

# Chromatografické metody

**RNDr. Alena Mikušková**

**FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB**



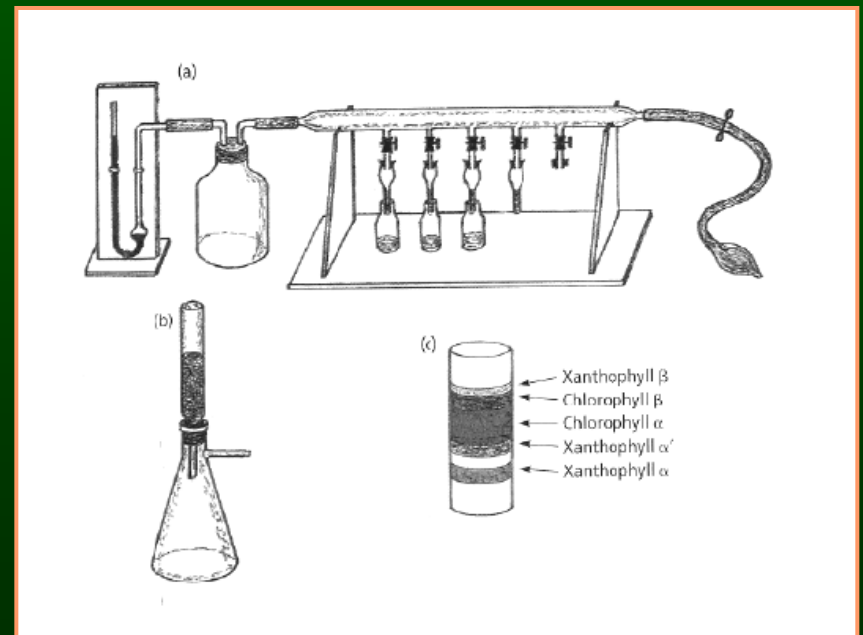
# CHROMATOGRRAFIE

- 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 rozhráním*

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

První chromatograf

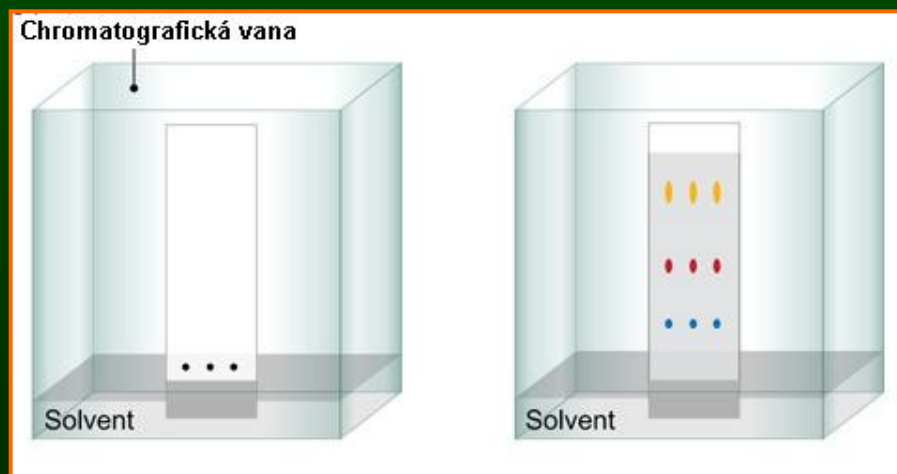
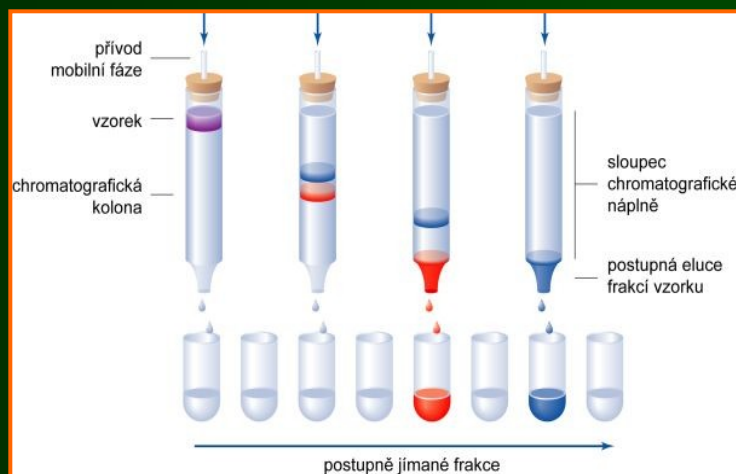


# CHROMATOGRRAFIE

■ 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)

