

Chromatografické metody

RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Dětská nemocnice, ODHB



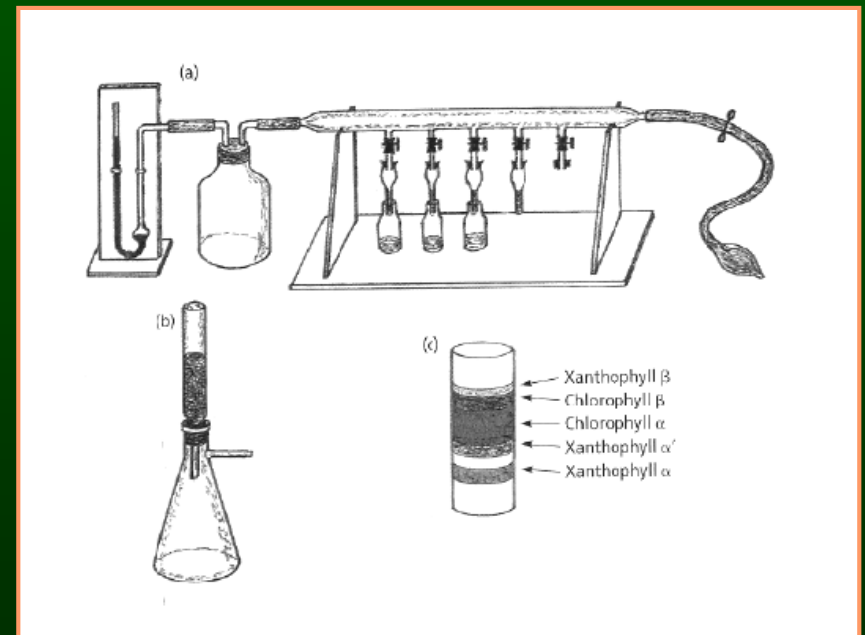
CHROMATOGRRAFIE

- Separační (dělicí) metoda a současně
- Analytická metoda - poskytuje kvalitativní a kvantitativní informaci o vzorku
- Využívá distribuce látek mezi dvě fáze
 - Stacionární (nepohyblivou) – pevná látka nebo na povrchu pevné látky fixovaná kapalina
 - Mobilní (pohyblivou) – kapalina nebo plyn

Fáze = homogenní část heterogenního systému oddělená od okolí fázovým rozhraním

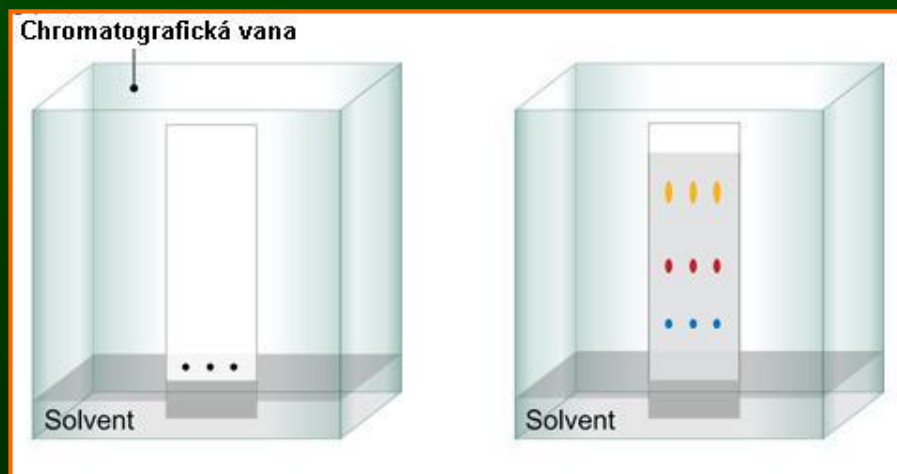
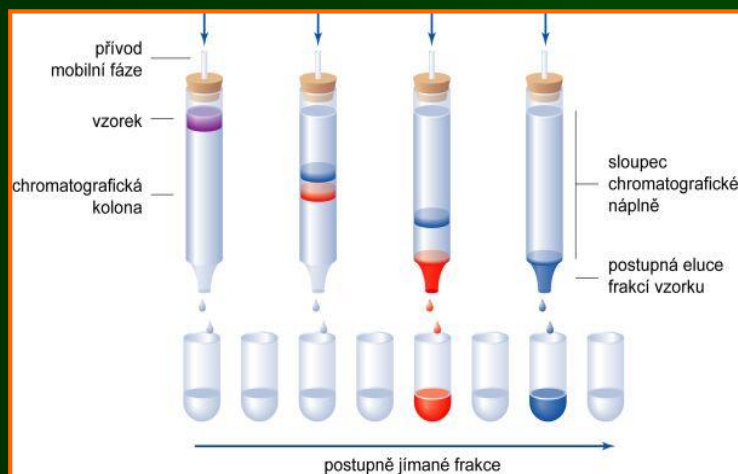
- Objevitel - ruský botanik Cvět
 - přelom 19. a 20. století
 - dělení rostlinných pigmentů

První chromatograf



CHROMATOGRRAFIE

- Metoda založená na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) fázi (SF, MF)
- Princip:
 - Mobilní fáze proudí přes nosič nebo kolonu, obsahující stacionární fázi
 - Během pohybu mobilní fáze dochází k distribuci komponent směsi mezi obě fáze - jednotlivé složky směsi procházejí systémem různou rychlostí:
 - látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi migrují pomaleji
 - látky s nižší afinitou ke stacionární fázi migrují rychleji (zůstávají přednostně v mobilní fázi)

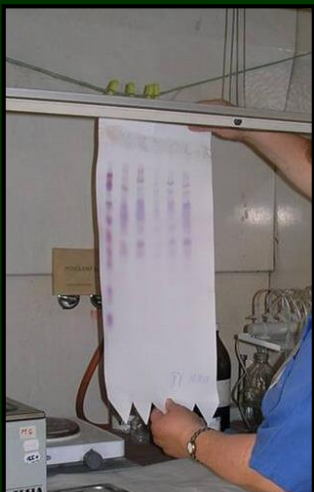


Klasifikace chromatografických metod

- Podle uspořádání systému

Chromatografie plošná (planární)

- Papírová chromatografie
 - SF (H_2O nebo polární rozpouštědlo) zakotvena na vláknech papíru
- Chromatografie na tenké vrstvě, TLC
 - SF (silikagel, alumina, celulóza, aj.) rozprostřená na inertní podložce (sklo, Alu-fólie, plast)



Chromatografie kolonová (sloupcová)

- SF (silikagel, polymer,...) tvoří náplň kolony
- nebo nanesena nebo chemicky navázána na nosné částice
- nebo nanesena přímo na vnitřní povrch kolony
- dle mobilní fáze - LC, GC



Klasifikace chromatografických metod

- Podle skupenství mobilní fáze

- plynová (gas chromatography, GC) – plynná MF
- kapalinová (liquid chromatography, LC) – kapalná MF

- Podle složení mobilní fáze

- izokratické dělení - mobilní fáze má po celou dobu dělení konstantní složení
- dělení s proměnlivým složením mobilní fáze
 - stupňovitá eluce
 - gradientová eluce

- Chromatografie podle účelu

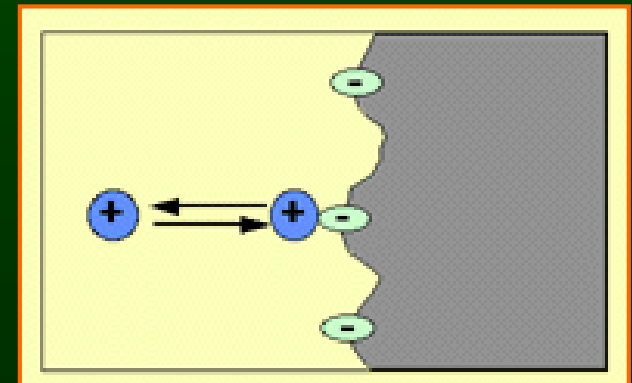
- Preparativní chromatografie - pro přípravu většího množství čistých látek
- Analytická chromatografie - pro určení identity a koncentrace látek ve směsi

Klasifikace chromatografických metod

- Podle separačního mechanismu

■ Iontoměničová chromatografie (ionexová, ion-exchange, IEC)

- výměna iontů elektrostaticky vázaných na nabitěm povrchu SF a iontů v roztoku
 - SF - iontoměnič (ionex): částice gelu (syntetické pryskyřice) s navázanými nabitými funkčními skupinami (kyselými nebo bazickými):
 - Katexy (umožňují výměnu kationtů)
 - na nosné částici navázaný silně nebo slabě kyselý funkční skupiny
 - Anexy (umožňující výměnu aniontů)
 - silně nebo slabě bazické funkční skupiny
 - Na těchto skupinách vázán opačně nabitý ion (zachování elektroneutality)
 - Tento ion je na začátku analýzy vyměněn za ionty analytů ze vzorku
 - Složky dělené směsi jsou z kolony eluovány
 - postupnou změnou pH mobilní fáze
 - a/nebo změnou iontové síly MF
- IEC umožňuje dělit ionty
- nízkomolekulární - aminokyseliny, nukleotidy,...
 - vysokomolekulární - peptidy, proteiny, nukleové kyseliny, oligonukleotidy,...

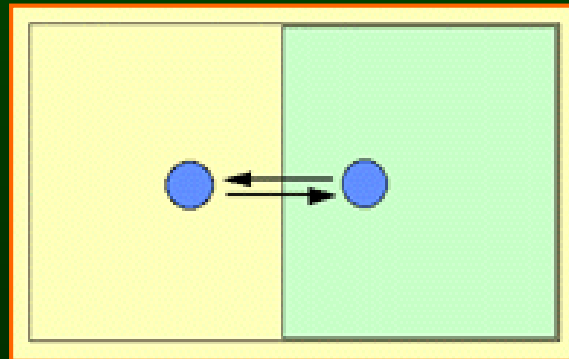


Klasifikace chromatografických metod

- Podle separačního mechanismu

Rozdělovací chromatografie

- Založena na distribuci látek mezi dvě nemísitelné tekutiny (tj. rozpustnosti v SF, MF)
- Stacionární fáze = kapalina, která může být
 - naadsorbována nebo chemicky navázána na pevném nosiči
 - např. na vláknech papíru u papírové chromatografie, na nosných částicích u HPLC
 - nanese na vnitřním povrchu kapilární kolony (GLC)
- Mobilní fáze = kapalina nebo plyn
 - **plynová** chromatografie (gas-liquid, GLC, zjednodušeně GC)
 - **kapalinová** (liquid-liquid, LLC, zjednodušeně LC) ve dvou provedeních:
 - LLC s normální fází - SF polární, MF méně polární
 - LLC s obrácenou fází - SF nepolární, MF polární (častěji používané provedení)

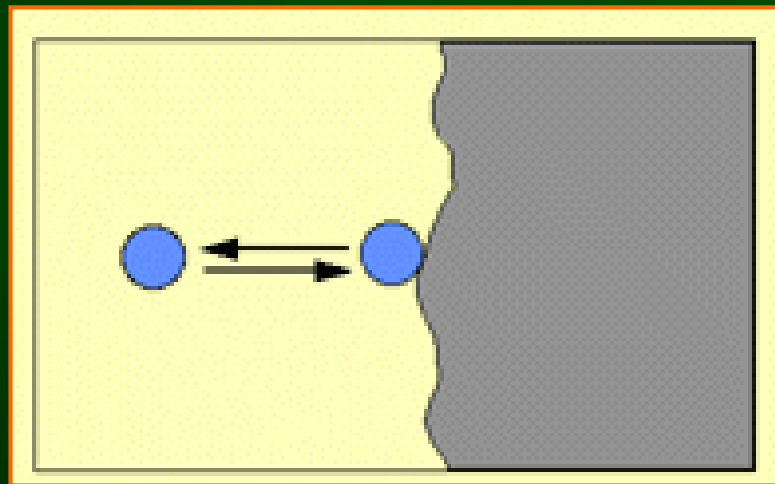


Klasifikace chromatografických metod

- Podle separačního mechanismu

Adsorpční chromatografie

- Dělení založeno na rozdílech v adsorpci a desorpci látek na pevný povrch sorbentu
 - (elektrostatickými silami, vodíkovými můstky nebo disperzními silami)

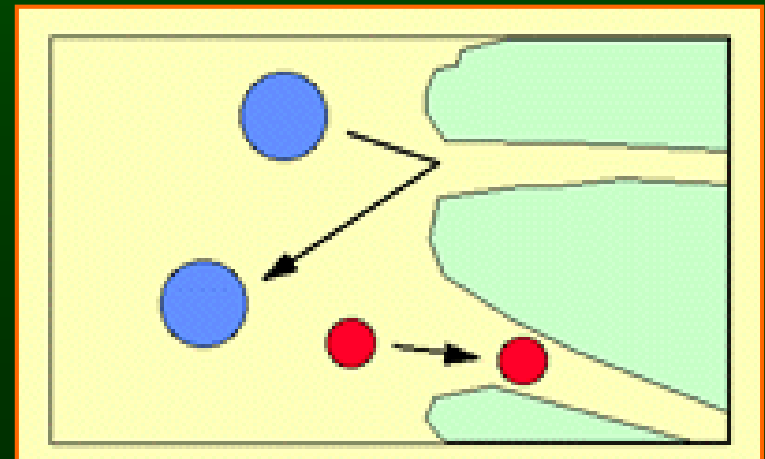
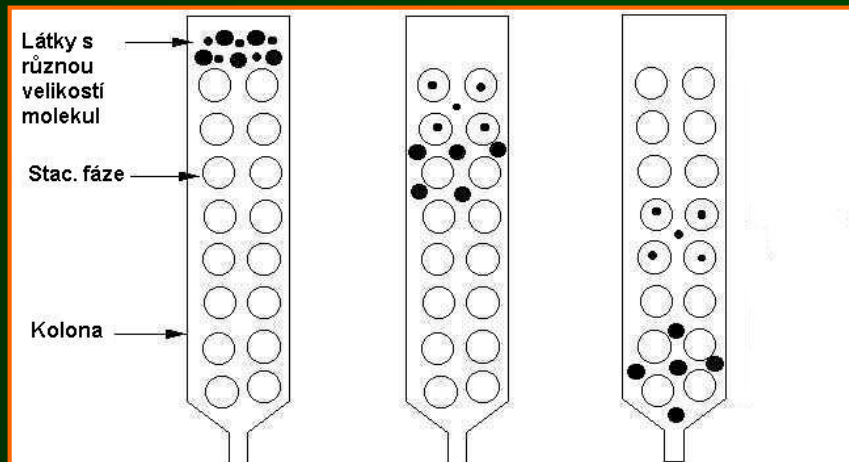


Klasifikace chromatografických metod

- Podle separačního mechanismu

Gelová permeační chromatografie

- umožňuje dělit molekuly podle jejich velikosti a tvaru
- SF = gelové částice kulovitého tvaru (na bázi polysacharidů nebo polyakrylamidu) s póry definovaných rozměrů
- Molekuly, jejichž průměr je menší než průměr pórů, difusním pohybem vnikají do vnitřních prostor gelových částic, čímž jsou na koloně zadržovány
- velké molekuly, které se nedostanou do pórů, jsou unášeny proudem MF a vytékají z kolony dříve

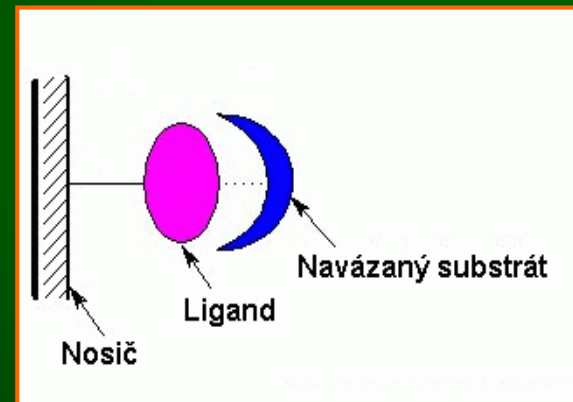


Klasifikace chromatografických metod

- Podle separačního mechanismu

Afinitní chromatografie

- využívá specifické interakce molekul:
 - interakce biologické povahy
 - enzym - substrát
 - enzym - inhibitor
 - antigen - protilátka
 - receptor - hormon apod.
 - biologickou interakci napodobující
 - bílkovina - triazinové barvivo
 - bílkovina - kovové ionty apod.
- Jeden z partnerů (tzv. ligand) - pevně navázán na nosič, kterým je naplněna chromatografická kolona
- V dělené směsi (mobilní fázi) je přítomna řada molekul, z nichž jen některé mají afinitu k ligandu → navážou se na něj a ostatní složky směsi se z kolony vymyjí
- změna složení mobilní fáze tak, aby se oslabila interakce ligand – navázaná molekula, ta se z kolony uvolní a získá se v relativně čisté podobě
- bioafinitní chromatografii lze použít k separaci, izolaci a k čištění složek vzorku



