicky aktivních pentapeptidů a nonapeptidů na rozdílných reverzních fázích, a to na bázi silikagelu, oxidu zirkoničitého a organických monolitů, v různých systémech mobilní fáze. Všechny studované stacionární fáze byly otestovány Waltersovým testem pro určení jejich základních chromatografických vlastností. Získané výsledky byly porovnány a kriticky zhodnoceny.

**Kapitola 2** popisuje strukturu, vlastnosti a základní biologické funkce studovaných pentapeptidů a nonapeptidů

**Kapitola 3** představuje separační techniky používané při separacích biologicky aktivních peptidů, popisuje reverzní stacionární fáze používané v kapalinové chromatografii a kapilární kapalinové chromatografii

**Kapitola 4** shrnuje vlastnosti studovaných kolon, použité přístroje a chemikálie, popisuje postupy a podmínky používané v experimentální části disertační práce

**Kapitola 5** se zabývá teoretickým i praktickým popisem Waltersova testu, dále uvádí experimenty a výsledky získané na reverzních silikagelových, zirkoniových a monolitických stacionárních fázích

**Kapitola 6** shrnuje a hodnotí výsledky získané v rámci této disertační práce



## 2 Peptidy

Peptidy jsou důležitou skupinou látek, které vykazují významnou biologickou aktivitu a v těle vykonávají některé specifické funkce. Peptidy slouží jako hormony, neurotransmitery či antibiotika; mají ale také toxické vlastnosti (toxiny). Řada těchto sloučenin a analogů je syntetizována, aby napomáhaly studiu jejich metabolismu a působení v organismu. Kontrola čistoty, identity a syntézy tedy nabývá na důležitosti a zde mají své nezastupitelné místo vysokoúčinné separační metody, především RP HPLC.

Peptidy se skládají z řetězce aminokyselin (AMK). V živých organismech se vyskytuje řada látek této skupiny. Zvláštní postavení mezi nimi má 20 esenciálních aminokyselin<sup>1</sup>, které jsou základními složkami peptidů a bílkovin. Je-li karboxylová skupina jedné AMK spojena s  $\alpha$ -amino skupinou další AMK, vzniká peptidová vazba. Podle definice molekuly, které obsahují méně než 50 aminokyselin, jsou klasifikovány jako peptidy. Molekuly, které obsahují více než 50 aminokyselin, se řadí mezi proteiny.

Tato práce je zaměřena na studium chromatografického chování biologicky aktivních peptidů. Z velkého množství peptidů byly vybrány 2 skupiny peptidů, a to pentapeptidy (4 zástupci) a nonapeptidy (6 zástupců). Všechny vybrané peptidy mají v těle lidí či živočichů své důležité postavení, ať již jde o peptidové hormony, neurotransmitery, nebo obojí. Primární struktury studovaných peptidů jsou uvedeny v *Tabulce 2.1*. Pentapeptidy jsou analogy methionin–enkefalinu a leucin–enkefalinu. Enkefaliny patří do skupiny neurotransmiterů peptidové povahy. Neurotransmitery zprostředkovávají přenos vzruchu mezi nervovými buňkami nebo nervovou a svalovou buňkou na krátkou vzdálenost. Nonapeptidy jsou analogy arginin–vasopresinu, které se liší aminokyselinami v pozici 1, 3, 4 nebo 8 (číslováno od N–koncové aminokyseliny).

Tabulka 2.1

Sekvence aminokyselin studovaných peptidů. Vasopresinové analogy mají mezi Cys 1 a Cys 6 disulfidický můstek.

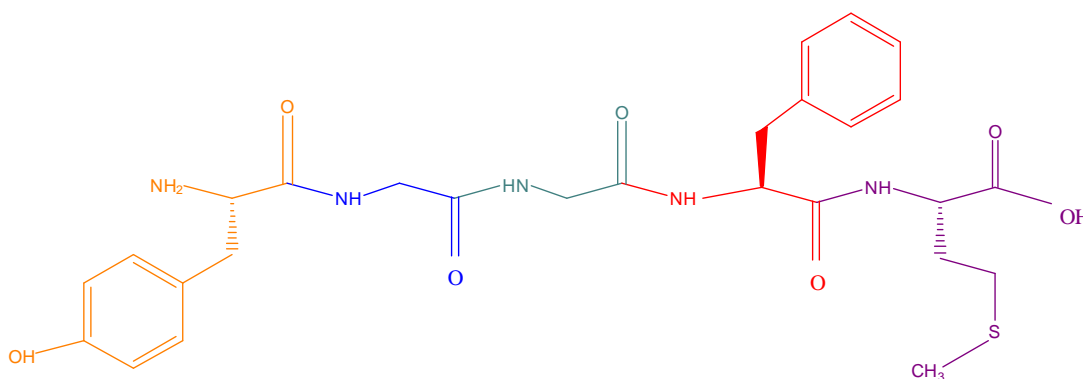
Název	Sekvence aminokyselin
methionin <sup>5</sup> –enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
leucin <sup>5</sup> –enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
D–alanin <sup>2</sup> ,leucin <sup>5</sup> –enkefalin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu
leucin <sup>5</sup> –enkefalinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH <sub>2</sub>
arginin <sup>8</sup> –vasopresin (AVP)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>
lysin <sup>8</sup> –vasopresin (LVP)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-GlyNH <sub>2</sub>
oxytocin (OXT)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH <sub>2</sub>
arginin <sup>8</sup> –oxytocin (AVT, vasotocin)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>
isotocin (ISO)	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-GlyNH <sub>2</sub>
deaminoCys <sup>1</sup> ,D–arginin–vasopresin (dDAVP, desmopresin)	Mpa* -Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg- GlyNH <sub>2</sub>

\* 3–merkaptopropionová kyselina

## 2.1 Pentapeptidy

**Enkefalin** (z řeckého „en kefalos“ – v hlavě) patří mezi endogenní, tělu vlastní, peptidy. Jsou přítomny v mozku a míše, kde vystupují jako inhibitory bolesti. Jsou označovány jako „hormony štěstí“, protože svým účinkem navozují pocit euforie např. při sportu, mlsání, sexu atd.<sup>2, 3</sup> Enkefaliny, společně např. s endorfiny, patří do skupiny peptidů, které vykazují podobné účinky jako morfin, a hrají tedy důležitou roli v regulaci bolesti. Tento účinek je způsoben tím, že se váží v mozku na stejné receptory, a proto se mohou potenciálně používat jako náhražky opiátových drog. Poruchy v syntéze enkefalinů mohou být příčinou různých neurodegenerativních onemocnění. Byly a jsou studovány ve spojení s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou<sup>4, 5, 6</sup>, a také v souvislosti s diagnostikou nádoru hypofýzy, neboť endogenní hladina těchto neuropeptidů v těle může indikovat vznik tohoto typu nádoru<sup>7, 8</sup>. Kromě methionin– a leucin–enkefalinu (*obr. 2.1.1 a 2.1.2*) byly dále studovány metabolicky stálější

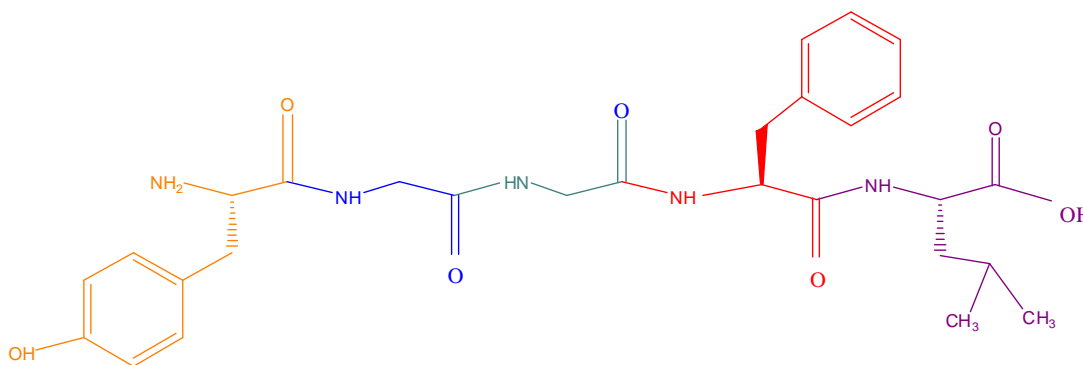
syntetické analogy leucin–enkefalinamid a D–alanin,leucin–enkefalin, které se liší aminokyselinami v poloze 2 a 5 (viz *Tabulka 2.1*).



Tyr – Gly – Gly – Phe – Met

**Obr. 2.1.1**

Struktura methionin–enkefalinu.



Tyr – Gly – Gly – Phe – Leu

**Obr. 2.1.2**

Struktura leucin–enkefalinu.

## 2.2 Nonapeptidy

Peptidové hormony vasopresin a oxytocin jsou vytvářeny z peptidových prekurzorů v hypotalamu. Odtud jsou po syntéze transportovány do neurohypofýzy, zadního laloku hypofýzy, kde jsou skladovány navázáním na proteiny neurofysin I a II a podle potřeby jsou předávány do krve<sup>9, 10</sup>. Vasopresin a oxytocin se skládají z 9 aminokyselinových zbytků, jak je patrné z *Tabulky 2.1*. Cysteinové zbytky v polohách 1 a 6 jsou spojeny disulfidickým můstkem, který společně s intramolekulárními vodíkovými vazbami zapříčiňuje stabilitu molekuly nonapeptidu. Oba hormony se liší

aminokyselinovými zbytky v poloze 3 a 8, což způsobuje jejich odlišné biologické vlastnosti.

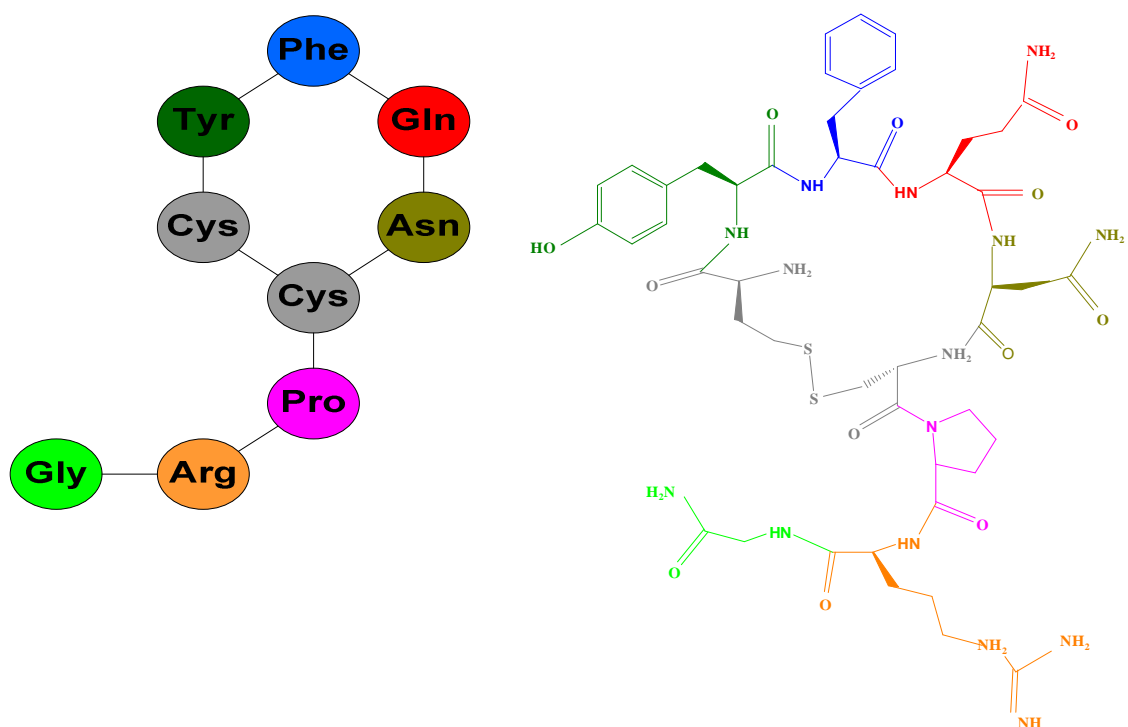
**Arginin–vasopresin**<sup>11, 12, 13</sup> (Arg–vasopresin, AVP) (*obr. 2.2.1*), také označován jako antidiuretický hormon (ADH), zvyšuje krevní tlak a zvyšuje zpětnou resorpci vody v ledvinách. Jeho vyplavení ze zadního laloku hypofýzy je vyvoláno objemovými anebo osmotickými změnami v krvi. Vasopresin má pozitivní účinky na procesy učení a pamatování. Nízká hladina vasopresinu v krvi způsobuje diabetes insipidus (cukrovka žíznivka)<sup>12</sup>, při které dochází ke snížení zpětné resorpce vody v ledvinách a následnému úbytku glukózy v krvi. Vnější příčinou tohoto hormonu může být porucha odstraněna. Látky jako LSD, kokain či amfetaminy zvyšují vylučování tohoto hormonu. Časté užívání těchto látek vede k otupění a depresi, které jsou způsobeny vyčerpáním tvorby vasopresinu. Alkohol a marihuana naopak tlumí vylučování vasopresinu, a proto nadměrní konzumenti těchto návykových látek trpí poruchami paměti. K porušení sekrece vasopresinu dochází u psychotických pacientů trpících především schizofrenií<sup>14</sup>.

Některé analogy AVP lze vytvořit záměnou aminokyselin v polohách 1, 3, 4 nebo 8. Nahrazením N–koncové aminokyseliny, tj. cysteinu v pozici 1, u AVP např. kyselinou 3–merkaptopropionovou vznikne deaminoCys<sup>1</sup>,Arg–vasopresin (dAVP). Atom síry přítomný v molekule 3–merkaptopropionové kyseliny umožňuje vznik disulfidického můstku, jak je běžné u analogů obsahujících v pozici 1 cystein. Použitím D–aminokyseliny místo L–aminokyseliny v pozici 8, tj. D–arginin nahradí L–arginin u dAVP, vznikne deaminoCys<sup>1</sup>,D–arginin–vasopresin neboli **desmopresin**<sup>15</sup>. Tento nonapeptid je stálejší, není odbouráván enzymy a má vyšší antidiuretický účinek než původní AVP, a proto se používá k léčbě častého močení spojeného s nemocí diabetes insipidus a také k omezení krvácení při určitých druzích hemofilie a von Willebrandově nemoci<sup>16</sup>. Často bývá předepisován k potlačení nočního pomočování dětí.

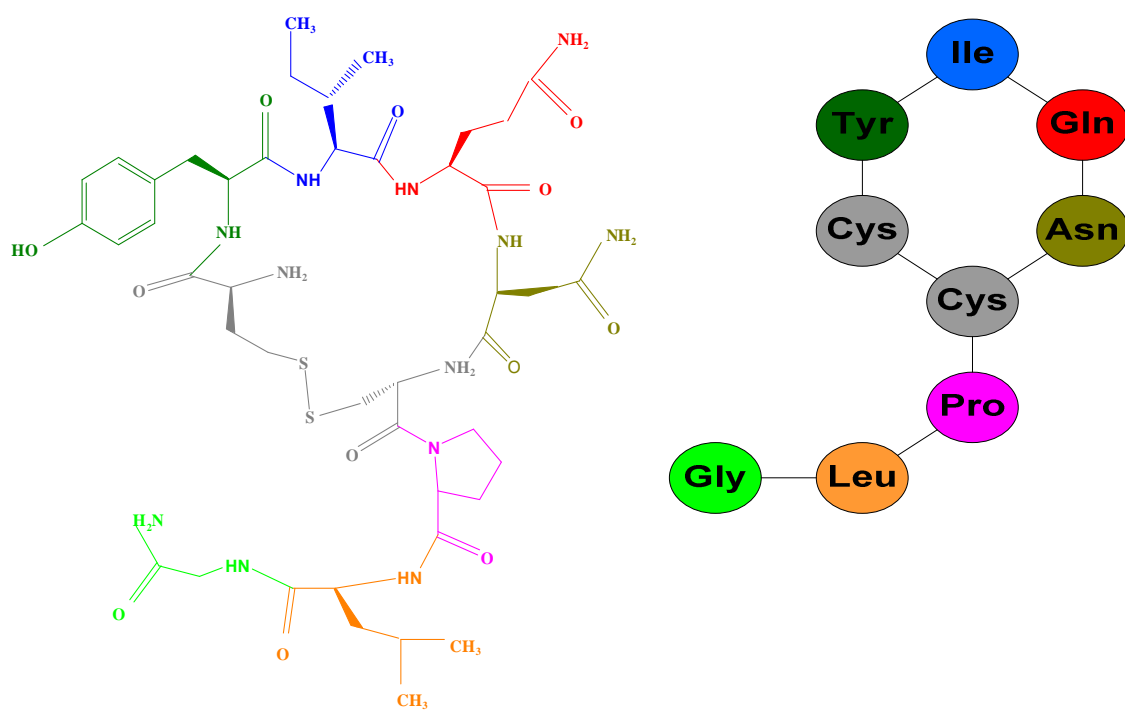
Jiným analogem AVP je **lysin–vasopresin** (Lys–vasopresin, LVP), u kterého je arginin v poloze 8 nahrazen lysinem. Tento peptid má nižší antidiuretickou aktivitu než Arg–vasopresin a v medicíně se používá k zástavě krvácení, protože působí vasokonstrikčně<sup>17</sup>.

Dalším analogem vasopresinu je **oxytocin**<sup>18, 19</sup> (OXT) (*obr. 2.2.2*). Tento nonapeptid je vylučován z neurohypofýzy a odtud je krví transportován do dalších tkání, včetně vaječníků a varlat. Oxytocin stimuluje stahy hladkého svalstva dělohy při porodu a orgasmu. Dále podporuje vylučování mateřského mléka při kojení. U mužů má oxytocin vliv na stahy hladkého svalstva při ejakulaci a předpokládá se i vliv na produkci mužského hormonu testosteronu<sup>20</sup>.

**Vasotocin** a **isotocin**<sup>21, 22</sup> jsou peptidové hormony hypofýzy nižších obratlovců jako ptáků, plazů, ryb a obojživelníků. Vasotocin má antidiuretické účinky stejně jako vývojově vyšší vasopresin. Isotocin u ryb stejně jako oxytocin u člověka ovlivňuje sexuální chování.

Obr. 2.2.1

Struktura Arg-vasopresinu.

Obr. 2.2.2

Struktura oxytocinu.

### ***3 Separální techniky používané k analýze peptidů a proteinů***

Analýza peptidů a proteinů hraje důležitou roli při studiu vlivu těchto látek v živých organismech a má řadu významných aplikací. Analýza peptidů a proteinů je používána k určení identity a čistoty peptidů během jejich izolace z přírodních materiálů a během jejich syntézy. Ve farmaceutickém průmyslu se používá ke kontrole čistoty peptidových či proteinových produktů, ke stanovení peptidů a proteinů v odlišných typech maticí a v neposlední řadě k objasnění primární struktury proteinů. V medicíně hraje analýza peptidů a proteinů svou důležitou roli především v diagnostice, tzn. při určování nemocí spojených s vylučováním nebo naopak s nedostatkem nějakého peptidu či proteinu.

K analýze peptidů a proteinů se používá řada separálních technik. Mezi nejběžnější se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie v nejrůznějších modech<sup>23–25</sup> jako jsou vylučovací chromatografie (SEC)<sup>26, 27</sup>, iontově výměnná chromatografie (IEC)<sup>28–32</sup>, afinitní chromatografie (AC)<sup>33–36</sup> nebo reverzní kapalinová chromatografie (RP LC)<sup>28, 37–45</sup>.

Trendem posledních let je miniaturizace chromatografických technik, a to především kapalinové chromatografie. Podrobnosti o procesu miniaturizace jsou uvedeny v *Kapitole 3.2*.

Kromě chromatografických metod se k analýze peptidů a proteinů hojně využívají i techniky elektromigrační<sup>46–50</sup> jako kapilární zónová elektroforéza (CZE)<sup>51–59</sup>, kapilární izoelektrické fokusování (CIEF)<sup>60–64</sup>, kapilární gelová elektroforéza (CGE), izotachoforéza (ITP)<sup>65, 66</sup>, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)<sup>52, 68, 69</sup> a kapilární elektrochromatografie (CEC)<sup>70–77</sup>.

#### ***3.1 Separace analogů enkefalinu a vasopresinu reverzní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií***

Reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejběžněji používaná metoda k separaci peptidů a proteinů. Tato technika se začala v polovině 70. let 20. století<sup>43</sup> nejprve používat k čištění peptidů a proteinů během jejich syntézy. V analýze peptidů a proteinů RP HPLC, díky své velmi vysoké účinnosti, nahradila techniky jako papírovou chromatografii, extrakci nebo gelovou chromatografii<sup>78</sup>.

Díky velké rozmanitosti struktury peptidů a proteinů neexistuje žádný obecný postup, jak tyto biomolekuly separovat. Vhodnou volbou stacionární a mobilní fáze lze

separace ovlivňovat, a tím dosáhnout velmi vysoké účinnosti a dostatečného rozlišení. Většina mobilních fází obsahuje vodnou složku a organickou složku. Vodná složka, pufr, je pro RP HPLC separace analogů enkefalinu a vasopresinu převážně tvořena kyselinami fosforečnou, octovou, trifluoroctovou (TFA) a její příslušnou solí. Výběr organického modifikátoru, typický je acetonitril (ACN) nebo methanol (MetOH), má velký vliv na chromatografické chování enkefalinů a vasopresinů. Jako organický modifikátor se díky své nízké UV absorbanci, viskozitě a naopak vysoké eluční síle a dobré selektivitě nejčastěji používá acetonitril. Často velmi malá změna koncentrace ACN v mobilní fázi způsobí velké změny v retenci peptidů<sup>79</sup>. Rozlišení peptidů je velmi závislé na pH a iontové síle mobilní fáze. Do mobilní fáze se pro zlepšení separace peptidů a proteinů přidávají činidla, tzv. iontově párová činidla, jako perfluorované kyseliny<sup>22, 44, 80</sup>, např. trifluoroctová kyselina, sodné sole alkylsulfonových kyselin nebo alkylované aminy<sup>81</sup>. Tato činidla zvyšují rozpustnost peptidů, tvoří s nimi iontové páry, které mají hydrofobní charakter, a redukují elektrostatické interakce se zbytkovými silanolovými skupinami na povrchu silikagelového nosiče stacionární fáze. Kromě vhodného výběru stacionární a mobilní fáze lze ovlivnit separaci i změnou teploty.

Důležité pro separaci peptidů a proteinů je zvolit i vhodnou reverzní stacionární fázi. RP HPLC kolony, respektive stacionární fáze, musí splňovat řadu náročných požadavků, aby vyhověly nárokům na reprodukovatelnost a robustnost analytických metod. Musí být mechanicky (pracovní tlaky 30–40 MPa) i chemicky stabilní, mít vysokou účinnost a selektivitu a poskytovat symetrické píky. Informace o moderních komerčně dostupných reverzních fázích jsou uvedeny v *Kapitole 3.3*.

V literatuře lze nalézt celou řadu prací zabývajících se separací analogů enkefalinu a vasopresinu metodou RP HPLC. Některé příklady prací jsou uvedeny v *Tabulce 3.1.1*, kdy byla sledována použitá stacionární fáze, složení mobilní fáze, tzn. typ, koncentrace a pH používaného pufru nebo organického modifikátoru, detekce, teplota a další.

Z tabulky vyplývá, že převládajícím typem stacionární fáze je oktadecylsilikagel, velmi časté je použití mobilní fáze o složení nejčastěji fosforečnanový pufr nebo TFA jako vodná složka a ACN nebo MetOH jako organická složka mobilní fáze. Sledované analyty se detekují UV spektrofotometricky, ale je možné použít i elektrochemickou detekci a vhodná je i MS detekce.



### 3 Separční techniky používané k analýze peptidů a proteinů

*Tabulka 3.1.1* Přehled separačních podmínek analogů vasopresinu a enkefalinu metodou RP HPLC.

<i>Peptidy</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Detekce</i>	<i>Poznámky</i>	<i>Citace</i>
DAVP	Supelcosil LC 18 DB	10–40 % ACN v 0,08 % TFA za 30 min	UV 220 nm	gradientová eluce	82
dDAVP, morfin	Nucleosil® C18	0,01% HCOOH v 1,6 mol·dm <sup>-3</sup> CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> – ACN (33/67, v/v)	MS iontová past	ESI+ ionty (m/z) 1069,2 a 286,4	83
AVP, DAVP	Nucleosil 10 C18	0,05 mol·dm <sup>-3</sup> CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , pH 6,5 – MetOH nebo ACN nebo EtOH (39/61, v/v)	UV 220 nm	isokratická eluce	81
AVP	Spheri ODS	0,1 mol·dm <sup>-3</sup> fosforečnanový pufr, pH 3,35 – MetOH	UV 220 nm	isokratická eluce	84
OXT, LVP	Nucleosil® C8 a C18 a Spherisorb® S5 ODS RP 8	a) fosforečnanový pufr, pH 7,0 – ACN (80/20, v/v) b) tetraboritanový pufr, pH 10,0 – ACN (82,5/17,5, v/v)	UV 210–220 nm	isokratická eluce	85
LVP, OXT, AVP	Dynamax 300–A C8	0,1 % trichloroctová kys. – 50·10 <sup>-3</sup> mol·dm <sup>-3</sup> heptansulfonová kys. – 30·10 <sup>-3</sup> mol·dm <sup>-3</sup> TEA – 20% ACN ve vodě, pH 2,5	UV spektra 200–400 nm	extrakce vzorku	86
OXT, insulin	KR100-10-C1 KR100-10-C4 KR100-10-C8 KR100-10-C18	0,1% TFA v ACN; gradient 0–34% ACN ve 140 min	UV 220 nm	gradientová eluce	87

### 3 Separční techniky používané k analýze peptidů a proteinů

*Tabulka 3.1.1* Přehled separačních podmínek analogů vasopresinu a enkefalinu metodou RP HPLC. (pokračování)

<i>Peptidy</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Detekce</i>	<i>Poznámky</i>	<i>Citace</i>
OXT, ISO, AVP	C18	0,04 mol·dm <sup>-3</sup> kys. citronová – 0,1 mol·dm <sup>-3</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1% TFA a ACN (80/20, v/v)	amperometrická		88
OXT	Ultrasphere XL C18	20·10 <sup>-3</sup> mol·dm <sup>-3</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5,7 – MetOH (60/40, v/v)	coulometrická	SPE a imunoafinitní čištění	89
AVT, ISO	Ultrasphere ODS	A: 0,1% TFA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% TFA v ACN–voda (3:1), lineární gradient 20–40% B ve 20 min	UV 215 nm	gradientová eluce, SPE vzorku	90
AVT, AVP, dDAVP, OXT	Kromasil C18	ACN – fosforečnanový pufr, pH 7,0 (18/82, v/v)	UV 225 nm	isokratická eluce	91
OXT, LVP, Leu–enkefalin	ODS	a) 0,025 mol·dm <sup>-3</sup> fosf. pufr, pH 8,9 – ACN (75/25, v/v) b) 0,025 mol·dm <sup>-3</sup> fosf. pufr, pH 8,9 – ACN (85/15, v/v)	UV 220 nm a elektrochemická		92
Leu–enkefalin, angiotensin, bradykinin	Alltech C18	0,1 % TFA ve vodě – 0,1 % TFA v ACN; 81 – 79 % ACN za 8 min	UV 215 nm	isokratická eluce, gradientová eluce	43
Leu–enkefalin, Met–enkefalin	Lichrosphere C18	0,05% ledová CH <sub>3</sub> COOH – 0,0625% CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , pH 4,8 – 60% ACN (75/25, v/v)	UV 215 nm	teplota kolony 40 °C	93

### 3 Separční techniky používané k analýze peptidů a proteinů

*Tabulka 3.1.1* Přehled separačních podmínek analogů vasopresinu a enkefalinu metodou RP HPLC. (pokračování)

<i>Peptidy</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Detekce</i>	<i>Poznámky</i>	<i>Citace</i>
Leu-enkefalin, Met-enkefalin, bradykynin,	TKS-gel Octyl-80Ts a Super-Octyl	0,1% TFA v 35 % ACN	fluorescenční (indukce laserem)	isokratická eluce, derivatizace vzorku: NBD-F v ACN – 0,1M tetraboritanový pufr, pH 8,0 při 40 °C po 10 min	94
Met-enkefalin	ODS a PS-DVB	15% ACN v 40mM triethylamin- mravenčan pH 3,0	MS a MS/MS		95
Met-enkefalin	Alltima C18	A: $1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosf.pufr v $10 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> síranu sodném (pH 7,0) B: 60% ACN gradient 5–95 % B za 5 min	elektrochemická (uhlíková elektroda)	cLC; kapilární kolona gradientová eluce	96
Leu-enkefalin	Inertsil ODS-3	A: $35 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosf. pufr pH 2,2 B: $59 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosf.pufr v ACN (60/40, v/v) gradient 2,5–30 % ACN za 21 min	elektrochemická (borem dopovaná diamantová elektroda)	gradientová eluce	97
Met-enkefalin, Leu-enkefalin	Ultrasphere ODS	$50 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosforečnanový pufr, pH 2,1– MetOH s ACN (1:1) (60/40, v/v)	elektrochemická a UV 205 nm		98
Met-enkefalin, insulin, dalargin, ...	C18	20–40% ACN – 0,2% TFA ve vodě	UV 190–215 nm		99

### 3 Separční techniky používané k analýze peptidů a proteinů

*Tabulka 3.1.1* Přehled separačních podmínek analogů vasopresinu a enkefalinu metodou RP HPLC. (pokračování)

<i>Peptidy</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Detekce</i>	<i>Poznámky</i>	<i>Citace</i>
Leu-enkefalin, Met-enkefalin	μBondapak C18	A: MetOH – voda (25/75) s 0,1% TFA B: ACN–voda (80/20) s 0,1% TFA gradient 0–60 % B v 60 min	UV 215 nm	lineární gradientová eluce	100
Leu-enkefalin, Met-enkefalin	Zorbax ODS	A: 20% ACN v 0,08% TFA B: 80% ACN v 0,08% TFA gradient 25–40 % B v 5 min	UV 296 nm	gradientová eluce	101
Leu-enkefalin, Met-enkefalin, D-Ala <sup>2</sup> -Met-enkefalin	Hypersil ODS	45% ACN v 26,5 M TFA, pH 3,5	fluorescenční	derivatizace vzorku: 2,3 – naftalendialdehydem	102
Leu-enkefalin, Met-enkefalin, Leu-enkamid, Met-enkamid	Kromasil C18	A: $35 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosf. pufr, pH 2,1 B: $59 \cdot 10^{-3}$ mol·dm <sup>-3</sup> fosf. pufr, pH 2,1 – ACN (60/40, v/v) gradient ACN: 4–5% za 9 min; 15% v 5 min; na 30% do 21 min	coulometrická (grafitové elektrody, Pd jako referenční)	gradientová eluce	103

### 3.2 Kapilární kapalinová chromatografie

V posledním desetiletí nastal rozmach miniaturizace kolon v kapalinové chromatografii<sup>104, 105, 106</sup>. V klasické HPLC se nejčastěji používají separační kolony o vnitřním průměru 3,0–4,6 mm. Dnes je tendence používat kolony rozměrově (délka, průměr) co nejmenší. V mikrokapalinové chromatografii se používají kolony o průměru 0,5–1,5 mm, v kapilární kapalinové chromatografii kolony o průměru 150–500  $\mu\text{m}$  a v nanokapalinové chromatografii kolony o průměru 10–150  $\mu\text{m}$ <sup>33, 106, 107, 108</sup>. Výhodou miniaturizované HPLC v porovnání s klasickou HPLC je velmi malá spotřeba vzorku, velmi malý průtok mobilní fáze, a s tím spojena i malá spotřeba mobilní fáze, a menší chromatografické zředění vzorku v koloně, což přináší vyšší citlivost detekce<sup>104, 105, 107, 108</sup>.