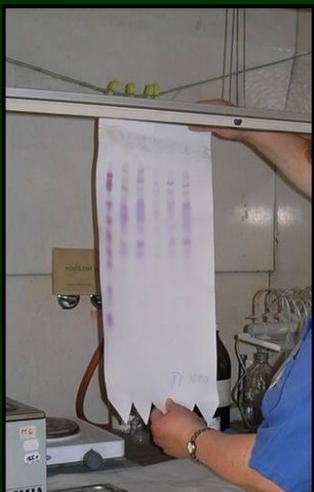


# Klasifikace chromatografických metod

## - 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

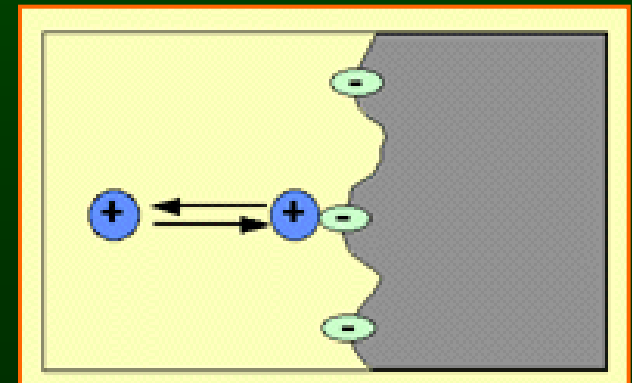
- Preparativní chromatografie - pro přípravu většího množství čistých látek
- Analytická chromatografie - pro určení identity a koncentrace látek ve směsi

# Klasifikace chromatografických metod

## - Podle separačního mechanismu

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

- výměna iontů elektrostaticky vázaných na nabitém 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 kyselé 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

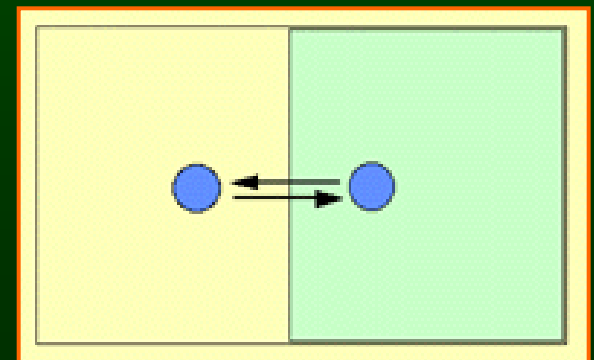
### Rozdělovací chromatografie

- 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 vlákněch papíru u papírové chromatografie, na nosných částicích u HPLC
    - nanesena 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)
- O pohyblivosti jednotlivých složek dělené směsi rozhoduje rozdělovací koeficient dělených látek mezi oběma fázemi (K):

$$K = c_{\text{org}} / c_{\text{vod}}$$

c org ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

c vod ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi

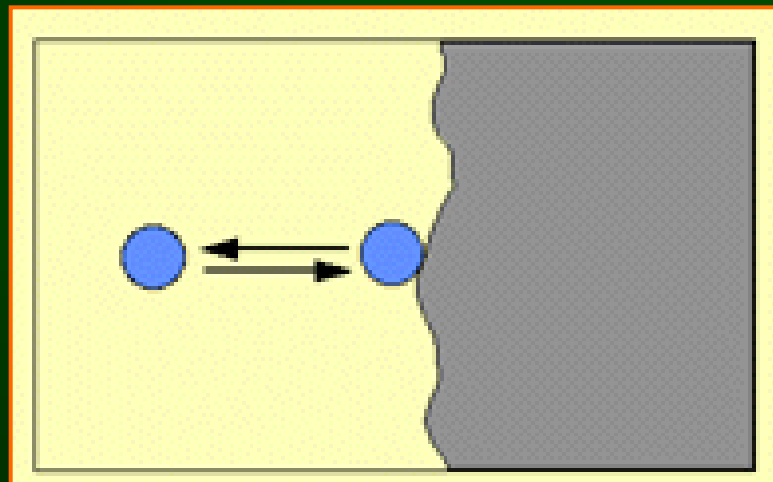


# Klasifikace chromatografických metod

## - 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)



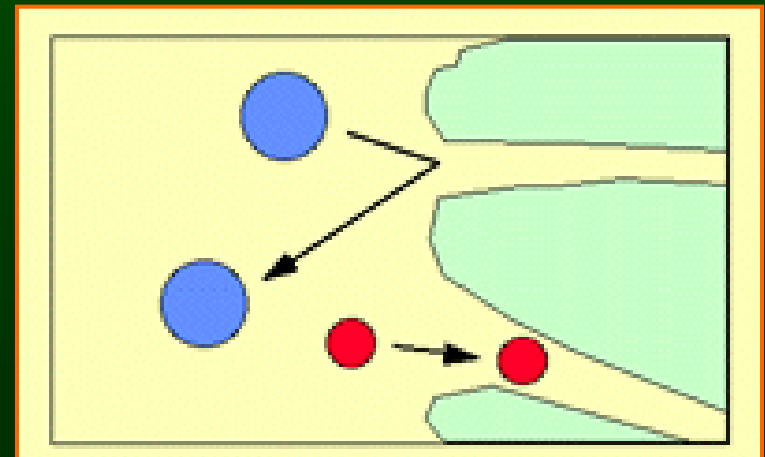
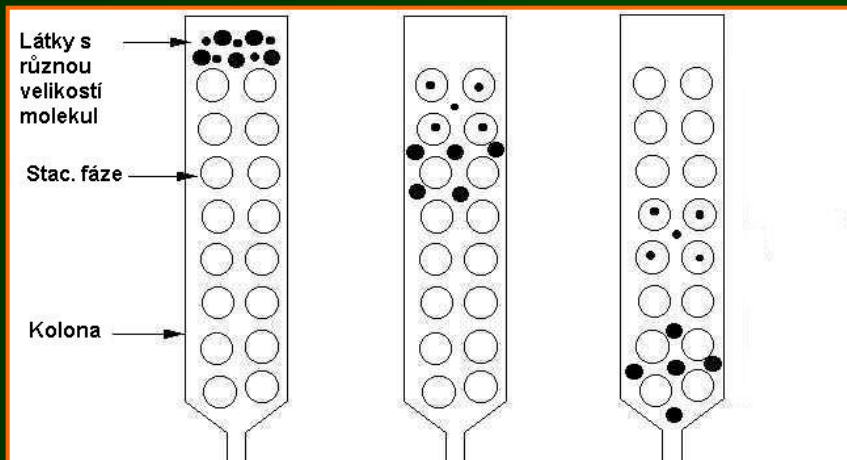


