

Chromatografie

Petr Breinek



Chromatografie_2013

Využití chromatografie v KB



Nejčastěji kapalinová chromatografie.

Co se stanovuje?

HbA1c, léky, vitaminy, hormony, metanefríny, toxikologie, ...

Společným znakem všech chromatografických metod je kontinuální dělení složek analyzované směsi mezi dvěma fázemi.

- Pohyblivá fáze (mobilní), eluent
- Nepohyblivá fáze (stacionární)

Výsledek chromatografie [chlorofylu](#)



Různá hlediska dělení chromatografie

Podle povahy mobilní fáze

- ❖ **Chromatografie plynová**
(**GC**; Gas Chromatography),
- ❖ **Chromatografie kapalinová**
(**LC**; Liquid Chromatography)

Podle systému fází

<i>Mobilní fáze</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mechanismus dělení</i>	<i>Metoda</i>
Plyn	Kapalina	Rozdělovací	GLC
	Pevná látka	Adsorpční	GSC
		Sítový efekt	GSC
Kapalina	Kapalina	Rozdělovací	LLC, TLC
		Sítový efekt	GPC
	Pevná látka	Adsorpční	LSC
		Iontová výměna	IEC
		Chemická reakce	Afinitní chromatografie

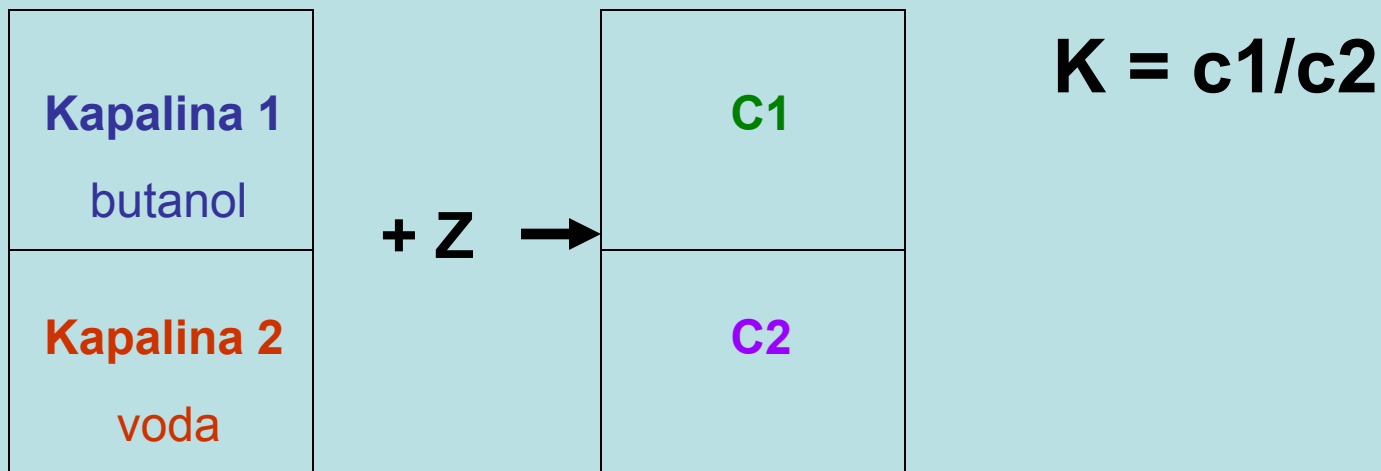
Podle způsobu provedení

- ❖ **Kolonová (sloupcová)** - stacionární fází (ukotvenou na vhodném materiálu) je naplněna skleněná či kovová kolona a mobilní fáze protéká kolonou pomocí gravitace nebo pumpy
- ❖ **Plošná (planární)**
 - papírová
 - tenkovrstevná (TLC; Thin Layer Chromatography)

Rozdělovací chromatografie

je založena na různé velikosti rozdělovacích koeficientů (K) dělených látek mezi dvěma nemísitelnými nebo omezeně mísitelnými kapalinami

O separaci rozhoduje **různá rozpustnost dělených látek** ve stacionární a mobilní fázi



Adsorpční chromatografie

je založena na rozdílných adsorpčních schopnostech jedné látky k povrchu druhé látky(adsorbentu) tvořící stacionární fázi

Stacionární fáze je adsorbent (sorbent)

- ✓ **Polární** (např. silikagel, oxid hlinitý a křemičitý)
- ✓ **Nepolární** (např. aktivní uhlí)

Iontově výměnná chromatografie

dělení látek je založeno na schopnosti výměny iontů na pevném nosiči (matrici)

Stacionární fází je **iontoměnič** (ionex)

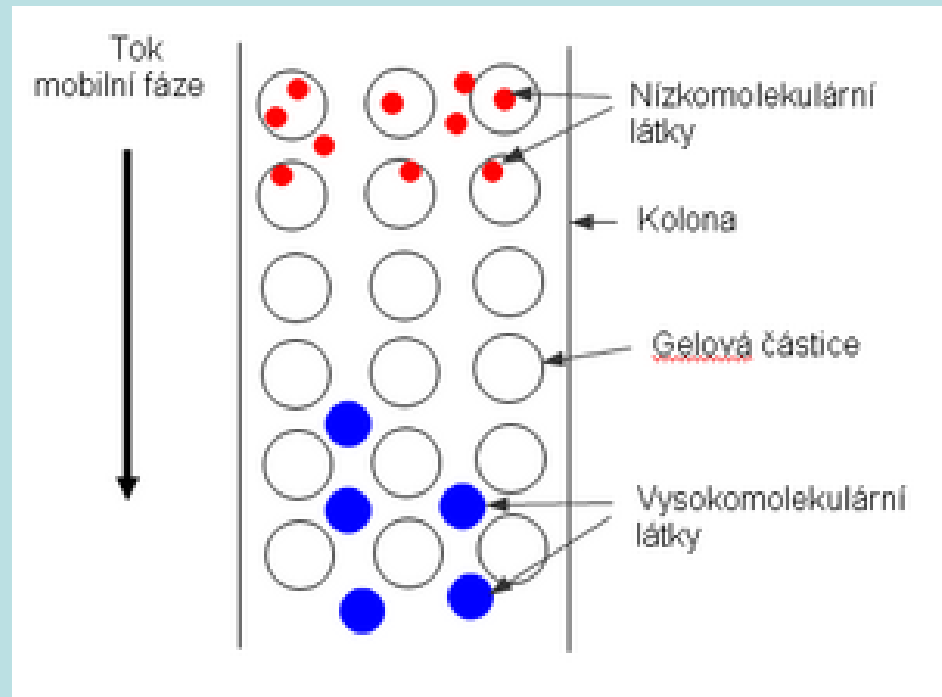
- ✓ Anexy („přitahují anionty“)
- ✓ Katexy („přitahují kationty“)

Mobilní fází jsou nejčastěji vodné roztoky

Gelová chromatografie

také chromatografie na „molekulových sítích“
dělení látek na gelu je založeno na velikosti
molekul