V kapilární kapalinové chromatografii se separace provádí na dvou druzích kolon, a to náplňových a monolitických. Kolony náplňové potřebují frity na konci kolon, aby nedocházelo k „vytékání“ stacionární fáze. Příprava těchto kolon je relativně obtížná, proto se stále populárnějšími stávají kolony monolitické. Příprava monolitických kolon spočívá v polymerizaci polymeru nebo kopolymeru přímo v separačních kapilárách, často o průměru jen několika desítek mikrometrů.

Detekce u cLC je založena na stejných principech jako u HPLC, jen jsou prostory v detekčním i separačním systému přizpůsobené parametrům cLC. Nejběžnějším detektorem je UV spektrofotometrický<sup>105, 106, 108</sup>. V místě detekčního okénka je většinou kapilára rozšířena, aby se dráha paprsku procházejícího kapilárou prodloužila. Rozšířením vznikají tzv. bublinkové nebo Z cely. Používají se i další běžně dostupné detektory jako fluorescenční<sup>33, 107</sup>, elektrochemický a hmotnostní<sup>104, 105</sup>.

Kapilární kapalinová chromatografie se dnes řadí mezi běžně využívané techniky kapalinové chromatografie, především v bioanalytickém a farmaceutickém výzkumu<sup>109, 110</sup>. Nachází své uplatnění i při chirálních separacích a při analýze průmyslových vzorků jako polymerů nebo různých aditiv<sup>106, 111</sup>.

### 3.3 Reverzní stacionární fáze

HPLC je jednou z nezbytných technik v analýze biologicky aktivních látek. Mezi běžně používané techniky HPLC patří např. HPLC na normálních fázích (NP HPLC), vylučovací chromatografie a hlavně HPLC na reverzních fázích. Osmdesát až devadesát procent všech analýz je uskutečněno pomocí RP HPLC. Proto je potřeba

vysoce kvalitních, a především stabilních reverzních fází. Přehled vývoje a komerčně dostupných reverzních fází je popsán v této kapitole.

Koncem 60. a začátkem 70. let 20. století došlo k prudkému rozvoji teorie a instrumentace moderní kapalinové chromatografie<sup>112</sup>. Na trhu se objevily přístroje umožňující práci při zvýšených tlacích, zpočátku 4 MPa a později až 60 MPa. Současně s tím byly vyvíjeny účinnější chromatografické kolony resp. jejich náplně. Běžně byly používány náplně s částicemi o průměru 50–80  $\mu\text{m}$ . Účinnost takovýchto kolon byla ale poměrně malá. Ke zvýšení účinnosti přispělo zavedení náplní s částicemi mikropelikulárními, porézními a perfuzními. Mikropelikulární částice (zrnění 1,5–2,5  $\mu\text{m}$ ) mají na neprostupném anorganickém nosiči kulovitěho tvaru nanosený film polymerní stacionární fáze; vykazují vysokou účinnost, ale díky malému povrchu nízkou kapacitu<sup>113</sup>. Vhodné jsou pro makromolekuly díky rychlému přenosu hmoty. Perfuzními mikročásticemi, které jsou tvořeny sítí více či méně objemných pórů (300–8000 Å), poměrně rychle teče mobilní fáze, a tím dochází k malému rozmývání píků. Díky různým velikostem pórů se tyto náplně hodí pro malé i velké molekuly. Porézní náplň, resp. částice, jsou nejběžnější s kontrolovanou povrchovou pórovitostí. Jsou tvořeny kulovitými porézními anorganickými částčkami, které mohou být ještě pokryté nanesenou nebo chemicky vázanou stacionární fází<sup>114</sup>. Aby bylo dosaženo vysoké účinnosti a nedocházelo k rozšíření elučních zón látek, je třeba, aby částice stacionární fáze byly malé, homogenní s ohledem na velikost i tvar a kolona jimi byla rovnoměrně naplněna.

Nejčastěji používaným nosičem je silikagel<sup>115, 116</sup>. Jedná se o síť polymerního oxidu křemičitého. Hlavní výhodou silikagelového nosiče je mechanická stabilita vůči vysokým tlakům (cca 40 MPa). Lze jej připravit jako velmi čistý s pravidelným tvarem částic o přesně definované velikosti, porozitě a velikosti pórů. Silikagel lze snadno modifikovat, a tím použít pro velkou škálu možných separací. Silikagelové nosiče odolávají širokému spektru organických rozpouštědel. Jejich další výhodou je vysoká účinnost dělení (oproti polymerním nosičům) a dobrá reprodukovatelnost výsledků dosažených na stacionárních fázích tohoto typu. Nevýhodou silikagelu jako nosiče stacionární fáze je jeho omezená pH stabilita a vysoká chemická reaktivita volných silanolových skupin na povrchu nosiče. Při pH menším než 2 je nestabilní Si–O–Si vazba na povrchu silikagelu, což vede k hydrolyze vazby u chemicky vázané fáze. Při pH vyšším než pH 8 dochází k rozpouštění samotného silikagelu. K narušení Si–O–Si vazeb dochází i zvýšením teploty nad 60 °C.

V posledním desetiletí bylo navrženo několik metod pro zvýšení chemické a teplotní stability silikagelu s ohledem na zlepšení retenčního chování bazických látek a používání mobilních fází s vysokým obsahem vody. Typickými příklady nové generace silikagelových RP fází se zlepšenou selektivitou a chemickou a teplotní stabilitou jsou fáze, kde silikagel je pokryt vrstvou polymeru (tzv. polymer-coated)<sup>117–127</sup> nebo silikagelové fáze se zabudovanou polární funkční skupinou (polar embedded)<sup>128</sup> a stericky chráněné fáze (diisopropylsilan nebo diisobutylsilan je použit k navázání ligandu na silikagel). Dalším způsobem zlepšení chemické stability a vlastností nosičů stacionární fáze je tzv. „endcapping“. Jedná se o deaktivaci volných Si–OH skupin navázáním malé chemicky neaktivní organické skupiny např. trimethylsilanylem.

Trendem posledních let je nahradit klasické silikagelové reverzní fáze fázemi s lepší jak mechanickou a chemickou stabilitou, tak i s lepší selektivitou. Mezi nové stacionární fáze patří např. fáze, kde je na silikagelový nosič navázána např. pentafluorfenylpropylová skupina, fáze na bázi oxidů kovů jako Zr, Ti, Al a fáze na bázi organických monolitů.

Perfluorované reverzní stacionární fáze jsou využívány jako dobrá alternativa ke klasickým C18 fázím. Separční mechanismus je založen na selektivních interakcích, jako jsou sterické rozpoznání, přenos náboje nebo  $\pi$ – $\pi$  interakce<sup>129</sup>. U těchto fází není potřeba přidávat do mobilní fáze iontově párová činidla, protože tyto fáze vykazují lepší tvary píků než klasické C18 kolony. Fluorované stacionární fáze nabízejí možnost použití jednodušších mobilních fází, a vyhnutí se extrémním separačním podmínkám a složité přípravě mobilní fáze<sup>85</sup>.

Snaha stabilizovat povrch silikagelu pokrytím vrstvou kovů nebo oxidů kovů (např. ZrO<sub>2</sub>) nepřinesla žádané zlepšení, protože vazba Zr–O–Si je méně stabilní než vazba Si–O–Si. Z toho důvodu se začaly využívat samotné oxidy kovů jako nosiče stacionární fáze. Byla testována chemická, fyzikální a teplotní stabilita ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a TiO<sub>2</sub> a méně rozšířených oxidů thoria a ceru<sup>130–133</sup>. Z těchto oxidů kovů se hlavně ZrO<sub>2</sub> jeví jako nosič vhodný k chromatografickým účelům<sup>134–139</sup>. Nové reverzní fáze na bázi oxidu zirkoničitého mají vysokou chemickou odolnost v širokém rozsahu hodnot pH a vykazují vysokou teplotní stabilitu. Lze je tedy využít v oblasti pH 1–14 a při použití speciální instrumentace při teplotách nad 200 °C. Možnost separace při vyšších hodnotách pH výrazně rozšiřuje aplikační možnosti, lze tedy analyzovat i silně bazické látky. Vyšší teplota systému snižuje viskozitu mobilní fáze, umožňuje tím zvýšit průtokovou rychlost, a pozitivně ovlivnit separační děj ve smyslu rychlejšího přenosu

hmoty mezi stacionární a mobilní fází. To se projevuje zejména zlepšením symetrie píků, za zvýšené teploty dochází i ke zkrácení doby analýzy, což nejen ve farmaceutických laboratořích, kde se analyzují velká množství vzorků, je velkým přínosem. Zirkoniové částice jsou mechanicky velmi odolné, nesmršťují se ani neobtnají s měnícím se tlakem, teplotou, iontovou silou nebo koncentrací organických rozpouštědel<sup>130, 131, 140–145</sup>. Oxid zirkoničitý je amfoterní oxid, který v závislosti na pH roztoku vystupuje buď jako anion, nebo jako kation<sup>134, 135, 146</sup>.

Separční mechanismus u stacionárních fází na bázi  $ZrO_2$  je odlišný v porovnání se silikagelovými chemicky vázanými fázemi.

Separční děj na chemicky vázaných fázích je obecně výslednicí několika interakcí<sup>147</sup>. Jde o interakci solutu s mobilní fází, adsorpcí solutu na stacionární fázi a rozdělení solutu mezi mobilní a stacionární fázi. Podstatná je i interakce mezi stacionární a mobilní fází. Rozhodujícím faktorem je interakce solutu s mobilní fází, jejíž podstatou je solvofóbní efekt a interakce namířené proti němu. Solvofóbní efekt znamená snahu rozpouštědla zmenšit dutiny ve své struktuře, a tak vypudit molekuly solutu do stacionární fáze. Interakce solutu s mobilní fází závisí na velikosti a polaritě molekuly solutu, na permitivitě a povrchovém napětí mobilní fáze.

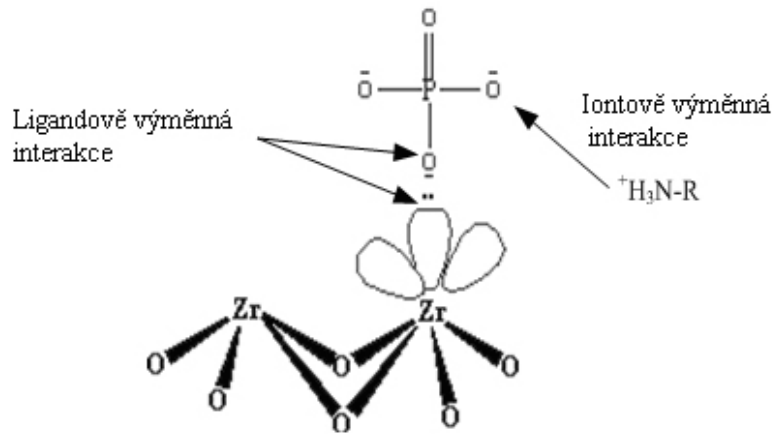
Separční děj na  $ZrO_2$  fázích je založen na Lewisově teorii kyselin a zásad (*obr. 3.3.1*). Atom zirkonia má ve vazbě  $Zr-O-Zr$  neobsazené  $d$ -orbitály, a tím se stává akceptorem elektronových párů. Podle Lewisovy teorie je tedy atom Zr silnou Lewisovou kyselinou. Tato místa mají silnou afinitu k Lewisovým bázím, mezi které patří např. fosforečnanové, fluoridové, octanové, citrátové, karboxylové a hydroxylové ionty. Tyto ionty jsou přítomné v mobilní fází, někdy i ve vzorku, a adsorbují se na částice  $ZrO_2$ . Takto naadsorbovaná Lewisova báze pak vystupuje jako iontově výměnné místo, kde probíhá iontově výměnná interakce separovaných analytů. Interakce probíhající na povrchu  $ZrO_2$  jsou schematicky znázorněny na *obr. 3.3.1*. Z toho vyplývá, že u fází na bázi  $ZrO_2$  se uplatňují tyto typy interakcí:

- adsorpce na stacionární fází
- iontově výměnná interakce s naadsorbovanou Lewisovou bází (např. ion z mobilní fáze)
- ligandově výměnná interakce s atomem Zr

Povrch  $ZrO_2$  lze modifikovat různými polymery tak, aby se snížila polarita povrchu a dalo se pracovat v reverzním modu. Nejčastěji se povrch  $ZrO_2$  modifikuje polybutadienem, ale používá se i pokrytí jinými látkami. Např. firma Sigma–Aldrich



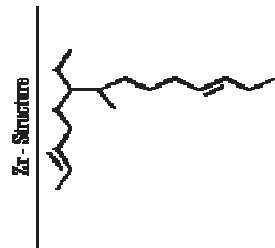
dodává na trh kromě fáze s navázaným polybutadienem i fze s navázaným polystyrenem, uhlíkem modifikovanm oktadecylovm zbytkem a istm uhlíkem (Obr. 3.3.2).



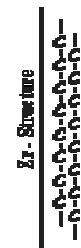
Obr. 3.3.1

Separáční děj na zirkoniiovch kolonách.

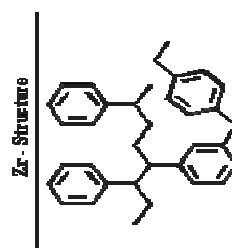
**Zr - PBD**



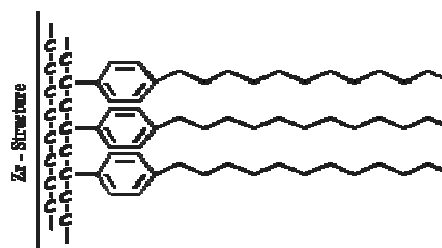
**Zr - Carbon**



**Zr - PS**



**Zr - CarbonC18**



Obr. 3.3.2

Dostupn zirkoniiov stacionární fáze firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA).

V neposlední rad existují stacionární fáze na bázi organických monolitů. Monolity jsou separáční média, kter lze přirovnat k jedine velké astici mající tvar i objem zcela zaplnujc vnitřek separáční kolony. Oproti typickm kolonám plněním drobnými asticemi neobsahují monolity meziasticov prostory, kterými u klasických

kolon proudí mobilní fáze. V případě monolitické stacionární fáze mobilní fáze protéká póry monolitu<sup>148, 149</sup>. Tento tok póry monolitu urychluje přenos hmoty v koloně<sup>150</sup>. Na rozdíl od klasických kolon, kde hlavní hnací silou přenosu hmoty z kapaliny proudící podél částic do jejich pórů je difúze, u monolitů konvekce póry umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, proteiny a peptidy, jejichž difúze je pomalá. Detailní popis přenosu hmoty v monolitických materiálech byl odvozen Liapisem<sup>151</sup>.

První pokusy vytvořit separační média monolitického typu byly provedeny v letech 1960–1970<sup>152–154</sup>. Tyto kolony se vyznačovaly nízkou permeabilitou a stabilitou, proto se prakticky nevyužívaly. V roce 1989, Hjertén<sup>155</sup> vyvinul stlačený měkký polyakrylamidový gel, tzv. „continuous bed“, který byl následně použit jako stacionární fáze v chromatografii. Další pokrok nastal v roce 1992, kdy byla představena nová monolitická stacionární fáze založená na stálých makroporézních organických polymerech (např. methakrylátech)<sup>156</sup>. Tyto monolity se vyznačují vynikajícími vlastnostmi a jsou dále rozvíjeny a používány jako stacionární fáze v kapalinové chromatografii a elektrochromatografii<sup>76, 157–161</sup>.

Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit na fáze na bázi silikagelu<sup>162, 163</sup> a na fáze na bázi organických polymerů<sup>164–166</sup>.

Příprava monolitů na bázi organických polymerů je poměrně jednoduchá. Získávají se radikálovou polymerizací směsi obsahující monomer, síťovadlo, iniciátor a porogenní rozpouštědlo. Vinylový monomer obsahuje funkční či reaktivní skupinu, jakou je butyl- či glycidyl-methakrylát, typickým síťovadlem je monomer se dvěma či více dvojnými vazbami např. divinylbenzen nebo ethylendimethakrylát. Významný vliv na vlastnosti polymeru má i použité porogenní činidlo (inertní rozpouštědlo např. propan-1-ol, butan-1,4-diol), které je zodpovědné za průchodnost a porézní vlastnosti vzniklého monolitu. Tato směs se naplní do formy buď válcovitého (kolona, kapilára), nebo plošného (disk) tvaru, kde po zahřátí nebo UV iniciaci zpolymeruje. Jako iniciátor pro tepelnou polymeraci se používá obvykle dibenzoyl peroxid nebo 2,2-azobisisobutyronitril (AIBN).

Monolitů je připravována celá řada s různými chemickými vlastnostmi a různou funkčností vhodnou pro celou škálu analytů, jako jsou peptidy a proteiny<sup>76, 167–172</sup>, oligonukleotidy<sup>173</sup>, oligosacharidy<sup>165</sup>, fragmenty DNA<sup>174</sup> a neutrální, bazické nebo kyselé látky<sup>175</sup>.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité kolony

Reverzní kolony používané v této disertační práci v HPLC experimentech mají shodné parametry, tedy délka 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm a velikost částic 5  $\mu\text{m}$ , a byly vyrobeny firmou Supelco (Bellefonte, PA, USA). Butylmethakrylátové monolity v křemenných kapilárách pro cLC mod byly připraveny Mgr. Janem Grafnetterem, PhD. v rámci jeho disertační práce<sup>176</sup>. Rozměry těchto kapilár jsou následující: délka 15 cm, vnitřní průměr 320  $\mu\text{m}$ , vnější průměr 450  $\mu\text{m}$ . Fyzikálně–chemické vlastnosti všech kolon jsou uvedeny v následující *Tabulce 4.1.1*.

*Tabulka 4.1.1*

Přehled testovaných kolon a jejich fyzikálně–chemické vlastnosti.

<i>Kolona</i>	<i>Nosič</i>	<i>Vázaná fáze</i>	<i>Tvar částic</i>	<i>Velikost pórů</i> ( $\text{Å}$ )	<i>Specifický povrch</i> ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	<i>Teplotní limit</i> ( $^{\circ}\text{C}$ )	<i>Rozsah pH</i>
<b>Supelcosil C18</b>	silikagel	C18	kulovitý	120	170	60	2–7
<b>Discovery HS F5</b>	silikagel	pentafluor–fenylpropyl	kulovitý	120	300	70	2–8
<b>Discovery Zr PBD</b>	ZrO <sub>2</sub>	poly–butadien	kulovitý	300	30	150	1–13
<b>Monolit</b>	–	–	kompaktní materiál	200	24	n/a	n/a

Monolity jsou novým materiálem a všechny jeho vlastnosti nebyly ještě potvrzeny, proto jsou některé kolonky nevyplněné.

### 4.2 Použité přístroje

Všechna chromatografická měření v HPLC modu byla prováděna na kapalinových chromatografech firem Pye Unicam (Cambridge, Velká Británie) a Ecom (Praha, Česká republika) složených z ternárního/kvartérního gradientového čerpadla, vakuového degaseru a UV/VIS spektrofotometrického detektoru. Data byla sbírána a vyhodnocována pomocí softwarů CSW a Clarity (Data Apex, Praha, Česká republika).

Manuální dávkování bylo prováděno pomocí dávkovacího ventilu Rheodyne Model 7125 (Cotati, CA, USA) s vnější smyčkou 10  $\mu$ l.

K měření byl používán i kapilární kapalinový chromatograf Isco syringe pump model 100DM (Lincoln, NE, USA) složený z čerpadla a spektrofotometrického detektoru Linear UV/VIS 205 (San Jose, CA, USA). Dávkování bylo prováděno dávkovacím ventilem Valco (Schenkon, Švýcarsko) s vnitřní dávkovací smyčkou 60 nl. Data byla sbírána a vyhodnocována pomocí softwaru Clarity (Data Apex, Praha, ČR).

Monolitické kolony byly připravovány v křemenných kapilárách (320  $\mu$ m vnitřní průměr, 450  $\mu$ m vnější průměr) firmy Supelco (Bellefonte, USA). K termostatování kapilár během silanizace a polymerizace byla používána pec UL 400 Memmert (Schwabach, Německo).

Pro odvzdušnění mobilních fází byl použit ultrazvuk Ultrasonic LC 30H firmy Elma (Německo). Pro úpravu pH mobilních fází byl používán pH-metr Jenway (Jenway, Felsted, Velká Británie) s kombinovanou elektrodou Sentek. Teplota kolony byla kontrolována termostatem LCO 101 od firmy Ecom s.r.o. (Praha, Česká republika). K navažování byly používány analytické váhy APX-100 od firmy P-Lab a.s. (Praha, Česká republika).

### 4.3 Použité chemikálie

**Pentapeptidy, 99% čistota (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)**

Methionin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	$M_r = 572,6$
Leucin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$M_r = 555,6$
Leucin <sup>5</sup> -enkefalinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	$M_r = 554,6$
D-Alanin <sup>2</sup> , Leucin <sup>5</sup> -enkefalin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	$M_r = 569,7$

**Nonapeptidy, 99% čistota (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)**

Arginin <sup>8</sup> -vasopresin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	$M_r = 1084,2$
Lysin <sup>8</sup> -vasopresin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub>	$M_r = 1056,2$
Desmopresin ( DeaminoCys <sup>1</sup> , D-arginin <sup>8</sup> -vasopresin)	Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	$M_r = 1069,2$

Oxytocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub>	$M_r = 1007,2$
Vasotocin (Arginin <sup>8</sup> -oxytocin)		
	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	$M_r = 1050,2$
Isotocin	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-GlyNH <sub>2</sub>	$M_r = 966,1$

Zásobní roztoky jednotlivých peptidů byly připraveny o koncentraci 1 mg.ml<sup>-1</sup> v deionizované vodě a byly skladovány při teplotě -20 °C. Pro optimalizaci separace peptidů byla připravena směs odebráním 100 µl ze zásobního roztoku každého peptidu. Do směsi peptidů byl pro určení mrtvého času přidáván uracil (zásobní roztok o koncentraci 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>) a směs byla též skladována při teplotě -20 °C.

### Ostatní chemikálie

Dihydrogenfosforečnan sodný – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan disodný – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Octan amonný – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Mravenčan amonný – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Kyselina fosforečná – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Kyselina octová – p.a. Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

Kyselina mravenčí – p.a. Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

Hydroxid sodný – p.a., Lachema (Brno, Česká republika)

Uracil – 99% čistota, Sigma –Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Benzen – HPLC grade, Aldrich (Milwaukee, WI, USA)

Toluen – HPLC grade, Aldrich (Milwaukee, WI, USA)

Antracen – purum (> 98%, HPLC), Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

N,N-dietyl-*m*-toluamid – purum (~97%, GC), Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

Butan-1,4-diol – 99% čistota, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

Propan-1-ol – 99% čistota, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylát – 99% čistota, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

2,2-azobisisobutyronitril (AIBN) – 98% čistota, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

Ethylen-dimethakrylát (EDMA) – 98% čistota, Merck (Darmstadt, Německo)

Butyl-methakrylát (BMA) – 99% čistota, Merck (Darmstadt, Německo)

4-ethylanilin – 98% čistota, Merck (Darmstadt, Německo)

Acetonitril – HPLC grade, Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Methanol – HPLC grade, Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Voda – deionizovaná, připravovaná použitím Milli–Q čisticího systému (Millipore, Milford, MA, USA)

#### ***4.4 Příprava mobilních fází a podmínky HPLC a cLC měření***

Mobilní fáze byly tvořeny směsnými roztoky acetonitrilu nebo methanolu jako organické složky a pufru jako vodné složky, jejich vzájemný poměr je uváděn v objemových procentech.

Pro přípravu pufrů bylo naváženo vypočítané množství příslušné soli. Navážené množství bylo rozpuštěno v deionizované vodě. Takto připravený pufr byl přidavkem NaOH nebo příslušné kyseliny upraven na požadovanou hodnotu pH. Dále byl pufr v odměrné baňce doplněn po rysku a přefiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  membrány (Pall Corporation, Michigan, USA). Pufr byl uchováván v ledničce při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ . Maximální doba skladování pufru jako vodné složky mobilní fáze byla 3 dny.

Velikost dávkovací smyčky určovala dávkovaný objem vzorků, tzn. pro HPLC bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  a pro cLC 60 nl. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1 ml/min pro HPLC a 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  pro cLC. Teploty se pohybovaly v rozmezí 25  $^{\circ}\text{C}$  – 80  $^{\circ}\text{C}$ . Vlnová délka UV detekce byla zvolena s ohledem na studované analyty a použitou mobilní fází, tedy 214 nm a 230 nm.

#### ***4.5 Experimentální podmínky Waltersova testu***

K určení silanolového indexu (SI) se používají N,N–dietyl–*m*–toluamid a antracen o koncentraci 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (rozpuštěny v mobilní fázi) a mobilní fáze obsahující čistý ACN. Hydrofobní index (HI) se určuje pomocí uracilu (0,01  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  značkovač mrtvého času), benzenu (2,0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), toluenu (2,0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , určení účinnosti kolony) a antracenu (0,01  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) rozpuštěných v mobilní fázi 65/35 ACN–voda (v/v).

Při realizaci Waltersova testu byl dávkovaný objem vzorků dán opět velikostí dávkovací smyčky, tedy pro HPLC bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  a pro cLC 60 nl. Měření probíhala při průtokových rychlostech 1 ml/min (HPLC) a 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  (cLC) a laboratorní teplotě. UV detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Waltersův test

K charakterizaci a klasifikaci stacionárních fází bylo navrženo mnoho testovacích metod. Jedním z důvodů pro testování stacionárních fází je velká variabilita v rámci jedné výrobní šarže a mezi šaržemi navzájem, ale také obtíže při výběru fází pro separaci problematických analytů jako například bazických látek.

Metody používané k hodnocení stacionárních fází mohou být rozděleny do následujících skupin<sup>177</sup>:

- Fyzikální metody určující vlastnosti stacionární fáze<sup>178, 179</sup>, jako je velikost částic, tvar částic, specifická plocha povrchu, velikosti pórů a porozita.
- Spektroskopické metody jako IČ<sup>180, 181</sup> a NMR<sup>181–183</sup> spektroskopie.
- Statistické metody<sup>184</sup> využívající chromatografická data.
- Termodynamické metody<sup>185–187</sup>, např. využívající Van't Hoffových křivek.
- Chromatografické testovací metody<sup>188–201</sup>.

Skupinu chromatografických metod, určených především k hodnocení a testování reverzních stacionárních fází, můžeme dále rozdělit do dalších dvou podskupin:

- Metody založené na experimentech, jako jsou např. Engelhardtův<sup>188–190</sup>, Waltersův<sup>191</sup>, Tanakův<sup>192</sup> a Bidlingmeyerův test<sup>193</sup>. V těchto metodách se používají sloučeniny, které charakterizují specifické vlastnosti kolony, jako je hydrofobnost, sterická selektivita nebo silanolová aktivita.
- Metody založené na modelech jako např. modely Galushka<sup>194, 195, 202</sup>, Horvátha<sup>196</sup>, Jandery<sup>197</sup> nebo QSRR (Quantitative Structure Retention Relationship)–model Abrahama, Carra, Bollieta a Kaliszana<sup>198–201</sup>.

V předchozích odstavcích jsou stručně shrnuty metody používané pro hodnocení kolon. V této práci byl konkrétně využit Waltersův test.

Waltersův test je poměrně snadný test klasifikující kolony na základě dvou převládajících interakcí v RP HPLC, hydrofobní interakce a silanofilní interakce. Hydrofobní interakce závisí na obsahu uhlovodíků v řetězci a její míra je



kvantifikována hydrofobním indexem, který je prezentován jako poměr retenčních faktorů antracenu a benzenu v mobilní fázi tvořené 65/35 ACN/voda (v/v). Silanolový index závisí na dostupnosti nezreagovaných silanolových skupin na povrchu silikagelu a je určován jako poměr retenčních faktorů N,N–dietyl–*m*–toluamidu a antracenu v čistém acetonitrilu.

U stacionárních fází, které nejsou založeny na bázi silikagelu, např. zirkoniová fáze nebo monolitické fáze a které tedy nemají na povrchu volné silanolové skupiny, bude v této disertační práci místo označení silanolový index používán termín index polarity.

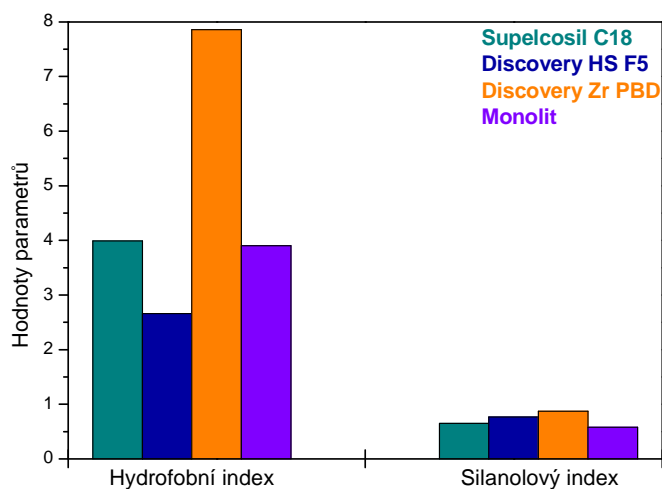
### 5.1.1 Výsledky

Waltersovým testem byly otestovány všechny používané stacionární fáze, a to Supelcosil C18, Discovery HS F5, Discovery Zr PBD a butyl–methakrylátový monolit. Testování probíhalo vždy za předepsaných podmínek Waltersova testu, a to před započítím a po ukončení optimalizačních kroků na dané koloně.