# Klasifikace chromatografických metod

## - 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



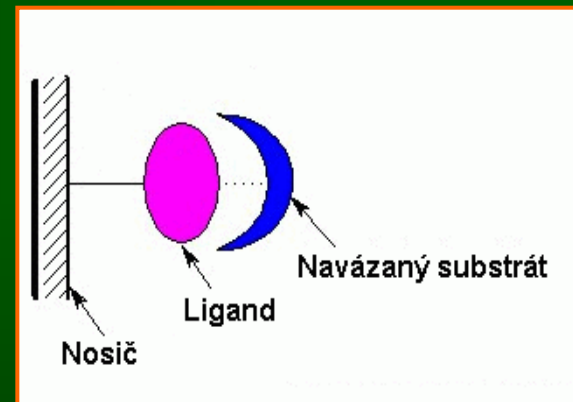
# Klasifikace chromatografických metod

## - 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

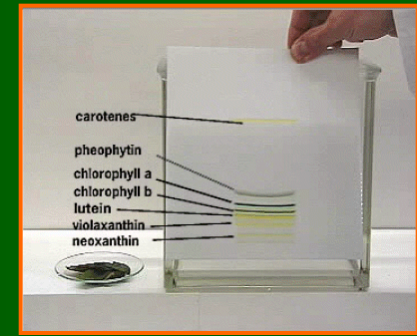
- papírová rozdělovací
- tenkovrstvá TLC (thin layer chromatography)
  - tenkovrstvá rozdělovací (SF kapalina)
  - tenkovrstvá adsorpční (SF pevná látka)

### ■ 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

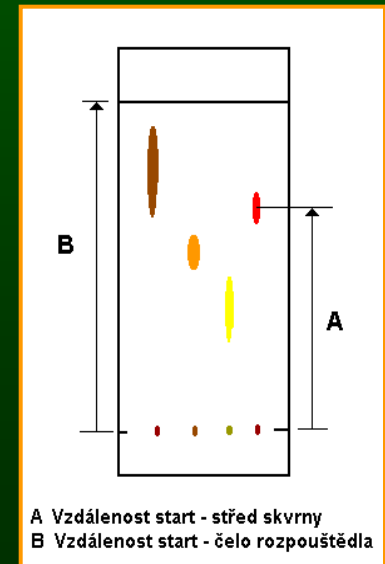


- **Nanesení chromatogramu** - vzorky na startovní pozici blízko okraje plošného nosiče (papíru, tenké vrstvy) ve formě malých kapek nebo tenkých čar
- **Vyvíjení chromatogramu** – v chromatografické vaně:
  - spodní konec nosiče ponořen do MF pod úroveň startovací linie
  - MF v důsledku kapilárních 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

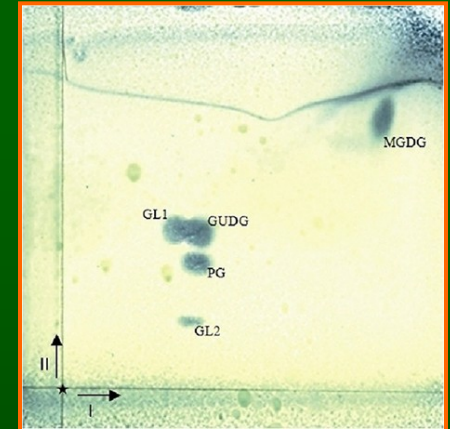
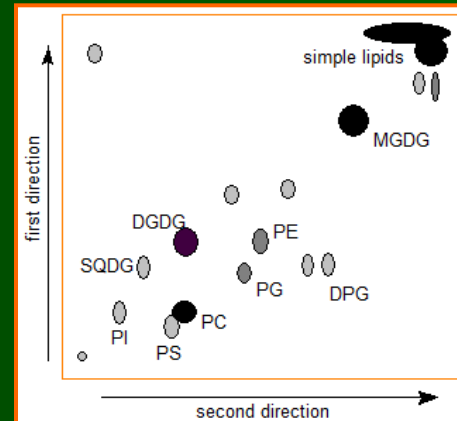
B...vzdálenost start – čelo rozpouštědla



# Planární chromatografie

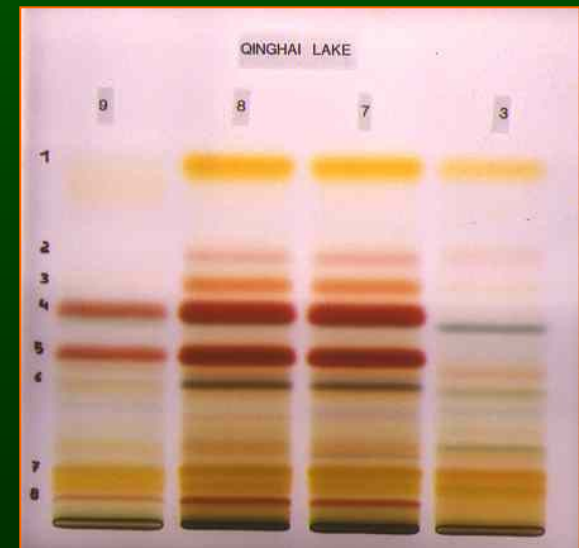
## ▪ Dvourozměrná TLC

- 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  $\mu\text{m}$ )