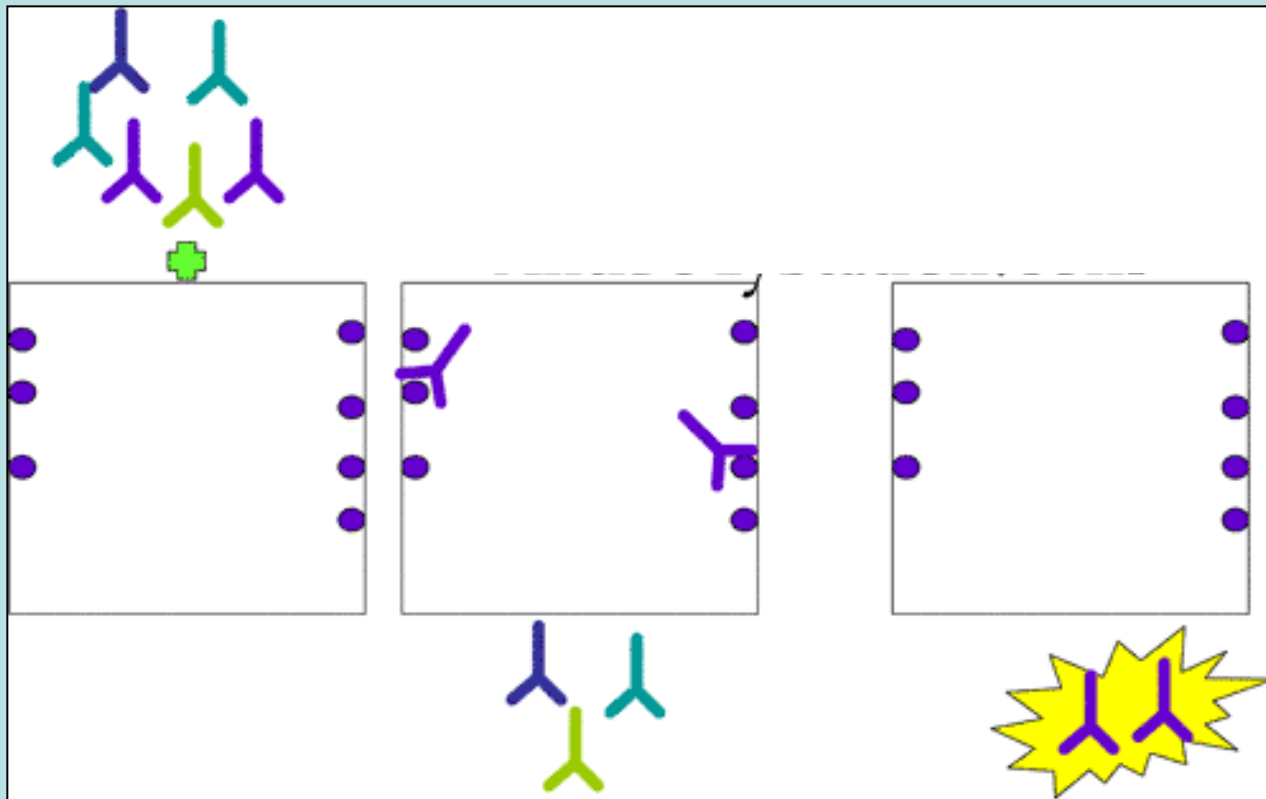
Stacionární fází je neionizovaný přírodní nebo
syntetický gel.



Afinitní chromatografie

využívá vlastnosti biologicky aktivní látky vytvářet specificky reverzibilní komplex s jinou molekulou (chemická reakce).

Stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže.

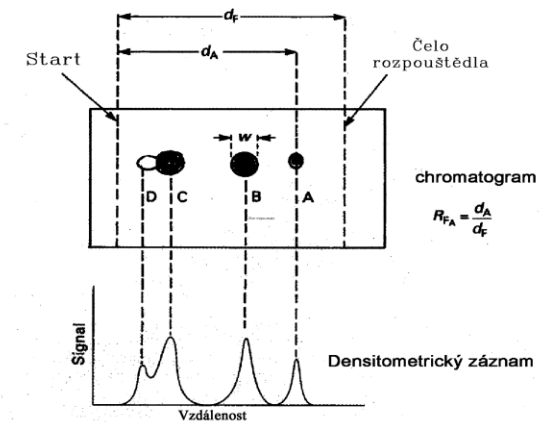
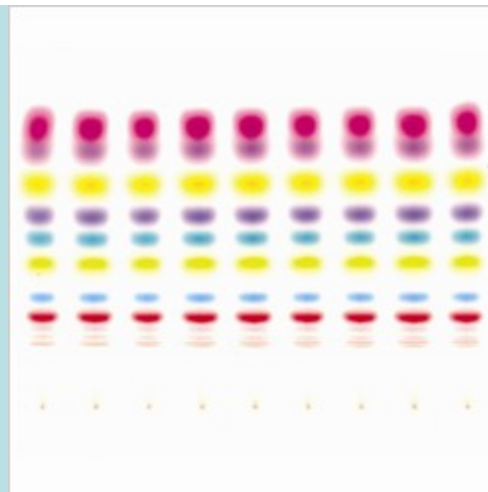
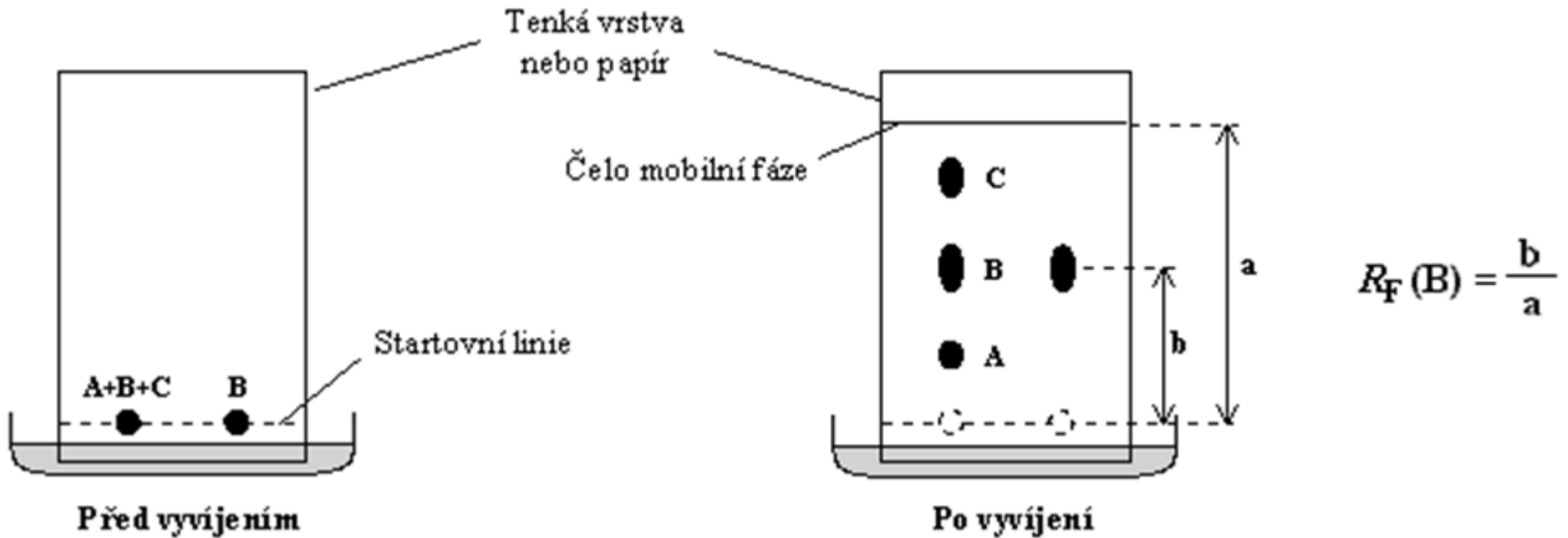