Přehled chromatografických technik

Chromatografie

■ planární

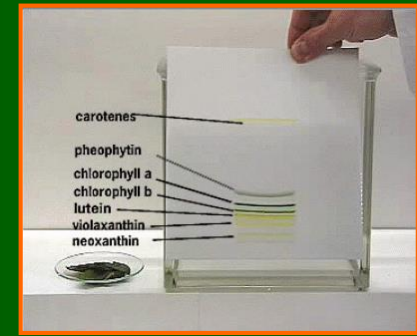
- papírová rozdělovací
- tenkovrstvá TLC (thin layer chromatography)
 - tenkovrstvá rozdělovací (SF kapalina)
 - tenkovrstvá adsorpční (SF pevná látka)

■ kolonová

- plynová GC (gas chromatography)
 - plynová rozdělovací GLC (SF kapalina)
 - plynová adsorpční GSC (SF pevná látka)
- kapalinová LC (liquid chromatography)
 - kapalinová rozdělovací LLC (SF kapalina)
 - kapalinová adsorpční LSC (SF pevná látka)
 - gelová permeační GPC
 - iontově výměnná IEC
 - afinitní (a další)

SF...stac.fáze

Planární chromatografie

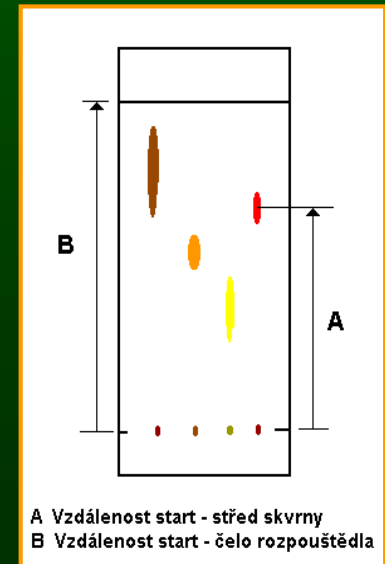


- Nanesení chromatogramu - vzorky na startovní pozici blízko okraje plošného nosiče (papíru, tenké vrstvy) ve formě malých kapek nebo tenkých čar
- Vyvíjení chromatogramu – v chromatografické vaně:
 - spodní konec nosiče ponořen do MF pod úroveň startovací linie
 - MF v důsledku kapilárních sil migruje přes SF, unáší s sebou složky směsi v závislosti na jejich afinitě ke SF
- Vizualizace skvrn - usušený chromatogram lze vizualizovat
 - barvotvorným činidlem
 - osvětlením UV světlem
 - fluorescenčně
- Charakteristikou látky je **retenční faktor R_f**
 - hodnota R_f je pro dané uspořádání experimentu stálá

$$R_f = A / B$$

A...vzdálenost start – střed skvrny

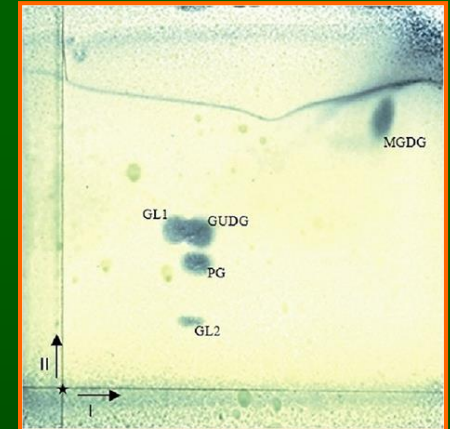
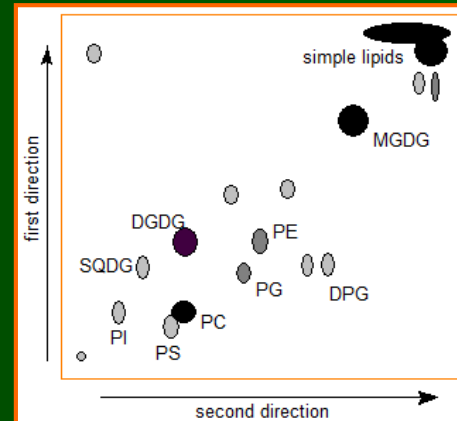
B...vzdálenost start – čelo rozpouštědla



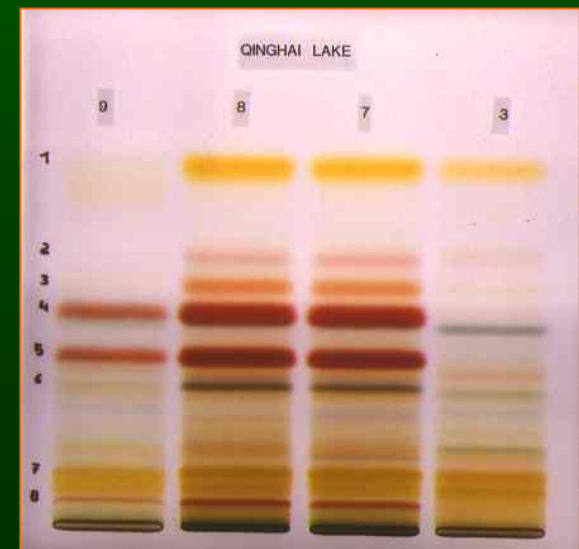
Planární chromatografie

▪ Dvourozměrná TLC

- Vyvíjení chromatogramu první mobilní fází
- otočení usušené destičky o 90 st.
- vyvíjení druhou mobilní fází
- dokonalejší separace



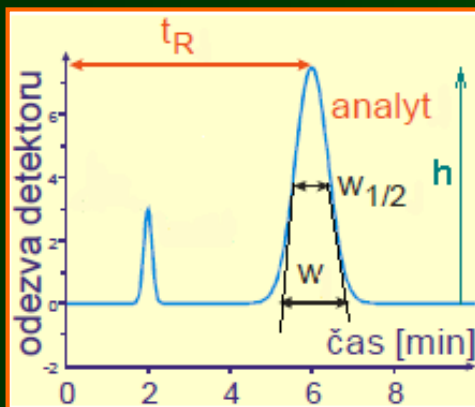
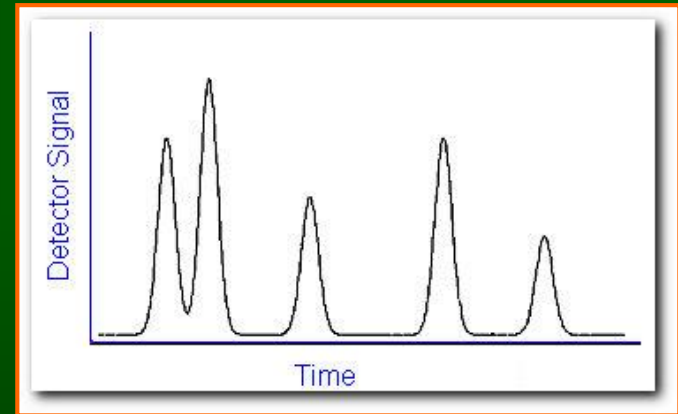
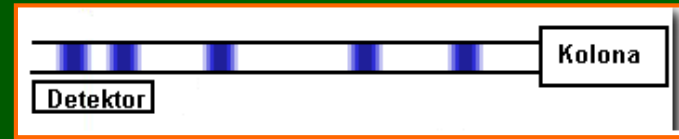
- HPTLC (high performance thin layer chromatography) - tenká vrstva sestává z částic o malém průměru (4,5 μm)
- Planární techniky - metody kvalitativní nebo semikvantitativní s vizuálním hodnocením - srovnáním se skvrnami standardů chromatografovaných na témže nosiči



Kolonová chromatografie

Chromatogram

- grafický záznam odezvy detektoru jako funkce času, případně objemu:
 - Při postupu vzorku kolonou se jednotlivé složky vzorku separují, tj. dospějí do detektoru v různých retenčních časech
 - eluované analyty graficky znázorněny jako série vrcholů (píků)
- data reprezentovaná chromatogramem slouží k identifikaci a kvantifikaci analytů:



- retenční čas t_R – kvalitativní charakteristika analytu
- plocha chromatografického vrcholu – kvantitativní charakteristika
- koncentrace analytu vypočítána na základě porovnání plochy píku analytu s plochou píku standardu
- plochu píku lze vypočítat jako: výška x poloviční šířka ($h \times w_{1/2}$)

Kolonová chromatografie

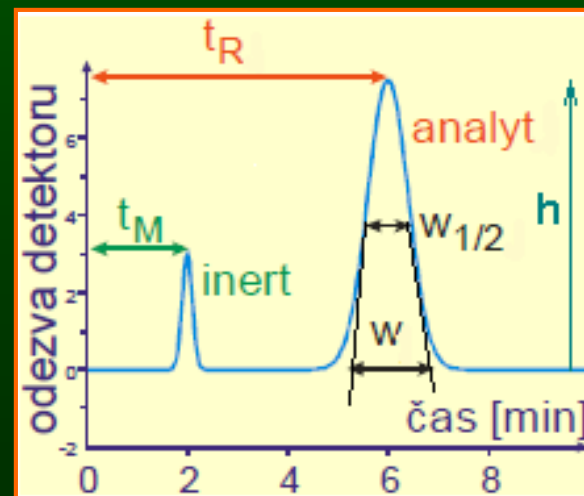
Základní pojmy – popis chromatografického píku:

- t_R (min)...retenční čas analytu (doba od nástřiku vzorku na kolonu do průchodu izolovaného analytu detektorem)
- t_M (min)...mrtvý čas kolony (retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. pohybuje se stejnou rychlostí jako MF)
- $W_{1/2}$...šířka píku analytu v polovině výšky
- W ...šířka píku analytu u základny
- t'_R (min)...redukovaný retenční čas analytu (čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi)

$$t'_R = t_R - t_M$$

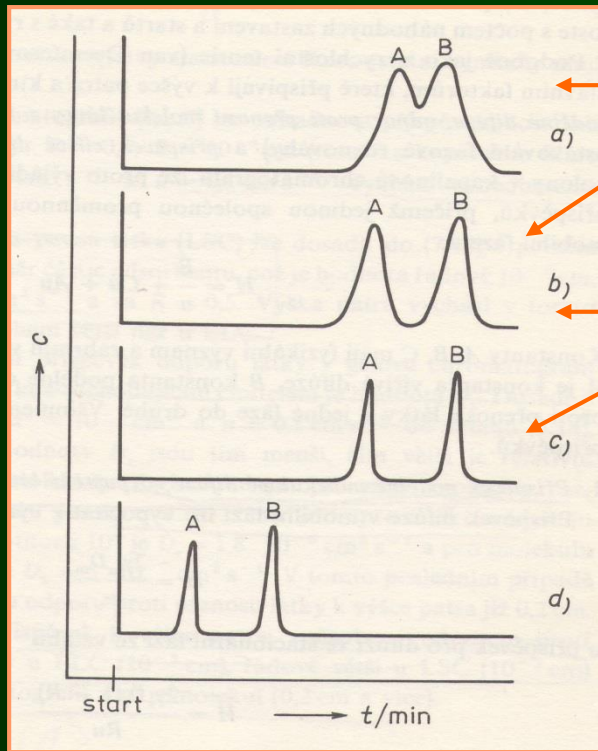
- Obdobně:
 - retenční objem V_R
 - mrtvý objem V_M
 - redukovaný retenční objem V'_R

$$V'_R = V_R - V_M$$



Kolonová chromatografie

- Pro dobré rozdělení dvou sousedních analytů je nutné, aby analyty měly:



➤ dostatečně rozdílné retenční časy

→ Vhodná volba SF a MF

➤ dostatečně úzké zóny analytů

→ Dostatečná účinnost kolony

- **Účinnost kolony** – charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek rozšiřují vlivem difúze

- Mírou účinnosti kolony je **počet teoretických pater kolony** (hypotetický pojem !)

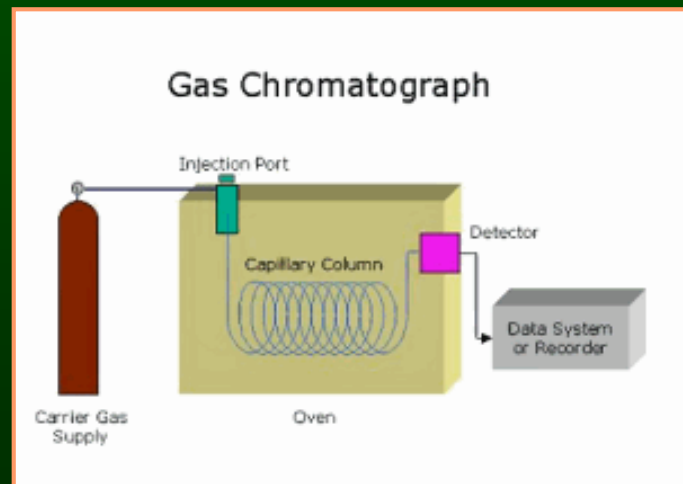
- **Teoretické patro** – taková část kolony, na které proběhne jedno ustavení rovnováhy MF – SF

- čím větší počet pater, tím užší zóny látek

- počet pater dané kolony závisí na rychlosti průtoku MF

Plynová chromatografie, GC

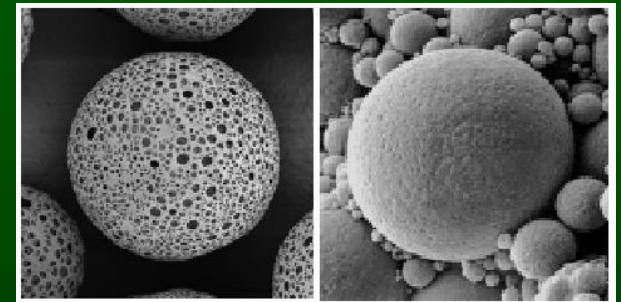
- **Mobilní fáze** - nosný plyn (nejčastěji inertní plyn - dusík, helium, argon)
- Separace u GC je založena
 - na rozdílech tlaku par analytů
 - interakcích se stacionární fází
- těkavější analyty se tedy pohybují kolonou rychleji než analyty méně těkavé a navíc analyty interagující se stacionární fází procházejí kolonou pomaleji než analyty se slabší interakcí
- **GSC** - separace na základě adsorpce analytů na pevný povrch náplně kolony
- **GLC** - separace na základě rozdělení mezi plynnou MF a kapalnou SF (netěkavá kapalina zakotvená na částicích náplně nebo přímo na vnitřním povrchu kapilární kolony)
- **Plynový chromatograf**
 - zdroj mobilní fáze a zařízení pro kontrolu průtoku nosného plynu systémem
 - dávkovač pro nanesení analytu na kolonu
 - chromatografická kolona pro separaci analytů
 - termostat (pec) pro regulaci teploty kolony
 - on-line detektor pro detekci separovaných analytů vycházejících z kolony
 - PC pro kontrolu systému a vyhodnocení dat



Plynová chromatografie, GC - kolony

Náplňové kolony - starší typ, již málo používané

- trubice (vnitřní průměr řádově mm, délka 1 m a více, sklo nebo nerez ocel) naplněné nosnými částicemi
- částice náplně jsou samy o sobě stacionární fází (**GSC** – sorbenty: modifikovaný silikagel, aktivní uhlí, alumina, molekulové síto,...)
- částice jsou stacionární fází potaženy (**GLC**)
 - užší kolony
 - vyšší účinnost x menší kapacita pro vzorek
 - delší kolony
 - vyšší účinnost x nutné zvýšené tlaky MF



Kapilární kolony - WCOT (wall-coated open tubular column)

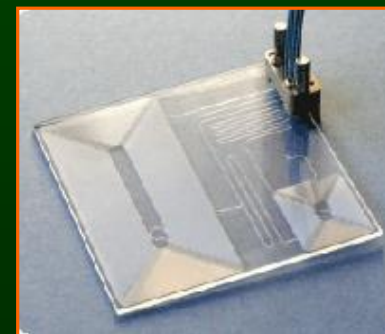
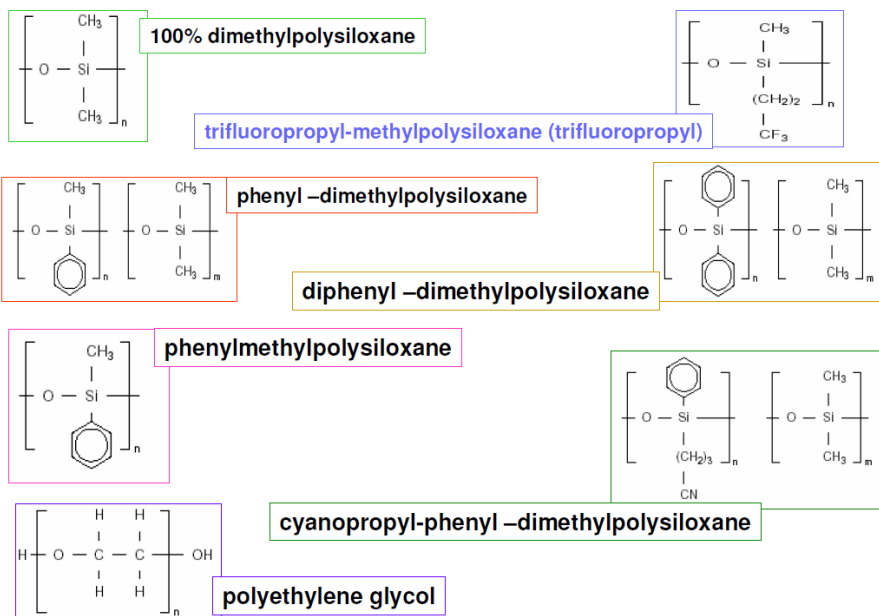
- kapiláry z křemenného skla (vnitřní průměr 0,1 - 0,5 mm, délka 10 - 150 m)
- na povrchu potaženy polyimidem (pevnost a pružnost)
- vnitřní povrch potažen tenkým filmem SF
- velmi účinné
- malá kapacita pro vzorek



