MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Separace peptidů pomocí monolitické HPLC

Bakalářská práce

Brno 2006 **Lenka Monincová**

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně. Použila jsem pouze uvedenou literaturu a experimentální výsledky dosažené v laboratořích Přírodovědecké fakulty MU v Brně.

Lenka Monincová

Především děkuji vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Janu Havlišovi, Dr. za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a připomínky a za odborné vedení při studiu a provádění praktické části.

Obsah

1. Úvod....6

2. Cíl práce....6

3. Peptidy....7

3.1 Charakter a základní vlastnosti peptidů důležité pro separaci....7
4. Separace peptidů....8

4.1 Chromatografické metody....8
4.1.1 Gelová permeační chromatografie....8
4.1.2 Iontově výměnná chromatografie....8
4.1.3 Afinitní chromatografie....9
4.1.4 Chromatografie na obrácených fázích....9
4.1.5 Chromatografie s hydrofobní interakcí....10
4.1.6 Gradientová eluce....10
4.2 Elektromigrační metody....10
4.2.1 Plošná zónová elektroforéza....11
4.2.2 Kapilární zónová elektroforéza....11
4.3 Dvojrozměrné metody....11
5. Detekce peptidů....12

5.1 Absorpční spektrometrie v UV oblasti....12
5.2 Fluorescenční emisní spektrometrie....12
5.3 Hmotnostní spektrometrie....13
5.3.1 ESI....13
5.3.2 MALDI....14
5.3.3 Srovnání ESI a MALDI....15
5.3.4 Detekční chemická činidla....15
6. Monolitické stacionární fáze....15

6.1 Historie vývoje monolitické stacionární fáze....16
6.2 Charakteristika monolitických materiálů....16
6.3 Monolity na bázi siliky....17
6.4 Monolity z organických materiálů....20
6.5 Polymerní disky....24
7. Využití monolitických stacionárních fází pro separaci peptidů....24

7.1 Monolity z organických materiálů....24
7.2 Monolity na bázi siliky....26
7.3 Kolona Onyx....29
8. Experimentální srovnání separačních vlastností částicové a monolitické kolony....31

8.1 Separace testovací směsi....31
Tab.3: Srovnání počtu teoretických pater testovací směsi na koloně Luna a Onyx....32
Tab.4: Srovnání rozlišení píků testovací směsi na koloně Luna a Onyx....35
8.2 Separace nukleotidů....35
8.2.1 Separace nukleotidů - vzorek 1....35
8.2.2 Separace nukleotidů - vzorek 2....37
8.3 Separace peptidů....40
8.4 Závěr....41
9. Literatura....43

10. Zkratky.....45

1. Úvod

Peptidy mají v živé přírodě významnou úlohu. Peptidy nejsou jen produkty, resp. meziprodukty, odbourávání bílkovin, ale vznikají také sami o sobě a mohou být i uměle syntetizovány. Často vykazují významnou biologickou aktivitu. Jejich studium, včetně separace a to na úrovni preparativní nebo analytické, je časté v chemii, biologii, biotechnologii, medicíně, farmacii a v zemědělství. Roste také význam peptidového mapování, které přestavuje velmi účinnou metodu pro analýzu struktury bílkovin.

Vývoj nových metod klade důraz nejen na vysoké rozlišení a citlivost, ale také na dobu separace a spojení s detekčními technikami jako je hmotnostní spektrometrie. Vysoceúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích představuje analytickou metodu, která vykazuje vysokou citlivost, selektivitu a reprodukovatelnost. Nabízí možnost plné automatizace a přímého napojení na hmotnostní spektrometr.

Kolona s monolitickou stacionární fází je nový druh kolony využitelné v RP-HPLC. Je to potenciální nástupce klasických náplňových kolon s řadou předností. Nabízí při zachování účinnosti a selektivity mnohem vyšší průtokové rychlosti při nižších tlacích na koloně, což vede ke zkrácení doby analýzy.

2. Cíl práce

Cílem mé práce bylo vytvořit rešerši o separaci peptidů se zaměřením na využití monolitických kolon pro separaci peptidů. Dále bylo cílem této práce se seznámit s technikou HPLC s použitím částicové kolony (Luna) a monolitické kolony (Onyx), porovnat jejich separační parametry a tak se seznámit se základní problematikou této techniky.

3. Peptidy

Za peptidy jsou považovány sloučeniny obsahující od 2 do 50 aminokyselinových zbytků. Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny peptidovou vazbou v řetězec. Tato vazba je vazbou amidovou, která formálně vzniká kondenzací karboxylové skupiny a aminoskupiny dvou aminokyselin. Peptidy na rozdíl od bílkovin, které jsou produktem proteosyntézy řízené genetickou informací, vznikají buď až sekundárně z proteinů nebo jednoduchou biosyntézou bez použití proteosyntetického aparátu. Peptidy lze syntetizovat i uměle. Jiné než kódované aminokyseliny a vedle L-enantiomerů i D-isomery mohou obsahovat ty peptidy, které nevznikly proteosynteticky. Peptidy mohou tvořit také cyklické struktury, spojením koncových aminokyselin, nebo prostřednictvím disulfidových vazeb [17].

3.1 Charakter a základní vlastnosti peptidů důležité pro separaci

Peptidy představují rozsáhlou skupinu sloučenin s rozdílnými vlastnostmi, které se dají využít při separaci v HPLC. Zatímco dipeptidy jsou malé molekuly s molekulovou hmotností řádu stovek, velké peptidy dosahují molekulové hmotnosti i několik tisíc hmotnostních jednotek.

Vlastnosti nejmenších peptidů jsou podobné jednotlivým aminokyselinám, které obsahují. Se vzrůstajícím počtem aminokyselinových zbytků roste důležitost primární struktury peptidu (složení a sekvence aminokyselin). U peptidů obsahující více než 15 aminokyselinových zbytků začíná hrát významnou roli sekundární struktura. U největších peptidů může mít rozhodující efekt v retenčním chováním i struktura terciální a kvartérní [18]. Charakter postranních řetězců a substitučních skupin udávají acidobazické vlastnosti a stupeň hydrofobicity a hydrofility. Tyto vlastnosti pak ovlivňují chování v chromatografii.

Pro separační techniky, ve kterých hraje významnou roli náboj peptidu je významnou vlastností obojetnost náboje peptidů. Peptidy jsou tedy látky, které mají v důsledku vnitřní ionizace kladné i záporné náboje. Při vysokém pH ionizují kyselé skupiny a částice mají záporný náboj. Při nízkém pH naopak zásadité skupiny a celkový náboj molekuly je kladný. pH, při kterém má peptid nulový sumární náboj se nazývá izoelektrický bod. V tomto bodě se peptid nepohybuje v elektrickém poli [19].

4. Separace peptidů

Důvodů k separaci a analýze peptidů je mnoho. Peptidy mohou být izolovány z přírodních materiálů nebo být uměle syntetizovány. Jejich analýza pak může sloužit ke zjištění čistoty a identity získaných peptidů, ke kontrole čistoty například ve farmaceutických firmách, k identifikaci peptidů z různých zdrojů v medicíně, biologii nebo zemědělství a především k peptidovému mapování [18].

4.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou separační metody, které využívají k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěmi fázemi - nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně-chemických interakcí mezi složkami a mobilní fází, složkami a stacionární fází a také mobilní a stacionární fází. Pro separaci peptidů se používá chromatografie kapalinová, ve které je mobilní fáze kapalná.

4.1.1 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je tradiční metodou dělící peptidy podle molekulové velikosti [18, 19]. Kolona v GPC je naplněna zrny gelu obsahující póry. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji a mají tedy vyšší retenční časy [5]. GPC může být využita k předseparaci směsi na menší skupiny analytů, které jsou dále separovány jinou technikou [18, 19].

4.1.2 Iontově výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie (IEC) je metoda založena na vratné výměně iontů mezi mobilní a stacionární fází [19]. Jednotlivé látky se váží na ionex pouze tehdy, jestliže nesou náboj opačný než je náboj ionexu. Mohou být použity oba druhy iontoměničů: anexy, které jsou kladně nabité a tedy vážou anionty nebo katexy, které jsou nabité záporně a vážou kationty. K separaci látek ze směsi dochází proto, že jednotlivé látky mají různou afinitu k ionexu, způsobenou rozdíly v nábojích. Síla vazby závisí na velikosti rozdílu v nábojích mezi ionexem a danou látkou [26]. V případě peptidů hraje významnou roli pH, protože náboj peptidu závisí na pH a na izoelektrickém bodu peptidu. Eluce zpravidla bývá gradientová, kdy se zvyšuje iontová síla nebo mění pH mobilní fáze [28]. IEC může být aplikována na široké rozmezí velikosti peptidů, avšak vykazuje menší separační účinnost

oproti RP-HPLC a přítomnost mnoha aktivních míst ve velkých peptidech může vést k velmi silné sorbci [18, 19].

4.1.3 Afinitní chromatografie

Peptidy obsahující velmi specifické funkční nebo aktivní skupiny mohou být izolovány afinitní chromatografií (AC). Chromatografie využívá funkční skupinu vázanou na pevném nosiči, která má specifickou afinitu k danému peptidu. Ligand navázaný na nosič může být biospecifický (enzym, substrát, protilátka, receptor) nebo pseudo-biospecifický (př. laktin, barvivo). Druhá skupina ligandů nabývá na významnosti pro svoji stabilitu, snadnost navázání na nosič a nižší cenu oproti bioligandům. Afinitní chromatografií jsme schopni vydělit i jediný protein ze složité směsi [20].

4.1.4 Chromatografie na obrácených fázích

Nejrozšířenější metodou pro separaci peptidů se stává chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC). Dělí látky na základě různě silných hydrofobních interakcí s chromatografickým nosičem obsahující hydrofobní skupiny. Hydrofobními ligandy jsou nejčastěji oktadecyl (C18), dodecyl (C12), oktyl (C8), butyl (C4) či fenyl (Phe). V RP-HPLC se používá nepolární stacionární fáze a mobilní fáze v definovaném stupni polarity. Toto může někdy vést k problémům spojených s nevratnými denaturačními změnami velkých peptidů následkem vysoké hydrofobicity stacionární fáze a nízké polarity mobilní fáze a tím i ztrátě jejich biologické aktivity [18, 21]. Bylo zjištěno, že navázané alkylové řetězce ne delší než butyl jsou vhodné pro separaci velkých peptidů a proteinů, protože je možné použít mobilní fázi obsahující větší množství vody a tak potlačit možnou denaturaci [18].

Význam RP-HPLC pro separaci peptidů postupně rostl, především díky novým objevům a zlepšování techniky. Významný přínos v RP-HPLC byl objev iontově párových činidel, které zvyšují citlivost a výtěžnost. Dále možnost výroby vysoce čistých a vysoce porézních křemenných nosičů, které zvyšují rozlišení a výtěžnost a možnost navázání rozdílných alkylsilanových skupin a derivatizace povrchu stacionární fáze, což zvyšuje citlivost a životnost kolony [24].