Techniky úpravy vzorků

- Extrakce kapalinou
- Extrakce pevnou látkou (SPE)
- Ultrafiltrace
- Derivatizace
- Extrakce plynem (headspace)
- Adsorpce
- Vymrazování



Plošná (planární) chromatografie



Hlavní součásti kapalinového chromatografu

Vysokotlaká pumpa

(v případě gradientové eluce je
nutná druhá pumpa a mísič)

Injektor

Dělicí kolona

Detektor

Vyhodnocovací zařízení

(zapisovač, PC, tiskárna)



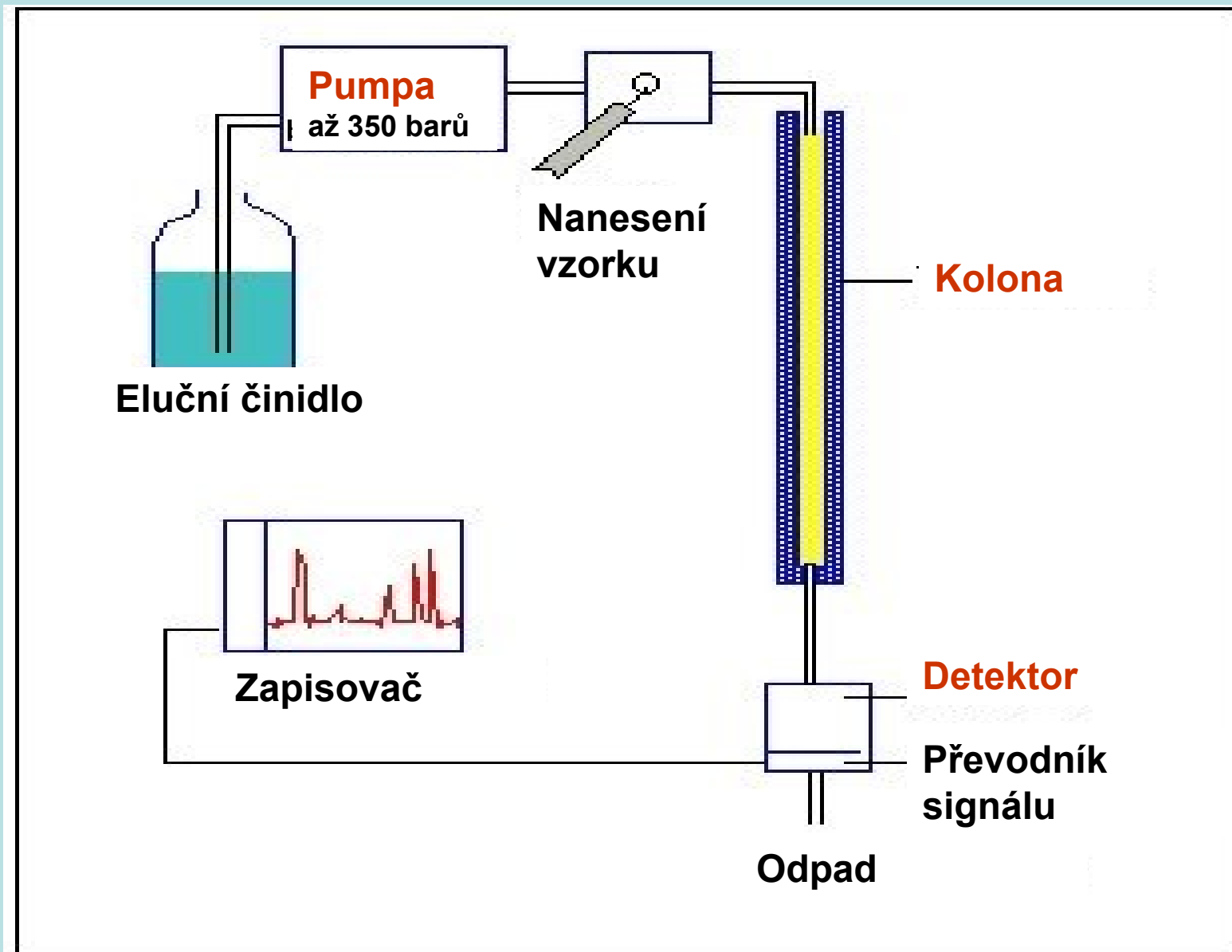
Typ eluce

- **Isokratická**
- **Gradientová** (v průběhu dělení se mění složení mobilní fáze)

Reverzní fáze

(stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní)