Počáteční hodnoty HI a SI, tedy hodnoty naměřené pro nové stacionární fáze ještě před používáním pufovaných mobilních fází, jsou uvedeny na *obr. 5.1.1.1*. Tyto výsledky naměřené za předepsaných podmínek Waltersova testu, tj. s mobilními fázemi tvořenými 65/35 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v) nebo 100 % ACN, jsou uvedeny na *obr. 5.1.1.1*. Z obrázku je zřejmé, že zirkoniová kolona modifikovaná polybutadienem, Discovery Zr PBD, vykazuje mnohem vyšší hydrofobnost oproti ostatním kolonám (HI = 7,86). Klasická silikagelová kolona Supelcosil C18 a butyl–methakrylátová monolitická kolona vykazují vzájemně srovnatelné hodnoty. Nejnižší hydrofobní index byl zjištěn u silikagelové kolony modifikované pentafluorfenylpropylem, Discovery HS F5 (HI = 2,66). Hodnoty silanolových indexů, respektive indexů polarity se pro testované kolony příliš neliší. Hodnota tohoto parametru nepatrně klesá v pořadí Discovery Zr PBD > Discovery HS F5 > Supelcosil C18 > butyl–methakrylátový monolit.

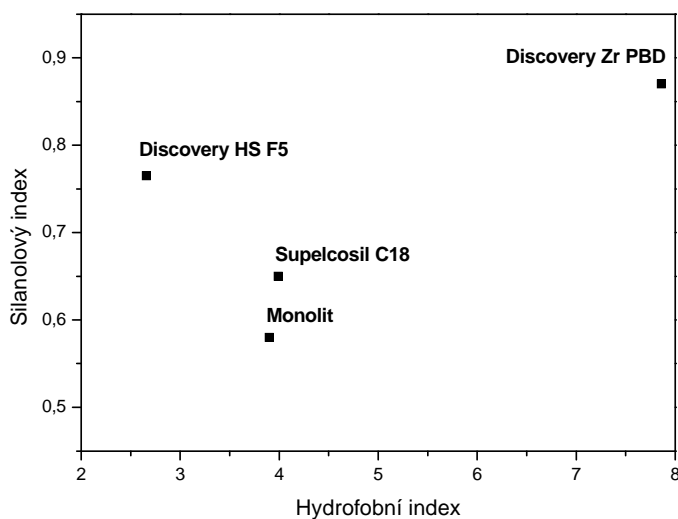
Pokud použijeme k porovnání kolon bodový graf a zobrazíme kolony podle naměřených hodnot hydrofobního indexu a silanolového indexu/indexu polarity, získáme zařazení kolon do jednotlivých skupin (*obr. 5.1.1.2*). Například kolona Discovery Zr PBD vykazuje nejvyšší hydrofobnost, a zároveň nejvyšší polaritu. Kolony Supelcosil C18 a butyl–methakrylátový monolit mají srovnatelnou hydrofobnost, ale liší se svojí polaritou. Butyl–methakrylátový monolit je méně polární než klasická

silikagelová kolona C18. Kolona Discovery HS F5 má ze všech kolon nejnižší hodnotu hydrofobního indexu, zato vykazuje druhou nejvyšší polaritu z testovaných kolon.



#### Obr 5.1.1.1

Srovnání kolon podle dosažených hodnot hydrofobního indexu a silanolového indexu/indexu polarity měřených za podmínek Waltersova testu.



#### Obr. 5.1.1.2

Grafické znázornění rozdělení kolon podle jejich hydrofobního a silanolového indexu/indexu polarity.

Následující *Tabulka 5.1.1.1* shrnuje výsledky získané za podmínek Waltersova testu pro jednotlivé kolony. Prezentované hodnoty HI a SI byly naměřeny před započítáním optimalizace separace peptidů, tzn. než se začala používat daná pufrovaná mobilní fáze, a následně po skončení měření s tímto pufrem. Zvolený postup umožnil

sledování míry změny chromatografické kolony během intenzivního používání za různých podmínek, tedy především pH, iontové síly a u zirkoniové kolony i teploty.

#### Tabulka 5.1.1.1

Výsledky pro jednotlivé kolony naměřené za podmínek Waltersova testu vždy před a po optimalizaci separace peptidů pro daný pufr.

Kolona	Typ pufru před a po kterém byl Waltersův test naměřen	Hydrofobní index		Silanolový index (Index polarity)	
		$\frac{k(\text{antracen})}{k(\text{benzen})}$		$\frac{k(N, N - DETA)}{k(\text{antracen})}$	
		před	po	před	po
	fosforečnanový	3,99	4,12	0,65	0,68
Supelcosil C18	octanový	4,12	4,04	0,68	0,69
	mravenčanový	4,02	4,15	0,70	0,72
Discovery HS F5	fosforečnanový	2,66	2,77	0,76	0,70
	octanový	2,55	2,69	0,85	0,75
Discovery Zr PBD	fosforečnanový	7,86	5,91	0,87	0,93
	octanový	8,22	7,20	0,96	1,40
Monolit	fosforečnanový	3,90	*	0,58	*
	octanový	3,89	3,96	0,54	0,52
	tetraboritanový	4,01	4,07	0,50	0,42

\* z důvodu nevratného poškození kolony nebyly tyto výsledky naměřeny

Z tabulky je patrné, že používané pufrы, vodné složky mobilní fáze, neměly výrazný vliv na změnu vlastností testovaných stacionární fází, kromě zirkoniové kolony Discovery Zr PBD. U této kolony došlo k poklesu HI indexu o 25 % po optimalizaci mobilní fáze obsahující fosforečnanový pufr a o 12 % po používání octanového pufru. Největší vliv použitého pufru na změnu silanolového indexu, v daném případě indexu polarity byl opět pozorován u kolony Discovery Zr PBD, a to po používání mobilní fáze s octanovým pufrem. Došlo k nárůstu hodnoty SI o 31 %. Pokles hodnot HI a současný nárůst hodnot SI lze vysvětlit tím, že došlo ke změně PBD vrstvy (pokles HI) na ZrO<sub>2</sub> nosiči, tím k „obnažení“ zirkoniové vrstvy a nárůstu hodnoty SI. Při tomto tvrzení je však třeba mít na paměti, že silanolový index byl zaveden pro charakterizaci kolon se

silikagelovým nosičem. Výše uvedenou interpretaci výsledků pro stacionární fázi na bázi oxidu zirkoničitého je proto třeba brát jako velmi aproximativní.

### 5.1.2 Závěr

Ze získaných výsledků Waltersova testu vyplývá, že použité stacionární fáze vykazují odlišné vlastnosti. Nejvyšší hydrofobní index, a zároveň i index polaritý měla zirkoniová kolona modifikovaná polybutadienem, Discovery Zr PBD. Silikagelová kolona, Discovery HS F5, modifikovaná pentafluorfenylpropylem je nejméně hydrofobní, ale druhá s nejvyšší polaritou. Polární charakter kolony Discovery HS F5 výhradně ale nesouvisí jen s velkým počtem nezreagovaných silanolových skupin. Přítomnosti fluoru a fenylového jádra ve struktuře vedou k uplatnění  $\pi$ - $\pi$  interakcí a vodíkových vazeb, které se významně podílejí na polárním charakteru perfluorované kolony. Kolony Supelcosil C18 a butyl-methakrylátový monolit vykazují podobnou hodnotu hydrofobního indexu, ale liší se v hodnotě silanolového indexu. Klasická C18 kolona má hodnotu silanolového indexu nepatrně vyšší (o 2,3 %) než testovaná kapilára naplněná butyl-methakrylátovým monolitem.

Porovnáním výsledků získaných za podmínek Waltersova testu před začátkem a po skončení optimalizace separace pro dané pufrý a kolony bylo zjištěno, že nedošlo během měření prokazatelně k výrazným změnám hydrofobnosti a silanolového indexu/indexu polaritý. Jedinou výjimku tvoří fosforečnanový a octanový pufr na koloně Discovery Zr PBD. Zde došlo k výraznému poklesu hydrofobnosti a výraznému nárůstu indexu polaritý vlivem používaného pufru v mobilní fázi.

## 5.2 Silikagelové reverzní stacionární fáze

Experimenty shrnuté v této disertační práci lze rozdělit do 3 částí podle typu stacionární fáze použité pro studium chromatografického chování vybraných bioaktivních pentapeptidů a nonapeptidů. První celek tvoří komerčně dostupné reverzní stacionární fáze na bázi silikagelu, kdy byly použity kolony Supelcosil C18 a Discovery HS F5. Podrobnosti o těchto kolonách a provedené experimenty jsou shrnuty v následujících podkapitolách. Druhou část této disertační práce tvoří výsledky získané s využitím moderní komerční stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého a v třetí části byl použit butyl–methakrylátový monolit jako stacionární fáze pro cLC, který byl připraven na Katedře analytické chemie PřF UK v Praze.

### 5.2.1 Supelcosil C18

Tato kolona je podle údajů výrobce speciálně deaktivovaná („endcapped“) pro analýzu bazických látek, což znamená, že tento typ kolon je vhodný pro analýzu studovaných analytů. Výrobce deklaruje, že kolona Supelcosil C18 poskytuje kratší retenci, lepší tvary píků a lepší účinnost vůči jiným C18 kolonám. Základní vlastnosti této kolony jsou uvedeny v *Tabulce 5.2.1.1*.

#### Tabulka 5.2.1.1

Vlastnosti klasické oktadecylové stacionární fáze na bázi silikagelu, Supelcosil C18.

znak	„endcapped“
obsah uhlíku	11,0 %
délka × I.D.	25 cm × 4,6 mm
pokrytí	3,1 μmol/m <sup>2</sup>
matrice	silikagel, kulovité částice
aktivní skupina	oktadecyl (C18)
velikost částic	5 μm
velikost pórů	120 Å
specifický povrch	170 m <sup>2</sup> /g

Kolona byla použita pro studium retenčního chování směsi pentapeptidů a nonapeptidů v různých mobilních fázích, které byly tvořeny směsí organické složky, acetonitrilu, a vodné složky, pufru. Byly testovány tři různé typy pufrů, a to fosforečnanový, octanový a mravenčanový pufr, s cílem dosáhnout rychlé a účinné

separace studovaných látek a najít takovou mobilní fázi, která by případně umožňovala spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem.

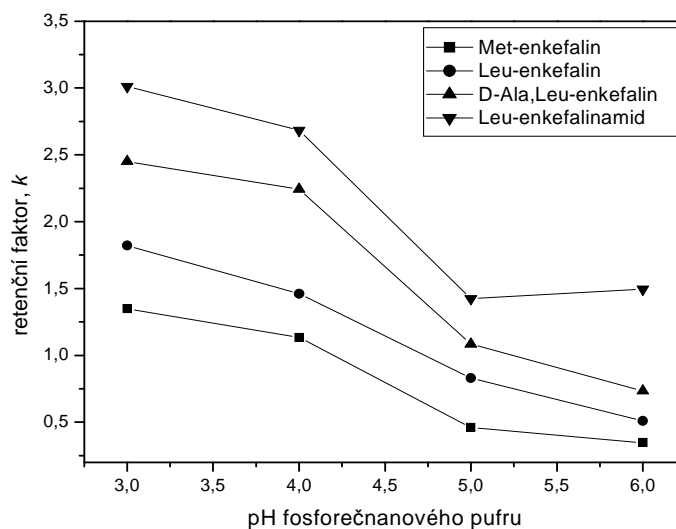
### 5.2.1.1 *Pentapeptidy*

Pro nalezení podmínek vhodných pro separaci směsi pentapeptidů byly postupně optimalizovány následující parametry: pH a koncentrace pufru jako vodné složky mobilní fáze, a také poměr organické složky a vybraného pufru. Počáteční podmínky, tedy poměr organické složky mobilní fáze a vodné složky,  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v), byly zjištěny na základě předběžných experimentů.

#### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Mobilní fáze, složená z ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru v poměru 20/80 (v/v), byla použita pro následující experimenty zjišťující vliv pH na retenční chování studovaných pentapeptidů. Vliv pH vodné složky na změnu retenčních charakteristik byl testován v rozmezí hodnot 3,0–6,0 (*obr. 5.2.1.1.1*). Retence studovaných pentapeptidů klesala s rostoucí hodnotou pH fosforečnanového pufru. Symetrie píků byla téměř nezávislá na změně pH vodné složky a pohybovala se v rozmezí hodnot 1,0–2,2 pro jednotlivé pentapeptidy. Tento fakt ukazuje na dobře chráněný povrch silikagelu a na dobrou homogenitu silikagelových částic. Dále bylo hodnoceno rozlišení všech studovaných analytů. S klesajícím pH se značně zlepšuje rozlišení Leu–enkefalinu a D–Ala,Leu–enkefalinu a malé zlepšení bylo pozorováno u páru Met–enkefalin a Leu–enkefalin. D–Ala,Leu–enkefalin a Leu–enkefalinamid byly lépe rozlišeny při nejvyšším studovaném pH (pH 6,0), nebo naopak při nízkém pH (pH 3,0).

Pro následující experimenty byla použita mobilní fáze o složení  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v) o pH 5,0. V této mobilní fázi byly všechny sledované parametry, tedy rozlišení a symetrie píků, dostatečné ( $R_s$  min 3,1 a  $A_s$  max 1,2) a sledované analyty eluovaly v nejkratších retenčních časech (do 8 min).



### Obr. 5.2.1.1.1

Závislost retenčního faktoru studovaných pentapeptidů na změně pH fosforečnanového pufru na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

### *Vliv koncentrace fosforečnanového pufru*

Dalším studovaným parametrem na retenční chování pentapeptidů byla koncentrace fosforečnanového pufru v koncentračním rozmezí  $(10\text{--}100) \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Pro tyto experimenty byla použita mobilní fáze o složení ACN–fosforečnanový pufr, pH 5,0 20/80 (v/v). Vzájemně rostoucí koncentrace pufru nevede téměř k žádné změně retence 3 studovaných analytů, stejně tak neovlivňuje symetrii píků a rozlišení. Odlišné chování bylo pozorováno jen u Leu–enkefalinamidu, jehož retence značně klesala s rostoucí koncentrací pufru, především v oblasti  $(10\text{--}60) \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Toto odlišné chování pravděpodobně souvisí s přítomností amidové skupiny na konci AMK řetězce daného peptidu.

Vyhodnocením naměřených dat byla pro další optimalizační kroky zvolena koncentrace fosforečnanového pufru  $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Hodnota rozlišení se pohybovala v rozmezí 2,3–5,3 a symetrie píků byla maximálně 1,1. Vyšší hodnoty koncentrace, tedy vyšší iontová síla mobilní fáze, která by vedla ke zkrácení doby analýzy, nemohla být

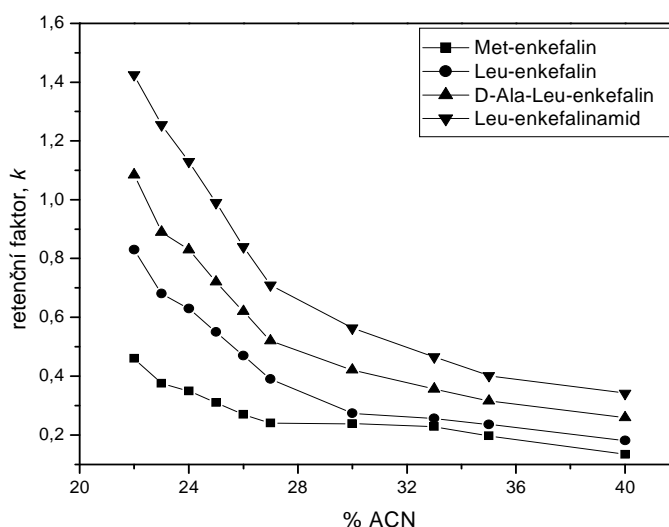
Poznámka k prokládání bodů v grafech:

Z důvodu lepší orientace v obrázcích jsou jednotlivé body v grafech vzájemně propojovány, přestože takto vytvořené závislosti nemusí zcela vypovídat o reálném průběhu závislosti.

zvolena, protože se zhoršilo rozlišení mezi analyty D-Ala,Leu-enkefalinem a Leu-enkefalinamidem.

#### Vliv poměru organického modifikátoru a pufru

Na základě předešlých výsledků (vysoké rozlišení a dobrá symetrie píků) byla zvolena mobilní fáze obsahující ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 5,0. Pro sledování vlivu organického modifikátoru na separaci enkefalinů byly použity mobilní fáze složené z ACN a fosforečnanového pufru v těchto objemových poměrech: 40/60, 35/65, 33/67, 30/70, 27/73, 26/74, 25/75, 24/76, 23/77 a 22/78 (v/v) (obr. 5.2.1.1.2). Retence enkefalinů značně vzrůstala s klesajícím obsahem ACN v mobilní fázi a rozlišení se s nižším obsahem ACN také zlepšovalo. Průběh získané závislosti je zcela typický pro reverzní chromatografii peptidů. Velice často je tento průběh pozorován dokonce v mnohem užším intervalu hodnot obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi, než je tomu v případě studovaných enkefalinů, např. v rozsahu 10 % ACN.



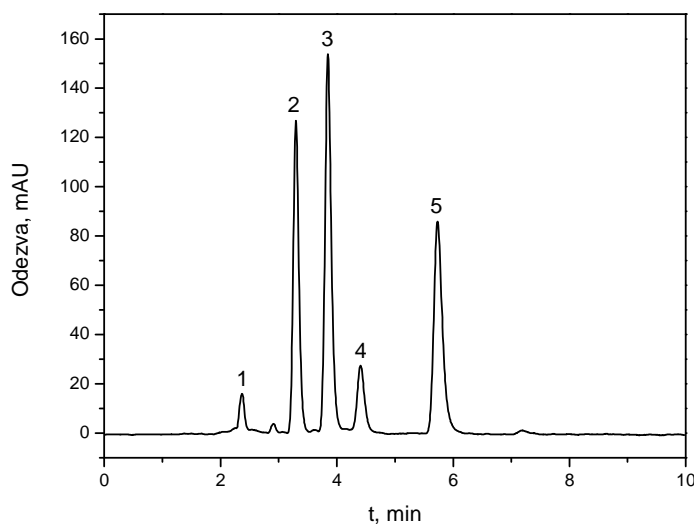
#### Obr. 5.2.1.1.2

Závislost retenčního faktoru na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0; teplota 25 °C.

Směs pentapeptidů byla dobře separována v mobilní fázi obsahující ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v). Ukázkový chromatogram je uveden na obr. 5.2.1.1.3. Při optimalizovaných podmínkách separace směsi enkefalinů



se hodnoty rozlišení pohybovaly v rozmezí 2,8–5,5 a symetrie píků studovaných analytů nabývala hodnot od 1,0 do 1,3. Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater na metr kolony dosahovala hodnot ~ 38 000.



#### Obr. 5.2.1.1.3

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10 µl; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) D–Ala,Leu–enkefalin; (3) Met–enkefalin; (4) Leu–enkefalin; (5) Leu–enkefalinamid.

#### **5.2.1.2 Nonapeptidy**

Druhou skupinou peptidů, u kterých bylo sledováno retenční chování v závislosti na změně některých parametrů, byly nonapeptidy – vasopresiny. Jde o látky strukturně odlišné od pentapeptidů. Struktura vasopresinů je tvořena cyklickou částí uzavřenou disulfidickým můstkem a zbývajícími 3 aminokyselinami, které tvoří volný a pro interakce dobře přístupný koncový řetězec.

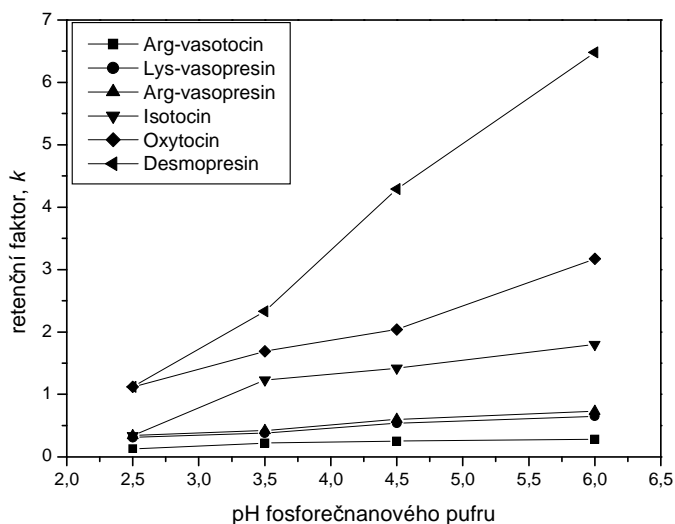
Při optimalizaci separace nonapeptidů na koloně Supelcosil C18 bylo postupováno stejně jako v případě separace enkefalinů. Nejprve byl tedy sledován vliv pH, dále koncentrace použitých pufrů a vliv poměru vodné a organické složky v mobilní fázi na retenční chování sledovaných nonapeptidů. Byly studovány tyto pufrы: fosforečnanový, octanový a mravenčanový. Provedené experimenty a získané výsledky jsou popsány v následujících kapitolách.

### 5.2.1.2.1 Fosforečnanový pufr

Při separaci směsi enkefalinů se fosforečnanový pufr osvědčil, byl tedy použit i v případě optimalizace separace nonapeptidů. Byl opět sledován vliv pH, koncentrace a poměr tohoto pufru a acetonitrilu jako organické složky na retenci vybraných nonapeptidů.

#### Vliv pH fosforečnanového pufru

Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenci studovaných nonapeptidů byl sledován v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v) při hodnotách pH 2,5; 3,5; 4,5 a 6,0 (obr. 5.2.1.2.1.1), tedy v rozsahu použitelnosti silikagelových kolon. Retence analytů se zvyšovala s rostoucí hodnotou pH pufru (vodné složky mobilní fáze). V oblasti pH 2,5–3,5 analyty Arg–vasopresin a isotocin a dále oxytocin a desmopresin koeluovaly. Rozlišení i symetrie píků se s rostoucí hodnotou pH zlepšovaly. Nejvhodnější se jevílo z hlediska retence, rozlišení ( $R_s \geq 0,8$ ) a symetrie píků ( $A_s \text{ max } 2,0$ ) pH vodné složky 4,5. Mobilní fáze o tomto pH byla tedy používána v dalších optimalizačních krocích.

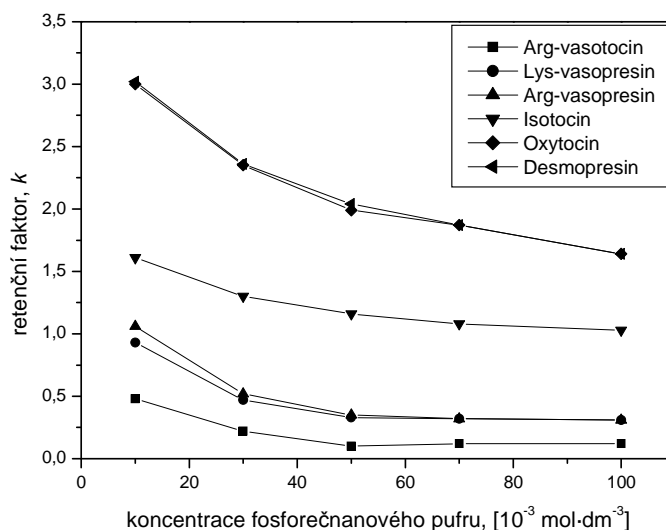


*Obr. 5.2.1.2.1.1*

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně pH fosforečnanového pufru na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

### Vliv koncentrace fosforečnanového pufru

V dalším kroku byla optimalizována koncentrace fosforečnanového pufru a sledován její vliv na separaci vasopresinů v rozmezí  $(10\text{--}100)\cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Mobilní fáze obsahovala ACN–fosforečnanový pufr pH 4,5 20/80 (v/v). Retence analytů se výrazněji snižovala v oblasti koncentrací  $(10\text{--}50)\cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> (obr. 5.2.1.2.1.2). V rozmezí koncentrací  $(70\text{--}100)\cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanového pufru došlo ke koeluci páru Lys–vasopresin a Arg–vasopresin a páru oxytocin a desmopresin. Retence většiny analytů (kromě posledně jmenovaných) v této oblasti byla na koncentraci fosforečnanového pufru téměř nezávislá. Rozlišení i symetrie byly lepší při nižších hodnotách koncentrace fosforečnanového pufru, a proto pro další experimenty byl vybrán  $10\cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr.



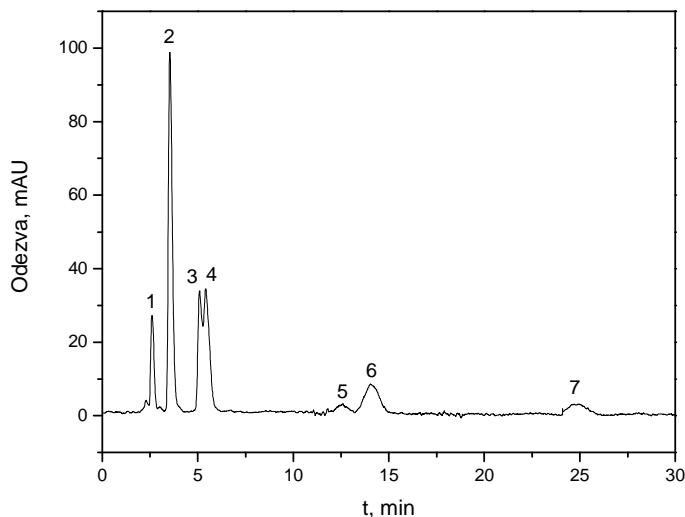
#### Obr. 5.2.1.2.1.2

Závislost retenčního faktoru na změně koncentrace fosforečnanového pufru na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN–fosforečnanový pufr pH 4,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

### Vliv poměru vodné a organické složky

Na základě výsledků předchozích optimalizačních kroků byla použita mobilní fáze o složení ACN– $10\cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5 pro sledování vlivu poměru pufru a acetonitrilu 24/76; 22/78; 20/80; 18/82 a 16/84 (v/v) na retenci studovaných analytů. S nižším obsahem acetonitrilu v mobilní fázi se výrazně zvyšovala retence vasopresinů. Rozlišení a symetrie píků se zlepšovaly se snižujícím se obsahem ACN.

Nejlepší separace směsi vasopresinů na koloně Supelcosil C18 bylo dosaženo v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v). Hodnoty sledovaných parametrů byly: rozlišení 0,6–5,1; symetrie 1,6–3,1 a účinnost separace 15 000–22 000. Získaný chromatogram je zobrazen na *obr. 5.2.1.2.1.3*. Z chromatogramu je patrné, že došlo k neúplnému rozdělení Arg– a Lys–vasopresinu. Později eluující nonapeptidy mají rozmyté píky a nízkou odezvu.



#### Obr. 5.2.1.2.1.3

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze  $\text{ACN}-10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Arg–vasotocin; (3) Lys–vasopresin; (4) Arg–vasopresin; (5) isotocin; (6) oxytocin; (7) desmopresin.

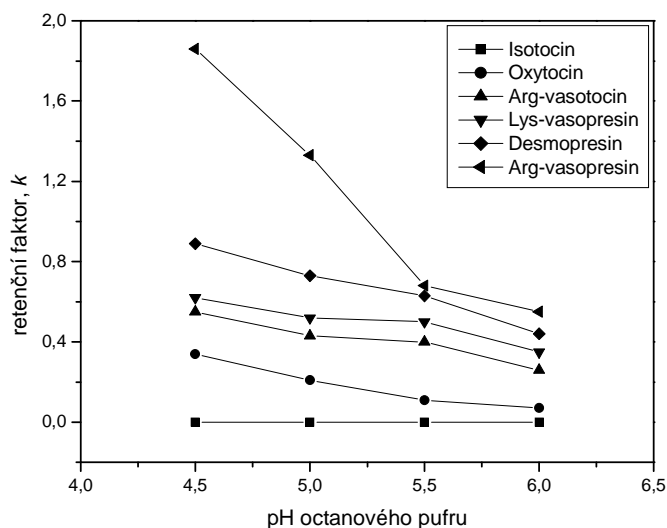
#### **5.2.1.2.2 Octanový pufr**

Druhým zvoleným typem pufru byl octanový pufr. Tento pufr je oproti fosforečnanovému pufru šetrnější k silikagelovým kolonám. Další výhodou octanového pufru je oproti fosforečnanovému jeho kompatibilita s MS detekcí. Jeho nevýhodou je vysoká absorpce v UV oblasti vhodné pro detekci studovaných peptidů a z toho vyplývající nižší odezva sledovaných látek. Na základě předchozích experimentálních zkoušek byla vybrána vlnová délka detekce 230 nm. Dobrá pufrací kapacita tohoto pufru leží přibližně v rozmezí hodnot pH 4,0–6,0.

Byl zvolen stejný postup optimalizace separace nonapeptidů jako u fosforečnanového pufru. Tedy byl sledován vliv pH a koncentrace octanového pufru a obsah ACN v mobilní fázi.

#### *Vliv pH octanového pufru*

Vliv pH vodné složky, pufru, na retenční chování studovaných analytů byl sledován v mobilní fázi  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr 20/80 (v/v). Vliv pH vodné složky mobilní fáze byl studován v oblasti pH 4,5–6,0 (*obr. 5.2.1.2.2.1*). Retence analytů se s rostoucím pH mírně snižovala, výrazný pokles byl pozorován pro Arg-vasopresin. Isotocin se nepodařilo v žádné z použitých mobilních fází oddělit od uracilu ( $t_m$ ). Došlo ke změně elučního pořadí sledovaných analytů proti mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr. Záměna pufru v mobilní fázi vedla ke změně selektivity separačního systému. Vyhodnocením parametrů retence a rozlišení, s přihlédnutím k pufrací kapacitě, byla pro další experimenty zvolena mobilní fáze ACN–octanový pufr pH 5,0 20/80 (v/v). V této mobilní fázi byly všechny sledované parametry, tedy rozlišení a symetrie píků, dostatečné, s výjimkou dvojice Arg- a Lys-vasopresin, pro které rozlišení bylo 0,8.



#### *Obr. 5.2.1.2.2.1*

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně pH octanového pufru na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

### *Vliv koncentrace octanového pufru*

Závislost retence studovaných nonapeptidů na změně koncentrace octanového pufru byla proměřena v oblasti  $(10-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Retence a rozlišení nonapeptidů značně klesá v rozmezí koncentrací  $(10-50) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (kromě isotocinu a desmopresinu). V oblasti  $(50-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  je retence látek na změně koncentrace octanového pufru téměř nezávislá. Isotocin koeluuje s uracilem ( $t_m$ ) v celém rozsahu koncentrací, a také v oblasti  $(50-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  koelují desmopresin a Arg-vasopresin. Píky vykazovaly lepší symetrii při nižších hodnotách koncentrace octanového pufru. Vyhodnocením experimentálních dat byla pro další měření zvolena koncentrace octanového pufru  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Při této koncentraci došlo jak k dostatečnému rozdělení analytů (kromě isotocinu od  $t_m$ ), tak i symetrie píků byla postačující (1,1 – 1,5).