Plynová chromatografie, GC - kolony

Stacionární fáze pro GLC

- netěkavé chemicky inertní kapaliny: methylsilikonové polymery, substituované silikonové polymery, polyethylenglykoly apod.
- nanoseny nebo chemicky navázány přímo na vnitřním povrchu kapilární kolony



- Dostupné i GC mikrokolony na bázi silikonového čipu

Plynový chromatograf

Zdroj nosného plynu a systém kontroly průtoku

- nosný plyn - např. He, Ar, N₂, H₂ (dle typu kolony a detektoru)
- nosný plyn musí být velmi čistý a suchý
 - trubice s molekulovým sítem odstraňují H₂O, uhlovodíky, O₂
- nutná řízená rychlost průtoku nosného plynu (pro získání reprodukovatelných retenčních časů)
 - programovatelné elektronické regulační systémy
 - náplňové kolony: průtok 10 - 60 ml/min
 - kapilární kolony: 1 - 2 ml/min, velké nároky na stabilitu

Dávkovač

- vnáší alikvot vzorku (μl) do kolony
- vzorky rozpuštěné v organickém rozpouštědle dávkovány injekční jehlou přes tzv. septum do vyhřívaného prostoru
 - analyty i rozpouštědlo ihned převedeny do plynné fáze a vneseny do kolony nosným plynem
- split - splitless technika dávkování vzorku na kolonu:
 - split mód - do kolony vstupuje pouze malá část zplyněného vzorku
 - nedochází k zahlcení kapilární kolony
 - splitless mód - do kolony vstupuje většina vzorku



Plynový chromatograf - detektory

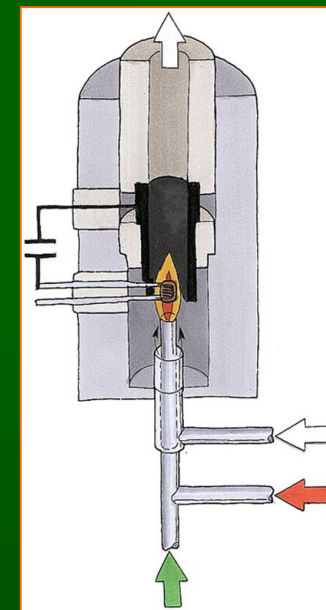
- Univerzální detektory - detegují většinu analytů
- Selektivní detektory

Plamenově ionizační detektor (flame ionization detector, FID)

- univerzální detektory pro GC
- efluent z kolony smíšen s H₂ a vzduchem → analyty spáleny v plameni
- v plameni dochází k ionizaci a vzniklé ionty zvyšují vodivost plamene

NPD (nitrogen – phosphorus detector) modifikace FID

- nad plamen umístěna vyhřívaná kulička soli alkalického kovu (Rb, Cs)
- přítomnost iontů alkalického kovu v plameni zvyšuje signál pro analyty obsahující dusík a fosfor



Fotoionizační detektor (photoionization detector, PID)

- ionizace intenzivním UV zářením
- selektivní pro UV absorbující látky

Termovodivostní detektor

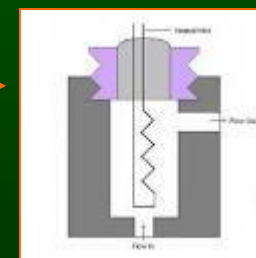
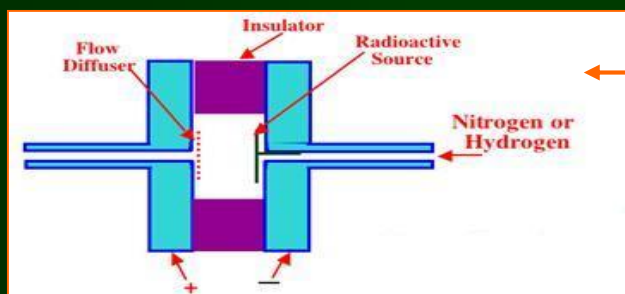
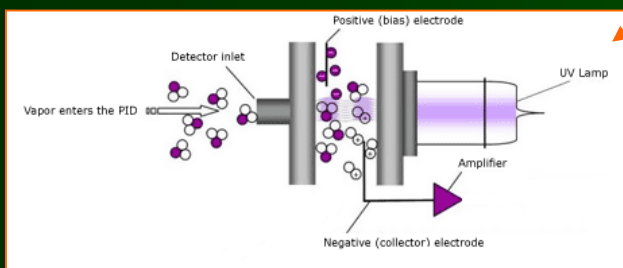
(thermal conductivity, TCD)

- v přítomnosti analytu v nosném plynu se zvyšuje tepelná vodivost plynu
- univerzální, jednoduchý, horší citlivost

Detektor elektronového záchytu (electron capture, ECD)

- nosný plyn ionizován radioaktivním β -zářičem
- analyty s elektronegativními skupinami vychytávají elektrony z β -zářiče → snížení ionizace

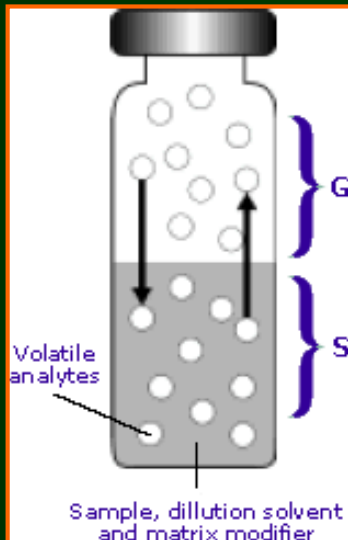
Hmotnostní detektor (mass spectrometry detector, MSD)



Plynová chromatografie

Příprava vzorků pro GC analýzu:

- extrakce sledovaných analytů ze vzorku biologického materiálu do organického rozpouštědla (+ odpaření rozpouštědla z extraktu)
- chemická derivatizace - zvýšení těkavosti a termostability látek pro GC analýzu (mnoho klinicky významných látek je netěkavých)
 - silylace – substituce atomu vodíku funkčních skupin látek silyl-skupinou (R_3Si-)
 - oximace, acylace, esterifikace



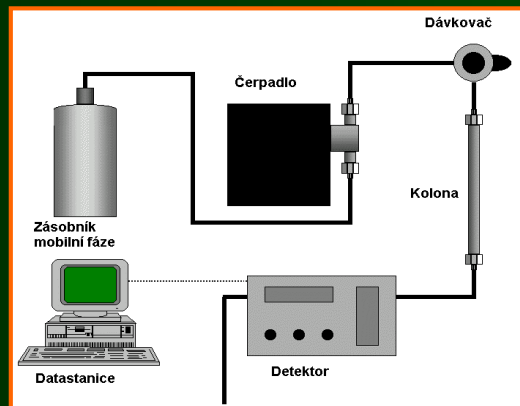
Analýza těkavých látek v kapalných nebo pevných vzorcích:

- GC v uspořádání head-space
 - „head space“ – prostor nad vzorkem (plynná fáze)

např. stanovení alkoholu v krvi,
analýza zbytků rozpouštědel ve farmaceutických výrobcích atd.

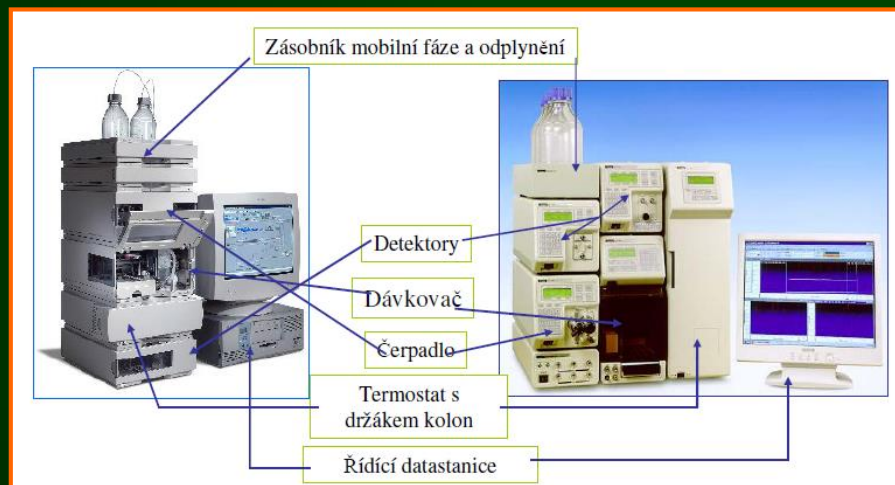
Kapalinová chromatografie - LC

- Separace založena na rozdělení látek mezi kapalnou mobilní fází a fází stacionární
- High performance liquid chromatography (HPLC) - jako nosič použity částice malého průměru (5 μm),
- HPLC - v klinické laboratoři nejrozšířenější forma LC (všechny principy dělení)



Kapalinový chromatograf

- kolona pro separaci analytů
- zásobníky rozpouštědel (mobilní fáze)
- čerpadla pro zajištění průtoku mobilní fáze systémem
- dávkovač pro nanesení vzorku na kolonu
- on-line detektor pro detekci separovaných analytů
- PC pro kontrolu systému, sběr a vyhodnocení dat



HPLC kolona

Náplňové kolony

- běžné kolony - vnitřní průměr 0,1 - 5 mm, délka 50 - 250 mm
 - tzv. nanobore kolony - vnitřní průměr 25 - 100 μm
 - open-tubular kolony - průměr pod 25 μm
 - SF chemicky navázána na povrch částic silikagelu nebo na povrchu polymerních částic
 - SF: polární funkční skupiny – HPLC s normální fází (silněji vázané polární látky)
 - C18, C8, C4 uhlovodíkové řetězce – HPLC s reverzní fází (silněji vázané nepolární látky)
 - částice náplně různé velikosti - průměr 1,8 - 10 μm
- Obecně platí:
- kolony s malým vnitřním průměrem a malým vnitřním objemem - vyšší účinnost, nižší limit detekce, malé objemy MF
 - čím menší částice náplně, tím větší je účinnost kolony (ale tím větší je odpor vrstvy náplně proti pohybu MF)



Monolitické kolony

- vysoká účinnost a nízké zpětné tlaky
- kolona zcela vyplněna pórovitým polymerem



Kapilární kolony pro LC (0,1 - 1 mm vnitřní průměr, 10 - 50 cm délky), SF nanosená na vnitřním povrchu skleněné kapiláry



■ Předkolona

- ochrana kolony před ireverzibilní adsorpcí proteinů ze vzorku
- naplněna stejnou nebo podobnou SF jako analytická kolona

Kapalinový chromatograf

Zásobníky s mobilními fázemi

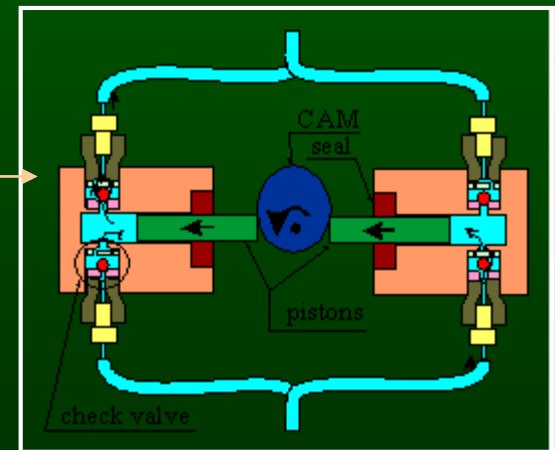
- v nejjednodušší formě skleněné lahve s přívodními hadičkami k čerpadlům
- MF připraveny z čistých rozpouštědel určených pro chromatografii (HPLC grade)
- MF přefiltrovány přes membránový filtr pro odstranění případných pevných částic
- MF zbaveny rozpuštěných plynů – sonikace, vakuové degassery (odplyňovače)

Čerpadla

- čerpadla zajišťují reprodukovatelný, konstantní a bezpulzní průtok MF systémem
- v systému je nutné vyvinout vysoké tlaky (až 250 bar)

(1 bar = 105 Pa = 1,02 atm = 14,5 psi)

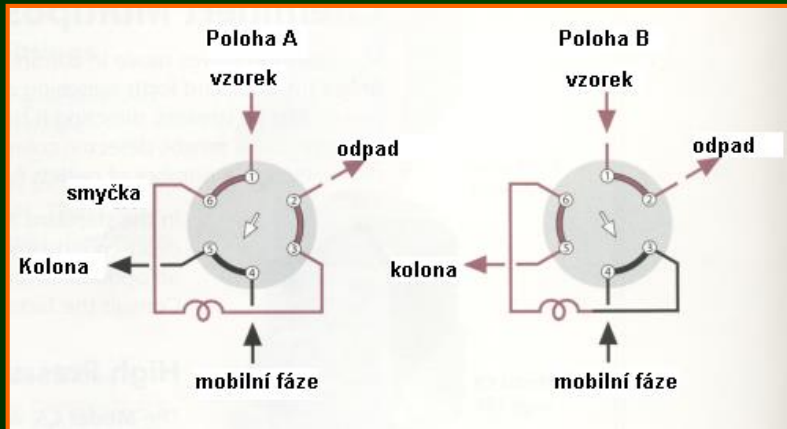
- **bezpulzní tzv. lineární dávkovač** - pro malé průtoky MF
 - pracuje na principu injekční stříkačky
- **pulzní pístová dvojúčinná (reciproká) čerpadla**
 - činnost je fázově posunutá pro minimalizaci pulzů
 - Vyhlazení pulzů
 - tlumič pulzů na principu svinuté odporové kapiláry
 - nebo redukce pulzů změnou rychlosti pohybu pístů
- ✓ **izokratický mód práce čerpadla**
 - složení MF zůstává konstantní během celé analýzy
- ✓ **gradientový mód**
 - změna složení MF s časem - až čtyři složky MF programovatelně směřovány gradientovým ventilem



Kapalinový chromatograf

Dávkovací zařízení

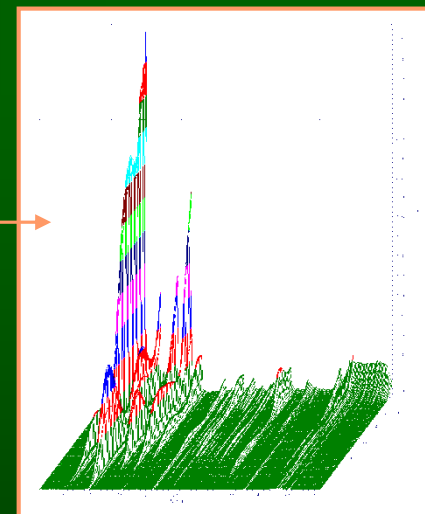
- šesticestný ventil s vyměnitelnou smyčkou
 - objem od desítek nanolitrů po mililitry
 - plnicí pozice (poloha A) - vzorek se nasaje ze vzorkové nádoby (tzv. vialky) dávkovací injekční stříkačkou do smyčky
 - otočením ventilu do polohy B je obsah smyčky vnesen do proudu mobilní fáze
 - dávkovací ventil je přesný, programovatelný



- Další možnosti
 - dávkovače s děličem (obdoba splitovacího zařízení v GC)
 - dávkovače s možností smísení vzorku s derivatizačním činidlem před nadávkováním na kolonu (předkolonová derivatizace)

Kapalinový chromatograf - detektory

- **Detektor** (s výjimkou MSD) obsahuje průtokovou celu - zde detegovány separované analyty
- generovaný elektronický signál zaznamenán ve formě chromatogramu
- **Fotometry a spektrofotometry** - měření absorbance UV a VIS záření
 - **Detektory s fixní nebo variabilní vlnovou délkou**
 - **Detektory diodového pole (PDA)** - schopné měřit v celé oblasti λ
 - průtokovou kyvetou prochází polychromatické světlo
 - prošlé světlo je za kyvetou rozděleno difrakční mřížkou
 - světlo dopadá na diodové pole
- **Fluorometry** - pro detekci fluorescenčních látek
 - často nutná před- nebo postkolonová derivatizace analytů
- **Elektrochemické detektory**
 - **amperometrické el.-chem. detektory**
 - elektroaktivní analyt v průtokové cele oxidován nebo redukován na povrchu elektrody s konstantním potenciálem
 - zaznamenám vzniklý elektrický proud
 - př. analýza katecholaminů v moči
 - **coulometrické detektory**
 - oxidace nebo redukce analytu
 - měření elektrického náboje
 - př. stanovení metanefrinů, vanilmandlové kyseliny, homovanilové kyseliny nebo 5-hydroxy-indolactové kyseliny v moči
- **Refraktometrický detektor** měří změny indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci analytu
- **Hmotnostní**



HPLC, UPLC

Výrobci HPLC systémů

- např. Waters, Agilent Technologies, Thermo, PerkinElmer, Shimadzu, Varian, Amersham Pharmacia, Dionex, Jasco, Gilson, Hitachi, BioRad a další...