HPLC – jednoduché schéma

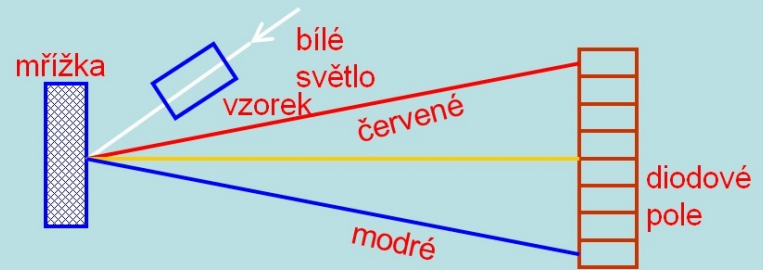


Kolona, eluční pufry

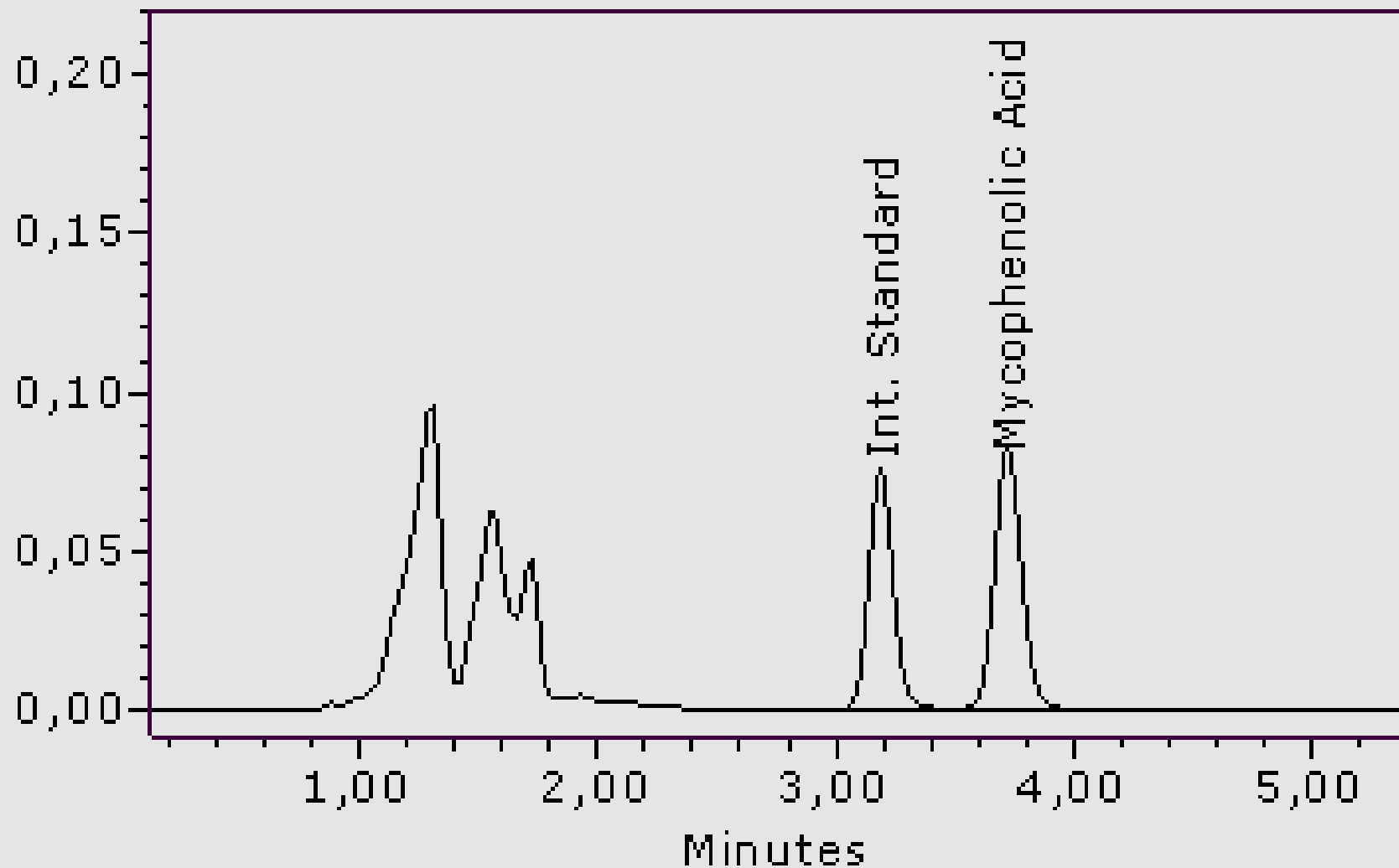


Detektory

- UV/VIS
- Detektor s diodovým polem
(Diode Array Detector)
- Fluorescenční
- Plamenový ionizační (FID)
- Elektrochemický
(coulometrický, ampérometrický,....)
- Hmotnostní spektrometr (MS)



Chromatografický záznam



Základní pojmy

Fáze

Průtok (flow rate, ml/s)

Retenční čas (minuty)

Pík

Výška píku; Plocha píku; Šířka píku

Šum

Drift

Účinnost kolony

Teoretické patro = minimální délka kolony nezbytná pro ustavení 1 cyklu rovnováhy mezi fázemi;

50 000 -100 000 teoretických pater na 1m délky

Kvantifikace (vyhodnocení)

1. Přímé srovnání

plocha nebo výška píku

srovnání s kalibrátorem (externí standard)

2. Metoda vnitřního standardu

plocha nebo výška píku

srovnání poměru plochy nebo výšky píku

stanovované látky s vnitřním a externím

standardem

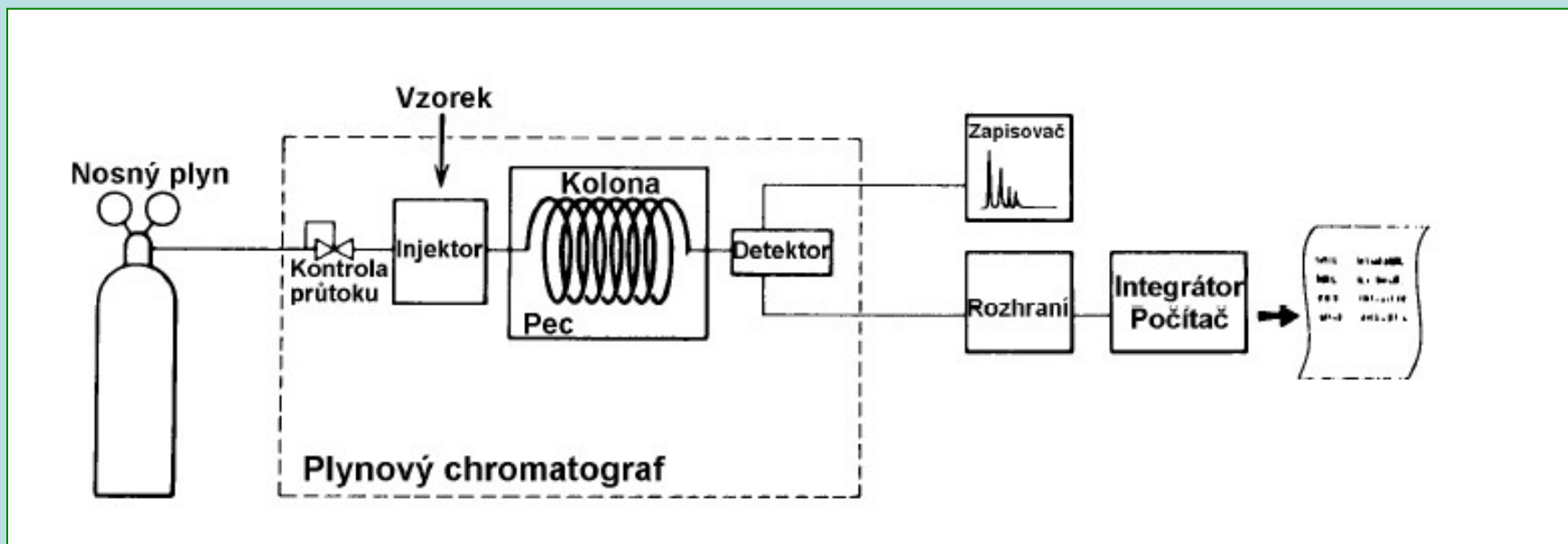
3. Metoda standardního přídavku

Plynová chromatografie (GC)