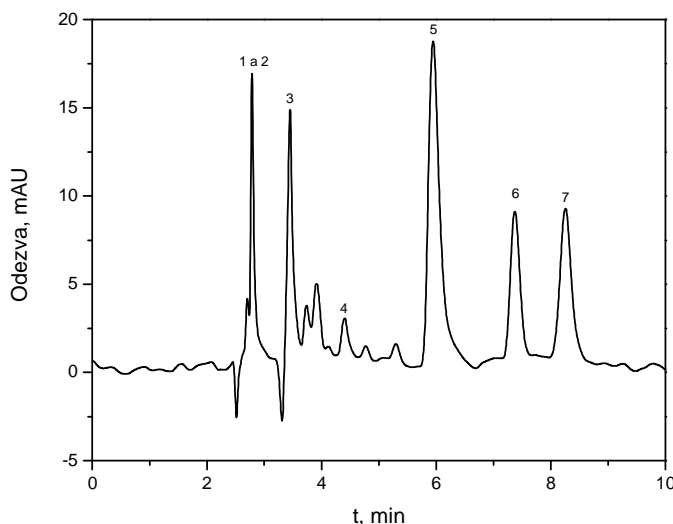
### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Vliv obsahu organické a vodné složky na retenční chování nonapeptidů byl studován v mobilní fázi složené z ACN a  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanového pufru o pH 5,0 v následujících objemových poměrech 24/76; 22/78; 20/80; 18/82; 16/84 a 14/86 (v/v). Retence analytů mírně klesala s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi. Například u nejméně zadržovaného nonapeptidu Arg-vasopresinu byla při změně obsahu ACN v mobilní fázi o 10 % (ze 14 % na 24 %) pozorována změna retenčního faktoru z hodnoty 1,6 na 1,1, tedy o 31 %. Retence isotocinu, který eluuje v mrtvém čase ( $t_m$ ), a oxytocinu je na změně obsahu organického modifikátoru téměř nezávislá. Žádný vliv obsahu ACN v mobilní fázi nebyl u těchto dvou analytů pozorován i pro rozlišení a symetrii píků. Rozlišení ostatních analytů se s rostoucím obsahem acetonitrilu snižuje. Nejlepší symetrie píků (1,1–1,6) a dostačující rozlišení (1,6–4,8) byly získány v mobilní fázi obsahující 20 % (v) ACN. Účinnost separace v dané mobilní fázi dosahovala hodnot od 18 000 do 24 000 tp/m v závislosti na analytu.

Nejlépe byla směs studovaných nonapeptidů separována v mobilní fázi obsahující ACN– $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 5,0 20/80 (v/v). Chromatogram za optimalizovaných podmínek je pro ilustraci uveden na obr. 5.2.1.2.2.2. Oproti separaci v mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr se zde výrazně zkrátila doba analýzy, píky jsou lépe rozdělené a symetrie píků je také lepší. Jedinou nevýhodou použití mobilní fáze s octanovým pufrům je nestabilní základní linie a nízká odezva analytů při

UV detekci. Tento separační systém by však byl vhodný k použití ve spojení s MS detekcí.

Další změna, oproti separaci směsi analytů v mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr, se projevila v záměně elučního pořadí studovaných analytů. Pravděpodobně odlišná interakce fosforečnanu s povrchem stacionární fáze omezuje interakci studovaných analytů se zbytkovými silanolovými skupinami. S touto hypotézou korelují také nižší hodnoty retenčních faktorů naměřené na dané koloně za použití fosforečnanového pufru ve srovnání s pufrem octanovým. Výhodou separace v mobilní fázi obsahující ACN–octanový pufr bylo úplné oddělení Lys– a Arg–vasopresinu, které jsou si velmi podobné a často je obtížné či nemožné je od sebe oddělit.



#### Obr. 5.2.1.2.2.2

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN– $30 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 5,0 20/80 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu$ l; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) oxytocin; (4) Arg–vasotocin; (5) Lys–vasopresin; (6) desmopresin; (7) Arg–vasopresin.

#### **5.2.1.2.3 Mravenčanový pufr**

Jako poslední separační systém byla testována pro separaci směsi nonapeptidů mobilní fáze obsahující mravenčanový pufr, který by neměl vykazovat tak silnou absorpci ve zvolené detekční UV oblasti, proto by jeho základní linie měla být stabilnější než základní linie octanového pufru. Na základě předchozích

experimentálních zkoušek byla zvolena vlnová délka detekce 230 nm. Mravenčanový pufr byl použit pouze pro separaci směsi 4 nonapeptidů (Arg–vasotocin, Arg–vasopresin, Lys–vasopresin a oxytocin), protože další dva nonapeptidy (isotocin a desmopresin) nebyly v době experimentů již k dispozici. Mravenčanový pufr byl používán v oblasti pH od 2,5 do 5,0, tedy v oblasti jeho dobré pufrací kapacity.

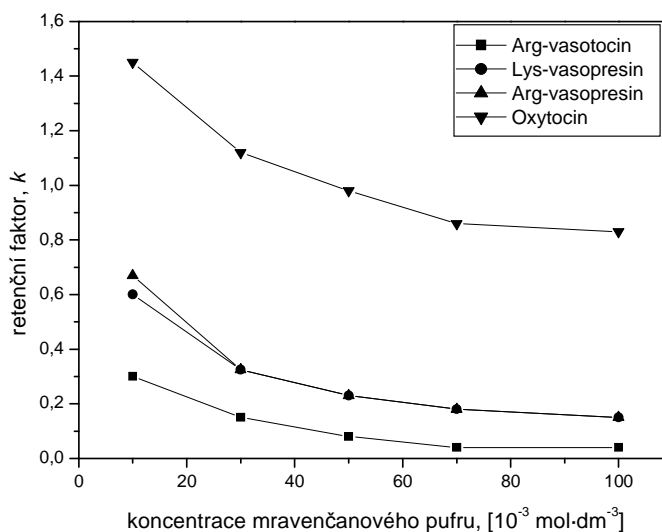
#### *Vliv pH mravenčanového pufru*

Změny retenčního chování směsi vasopresinů byly sledovány při pH vodné složky 2,5; 3,5; 4,5 a 5,0 v mobilní fázi složené z ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mravenčanového pufru 20/80 (v/v). Retence analytů je na změně pH téměř nezávislá. Arg–vasopresin a Lys–vasopresin se nepodařilo od sebe při žádné studované hodnotě pH oddělit. Nejméně zadržovaný nonapeptid byl vasotocin, jehož retenční faktor měl hodnotu 0,1. Retenční faktor nerozděleného páru Arg– a Lys–vasopresinu dosahoval hodnoty 0,2 a nejvíce byl zadržován oxytocin s retenčním faktorem o hodnotě 0,8. Rozlišení všech dělených nonapeptidů se pohybovalo v rozmezí (1,4–6,0) a symetrie dosahovala nejlepších hodnot (1,2–1,5) při pH vodné složky mobilní fáze 4,5, proto byla tato mobilní fáze využita v dalších optimalizačních krocích.

#### *Vliv koncentrace mravenčanového pufru*

Mobilní fáze obsahující ACN – mravenčanový pufr pH 4,5 20/80 (v/v) byla použita při sledování závislosti retence na změně koncentrace mravenčanového pufru v rozmezí  $(10\text{--}100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (obr. 5.2.1.2.3.1). Retence nonapeptidů klesala s rostoucí hodnotou koncentrace mravenčanového pufru, stejnou tendenci vykazovalo i rozlišení píků jednotlivých analytů. Arg–vasopresin a Lys–vasopresin se podařilo od sebe oddělit pouze v  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mravenčanovém pufru. Tato koncentrace byla proto použita i v dalších experimentech. Hodnoty rozlišení a symetrie studovaných analytů v mobilní fázi obsahující  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mravenčanový pufr dosahovaly hodnot minimálně 0,7 respektive maximálně 4,2.





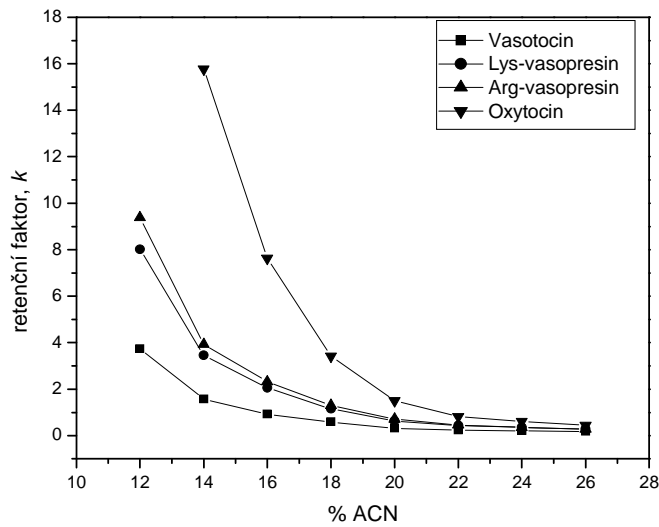
#### Obr. 5.2.1.2.3.1

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně koncentrace mravenčanového pufru na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze ACN–mravenčanový pufr pH 4,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv poměru vodné a organické složky*

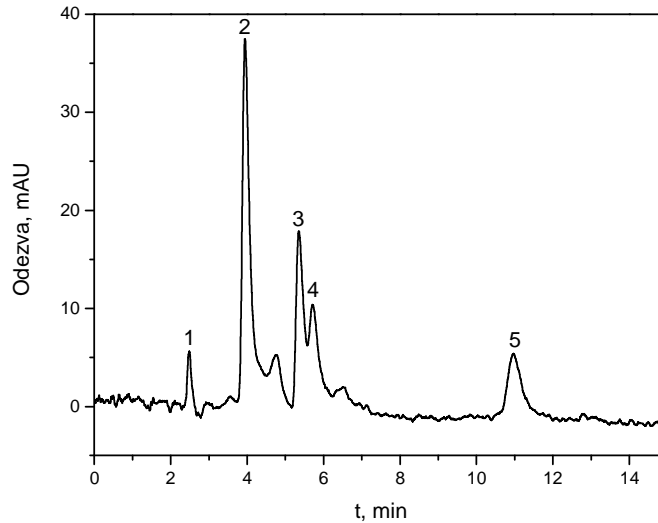
Vliv obsahu organické a vodné složky v mobilní fázi na retenci studovaných analytů byl sledován v mobilní fázi o složení ACN–10·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> mravenčanový pufr, pH 4,5 v objemových poměrech 26/74; 24/76; 22/78; 20/80; 18/82; 16/84; 14/86 a 12/88 (v/v). Se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi se retence i rozlišení analytů zvyšovaly, jak je dobře vidět z obr. 5.2.1.2.3.2. Symetrie píků byla na obsahu ACN v mobilní fázi téměř nezávislá.

Nejlepší separace bylo dosaženo v mobilní fázi ACN–10·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> mravenčanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v). Příslušný chromatogram této separace je uveden na obr. 5.2.1.2.3.3 a všechny sledované parametry, tedy rozlišení a symetrie píků byly dostatečné ( $R_s$  minimálně 0,8;  $A_s$  max 2,5 a  $t_p/m \sim 15\ 000$ ) a studované analyty eluovaly v retenčních časech do 12 min.



Obr. 5.2.1.2.3.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze  $\text{ACN}-10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mravenčanový pufr pH 4,5; teplota 25 °C.



Obr. 5.2.1.2.3.3

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Supelcosil C18; mobilní fáze  $\text{ACN}-10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mravenčanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Arg-vasotocin; (3) Lys-vasopresin; (4) Arg-vasopresin; (5) oxytocin.

### 5.2.1.3 Shrnutí

Na silikagelové koloně Supelcosil C18 bylo podrobně studováno retenční chování dvou skupin peptidů v různých systémech mobilních fází. Byl sledován vliv typu pufru (fosforečnanového, octanového a mravenčanového), jeho pH a koncentrace a poměru daného pufru a ACN na separaci směsi pentapeptidů nebo nonapeptidů. Byl zkoumán vliv jednotlivých optimalizačních parametrů na základní retenční charakteristiky jako retenční faktor, rozlišení, symetrii píků a účinnost analýzy vyjádřené počtem teoretických pater na metr kolony.

Separace směsi pentapeptidů byla optimalizována v mobilní fázi obsahující ACN a fosforečnanový pufr. Vyhodnocením všech sledovaných parametrů byla jako nejvhodnější mobilní fáze pro separaci směsi 4 pentapeptidů zvolena mobilní fáze složená z ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru pH 5,0 22/78 (v/v). Doba analýzy směsi pentapeptidů byla krátká (do 7 min) a všechny sledované parametry separace byly dostačující ( $R_s \geq 2,8$ ;  $A_s \leq 1,3$  a  $tp/m \sim 38\ 000$ ). Tento pufr bohužel nelze použít pro MS detekci, proto by bylo vhodné vyzkoušet i jiné typy pufrů.

Větší pozornost byla věnována optimalizaci separace směsi nonapeptidů, kdy byly studovány 3 typy pufrů (fosforečnanový, octanový a mravenčanový). Fosforečnanový pufr se osvědčil při analýze pentapeptidů, dále octanový a mravenčanový pufr byly vybrány s ohledem na možnou MS detekci. Optimalizace podmínek pro MS detekci však nebyla předmětem této disertační práce.

Retence analytů v mobilní fázi obsahující ACN–fosforečnanový pufr rostla s rostoucí hodnotou pH, největší vliv pH na retenci byl pozorován u desmopresinu. Při změně pH v mobilní fázi ACN–octanový pufr byl pozorován vliv opačný, tedy retence analytů s rostoucím pH klesala a změna pH mobilní fáze měla opět největší vliv na desmopresin. Mobilní fáze ACN–mravenčanový pufr byla použita jen pro separaci směsi 4 nonapeptidů, změna pH neměla výrazný vliv na retenci. V této mobilní fázi při jakékoli změně pH pufru nebylo dosaženo rozdělení páru Arg–vasopresin a Lys–vasopresin. Přestože byl pozorován různý vliv změny pH na retenci sledovaných analytů, jako nejvhodnější pH byla vybrána podobná hodnota pH pro všechny 3 pufrů, a to pH 4,5 pro fosforečnanový a mravenčanový pufr a pH 5,0 v případě octanového pufru.

Dalším důležitým krokem byla optimalizace koncentrace vybraných pufrů. Pro všechny 3 systémy mobilní fáze byl pozorován stejný trend, tedy se zvyšující se

koncentrací pufru se retence, a tedy i rozlišení analytů, snižuje. Proto se shodně jako nejvhodnější jevíly nižší hodnoty koncentrací, což byla v případě fosforečnanového pufru koncentrace  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , v případě octanového pufru  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  koncentrace a koncentrace  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byla vhodná pro mravenčanový pufr.

Změna poměru ACN a pufru ve všech sledovaných mobilních fázích měla stejný vliv na retenci, tedy s nižším obsahem organické složky, ACN, se retence analytů zvyšovala. Jako nejvhodnější složení mobilní fáze (poměr organické a vodné složky) byly vybrány poměry 18/82 (v/v) ACN–fosforečnanový pufr, 20/80 (v/v) ACN–octanový pufr a 18/82 (v/v) ACN–mravenčanový pufr.

Z výsledků je patrné, že všechny 3 mobilní fáze, které byly označeny jako optimalizované, mají velmi podobné parametry, ale výsledné separace se značně liší. Separace směsi nonapeptidů v mobilní fázi ACN– $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 18/82 (v/v) se podařila do 26 min. Za těchto podmínek se ovšem nepodařilo rozdělit Arg–vasopresin a Lys–vasopresin ( $R_s \sim 0,6$ ). V mobilní fázi ACN–octanový pufr nedošlo během optimalizace k dělení isotocinu a uracilu ( $t_m$ ), tzn. že isotocin eluoval v mrtvém čase. Ostatní analyty byly rozděleny s dostatečnou hodnotou rozlišení ( $R_s \geq 1,2$ ) do 10 min v optimalizované mobilní fázi ACN–octanový pufr pH 5,0 20/80 (v/v). V této mobilní fázi se změnilo eluční pořadí analytů oproti ostatním separačním systémům, což ukazuje na změnu selektivity daného separačního systému. Při použití mravenčanového pufru jako vodné složky mobilní fáze bylo dosaženo nejlepšího dělení 4 studovaných nonapeptidů v mobilní fázi složené z ACN a mravenčanového pufru o pH 4,5 18/82 (v/v). Ani v této mobilní fázi však nedošlo k dostatečnému rozdělení Arg–vasopresinu a Lys–vasopresinu ( $R_s \geq 0,8$ ). Celková doba separace byla 15 min s dostatečným rozlišením ostatních analytů ( $R_s \geq 4,0$ ). Vypočítaná účinnost kolony pro všechny tři používané pufrы byla v rozmezí 10 000–24 000 tp/m v závislosti na analytu.

### 5.2.2 Discovery HS F5

Relativní novinkou na trhu s chromatografickými kolonami je kolona Discovery HS F5. Jedná se o silikagelovou kolonu s navázanou pentafluorfenylpropylovou skupinou<sup>203</sup>. Zkratka v názvu kolony HS znamená „high surface“, tzn. že specifický povrch kolony dosahuje hodnoty 300 m<sup>2</sup>/g. U jiných silikagelových kolon je specifický povrch mnohem menší, např. u kolony Supelcosil C18 činí 170 m<sup>2</sup>/g. Pentafluorfenylpropylová stacionární vázaná fáze je schopna dělit určité skupiny problematických analytů s výbornou selektivitou, další výhodou této fáze je snadná přenositelnost metod vypracovaných pro C18 kolony na kolonu Discovery HS F5. Pentafluorfenylpropylové stacionární fáze na bázi silikagelu dále vykazují výborné tvary píků, jsou velmi stabilní a kompatibilní s MS detekcí. Tyto kolony jsou méně hydrofobní než klasické C18 fáze, a jsou tedy vhodné pro analýzy s vysokým procentem vodné složky v mobilní fázi. Při separaci bazických látek na koloně Discovery HS F5 se projevuje tzv. „U“ retenční profil, tzn. že s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi se retence látek snižuje, a to až do určitého bodu, kde opět začne retence narůstat. Základní vlastnosti této kolony jsou uvedeny v *Tabulce 5.2.2.1*.

*Tabulka 5.2.2.1*

Vlastnosti pentafluorfenylpropylové stacionární fáze na bázi silikagelu, Discovery HS F5.

znak	„endcapped“
obsah uhlíku	12,0 %
délka × I.D.	25 cm × 4,6 mm
pokrytí	4,0 μmol/m <sup>2</sup>
matrice	silikagel, kulovité částice
aktivní skupina	pentafluorfenylpropyl (PFPP)
velikost částic	5 μm
velikost pórů	120 Å
specifický povrch	300 m <sup>2</sup> /g
pH rozmezí	2–8
teplotní limit	70 °C

Kolona Discovery HS F5 byla použita pro optimalizaci separací směsí pentapeptidů a nonapeptidů v různých typech mobilní fáze, která byla směsí organické

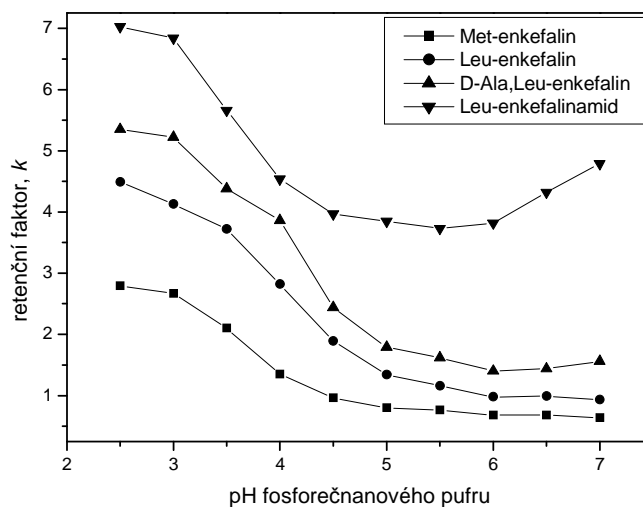
složky, acetonitrilu, a vodné složky tvořené fosforečnanovým nebo octanovým pufrům. Mravenčanový pufr, který podle údajů výrobce vykazuje na této koloně velmi malou eluční sílu, nebyl zkoumán.

### 5.2.2.1 *Pentapeptidy*

Jak již bylo řečeno v úvodu *Kapitoly 5.2.2*, lze lehce převést metody používané u C18 fází na fluorované fáze. Pro ověření tohoto tvrzení byla pro separaci směsi pentapeptidů použita mobilní fáze optimalizovaná pro separaci směsi pentapeptidů na koloně Supelcosil C18, tedy  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v). Došlo k dělení sledovaných analytů, ale značně se prodloužila doba analýzy (~ 40 min). Ukázalo se, že vypracovanou metodu pro pentapeptidy na koloně Supelcosil C18 nelze jednoduše převést na kolonu Discovery HS F5. Proto musela být mobilní fáze optimalizována. Byl opět sledován vliv pH, koncentrace použitého pufru a obsah ACN v mobilní fázi na separaci směsi analytů. Ostatní podmínky separace jako průtoková rychlost mobilní fáze  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a UV detekce při 214 nm zůstaly zachovány.

#### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Základní mobilní fáze, stejně jako u klasické silikagelové kolony Supelcosil C18, byla složena z  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru 20/80 (v/v). pH fosforečnanového pufru se měnilo v rozmezí hodnot 2,5–7,0 (*obr. 5.2.2.1.1*). Retence analytů se s rostoucím pH vodné složky mobilní fáze snižovala. Odlišné chování, které s největší pravděpodobností ovlivnila přítomnost amidové skupiny zabudované ve struktuře tohoto peptidu, bylo pozorováno u Leu–enkefalinamidu v rozsahu pH 5–7. Na základě získaných výsledků byla jako nejvhodnější hodnota pH fosforečnanového pufru zvolena 4,5. Při tomto pH bylo rozlišení všech analytů dostačující ( $R_s$  3,5–6,5) a hodnoty symetrie byly taktéž vyhovující ( $A_s$  1,2–1,4).



#### Obr. 5.2.2.1.1

Závislost retenčního faktoru studovaných peptidů na změně pH fosforečnanového pufru na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

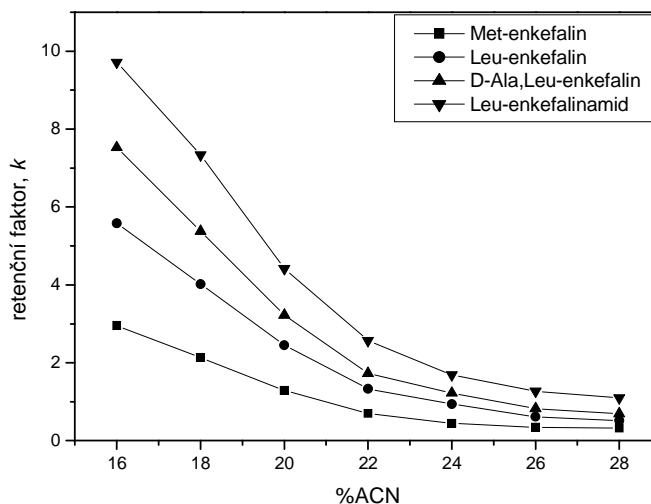
#### *Vliv koncentrace fosforečnanového pufru*

Pro určení nejvhodnější koncentrace fosforečnanového pufru pro separaci směsi pentapeptidů na koloně Discovery HS F5 byla použita mobilní fáze obsahující ACN–fosforečnanový pufr pH 4,5. Vliv koncentrace fosforečnanového pufru byl studován v rozmezí koncentrací  $(10-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pro všechny analyty ve směsi bylo zjištěno, že jejich retence se zvyšující koncentrací pufru snižuje, dochází tedy ke zkrácení doby analýzy. Z vyhodnocených dat retenčních faktorů ( $k$  0,3–1,2), rozlišení ( $R_s \geq 2,3$ ) a symetrie ( $A_s \leq 1,4$ ) píků byla pro další experimenty zvolena koncentrace fosforečnanového pufru  $80 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

#### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Na základě výsledků uvedených v kapitolách výše byly pro zjištění vlivu poměru organického modifikátoru a pufru na retenci studovaných analytů použity mobilní fáze obsahující  $\text{ACN}-80 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 v poměrech 28/72; 26/74; 24/76; 22/78; 20/80; 18/82; 16/84 (v/v).

Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi je znázorněna na *obr. 5.2.2.1.2*. Z výsledků v grafu je patrné, že malá změna obsahu ACN v mobilní fázi způsobila velké změny v retenčním chování sledovaných analytů. S klesajícím obsahem ACN v mobilní fázi se retence látek značně zvětšuje. Rozlišení analytů dosahovalo hodnot v rozmezí 1,3–7,6. Symetrie píků byla nejlepší ( $A_s$  1,2–1,9) při 22 % (v) ACN v mobilní fázi.

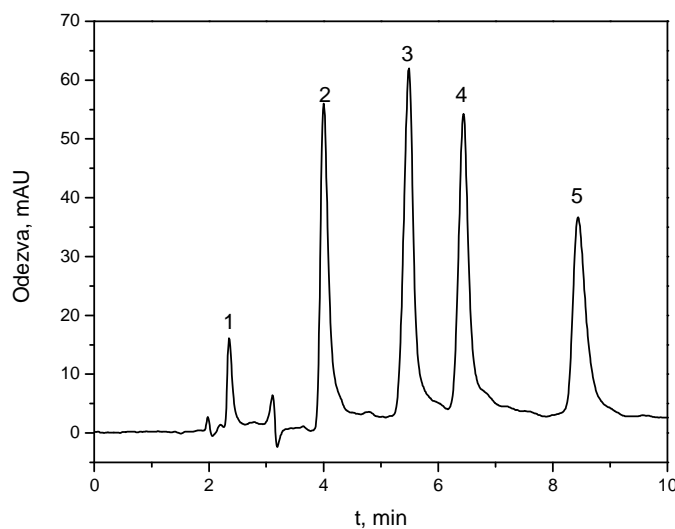


#### Obr. 5.2.2.1.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN–80·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5; teplota 25 °C.

Směs studovaných pentapeptidů byla nejlépe separována v mobilní fázi obsahující ACN–80·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5 22/78 (v/v). Separace pentapeptidů za těchto podmínek je uvedena na *obr. 5.2.2.1.3*. Došlo k úplnému rozdělení ( $R_s$  2,8–4,6) všech sledovaných analytů s dobrou symetrií ( $A_s$  1,1–1,7) během 10 min. Vypočítaná účinnost kolony za optimalizovaných podmínek se pohybovala okolo 26 000 tp/m v závislosti na analytu.





### Obr.5.2.2.1.3

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN– $80 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 4,5 22/78 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu$ l; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Met–enkefalin; (3) Leu–enkefalin; (4) D–Ala,Leu–enkefalin; (5) Leu–enkefalinamid.

## 5.2.2.2 Nonapeptidy

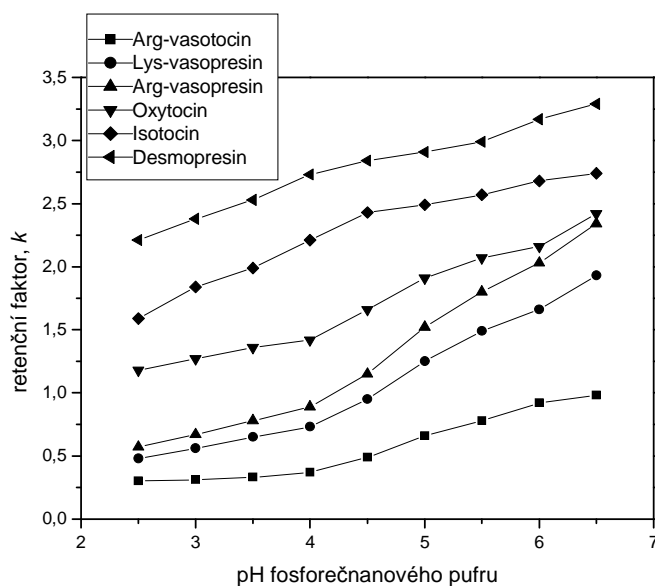
Při procesu optimalizace separace nonapeptidů na koloně Discovery HS F5 bylo postupováno stejně jako v případě separace směsi nonapeptidů na koloně Supelcosil C18. Byl tedy sledován vliv pH a koncentrace použitých pufrů a vliv poměru vodné a organické složky v mobilní fázi. Vodná složka mobilní fáze byla tvořena buď fosforečnanovým, nebo octanovým pufrům. Provedené experimenty a získané výsledky jsou popsány v následujících kapitolách.

### 5.2.2.2.1 Fosforečnanový pufr

#### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Při optimalizaci pH fosforečnanového pufru bylo postupováno podobně jako v předešlých případech. Byla použita mobilní fáze, která se osvědčila u kolony Supelcosil C18 a která obsahovala ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr 20/80 (v/v). Hodnota pH vodné složky se pohybovala v rozmezí 2,5–6,5. Retence analytů

s rostoucím pH vodné složky roste a tento trend je stejný pro všechny dělené nonapeptidy (*obr. 5.2.2.2.1.1*). Nejlepších hodnot retenčních faktorů, rozlišení a symetrie píků bylo dosaženo při vyšším pH, proto pro další experimenty byla vybrána mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,5 20/80 (v/v). Konkrétní hodnoty rozlišení a symetrie pro tuto mobilní fázi jsou minimálně 1,9 pro  $R_s$  a maximálně 1,6 pro  $A_s$ .