Jako mobilní fáze se nejčastěji v RP-HPLC používá směs vody s organickým rozpouštědlem jako je acetonitril nebo methanol s malým přídavkem kyseliny trifluoroctové (TFA) s výsledným pH 2. TFA sloužící jako iontově párové činidlo [27] má

nízkou hodnotu pK_a (pK_a = 0,30), takže se vyskytuje v disociované formě [39]. Vysoká kyselost TFA zajistí, že všechny peptidy jsou kladně nabité (pK_a C-terminální karboxylové skupiny je *cca* 2,0) [42]. Díky své amfifilní povaze se TFA dokáže adsorbovat na povrch stacionární fáze a učiní tím některé alkylové řetězce záporně nabitými. V tomto systému se vyskytují interakce mezi hydrofobní částí analytu a hydrofobním povrchem a elektrostatické interakce mezi nabitou částí analytu a iontem organické kyseliny adsorbované na hydrofobním povrchu [36].

4.1.5 Chromatografie s hydrofobní interakcí

V chromatografii s hydrofobní interakcí (HIC) je stacionární fáze řídce osazena hydrofobními ligandy, takže hydrofobní interakce biomolekul není tak silná jako v případě RP-HPLC. Jako mobilní fáze se používají vodní roztoky solí s velkou iontovou silou [18]. Lze použít sestupný gradient, kdy na začátku separace se použije mobilní fáze s vysokou iontovou silou, proteiny se naváží na stacionární fázi a postupným snižováním iontové síly dochází k oslabování hydrofobních interakcí proteinu s nosičem a k jejich postupné eluci z kolony. Za těchto podmínek je sníženo nebezpečí denaturace [18, 25].

4.1.6 Gradientová eluce

Podíl polární a nepolární (vody a organické) složky v mobilní fázi může být po celou dobu separace stejný (izokratická eluce) nebo se podíl jedné složky v mobilní fázi během analýzy mění (gradientová eluce). Při separaci větší směsi biomakromolekul se využívá gradientová eluce, protože jednotlivé komponenty mívají značně rozdílnou retenci. Takže využití gradientu u mobilní fáze je schopno urychlit eluci a tím dosáhnout rozumnější dobu separace. Lze ji využít při chromatografii na obrácených fázích, s hydrofobní interakcí i při iontově výměnné chromatografii [1].

4.2 Elektromigrační metody

Elektromigrační separační metody jsou založeny na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato pohyblivost závisí na velikosti náboje, na velikosti a tvaru molekul, na povaze nosiče, na podmínkách prostředí a na síle elektrického pole. Velikost náboje potom ovlivňuje stupeň ionizace, iontová síla a pH prostředí.

4.2.1 Plošná zónová elektroforéza

Plošná zónová elektroforéza je elektromigrační metoda, která se provádí na vhodném plošném nosiči, který je napuštěn elektrolytem. Po vložení napětí na protilehlé strany se oddělí zóny obsahující jednotlivé složky.

Pro účely separace peptidů je široce užívaná metoda v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti anionického detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). SDS, který v přítomnosti činidel štěpí disulfidické můstky, peptid kompletně disociuje na podjednotky a afinitně interaguje s denaturovanými řetězci proteinů/peptidů, čímž jim udělí jednotný negativní náboj na jednotku molekulové hmotnosti. Rychlost migrace v polyakrylamidovém gelu je pak dána jen molekulovou hmotností analytu.

Hlavní nevýhodou plošné zónové elektroforézy je vysoká pravděpodobnost překrytí zón jednotlivých peptidových fragmentů. Proto je v současnosti tato metoda nahrazována dvojrozměrnými technikami. Plošná zónová elektroforéza je snadno proveditelná, ale obvykle probíhá i několik hodin, je obtížné ji automatizovat a kvantitativně vyhodnocovat. [5, 21].

4.2.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza využívá pro dělení velmi tenké kapiláry o vnitřním průměru 50 až 75 μm. Jejichž výhodou je, že rychle odvádějí teplo, proto se mohou použít elektrická pole s vysokým napětím, čímž se sníží čas potřebný pro rozdělení vzorku. Zóny jednotlivých látek migrují konstantní rychlostí a postupně se od sebe vzdalují. Tato metoda má nejen vysoký stupeň rozlišení, ale může být snadno automatizována [21].

4.3 Dvojrozměrné metody

Při separaci či analýze složité směsi peptidů může být použití jedné metody nedokonalé. Avšak použitím kombinací dvou na sobě nezávislých metod separace můžeme získat velmi účinnou a citlivou metodu [21]. Nejčastější kombinace metod může být kombinace dvou PAGE, kdy druhá probíhá ve směru pootočeném o 90°, kombinace PAGE a SDS-PAGE (v jednom směru se látky rozdělují podle náboje, ve druhém podle velikosti molekuly) nebo izoelektrické fokuzace (IEF) a SDS-PAGE (v jednom směru se látky rozdělují podle izoelektrického bodu, ve druhém podle velikosti molekuly) [26]. Separované peptidy jsou nejčastěji detekovány nespecifickým barvením, nebo lze pro zvýšení citlivosti použít fluorescenční či radioaktivní značení [21]. Ač jsou tyto metody

široce rozšířené, trpí technickým omezením - např. je omezen počet peptidů, které lze na gel nanést, problémy s analýzou příliš kyselých nebo bazických peptidů.

Alternativou k 2D PAGE je možnost využití kapalinové chromatografie, tedy 2D HPLC. 2D HPLC nabízí vysokou rozlišovací schopnost, reprodukovatelnost a možnost napojení na hmotnostní spektrometr. Velkou výhodou je široký výběr ze stacionárních a mobilních fází, které dělají z kapalinové chromatografie všestrannou techniku. Lze kombinovat jednotlivé druhy kapalinové chromatografie: AC, RP-HPLC, IEC, GPC. Manipulace se vzorkem je v 2D HPLC minimální narozdíl při použití gelu [27].

5. Detekce peptidů

Detekce separovaných peptidů může být provedena pomocí přímého či nepřímého stanovení peptidů. Přímá stanovení jsou založena na měření určité fyzikální vlastnosti analyzovaného peptidu - např. pomocí absorpční spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, emisní fluorescenční spektrometrie. Při nepřímých metodách jsou měřeny komplexy peptidů s činidly. Výběr vhodné detekční metody závisí na použité separační metodě.

Separační metody v plošném uspořádání využívají k detekci spíše reakce s chemickými činidly, fluorescenční nebo radioaktivní značení. Kapilární elektroforéza a kapalinová chromatografie využívá přímé metody [21].

5.1 Absorpční spektrometrie v UV oblasti

Přímé spektrofotometrické stanovení peptidů v oblasti absorpce peptidových vazeb (210-220 nm) nebo aromatických kyselin (280 nm) je rychlá a poměrně citlivá metoda. Absorbance při 280 nm závisí výrazně na složení peptidu. V této oblasti je totiž možno detekovat pouze peptidy s aromatickými aminokyselinovými zbytky. Jinou možností je chemická derivatizace peptidů činidly jako je ninhydrin, dansylchlorid nebo fenylisokyanát a následné měření absorbance takto vzniklých komplexů. Hlavním omezením absorpční spektrometrie v UV oblasti je vysoká absorbance v UV oblasti některých roztoků používaných pro separaci peptidů, jež ruší stanovení zejména v oblasti 210-220 nm [19].

5.2 Fluorescenční emisní spektrometrie

Pro měření fluorescence je nezbytnou podmínkou přítomnost fluoroforu. V peptidech jsou přirozené vnitřní fluorofory aromatické zbytky aminokyselin tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Absorpční pás těchto aminokyselin leží v rozmezí 240-300 nm.

Budí-li se tyto aminokyseliny zářením v této spektrální oblasti můžeme pozorovat fluorescenci [19. 21].

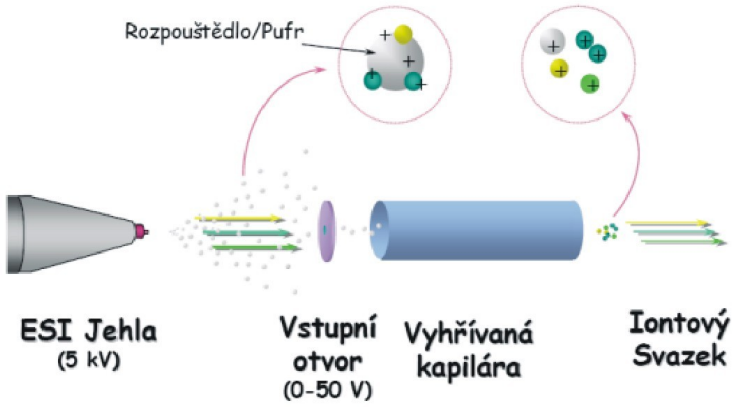
Častěji se využívají vnější fluorofory s dobře definovanými chemickými a fluorescenčními vlastnostmi, které se přidávají k analyzovanému peptidu. K derivatizaci peptidů fluorogenními činidly se využívá dansylchlorid, fluorescamin nebo *o*-ftalaldehyd [19. 21].

5.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje detekční techniku, jejíž předností je univerzálnost a citlivost. Touto metodou můžeme zjistit nejen molekulovou hmotnost peptidů, ale i totožnost odpovídajících aminokyselinových zbytků. Molekuly separované látky jsou nejprve ionizovány a poté se nabité částice rozdělují v prostoru nebo čase podle poměru hmotnosti a náboje (*m/z*) [21]. Základními součástmi každého hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor [22]. Využití MS při detekci látek s vyšší molekulovou hmotností, tedy i peptidů, bylo možné, až s vývojem „měkkých“ ionizačních technik, které předcházejí nežádoucímu štěpení [30]. Nejvhodnější techniky pro práci s peptidy je technika MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization, ionizace laserem za přítomnosti matrice) kombinovaná s TOF (time-of-fligh, analyzátor doby letu) a ionizace elektosprejem (ESI) kombinovaná s kvadrupolovým hmotnostním analyzátorem. Starší metoda bombardování rychlými atomy se sice stále používá, ale je méně citlivá a použitelná do molekulové hmotnosti 10 kDa [23].

5.3.1 ESI

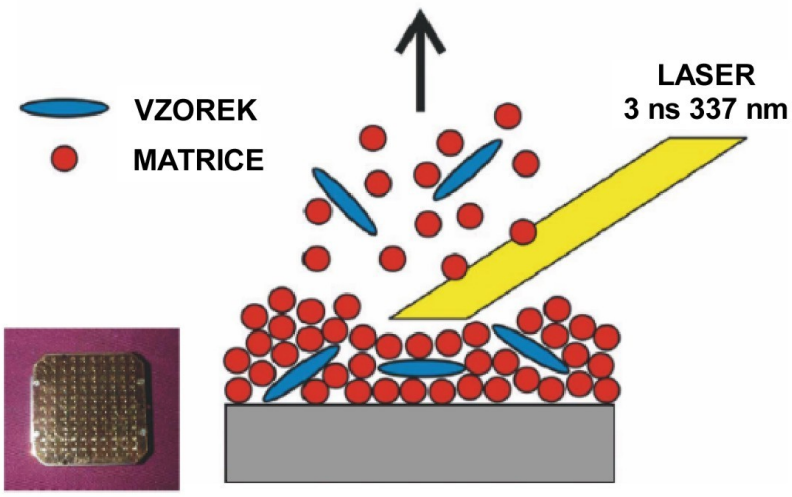
Při ionizaci elektrosprejem (ESI) prochází po výstupu z chromatografické kolony eluát kapilárou, na které je vloženo napětí (3-5 kV). Na výstupu z kapiláry vznikají malé kapičky, které nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarity vloženého napětí na kapiláru. Dalším odpařováním rozpouštědla (vysoušení proudem suchého dusíku nebo modifikace s vyhřívanou kapilárou) dochází ke zmenšení velikosti kapiček a tím i ke zvětšení hustoty povrchového náboje, až dojde k tzv. coulombické explozi, při které se uvolní ionty, které odchází do spektrometru [31, 32].