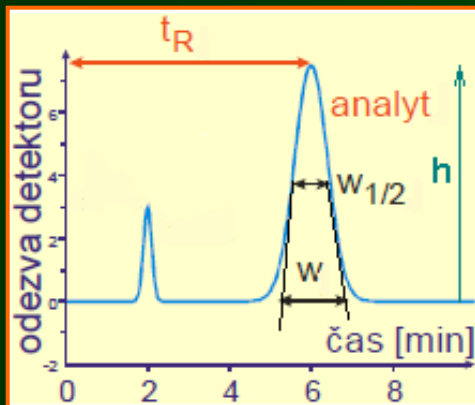
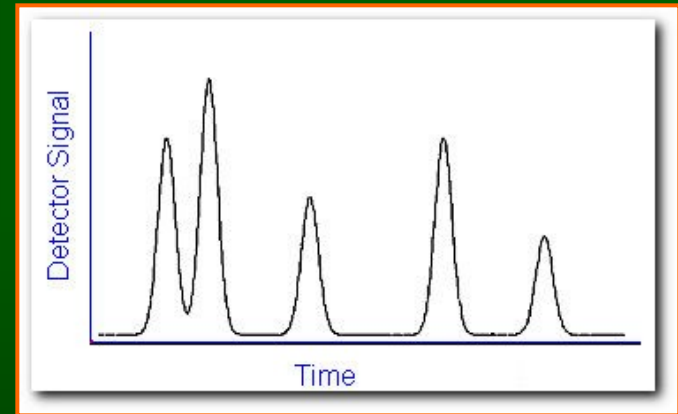
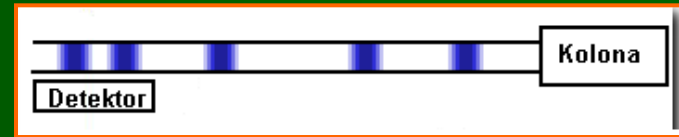
- Planární techniky - metody kvalitativní nebo semikvantitativní s vizuálním hodnocením - srovnáním se skvrnami standardů chromatografovaných na témže nosiči



# 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:

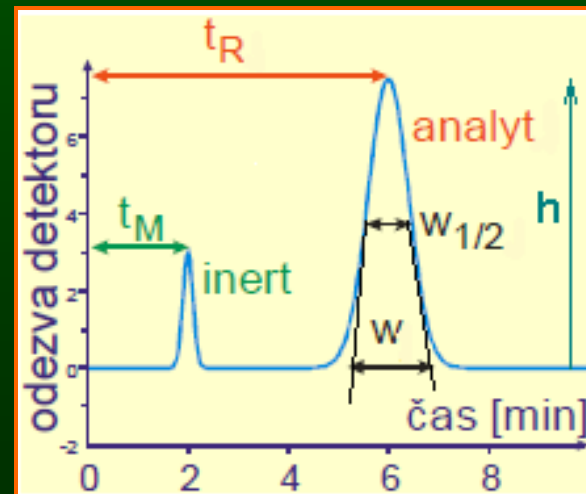
- $t_R$  (min)...retenční čas analytu (doba od nástřiku vzorku na kolonu do průchodu izolovaného analytu detektorem)
- $t_M$  (min)...mrtvý čas kolony (retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. pohybuje se stejnou rychlostí jako MF)
- $W_{1/2}$  ...šířka píku analytu v polovině výšky
- $W$  ...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  $V'_R$