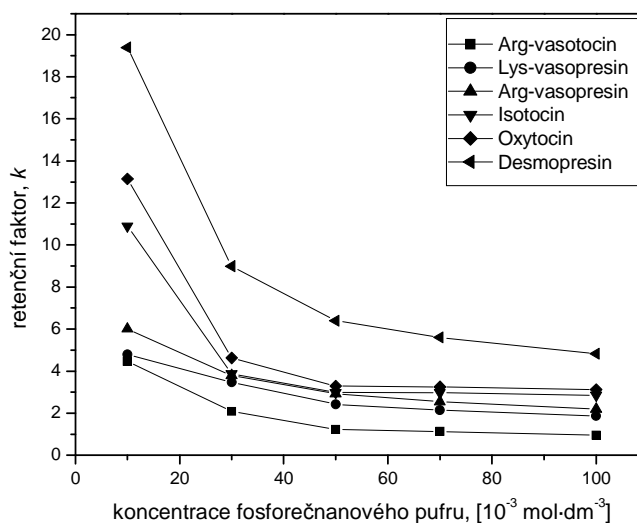
#### Obr. 5.2.2.2.1.1

Závislost retenčního faktoru studovaných peptidů na změně pH fosforečnanového pufru na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv koncentrace fosforečnanového pufru*

Dalším optimalizovaným parametrem byla koncentrace fosforečnanového pufru a její vliv na separaci vasopresinů byl sledován v rozmezí koncentrací  $(10-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Mobilní fáze obsahovala  $\text{ACN}$ -fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v). Retence analytů se značně snižovala v oblasti koncentrací  $(10-50) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (*obr. 5.2.2.2.1.2*) a při koncentraci  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  došlo ke koeluci Arg-vasopresinu a isotocinu. V oblasti koncentrací  $(70-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru byla retence analytů na koncentraci fosforečnanového pufru téměř nezávislá. Přesto byl tvar píků lepší a rozlišení dostačující při vyšších hodnotách koncentrace fosforečnanového pufru, proto byl pro další měření vybrán fosforečnanový pufr o koncentraci  $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Hodnoty rozlišení se pro tuto koncentraci

pohybovaly mezi hodnotami 1,8–10,5 a symetrie píků byla přibližně 1,2 pro všechny separované nonapeptidy.



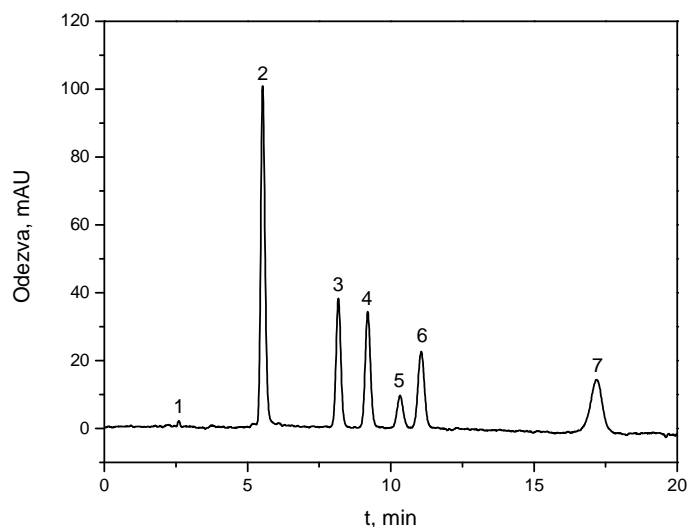
#### Obr. 5.2.2.2.1.2

Závislost retenčního faktoru na změně koncentrace fosforečnanového pufru na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN–fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Během optimalizace poměru organické a vodné složky v mobilní fázi pro separaci směsi nonapeptidů byla použita mobilní fáze ACN– $70\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 6,5 v poměrech 24/76; 22/78; 20/80; 18/82; 16/84 a 14/86 (v/v). Se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi se prodlužovala retence analytů, velmi výrazný nárůst retence byl zaznamenán u desmopresinu. Po vyhodnocení naměřených retenčních faktorů, hodnot rozlišení a symetrie jednotlivých píků byla jako nejlepší mobilní fáze pro separaci směsi šesti nonapeptidů zvolena mobilní fáze složená z ACN a  $70\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru pH 6,5 v poměru 20/80 (v/v).

Chromatogram naměřený za těchto podmínek je uveden na obr. 5.2.2.2.1.3. Hodnoty rozlišení pro analyty se pohybovaly v rozmezí 1,8–10,5, hodnoty symetrie 0,9–1,3 a účinnost kolony 37 000–47 000 tp/m v závislosti na analytu. Za optimalizovaných podmínek došlo k separaci všech 6 nonapeptidů do 18 min, což je v kratším čase než na koloně Supelcosil C18. Dokonce se podařilo oddělit kritický pár Arg– a Lys– vasopresin a později eluující analyty vykazují mnohem lepší symetrii než stejné analyty na koloně Supelcosil C18.



#### Obr. 5.2.2.2.1.3

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN– $70 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu$ l; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Arg–vasotocin; (3) Lys–vasopresin; (4) Arg–vasopresin; (5) isotocin; (6) oxytocin; (7) desmopresin.

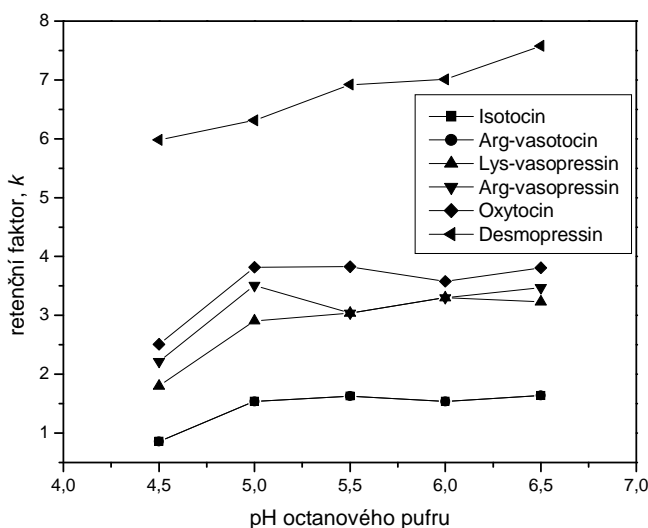
#### **5.2.2.2.2 Octanový pufr**

Při separaci směsi šesti nonapeptidů na koloně Discovery HS F5 došlo v mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr k úplnému rozdělení všech analytů do 18 min a symetrie píků ( $A_s$  1,0–1,3) byla velmi dobrá. Použití fosforečnanového pufru není obecně vhodné pro spojení s MS detekcí, proto byl jako vhodná alternativa dále vybrán octanový pufr. Na základě předchozích experimentálních zkoušek byla určena optimální vlnová délka detekce 230 nm. Při optimalizaci separace směsi nonapeptidů s použitím octanového pufru jako vodné složky mobilní fáze bylo postupováno stejně jako v případě fosforečnanového pufru, tzn. bylo sledováno retenční chování studovaných peptidů v závislosti na změně pH a koncentrace octanového pufru a poměru tohoto pufru a ACN.

#### *Vliv pH octanového pufru*

Při sledování vlivu pH na retenční chování studovaných analytů na koloně Discovery HS F5 byla použita mobilní fáze obsahující ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr 20/80 (v/v), která se osvědčila při optimalizaci separace na koloně Supelcosil C18,

a bylo proměřeno rozpětí hodnot pH od 4,5 do 6,5 (*obr. 5.2.2.2.2.1*). Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucím pH použitého pufru se i retence analytů zvyšuje, a to především v oblasti pH 4,5–5,0. Pouze v případě desmopresinu pokračuje nárůst retence i při vyšších hodnotách pH. Ani při vyšším pH se však nepodařilo oddělit isotocin a Arg–vasotocin, které koeluuji v celém studovaném rozsahu pH hodnot vodné složky mobilní fáze. Porovnáním retenčních faktorů, vyhodnocením rozlišení a symetrie pík bylo zvoleno vhodné pH octanového pufru, a to pH 6,5. Rozlišení analytů při tomto pH se pohybuje v rozmezí hodnot 1,2–7,4, zatímco hodnoty symetrie leží v rozmezí 1,9–2,1.



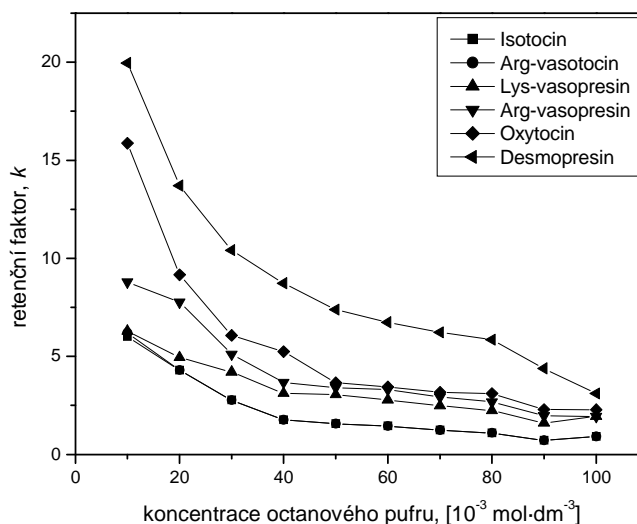
#### Obr.5.2.2.2.2.1

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně pH octanového pufru na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv koncentrace octanového pufru*

Vliv iontové síly mobilní fáze, tj. koncentrace octanového pufru na retenci studovaných analytů byl sledován v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-\text{octanový pufr pH } 6,5$  20/80 (v/v) v koncentračním rozmezí  $(10-100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (*obr. 5.2.2.2.2.2*). Z naměřených dat vyplývá, že s rostoucí koncentrací octanového pufru se retence látek snižuje. Největší pokles retence nastává v rozmezí koncentrací  $(10-40) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Při vyšší koncentraci je pokles retence pozvolnější. Isotocin a Arg–vasotocin se opět nepodařilo navzájem oddělit. Náznak dělení se objevil v  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanovém pufru ( $k$  isotocinu 6,0 a  $k$  Arg–vasotocinu 6,2), kdy ale zároveň došlo ke značnému

prodloužení retenčních časů, takže poslední analyt desmopresin eluoval až v 70 min. Proto vyhodnocením dat, tedy kompromisem mezi dobou analýzy, symetrií píků a rozlišením, získaných touto optimalizací byla zvolena jako nejvhodnější koncentrace octanového pufru  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $R_s$  1,8 – 6,6 a  $A_s$  0,8 – 2,3).



*Obr. 5.2.2.2.2.2*

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně koncentrace octanového pufru na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN–octanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

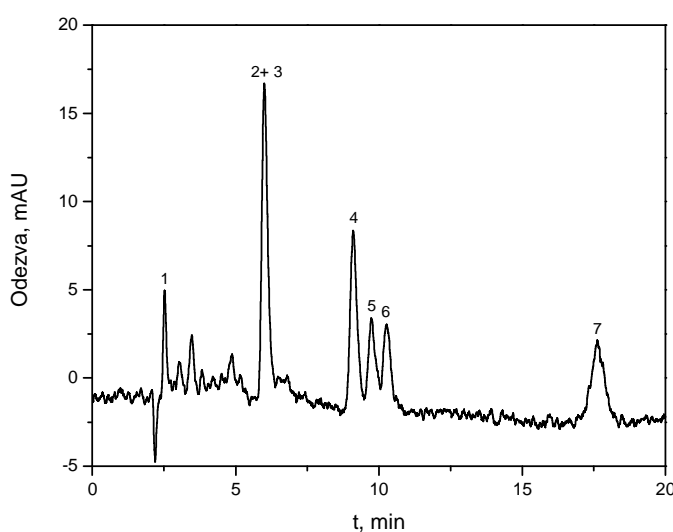
#### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Mobilní fáze obsahující ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 byla použita k určení vlivu obsahu ACN na retenční chování studovaných nonapeptidů, a to v následujících poměrech ACN–vodná složka: 22/78; 21/79; 20/80; 19/81 a 18/82 (v/v). Z naměřených dat vyplývá, že retence a rozlišení analytů se s klesajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi zvyšovaly, ale opět se nepodařilo oddělit od sebe isotocin a Arg–vasotocin. Při obsahu 21 % ACN v mobilní fázi došlo dokonce ke koeluci tří studovaných nonapeptidů, a to Lys–vasopresinu, Arg–vasopresinu a oxytocinu. S klesajícím obsahem ACN v mobilní fázi se zhoršila symetrie píků studovaných analytů.

Nejlépe se studované nonapeptidy dělily v mobilní fázi obsahující ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 21/79 (v/v). Hodnoty rozlišení a symetrie pro optimalizovanou mobilní fázi jsou 1,7–8,9 respektive 1,3–1,5. Účinnost kolony pro optimalizované podmínky se pohybovala v rozmezí 17 000–30 000 tp/m.

Reprezentativní chromatogram naměřený za optimalizovaných podmínek je uveden na obr. 5.2.2.2.3. Opět byla zaznamenána nestabilita základní linie stejně jako při použití octanového pufru u kolony Supelcosil C18. Byla pozorována i změna elučního pořadí oproti koloně Supelcosil C18. Na koloně Discovery HS F5 došlo k neúplnému rozdělení isotocinu a Arg–vasotocinu a také Lys–vasopresinu, Arg–vasopresinu a oxytocinu. Posledně eluující analyt, desmopresin, je zatížen šumem.

Kombinace kolony Discovery HS F5 a octanového pufru se neosvědčila, doba analýzy byla delší a nedošlo k rozdělení všech analytů. Výhodnější se ukazuje použití kolony Supelcosil C18 v kombinaci s octanovým pufrům pro separaci nonapeptidů.



Obr. 5.2.2.2.3

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery HS F5; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 21/79 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) Arg–vasotocin; (4) Lys–vasopresin; (5) Arg–vasopresin; (6) oxytocin; (7) desmopresin.

### 5.2.2.3 Shrnutí

Na silikagelové koloně Discovery HS F5 bylo podrobně studováno retenční chování dvou skupin peptidů v různých systémech mobilní fáze. Na této koloně byl sledován vliv typu pufru (fosforečnanového a octanového), jeho koncentrace a pH a poměru příslušného pufru a ACN na separaci směsi pentapeptidů a nonapeptidů. Byl sledován vliv jednotlivých optimalizačních parametrů na základní retenční

charakteristiky jako retenční faktor, rozlišení, symetrii píků a účinnost analýzy vyjádřené počtem teoretických pater na metr kolony.

Směs čtyř pentapeptidů byla na koloně Discovery HS F5 nejlépe separována v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-80 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 4,5 22/78 (v/v). V této mobilní fázi separace proběhla do 10 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 2,8$ ) a symetrií ( $A_s \leq 1,7$ ). Vypočítaná účinnost kolony pro fosforečnanový pufr se pohybovala okolo 26 000 teoretických pater na metr kolony v závislosti na analytu.

Optimalizace separace směsi šesti nonapeptidů byla prováděna v mobilní fázi obsahující ACN–fosforečnanový nebo ACN–octanový pufr. Na této koloně byly pro oba systémy mobilní fáze zaznamenány stejné trendy retenčního chování studovaných analytů v závislosti na pH a koncentraci použitého pufru jako vodné složky mobilní fáze a poměru ACN a vodné složky v mobilní fázi. S rostoucím pH pufru se retence i rozlišení analytů zvyšuje, naopak rostoucí iontová síla mobilní fáze a vyšší obsah ACN snižuje retenci analytů.

V mobilní fázi obsahující ACN a  $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,5 20/80 (v/v) došlo k rozdělení všech šesti vasopresinů do 18 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,8$ ) a symetrií píků ( $A_s \leq 0,9$ ). Ve druhé mobilní fázi složené z ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanového pufru o pH 6,5 21/79 (v/v) se nepodařilo rozdělit analyty isotocin a Arg–vasotocin a došlo ke změně elučního pořadí analytů v porovnání s elučním pořadím získaným v mobilní fázi obsahující fosforečnanový pufr. V mobilní fázi obsahující octanový pufr jako vodnou složku sice nedošlo k úplnému rozdělení všech analytů, ale jelikož je octanový pufr vhodný k použití ve spojení s MS detekcí, není nutné separovat látky až na základní linii. U separace v octanovém pufru se opět projevuje nestabilita základní linie dána velkou UV absorpcí tohoto pufru. Z těchto závěrů tedy vyplývá, že vhodnější pro naše měření je separace směsi šesti nonapeptidů v mobilní fázi obsahující ACN a  $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,5 20/80 (v/v). Vypočítaná účinnost kolony pro oba používané pufrы byla v rozmezí 17 000–47 000 teoretických pater na metr kolony v závislosti na analytu.



### 5.2.3 Závěr

Směs čtyř pentapeptidů byla separována na dvou odlišných typech silikagelových kolon, klasické C18 a modifikované pentafluorfenylpropylovou skupinou, za analogických podmínek. Stacionární fáze vykazují odlišnou selektivitu, proto došlo ke změně elučního pořadí studovaných analytů. Na koloně Discovery HS F5 bylo zapotřebí mobilní fáze s vyšší iontovou silou, pH vodné složky i poměr vodné a organické složky mobilní fáze byly téměř totožné. Separace analytů na obou kolonách bylo dosaženo do 10 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 2,8$ ) a dobrou symetrií ( $A_s$  max 1,7). Nicméně na koloně Supelcosil C18 se separace směsi analytů podařila v kratším čase (do 7 min) a píky analytů vykazovaly lepší symetrii ( $A_s$  max 1,3). Pro separaci směsi pentapeptidů byla nesporně výhodnější klasická C18 fáze, tedy kolona Supelcosil C18.

Porovnáním chromatografického chování směsi šesti nonapeptidů na kolonách Supelcosil C18 a Discovery HS F5 bylo zjištěno:

V mobilní fázi obsahující ACN–fosforečnanový pufr se podařilo rozdělit směs 6 nonapeptidů na obou kolonách, ale kolona Discovery HS F5 je výhodnější, protože na ní došlo k rozdělení páru Arg–vasopresin a Lys–vasopresin až na základní linii ( $R_s \sim 3,2$ ) a separace proběhla v čase do 20 min. Symetrie píků jednotlivých analytů na této koloně byla celkově lepší ( $A_s$  0,8–1,3) v porovnání s výsledky získanými na koloně Supelcosil C18.

Proti předchozímu zjištění se klasická C18 kolona, Supelcosil C18, jeví jako výhodnější pro separaci směsi studovaných nonapeptidů v mobilní fázi obsahující ACN–octanový pufr. Na koloně Supelcosil C18 došlo k rozdělení analytů do 10 min, avšak isotocin eluoval v mrtvém čase. Na koloně Discovery HS F5 bylo dosaženo doby analýzy okolo 20 min, ale nepodařilo se rozdělit pár isotocin a Arg–vasopresin. Také eluční pořadí analytů je na obou kolonách jiné v mobilní fázi obsahující octanový pufr.

Na koloně Supelcosil C18 byla dále testována mobilní fáze ACN–mravenčanový pufr, která byla použita jen pro tuto stacionární fázi, protože na koloně Discovery HS F5 tato mobilní fáze vykazovala velmi nízkou eluční sílu. V mobilní fázi obsahující mravenčanový pufr se podařilo rozdělit směs čtyř nonapeptidů do 15 min, ale pár Lys–vasopresin a Arg–vasopresin nebyl rozdělen až na základní linii.

Z dosažených výsledků vyplývá, že nejvhodnější pro separaci směsi nonapeptidů se jeví mobilní fáze obsahující ACN–fosforečnanový pufr a kolona Discovery HS F5. Ze získaných výsledků vyplývá, že nelze tak jednoduše přenést vypracovanou metodu z klasické C18 kolony na perfluorovanou stacionární fázi. Neplatí tedy tvrzení výrobce o dobré přenositelnosti metody, ale je nutné optimalizovat složení mobilní fáze.

### 5.3 Zirkoniová reverzní stacionární fáze

Zirkoniové stacionární fáze modifikované polybutadienem poskytují separace velmi podobné silikagelovým kolonám s chemicky navázanou fází C18. Přínos zirkoniových kolon spočívá především v jejich vynikající chemické stabilitě, lze je použít v širokém rozmezí pH, a jejich teplotní stabilitě. Separací mechanismus je v porovnání se silikagelovými chemicky vázanými fázemi zcela odlišný (viz. *Kapitola 3.3*). Základní vlastnosti kolony Discovery Zr PBD jsou uvedeny v *Tabulce 5.3.1*.

#### Tabulka 5.3.1

Vlastnosti zirkoniové stacionární fáze s navázaným polybutadienem, Discovery Zr PBD.

znak	ne „endcapped“
obsah uhlíku	2,0 %
délka × I.D.	25 cm × 4,6 mm
pokrytí	n/a
matrice	oxid zirkoničitý, kulovité částice
aktivní skupina	polybutadien
velikost částic	5 μm
velikost pórů	300 Å
specifický povrch	30 m <sup>2</sup> /g
pH rozmezí	1–13
teplotní limit	150 °C

Kolona byla použita pro optimalizaci separací směsi pentapeptidů a nonapeptidů v mobilních fázích obsahujících ACN nebo MetOH jako organickou složku a jako vodnou složku fosforečnanový nebo octanový pufr. Tyto typy pufrů jsou doporučeny výrobcem kolon jako relativně silné Lewisovské báze, které vykazují vysokou eluční sílu na zirkoniových stacionárních fázích, tedy i na koloně Discovery Zr PBD.

#### 5.3.1 Pentapeptidy

Na koloně Discovery Zr PBD bylo studováno retenční chování čtyř pentapeptidů (Met–enkefalin, Leu–enkefalin, Leu–enkefalinamid, D–Ala,Leu–enkefalin). Sledován byl vliv typu organického modifikátoru, pH a koncentrace vybraného pufru a vliv poměru organického modifikátoru a pufru na retenci studovaných analytů jako při

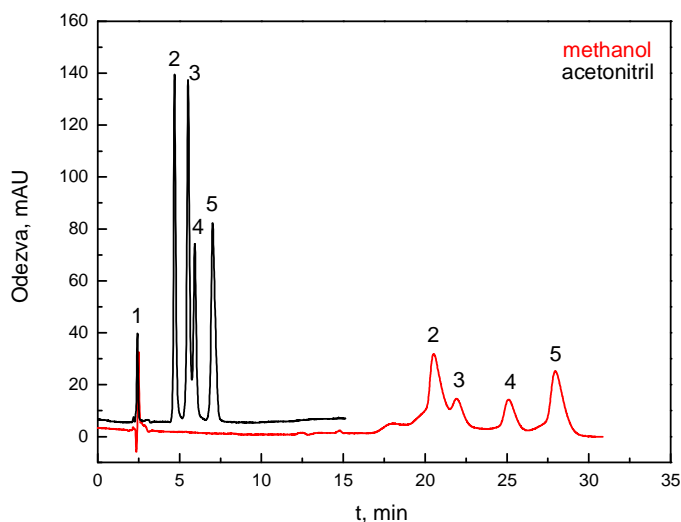
experimentech se stacionárními fázemi na bázi silikagelu. Teplota jako další optimalizovaný parametr mohla být zařazena u zirkoniových kolon, neboť tyto kolony vykazují velkou teplotní stabilitu v porovnání se silikagelovými stacionárními fázemi a mohou být tedy použity pro separace za vyšších teplot.

#### *Typ organického modifikátoru*

Zirkoniové kolony jsou na trhu relativní novinkou a v odborné literatuře nebyl nalezen žádný odkaz týkající se separace peptidů na tomto typu stacionárních fází, a tudíž ani vlivu druhu organického modifikátoru na retenční chování peptidů. Proto byl jako první zkoušen právě vliv organického modifikátoru, acetonitrilu a methanolu, na retenci pentapeptidů. U silikagelových kolon je pro separaci peptidů vhodnější ACN, protože vykazuje vyšší eluční sílu a účinnost. Na koloně Discovery Zr PBD byly pozorovány značné rozdíly mezi oběma studovanými organickými modifikátory. V mobilní fázi obsahující MetOH došlo ke značnému prodloužení retenčních časů (~ 30 min) a píky byly nesymetrické, jak je vidět na *obr. 5.3.1.1*. ACN nabízí nízkou viskozitu, vysokou UV transmitanci a hlavně vysokou separační účinnost (~ 30 000 tp/m) v kombinaci se zirkoniovou stacionární fází Discovery Zr PBD. Separační účinnost byla vypočítaná na základě výsledků separace na *obr. 5.3.1.1*. Na základě naměřených experimentů byl ACN vybrán jako organický modifikátor pro další měření.

#### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Pro následné experimenty byla vybrána mobilní fáze, která se skládala z ACN– $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru 50/50 (v/v). Počáteční koncentrace pufru a poměr ACN a pufru byly zvoleny na základě doporučení výrobce používaných zirkoniových kolon (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Efekt pH fosforečnanového pufru byl zkoušen v rozmezí pH 2,0–3,5. Retence studovaných látek velmi výrazně rostla s rostoucím pH fosforečnanového pufru, proto vyšší hodnoty pH nebyly studovány. Lepší symetrie píků byla pozorována při nízkých hodnotách pH. Na základě naměřených dat bylo pro další experimenty vybráno pH fosforečnanového pufru 2,0. Hodnota rozlišení pro sledované analyty se pohybovala v rozmezí 0,7–5,4 a symetrie píků byla maximálně 1,2.

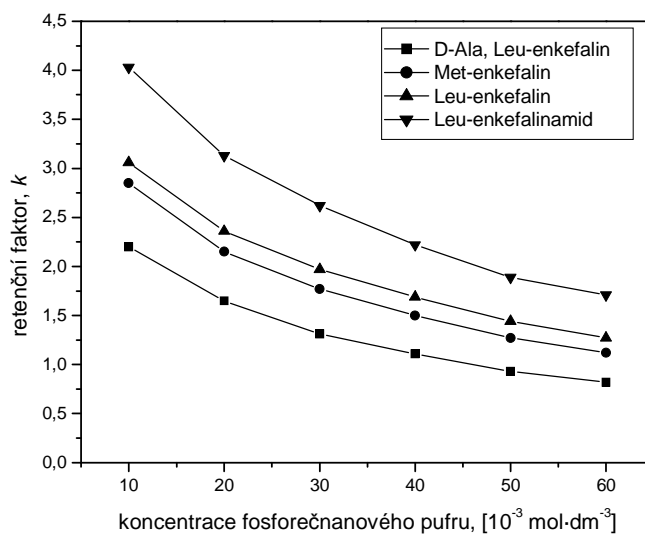


### Obr. 5.3.1.1

Vliv organického modifikátoru na retenční chování studovaných analytů. Mobilní fáze obsahovala MetOH / ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 2,0 50/50 (v/v); teplota 25 °C; průtok 1 ml/min; dávkovaný objem 10  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 214 nm. Identifikace píků : (1) uracil, (2) D–Ala,Leu–enkefalin, (3) Met–enkefalin, (4) Leu–enkefalin, (5) Leu–enkefalinamid

### *Vliv koncentrace fosforečnanového pufru*

V dalším kroku byl sledován vliv koncentrace fosforečnanového pufru na retenci studovaných analytů. Mobilní fáze obsahovala ACN–fosforečnanový pufr pH 2,0 50/50 (v/v) v koncentračním rozmezí  $(10\text{--}60) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . S rostoucí koncentrací fosforečnanového pufru docházelo ke zkracování retenčních časů (*obr. 5.3.1.2*) a zlepšení symetrie píků. Rozlišení analytů se naopak mírně zhoršovalo s rostoucí koncentrací pufru v mobilní fázi, proto vyšší koncentrace pufru než  $60 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  nebyly zkoušeny. Pro další experimenty byla používána koncentrace pufru  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Hodnoty rozlišení a symetrie se pohybovaly v rozmezí 1,3–3,0 respektive 1,3–1,6.

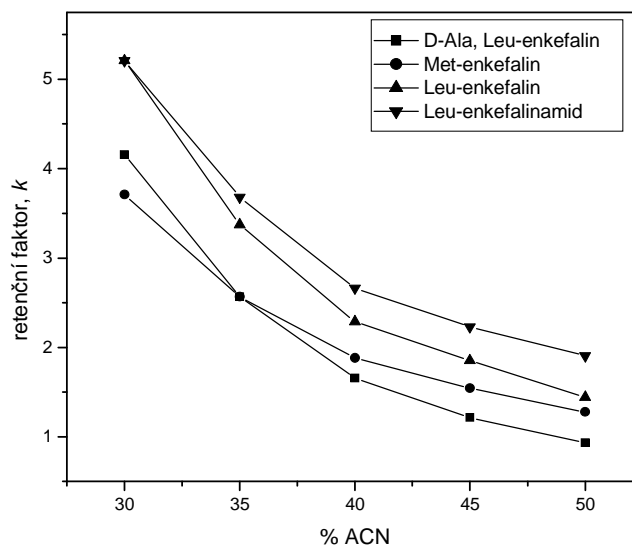


### Obr. 5.3.1.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně koncentrace fosforečnanového pufru na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN–fosforečnanový pufr pH 2,0 50/50 (v/v); teplota 25 °C.

### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Z předchozích optimalizačních kroků vyplývá, že pro sledování vlivu složení mobilní fáze, tedy poměru ACN a pufru v mobilní fázi, je nejvhodnější mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0. Byly proměřovány poměry ACN–pufr 50/50, 45/55, 40/60, 35/65 a 30/70 (v/v). Obsah ACN v mobilní fázi výrazně ovlivňuje její eluční sílu i na zirkoniové stacionární fázi modifikované polybutadienem. Z naměřených dat vyplývá, že se snižujícím se obsahem organické složky v mobilní fázi se retence látek zvyšuje, a dokonce dochází ke změně elučního pořadí studovaných analytů (obr. 5.3.1.3) oproti silikagelovým kolonám. Při obsahu 35 % (v) ACN v mobilní fázi došlo k záměně D–Ala, Leu–enkefalinu a Met–enkefalinu, dalším snížení ACN v mobilní fázi se dá předpokládat záměna elučního pořadí Leu–enkefalinu a Leu–enkefalinamidu. Symetrie píků jednotlivých analytů byla téměř nezávislá na obsahu ACN a pufru v mobilní fázi. Pro další optimalizační krok byla vybrána mobilní fáze obsahující ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v). Rozlišení dosahovalo hodnot minimálně 2,0–2,4 a symetrie píků byla maximálně 1,8.

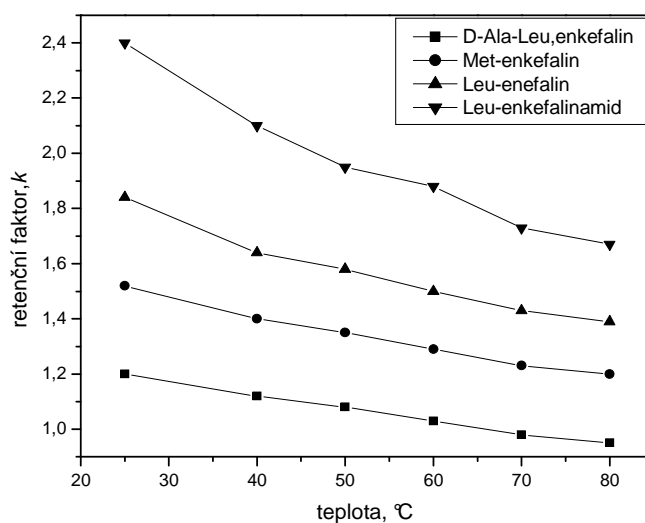


*Obr. 5.3.1.3*

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0; teplota 25 °C.