Obr.1: Schéma ionizace molekul elektrosprejem [43]

5.3.2 MALDI

Při použití metody MALDI se nechá vzorek vykrystalovat na vhodném nosiči (například na nerezové destičce) s tzv. matricí, která je oproti vzorku v nadbytku. Tato směs je zasažena nanosekundovým pulzem laseru. Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Analyt je tedy převeden do plynné fáze nepřímo. Matrice se volí podle typu vzorku a typu použitého laseru. V případě UV laserů to bývají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin (kyselina 2,5-dihydroxybenzeoová, kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina sinapová, kyselina ferulová), které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti [31, 32, 33].



Obr.2: Schéma ionizace molekul metodou MALDI [43]

5.3.3 Srovnání ESI a MALDI

Použití MALDI MS a ESI MS pro detekci peptidů má své výhody i nevýhody. Příprava vzorků pro MALDI MS je rychlá a jednoduchá a spotřeba vzorku je malá. Hmotnostní spektra mohou být získány v poměrně krátkém čase. Jednou z nevýhod, která se může objevit u MALDI, je přednostní ionizace některých složek před ostatními. Signál z hmotnostního spektrometru je pak závislý na začlenění analytu do krystalu matrice a účinnosti ionizace na jednotlivé části analytu. To je jeden z důvodů proč tato metoda není kvantitativní technikou. Pro analýzu proteinů 30 kDa a výše má MALDI MS už relativně nízké rozlišení.

ESI MS je vhodná ke stanovení molekulové hmotnosti až 150 kDa, ale požadavky na čistotu peptidu či proteinu jsou zde vyšší než u MALDI MS. ESI MS je metoda semi-kvantitativní, což znamená, že hmotnostní spektrometr reaguje úměrně koncentraci peptidu, ale tato reakce je závislá i na dalších veličinách [23].

5.3.4 Detekční chemická činidla

Detekční chemická činidla reagují na principu slabých interakcí nespecificky s peptidovými fragmenty a vznikají barevné komplexy, které lze měřit spektrofotometricky. Tyto detekční metody se využívají hlavně v plošném experimentálním uspořádání [21]. K vizualizaci peptidů a proteinů se používá barviva modř Coomassie Brilliant, rubínová Sypro a barvení stříbrem. Barvení modří Coomassie Brilliant je kvantitativní a gel po gelové elektroforéze lze po barvení použít pro analýzu hmotnostní spektrometrií. Barvení stříbrem je citlivější, ale stříbrné ionty se váží jen na některé aminokyselinové zbytky, proto ji nelze považovat za plně kvantitativní. Florescenční metody barvení pomocí rubínové Sypro je jednoduché, kvantitativní, citlivé, kompaktibilní s MS, ale jejich nevýhodou je vysoká cena [38].

6. Monolitické stacionární fáze

Při zkvalitňování separace zmenšováním rozměru částic v klasických náplňových kolonách pro HPLC se objevují negativní jevy. Zrníčka sorbentu kladou prostupující kapalině značný hydrodynamický odpor. Pro zvýšení účinnosti je proto nutné využít vyšších protitlaků. Monolity se vyhýbají tomuto problému, protože vytvářejí jednotný souvislý kus materiálu s vysokou pórovitostí, takže neobsahují mezičásticové prostory a zajišťují průtok skrz kolonu pomocí pórů [4]. Během vývoje byly zveřejněny přístupy

zahrnující jak přípravu systémů vyznačující se pouze některými prvky charakteristickými pro monolity (kazety naplněné vrstvenými listy modifikované celulózy nebo srolované tkaniny), tak i technologie skutečně monolitické (stlačené hydrofilní gely, polymerní makroporézní disky, kolony, trubice a monolity na bázi siliky) [2]. Monolity lze využít nejen v HPLC, ale také v elektrochromatografii a plynové chromatografii.

6.1 Historie vývoje monolitické stacionární fáze

První pokus o monolitické separační média byl proveden v laboratoři M. Kubína *et al.* v roce 1967. Houbovitý polymerní gel připravili radikálovou polymerací vodného roztoku 2-hydroxyethylmetakrylátu s 0,2% ethylendimethakrylátem, sloužící jako síťovadlo, ve skleněné trubici. Poté gel vyjmuli, vyvařili ve vodě a zasunuli do skleněné kolony. Efektivita takto vytvořeného separačního média byla velice malá a postrádala vhodnou průchodnost [2]. V 70. letech Roos *et al.* vytvořili kolony obsahující polyurethanovou pěnu použitelnou pro HPLC i pro GC. Kolony měly dobrou průchodnost, ale postrádaly stabilitu vůči rozpouštědlu [3]. Další zkoumané monolitické materiály byly makroporézní disky a stlačené gely umístěné v kazetě nebo koloně [1]. Jemnými houbovitými polyakrylamidovými stlačenými gely se v roce 1989 zabývali Hjertén *et al.* Tyto gely nebyly schopny odolávat tlaku spojeného s vysokou průtokovou rychlostí, potřebné k rychlé analýze [3]. Na počátku 90. let Švec a Fréchet se zaměřili na nový druh pevných makroporézních monolitů. Ty byly vytvořeny polymerací směsi monomeru a rozpouštědla v uzavřené trubici, ve které pak byly přímo používány [1]. Využití monomerních materiálů vyzkoušeli také v kapilární elektrochromatografii [3]. Nakanishi *et al.* v roce 1991 vyvinuli proces pro přípravu porézních tyčinek z oxidu křemičitého, který spočíval v hydrolýze a polykondenzaci tetramethoxysilanu v přítomnosti polyethylenoxidu. První popsaná aplikace těchto tyčinek na bázi siliky byly publikovány Tanakou *et al.* v roce 1996 [4].

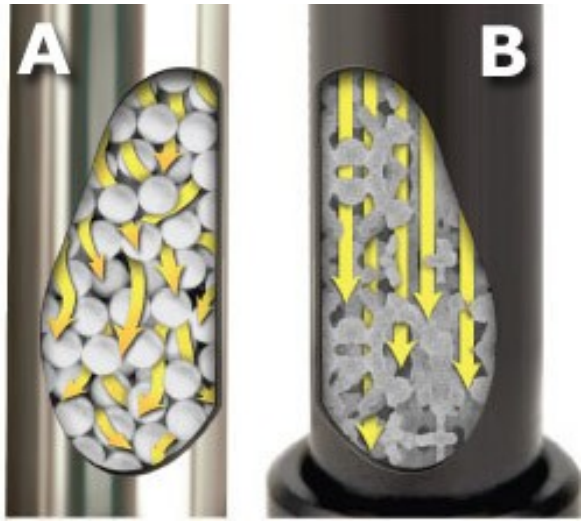
6.2 Charakteristika monolitických materiálů

Monolity můžeme přirovnat k jedné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Neobsahují mezičásticové prostory jako klasické náplňové kolony, proto musí veškerá mobilní fáze nutně protékat póry monolitu [2].

Z praktických důvodů by měl být tlak potřebný k průtoku kapaliny skrz chromatografický systém co nejnižší. V klasických náplňových kolonách je nutné pro vyšší účinnost kolony použít malých zrníček sorbentu, která však kladou prostupující kapalině

značný hydrodynamický odpor. Proto je nutné pracovat při vysokém tlaku. Je zřejmé, že nižší odpor bude v materiálu obsahující velké množství širokých kanálků. Avšak k účinné separaci se vyžaduje velká plocha povrchu, který právě vytvářejí malé póry v monolitu. Ideální monolit by měl tedy obsahovat obojí, jak dostatečně velké kanálky umožňující dostatečnou propustnost, tak pospojovanou síť kratších a menších pórů vytvářející velkou kapacitu [1].

Vyhledávané vlastnosti monolitických kolon jsou snadná příprava, absence koncových frit, nízký tlak na koloně a malý odpor proti převodu hmoty, čímž získáváme rychlé analýzy s vysokou účinností separace [6].



Obr. 3: A: částicová fáze; B: monolitická fáze [7]

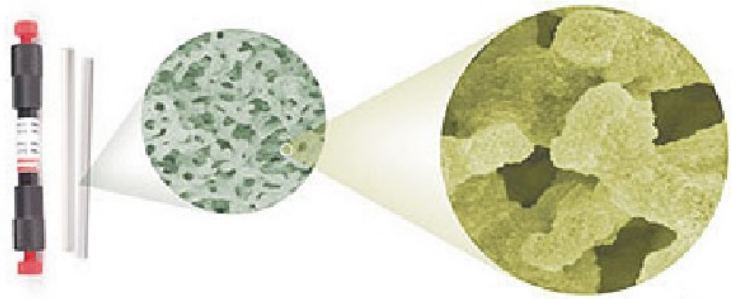
Nevýhodou u monolitických kolon je špatná reprodukovatelnost a problémy se zapouzdřením monolitu, především u monolitů na bázi siliky.

Monolitické kolony rozlišujeme na dva základní typy: anorganické monolity na bázi siliky a na kolony z organických materiálů jako polystyren, polyakrylamid či methakrylát [3].

6.3 Monolity na bázi siliky

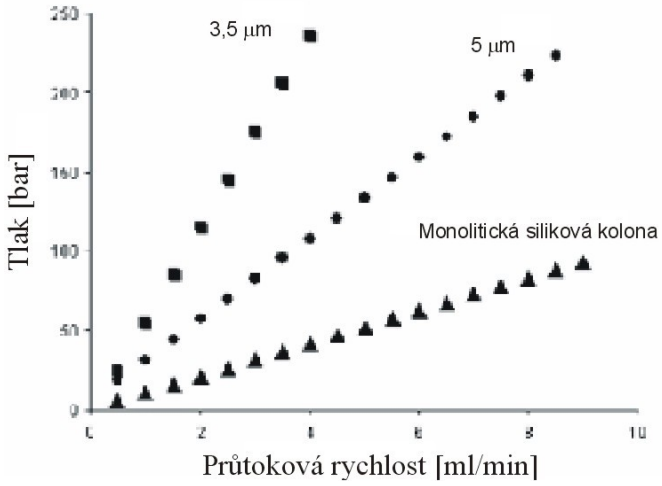
Na konci 90. let vzrostlo významně počet publikací zaměřených na monolitické kolony z materiálů na bázi oxidu křemičitého, pro něhož se vžil název silika. Struktura silikového monolitu je bimodální - skládá se z křemenné kostry, z makropórů (0,5 -8 μm) a mezopórů (2-20 nm) [3]. Makropóry tvoří prostorovou síť, kterou může mobilní fáze za

nízkého tlaku rychle protékat a dramaticky tak snížit dobu separace. Mezopóry s velkým povrchem vytvářejí naopak jemnou porézní strukturu vnitřku kolony. Na vnitřním povrchu makropórů dochází díky odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem analytů k jejich separaci [7].



Obr 4. Bimodální struktura monolitu [7].