- Dělená směs musí procházet kolonou v plynném stavu

Plyn - Kapalina
Plyn - Pevná látka

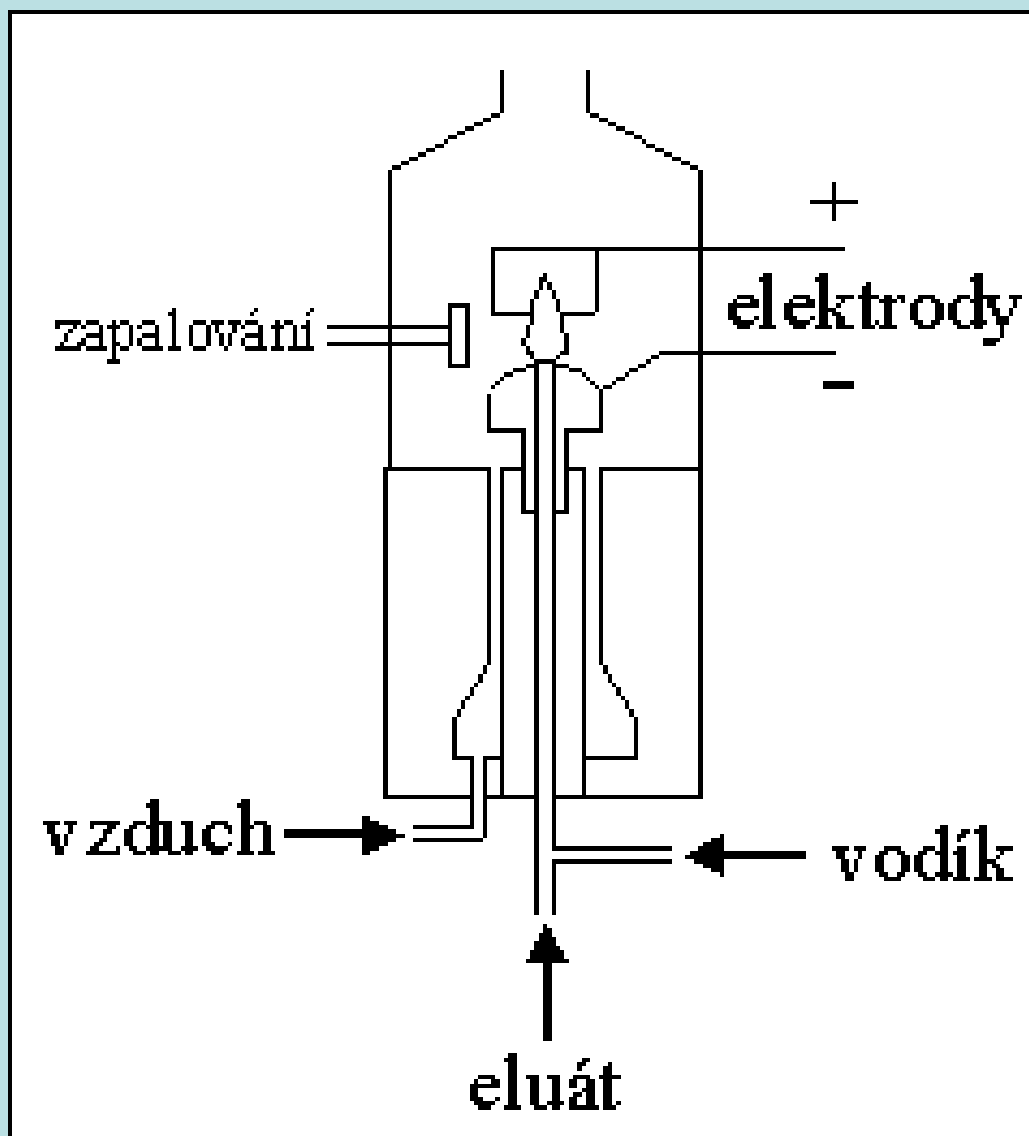
Rozdělovací
Adsorpční



Detektory

- Plamenový ionizační (FID)
- Tepelně vodivostní (TCD)
- Elektronového záchytu (ECD)
- Hmotnostní spektrometr (MS)

Plamenový ionizační detektor (FID)



Měření změny ionizačního proudu vodíkového plamene v důsledku přítomnosti iontů vzniklých při spálení

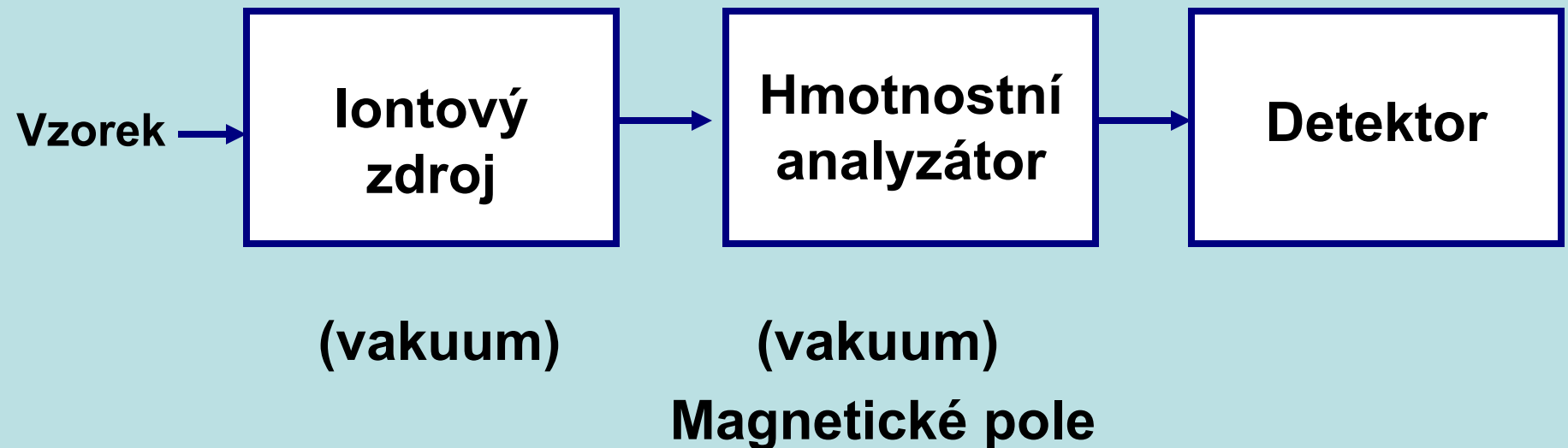
Hmotnostní spektrometrie (MS)

Analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty v plynné fázi ve vakuu a **rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)**

Principem MS je pohyb iontů v elektrickém nebo magnetickém poli v závislosti na jejich hmotnosti a náboji

Hlavní součásti hmotových spektrometrů

- Iontový zdroj (destrukce molekul na fragmenty)
- Hmotnostní analyzátor
- Detektor dopadajících fragmentů

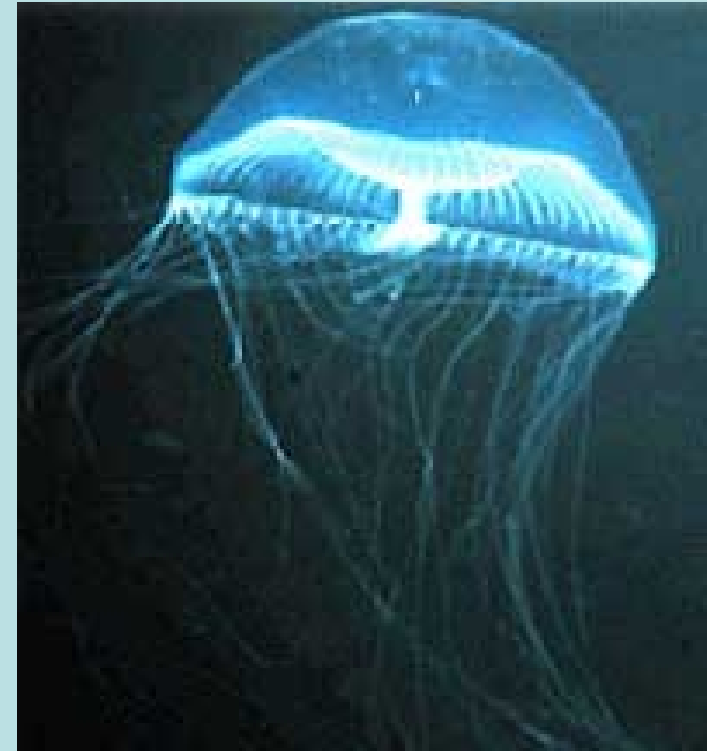


LUMINISCENČNÍ metody

Petr Breinek

Bioluminescence v přírodě

Světlušky, medúzy,
dřevokazné houby,
hlubokomořské ryby,.....

