

Abstrakt

Předkládaná disertační práce se zabývá podrobnou charakterizací a využitím různých módů kapalinové chromatografie s více interakčními mechanismy pro analýzu biologicky aktivních látek, jako jsou například peptidy, proteiny nebo terapeutické oligonukleotidy. V první části práce byl detailně studován retenční/interakční mechanismus vybraných reverzních a mix-mód stacionárních fází, a to s velkým důrazem na popis elektrostatických interakcí. Pro jejich detailní charakterizaci byla vyvinuta nová metoda využívající čisté vodné mobilní fáze s různými hodnotami pH a modelové permanentně nabitě analyty (včetně anorganických aniontů). Bylo ukázáno, že elektrostatické interakce mohou být důsledkem přítomnosti nejen ligandu s iontově výměnným charakterem (na mix-mód stacionárních fázích), ale i residuálních disociovaných silanolových skupin.

Pro popis retenčního chování peptidů a proteinů, tedy analytů zwitterionické povahy, byly vybrány stacionární fáze s mix-mód charakterem. Retence i tvar píků v těchto systémech jsou zásadně ovlivněny nejen pH vodné složky mobilní fáze, ale také koncentrací pufru. S cílem vyvinout jednoduché metody pro on-line štěpení proteinů byly charakterizovány chromatografické kolony s imobilizovaným trypsinem z hlediska vlivu chromatografických podmínek (teplota, pH mobilní fáze, průtok, obsah organické složky mobilní fáze) na aktivitu imobilizovaného trypsinu. V optimalizovaných podmínkách bylo provedeno on-line štěpení různých proteinů s následnou separací na mix-mód koloně. Získané výsledky byly porovnány s off-line štěpením pomocí „spin kolonek“, v případě cytochromu C i s analýzou jeho komerčně dostupného naštěpeného standardu.

Terapeutické thiofosfátové oligonukleotidy byly charakterizovány a analyzovány ve dvou různých módech, a to iontově-párovou chromatografií na reverzních fázích a hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií. Oba systémy v optimalizovaných podmínkách neposkytují separaci diastereomerů, což je klíčové pro jejich spolehlivou analýzu. V prvním zmíněném módu byl podrobně studován vliv separační teploty, typu a koncentrace jak iontově-párového činidla, tak i jeho protiiontu na potlačení separace diastereomerů a rozlišení oligonukleotidů s různou délkou (n a $n-x$). Zjištěný vysoký potenciál hydrofilní interakční kapalinové chromatografie a její kompatibilita s hmotnostní detekcí byly využity při separaci a identifikaci nečistot a metabolitů terapeutického oligonukleotidu nusinersenu.