#### *Vliv separační teploty*

Zirkoniové stacionární fáze jsou díky svým vlastnostem vhodné pro práci za vyšších teplot. Obecně, zvýšená teplota urychluje převod hmoty během separačního děje, a tedy pozitivně ovlivňuje separaci. Vliv teploty na retenční chování pentapeptidů na koloně Discovery Zr PBD byl studován v rozmezí teplot 25–80 °C. Získané teplotní závislosti jsou znázorněny na (obr. 5.3.1.4). Zvýšením teploty došlo ke snížení retence a rozlišení všech studovaných enkefalinů. S rostoucí teplotou se ovšem zlepšovala symetrie píků.



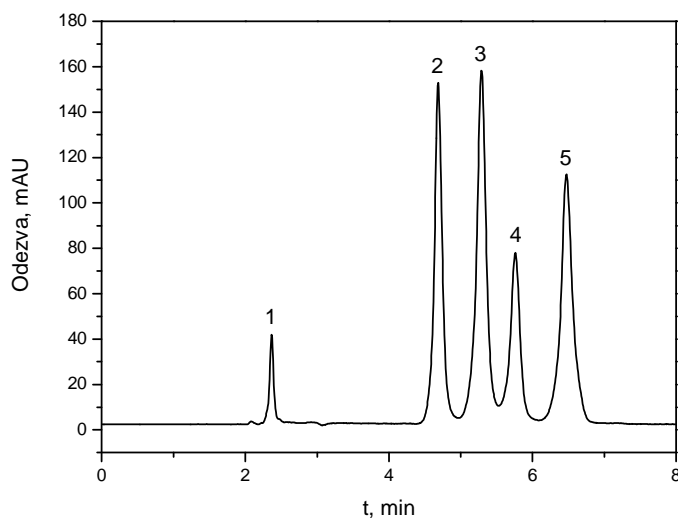
#### Obr. 5.3.1.4

Závislost retenčního faktoru na změně separační teploty na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN–50·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v).

Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že nejvhodnější podmínky pro separaci směsi pentapeptidů na zirkoniové koloně jsou mobilní fáze ACN–50·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v) a teplota 70 °C. Hodnota rozlišení pro tyto podmínky je v rozmezí hodnot 1,9–2,9 a symetrie píků dosahuje maximálně hodnoty 1,4. Počet pater na metr kolony dosahoval hodnot kolem 20 000. Příslušný chromatogram je zobrazen na obr. 5.3.1.5. Za optimalizovaných podmínek došlo k rozdělení všech studovaných enkefalinů téměř na základní linii do 7 min. Oproti silikagelové koloně Supelcosil C18 se změnilo eluční pořadí D–Ala, Leu–enkefalinu, který na koloně Supelcosil C18 eluuje jako druhý. Separace na obou kolonách je srovnatelná, jen u kolony Supelcosil C18 se symetrie píků analytů zdá lepší. Výhodou zirkoniové kolony Discovery Zr PBD je použití silně kyselé mobilní fáze (pH 2,0) bez nebezpečí poškození kolony, jak je tomu u silikagelových kolon.

Ve srovnání zirkoniové kolony Discovery Zr PBD se silikagelovou kolonou Discovery HS F5 se separace směsi pentapeptidů jeví podobně, eluční pořadí, symetrie i doba analýzy je podobná. Přesto je nutno dodat, že pro takový výsledek je třeba v systému s kolonou Discovery Zr PBD volit poněkud extrémní podmínky (pH, teplota).





*Obr. 5.3.1.5*

Optimalizovaná separace směsi enkefalinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v); teplota 70 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu$ l; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) Met–enkefalin; (3) Leu–enkefalin; (4) D–Ala,Leu–enkefalin; (5) Leu–enkefalinamid.

### 5.3.2 Nonapeptidy

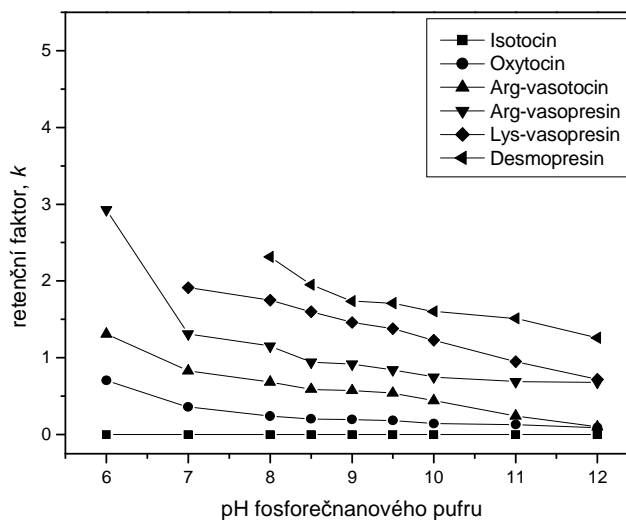
Druhou skupinou peptidů, u kterých byl na koloně Discovery Zr PBD studován vliv pH, koncentrace vybraného pufru, vliv poměru tohoto pufru a organického modifikátoru v mobilní fázi a vliv teploty na retenční chování, byly nonapeptidy, jak už bylo zmíněno, jejich struktura je tvořena cyklickou částí uzavřenou disulfidickým můstkem a zbývajícími 3 aminokyselinami, které tvoří volný a pro interakce dobře přístupný koncový řetězec. Jako parametry popisující retenční chování studovaných látek byly, stejně jako v předchozích experimentálních částech této disertační práce, zvoleny chromatografické veličiny retenční faktory, symetrie píků, rozlišení a počet teoretických pater. Směs nonapeptidů obsahovala tyto peptidy: Arg–vasotocin, Arg–vasopresin, Lys–vasopresin, oxytocin, isotocin a desmopresin. Mobilní fáze byla složena z ACN jako organického modifikátoru a vodné složky, která byla zastoupena fosforečnanovým nebo octanovým pufrům.

### 5.3.2.1 Fosforečnanový pufr

Obdobně jako při optimalizaci separace pentapeptidů na zirkoniové koloně Discovery Zr PBD a nonapeptidů na koloně Supelcosil C18, respektive Discovery HS F5, byl pro charakterizaci retenčního chování nonapeptidů vybrán fosforečnanový pufr a byl sledován vliv pH pufru, jeho koncentrace, poměru tohoto pufru a acetonitrilu v mobilní fázi a separační teploty na retenční chování studovaných analytů.

#### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Pro optimalizaci pH fosforečnanového pufru byla použita mobilní fáze obsahující  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v), tedy stejná mobilní fáze jako při optimalizaci separace směsi nonapeptidů na kolonách na bázi silikagelu. Jelikož zirkoniová fáze umožňuje práci i při vyšších hodnotách pH a protože z předchozích experimentů vyplývá, že vasopresiny se lépe separují při vyšších hodnotách pH, byl zvolen interval v bazické oblasti, tedy pH od 6,0 do 12,0. Závislost retenčních faktorů separovaných nonapeptidů na pH vodné složky mobilní fáze je ukázána na *obr. 5.3.2.1.1*. Ze získaných dat je patrné, že s klesající hodnotou pH se retence látek zvyšuje. Největší vliv na retenci byl zaznamenán v intervalu pH 6–8 a to u Lys–vasopresinu a desmopresinu. Hodnota retenčního faktoru pro tyto dva analyty nebyla při pH 6 a 7 zaznamenána, protože došlo ke značnému prodloužení jejich retenčních časů (nad 90 min). Isotocin eluoval při všech sledovaných pH hodnotách v mrtvém čase a nepodařilo se ho oddělit od uracilu ( $t_m$ ). Symetrie píků je na změně pH fosforečnanového pufru nezávislá ( $A_s \sim 1,6$ ). Pro další optimalizační kroky bylo vybráno pH 10,0 vodné složky mobilní fáze. Rozlišení analytů v této mobilní fázi se pohybovalo v rozmezí 1,3–3,7.



### Obr. 5.3.2.1.1

Závislost retenčního faktoru na pH fosforečnanového pufru na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  fosforečnanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

### *Vliv koncentrace fosforečnanového pufru*

Změny retenčního chování vasopresinů, respektive závislost retenčního faktoru, rozlišení a symetrie píků na změně koncentrace fosforečnanového pufru byla studována v mobilní fázi obsahující ACN–fosforečnanový pufr pH 10,0 20/80 (v/v) o koncentraci  $(10\text{--}100) \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$ . Retence látek se snižovala s rostoucí koncentrací fosforečnanového pufru. Největší pokles nastal u Arg–vasotocinu, Arg–vasopresinu, Lys–vasopresinu a desmopresinu, a to v rozmezí koncentrací  $(10\text{--}60) \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$ . Retence isotocinu a oxytocinu nebyla, respektive byla jen velmi málo, ovlivněna rostoucí iontovou silou mobilní fáze. S rostoucí koncentrací fosforečnanového pufru se snižuje rozlišení mezi jednotlivými analyty, ovšem symetrie píků se zlepšuje. Pro další optimalizační kroky byla vybrána mobilní fáze ACN –  $70 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 10,0. Hodnoty rozlišení v této mobilní fázi se pohybovaly v intervalu 2,3–3,1 a symetrie dosahovala vyhovujících hodnot 1,4–1,8.

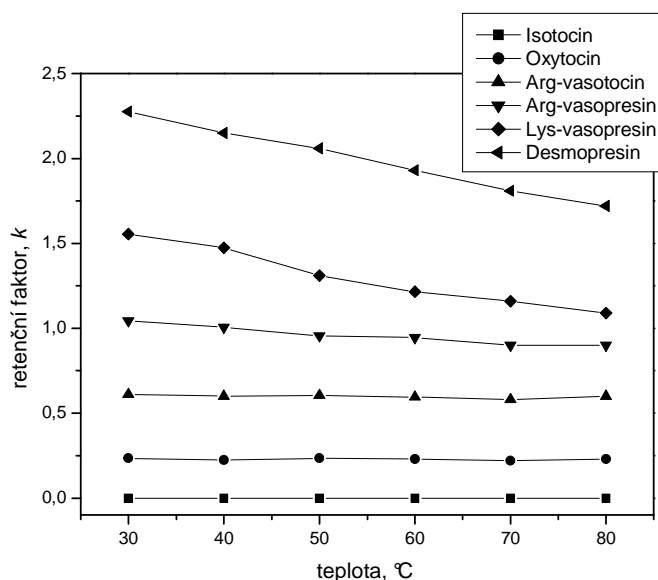
### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Pro experimenty zjišťující změnu retenčního chování nonapeptidů v závislosti na obsahu ACN v mobilní fázi byla použita mobilní fáze obsahující ACN– $70 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 v poměrech 24/76, 22/78, 20/80, 18/82, 16/84, 14/86 a

12/88 (v/v). Retence analytů s klesajícím obsahem organické složky v mobilní fázi vzrůstala. Největší vzrůst byl pozorován u desmopresinu v mobilní fázi obsahující 12–18 % (v) ACN. Isotocin eluoval společně s uracilem v mrtvém čase. Rozlišení analytů se s klesajícím obsahem ACN v mobilní fázi zlepšovalo, ale na druhou stranu došlo ke značnému prodloužení retenčních časů. Vyhodnocením získaných výsledků byl vybrán poměr 18/82 (v/v) ACN– $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru pH 10,0 pro další optimalizaci ( $R_s$  2,3 – 2,9 a  $A_s$  1,4 – 1,7).

### Vliv separační teploty

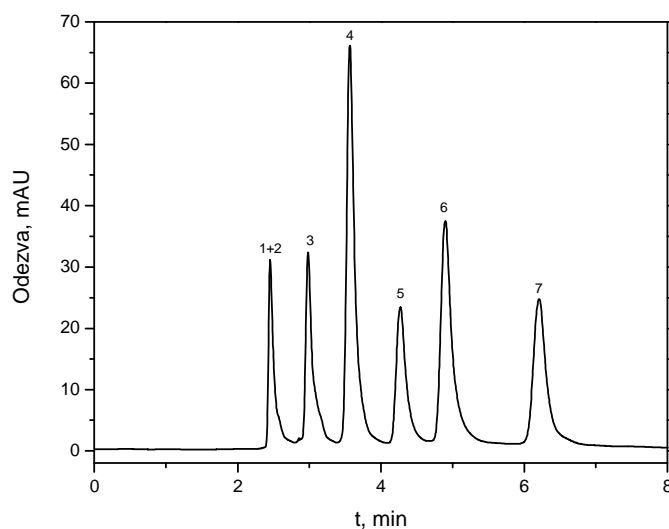
Mobilní fáze obsahující ACN– $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v) byla použita pro proměření teplotních závislostí retenčního faktoru, rozlišení a symetrie píků pro jednotlivé studované vasopresiny. Rozsah proměřovaných teplot byl od 30–80 °C. Ze získaných dat, které jsou prezentovány na obr. 5.3.2.1.2, je patrné, že retence látek nepatrně klesá se zvyšující se teplotou, největší pokles retence byl pozorován u Lys–vasopresinu a desmopresinu. Retence isotocinu, oxytocinu a Arg–vasotocinu byla ovšem na separační teplotě nezávislá. Nedochozí totiž ke snížení jejich retenčních časů. Symetrie píků se podle očekávání s rostoucí teplotou zlepšila.



### Obr. 5.3.2.1.2

Závislost retenčního faktoru na teplotě na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v).

Na základě výsledků získaných při optimalizačních krocích se jako nejvhodnější podmínky pro separaci směsi nonapeptidů jeví mobilní fáze obsahující ACN– $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v) a teplota 50 °C. Příslušný chromatogram je uveden na *obr. 5.3.2.1.3*. Parametry této separace jsou: rozlišení 2,9–4,3, symetrie píků 1,2–1,9 a počet pater na metr 24 000–33 000. Separace směsi nonapeptidů proběhla do 7 min s dostatečným rozlišením a dobrou symetrií píků, což je v porovnání se silikagelovými kolonami výrazně lepší výsledek. Za optimalizovaných podmínek došlo na této koloně i k oddělení Arg–vasopresinu a Lys–vasopresinu až na základní linii. Tyto dva nonapeptidy mají velmi podobnou strukturu (liší se jen v 1 AMK), a proto jsou často neúplně rozděleny viz *Kapitola 5.2.1.2.1* nebo *Kapitola 5.2.2.2.2*. Bohužel se nepodařilo zvýšit retenci isotocinu, který za všech testovaných podmínek eluoval v mrtvém čase.



*Obr. 5.3.2.1.3*

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 10,0 18/82 (v/v); teplota 50 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; detekce 214 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) oxytocin; (4) Arg–vasotocin; (5) Arg–vasopresin; (6) Lys–vasopresin; (7) desmopresin.

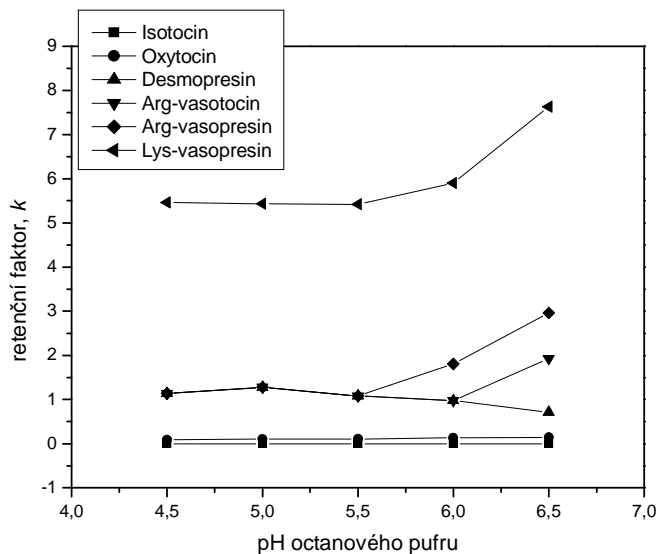
### 5.3.2.2 Octanový pufr

Míra Lewisovských interakcí mezi analytem a modifikovanou zirkoniovou kolonou záleží na typu použitého pufru. Kromě fosforečnanového pufru, jehož

optimalizace byla popsána v předešlých kapitolách, byl studován i octanový pufr. Tento pufr vykazuje nižší eluční sílu na zirkoniových materiálech než fosforečnanový pufr, ale jak už bylo několikrát zmíněno, je výhodnější z hlediska spojení s MS detekcí. Tento pufr byl použit i při optimalizaci separace nonapeptidů na silikagelových kolonách. Aby bylo možné porovnat chromatografické chování studovaných analytů na různých stacionárních fázích, byl octanový pufr použit i na koloně Discovery Zr PBD.

#### *Vliv pH octanového pufru*

Podmínky sledování vlivu tohoto parametru na retenci studovaných látek byly nastaveny shodně s podmínkami sledování vlivu octanového pufru na ostatních studovaných kolonách. Mobilní fáze tedy obsahovala  $\text{ACN}-50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr v poměru 20/80 (v/v). Bylo testováno rozmezí pH od 4,5 do 6,5 (*obr. 5.3.2.2.1*). Retence všech nonapeptidů v oblasti pH 4,5–5,5 byla na změně pH téměř nezávislá, isotocin a oxytocin vykazovaly velice podobnou hodnotu retenčního faktoru a desmopresin, Arg–vasotocin a Arg–vasopresin v této oblasti hodnot pH koeluovaly. V oblasti pH 5,5–6,5 se retence značně zvýšila u Arg–vasotocinu a Arg–vasopresinu, a dokonce se podařilo oddělit desmopresin, Arg–vasotocin a Arg–vasopresin. S ohledem na to, že pouze při pH octanového pufru 6,5 došlo k oddělení všech analytů, bylo toto pH použito pro další experimenty. Při této hodnotě pH, tedy 6,5, rozlišení studovaných analytů bylo dostatečné ( $R_s$  min 2,2). Totéž platí i pro symetrii píků, kdy se hodnoty pohybovaly v intervalu 1,0–2,0. Pro další měření byla použita mobilní fáze ACN–octanový pufr o pH 6,5, 20/80 (v/v).



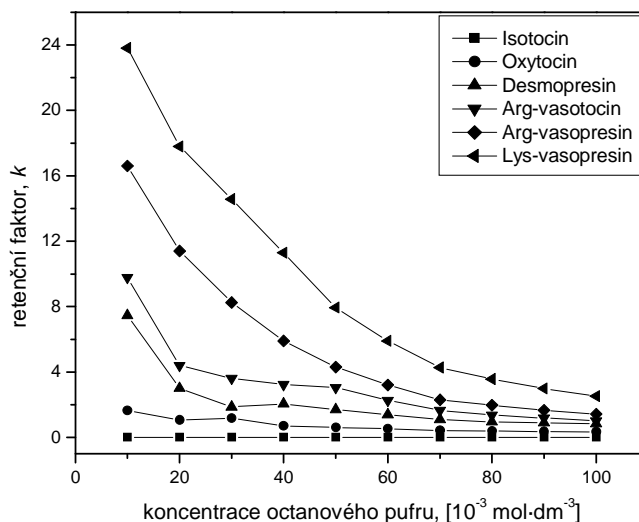
#### Obr. 5.3.2.2.1

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně pH octanového pufru na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN–50·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv koncentrace octanového pufru*

Pro sledování vlivu iontové síly mobilní fáze na separaci směsi nonapeptidů byla použita mobilní fáze obsahující ACN–octanový pufr pH 6,5 v poměru 20/80 (v/v). Koncentrace octanového pufru se pohybovala v rozmezí koncentrací (10–100)·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. S rostoucí koncentrací octanového pufru se retence analytů snižuje (obr. 5.3.2.2.2). Nejvýraznější pokles retence byl zaznamenán v oblasti koncentrací (10–60)·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Retenční chování isotocinu a oxytocinu nebylo výrazněji ovlivněno rostoucí iontovou silou mobilní fáze a retenční faktory pro isotocin a oxytocin si byly velmi blízké, jejich hodnoty se pohybovaly v intervalu od 0,3 do 1,6. Největší vliv koncentrace pufru na retenci byl pozorován u Arg– a Lys–vasopresinu. Stejně jako retence, také rozlišení se s klesající koncentrací zvyšuje, zatímco symetrie píků studovaných analytů nebyla na změně koncentrace pufru v mobilní fázi příliš závislá. Z vyhodnocených dat je také patrné, že se bohužel nepodařilo žádnou změnou koncentrace octanového pufru oddělit isotocin od uracilu, tedy isotocin eluoval v mrtvém čase.

Pro další experimenty byla používána mobilní fáze ACN–60·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr o pH 6,5. Hodnoty rozlišení a symetrie píků v této mobilní fázi byly uspokojivé, dosahovaly hodnot min 1,8 pro rozlišení a max 2,0 pro symetrii píků.



#### Obr. 5.3.2.2.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně koncentrace octanového pufru na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN–octanový pufr pH 6,5 20/80 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv poměru organické a vodné složky*

V další fázi optimalizace byl měněn poměr ACN jako organického modifikátoru a octanového pufru jako vodné složky mobilní fáze v rozmezí 30/70, 28/72, 26/74, 24/76, 20/80, 18/82 a 16/84 (v/v). Byla používána mobilní fáze ACN– $60 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  octanový pufr o pH 6,5. Se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi byl pozorován stejný trend jako u testovaných silikagelových kolon, tedy pozvolný nárůst retenčního faktoru. Nejvýraznější prodloužení retence bylo pozorováno u Lys–vasopresinu, a naopak žádné prodloužení retence u isotocinu. Rozlišení a symetrie píků dosahovaly lepších hodnot při nižším obsahu ACN v mobilní fázi ( $R_s$  min 1,5 a  $A_s$  max 2,1). Pro další experimenty byla vybrána mobilní fáze ACN– $60 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  octanový pufr o pH 6,5 18/82 (v/v).

#### *Vliv separační teploty*

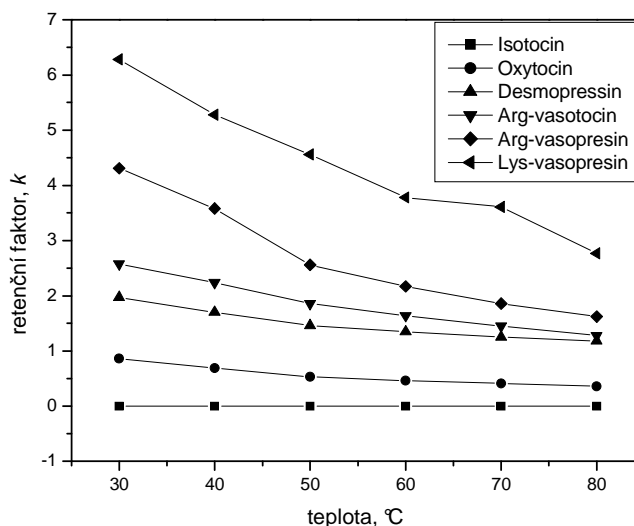
Vliv teploty na separaci směsi nonapeptidů byl studován v mobilní fázi ACN– $60 \cdot 10^{-3}$  mol·dm $^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 v poměru 18/82 (v/v). Kolona byla termostatována na 30, 40, 50, 60, 70 a 80 °C. Výrazný pokles retence sledovaných analytů s rostoucí teplotou byl pozorován jen u Lys– a Arg–vasopresinu, u ostatních



analytů byl pokles retence pozvolný (*obr. 5.3.2.2.3*). Symetrie píků se s rostoucí teplotou zlepšovala, rozlišení studovaných analytů se s rostoucí teplotou zhoršovalo ( $R_s$  min 0,6).

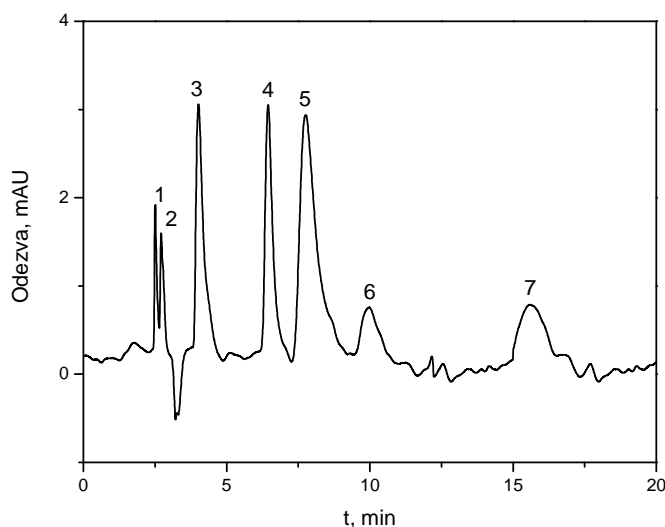
Nejllepší separaci směsi nonapeptidů poskytovala mobilní fáze obsahující ACN– $60 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 6,5 v poměru 18/82 (v/v) při teplotě 40 °C. Příslušný chromatogram je uveden na *obr. 5.3.2.2.4*. Sledované parametry se pohybovaly v rozmezí:  $R_s$  1,7–5,0,  $A_s$  1,1–2,9 a  $t_p/m$  5000–22 000.

V optimalizované mobilní fázi byla pozorována větší nestabilita základní linie, která souvisí s vyšší absorpcí octanového pufru v UV oblasti. Oproti silikagelovým kolonám došlo ke změně elučního pořadí desmopresinu, který na koloně Discovery Zr PBD eluoval jako třetí v pořadí, kdežto u studovaných silikagelových kolon eluoval jako předposlední (Supelcosil C18), respektive poslední (Discovery HS F5). Délka analýzy směsi 6 nonapeptidů na koloně Discovery Zr PBD je srovnatelná se separací na koloně Discovery HS F5, jen symetrie píků je mnohem horší oproti silikagelové koloně. Výhodou separace na koloně Discovery Zr PBD je, že došlo k rozdělení všech 6 nonapeptidů, a dokonce isotocin byl oddělen od uracilu.



### Obr. 5.3.2.2.3

Závislost retenčního faktoru vasopresinů na separační teplotě na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $60 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 6,5 18/82 (v/v).



#### Obr. 5.3.2.2.4

Optimalizovaná separace směsi vasopresinů na koloně Discovery Zr PBD; mobilní fáze ACN– $60 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 6,5 18/82 (v/v); teplota 40 °C; průtok 1 ml/min; dávkování 10  $\mu\text{l}$ ; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) oxytocin; (4) desmopresin; (5) Arg–vasotocin; (6) Arg–vasopresin; (7) Lys–vasopresin.

### 5.3.3 Závěr

Při optimalizaci separace směsi čtyř pentapeptidů na koloně Discovery Zr PBD byl na základě provedených experimentů vybrán jako organický modifikátor ACN, který oproti MetOH má nižší viskozitu, ale především vysokou separační účinnost pro vybrané analyty. Dalšími kroky bylo optimalizováno pH a koncentrace pufru a poměr ACN a fosforečnanového pufru v mobilní fázi. Byl sledován i vliv separační teploty na retenci analytů, protože zirkoniové kolony umožňují díky své stabilitě práci při vyšších teplotách v porovnání se silikagelovými materiály. Na základě získaných výsledků byla jako nejvhodnější mobilní fáze zvolena směs ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v). V této mobilní fázi se podařilo směs čtyř pentapeptidů rozdělit s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,9$ ) a dobrou symetrií ( $A_s 0,7\text{--}1,4$ ) do 8 minut při teplotě 70 °C. Účinnost kolony pro optimalizovanou mobilní fázi ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 2,0 45/55 (v/v) dosahovala hodnot kolem 20 000 teoretických pater na metr kolony v závislosti na sledovaném analytu.

Retenční chování směsi šesti nonapeptidů bylo studováno v mobilní fázi obsahující ACN–fosforečnanový nebo octanový pufr. Opět byl sledován vliv pH a koncentrace pufru, poměr ACN–pufr v mobilní fázi a také vliv separační teploty na základní retenční charakteristiky analyzovaných nonapeptidů. Se snižujícím se pH fosforečnanového pufru došlo k prodloužení retence, zlepšení rozlišení jednotlivých analytů, ale naopak ke zhoršení symetrie píků. V mobilní fázi obsahující ACN–octanový pufr došlo snížením pH ve sledovaném intervalu hodnot ke zkrácení retence, ale zároveň ke koeluci desmopresinu, Arg–vasotocinu a Arg–vasopresinu. Se zvyšujícím se koncentrací fosforečnanového i octanového pufru došlo ke snížení retence analytů, tedy ke zkrácení doby analýzy. Rostoucí koncentrace pufrů měla vliv na zlepšení symetrie píků. S nižším procentem ACN v obou mobilních fázích (s fosforečnanovým i octanovým pufrům) docházelo k prodlužování celkové doby analýzy vlivem snižování eluční síly mobilní fáze. Tím se zlepšilo rozlišení píků a zároveň také jejich symetrie. Rostoucí separační teplota vedla ke zkrácení retence a ke zlepšení symetrie píků, ale k mírnému zhoršení rozlišení.

Z naměřených dat vyplývá, že se směs šesti nonapeptidů na koloně Discovery Zr PBD lépe separuje při vyšších hodnotách pH, koncentrace a obsahu pufru v mobilní fázi, a také při vyšší separační teplotě. Mobilní fáze obsahující ACN–fosforečnanový pufr se pro separaci nonapeptidů jeví jako výhodnější. Isotocin sice eluoval v mrtvém čase, ale ostatních 5 analytů bylo separováno do 7 minut s dobrou symetrií píků ( $A_s$  1,2–1,9). Separace všech šesti analytů byla možná i v mobilní fázi ACN–octanový pufr do 20 minut. Píky jednotlivých analytů v chromatogramu získaném v mobilní fázi obsahující ACN–octanový pufr však nemají příliš dobrou symetrii ( $A_s$  1,1–2,9), na druhou stranu došlo v dané mobilní fázi k částečnému oddělení isotocinu od uracilu. Octanový pufr má při vlnové délce 230 nm výrazně vyšší absorpci, tj. vykazuje výraznější šum základní linie než fosforečnanový pufr, proto celková intenzita odezvy studovaných analytů je při použití octanového pufru podstatně nižší. Octanový pufr je však na rozdíl od fosforečnanového pufru vhodný pro spojení s MS detekcí. Vypočítaná účinnost kolony pro všechny používané pufrы se pohybovala v rozmezí 5000–33 000 teoretických pater na metr kolony v závislosti na analytu a použitém pufru v mobilní fázi.

## 5.4 Butyl–methakrylátové monolitické stacionární fáze

V této disertační práci byla studována možnost využití moderního separačního média, monolitů, pro separaci vybraných peptidů. Monolitické kolony mají významné místo v cLC. Byly zvoleny butyl–methakrylátové monolity, které jsou na Katedře analytické chemie PŘF UK v Praze dlouhodobě vyvíjeny a postupy jejich přípravy optimalizovány<sup>176</sup>.