Celková porozita v monolitické silikové koloně může dosahovat až 85 %, to je o 15-20 % více než v náplňové koloně s průměrem částic 5 µm. Výsledek vysoké pórovitosti monolitické kolony je nízký odpor k toku. Jak ukazuje Obr. 5 nižší a tedy příznivější tlaky na koloně vykazuje monolitická siliková kolona než náplňové kolony s velikostí částic 3,5 a 5 µm a tudíž lze pracovat s vyššími průtokovými rychlostmi a dosáhnout rychlejší separace [4]. Monolitická siliková kolona o vnitřním průměru 4,6 mm umožňuje použití průtokové rychlosti až 9 ml/min, aniž by tlak přesáhl 8 MPa, což jsou podmínky nepředstavitelné pro stejnou kolonu naplněnou 5 µm částicemi [2].



Obr. 5: Srovnání závislosti zpětných tlaků na průtokové rychlosti u monolitické silikové kolony a klasických náplňových kolonách s velikostí částic 3,5 a 5 µm [4].

Monolitická siliková kolona může být připravena buď ve formě (6-9 mm I.D. skleněná trubice) nebo v tavené křemenné kapiláře. Tetramethoxysilan (TMOS) nebo tetraethoxysilan (TEOS) je podroben hydrolytické polymeraci ve vodném roztoku kyseliny octové ze přítomnosti polyethylenglykolu (PEG), který slouží jako porogenní činidlo a formuje křemíkovou síťovou strukturu. Při přípravě ve formě je proces doprovázen snížením objemu celé struktury. Výsledný průměr je 4,6 mm, při použití 6 mm trubice a 7 mm, při použití 9 mm trubice. Výsledný silikový monolit je obalen PTFE (polytetrafluoroethylen) trubicí nebo trubicí z materiálu PEEK (poly(ether-ether-keton)). Při tomto postupu je omezení přípravy délky trubice a to na 15 cm a kratší [9]. Takhle připravenou kolonu jako první testoval Nakanishi *et al*.. Zaměřil se především na vysoký výkon a zároveň vysokou propustnost [8]. Současně tento typ monolitické silikové kolony vyrábí firma Merck pod značkou Chromolith. V roce 2000 to byla první komerčně dostupná monolitická kolona [3]. Při přípravě monolitické kolony v tavené křemenné kapiláře musí být křemíková kostra monolitu připojena ke stěně kapiláry, aby se zabránilo scvrkávání kostry. Trubice s menším průměrem (50 μm I.D.) dává lepší výsledky než trubice s většími vnitřními průměry.

Po vytvoření struktury monolitu jsou dále mezopóry upravovány vodním roztokem amoniaku. Monolitická kolona v kapiláře může být ještě upravena přímo v koloně chemickou modifikací s N,N-diethylaminodimethyloktadecylsilanem.

Výsledná monolitická kolona má bimodální porézní strukturu obsahující makropóry a mezopóry v silikové kostře. Proces vytvořený Nakanishim *et al.* dovoluje nezávislou kontrolu velikosti pórů. Takže je možné vytvořit větší či menší makropóry o velikost v rozsahu 1 až 8 μm a velikost mezopórů bude konstantní a naopak. Velikosti můžeme ovlivňovat změnou složení nebo koncentrace počáteční směsi TMOS a PEG [4,9].

Další postup při výrobě monolitické kolony na bázi siliky tzv. xerogel popsal Fields *et al*. [41]. Monolit byl připraven zahříváním roztoku křemičitanu draselného v 320 μm ID tavené křemenné kapiláře, tak se zabránilo pracnému následnému zapouzdření silikové trubičky. Následně byl povrch derivatizován použitím dimethyloktadecylchlorosilanu (ODS). I když taková kolona měla velice nízkou účinnost, byla docílena separace směsi polycyklických aromatických uhlovodíků [3, 4].

V roce 1998 Horvathem *et al.* byla popsána další výroba monolitických kolon. Tavená křemenná kapilára byla naplněna 6 μm velikými částicemi ODS, poté se kapilára

tepelně upravila, aby vznikla monolitická porézní siliková náplň. Po spečení byl monolit *in situ* znovu upraven pomocí ODS. Mechanická odolnost a stabilita této kolony byla podstatně větší než u příslušné klasické náplňové kolony. Tato kolona byla použita pro μ-HPLC a kapilární elektrochromatografii (CEC) [10].

Čtvrtý druh monolitické kolony na bázi siliky připravil Zare *et al*. Porézní xerogel je vytvořen v kapilární koloně a slouží jako podpora pro částicovou stacionární fázi, používanou v kapilární elektrochromatografii. ODS částice o velikosti 3-5 μm jsou včleněny do sol-gel roztoku naplněného v tavené křemenné kapiláře. Přítomnost částic v koloně významně zabraňuje potrhání matrice způsobené rozdílem tlaků vnitřního a tlaků v pórech sol-gelu. Výkon této sol-gel/ODS kapiláry byl testován na směsi aromatických a nearomatických organických částic [11].

Jedinečná vlastnost monolitických silikových kolon, jak už bylo zmíněno, je možnost nezávisle měnit velikost makropórů a mezopórů. Makropóry mohou být přirovnány k prostoru mezi částicemi v klasické náplňové koloně. Propustnost a zpětný tlak kolony je omezen na jedné straně makropóry a na straně druhé mezičásticovým prostorem. V částicové náplňové koloně závisí velikost mezičásticového prostoru na průměru částic. Na velikosti částic také závisí výkon kolony. Pokud kolona obsahuje částice s malým průměrem, má malou propustnost, ale vetší účinnost. Pokud kolona obsahuje velké částice, vykazuje vysokou propustnost, ale menší výkon. Takže výkon a propustnost nemůže být ovlivňována nezávisle na sobě. S monolitickou kolonou to možné je a to kontrolou velikost makro- a mezopórů [4].

Aplikace monolitických silikových kolon byla provedena v mnoha různých oblastech: bioanalytická separace, analýza léčiv a metabolitů, analýza látek významných v životním prostředí, potravinářských přísad, chirálních látek [4].

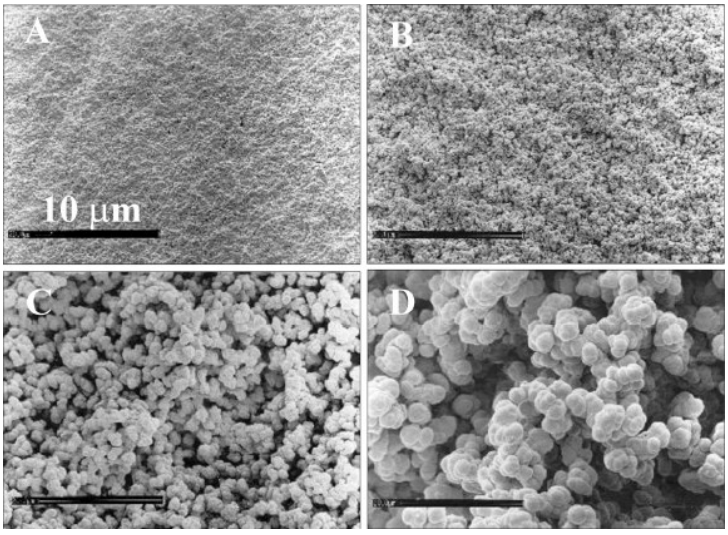
Další komerčně dostupná monolitická kolona na bázi siliky je kromě kolony Chromolith kolona Onyx od firmy Phenomenex.

6.4 Monolity z organických materiálů

Porézní struktura organických monolitů je odlišná od silikových monolitů. Struktura organických polymerů se skládá z pospojovaných skupin málo uspořádaných mikroglobulí s makropóry mezi nimi [2]. Aby povrch nabyl co největších rozměrů, musí být v polymeru včleněno spoustu malých pórů. Největší příspěvek k celkovému povrchu

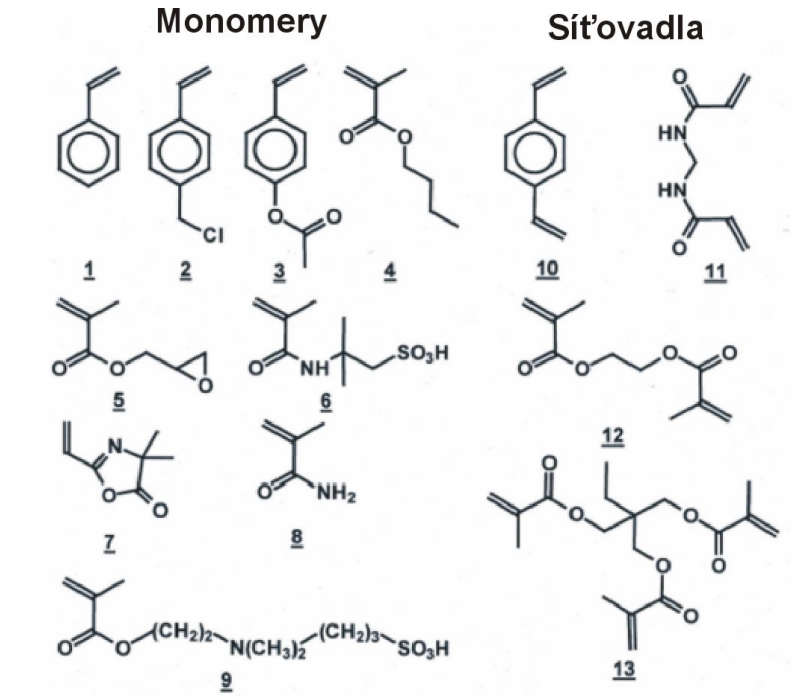
mají mikropóry (menší než 2 nm), poté mezopóry (2-50 nm) a největší póry (makropóry) přispívají k celkovému povrchu jen velice málo [1].

Permanentní porézní struktura je vytvořena během přípravy monolitu, která se uskutečňuje přímo v trubce kolony. Monolity se získávají radikálovou polymerací směsi, která obsahuje monomer, síťovadlo a inertní diluent sloužící jako porogenní činidlo. Nejčastěji používané monolity jsou styrendivinylbenzen, akrylát, methakrylát, vinylpiridin, vinylpyrrolidin, vinylacetát [1]. Monolity jsou připravovány přímo v trubici. Trubice může být z nerezavějící oceli, PEEK, ze skla nebo tavené křemenné kapiláry. Na jednom konci je trubice utěsněna, naplněna polymerační směsí a pak utěsněna i na druhém konci. Polymerizace je započata buď zahřátím v lázni o 55-80 °C, UV světlem nebo redoxní iniciací. Iniciace UV světlem může být použita pouze ve formách transparentních pro UV světlo jako jsou skleněné trubice a tavené křemenné kapiláry. Po ukončení polymerizace jsou utěsnění na koncích odstraněny, porogenní činidlo a jiné rozpustné látky jsou z trubice vymyty [1, 2]. Pórovitost lze ovlivnit změnami klíčových podmínek jako je teplota, složení roztoku porogenního činidla a výběr látky sloužící jako síťovadlo.



Obr. 6: Obrázky z elektronového mikroskopu zachycující vnitřní část organického monolitu, který byl připraven z polymerační směsi, ve které se měnilo zastoupení isooktanu v toluenu (porogenní roztok) a poměr porogenní roztok/monomer. Rozměr pórů: 35 (A), 225 (B), 4990 (C) a 6890 nm (D). [1].