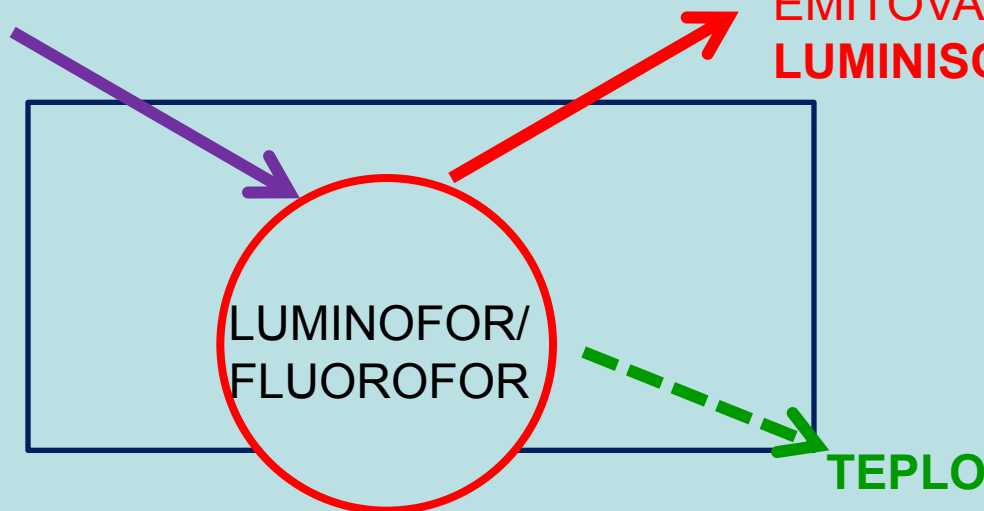


Luminiscence

je jev, při kterém vzniká světlo (fotony) po předchozím dodání energie (excitaci) materiálu (luminoforu)

Luminiscence je charakteristická svojí dobou trvání, která o několik řádů převyšuje doby života termálních kmitů (záření černého tělesa), t.j. tepelné záření není luminiscence!

EXCITAČNÍ záření



Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- ✓ **Fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- ✓ **Chemiluminiscence** a bioluminiscence - zdrojem energie je chemická reakce
- ✓ **Elektroluminiscence** – zdrojem je el. proud; **Katodoluminiscence** – zdrojem je proud elektronů ; **Thermoluminiscence**; **Radioluminiscence** – zdrojem je radioaktivní záření; **Mechanoluminiscence** – zdrojem je mechanická energie; **Krystaloluminiscence** – krystalizace je doprovázena luminiscencí; **další zdroje**

Luminofory/fluorofory

jsou molekuly nebo jejich části, které vyzařují luminiscenční záření (fluoreskují)

✓ **Přirozené**

✓ **Analytické**

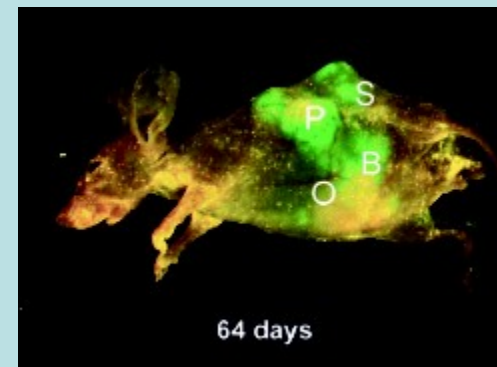
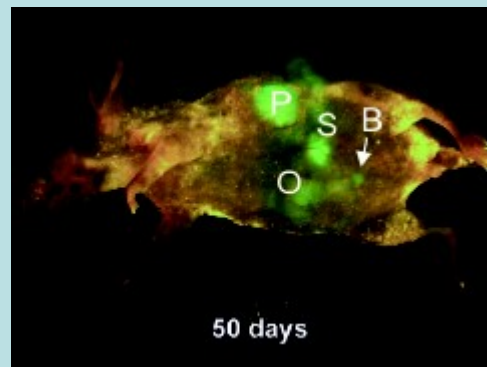
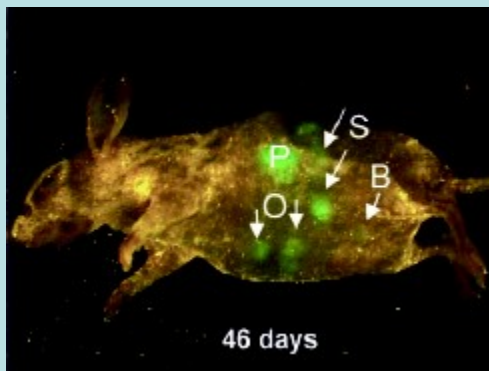
(fluorescenční značky nebo sondy)

Přirozené luminofory/fluorofory

- Polyaromatické uhlovodíky
- **Vitamin A, E**
- **FAD, FMN (450/525 nm) x FADH, FMNH**
- **NADH (340/460 nm) x NAD⁺**
- **Karoteny**
- Chinin
- Steroidy
- **Aromatické aminokyseliny**
- Nukleotidy
- Fluoreskující proteiny - GFP (green fluorescent protein)

Použití GFP v chemii a biologii

- Nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru



Analytické luminofory/fluorofory

- Luminol, isoluminol
- Fluorescein
- Methylumbelliferon (MU)
- Akridin a jeho estery
- Adamantyl dioxetan
- Cheláty lanthanoidů (Europium)

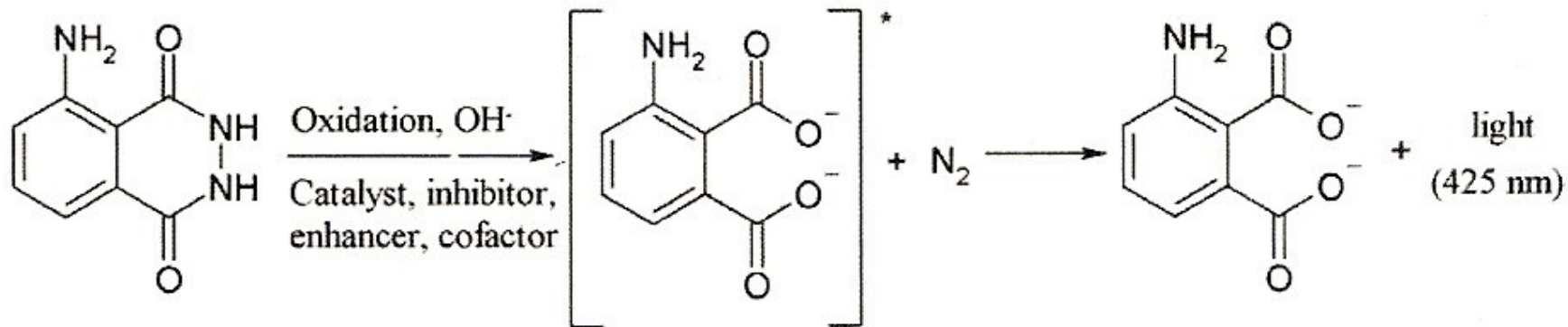
Nejčastěji jsou navázány jako značka (na protilátky nebo antigeny) nebo jsou použity jako substrát.

Luminol (5-aminoftalhydrazid)



(1928) – oxidace v bazickém prostředí

příklad použití: intenzivní reakce s hematinem detekce krevních skvrn)



Luminol



3-aminophthalate
excited state

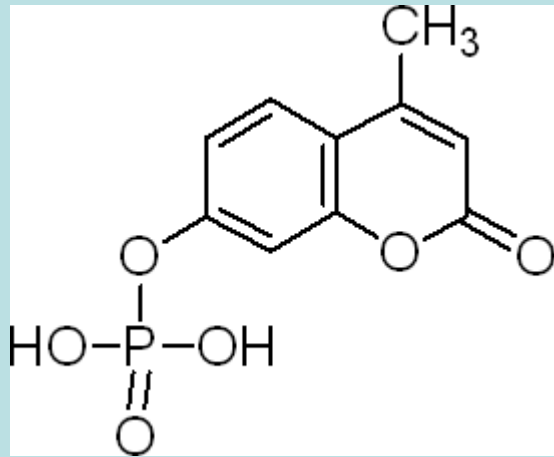
3-aminophthalate
ground state



Methylumbelliferon (MU)