UPLC, UHPLC

- Ultra high-performance liquid chromatography
- vyšší separační účinnost než klasická HPLC
- UHPLC využívá chromatografické kolony s částicemi $< 2\mu\text{m}$
- přístroje schopné pracovat s ultravysokými tlaky (100 MPa)
- práce s širokým rozsahem průtoků
- významné zkrácení doby analýzy
- **Výrobci UPLC** - např. Waters
 - UPLC Waters Acquity (s MS detektorem)



Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Čištění vzorku a zakoncentrování analytů

Ultrafiltrační techniky - úprava roztoků pomocí polopropustných membrán

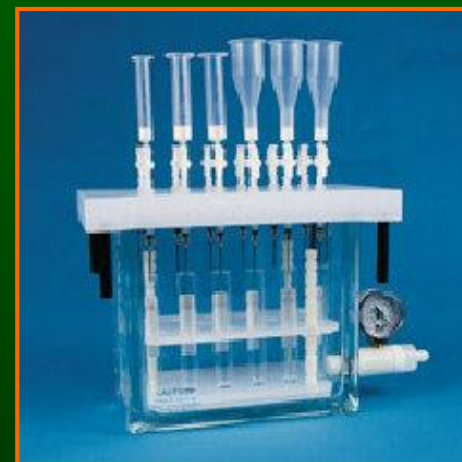
- hustota membrány limituje velikost molekul, které jsou separovány
- technika je vhodná pro deproteinaci vzorků

Extrakční techniky

- **Kapalinová extrakce** analytů do organického rozpouštědla
 - organický extrakt se odpařuje v proudu inertního plynu (dusíku)
 - odparek se rozpustí v nezbytném objemu mobilní fáze
- **Extrakce pevnou látkou** (solid phase extraction, **SPE**)
 - využití SPE kolonek naplněných médiem dle charakteru látky - sorbent, iontoměnič, gel atd.
 - vzorek v roztoku se kolonkou prolévá podtlakem
 - zachycené složky se po promytí uvolní vhodným rozpouštědlem
 - SPE je automatizovatelná

Derivatizace analytů

- umožnění nebo usnadnění detekce analytů
- **předkolonová derivatizace** - např. derivatizace aminokyselin a jiných primárních aminů za vzniku fluorescenčních sloučenin a následná detekce fluorometrem
- **postkolonová derivatizace** - např. u analyzátorů aminokyselin eluované aminokyseliny za kolonou derivatizovány ninhydrinem, fotometrická detekce

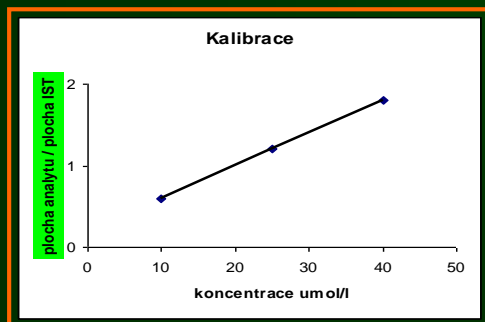
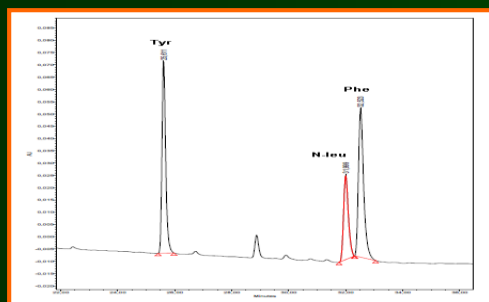
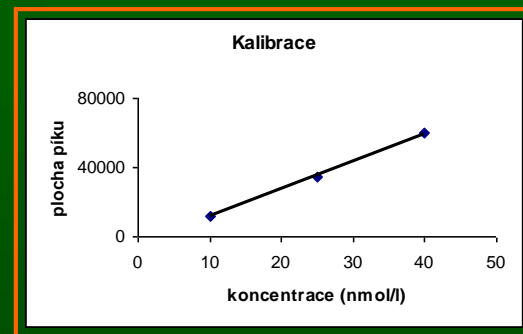
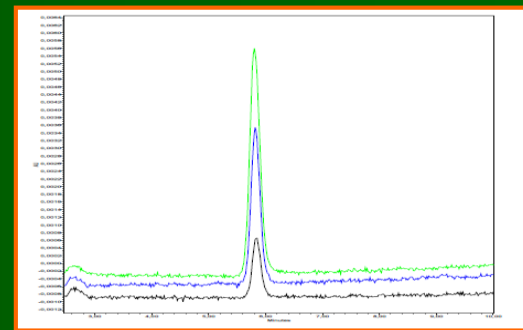


Chromatografie - kvantitativní analýza

Kalibrační techniky:

Externí kalibrace (kalibrace s vnějším standardem):

- provedení analýz referenčních vzorků se známým obsahem analytu
- sestavení kalibrační křivky - velikost ploch píků analytu v závislosti na jeho koncentraci
- použití kalibrační závislosti pro vyhodnocení koncentrací analytu v reálných vzorcích



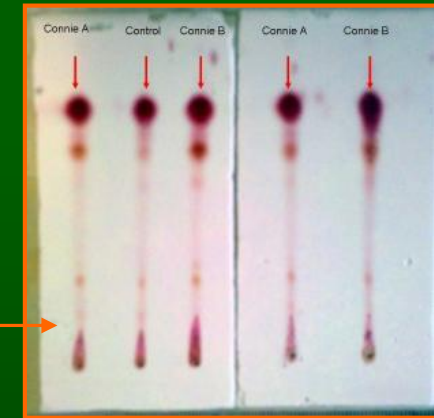
Interní kalibrace (kalibrace s vnitřním standardem):

- provedení analýzy referenčních vzorků se známým obsahem analytů s přidavkem konstantního množství vnitřního standardu
 - vnitřní (interní) standard – sloučenina s podobnými vlastnostmi jako stanovované analyty, ale nevyskytující se v reálných vzorcích
- do kalibrační křivky se vynáší poměr plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standardu v závislosti na koncentraci analytu
- do reálných vzorků se přidává interní standard ve stejném množství jako do referenčních roztoků
- koncentrace analytu se vyhodnocuje na základě poměru plochy (výšky) odpovídajícího píku a píku vnitřního standardu

Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, HPTLC)

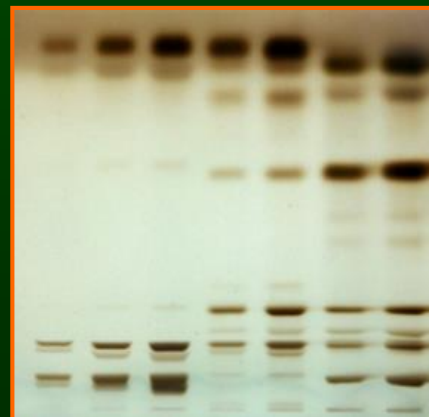
- kvalitativní, příp. semikvantitativní analýza
- flexibilní levná metoda
- umožňuje souběžně analyzovat více vzorků
- nevyžaduje přístroje a náročnou přípravu
- velmi časté využití v **toxikologii**
 - cílené průkazy nejrůznějších tox (jedů, škodlivin)
 - orientační screening léků a drog
 - pozitivní výsledky z toxikologického screeningu musí být potvrzeny pomocí dalších chromatografických metod (př. HPLC, často ve spojení s hmotnostní spektrometrií)



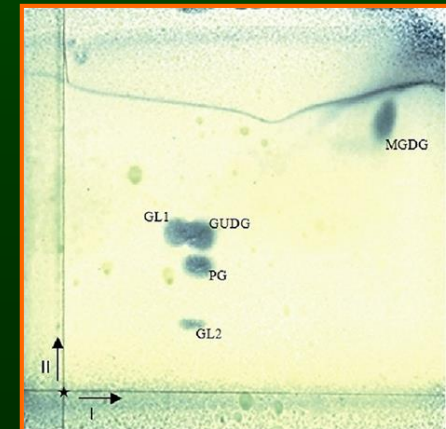
HPTLC – sacharidy



HPTLC – lipidy



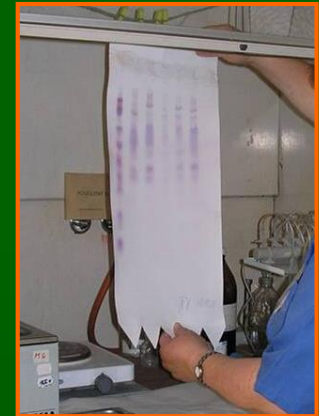
dvojměrná TLC – složené lipidy



Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Papírová chromatografie

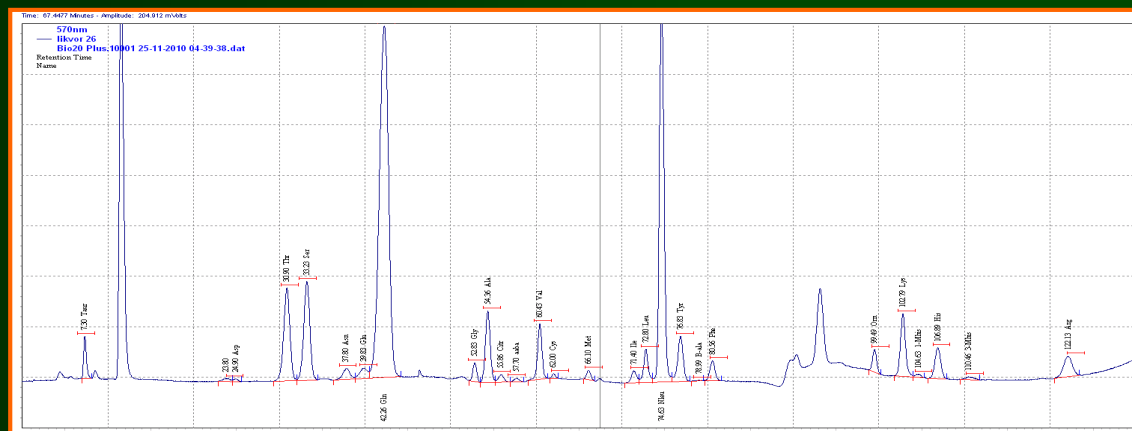
- jednoduchá, již málo používaná technika př. screening aminokyselin v moči



Ionexová chromatografie (IEC)

➤ Analýza aminokyselin

- vzorek - deproteinovaná plazma resp. sérum, moč, CSF - směs volných aminokyselin (AMK)
- AMK vneseny na kolonu s katexem ve formě kationtů (při nízkém pH)
- AMK postupně eluovány z kolony pufrů o zvyšující se eluční síle (rostoucí pH a iontová síla)
- postkolonová derivatizace ninhydrinem
- kvalitativní vyhodnocení chromatogramu - na základě retenčních časů
- kvantitativní vyhodnocení pomocí vnitřního standardu (AMK norleucin)



Analyzátor AMK (Perkin – Elmer)

➤ Další využití IEC

- nukleotidy, peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny

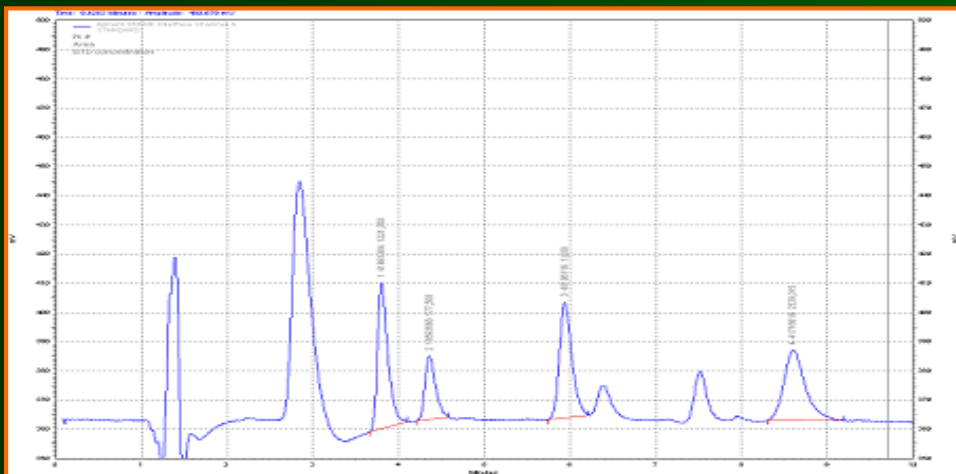
Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

HPLC - rozdělovací

- z chromatografických metod nachází nejširší uplatnění v klinické biochemii
- většina aplikací využívá HPLC s reverzní fází
- lze ji aplikovat na široké spektrum analytů v závislosti na způsobu detekce
 - sacharidy
 - lipidy
 - léky
 - pteriny
 - karboxylové kys.
 - steroidy
 - drogy
 - CDT
 - aminokyseliny
 - katecholaminy
 - homocystein
 - glykovaný hemoglobin atd.
- HPLC se uplatňuje jako standardní metoda v toxikologii, hlavně v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Záznam HPLC analýzy **katecholaminů** v moči z HPLC Agilent série 1200, elektrochemický detektor Coulochem



Katecholaminy – adrenalin, noradrenalin, dopamin

Metanefriny – metanefrin, normetanefrin (metabolity katecholaminů)

Kys. vanilmandlová (metabolit katecholaminů)

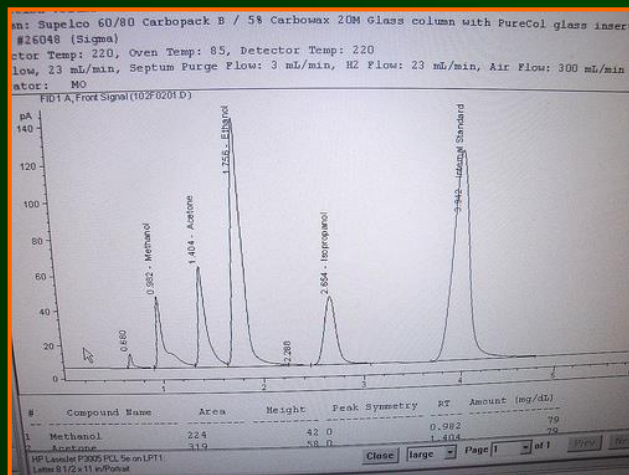
- markery feocytochromu (nádor sympatoadrenálního systému, nejčastěji dřeně nadledvin)

Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

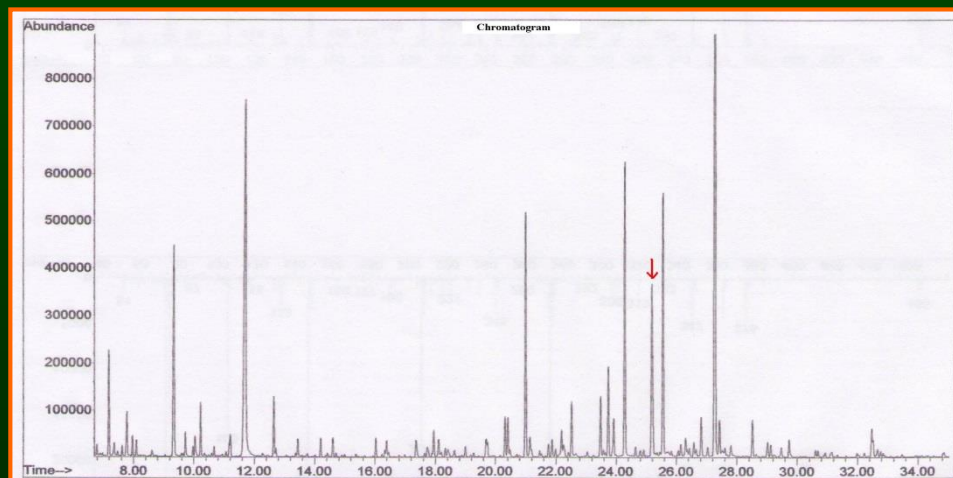
Plynová chromatografie

- standardní technika v kvalitativních i kvantitativních analýzách v **toxikologii**
 - plynové chromatografy v toxikologických laboratořích vybaveny různými detektory k různým typům analýz, např.
 - GC s plamenovým ionizačním detektorem - stanovení alkoholu a těkavých látek v krvi
 - NPD detektor - screening většiny léčiv či drog
 - detektor elektronového záchytu - analýze benzodiazepinů nebo halogenovaných látek
 - hmotnostní spektrometr - cílené průkazy a stanovení tox
- diagnostika dědičných metabolických poruch (GC / MS)