Funkční skupiny monolitických kolon připravených přímou polymerací jsou dány použitými monomery. Příklady monomerů (1-9) a síťovadel (10-13) vidíme na Obr. 7. Jako monomery lze vybrat ze široké škály látek: hydrofilní akrylamid (8) a 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina (AMPS, 6), reaktivní glycidylmethakrylát (GMA, 5), chloromethylstyren (2), 2-vinyl-4,4-dimethylazolakton (VAZ, 7), s chráněnými skupinami 4-acetoxystyren (3), hydrofobní styren (ST, 1) a také sloučenina (N,N-dimethyl-N-methakryloyloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonia. Jako zesíťovadla lze použít divinylbenzen (10), N,N´-methylenbisakrylamid (11), ethylendimethakrylát (12) a trimethylolpropantrimethakrylát (13) [1].



Obr. 7: Příklady monomerů pro přípravu pevných polymerních monolitických kolon [1].

Huber *et al*. použili k dělení peptidů, proteinů, oligonukleotidů a DNA fragmentů monolitickou kapilární kolonu (200 μm I.D.) připravenou *in situ* radikálovou kopolymerací styrenu. Jako síťovadlo byl použit divinylbenzen a jako porogen směs tetrahydrofuranu a dekanolu. Vlastnosti monolitické kolony srovnali s náplňovou kolonou obsahující částice oktadecylpoly(styren-*co*-divinylbenzen) (PS-DVB-C18). Monolitická kolona vykazovala 3,6 krát vyšší separační účinnost a vyšší přenos hmoty pro oligonukleotidy než kolona náplňová. Tuto skutečnost vysvětlili tím, že povrch monolitu je hodně členitý. Lepší reprodukovatelnost byla dokázána u náplňové kolony, protože každá monolitická kolona je

v podstatě unikát. Kolona může být použita pro separaci s obrácenými fázemi, vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze [12, 13].

Jednokrokovou *in situ* přípravu organického monolitu pro separaci polárních aromatických sloučenin (pyridin, 4-pyridylmethanol, 4-methoxyphenol, 2-naftol, katechol, resorcinol, 2,7 -dihydroxynaftelen) uskutečnili Maruška *et al.* Roztok akrylového monomeru obsahující síťovadlo piperazindiakrylamid je polymerizován v tavené křemenné kapiláře, která je předem upravena 3-(trimetoxysilyl)propylmethakrylátem. Vytvořený monomer je kovalentně přichycen ke stěně křemenné kapiláry (100 μm I.D.) [14]. Separace může být popsána jako separace na normálních fázích, tak absorpční chromatografie.

Přípravou monolitů pro klasickou i μHPLC se zabývali Frechet *et al*. Navrhli pevnou monolitickou kolonu na bázi polyakrylamidu obsahující butylmethakrylát pro separaci proteinů s hydrofóbními interakcemi. Jejich cílem je připravit stacionární fázi pro elektrochromatografii, využitelnou k separaci bílkovin na čipu [15].

Mírně odlišný postup v přípravě organických monolitů tzv. ring-opening metathesis polymerisation (ROMP, polymerace přesmykem za otevření kruhu) popsal Buchmeiser [2]. Tato třída monolitických separačních médií se připraví z norborn-2-enu (NBE) a 1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4,5,8-exo,endo-dimethanonaftelenu (DMN-H6), které jsou kopolymerisovány s iniciátorem Grubbsova typu $Cl_2(PCy_3)_2Ru(=CHPh)$ v přítomnosti porogenní směsi toluenu a 2-propanolu. Proces se odehrává přímo v separační formě: HPLC koloně nebo kapiláře. Mikrostruktura monolitu závisí na polymeračních podmínkách a velikosti monolitu. Velikost pórů může být v průměru 2-30 μm. Tento monolit je vhodný pro separaci peptidů a proteinů [16].

Další možností řízení přítomnosti funkčních skupin je příprava monolitu s reaktivními skupinami a modifikace vzniklého polymeru. To vede k další skupině monolitů. Modifikace se snadno uskuteční použitím monolitu připraveného z monomeru obsahující reaktivní skupinu. Například monomery 2 a 5 na Obr. 7. Reakce poly(chloromethylstyren-*co*-divinylbenzenu) s ethylendiaminem a následně s γ-glukonolaktonem vede ke změně povrchové polarity z hydrofóbní na vysoce hydrofilní [1]. Derivatizovat lze také monolity vzniklé polymerací ROMP na bázi norbornenu a to přidáním jednoho kroku, kdy monolit na povrchu reaguje s iniciátorem a vzniká funkční skupina jako terciální amin, cyklodextrin nebo karboxylová kyselina [1].

Pokud chceme umocnit počet různých funkčních skupin, je lépe použít roubování. Při něm z každé povrchové skupiny roste řetězec obsahující četné nové funkční skupiny, které mohou významně zvýšit vazebnou kapacitu. Roubovat lze například monolit vzniklý s požitím stabilních volných radikálů, které v latentní formě zůstávají na povrchu pórů a teprve po jejich zaplnění novou polymerační směsí se aktivují zahřátím a iniciují další polymerační reakci. Iniciace lze započíst také pomocí UV světla, což umožňuje velmi účinnou a snadnou kontrolu chemicky vázaných funkčních skupin, protože lze vymezit určitou část, která se ozařuje. Tak lze také do jednoho monolitu umístit několik funkčních skupin [2].

Komerčně dostupné monolitické kolony na bázi organických látek jsou od slovinské firmy BIA Separations (modifikované polymethakrylátové kopolymery), od firmy BioRad (kopolymery methakrylamidových monomerů), od firmy ISCO (modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery) nebo od firmy LC Packings (polystyrendivinylbenzenové kopolymery) [2].

6.5 Polymerní disky

Organické monolity nemusí být pouze ve formě kolon, ale také jako makroporézní polymerní disky. Příprava je podobná jako u makroporézních polymerních kolon. Polymerační směs je naplněna do formy plochého nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí zpolymeruje. Po vyjmutí se vytvoří mechanickým obráběním disk. Většina diskových separačních médií se připravuje z glycidylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu, přičemž první z těchto monomerů umožňuje následnou modifikaci. Disky lze použít pro separaci s obrácenými fázemi, s iontovou výměnou, s hydrofobními interakcemi a separace bioafinitní. Disky umožňují velmi rychlé a vysoce účinné separace bílkovin a nukleových kyselin. Podle studie Tennikovové popis separace v tenkých monolitických vrstvách je zcela odlišná od separací docílených v podlouhlých kolonách [2].

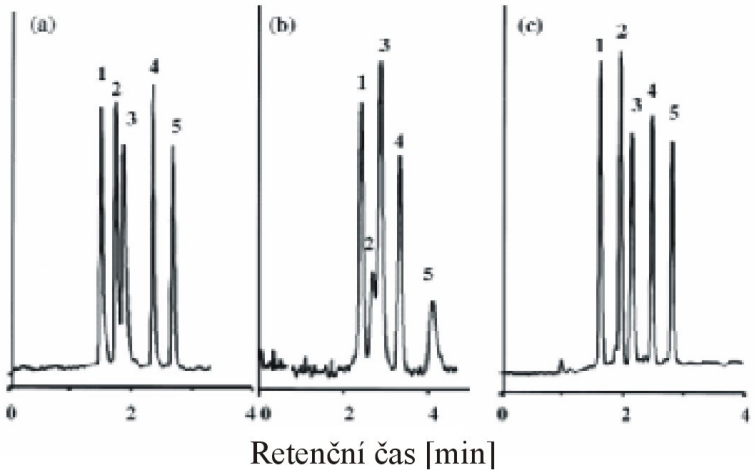
Komerčně dostupné disky vyrábí slovinská firma BIA Separations (modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery).

7. Využití monolitických stacionárních fází pro separaci peptidů

7.1 Monolity z organických materiálů

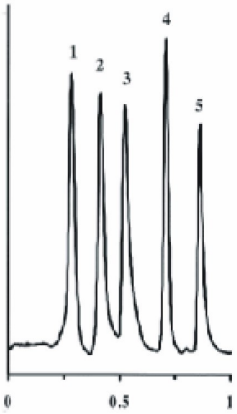
Pro RP-HPLC Švec *et al.* připravili monolitickou kolonu (50 × 4,6 mm) obsahující poly(styren-*co*-divinylbenzen) vhodnou pro separaci peptidů i proteinů. Separační

schopnosti kolony porovnávali s kolonami Hamilton PRP-1 (150 × 4,6 mm) obsahující 10μm částice z poly(styren-*co*-divinylbenzenu) a s kolonou Altech (150 × 4,6 mm) naplněnou 5μm částicemi s vázanou fází C8 na silikagelu. Pro test bylo použito 5 peptidů: bradykinin, leucinenkephalin, methioninenkephaline, physalaemin a substance P. Při průtokové rychlosti 2 ml/min bylo dosáhnuto nejlepší separace na koloně s fází C8 během 3 minut. Zatímco na monolitické a PRP-1 koloně bylo špatné rozlišení peptidů leucinenkephalin a methioninenkephalin (viz obr.8).



Obr.8: Separace peptidů při průtokové rychlosti 2 ml/min. Kolony (a) Monolitická, (b) Hamilton PRP-1; (c) Alltech C8. Gradient mobilní fáze: (a) 12-38 % MeCN v 0,15% vodném roztoku TFA během 4,3 min; (b) 15-32 % v 5.5 min; (c) 15-50 % v 4 min. Píky: bradykinine (1), leucine enkephaline (2), methionine enkephaline (3), physalaemin (4) a substance P (5). Detekce: UV 214 nm [29].

Avšak při průtokové rychlosti 5 ml/min a upravení gradientu mobilní fáze bylo na monolitické koloně také docíleno velmi dobré separace během 50 s, viz obr.9. Takový vzrůst rychlosti není možné u kolony C8, protože tlak na koloně by dosáhl mezní hranice pro možný tlak na koloně. Tento test dokázal, že monolitická kolona obsahující poly(styren-*co*-divinylbenzen) je vhodná pro rychlou separaci peptidů [29].



Obr.9: Separace peptidů na monolitické koloně při průtokové rychlosti 5 ml/min. Gradient mobilní fáze: 15-38 % MeCN v 0,15% vodném roztoku TFA během 41,5 min [29].

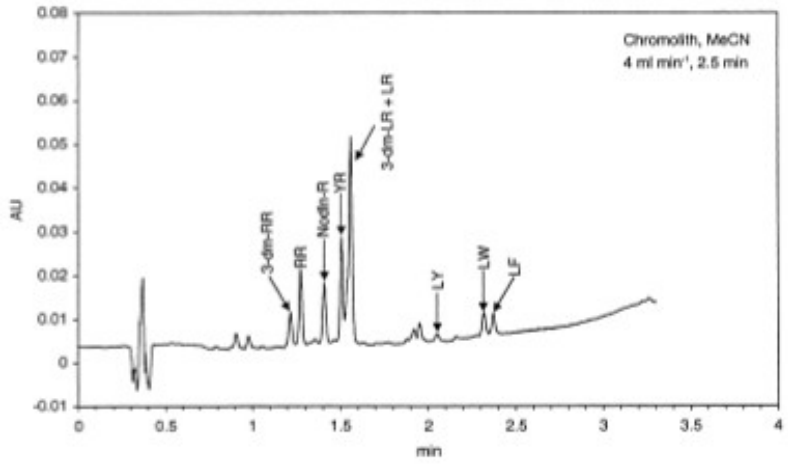
Pro separaci peptidů byli zhotoveny také kapilární monolitické kolony se stacionární fází z poly(styren-*co*-divinylbenzenu). Lze je vyrobit v různých velikostech. Premstaller *et al.* připravili kapilární kolonu dlouhou 6 cm s vnitřním průměrem 200 μm. Na ni dokázali, že monolitická kolona je schopna dosáhnout rychlé a účinné separace peptidů s následnou ESI-MS detekcí. Huang *et al.* zvýšili hydrofobicitu kapilární kolony (I.D. 75 a 125 μm) Friedel-Craftsovou reakcí s chloroktadekanem za přítomnosti katalyzátoru chloridu hlinitého, čímž také zvýšili výkon kolony [1].