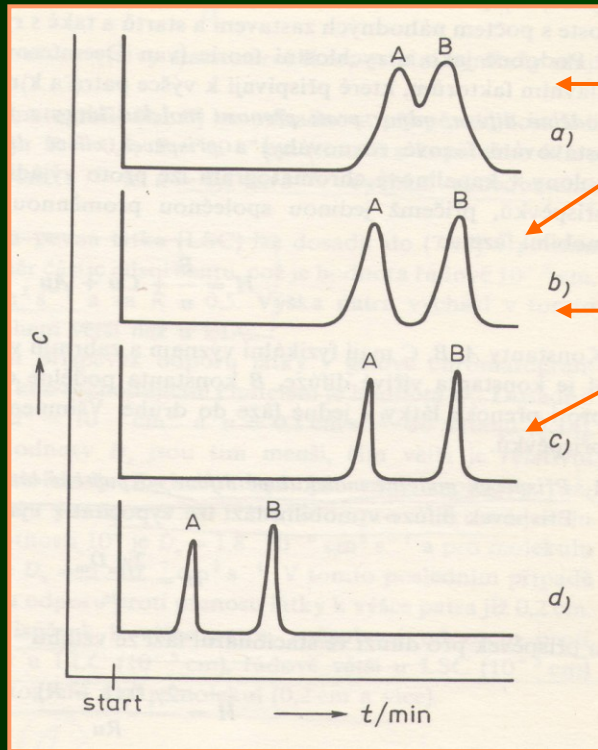
$$V'_R = V_R - V_M$$





# 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 !)

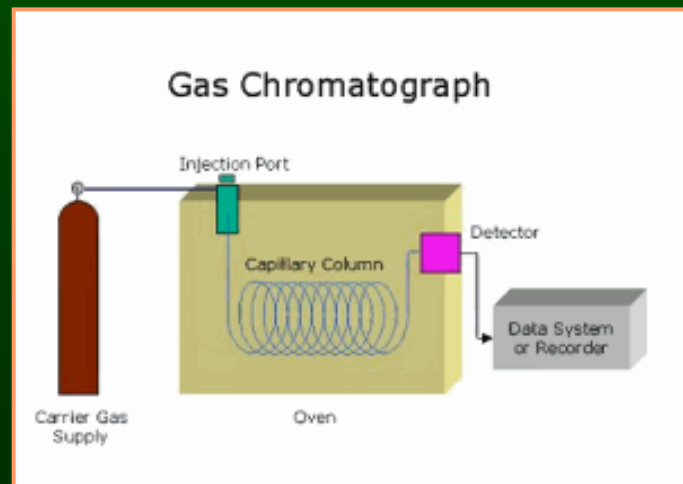
- **Teoretické patro** – taková část kolony, na které proběhne jedno ustavení rovnováhy MF – SF

- čím větší počet pater, tím užší zóny látek

- počet pater dané kolony závisí na rychlosti průtoku MF

# Plynová chromatografie, GC

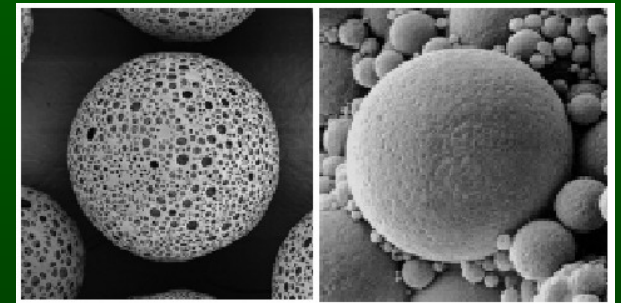
- **Mobilní fáze** - nosný plyn (nejčastěji inertní plyn - dusík, helium, argon)
- Separace u GC je založena
  - na rozdílech tlaku par analytů
  - interakcích se stacionární fází
  - těkavější analyty se tedy pohybují kolonou rychleji než analyty méně těkavé a navíc analyty interagující se stacionární 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)

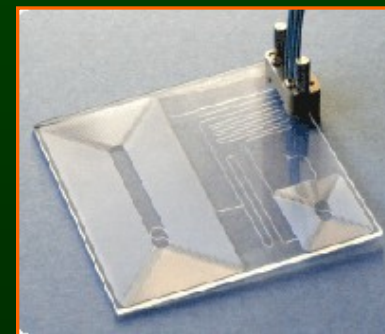
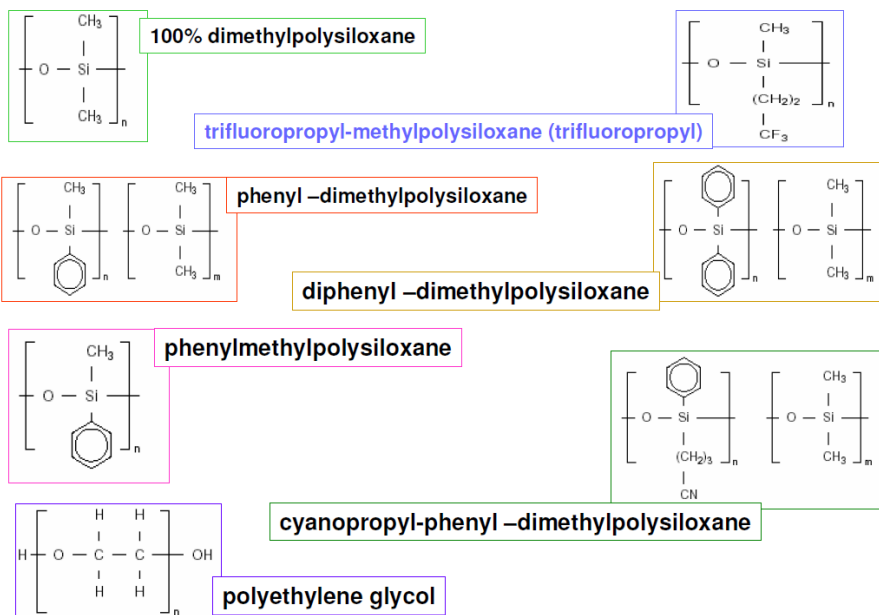
- kapiláry z křemenného skla (vnitřní průměr 0,1 - 0,5 mm, délka 10 - 150 m)
- na povrchu potaženy polyimidem (pevnost a pružnost)
- vnitřní povrch potažen tenkým filmem SF
- velmi účinné
- malá kapacita pro vzorek