### 5.4.1 Příprava butyl–methakrylátových monolitů

Příprava butyl–methakrylátových monolitů byla převzata od Peters a kol.<sup>161</sup>, který plnil 100  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  křemenné kapiláry. Tato příprava byla optimalizována pro využití butyl–methakrylátových monolitů pro 320  $\mu\text{m}$  kapiláry v cLC módu<sup>107, 108, 204</sup>.

Nejdříve byly kapiláry (délky cca 22–25 cm) proplachovány 1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH po dobu 6 hodin a následně 1 hodinu deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$ , aby došlo k aktivaci povrchu kapiláry. Druhým krokem bylo naplnění kapilár silanizačním roztokem obsahujícím 40  $\mu\text{l}$  3–(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu v 10 ml 6  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  kyselině octové. Tento krok zajišťuje pokrytí vnitřní stěny kapiláry silanizačním činidlem, aby bylo možné monolit zakotvit ke stěně kapiláry. Po naplnění kapilár byly jejich konce ponechány ponořené v malém množství tohoto roztoku v plastových vialkách a takto naplněné kapiláry byly termostatovány při 60 °C po dobu 20 hodin. Dále byly kapiláry promyty deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  asi 30 minut a pak 5 minut sušeny proudem inertního plynu ( $\text{N}_2$ ). Tak byly kapiláry připraveny k naplnění polymerizační směsí. Po naplnění kapilár polymerizační směsí byly konce kapilár ponořeny do plastových vialek obsahujících polymerizační směs a takto termostatovány při 60 °C po dobu 20 hodin. Po polymerizačním kroku byly kapiláry promyty mobilní fází ACN–voda 65/35 (v/v) k odstranění neopolymerovaného podílu polymerizační směsi, upraveny na konečnou délku 15 cm a následně použity pro separace peptidů.

Polymerizační směs se skládala z 0,4 % hm. 2,2–azobisisobutyronitrilu (AIBN) jako iniciátoru; 17,8 % hm. butyl–methakrylátu (BMA) jako funkčního monomeru; 21,8 % hm. ethylen–dimethakrylátu (EDMA) jako síťovacího monomeru; 42,0 % hm. propan–1–olu a 18,0 % hm. butan–1,4–diolu jako porogenního činidla.

Základní vlastnosti butyl–methakrylátových monolitů připravených výše popsaným postupem jsou uvedeny v *Tabulce 5.4.1.1*. Jelikož se jedná o poměrně nová média, která nejsou zatím komerčně dostupná, nejsou jejich fyzikálně–chemické

vlastnosti ještě podrobně popsány. Hodnota specifického povrchu byla určena metodou sorpce a desorpce dusíku (B.E.T) a hodnota poloměru pórů byla určena rtuťovou porozimetrií na Ústavu fyzikální a makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Jelikož monolit je kompozitní materiál, nemá částice, proto nelze u něho určit velikost částic. U monolitických materiálů na bázi organických polymerů se předpokládá větší chemická a teplotní stabilita než u silikagelových částicových a i monolitických materiálů; tento předpoklad potvrzují i polymerní částicové stacionární fáze pro HPLC, které jsou chemicky i teplotně odolnější než silikagelové HPLC stacionární fáze, ale jejich nevýhodou je menší separační účinnost oproti silikagelovým materiálům.

#### Tabulka 5.4.1.1

Vlastnosti monolitické stacionární fáze.

obsah uhlíku	n/a
délka × I.D.	15 cm × 320 μm
pokrytí	n/a
matrice	monolit
velikost částic	nečásticový charakter
velikost pórů	200 nm
specifický povrch	24 m <sup>2</sup> /g
pH rozmezí	n/a
teplotní limit	n/a

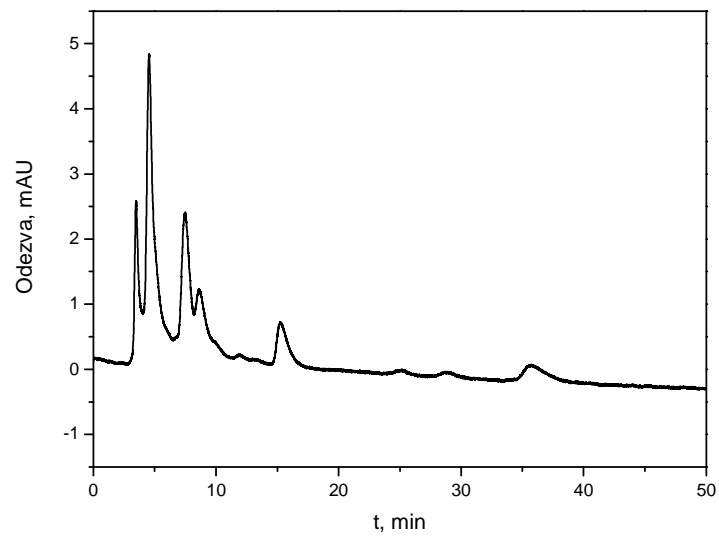
#### **5.4.2 Nonapeptidy**

Butyl–methakrylátové monolitické stacionární fáze byly využity při popisu separačního chování pouze jedné skupiny peptidů studovaných v této disertační práci, a to nonapeptidů. Při získávání experimentálních dat bylo postupováno stejně jako při studiu retenčního chování zmiňovaných analytů na zirkoniové a silikagelových stacionárních fázích. Byl tedy sledován vliv typu pufru (fosforečnanový, octanový, tetraboritanový), jeho pH a koncentrace v mobilní fázi a poměru organického modifikátoru a příslušného pufru jako vodné složky mobilní fáze na retenční chování analogů vasopresinu.

#### 5.4.2.1 Fosforečnanový pufr

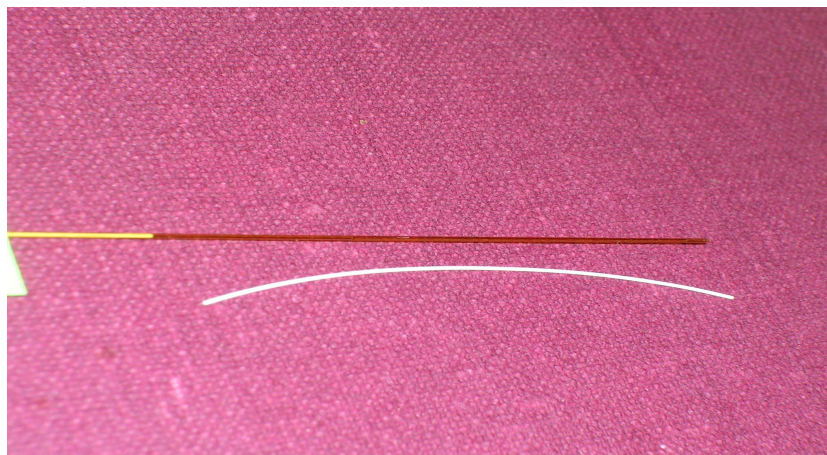
##### *Vliv pH fosforečnanového pufru*

Při výběru výchozích podmínek analýzy vasopresinů (tj. složení mobilní fáze) na butyl–methakrylátových monolitech nebylo možné využít zkušenosti publikované v odborné literatuře, protože zatím nejsou dostupné žádné práce zabývající se analýzou analogů vasopresinu na butyl–methakrylátových monolitech. Při volbě složení mobilní fáze bylo tedy vycházeno ze zkušeností získaných při separaci vasopresinů na silikagelových a zirkoniových kolonách, které jsou popsány v této disertační práci. Protože byly na silikagelových a zirkoniových kolonách získány rychlejší a účinnější separace nonapeptidů v mobilních fázích o vyšších hodnotách pH, byla jako počáteční mobilní fáze zvolena směs ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanového pufru o pH 10,0 20/80 (v/v). Za těchto experimentálních podmínek všechny analyty eluovaly z monolitu v mrtvém čase, proto byla vyzkoušena mobilní fáze s nižší eluční silou, tj. ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 10,0 10/90 (v/v). V mobilní fázi (o pH 10,0) s nižším obsahem organického modifikátoru došlo k velmi výraznému prodloužení retence, kdy poslední analyt eluoval okolo 120 minut. Takto dlouhé retenční časy výrazně přispěly k rozmytí zón analyzovaných nonapeptidů a zkomplikovaly jejich identifikaci. Proto byla dále zkoušena mobilní fáze se stejným obsahem ACN 10 % (v), ale s nižším pH vodné složky. Postupně byl tedy použit  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,0 a 8,0. Chromatogram naměřený v mobilní fázi ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,0 10/90 (v/v) je znázorněn na *obr. 5.4.2.1.1*. Bohužel pravděpodobně působením fosforečnanového pufru, u kterého je znám jeho negativní vliv na stěnu křemenné kapiláry v kapilární zónové elektroforéze, došlo k porušení chemické vazby mezi monolitem a vnitřní stěnou křemenné kapiláry, následnému uvolnění monolitu a jeho vymytí z kapiláry. Na *obr. 5.4.2.1.2* je zachycen vytlačený monolit z kapiláry. Proto bylo používání mobilních fází obsahujících fosforečnanový pufr ukončeno a na nové butyl–methakrylátové monolitické koloně, připravené stejným postupem jako monolitická kolona předešlá, bylo zahájeno testování jiných typů mobilních fází.



*Obr. 5.4.2.1.1*

Separace směsi šesti vasopresinů na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 6,0 10/90 (v/v); teplota 25 °C; průtok 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; dávkování 60 nl; detekce 214 nm. Identifikace píků nebyla provedena, protože došlo k vymytí stacionární fáze z kapiláry.



*Obr. 5.4.2.1.2*

Fotografie vymytého butyl–methakrylátového monolitu z kapiláry v důsledku porušení vazeb mezi monolitem a vnitřní stěnou křemenné kapiláry.

#### 5.4.2.2 Octanový pufr

Vzhledem ke skutečnosti, že při používání fosforečnanového pufru jako vodné složky mobilní fáze, došlo k vymytí monolitu z kapiláry, byly hledány další pufrы, které

by byly kompatibilní s monolitickou stacionární fází a bylo by je možné využít pro separaci nonapeptidů. Na základě zkušeností s částicovými silikagelovými a zirkoniovými stacionárními fázemi byl vybrán octanový pufr, který spolu s acetonitrilem tvořil mobilní fáze dále testované pro analýzu vasopresinů na monolitu.

#### *Vliv pH octanového pufru*

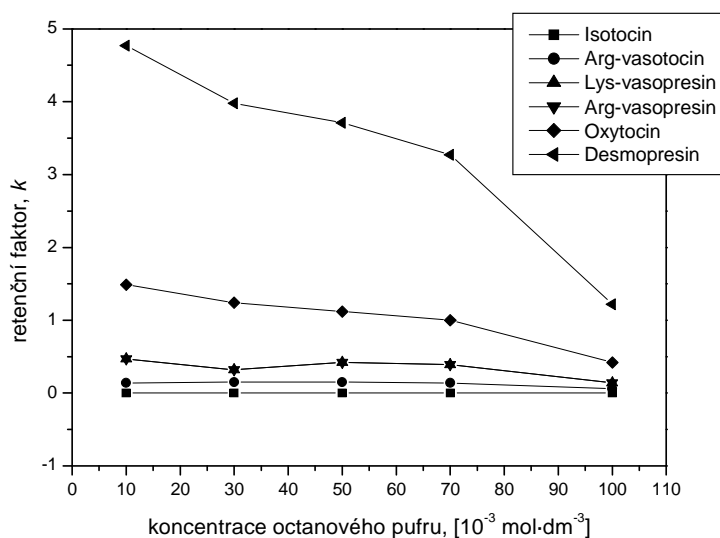
Na základě výsledků získaných během optimalizace pH fosforečnanového pufru na butyl–methakrylátovém monolitu, byla použita mobilní fáze se stejným poměrem ACN a  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanového pufru, tedy 10/90 (v/v) o dvou hodnotách pH 4,5 a 6,0. Retence studovaných analytů se při vyšší hodnotě pH vodné složky mobilní fáze mírně snižovala. Při pH 4,5 dosahovaly retenční faktory hodnot od 0,1 do 2,8 a pro pH 6,0 od 0,1 do 2,2. Nejdříve eluoval isotocin v mrtvém čase, poté Arg–vasotocin, Lys–vasopresin, Arg–vasopresin, oxytocin a posledně elující byl desmopresin. Avšak ani při jednom z měřených pH se nepodařilo dosáhnout patřičného rozdělení páru Lys–vasopresin a Arg–vasopresin a isotocin se nepodařilo oddělit od uracilu (značkovač  $t_m$ ). Při vyšší hodnotě pH vodné složky se zhoršovalo i rozlišení ostatních analytů. Změna pH mobilní fáze neměla zásadní vliv na symetrii píků. Pro další experimenty bylo zvoleno pH 4,5 a byla použita mobilní fáze ACN– $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr o pH 4,5 10/90 (v/v). Hodnoty rozlišení a symetrie dosahovaly hodnot 0,6–4,7 respektive 0,7–2,1.

#### *Vliv koncentrace octanového pufru*

V dalším optimalizačním kroku byl sledován vliv koncentrace octanového pufru na separaci studovaných vasopresinů v oblasti  $(10–100) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v mobilní fázi ACN–octanový pufr pH 4,5 10/90 (v/v) (*obr. 5.4.2.2.1*). Při rostoucí koncentraci pufru byl pozorován největší pokles retence u desmopresinu. U dalších analytů nebyla změna retence se změnou koncentrace octanového pufru tak výrazná. Isotocin nevykazoval pozorovatelnou změnu retenčního chování, při všech koncentracích octanového pufru isotocin eluoval v mrtvém čase. Rozlišení i symetrie píků se zhoršovaly s rostoucí koncentrací octanového pufru v mobilní fázi. Vyhodnocením naměřených dat byla vybrána mobilní fáze obsahující octanový pufr o koncentraci  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a celkovém složení ACN– $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr o pH 4,5 10/90 (v/v). Tato



mobilní fáze byla používána pro další experimenty. Rozlišení dosahovalo hodnot min 0,6 a symetrie píků byla max 2,4.

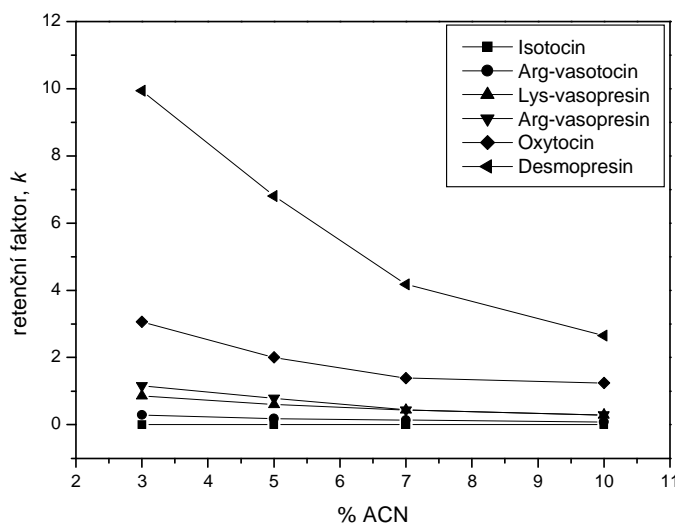


#### Obr. 5.4.2.2.1

Závislost retenčního faktoru na koncentraci octanového pufru na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN–octanový pufr pH 4,5 10/90 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv poměru organické a vodné složky*

Na základě předešlých experimentů byla pro další optimalizační krok použita mobilní fáze ACN–30·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr o pH 4,5. Obsah ACN v mobilní fázi byl měněn z původních 10 % (v) na 7 % (v), dále na 5 % (v) a 3 % (v) (*obr. 5.4.2.2.2*). Se snižujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi se retence studovaných analytů zvyšovala. Největší nárůst retence byl pozorován u nejpozději eluujícího vasopresinu, desmopresinu. Isotocin stále eluoval v mrtvém čase. S nižším obsahem acetonitrilu v mobilní fázi vzrůstala retence analytu, tím pádem rostlo i rozlišení. Lepší symetrie píků byla pozorována při nižším obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

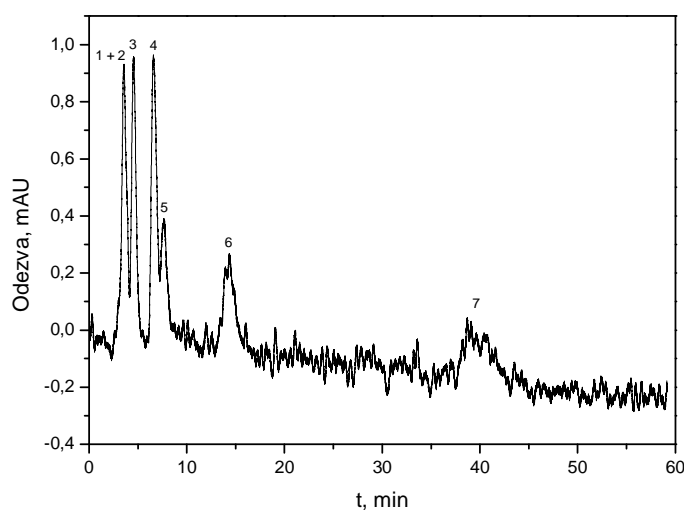


#### Obr. 5.4.2.2.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze  $\text{ACN}-30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 4,5; teplota 25 °C.

Směs šesti nonapeptidů byla nejlépe separována na butyl–methakrylátovém monolitu v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 4,5 3/97 (v/v). Reprezentativní chromatogram je uveden na *obr. 5.4.2.2.3*. Z chromatogramu lze vyzorovat neúplné rozdělení dříve eluujících analytů, a naopak velké rozmytí později eluujících peptidů. Lze shrnout, že lepší rozdělení analytů isotocinu, Arg–vasotocinu, Lys–vasopresinu a Arg–vasopresinu, je možné při nižším obsahu ACN v mobilní fázi, které ovšem doprovází příliš velké rozmytí posledně eluujícího analytu, desmopresinu. Symetrie dříve eluujících analytů se pohybuje od 0,9 do 1,3. Později elující analyty mají symetrie horší ( $A_s$  max 2,0). Řešením tohoto problému by byla gradientová eluce, která bohužel v cLC modu nebyla k dispozici. Rozlišení píků v této optimalizované mobilní fázi dosahuje hodnot 0,9–4,2 a účinnost kolony, vyjádřená počtem pater na metr byla mezi 5000–10 000.

Stejně jako u silikagelových kolon nebo zirkoniové kolony je v mobilní fázi obsahující octanový pufr problém s velkou absorbancí této mobilní fáze, která se projevuje zhoršením stability základní linie. Výhodou této mobilní fáze je ale její vhodnost k použití s MS detekcí.



#### Obr. 5.4.2.2.3

Optimalizovaná separace směsi nonapeptidů na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN– $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanový pufr pH 4,5 3/97 (v/v); teplota 25 °C; průtok  $3 \mu\text{l}/\text{min}$ ; dávkováno 60 nl; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) Arg–vasotocin; (4) Lys–vasopresin; (5) Arg–vasopresin; (6) oxytocin; (7) desmopresin.

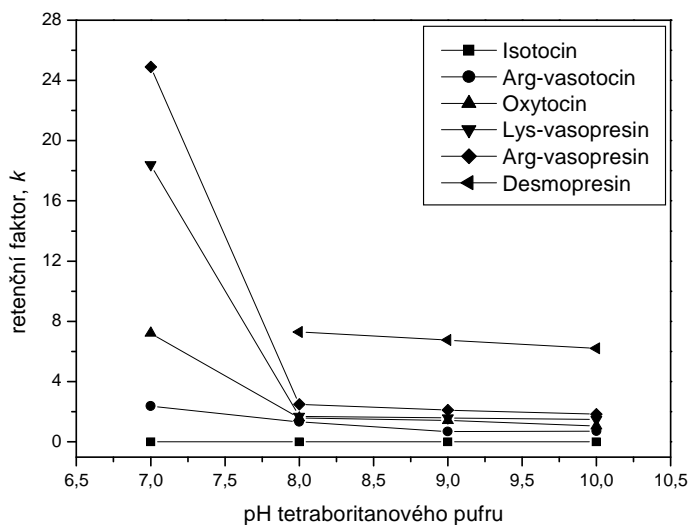
#### **5.4.2.3 Tetraboritanový pufr**

Na základě poznatků získaných při studiu retenčního chování vasopresinů na silikagelových a zirkoniových fázích, kdy bylo zjištěno, že dobré separace vasopresinů lze dosáhnout v zásaditém pH vodné složky mobilní fáze, byl hledán vhodný pufr, který by bylo možné použít na butyl–methakrylátovém monolitu pro bazickou oblast pH. Fosforečnanový pufr nemohl být na základě předchozích experimentů použit, protože vlivem tohoto pufru došlo k nevratnému poškození monolitu. Proto byl vybrán tetraboritanový pufr, který lze použít pro oblast pH od 7,4 do 9,2. Po předchozích experimentech byla zvolena vlnová délka 230 nm pro detekci studovaných analytů.

#### *Vliv pH tetraboritanového pufru*

Při volbě složení mobilní fáze s tetraboritanovým pufrům, ve které měl být sledován vliv pH mobilní fáze na separaci studovaných nonapeptidů, byly využity poznatky získané při optimalizaci pH v prostředí octanového pufru na monolitické stacionární fázi. Byl tedy zvolen poměr ACN a pufru 10/90 (v/v) a koncentrace pufru byla vybrána  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a studovaná oblast pH byla od 7,0 do 10,0. Změny retenčního chování všech studovaných vasopresinů v závislosti na pH vodné složky

mobilní fáze jsou ukázány na *obr. 5.4.2.3.1*. V oblasti pH 8,0–10,0 nemá tento parametr zásadní vliv na retenci všech analytů. Při pH 7,0 došlo k výraznému zvýšení retence u téměř všech analytů, výjimkou byly isotocin a Arg–vasotocin, jejichž retence se zvýšila jen nepatrně. U posledního eluujícího analytu, desmopresinu, se retence zvýšila natolik, že nebyla při nižších hodnotách pH zaznamenána z důvodu silného rozmytí píku, který se stal nevyhodnotitelný. Rozlišení píků studovaných analytů rostlo s klesajícím pH vodné složky mobilní fáze. Úplného rozdělení nonapeptidů bylo dosaženo při pH 7,0. Při pH 8,0 koeluovaly Arg–vasotocin, oxytocin a Lys–vasopresin, při pH 9,0 oxytocin a Lys–vasopresin a při pH 10,0 se nepodařilo rozdělit Arg–vasotocin, oxytocin, Lys–vasopresin a Arg–vasopresin. Symetrie píků se zlepšovala s klesajícím pH a pohybovala se v rozmezí hodnot (0,8–2,8). Pro další experimenty byla vybrána mobilní fáze složená z ACN–50·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritanového pufru pH 7,7 10/90 (v/v). Hodnoty rozlišení se pohybovaly intervalu 1,1–6,6. Symetrie píků byla maximálně 2,6.



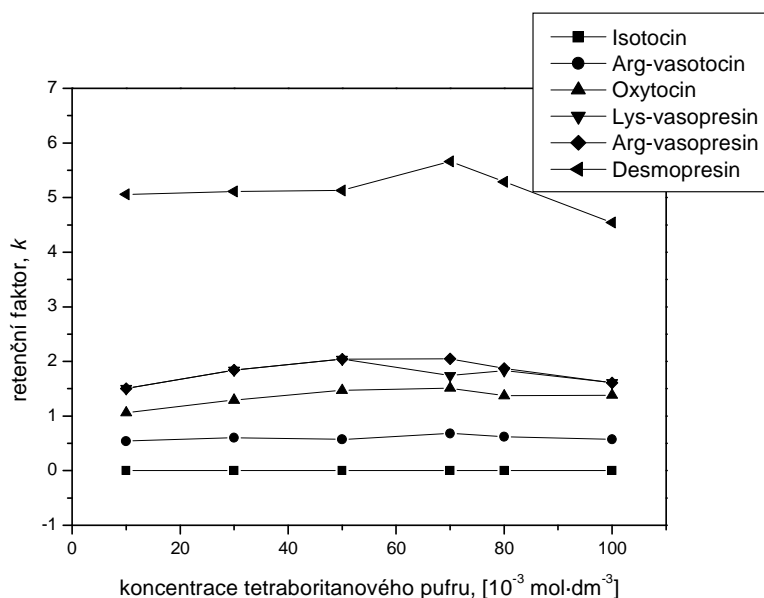
#### Obr. 5.4.2.3.1

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně pH tetraboritanového pufru na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN–50·10<sup>-3</sup> mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritanový pufr 10/90 (v/v); teplota 25 °C.

#### *Vliv koncentrace tetraboritanového pufru*

V tomto optimalizačním kroku byl sledován vliv koncentrace tetraboritanového pufru v mobilní fázi ACN–tetraboritanový pufr pH 7,7 10/90 (v/v) na retenční chování separovaných nonapeptidů. Na *obr. 5.4.2.3.2* jsou znázorněny závislosti retenčního

faktoru na koncentraci tetraboritanového pufru naměřené v koncentračním rozmezí  $(10\text{--}100)\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Z vynesných závislostí plyne, že vliv koncentrace tetraboritanového pufru na retenční chování vasopresinů je v tomto separačním systému nevýrazný. Zajímavá skutečnost byla zjištěna v intervalu koncentrace pufru  $(50\text{--}80)\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , kdy u později eluujících vasopresinů došlo k výraznějšímu nárůstu retenčního faktoru, jehož maximum se nachází při koncentraci tetraboritanového pufru o hodnotě  $70\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poté opět retenční faktor klesal, až při koncentraci pufru  $80\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  dosáhl hodnoty v souladu s průběhem ostatních bodů prezentované závislosti. Pro Lys–vasopresin byl ve zmiňovaném intervalu koncentrací pufru zaznamenán opačný průběh, tedy pokles retenčního faktoru s minimem při  $70\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentraci pufru a poté opětovný nárůst retence. V oblasti koncentrace pufru  $(50\text{--}80)\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  došlo díky popisovanému jevu k částečnému rozdělení Lys–vasopresinu a Arg–vasopresinu, při koncentraci  $70\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  bylo rozlišení těchto dvou peptidů 0,5, a proto tato koncentrace byla použita pro další kroky optimalizace. Rozlišení analytů se pohybovalo v rozmezí 0,5–3,7 a symetrie jejich píků dosahovala hodnot 0,4–2,1.



#### Obr. 5.4.2.3.2

Závislost retenčního faktoru studovaných analytů na změně koncentrace tetraboritanového pufru na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN–tetraboritanový pufr pH 7,7 10/90 (v/v); teplota 25 °C.

### *Vliv poměru organické a vodné složky*

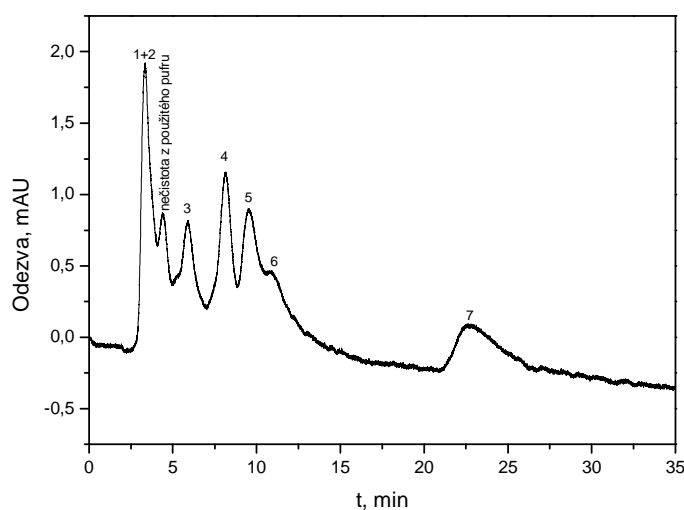
Po optimalizaci pH a koncentrace tetraboritanového pufru byl studován vliv obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi na retenční chování separovaných vasopresinů. Mobilní fáze obsahovala  $\text{ACN}-70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetraboritanový pufr o pH 7,7 v těchto poměrech 10/90, 8/92 a 5/95 (v/v). Retence a rozlišení studovaných vasopresinů s klesajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi vzrůstala. U Arg-vasopresinu a desmopresinu byl zaznamenán velmi silný nárůst retence s klesající eluční silou mobilní fáze. Symetrie píků byla nejlepší v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN}-70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetraboritanový pufr pH 7,7 8/92 (v/v). Hodnoty retenčního faktoru pro Arg-vasopresin a desmopresin v mobilní fázi  $\text{ACN}-70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetraboritanový pufr pH 7,7 5/95 (v/v) nebyly získány kvůli značnému prodloužení retenčních časů těchto analytů.

Chromatogram naměřený za optimalizovaných podmínek, tj.  $\text{ACN}-70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetraboritanový pufr pH 7,7 8/92 (v/v), je zobrazen na obr. 5.4.2.3.3. Hodnoty rozlišení a symetrie píků pro tyto nejvhodnější podmínky jsou  $R_s$  0,2–4,6;  $A_s$  1,1–3,2 a  $t_p/m$  2400–6700. Z chromatogramu je patrné, že lze identifikovat všechny vasopresiny z dělené směsi peptidů, ovšem rozlišení píků není dostačující. Isotocin opět eluoval v mrtvém čase, tento problém byl také pozorován u zirkoniové stacionární fáze. Výrazné je i rozmytí píku desmopresinu, který eluuje okolo 25 minuty.

### **5.4.3 Závěr**

V této části disertační práce byl testován nový typ stacionárních fází v cLC módu. Na butyl-methakrylátových monolitech bylo podrobně studováno retenční chování nonapeptidů v různých systémech mobilní fáze. Konkrétně byl sledován vliv typu pufru (fosforečnanový, octanový a tetraboritanový), jeho koncentrace a pH a vliv poměru příslušného pufru a ACN na separaci směsi vasopresinů. Byl zkoumán vliv jednotlivých optimalizačních parametrů na základní retenční charakteristiky, tj. retenční faktor, rozlišení, symetrie píků a účinnost analýzy vyjádřené počtem teoretických pater na metr kolony.

Použitím mobilní fáze obsahující ACN-fosforečnanový pufr byly získány celkem slibné výsledky. Podařilo se oddělit jednotlivé vasopresiny, i když ne až na základní linii v čase do 40 minut. Prostředí fosforečnanového pufru však nebylo pro



### Obr. 5.4.2.3.3

Optimalizovaná separace směsi nonapeptidů na butyl–methakrylátovém monolitu; mobilní fáze ACN –  $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetraboritanový pufr pH 7,7 8/92 (v/v); teplota 25 °C; průtok 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; dávkováno 60 nl; detekce 230 nm. Identifikace píků: (1) uracil; (2) isotocin; (3) Arg–vasotocin; (4) oxytocin; (5) Lys–vasopresin; (6) Arg–vasopresin; (7) desmopresin.

monolitickou kolonu vhodné, protože vlivem tohoto pufru došlo k porušení vazeb mezi monolitem a stěnou křemenné kapiláry, k uvolnění monolitu, a tím k jeho vymytí z kapiláry.