7.2 Monolity na bázi siliky

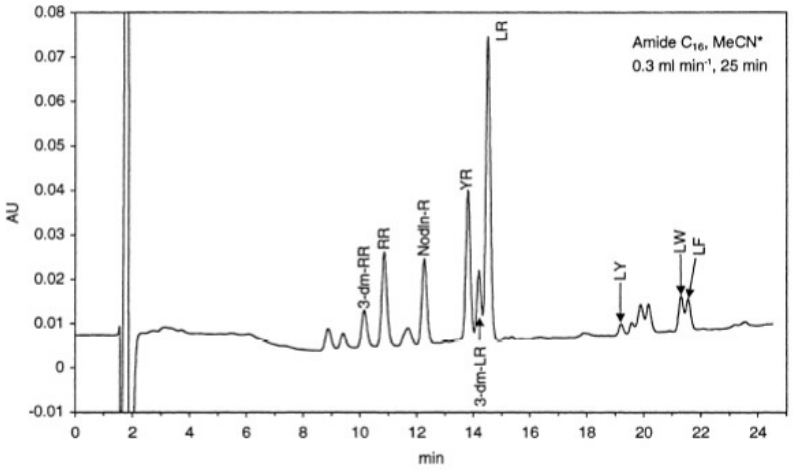
Cíl práce Xiong *et al*. byla popsat účinnost komerčně vyráběné monolitické kolony Chromolith s C18 fází (100 × 4,6 mm) pro separaci peptidů vzniklé tryptickým štěpením cytochromu c pomocí RP-HPLC. Kolona byla podrobena průtoku mobilní fáze od 1 ml/min do 10 ml/min. Peptidy byly eluovány pomocí mobilní fáze obsahující acetonitril (MeCN). Byla použita gradientová separace v rozsahu 5% MeCN, 0,1% TFA ve vodě do 60% MeCN, 0,1% TFA. Pro průtokové rychlosti 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 ml/min byly získány pro stejné eluované objemy separační časy 60, 30, 15, 7,5 a 6 minut. Při největším průtoku, tedy 10.0 ml/min, bylo pozorované malé snížení účinnosti. Tlak přítomný v koloně během separace při průtoku 10.0 ml/min se pohyboval kolem 150 bar. Tlaky takové velikosti jsou snadno dosahovány při použití klasické kolony v HPLC. Fakt, že separace peptidů může být dosáhnuta 10krát rychleji pomocí monolitické kolony než klasické náplňové kolony jen s mírnou ztrátou v rozlišení, je významný a to v možnosti využití této kolony v proteomice. Jediný negativní jev, který byl zjištěn během separace bylo, že malé

množství analytu se objevilo v pozdější frakci. Autoři předpokládají, že za tento jev je zodpovědný rychlý průtok mobilní fáze a prudký gradient, který způsobuje pomalejší desorbci malé části analytu [24].

Využitím monolitické silikové kolony a porovnáváním s klasickými kolonami se zabýval Spoof *et al*.. Mikrocystin a nodularin patří mezi hepatotoxiny produkované sladkovodními sinicemi. Jsou to cyklické peptidy a inhibitory proteinfosfatáz 1 a 2A. U obratlovců působí mikrocystiny negativně především na játra a jsou považovány za látky podporující nádorové bujení. Je známo přes 70 strukturních variant mikrocystinů, které se liší svou toxicitou, takže ke zjištění celkové toxicity vzorku je nutné použít metodu, která dokáže separovat a kvantifikovat jednotlivé mikrocystiny. Metoda tedy musí mít vysoké rozlišení a dobrou selektivitu. Kromě enzymové imunologické analýzy (ELISA) je široce rozšířena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s UV detekcí, kde se používá kolona dlouhá 25 cm s 5μm částicemi nebo 15cm kolona naplněná 3-4μm částicemi. Tyto kolony sice dávají dobré výsledky, ale jsou schopny analyzovat jen 1 až 2 vzorky za hodinu. Pomalá analýza je jednak dána velkým odporem částic, který kladou prostupující kapalině a tedy průtoková rychlost je nízká a jednak nutnou dlouhou reekvilibrací, která je potřebná po použití gradientu mobilní fáze. Spoof *et al.* se tedy snažili využít monolitickou kolonu ke zrychlení analýzy se zachováním kvality separace. Monolitická kolona Chromolith RP-18 (100 × 4,6 mm I.D.) byla porovnávána s náplňovou kolonou LiChrospher 100 RP-18 (5 μm částice, 125 × 4 mm I.D.). Dále byla použita referenční kolona RP-Amide C16 (150 × 2,1 mm I.D.). K analýze bylo použito 8 různých mikrocystinů a nodularin-R. Kolony porovnávali při použití mobilní fáze obsahující vodní roztok TFA s acetonitrilem nebo methanolem, různých průtokových rychlostí a různých délek lineárního gradientu. Po porovnání výsledků, nejlepší kombinaci celkového výkonu a rychlosti separace na monolitické koloně dosahovala kolona s mobilní fázi TFA-MeCN, délkou gradientu 2,5 min a při průtokové rychlosti 4,0 ml/min. Čas potřebný k analýze zahrnující i reekvilibraci byl 4,3 min (14 vzorků za hodinu), viz Obr.10. Výkon částicové kolony LiChrospher byl sice postačující, ale v porovnání s monolitickou kolonou horší. Obě dvě kolony nedokázaly dostatečně rozlišit 3-desmethylmikrocystin-LR a mikrocystin-LR. Tento pár peptidů dokázala rozlišit kolona RP-Amide C16, ale její celkový čas analýzy i s reekvilibrací trval 45 minut a rozlišení jiného páru peptidů (mikrocystin-LW a mikrocystin-LF) bylo nízké, viz Obr.11 [34].



Obr.10: Chromatogram na koloně Chromolith RP-18 (100 × 4,6 mm I.D.) Průtoková rychlost 4 ml/min. Gradient mobilní fáze: 25-70 % MeCN v 0,05% vodném roztoku TFA během 2,5 min. Detekce: absorbance při 238 nm. Teplota 25°C [34].



Obr.11: Chromatogram na koloně RP-Amide C16 (150 × 2,1 mm I.D.). Průtoková rychlost 0,3 ml/min. Gradient mobilní fáze: 20-65 % MeCN v 0,05% vodném roztoku TFA během 25 min. Detekce: absorbance při 238 nm. Teplota 40 °C [34].

Na vývoji metody pro vytváření peptidových map pomocí monolitické kolony na bázi siliky se zaměřil Hennessy *et al*. Peptidové fragmenty získal tryptickým štěpením různých typů cytochromu c. Pro analýzu byly použity kolony Chromolith Perfomance RP-18 (100 × 4,6 mm I.D.), Chromolith SpeedROD RP-18 (50 × 4,6 mm I.D.) a Chromolith SpeedROD RP-18 (100 × 4,6 mm I.D.). Zatímco kolona Chromolith Perfomance má makropóry velikosti 2000 nm a mezopóry 13 nm, kolony Chromolith SpeedROD obsahují makropóry velikosti 2500 nm a mezopóry 25 nm. Úspěšná separace na koloně Chromolith

Perfomance byl docílena s délkou gradientu 10 minut. Větší póry v monolitu u kolon Chromolith SpeedROD umožňovaly dvakrát větší průtokové rychlosti (až 8 ml/min) než u Chromolith Performance, ale ztráta ve velikosti plochy povrchu způsobila pokles kapacity a snížení selektivity. Při použití mírnějšího spádu gradientu (délka gradientu u 50 mm kolony byl 15 minut u 100 mm kolony 25 minut) i kolony Chromolith SpeedROD vykazovaly vysoké rozlišení a rychlou separaci. Tato studie dokázala, že použití monolitických silikových kolon vede k významnému snížení separačních časů a lze u nich využít postupů vyvinutých pro částicové kolony [35].

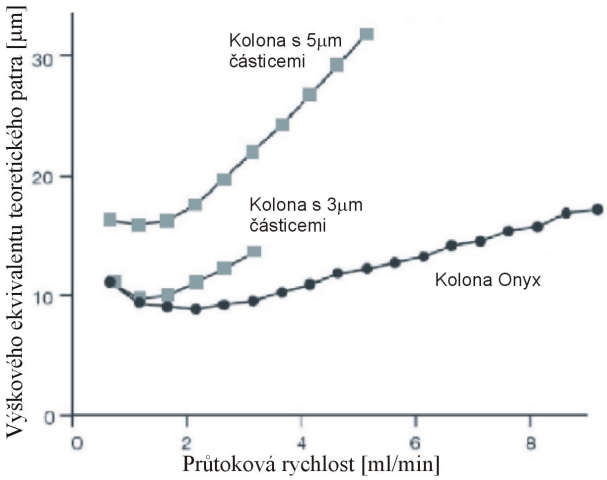
7.3 Kolona Onyx

Kolona Onyx od společnosti Phenomenex byla vyrobena na základě licence firmy Merck KGaA, takže její podstata je stejná jako kolona Chromolith, která vznikla na základě práce Nakanishiho *et al.* Onyx je kolona založená na struktuře tzv. monolitického silikagelu. Obsahuje tedy dva druhy pórů: mezopóry o velikosti 13 nm a makropóry velikosti 2 μm. Porozita je větší než 80%. pH stabilita kolony je v rozmezí 2,0 až 7,5, protože kolony na bázi siliky jsou citlivé na pH. Při pH nižší než 2,0 dochází k hydrolýze vázaných funkčních skupin. Vyšší pH než 8 způsobuje rozpouštění silikové podpory. Tlakový limit je 20 MPa (200 bar) a teplotní limit je 45 °C.

Dostupné fáze kolony Onyx jsou Onyx Monolithic C18, jejíž selektivita je srovnatelná s konvenčními C18 reverzními kolonami. Je vhodná pro nepolární, bazické, kyselé a kovové ionty chelatující sloučeniny. Vyrábí se v délkách 100, 50 a 25 mm. Pro oblast biotechnologií je k dispozici kapilární C18 kolona o rozměrech 150 × 0,1 mm. Dále se vyrábí s navázanou fází C8 kolona Onyx Monolithic C8 o rozměrech 100 × 4.6 mm. Je také dostupná kolona Onyx Monolithic Silica (100 × 4.6 mm), která je plněna čistým monolitickým silikagelem a je použitelná např. pro separace polárních neiontových organických sloučenin nebo pro vlastní *in situ* modifikace pro speciální analytické aplikace.