# 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

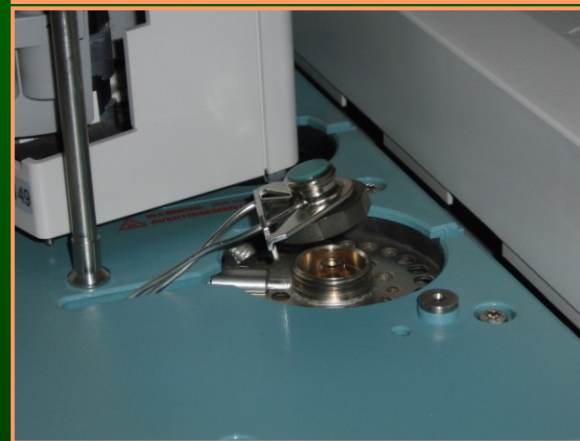
# Plynový chromatograf

## Zdroj nosného plynu a systém kontroly průtoku

- nosný plyn - např. He, Ar, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> (dle typu kolony a detektoru)
- nosný plyn musí být velmi čistý a suchý
  - trubice s molekulovým sítem odstraňují H<sub>2</sub>O, uhlovodíky, O<sub>2</sub>
- 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

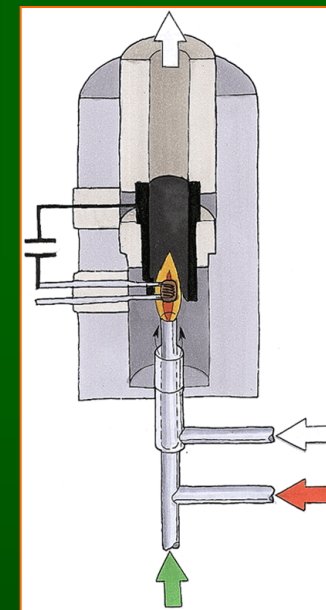
- Univerzální detektory - detegují většinu analytů
- Selektivní detektory

## Plamenově ionizační detektor (flame ionization detector, FID)

- univerzální detektore pro GC
- efluent z kolony smísen s H<sub>2</sub> 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

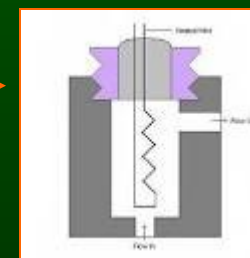
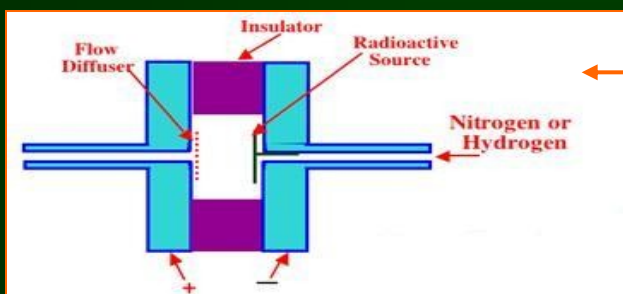
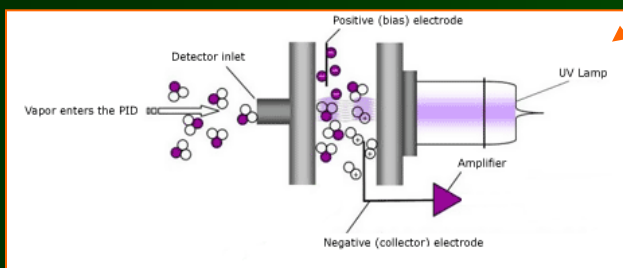
(thermal conductivity, TCD)

- 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  $\beta$ -zářičem
- analyty s elektronegativními skupinami vychytávají elektrony z  $\beta$ -zářiče → snížení ionizace

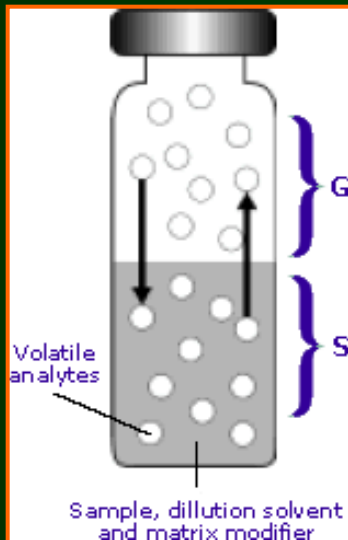
## Hmotnostní detektor (mass spectrometry detector, MSD)



# 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:

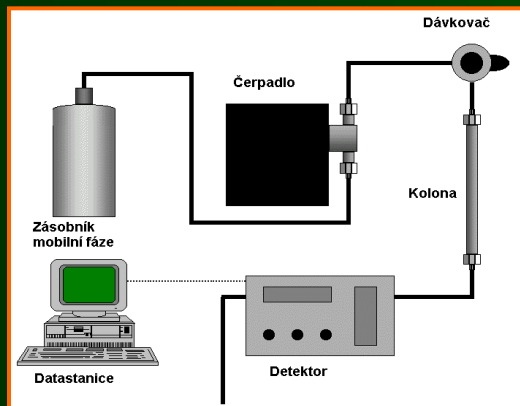
- GC v uspořádání head-space
  - „head space“ – prostor nad vzorkem (plynná fáze)