GC analýza alkoholu



Organické kyseliny v moči – diagnostika dědičných metab. poruch



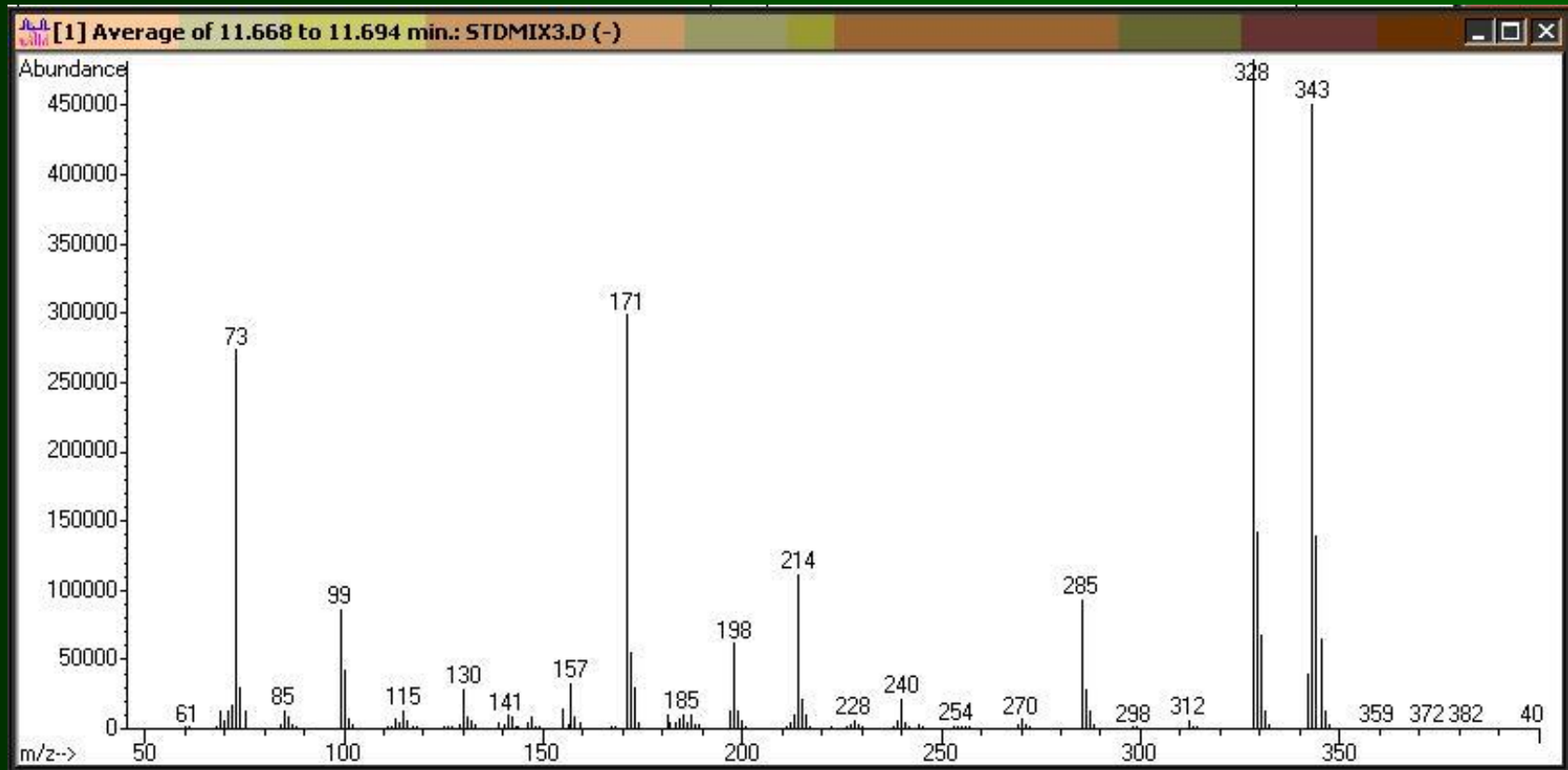
Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

- Fyzikálně-chemická metoda
 - využívá separace urychlených ionizovaných částic ve vakuu **podle jejich hmotnosti** při jejich průchodu elektrickými (příp. magnetickými) poli
- **MS** vyvinuta počátkem 20.století,
 - v klinické biochemii - již několik desetiletí
 - identifikace a stanovení nízkomolekulárních látek na základě měření hmotnosti jejich molekul (detekce látek ve spojení s plynovou chromatografií)
 - První polovina 90. let 20.století - nové techniky
 - umožnily využívat metodu i pro látky vysokomolekulární
- **MS** - nejdynamičtěji se rozvíjející metodika současné biochemie
 - vedle metod molekulové genetiky

Hmotnostní spektrum

Výstup MS - hmotnostní spektrum

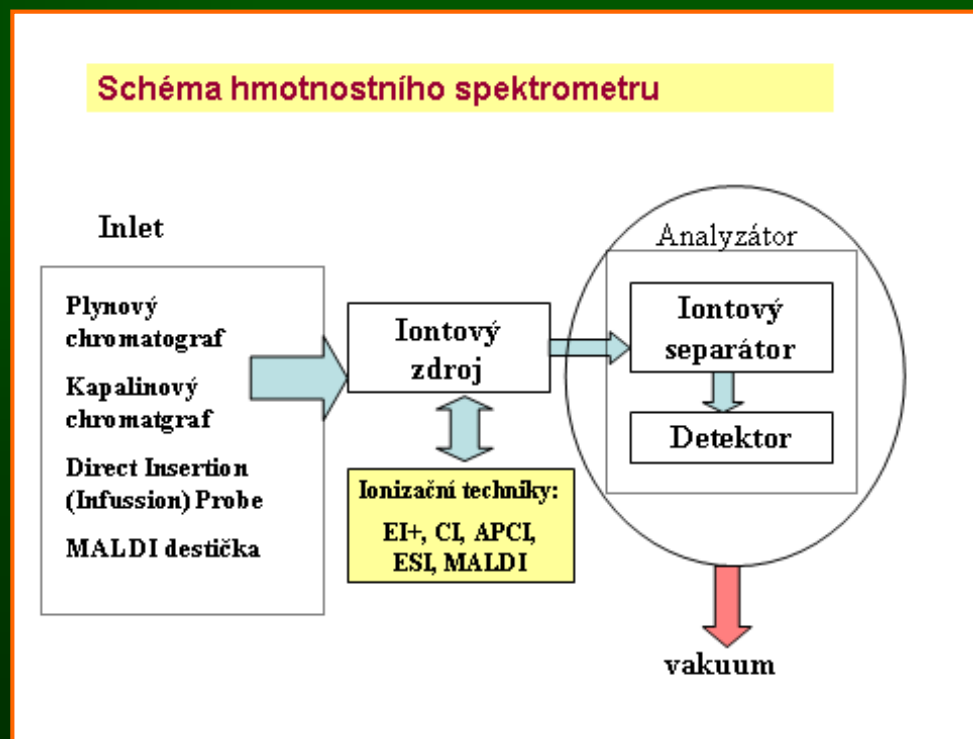
- čarový diagram
 - vodorovná osa - hodnota m/z (hmotnost / náboj iontu)
 - svislá osa - odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu



Hmotnostní spektrometr

- tři funkční celky:

- **Iontový zdroj** - ionizace neutrálních molekul měřené směsi:
 - molekula analytu je převedena do plynné fáze (do vysokého vakua)
 - získává charakteristický náboj
- **Iontový separátor**
 - rozdělení iontů různých hmotností
 - ion je urychlen
 - z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat jeho m/z
- **Detektor**
 - detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z
 - určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů



Iontový zdroj - Ionizační techniky

- Existuje celá řada ionizačních technik
- Cíl: vytvoření nabité částice, která je následně analyzována
- Použitá technika záleží na
 - charakteru analyzovaných látek
 - separační metodě, na kterou je MS napojen (GC/MS, LC/MS, bez napojení na separaci)

GC/MS:

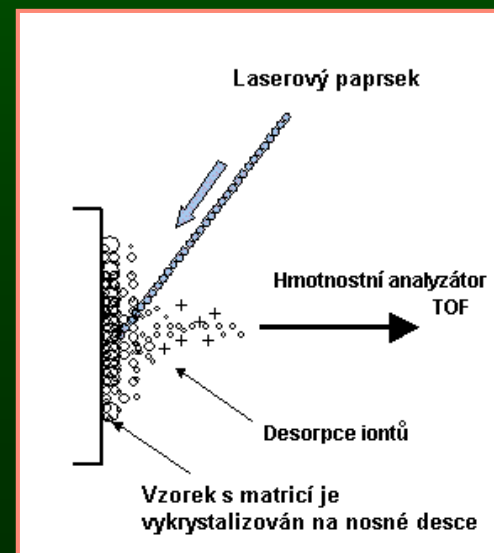
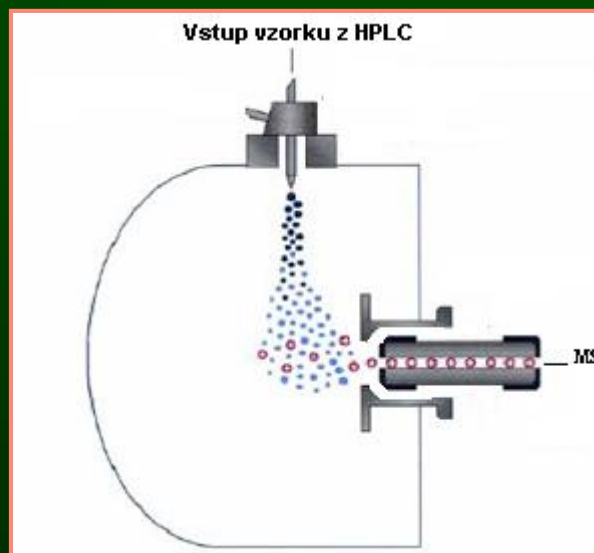
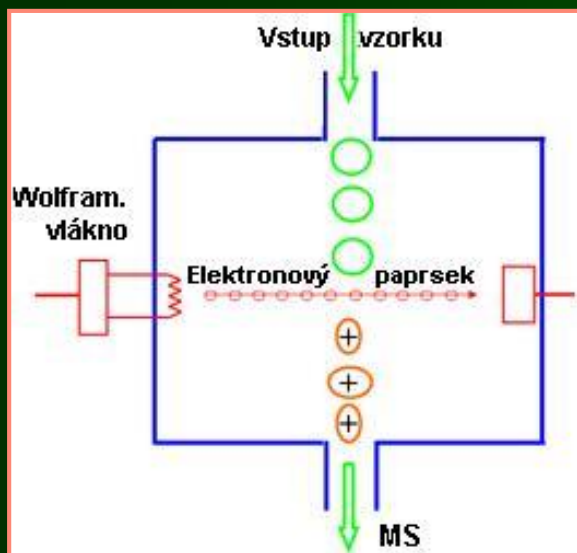
- Elektronová ionizace EI

LC/MS, CE/MS,

MS s přímým nástřikem

- Elektrospray ESI

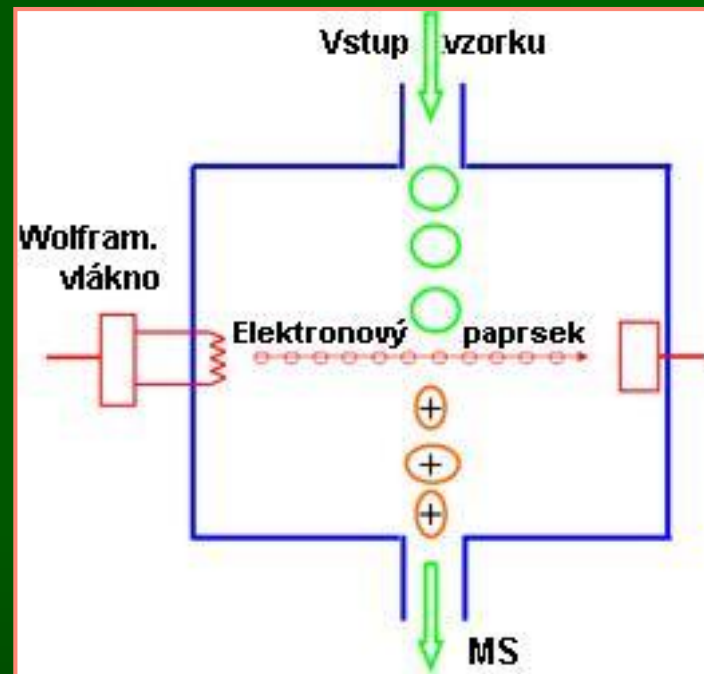
MALDI



Elektronová ionizace, EI

- Iontový zdroj - ionizace molekul analytu v plynném stavu pomocí proudu elektronů

- Z molekuly při srážce s paprskem elektronů odtržen elektron
 - molekula získává kladný náboj
- Následná fragmentace (rozpad) molekuly přebytkem energie

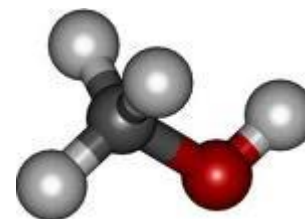
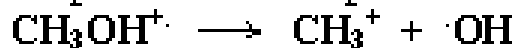
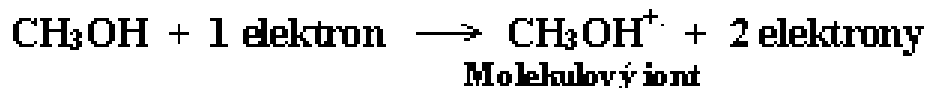


EI - tvrdá ionizační technika (fragmentace)

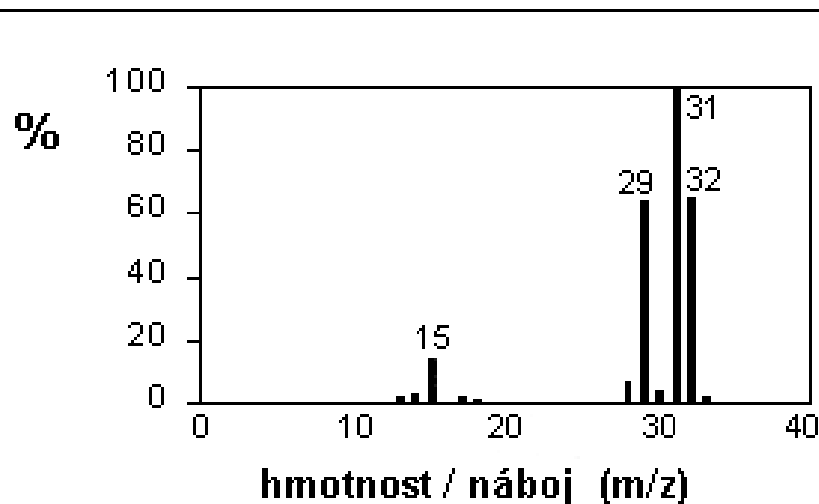
- fragmenty rozděleny v další části analyzátoru dle hodnoty m/z a detegovány
 - separace magnetickým analyzátozem, kvadrupólem
- Pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky (50 – 800 Da)
 - Dalton – jednotka molekulové hmotnosti



Elektronová ionizace (fragmentace)



ions	m/z
$\text{CH}_3\text{OH}^{+\cdot}$	32
$\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$	31
$\text{HC}\equiv\text{O}^+$	29
H_3C^+	15