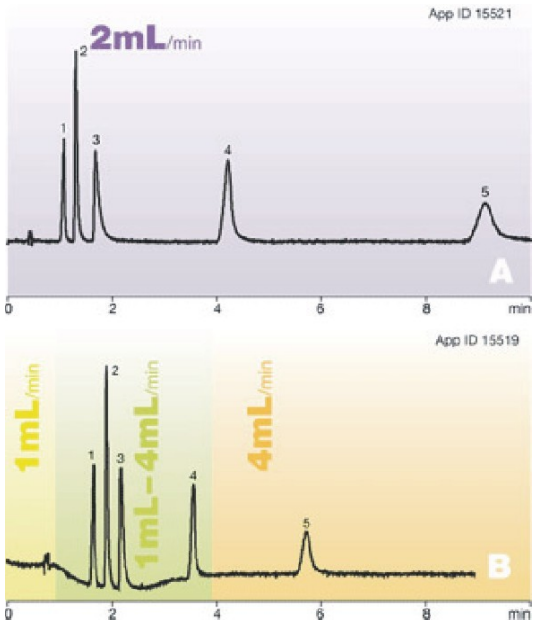
Účinnost separace je u kolony Onyx srovnatelná s klasickými kolonami s 3 μm částicemi. Účinnost lze díky nízkému odporu fáze zvýšit zvýšením počtu teoretických pater zapojením několika kolon do série. S kolonou lze pracovat s průtoky 1 ml/min až 9 ml/min. Onyx nabízí nejen zkrácenou dobu analýzy, ale též výrazně kratší dobu nutnou pro reekvilibraci při změně podmínek analýzy. Separační účinnost u klasických náplňových kolon významně klesá s rostoucí průtokovou rychlostí. U monolitické kolony tomu tak

není a tak je umožněno pracovat při vysokých průtokových rychlostí s minimální ztrátou rozlišení píků.



Obr.12: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na průtokové rychlosti u kolon plněných částicemi o velikosti 3 a 5 µm a u monolitické kolony Onyx [37].

Další možným způsobem u kolony Onyx jak zkrátit dobu analýzy je využít možnosti změny průtoku mobilní fáze během analýzy, který může být změněn v průběhu analýzy tak, jak potřebujeme. Kromě zkrácení celkové doby separace, také lze docílit vylepšení ostrosti píku cílového analytu [7, 37].



Obr.13: Flexibilta průtoku na koloně Onyx Monolithic C18 (50 × 4,6 mm). Mobilní fáze:10 mM fosforečnan draselný pH 5/MeCN (97:3). Detekce: UV 220 nm. Teplota: 22°C. Vzorky: 1. kyselina p-hydroxybenzoová 2. sacharin 3. kyselina salicylová 4. kyselina sorbová 5. kyselina p-toluová [37].

8. Experimentální srovnání separačních vlastností částicové a monolitické kolony

Cílem měření bylo zvládnout základy techniky HPLC a porovnat separační parametry klasické částicové kolony a monolitické kolony. K měření byl využit HPLC systém 10AVP s UV-Vis detekcí (Shimadzu, Tókjó, Japonsko) s klasickou kolonou Luna(2)C18 (250 × 4,6 mm) s velikostí částic 5 μm a s monolitickou kolonou Onyx C18 (100 × 4,6 mm). Na těchto kolonách byl změřen jejich mrtvý čas, retenční časy analytů a jejich rozlišení. Byly využity tři sady analytů: testovací směs, směs nukleotidů a vzorek peptidu.

8.1 Separace testovací směsi

Na koloně Luna a Onyx byla změřena testovací směs obsahující aceton, benzen, toluen (4:1:1 v metanolu). Pro určení mrtvého času byl využit retenční čas acetonu.

Kolona Luna

Průtoková rychlost: 0,5 ml/min

Tlak na koloně: 28,4 MPa

Mobilní fáze: 70% MeOH

Teplota: 25 °C

Tab.1: Retenční časy a kapacitní faktory testovací směsi na koloně Luna

	ACETON	BENZEN		TOLUEN	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	2,613	5,963	1,272	8,747	2,333
2. měření	2,635	5,995	1,285	8,768	2,341
3. měření	2,624	5,995	1,285	8,757	2,337
medián	2,624	5,995	**1,285**	8,757	**2,337**
odhad směrodatné odchylky	0,013	0,019	**0,007**	0,012	**0,008**
RSD [%]	0,495	0,315	**0,571**	0,142	**0,348**

Kolona Onyx

Průtoková rychlost: 3 ml/min

Tlak na koloně: 4,7 MPa

Mobilní fáze: 60 % MeCN

Teplota: 25 °C

Tab.2: Retenční časy a kapacitní faktory testovací směsi na koloně Onyx

	ACETON	BENZEN		TOLUEN	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	0,587	0,928	0,581	1,141	0,944
2. měření	0,587	0,928	0,581	1,141	0,944
3. měření	0,587	0,928	0,581	1,142	0,945
medián	0,587	0,928	**0,581**	1,141	**0,944**
odhad směrodatné odchylky	0,000	0,000	**0,000**	0,001	**0,001**
RSD [%]	0,000	0,000	**0,000**	0,052	**0,107**

Tab.3: Srovnání počtu teoretických pater testovací směsi na koloně Luna a Onyx

	Počet teoretických pater (Luna)	Počet teoretických pater (Onyx)
ACETON	9851,96	8736,1
BENZEN	31601,08	17964,5
TOLUEN	45421,96	28117,9

Tab.4: Srovnání rozlišení píků testovací směsi na koloně Luna a Onyx

	Rozlišení (Luna)	Rozlišení (Onyx)
$R_{BENZEN/ACETON}$	18,51	5,73
$R_{TOLUEN/BENZEN}$	9,56	3,13

8.2 Separace nukleotidů

Na koloně Luna a Onyx byla změřena směs nukleotidmonofosfátů (obsahující deoxycytosinmonofosfát (dCMP), deoxyadenosinmonofosfát (dAMP), deoxythimidinmonofosfát (dTMP), deoxyguanosinmonofosfát (dGMP)) dvou vzorků. Na koloně Luna byl mrtvý čas změřen pomocí acetonu, na koloně Onyx byla použita thiomočovina.

8.2.1 Separace nukleotidů - vzorek 1

Kolona Luna

Průtoková rychlost: 0,75 ml/min

Tlak na koloně: 19,2 MPa

Mobilní fáze: 25mM fosforečnanový pufr, pH = 5,5, s 1% MeOH

Teplota: 25 °C

Tab.5: Retenční časy a kapacitní faktory směsi nukleotidů (vzorek 1) na koloně Luna

	ACETON	dCMP		dTMP	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	1,742	2,656	0,518	6,816	2,896
2. měření	1,757	2,667	0,524	6,816	2,896
medián	1,750	2,662	**0,521**	6,816	**2,896**
odhad směrodatné odchylky	0,009	0,006	**0,004**	0,000	**0,010**
RSD [%]	0,507	0,244	**0,851**	0,000	**0,332**

	dGMP		dAMP	
	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	7,317	3,182	17,024	8,731
2. měření	7,307	3,177	17,003	8,719
medián	7,312	**3,179**	17,014	**8,725**
odhad směrodatné odchylky	0,006	**0,012**	0,012	**0,040**
RSD [%]	0,081	**0,363**	0,073	**0,456**

Kolona Onyx

Průtoková rychlost: 3 ml/min

Tlak na koloně: 6,17 MPa

Mobilní fáze: 25mM fosforečnanový pufr, pH = 5,5, s 1% MeOH

Teplota: 25 °C

Tab.6: Retenční časy a kapacitní faktory směsi nukleotidů (vzorek 1) na koloně Onyx

	THIOMOČOVINA	dCMP		dTMP	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	0,576	0,651	0,130	1,120	0,944
2. měření	0,580	0,672	0,167	1,120	0,944
3. měření	0,576	0,672	0,167	1,120	0,944
medián	0,576	0,672	**0,167**	1,120	**0,944**
odhad směrodatné odchylky	0,000	0,012	**0,022**	0,000	**0,000**
RSD [%]	0,000	1,846	**12,924**	0,000	**0,000**

	dGMP		dAMP	
	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	1,163	1,019	2,208	2,833
2. měření	1,174	1,038	2,208	2,833
3. měření	1,174	1,038	2,208	2,833
medián	1,174	**1,038**	2,208	**2,833**
odhad směrodatné odchylky	0,006	**0,011**	0,000	**0,000**
RSD [%]	0,554	**1,087**	0,000	**0,000**

Tab.7: Srovnání počtu teoretických pater směsi nukleotidů (vzorek 1) na koloně Luna a Onyx

	Počet teoretických pater (Luna)	Počet teoretických pater (Onyx)
dCMP	8145,30	9792,9
dTMP	19566,22	8315,2
dGMP	18941,10	9241,3
dAMP	29036,72	36935,9

Tab.8: Srovnání rozlišení píků směsi nukleotidů (vzorek 1) na koloně Luna a Onyx

	Rozlišení (Luna)	Rozlišení (Onyx)
$R_{dTMP/dCMP}$	13,97	5,86
$R_{dGMP/dTMP}$	1,23	0,71
$R_{dAMP/dGMP}$	16,08	9,36

8.2.2 Separace nukleotidů - vzorek 2

Kolona Luna

Průtoková rychlost: 0,75 ml/min

Tlak na koloně: 19,2 MPa

Mobilní fáze: 25mM fosforečnanový pufr, pH = 5,5, s 1% MeOH

Teplota: 25 °C

Tab.9: Retenční časy a kapacitní faktory směsi nukleotidů (vzorek 2) na koloně Luna

	ACETON	dCMP		dTMP	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	1,742	2,656	0,518	6,827	2,902
2. měření	1,757	2,656	0,518	6,827	2,902
medián	1,750	2,656	**0,518**	6,827	**2,902**
odhad směrodatné odchylky	0,009	0,000	**0,002**	0,000	**0,010**
RSD [%]	0,507	0,000	**0,471**	0,000	**0,332**

	dGMP		dAMP	
	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	7,328	3,189	17,024	8,731
2. měření	7,307	3,177	17,003	8,719
medián	7,318	**3,183**	17,014	**8,725**
odhad směrodatné odchylky	0,012	**0,013**	0,012	**0,040**
RSD [%]	0,170	**0,413**	0,073	**0,456**

Kolona Onyx

Průtoková rychlost: 3 ml/min

Tlak na koloně: 6,17 MPa

Mobilní fáze: 25mM fosforečnanový pufr, pH = 5,5, s 1% MeOH

Teplota: 25 °C

Tab.10: Retenční časy a kapacitní faktory směsi nukleotidů (vzorek 2) na koloně Onyx

	THIOMOČOVINA	dCMP		dTMP	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	0,576	0,609	0,057	1,109	0,925
2. měření	0,580	0,661	0,148	1,12	0,944
3. měření	0,576	0,661	0,148	1,12	0,944
medián	0,576	0,661	**0,148**	1,120	**0,944**
odhad směrodatné odchylky	0,000	0,031	**0,053**	0,006	**0,011**
RSD [%]	0,000	4,648	**36,143**	0,580	**1,195**

	dGMP		dAMP	
	retenční čas [min]	kapacitní faktor	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	1,152	1,000	2,197	2,814
2. měření	1,17	1,031	2,208	2,833
3. měření	1,168	1,028	2,208	2,833
medián	1,168	**1,028**	2,208	**2,833**
odhad směrodatné odchylky	0,011	**0,018**	0,006	**0,011**
RSD [%]	0,910	**1,796**	0,294	**0,398**

Tab.11: Srovnání počtu teoretických pater směsi nukleotidů (vzorek 2) na koloně Luna a Onyx

	Počet teoretických pater (Luna)	Počet teoretických pater (Onyx)
dCMP	9216,82	9701,5
dTMP	23616,30	7228,2
dGMP	23042,40	7892,7
dAMP	33816,68	36942,5

Tab.12: Srovnání rozlišení píků směsi nukleotidů (vzorek 2) na koloně Luna a Onyx

	Rozlišení (Luna)	Rozlišení (Onyx)
$R_{dTMP/dCMP}$	15,11	6,75
$R_{dGMP/dTMP}$	1,36	0,56
$R_{dAMP/dGMP}$	17,55	9,42

8.3 Separace peptidů

Separován byl vzorek peptidu humaninu.