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



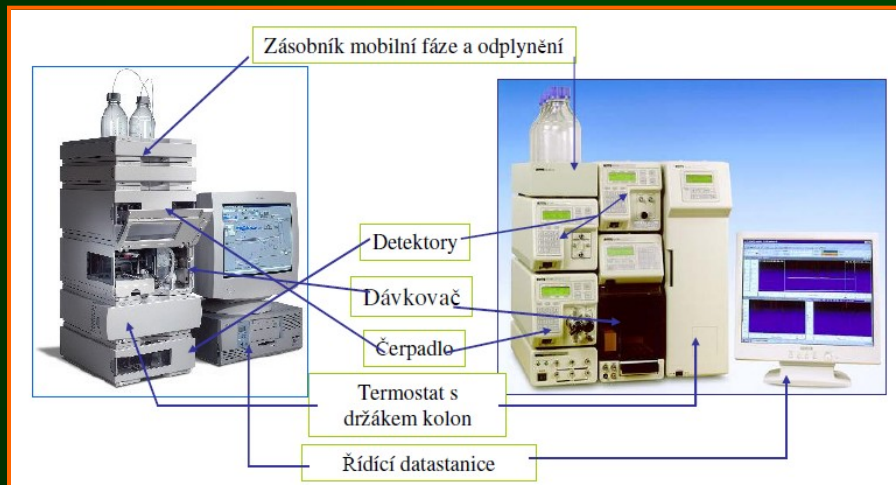
# Kapalinová chromatografie - LC

- Separace založena na rozdělení látek mezi kapalnou mobilní fází a fází stacionární
- High performance liquid chromatography (HPLC) - jako nosič použity částice malého průměru (5  $\mu\text{m}$ ),
- 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  $\mu\text{m}$
- open-tubular kolony - průměr pod 25  $\mu\text{m}$
- 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  $\mu\text{m}$



## ■ 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 nanesena 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

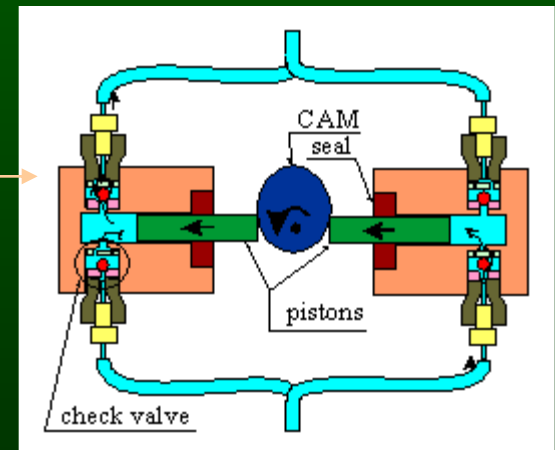
- v nejjednodušší formě skleněné lahve s přívodními hadičkami k čerpadlům
- MF připraveny z čistých rozpouštědel určených pro chromatografii (HPLC grade)
- MF přefiltrovány přes membránový filtr pro odstranění případných pevných částic
- MF zbaveny rozpuštěných plynů – sonikace, vakuové degassery (odplyňovače)

## 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)

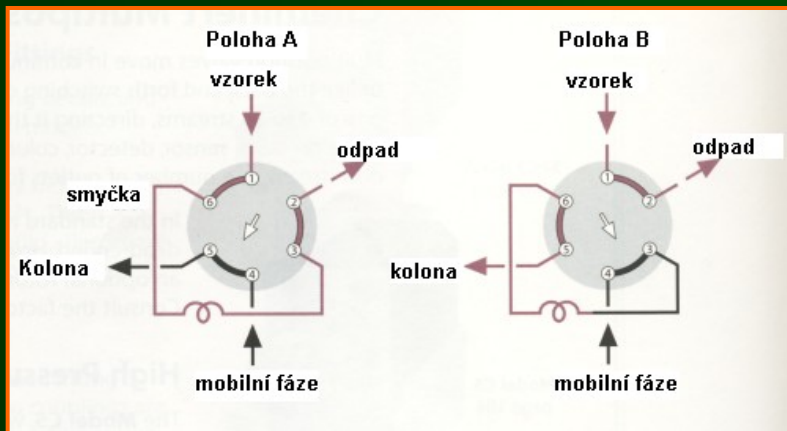
- **bezpulzní tzv. lineární dávkovač** - pro malé průtoky MF
  - pracuje na principu injekční stříkačky
- **pulzní pístová dvojúčinná (reciproká) čerpadla**
  - činnost je fázově posunutá pro minimalizaci pulzů
    - Vyhlazení pulzů
      - tlumič pulzů na principu svinuté odporové kapiláry
      - nebo 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

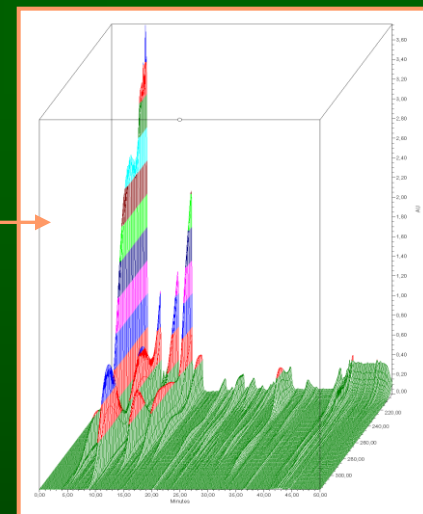
- šesticestný ventil s vyměnitelnou smyčkou
  - objem od desítek nanolitrů po mililitry
  - plnicí pozice (poloha A) - vzorek se nasaje ze vzorkové nádoby (tzv. vialky) dávkovací injekční stříkačkou do smyčky
  - otočením ventilu do polohy B je obsah smyčky vnesen do proudu mobilní fáze
  - dávkovací 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  $\lambda$ 
    - průtokovou kvyetou prochází polychromatické světlo
    - prošlé světlo je za kvyetou 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