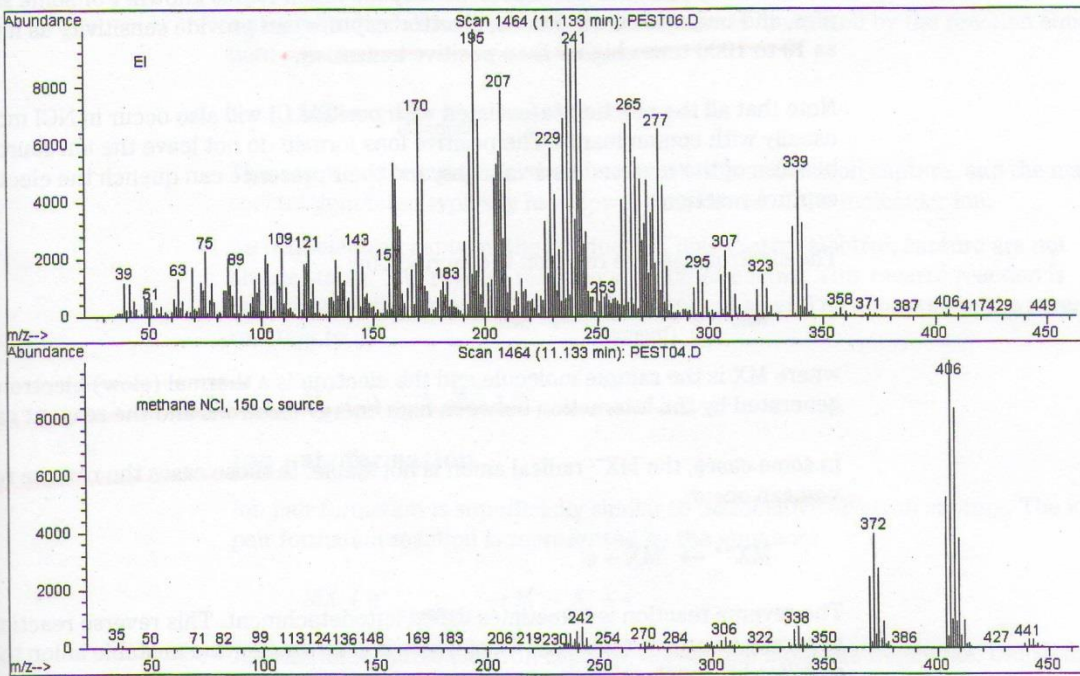


- Hmotnostní spektrum metanolu

Chemická ionizace CI

- „Měkčí“ varianta elektronové ionizace
- Do iontového zdroje přiváděn ionizační plyn (př. metan)
 - proud elektronů ionizuje nejdříve molekuly tohoto plynu
 - tyto teprve předávají energii molekule analytu
 - šetrnější, nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci

Endosulfan I (MW = 404): EI and methane NCI

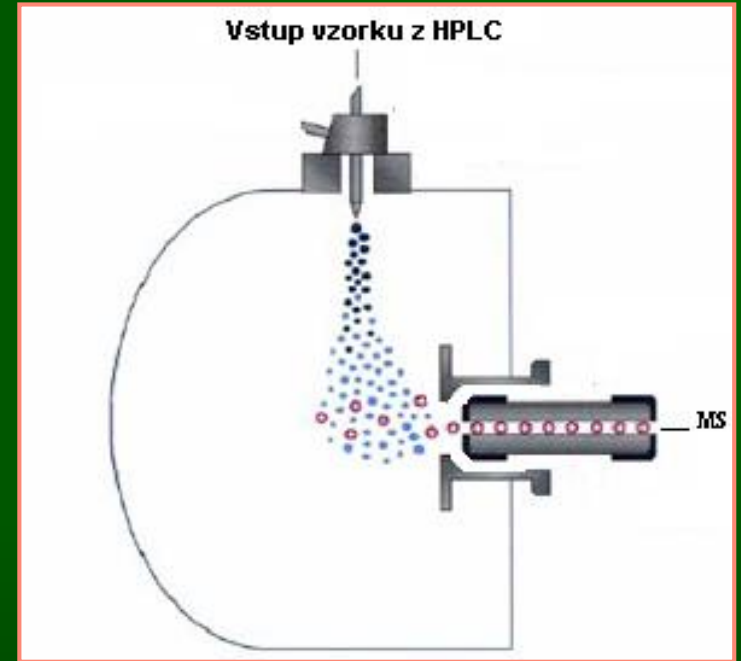
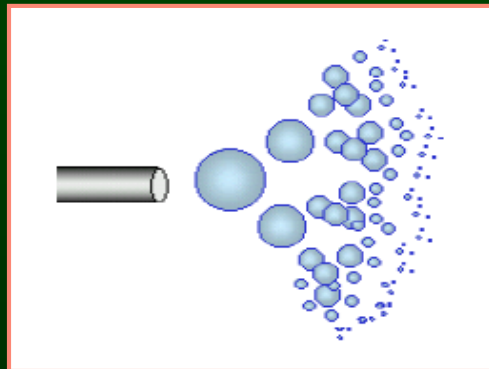


← Srovnání hmotnostního spektra s elektronovou ionizací a chemickou ionizací



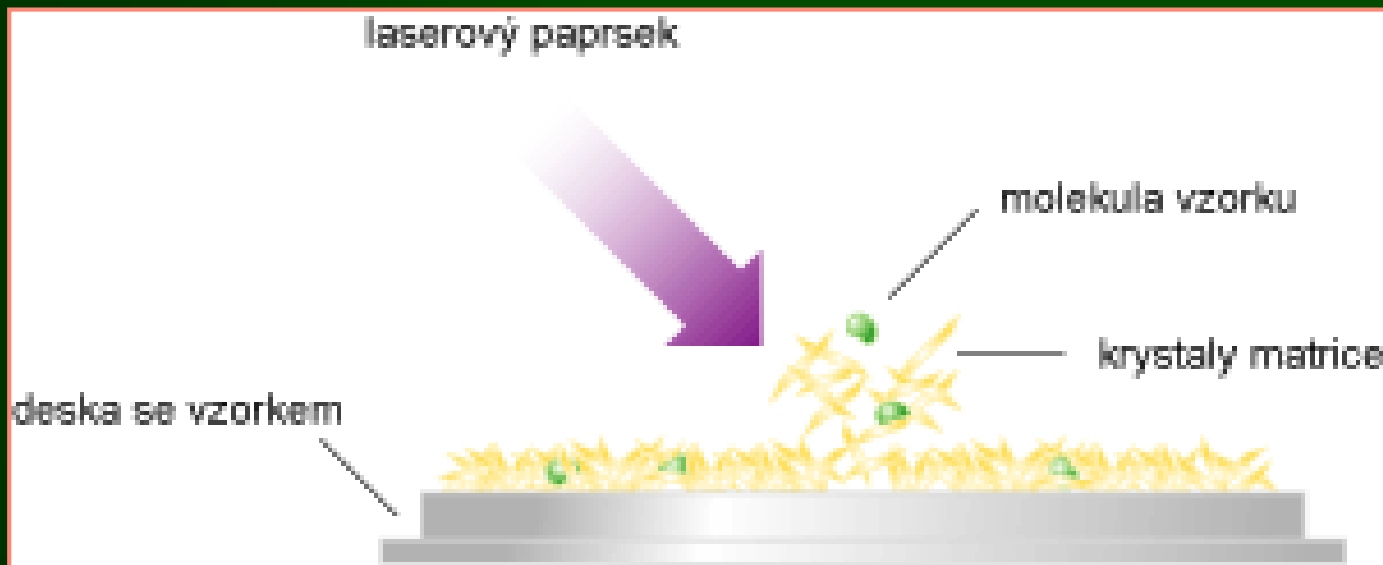
Elektrospray ionizace, ESI

- Eluát prochází kapilárou, na ni vloženo vysoké napětí
 - vzniká sprej vysoce nabitých kapiček
 - následný postupný odpar rozpouštědla
 - vznikají ionty (i vícenásobně nabité)
 - jsou dále separovány (např. kvadrupól)
- **Měkká ionizační technika** (bez fragmentace)
- Vhodné pro nízko- i vysokomolekulární látky (peptidy, sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny,...)



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI

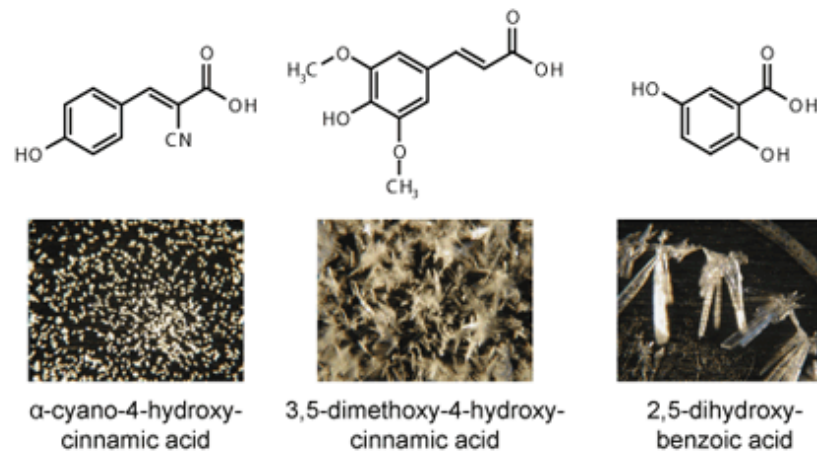
- Vzorek v roztoku smíchán s matricí
 - matrice - deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin
 - absorbují energii laserového záření ve VIS nebo blízké UV oblasti
- Roztok nakápnut a vysušen (vykrytalizován) na MALDI destičce
- Pulzní ozáření směsných krystalů zábleskem laseru
 - prudké odpaření látek do vakua
 - ionizovaná matrice strhává sebou molekulu analytu a ionizuje ji
 - ionty urychleny stejnosměrným elektrickým polem do TOF analyzátoru



MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

- Velmi měkká, šetrná technika – i pro vysokomolekulární látky (proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy)
- Ionty dále separovány analyzátozem TOF

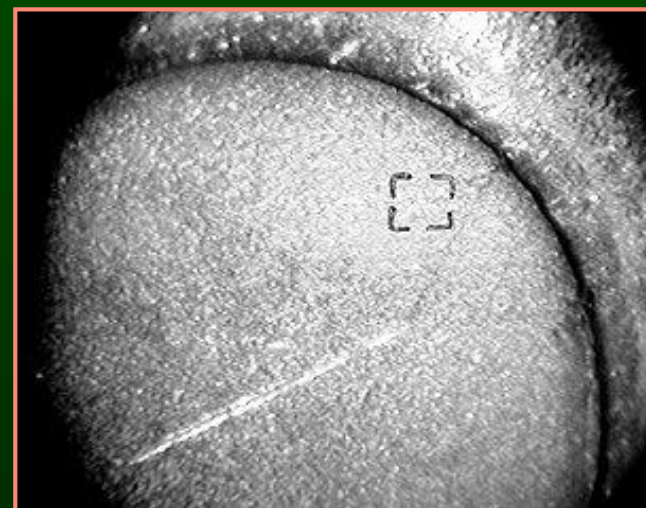
Matrice →



Spotovací destička



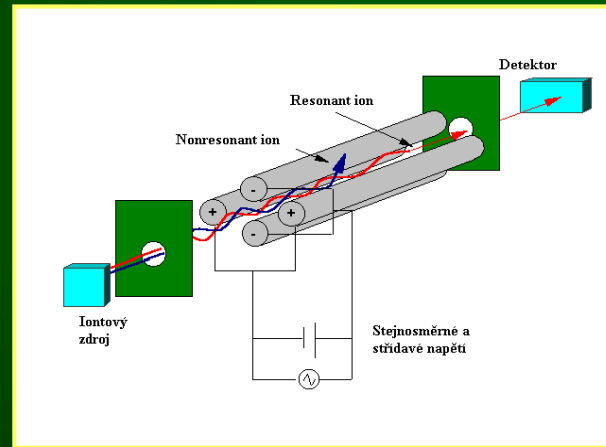
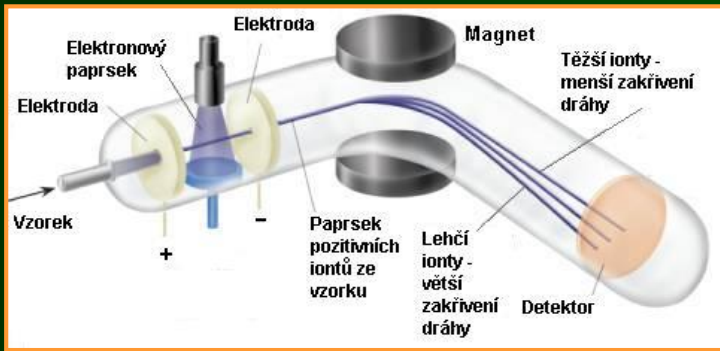
Spotovací destička na monitoru



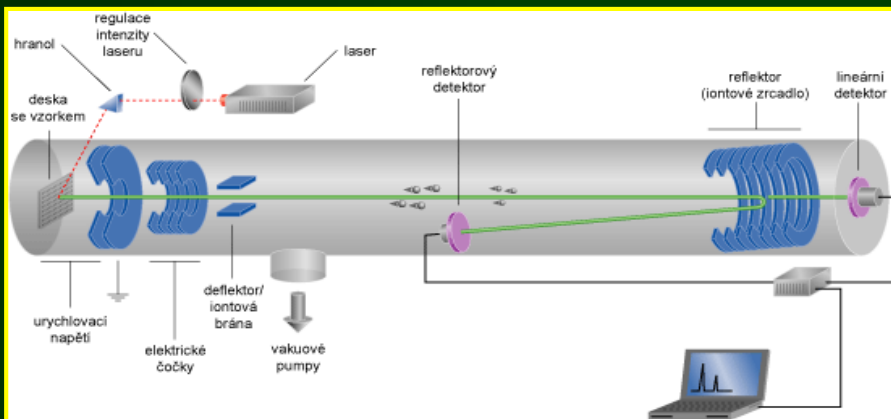
MS – separace iontů

- **Iontový separátor:** rozdělení iontů různých hmotností
 - ion je urychlen
 - z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje m/z

Magnetický sektorový analyzátor

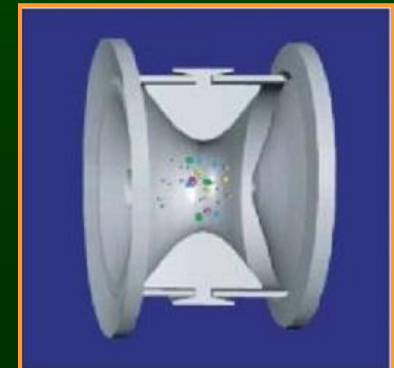


Kvadrupól



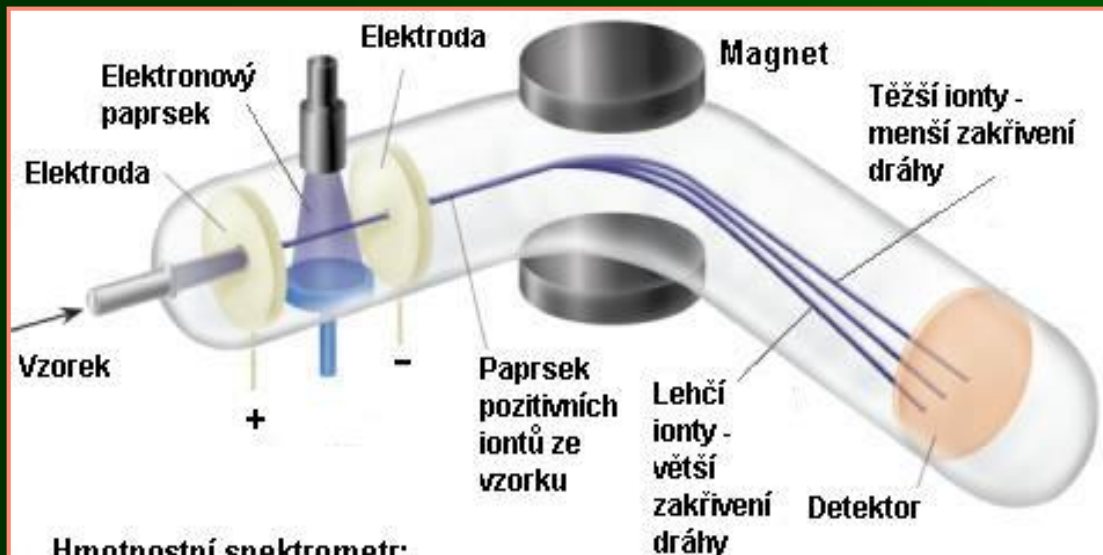
TOF

Iontová past



Magnetický sektorový analyzátor

- Nejdéle používaný a nejlépe prozkoumaný, stále se vyvíjí
- Klasický typ detektoru, využívá skutečnosti, že dráha nabité částice se v magnetickém poli zakřivuje tím více, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost
- Malé molekuly – pouze GC/MS (EI)
- Velmi přesný, ve své moderní verzi velmi nákladný (v klin. biochemii není používán)



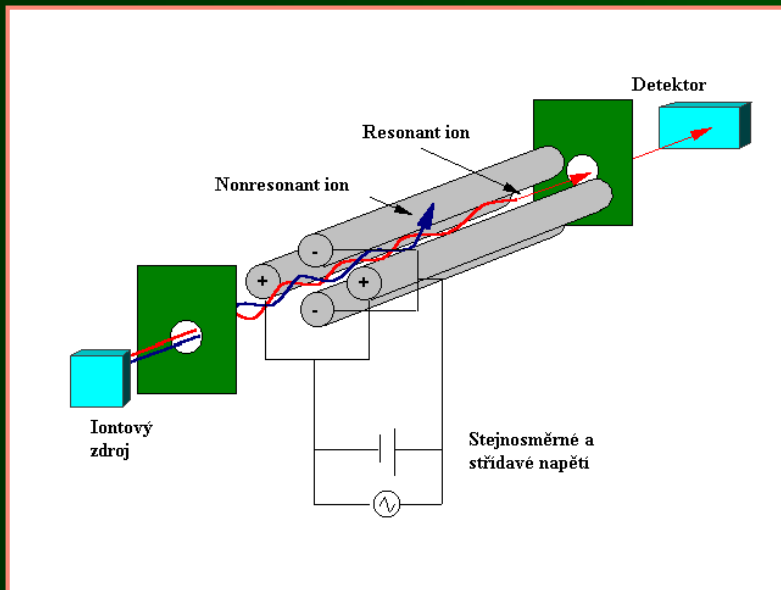
Hmotnostní spektrometr:

Elektronový paprsek fragmentuje molekuly látek v plynném stavu za vzniku pozitivních iontů. Ionty jsou urychleny elektrickým polem a prolétají magnetickým polem, kde se jejich dráhy zakřivují.