Kolona Luna

Průtoková rychlost: 0,6 ml/min

Tlak na koloně: 14,7 MPa

Mobilní fáze: 29 % roztok MeCN v 0,04 % vodném roztoku TFA, pH 2,2

Teplota: 40 °C

Tab.13: Retenční časy a kapacitní faktory vzorku peptidu na koloně Luna

	THIOMOČOVINA	HUMANIN	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	1,905	14,936	6,783
2. měření	1,927	12,756	5,647
3. měření	1,919	10,256	4,344
medián	1,919	12,756	**5,647**
odhad směrodatné odchylky	0,013	2,765	**1,441**
RSD [%]	0,677	21,675635	**25,520**

Kolona Onyx

Průtoková rychlost: 3 ml/min

Tlak na koloně: 5,8 MPa

Mobilní fáze: 29 % roztok MeCN v 0,04 % vodném roztoku TFA, pH 2,2

Teplota: 40 °C

Tab.14: Retenční časy a kapacitní faktory vzorku peptidu na koloně Onyx

	THIOMOČOVINA	HUMANIN	
	retenční čas [min]	retenční čas [min]	kapacitní faktor
1. měření	0,555	6,765	11,189
2. měření	0,555	6,491	10,695
3. měření	0,555	6,437	10,598
medián	0,555	6,491	**10,695**
odhad směrodatné odchylky	0	0,194	**0,349**
RSD [%]	0	2,985	**3,265**

Tab.15: Srovnání počtu teoretických pater vzorku peptidu na koloně Luna a Onyx

	Počet teoretických pater (Luna)	Počet teoretických pater (Onyx)
HUMANIN	439,18	4185,00

8.4 Závěr

Znatelná změna u monolitické kolony Onyx oproti kolony Luna byla ve zkrácení času nutného pro ekvilibraci kolony. Doba ekvilibrace u kolony Onyx trvala asi 30 minut, zatímco u kolony Luna trvala asi 60 minut. Další výrazná změna byla v nižších tlacích na koloně. Dále, srovnáme-li hodnoty retenčních časů analytů s největší retencí na obou kolonách u všech testovaných separací, zjistíme, že i při 4x zvýšeném průtoku mobilní fáze, celková spotřeba mobilní fáze je buď stejná (v případě testovací směsi) nebo nižší (případ separace nukleotidmonofosfátů). Pouze v případě separace vzorku peptidu došlo ke zvýšení spotřeby mobilní fáze dvakrát, neboť analyt měl vysokou zádrž.

Po srovnání kapacitních faktorů v případě testovací směsi byly na monolitické koloně Onyx kapacitní faktory více než dvakrát menší než v případě částicové kolony Luna. Počet teoretických pater byl pro všechny tři analyty v testovací směsi na koloně Onyx menší. U benzenu a toluenu byl tento rozdíl až dvojnásobný. Rozlišení píků bylo u obou typů separací větší než 1,5. To znamená, že na koloně Luna i na koloně Onyx došlo k úplné separaci všech píků.

Při separaci směsi nukleotidmonofosfátů byl kapacitní faktor na koloně Onyx větší jen v případě dCMP a to desetkrát. Kapacitní faktor pro dTMP, dGMP a dAMP byl na

koloně Onyx dvakrát menší než na koloně Luna. Na obou dvou kolonách bylo pořadí eluce nukleotidů shodné. Počet teoretických pater v případě dCMP byl srovnatelný, u dTMP a dGMP byl počet teoretických pater až dvakrát větší na koloně Luna než na koloně Onyx. U dAMP byl počet teoretický pater větší asi o polovinu na koloně Onyx než na koloně Luna. Píky dGMP a dTMP nebyly separovány ani na jedné koloně úplně. Na koloně Onyx bylo rozlišení těchto dvou píků menší než na koloně Luna (rozlišení píků dGMP a dTMP na koloně Luna pro vzorek 1 byl 1,23 a pro vzorek 2 1,36, rozlišení píků dGMP a dTMP na koloně Onyx pro vzorek 1 byl 0,71 a pro vzorek 2 0,56). Tlak na koloně Onyx během separace nukleotidů byl výrazně nižší (6,13 MPa) i při 4krát větším průtoku než byl pozorován na koloně Luna (19,2 MPa).

Kapacitní faktor peptidu humaninu byl dvakrát větší při použití kolony Onyx (10,695) než kolony Luna (5,647). Počet teoretických pater peptidu byl na koloně Onyx až desetkrát větší než na koloně Luna (počet teoretických pater na koloně Onyx byl 4185,00, na koloně Luna 439,18). Při separaci směsi peptidů byl tlak na koloně při použití monolitické kolony 5,8 MPa, což je o více než polovinu menší než na částicové koloně (14,7 MPa) a to při průtoku 3 ml/min, zatímco na částicové koloně byl průtok 0,6 ml/min. Čas potřebný pro ekvilibraci částicové kolony je dlouhý a tak se pravděpodobněji projeví nedostatečná ekvilibrace na rozptylu hodnot stanovených retenčních časů.

Ze srovnání účinnosti separace v obou systémech vyplývá, že monolitická kolona dosahuje podobných, byť poněkud horších výsledků, než je možné dosáhnout na koloně částicové. Odlišná termodynamika separace v obou systémech vyplývá z rozdílných kapacitních faktorů při zachování eluční síly (složení) mobilní fáze. Monolitická kolona vykazuje pro nízkomolekulární látky nižší zádrž, v případě látek vysokomolekulárních zádrž vyšší.

Obecně lze shrnout, že monolitická kolona oproti koloně částicové umožňovala rychlejší separace nízkomolekulárních látek s podobnou účinností dělení, měla menší či stejnou spotřebu mobilní fáze a rozlišení píků bylo dostatečné pro eventuální kvantitativní stanovení. Při separaci peptidu se dosáhlo výrazně vyšší účinnosti dělení na monolitické koloně. Rozdílná termodynamika separace (ilustrováno nejlépe na páru nukleotidů dTMP a dGMP), jež se odrazila na hodnotách kapacitních faktorů, naznačuje, že není možné přímo přenášet složení mobilní fáze, optimalizované pro částicovou kolonu na kolonu monolitickou. Při adaptaci složení mobilní fáze pro separaci na monolitické koloně bude třeba dodatečné optimalizace.

9. Literatura

[1] Švec F.: *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 747-766

[2] Švec F.: *Chem. Listy* 98 (2004) 232-238

[3] Smith J.H.: Dissertation submitted, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg 2002.

[4] Cabrera K.: *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 843-852

[5] Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda Ostrava 1996

[6] http://webak.upce.cz/~koch/cz/sylspec/souhrny/Kucerova_Z.htm

[7] http://www.chromservis.cz/onyx.htm

[8] Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: *Anal. Chem*. 68 (1996) 3498-3501

[9] Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T.: *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35-49

[10] Asiaie R., Huang X., Farnan D., Horváth C.: *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 251-263

[11] Dulay M.T., Kulkarni R.P., Zare R.N.: *Anal. Chem.* 70, (1998) 5103-5107

[12] Oberacher H., Premstaller A., Huber C. G.: *J. Chromatogr.* 1030 (2004) 201-208

[13] Walcher W., Oberacher H., Troiani S., Hölzl G., Oefner P., Zolla L., Huber C. G.: *J. Chromatogr. B* 782 (2002) 111-125

[14] Maruška A., Ericson C., Végván Á., Hjertén S., *J. Chromatogr.* 837 (1999) 25-33

[15] Siouffi A. M.: *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 801-818

[16] Sinner F.M., Buchmeiser M.R.: *Angew. Chem.-Int. Edit*. 39 (2000) 1433-1436

[17] Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia Praha 1996

[18] Štulík K., Pacáková V., Suchánková J.: *Anal. Chim. Acta* 352 (1997) 1-19

[19] www.fch.vutbr.cz/minimovky/zemanova.pdf

[20] Guntinas M.B.D.C., Bordin G., Rodriguez A.R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 369-378

[21] Vaňková H.: *Chem. Listy* 93 (1999) 120-127

[22] Sommer L.: Základy analytické chemie II, VUTIUM Brno 2000

[23] Creighton T.E.: Protein Structure, IRL Press 1998

[24] Xiong L., Yhang R., Regnier F.: *J.Chromatogr. A* 1030 (2004) 187-194

[25] http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/chromatografie_s_hydrofobni_interakci.html

[26] Bílková K., Králová B.: Izolace biomakromolekul, VŠCHT Praha 1997

[27] Shi Y., Xiang R., Horváth C., Wilkins A.: *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 27-36

[28] www.usbe.cas.cz/people/safarik/Prednasky-na-JcU/ Enzymologie/isolace-enzymu-PP95.ppt

[29] Xie S., Allington R., Svec F., Frechet M. J.: *J. Chromatogr. A* 865 (1999) 169-174

[30] http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=1008--

[31] Holčapek M., Jandera P.: *Chem. Listy 9* (1998) 278 - 286

[32] www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bam/08.ppt

[33] http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=1008--

[34] Spoof L., Meriluoto J.: *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 237-245

[35] Hennessy T.P., Boysen R.I., Huber M.I., Unger K.K., Hearn M.T.W.: *J.Chromatogr. A* 1009 (2003) 15-28

[36] Walchera W., Tollb H., Ingendohc A., Huberb C.G.: *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 107–117

[37] http://www.phenomenex.com/Phen/Products/onyx/

[38] Bouchal P., Kučera I.: *Chem. Listy* 97 (2003) 29-36

[39] http://www.sweb.cz/hplc/Tabs/2_pK.htm

[40] http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm

[41] Fields S. M.: *Anal. Chem* 68 (1996) 2709-2712

[42] http://www.zirchrom.com/organic.htm

[43] http://www.uhkt.cz/vyuka_seminare/postgradual/proteomika2005/zaklady_ms.pdf

Pozn.: Internetové adresy byly aktuální ke dni 17.5.2006

10. Zkratky

AC	afinitní chromatografií
CEC	kapilární elektrochromatografie
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
dCMP	deoxycytosinmonofosfát
dGMP	deoxyguanosinmonofosfát
dTMP	deoxythimidinmonofosfát
ELISA	heterogenní imunoesej s vázaným enzymem
ESI	ionizace elektosprejem
GPC	gelová permeační chromatografie
HIC	chromatografii s hydrofobní interakcí
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově-výměnná chromatografie
IEF	izoelektrická fokuzace
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
ODS	dimethyloktadecylchlorosilan
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PEEK	poly(ether-ether-keton)
PEG	polyethylenglykolu
PTFE	polytetrafluoroethylen
ROMP	polymerace přesmykem za otevření kruhu
RP-HPLC	chromatografie na obrácených fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
TEOS	tetraethoxysilan
TFA	kyselina trifluoroctová
TMOS	tetramethoxysilan
TOF	analyzátor doby letu
UV	ultrafialové záření