4-metylumbelliferyl fosfát \rightarrow 4-metylumbelliferon + fosfát
+ luminiscence



(defosforylace substrátu)

Chemiflex™ (Abbott)

Patentovaný ester akridinu

akridinium(N-sulfonyl)karboxamid

Sloučenina je velmi stálá

Reakce:

- oxidace v kyselém prostředí (pH=2; HNO₃ a H₂O₂)
- změna prostředí na zásadité (NaOH)
- vznik nestabilní N-sulfonylpropylakridon v excitovaném stavu
- při přechodu do stabilní formy se uvolní CO₂ a energie v podobě světla (430nm)

Lumigen® (Siemens, DPC)

Fosfátový ester adamantyl dioxetanu

Reakce:

- defosforylace substrátu účinkem ALP
- vznik nestabilního meziprojektu v excitovaném stavu
- při jeho tvorbě je emitován tok fotonů

Luminiscence lanthanoidů

Některé komplexy Ln(III) mají velmi neobvyklé spektrální vlastnosti:

- ✓ **dlouhý čas vyhasínání luminiscence**
- ✓ **Stokesův posun může být i více než 100 nm**
- ✓ **emisní spektrum obsahuje ostré píky**

Fotoluminiscence

- Podle dosvitu sekundárního záření dělíme fotoluminiscenci na:

Fluorescenci (10^{-9} - 10^{-5} s)

Fosforescenci (10^{-2} s až dny)

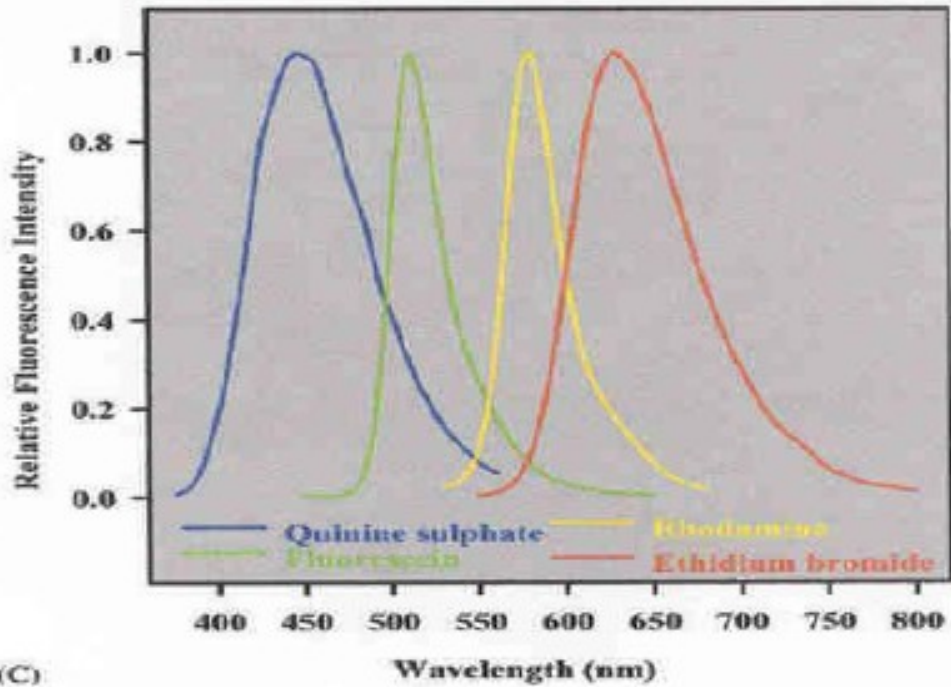
- Absorpce primárního záření v oblasti gama, rentgenového, ultrafialového nebo viditelného spektra

Fluorimetrie – absorpce UV záření

Přístrojová technika

- **Zdroj excitačního záření** (Hg výbojka, halogenové výbojky, Xe výbojka, lasery).
- **Filtr** (Woodův filtr skla s příměsí NiO, CuO, CoO).
- **Měřicí prostor**
- **Interferenční filtr** propouštějící fluorescenční signál.
- **Detektor**

Emisní spektrum

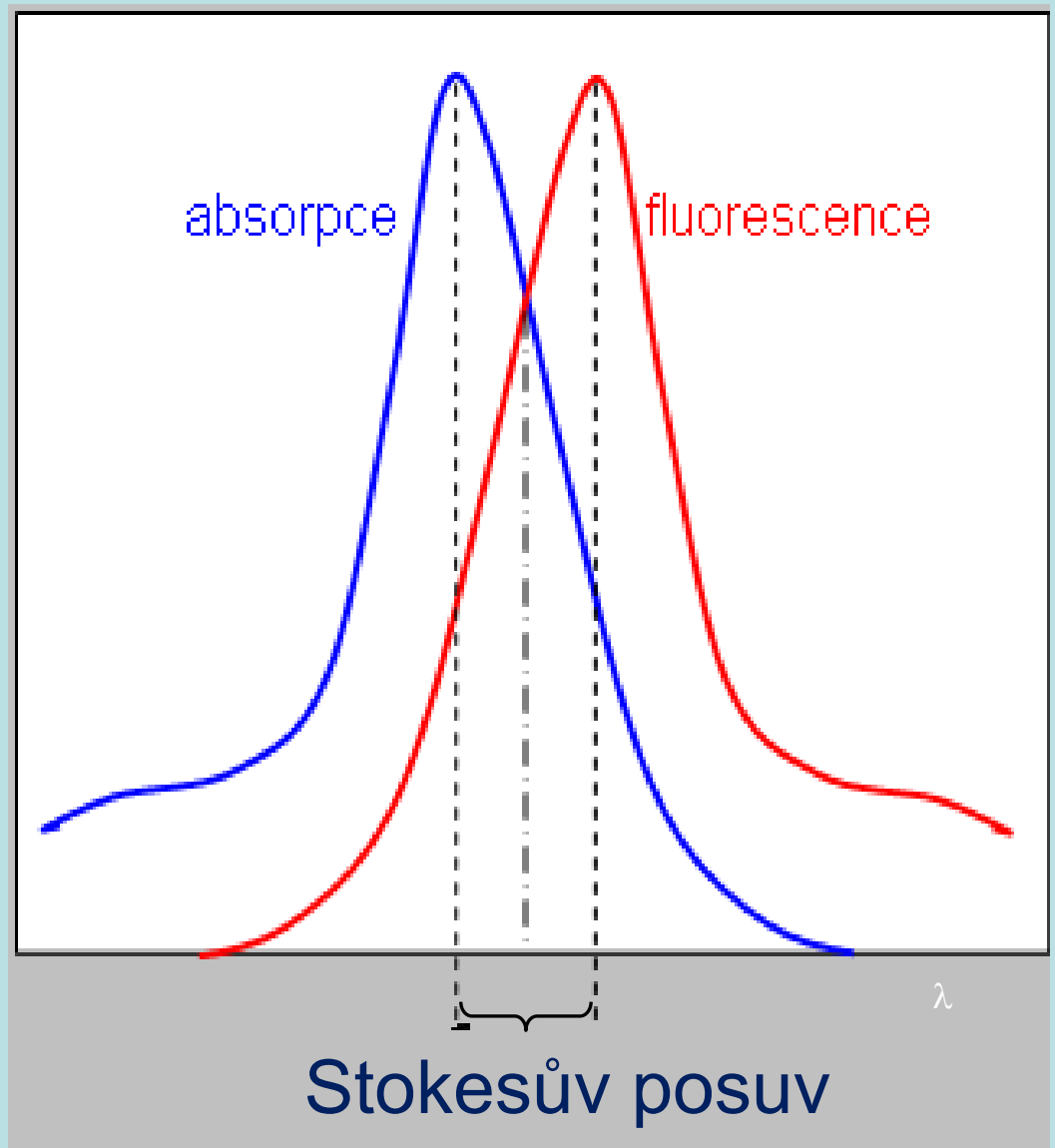


Stokesův posuv

Rozdíl vlnových délek absorpčního (excitačního) a emisního maxima

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

$$E = h \cdot c / \lambda$$



DELFLIA

Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay

Protilátky nebo antigeny jsou značeny **cheláty lanthanoidů**: **Eu** (europia), **Sm** (samaria) a **Tb** (terbia)

Cheláty lanthanoidů vykazují velký Stokesův posun a delší dobu emise.