Kvadrupol

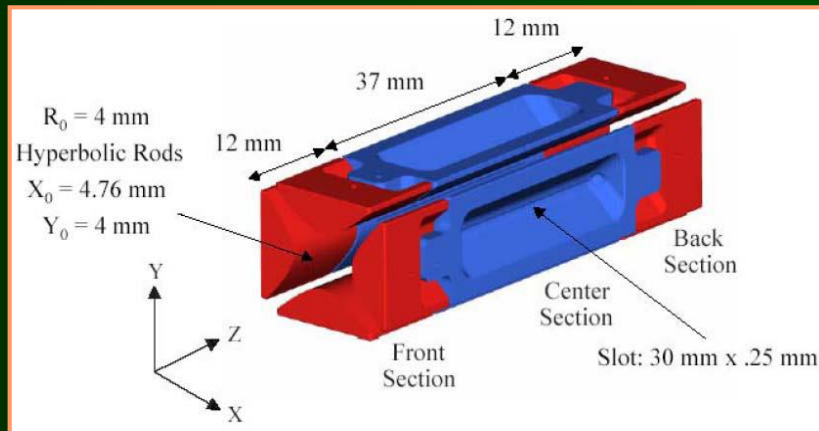
- Konstrukce - 4 kovové tyče, na ně vloženo stejnosměrné a střídavé napětí
 - Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat
 - Při vhodné kombinaci obou složek napětí prochází kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru m/z
 - změnou vkládaných napětí je možné nechat projít kvadrupolem postupně ionty v celém rozsahu m/z
 - Lze použít pro GC/MS i LC/MS (v kombinaci s EI, ESI),
 - pouze pro částice s menší hodnotou m/z



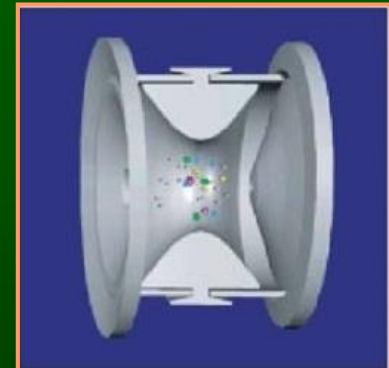
Iontové pasti

- stejné fyzikální principy jako kvadrupól
 - regulace pohybu iontu v určitém prostoru elektrickými poli
- ionty se pohybují po určitou dobu v prostoru iontové pasti
- vypuzovány z pasti selektivně podle hodnoty m/z

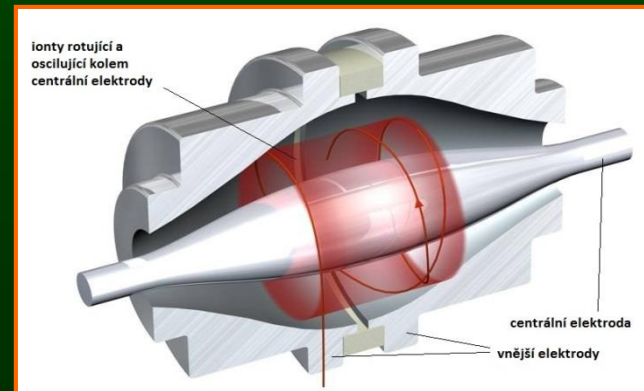
Lineární iontová past



sférická

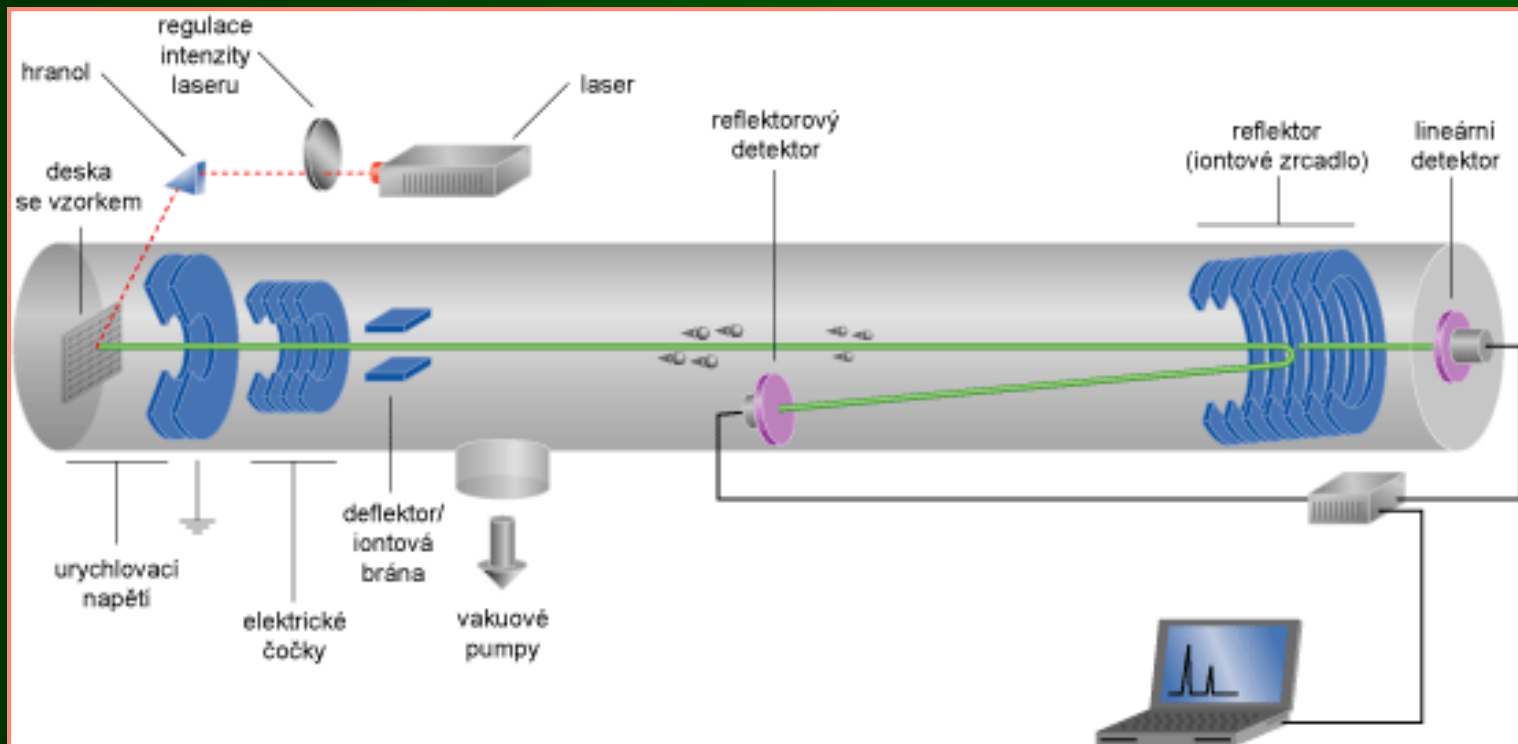


Orbitrap



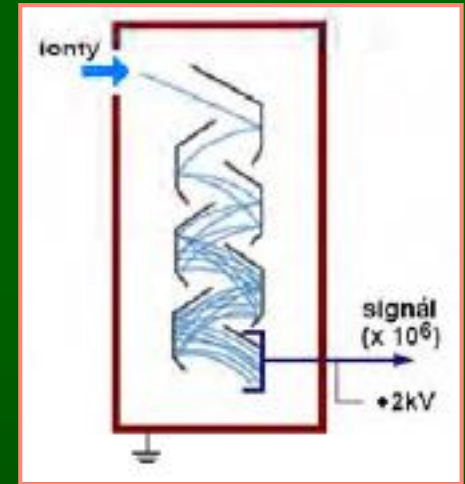
TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- Deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí
- rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti m/z
 - lehčí molekula letí rychleji
- V kombinaci s MALDI ionizací

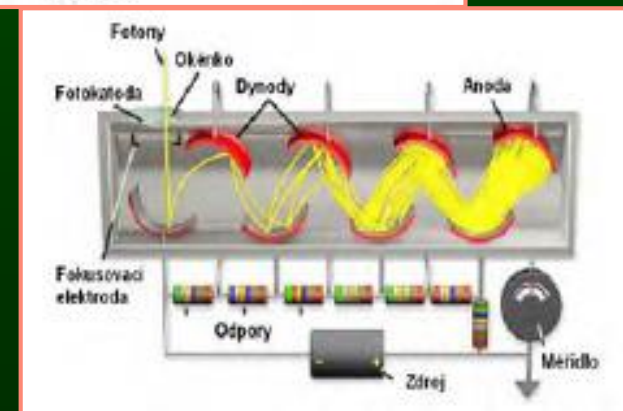
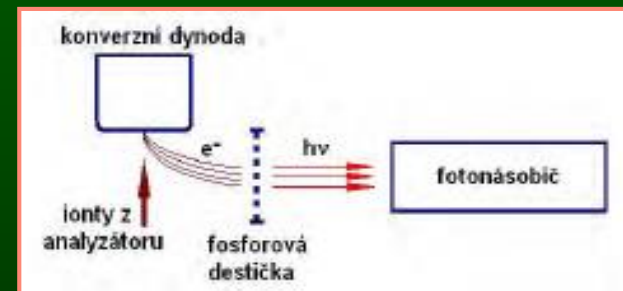


Detektor

- detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z
- určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů
- **Elektronový násobič** - série dynod se vzrůstajícím potenciálem
 - ion narazí na povrch první dynody - emise elektronu
 - po jeho dopadu na další dynodu - vícenásobná emise
 - kaskádový efekt - velké množství elektronů
 - detekce

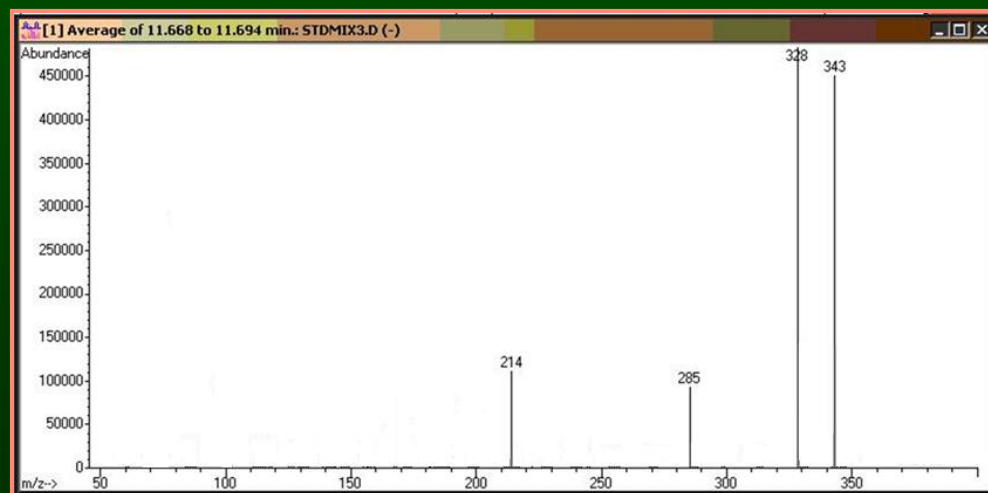
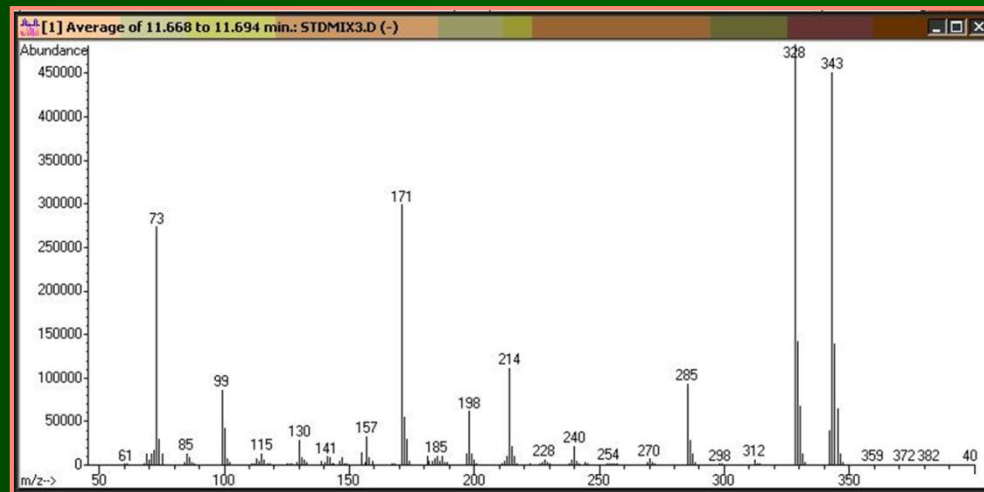


- **Fotonásobič**
 - před vlastním fotonásobičem umístěna fosforová destička
 - na ni dopadají částice z konverzní dynody
 - emise fotonů
 - fotony dopadají na fotokatodu
 - fotoelektrický jev - emise elektronů
 - elektrony zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči



Detekce - hmotnostní spektrum

- **Skenovací mód** = zobrazí všechny fragmenty zvoleného rozmezí m/z
- **SIM mód** (Selection Ion Monitoring) – způsob, kdy přístroj registruje pouze několik zvolených fragmentů (zvýšení citlivosti)

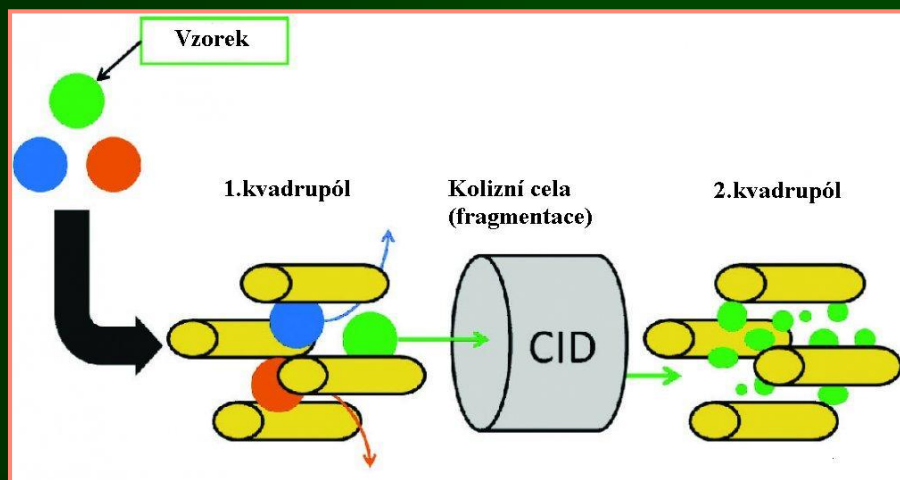


Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS

- MS/MS - ionty podrobeny dvěma hmotnostním analýzám (zapojení dvou či více iontových separátorů v tandemu)
- MS/MS umožňuje **rychlou** analýzu bez použití separačních metod (GC, LC) ve složité matici, velice **citlivá** metoda

Standardně např. **trojitý kvadrupól QqQ**:

- První kvadrupól vybírá prekursorový ion
- Ve druhé části - kolizní cele - probíhá fragmentace prekursorového iontu (srážkou iontu s atomy inertního plynu)
- Poslední kvadrupól analyzuje fragmenty



Pozn.: QqQ v kombinaci s ESI (přímý nástřik) se používá pro novorozenecký screening

- Obdobně **TOF-TOF** analyzátor
- Hybridní **Q-TOF** analyzátor (kvadrupól – TOF)