Po neúspěchu s fosforečnanovým pufrem byly hledány jiné pufrы, které by byly šetrnější k monolitické koloně a které by byly příslibem pro úspěšné dělení směsi šesti vasopresinů. Na základě experimentů provedených v rámci této disertační práce na silikagelových a zirkoniových náplňových kolonách byly vybrány pufrы dva, a to octanový a tetraboritanový. Druhý zmiňovaný pufr umožňuje měření v silně bazické oblasti, která se pro separaci vasopresinů osvědčila. S rostoucí hodnotou pH mobilní fáze se retence analytů v mobilní fázi ACN–octanový pufr snížila, zhoršilo se i rozlišení píků. Rozdělit analyty Arg–vasopresin a Lys–vasopresin až na základní linii se v této mobilní fázi nepodařilo. Výrazný vliv pH v systému s tetraboritanovým pufrem byl pozorován jen v oblasti pH 7,0–8,0. V tomto rozmezí se retence a rozlišení všech separovaných analytů výrazně snižovaly. V oblasti hodnot vyšších než pH 8 byla retence studovaných vasopresinů na změně pH použitého tetraboritanového pufru již téměř nezávislá. Změna koncentrace jak octanového, tak tetraboritanového pufru v mobilní fázi neměla na retenci či symetrii píků téměř žádný vliv. Změna byla

pozorována jen u desmopresinu v mobilní fázi ACN–octanový pufr, kdy se retence tohoto analytu s rostoucí koncentrací pufru značně snížila. Při změně obsahu ACN v mobilní fázi byl pro oba systémy mobilní fáze (tj. octanový a tetraboritanový pufr) pozorován stejný trend, tedy nižší obsah ACN vedl ke zvýšení retence, a tím se značně prodloužily retenční časy analyzovaných nonapeptidů. S nižším obsahem ACN v mobilní fázi se zlepšilo rozlišení a symetrie všech píků.

Mobilní fáze obsahující ACN– $30 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> octanový pufr pH 4,5 3/97 (v/v) vedla k částečnému rozdělení směsi 6 nonapeptidů do 45 min. Tento separační systém umožnil jednoznačnou identifikaci všech studovaných nonapeptidů i při značném zatížení záznamu šumem základní linie. V mobilní fázi ACN– $70 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritanový pufr pH 7,7 8/92 (v/v) se podařilo sice rozdělit všech 6 analytů do 25 min, ale rozlišení píků nebylo dostačující a ani jejich symetrie nebyla dobrá.

Porovnáním separace studovaných analytů na koloně Supelcosil C18 a na butyl–methakrylátovém monolitu v mobilní fázi obsahující ACN a octanový pufr došlo u butyl–methakrylátového monolitu ke značnému prodloužení retenčních časů a nepodařilo se vzájemně oddělit Lys–vasopresin a Arg–vasopresin. Také se změnila selektivita separačního systému v porovnání se silikagelovými kolonami, což zapříčinilo změnu elučního pořadí studovaných vasopresinů. Totéž platí i ve srovnání se zirkoniovou kolonou Discovery Zr PBD. Vypočítaná účinnost monolitické kolony pro všechny používané pufrы byla v rozmezí 2400–10 000 teoretických pater na metr kolony v závislosti na analytu. Účinnost butyl–methakrylátových monolitů byla ze studovaných kolon nejnižší, ale vzhledem k tomu, že se jedná o experimentální kolonu, je zde možný další vývoj a prostor pro zlepšení.



## 6 Celkový závěr

Cílem této disertační práce bylo studium retenčního chování dvou skupin peptidů, vybraných pentapeptidů a nonapeptidů, v různých separačních systémech HPLC a cLC. Na základě podrobného experimentálního popisu separačních systémů lze následně zvolit nejvhodnější kombinaci stacionární a mobilní fáze pro separaci vybrané směsi analytů.

Do této disertační práce byly vybrány typově odlišné kolony, Supelcosil C18, Discovery HS F5, Discovery Zr PBD a butyl–methakrylátový monolit. Tyto kolony jsou zástupci silikagelových a zirkoniových náplňových stacionárních fází, a také moderního monolitického separačního média na bázi organického polymeru. Kolony Supelcosil C18 a Discovery HS F5 jsou zástupci silikagelových reverzních kolon. Kolona Supelcosil C18 je klasická C18 reverzní kolona, kolona Discovery HS F5 je představitelem modifikované silikagelové stacionární fáze s navázanou pentafluorfenylpropylovou funkční skupinou. Dále byla používána zirkoniová stacionární fáze, kolona Discovery Zr PBD, u které je nosič tvořený oxidem zirkoničitým modifikován polybutadienem. Posledním typem používaných kolon, určených pro cLC, byly butyl–methakrylátové monolity, které jsou na Katedře analytické chemie PřF UK v Praze dlouhodobě vyvíjeny a postupy jejich přípravy optimalizovány. Zvolené kolony jsou typově rozdílné, relativně nové a představují nové možnosti v separacích biologicky aktivních látek.

Nejprve byly všechny používané kolony otestovány Waltersovým testem, který slouží k charakterizaci stacionárních fází na základě dvou převládajících interakcí, tj. hydrofobní a silanofilní. Ve skupině studovaných stacionárních fází jsou zastoupeny na základě výsledků Waltersova testu jak kolony s odlišným indexem polarit, tak i rozdílnou hydrofobností. Tento výběr kolon s dostatečně odlišnými vlastnostmi vytváří prostor k dobré charakterizaci separačního chování zvolených analytů. Na základě získaných dat lze pak zvolit separační systém pro konkrétní aplikaci – analýzu biologicky aktivních peptidů.

Retenční pořadí separovaných pentapeptidů bylo na všech studovaných stacionárních fázích stejné. Výjimku tvořil D–Ala, Leu–enkefalin, který na koloně Supelcosil C18 eluoval jako první v pořadí a na kolonách Discovery HS F5 a Discovery Zr PBD jako třetí. Změna retence daného analytu zřejmě souvisí s indexem polarit dané stacionární fáze, neboť zmiňovaný enkefalin je více zadržován na polárnějších

stacionárních fázích. Ve struktuře D–Ala, Leu–enkefalinu je v pozici 2 aminokyselina glycin nahrazena D–alaninem. Odlišné eluční pořadí D–Ala, Leu–enkefalinu na koloně Discovery Zr PBD dále zřejmě souvisí s vysokou hodnotou hydrofobního indexu kolony v korelaci s vyšší hydrofobností D–alaninu v molekule D–Ala, Leu–enkefalinu. Na silikagelové koloně Discovery HS F5, ale i na zirkoniové koloně Discovery Zr PBD se uplatňují jiné typy interakcí (např.  $\pi$ – $\pi$ ), proto zde eluuje D–Ala, Leu–enkefalin jinak než z klasické C18 kolony. Nejlepší separace pentapeptidů z hlediska rozlišení ( $R_s \geq 2,8$ ), symetrie ( $A_s \leq 1,3$ ) a doby analýzy (do 7 minut) byla dosažena na koloně Supelcosil C18 v mobilní fázi obsahující  $\text{ACN} \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr pH 5,0 22/78 (v/v).

Při studiu retenčního chování nonapeptidů na různých typech stacionárních fázích byly pozorovány následující důležité zobecňující poznatky: isotocin téměř ve všech studovaných separačních systémech s výjimkou použití kolon Discovery HS F5 a Supelcosil C18 v kombinaci s fosforečnanovým pufrem v mobilní fázi, eluoval v mrtvém čase. Druhým poznatkem byla častá neschopnost separačních systémů dostatečně oddělit nonapeptidy Lys–vasopresin a Arg–vasopresin, které se liší pouze jednou aminokyselinou (lysin nebo arginin) umístěnou v poloze 8 aminokyselinového řetězce. Tuto dvojici analytů se nepodařilo rozdělit až na základní linii ani na koloně Supelcosil C18 s fosforečnanovým pufrem a s mravenčanovým pufrem v mobilní fázi, ani v systému s kolonou Discovery HS F5 a octanovým pufrem a ani na butyl–methakrylátovém monolitu s octanovým pufrem v mobilní fázi. Z výsledků vyplynulo, že nejlepší studovaný separační systém pro nonapeptidy je tvořen kolonou Discovery HS F5 a mobilní fází obsahující  $\text{ACN}$  a  $70 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosforečnanový pufr o pH 6,5 20/80 (v/v). V tomto separačním systému došlo k rozdělení všech šesti vasopresinů do 20 min s dostatečným rozlišením ( $R_s \geq 1,8$ ) a symetrií píků ( $A_s \sim 1,1$ ). Vypočítaná účinnost kolony v optimalizované mobilní fázi se pohybovala v intervalu 35 000–47 000 tp/m v závislosti na analytu .

Nejcitlivějším analytem na změnu složení mobilní fáze byl desmopresin, jehož retenční chování vykazovalo nejintenzivnější závislost především na změně pH a koncentrace vybraného pufru. Desmopresin se odlišuje od ostatních analyzovaných nonapeptidů přítomností 3–merkaptopropionové kyseliny na C–konci aminokyselinového řetězce. Absence aminokyseliny cysteinu v pozici 1, která byla nahrazena karboxylovou kyselinou obsahující síru, je pravděpodobně zodpovědná za jeho odlišné chování.

Na závěr lze říci, že nové stacionární fáze, jako například modifikované silikagelové, zirkoniové nebo monolitické, jsou dobrou a zajímavou alternativou pro separaci biologicky aktivních peptidů ke klasickým C18 fázím.

Výhody zirkoniových stacionárních fází jsou především v jejich zvýšené stabilitě vzhledem k hodnotám pH pufrů jako vodných složek mobilních fází a vůči zvýšené experimentální teplotě. V našem konkrétním případě však neposkytly lepší výsledky separace směsi pentapeptidů ani nonapeptidů než kolony silikagelové.

Trend miniaturizace HPLC nabývá v dnešní době na oblibě, přesto výběr a dostupnost stacionárních fází pro cLC je oproti klasické kapalinové chromatografii stále nedostatečný. Tento nedostatek by mohl být odstraněn i pomocí kapilárních monolitických kolon. Separace na monolitických kolonách naznačují dobrý trend a vzrůstá i jejich použití díky poměrně snadné přípravě. Monolitické kolony ale ještě vyžadují další vývoj v oblasti technologie jejich přípravy a následně jejich aplikačního využití. Tento fakt potvrzují i nejnižší hodnoty účinnosti testované kolony vypočítané pro jednotlivé analyty.

**7 Použitá literatura**

1. Kolektiv autorů katedry biochemie, Biochemie – základní kurz, Karolinum, Praha 1999, str. 19
2. H. G. Lee, D. M. Desiderio, Anal. Chim. Acta 383 (1999) 79
3. Y. C. David, A. Phillip, M. S. Angelica, C. Doris, B. Mark, N. Steve, G. N. Carlos, G. Alexander, K. Georgie, V. J. Pablo, Clin.Microbiol. 37 (1999) 1393
4. A. Barberis, B. Mouillac, T. Durroux, J. Endocr. 156 (1998) 223
5. I. N. Ferrier et al., J. Neurol. Sci. 62 (1983) 159
6. J. Suchánková, PhD. Thesis, Praha 2001
7. D. M. Desiderio, J. F. Kusmierz, X. Zhu, C. Dass, D. Histon, J. T. Robertson, H. S. Sacks, Biol. Mass Spectrom. 22 (1993) 89
8. X. Zhu, D. M. Desiderio, Mass Specrom. Rev 15 (1996) 213
9. P. Karlson, W. Gerok, W. Gross, Patobiochemie, Academia Praha 1987, str. 224
10. Z. Vodrážka: Biochemie 1, Academia Praha 1992, str. 77
11. <http://www.acnp.org/g4/GN401000051> (8. 3. 2006)
12. <http://www.erna.uochb.cas.cz/pdp/node32.html> (8. 3. 2006)
13. <http://arbl.cumb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/adh.html> (8. 3. 2006)
14. N. Kawai, A. Baba, T. Suzuki, H. Shiraishi, Psychiatry Research 101 (2001) 39
15. M. Zaoral, I. Bláha, M. Buděšínský, A. Machová, J. Slaninová, J. Peptide Sci. 6 (2000) 123
16. <http://www.answers.com/desmopressin> (8. 3. 2006)
17. <http://www.biology-online.org/dictionary/lypressin> (8. 3. 2006)
18. <http://arbl.cumb.colostate.edu/hbook/pathphys/endocrine/hypopit/adh.html> (8. 3. 2006)
19. <http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/vasopressin.html> (8. 3. 2008)
20. R. Ivell, M. Balvers, W. Rust, A. Einspanier, Adv. Exp. Med. Biol 424 (1997) 253
21. Z.Vodrážka: Biochemie 1, Academia Praha 1992, str. 57
22. <http://www.fasthealth.com/dictionary/v/vasotocin.php> (8. 3. 2008)
23. K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, H. A. Claessens, Anal.Chim.Acta 352 (1997) 1

24. C. K. Larive, S. M. Lunte, M. Zhoní, M. D. Perlina, G. S. Wilson, G. Gokulrangan, T. Williams, *Anal. Chem.* 71 (1999) 389R
25. J. G. Dorsey, W. T. Cooper, *Anal. Chem.* 70 (1998) 591R
26. H. G. Barth, B. E. Boyes, C. Jackson, *Anal. Chem.* 70 (1998) 251R
27. R. D. Ricker, L. A. Sandoval, *J. Chromatogr. A* 743 (1996) 43
28. J. Freuz, S. L. Wu, W. S. Hancock, *J. Chromatogr.* 480 (1989) 379
29. P. R. Levison, C. Mumford, M. Streater, A. B. Nielsen, N. D. Pathirana, S. E. Badger, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 151
30. S. A. Cohew, J. L. Hilsenbeck, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 879
31. G. Mandril, *J. Chromatogr.* 604 (1992) 267
32. X. Kang, D. D. Frey, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (2004) 376
33. D. Zhou, H. Zou, J. Ni, L. Yang, L. Jia, Q. Zhang, Y. Zhang, *Anal. Chem.* 25 (1999) 115
34. M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 317
35. M. C. Milot, F. Herré, B. Seville, *J. Chromatogr. B* 664 (1995) 55
36. S. H. Li, C. Dass, *Anal. Biochem.* 270 (1999) 9
37. V. E. Klycshnickenko, D. M. Konlich, S. A. Yakimov, K. V. Maltseu, G. A. Grishina, I. V. Nazimov, A. N. Wulfson, *J. Chromatogr. A* 661 (1994) 83
38. J. F. Banks, E. E. Gulcicek, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3973
39. T. J. Sereda, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A* 776 (1997) 153
40. T. J. Yoshida, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 105
41. M. H. Chen, C. J. Horváth, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 51
42. R. Bhusham, R. Agarwal, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 322
43. S. K. Lee, K. H. Row, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 115
44. C. E. Dunlap III, S. Gentleman, L. I. Lowney, *J. Chromatogr.* 160 (1978) 191
45. S. Terebe, R. Konaka, K. Inouye, *J. Chromatogr.* 172 (1979) 163
46. W. W. C. Quigley, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* 79 (2004) 4645
47. V. Kašička, *Electrophoresis* 24 (2003) 4013
48. H. J. Issaq, T. P. Conrads, G. M. Janini, T. D. Veenstra, *Electrophoresis* 23 (2002) 3048
49. M. T. W. Hearn, *Biologicals* 29 (2001) 159
50. P. G. Gighetti, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 337
51. V. Šolínová, V. Kašička, T. Barth, L. Hauzerová, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 1981 (2005) 9

52. V. Šolínová, V. Kašička, D. Koval, T. Barth, A. Cencialová, L. Žáková, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 75
53. Y. Haung, J. Duan, X. Jiang, H. Chen, G. Chen, *J. Sep. Sci* 28 (2005) 2534
54. A. J. Gawron, S. M. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 3205
55. T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J. C. M. Waterval, A. Bult, G. J. de Jong, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 24 (2003) 897
56. A. Bossi, P. G. Gighetti, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 117
57. A. Bossi, E. Olivieri, L. Castelletti, C. Gelfi, M. Haman, P. G. Righetti, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 71
58. P. G. Righetti, C. Gelfi, A. Bossi, L. Castelletti, B. Verzála, A. V. Stoyanov, *Electrophoresis* 21 (2000) 4046
59. V. Dolník, *Electrophoresis* 18 (1997) 2353
60. H. H. Lauer, J. B. Ooms, *Anal. Chim. Acta* 250 (1991) 45
61. M. Zhu, R. Rodriguez, T. Webe, *J. Chromatogr. A* 559 (1991) 479
62. T. Webe, R. Rodriguez-Díaz, M. Zhu, *Chromatographia* 53 (2001) S45
63. K. Shimura, Z. Wang, H. Matsumoto, K. Kasai, *Electrophoresis* 21 (2000) 603
64. K. Shimura, W. Zhi, H. Matsumoto, K. Kasai, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4747
65. P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 21 (2000) 3898
66. L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 55
67. D. Kaniansky, J. Marak, J. Lastinec, J. C. Reijenga, F. I. Onuska, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 141
68. J. Liu, K. A. Coby, M. Novotny, *J. Chromatogr. A* 519 (1990) 189
69. K. Koezuka, H. Ozaki, N. Matsubara, S. Terabe, *J. Chromatogr. B.* 689 (1997) 3
70. Z. El Rassi, *Electrophoresis* 20 (1999) 1
71. Z. El Rassi, *Electrophoresis* 22 (2001) 1249
72. I. S. Krull, A. Debat, R. Stevenson, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 137
73. K. Walhagen, K. K. Unger, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 165
74. M. L. Ye, H. F. Zou, Z. Liu, J. Y. Ni, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 385
75. P. Q. Juany, X. Y. Jin, Y. J. Chen, J. R. Srinivasan, D. M. Luxman, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1786
76. F. Svec, E. C. Peters, D. Sykora, G. Yu, J. M. J. Fréchet, *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 3
77. D. Bandilla, C. D. Skinner, *J. Chromatogr. A.* 1044 (2004) 113
78. J. D. Pearson, M. C. McCroskey, D. B. DeWald, *J. Chromatogr.* 418 (1987) 245

79. M. Ohta, H. Fukuda, T. Kimura, A. Tanaka, *J. Chromatogr.* 402 (1987) 392
80. T. G. Heath, A. B. Giordani, *J. Chromatogr. A* 638 (1993) 9
81. G. Lindeberg, *J. Chromatogr.* 193 (1980) 427
82. S. Lundin, H. G. Folkesson, S. G. Pierzynowski, H.-I. Bengtsson, *Peptides* 15 (1994) 809–814
83. M. Getie, R. H. H. Neubert, *J. Pharm. And Biomed. Anal.* 35 (2004) 921
84. M. D. Bi, J. Singh, *Int. Journal of Pharmaceutics* 197 (2000) 87
85. K. Krumen, R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 132 (1977) 27
86. P. S. Rao, G. S. Weinstein, D. W. Wilson, N. Rujikan, D. H. Tyras, *J. Chromatogr. A* 536 (1991) 137
87. S. W. Pettersson, B. S. Persson, M. Myström, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 159
88. A. Przyjazny, J. A. Cox, *Electroanalysis* 5 (1993) 657
89. M. A. Kukucka, H. P. Misra, *J. Chromatogr. B* 653 (1994) 139
90. E. Kulczykowska, *J. Chromatogr. B* 673 (1995) 289
91. K. Larsson, W. Herman, P. Möller, D. Sanchez, *J. Chromatogr.* 450 (1988) 71
92. M. W. White, *J. Chromatogr.* 262 (1983) 420
93. T. Stroink, G. Wiese, H. Lingeman, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 193
94. H. Kanazawa, T. Nagatsuka, M. Miyazaki, Y. Matsushima, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 23
95. D. M. Desiderio, X. Zhu, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 85
96. H. Shen, M. W. Lada, R. T. Kennedy, *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 43
97. T. A. Ivandini, B. V. Sarada, C. Terashima, T. N. Rao, D. A. Tryk, H. Ishiguro, Y. Kubota, A. Fujishima, *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 63
98. S. Mousa, D. Couri, *J. Chromatogr.* 267 (1983) 191
99. V. Pacáková, J. Suchánková, K. Štulík, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 69
100. L. Tan, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 67
101. S. Lemaire, M. Dumont, S. Nolet, *J. Chromatogr. A* 425 (1988) 77
102. Y. Ohkura, M. Kai, H. Nohta, *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 85
103. V. P. Ranta, A. Urtti, S. Auriola, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 85
104. J. P. C. Wissers, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 1
105. J. P. C. Wissers, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 117
106. Y. Hirata, M. Novotný, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 521

107. P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Tesařová, *Chem. Listy* 95 (2001) 509
108. P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková, K. Štulík, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 99
109. Ch. Ch. Lin, G. R. Wang, CH. Y. Liu, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 197
110. N. Wu, J. Dempsey, P. M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 149
111. M. Lämmerhofer, F. Švec, J. M. J. Fréchet, W. Lindner, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 597
112. J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL Praha 1985
113. A. G. Horvát, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422
114. J. J. Kirkland, *Anal. Chem.* 41 (1969) 218
115. H. J. Wirth, K. O. Ericsson, P. Holt, M. Aguilar, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 646 (1993) 129
116. [www.sigma-aldrich.com/supelco-literature/Bulletin932](http://www.sigma-aldrich.com/supelco-literature/Bulletin932) (27. 3. 2004)
117. M. Petro, D. Berek, *Chromatografia* 37 (1993) 549
118. H. Figge, A. Deege, J. Köhler, G. Schomurg, *J. Chromatogr.* 351 (1986) 393
119. E. Tonhi, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 109
120. C. B. G. Bottioli, Z. F. Chaudhry, D. A. Fonseca, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 121
121. R. Barbosa Silva, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 137
122. V. Bien-Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Köhler, G. Schomurg, *Chromatographia* 19 (1984) 170
123. K. E. Collins, C. B. G. Bottoli, C. R. M. Vigna, S. Bachmann, K. Albert, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 43
124. D. A. Fonseca, H. R. Gutiérrez, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 149
125. G. Schomburg, A. Deege, V. Bien-Vogelsang, J. Köhler, *J. Chromatogr.* 287 (1983) 27
126. M. J. Wirth, H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2783
127. M. J. Wirth, H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 822
128. J. Layne, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 149
129. S. Terabe, R. Konaka, K. Inouye, *J. Chromatogr.* 172 (1979) 163



130. J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1
131. J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31
132. M. R. Buchmeiser, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 233
133. M. Kawahara, H. Nakanuta, T. Nakajima, *J. Chromatogr. A* 515 (1990) 149
134. M. P. Rigney, T. P. Weber, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273
135. L. Sun, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2517
136. C. J. Dunlap, C. V. McNeff, D. Stoll, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 73 (2001) 598A
137. U. Trüding, G. Müller, K. K. Unger, *J. Chromatogr. A* 535 (1990) 111
138. M. J. Wirth, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 646 (1993) 143
139. J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217
140. J. Li, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837
141. L. Sun, A. V. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 658 (1994) 465
142. W. S. Hancock, R. C. Chaloupek, J. J. Kirkland, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 3
143. J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229
144. M. P. Rigney, E. F. Funkenbusch, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 499 (1990) 291
145. C. J. Dunlap, P. W. Carr, A. V. McCormick, *Chromatographia* 42 (1996) 273
146. J. A. Blackwell, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 64 (1992) 863
147. V. Pacáková, K. Štulík: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, SNTL Praha, 1985
148. F. Švec, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 747
149. F. Švec, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1419
150. D. K. Roper, E. N. Lightfoot, *J. Chromatogr. A* 702 (1995) 3
151. J. J. Mezera, A. I. Liapis, *J. Chromagr. A* 852 (1999) 3
152. M. Kubín, P. Špaček, R. Chrobaček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32 (1967) 3881
153. W. D. Ross, R. T. Jefferson, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 386
154. F. D. Hileman, R. E. Sievers, G. G. Hess, W. D. Ross, *Anal. Chem.* 45 (1973) 1126
155. S. Hjertén, J. L. Liao, R. Zhang, *J. Chromatogr.* 473 (1989) 273
156. F. Švec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820

157. F. Švec, E. C. Peters, D. Sýkora, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 3
158. E. C. Peters, M. Petro, F. Švec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2288.
159. Ch. Fujimoto, Y. Fujise, E. Matsuzawa, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2753
160. E. C. Peters, M. Petro, F. Švec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3646
161. H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 5
162. H. Tanaka, M. Kamada, M. Nudo, M. Ohira, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 89
163. K. Cabrera, D. Lubda, H. M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 93
164. C. Fujimoto, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2050
165. A. Palm, M. V. Novotný, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4499
166. M. Petro, F. Švec, I. Gitson, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 68 (1996) 315
167. I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 273
168. R. Wu, H. Zou, M. Ye, Z. Lei, J. Ni, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4918
169. S. Xie, F. Švec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A* 775 (1997) 65
170. C. Yu, F. Švec, J. M. J. Fréchet, *Electrophoresis* 21 (2000) 120
171. G. S. Chirica, V. T. Remcho, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 223
172. D. Josic, A. Buchacher, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. B* 752 (2001) 191
173. A. Podgornik, M. Barut, J. Jančar, A. Štrancar, *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 51
174. J. Ren, Z. F. Fang, *J. Chromatogr. B* 761 (2001) 139
175. R. Wu, H. Zou, M. Ye, Z. Lei, J. Ni, *Electrophoresis* 22 (2001) 544
176. J. Grafnetter, *Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze*, 2006
177. H. A. Claessens, M. A. van Straten, C. A. Frajer, M. Jezierska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 135
178. J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29
179. A. Berthold, *J. Chromatogr. A* 549 (1991) 1
180. J. Köhler, D. B. Chase, R. P. Farlee, A. J. Vega, J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 352 (1986) 275
181. R. K. Gilpin, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 217
182. H. A. Claessens, J. W. de Haan, L. J. M. van de Ven, P. C. de Bruyn, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 436 (1993) 345
183. K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 544 (1991) 345
184. T. Hamoir, F. C. Sanchez, B. Bourguignon, D. L. Massart, *J. Chromatogr. Sci.* 32 (1994) 488
185. L. A. Cole, J. G. Dorsey, K. A. Dill, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1324

186. L. A. Cole, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1317
187. H. J. A. Philipsen, H. A. Claessens, H. Lind, B. Klumperman, A. L. German, *J. Chromatogr. A* 790 (1998) 101
188. H. Engelhard, M. Jungheim, *Chromatographia* 29 (1990) 59
189. H. Engelhard, H. Löw, W. Götzinger, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 371
190. H. Engelhard, M. Arangio, T. Lobert, *LC/GC*, 15 (1997) 856
191. M. J. Walters, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1987) 465
192. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721
193. B. A. Bidlingmeyer, S. N. Deming, W. P. Price, B. Schoh, M. Petrusek, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 419
194. S. V. Galushko, *Chromatographia* 36 (1993) 39
195. S. V. Galushko, A. A. Kamenchuk, G. L. Pit, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 47
196. C. Horwáth, W. R. Melander, J. Molnár, *Anal. Chem.* 49 (1977) 142
197. P. Jandera, J. Rozkošná, *J. Chromatogr. A* 556 (1991) 145
198. L. C. Tan, P. W. Carr, M. H. Abraham, *J. Chromatogr. A* 752 (1996) 1
199. M. H. Abraham, M. Ross, C. F. Poole, S. K. Poole, *J. Phys. Org. Chem.* 10 (1997) 358
200. D. Bolliet, C. F. Poole, *Chromatographia* 46 (1997) 381
201. B. Buszewski, R. M. Gdzala–Kopciuch, M. Markuszewski, R. Kaliszan, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3277
202. S. V. Galusko, *J. Chromatogr. A* 552 (1991) 91
203. [www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HS\\_F5](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5) (23. 12. 2007)
204. D. Moravcová, P. Jandera, J. Urban, J. Planeta, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1005

## Seznam publikací, prezentací a posterů

### Publikace:

K. Soukupová, J. Suchánková–Sobotníková, L. Janečková, E. Tesařová: *Application of modern silica-based and zirconia-based reversed stationary phases for separation of selected vasopressins* – ve stadiu přípravy

K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová: *Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins*, *Journal of Chromatography A* 1087 (2005) 104–111

J. Suchánková, K. Soukupová, E. Tesařová, Z. Bosáková, P. Coufal: *Separation and Quantification of Enkephalin and Vasopressin Related Peptides in Reversed Phase Capillary Liquid Chromatography*, *Chromatographia* 60 (2004) S119–S124

### Přednášky:

K. Soukupová: Comparison of zirconia-based and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins, *2<sup>nd</sup> International conference „Modern Analytical Chemistry”*, PřF UK Praha, 25. 1. 2005

K. Soukupová: Separace biologicky aktivních látek v RP HPLC na kolonách na bázi oxidu zirkoničitého, *SPE and HPLC seminář organizovaný firmou Sigma–Aldrich*, ÚOCHB Praha, 22. 10. 2004

K. Soukupová: Využití cLC pro separaci biologicky aktivních látek – peptidů, *SPE and HPLC seminář organizovaný firmou Sigma–Aldrich*, ÚOCHB Praha, 21. 11. 2003

**Plakátová sdělení:**

K. Soukupová, L. Janečková, J. Suchánková, E. Tesařová: New reversed stationary phases applied to separation of selected biologically active compound, *12<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences ISSS 2006*, Lipica, Slovinsko, 27.–29. 9. 2006

K. Soukupová, J. Kodeš, J. Suchánková, E. Tesařová: New reversed stationary phases and their use for separation of biologically active peptides, *11<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences ISSS 2005*, Pardubice, 12.–14. 9. 2005

K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová: Comparison of separation behaviour of some biologically active compounds on zirconia- and silica-based RP-HPLC stationary phases, *25<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography*, Paříž, Francie, 4.– 8. 10. 2004

K. Soukupová, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková: Capillary liquid chromatography for separation of biologically active peptides, *5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-performance Separation Methods*, Siófok, Maďarsko, 3.– 5. 9. 2003

J. Suchánková, K. Soukupová, E. Tesařová: Srovnání separace biologicky aktivních peptidů na různých reverzních stacionárních fázích, *IX. konference ACP 2002 Súčasný stav a perspektivy analytickém chemie v praxi*, Bratislava, Slovensko, září 2002