(Pozn.: použití jako luminofor v obrazovkách barevných televizorů)

Nekompetitivní sendvičová technika chráněná patentem.

- Po imunochemické reakci se tento chelát přemění na fluoreskující sloučeninu
- Detekce záření se zpožděním (odstranění interferujícího záření)
- **Pulzní zdroj** (340nm, tisíce pulzů/s)

Po každém záblesku:

400 μ s prodleva

400 μ s měření emitovaného záření

(Nespecifická emise 10 ns)

Využití:

„Celoplošný laboratorní novorozenecký screening“

- **Kongenitální hypotyreóza (SKH)**
Snížená funkce štítné žlázy vede ke zvýšení koncentrace **TSH**
- **Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH)**
Defekt steroidogeneze v kůře nadledvin;
nejčastěji deficit enzymu P450c21 (21-hydroxylázy)
zvýšení koncentrace **17 OHP** (17-0H-progesteronu)
- Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie

TRACE

Time Resolved Amplified Cryptate Emission Časově modulovaná detekce fluorescence

- Homogenní fluorescenční imunoanalýza
- Využití kryptandů (=sloučeniny, které fluorofor Eu^{3+} váží v trisdipyridylové „kleci“)
- Kryptandem je značený antigen nebo protilátka
- Na druhou protilátku je vázán fluorofor, který je excitován při jiné vlnové délce než Eu
- Immunokomplex je excitován laserem při 337 nm
- Energie přenesená z kryptandu na fluorofor je detekována při 665 nm jako prodloužený signál

Chemiluminescence

je vyvolána energií chemické reakce (většinou oxidace)

- Jednoduché přístrojové vybavení bez zdroje primárního záření, nižší vliv matrice, stanovení nižších koncentrací

- **Elektrochemiluminescence**

je modifikace chemiluminescence, kdy luminescence je generována chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky

CMIA

Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích

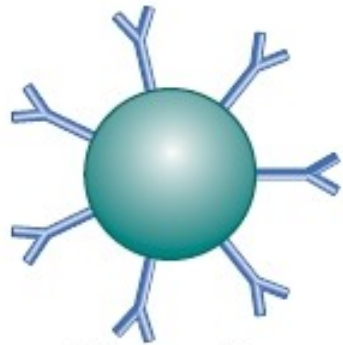
- Heterogenní imunoanalýza - separace pevnou fází
- Paramagnetické mikročástice
- Emise světla molekulou, která je produktem chemické reakce
- Systém není ozařován zdrojem světla.

Paramagnetické částice

Krystaly kysličníků železa

- ❖ velký povrch
- ❖ magnetické vlastnosti

CMIA



Magnetic
Microparticle

+



Sample

+



Patented
Acridinium Derivative
Conjugate

+



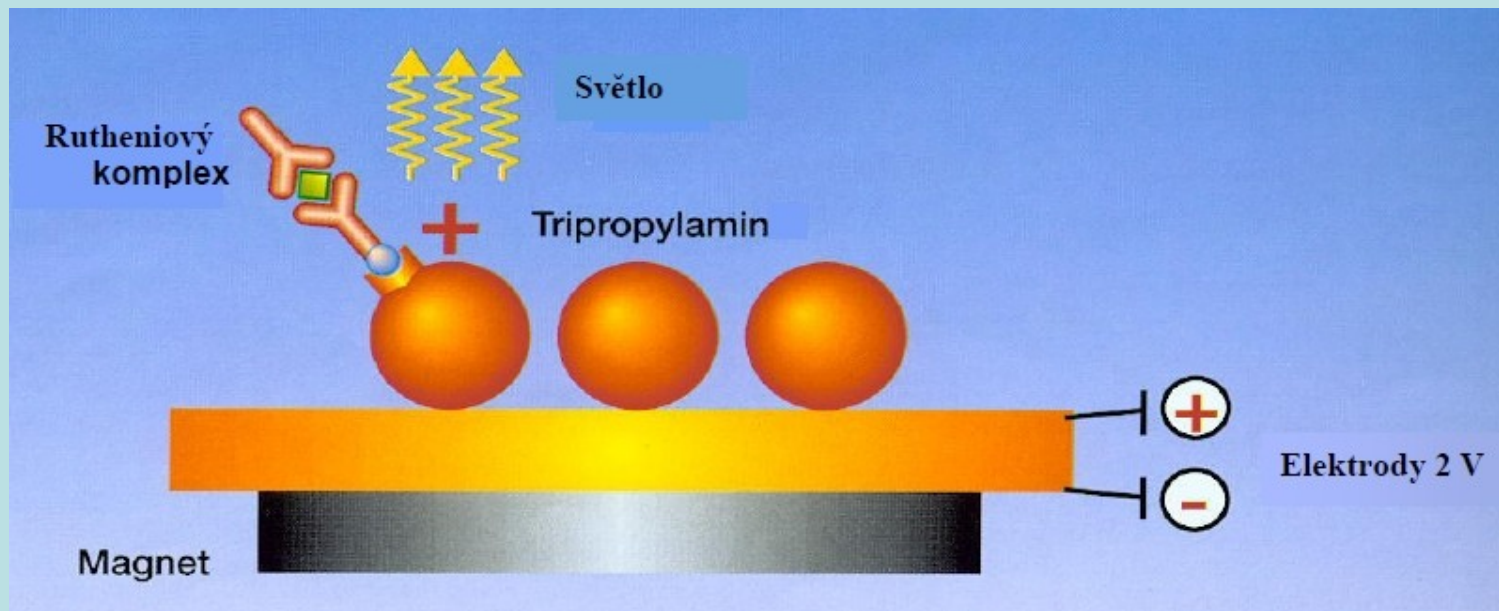
Base/Acid

ECLIA

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
modifikace chemiluminiscence, světlo je
generováno chemickými reakcemi
iniciovaných elektrochemicky



Elecsys 2010
(Roche)



- ✓ Cheláty ruthenia se používají jako luminiscenční značka vzniklých imunokomplexů
- ✓ Na platinové elektrodě je chelát Ru^{2+} oxidován na Ru^{3+} , zároveň je tripropylamin (TPA^+) oxidován na radikál $\text{TPA}^{\cdot+}$ (má redukční vlastnosti), snadno redukuje Ru^{3+} komplex na Ru^{2+} , Ru kation prochází reakcí cyklicky, nespotřebovává se, chová se jako enzym
- ✓ elektron z TPA přeskočí do vyšší energetické hladiny Ru kationtu, přechodem do základního stavu dojde k luminiscenci a Ru komplex je opět schopen další oxidace
- ✓ TPA se rozpadá na dipropylamin, je v reakci spotřebováván, slouží jako substrát