Kvantita v hmotnostní spektrometrii

Kvantifikace látek - metoda vnitřního (interního) standardu (IST)

- IST pro stanovení určité látky - analogická sloučenina nebo homolog
 - co nejpodobnější chemicko-fyzikální vlastnosti jako stanovovaná látka
 - látka, která se v původním zkoumaném vzorku nevyskytuje
- IST se přidává do vzorku již na začátku zpracování
 - pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu
- IST se přidává do všech vzorků ve stejné koncentraci
- Z MS spektra se po analýze vyhodnocuje **poměr intenzit fragmentů typických pro stanovovanou látku a IST**

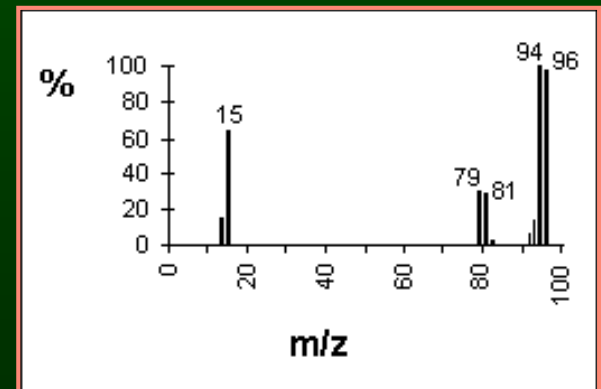
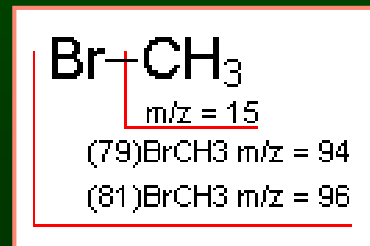
Pozn.: Pro kvantifikaci je vhodné použití selektivního záznamu iontů (**SIM** – Selection Ion Monitoring) – způsob, kdy přístroj registruje pouze několik zvolených fragmentů (zvýšení citlivosti)

nejpřesnější postup: **ID-MS**

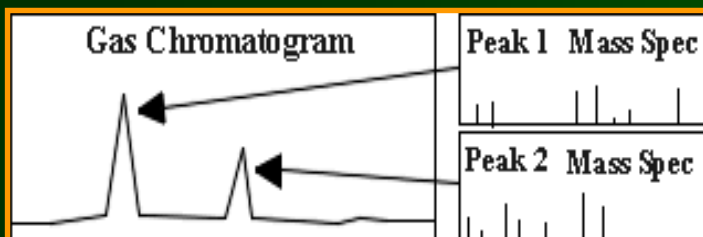
metoda izotopického zředování

IST - izotopicky značený standard stanovované látky

- identické chemicko-fyzikální vlastnosti
- nejčastěji deuterovaný

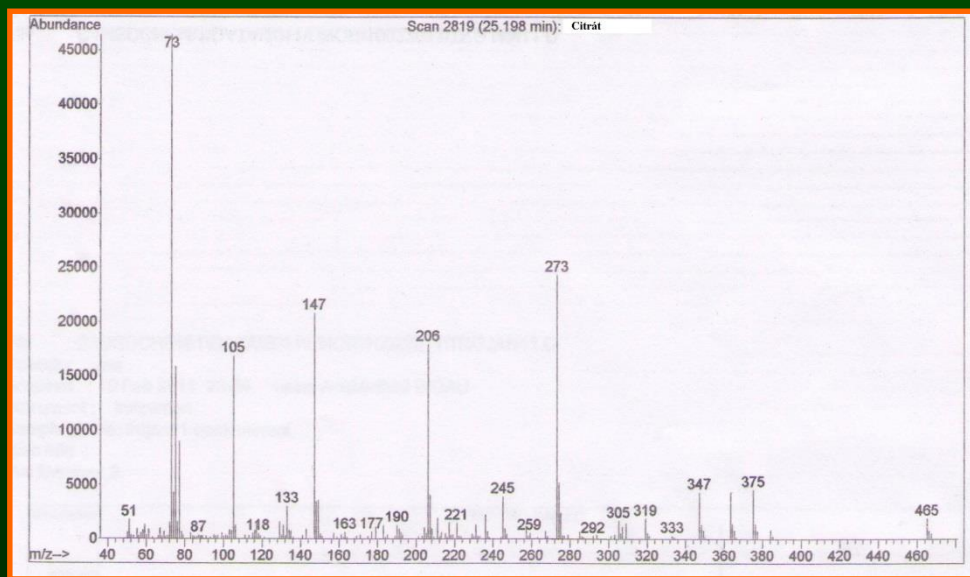
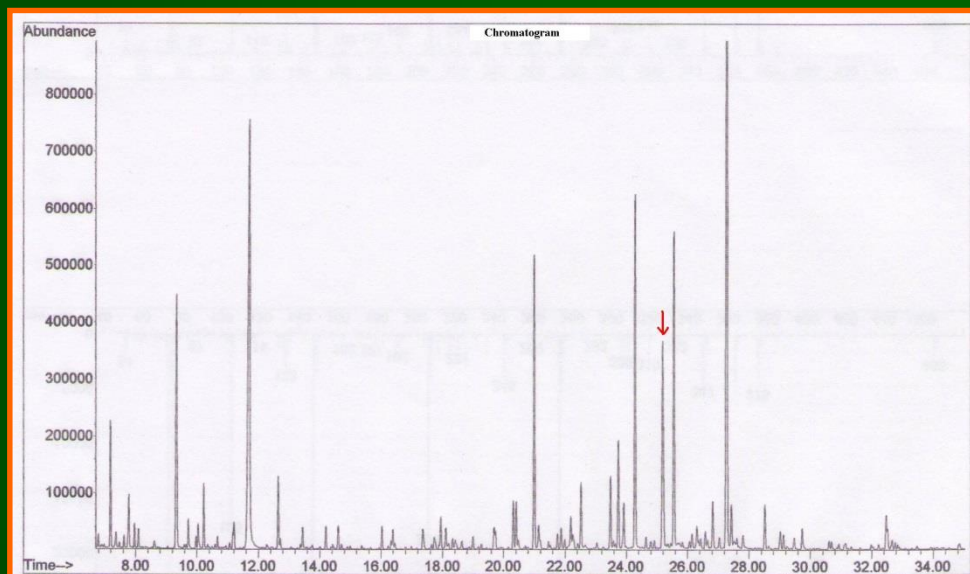


Příklady použití – GC/MS



- Analýza neznámých složek směsi
 - hmotnostní spektrum pro každou složku směsi
 - porovnání s databází spekter v počítači - identifikace
- Potvrzení či vyloučení metabolitů, které svědčí pro určité metabolické onemocnění
- Kvantifikace určitých metabolitů
- Toxikologie – léky, drogy, alkohol

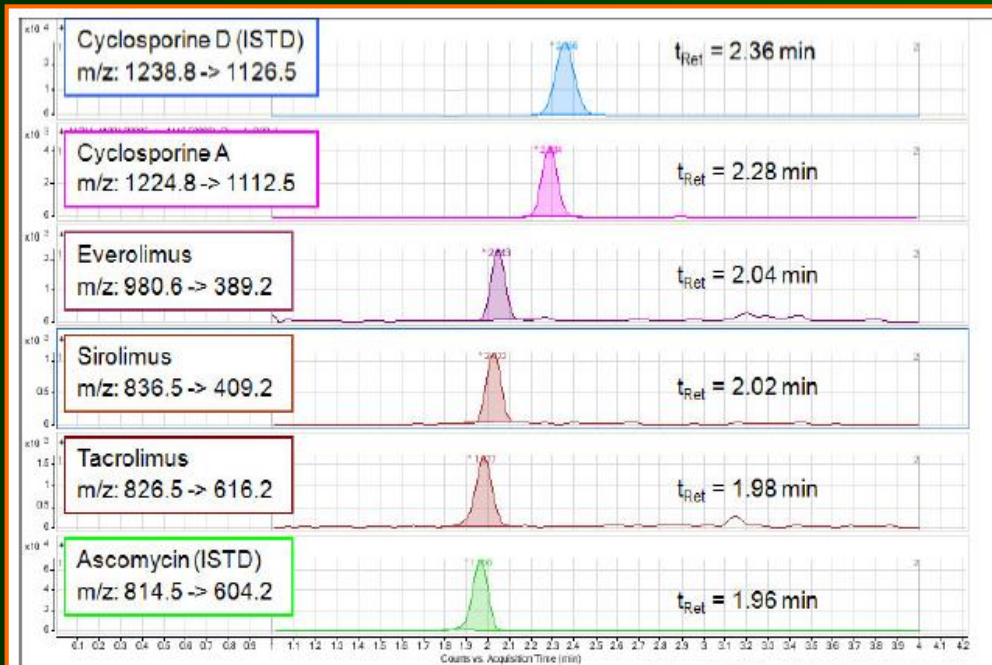
Ukázka – organické kyseliny v moči



Příklady použití - LC/MS, LC/MS/MS

- Toxikologie – standardní metoda
 - screening neznámých tox
 - konfirmace a kvantifikace speciálních tox
- Farmakokinetické studie, stanovení léků
- Proteomika / metabolomika

Stanovení léků LC/MS (LC/MS/MS)

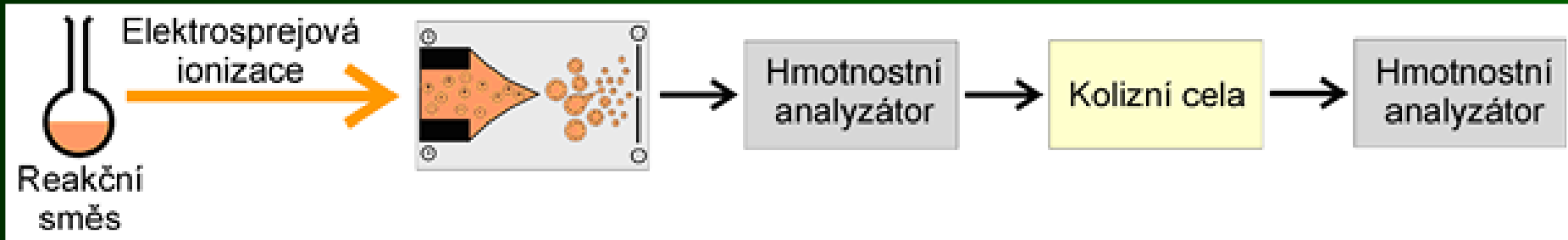


Pozn.: Záznam v SIM módu



Příklady použití – MS/MS

- MS/MS analýza bez použití separační metody (GC, LC)
 - uspořádání ESI – trojitý kvadrupol:



Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu

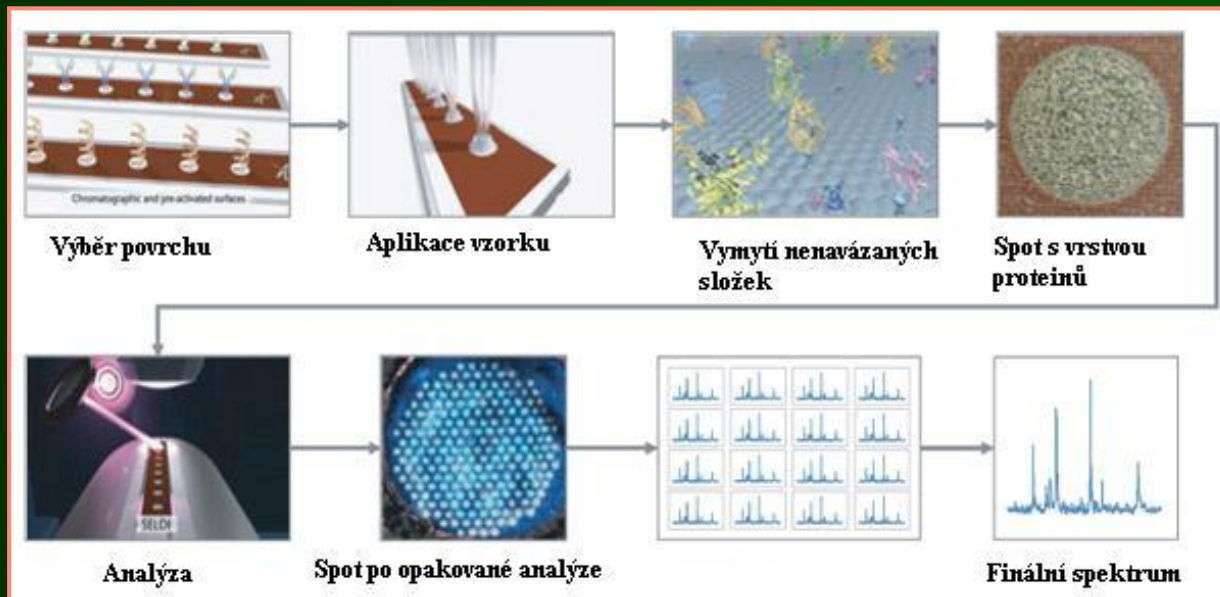
- Stanovení markerů dědičných poruch metabolismu aminokyselin a mastných kyselin ze suché krevní kapky (18 různých metabolických poruch, např. fenylketonurie)



Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

Analýza proteinů pomocí vazby na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu

- Povrch čipu - tvořený protilátkou, receptorem, ligandem, chemickou úpravou
- Po nanesení vzorku - navázání proteinů k povrchu adsorpcí, elektrostatickou interakcí, na afinitním principu,...
- Promytí mikročipu - odstranění nenavázané složky
- Analýza – viz MALDI - TOF

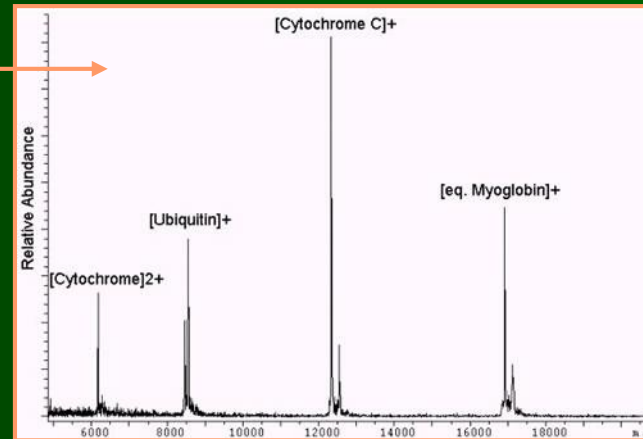


- Vzorek komplexní směsi proteinů lze analyzovat současně na několika různých sorbentech, aby byly navázány veškeré proteiny ze vzorku
- Čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka

Příklady použití - MALDI-TOF

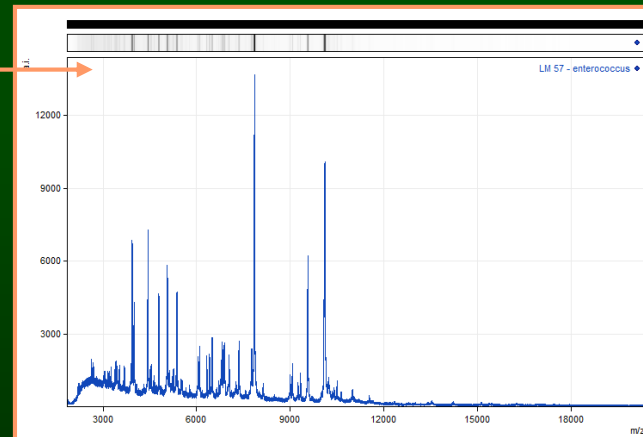
■ Analýza biomolekul

- proteiny
- peptidy
- oligosacharidy
- nukleotidy...

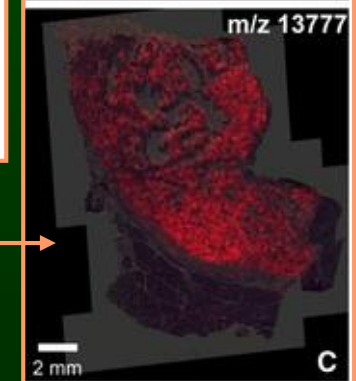
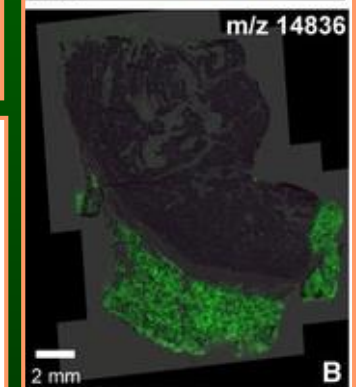


■ Identifikace mikroorganismů

po extrakci proteinů z bakterií nebo i metodou celých buněk



- MALDI - IMS (imaging mass spectrometry) zobrazení rozložení proteinů i nízkomolekulárních látek ve tkáních přímou „in-situ“ analýzou



Děkuji za pozornost...



*...ale i těm,
kteří se
nudili !*

*...těm, které
problematika
zajímala...*