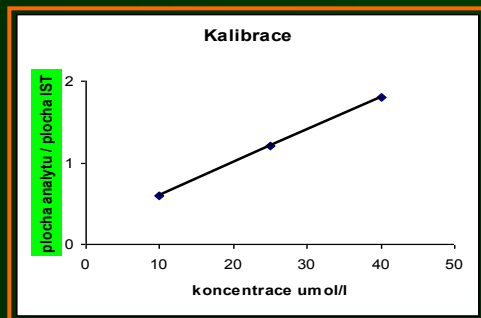
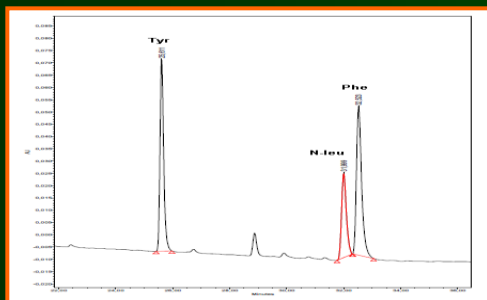
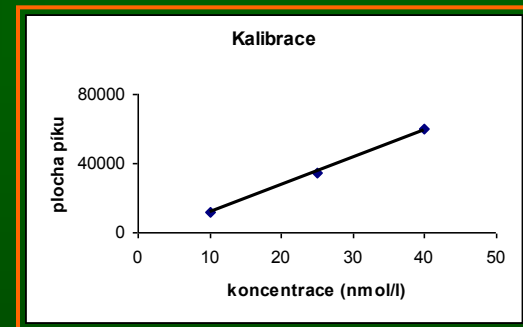
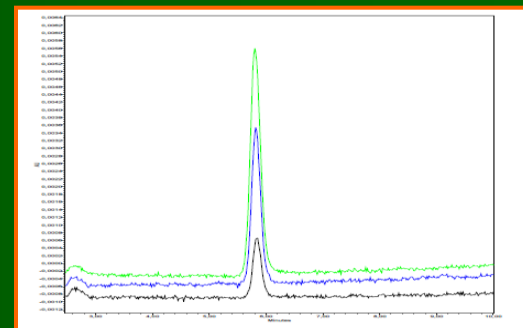


# Chromatografie - kvantitativní analýza

## 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):

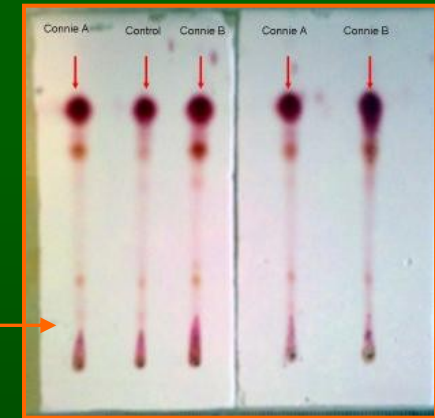
- provedení analýzy referenčních vzorků se známým obsahem analytů s přidavkem konstantního množství vnitřního standardu
  - vnitřní (interní) standard – sloučenina s podobnými vlastnostmi jako stanovované analyty, ale nevyskytující se v reálných vzorcích
- do kalibrační křivky se vynáší poměr plochy 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)

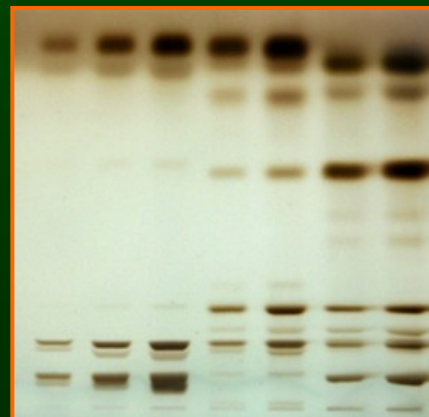
průkaz THC



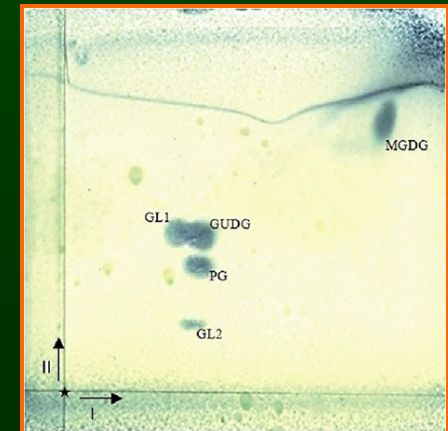
HPTLC – sacharidy



HPTLC – lipidy



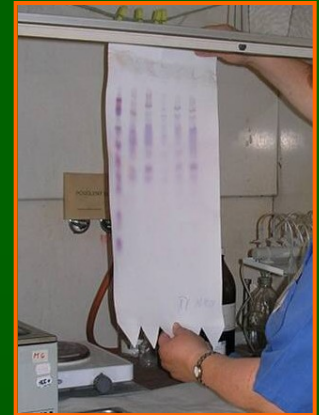
dvojměrná TLC – složené lipidy



# Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

## Papírová chromatografie

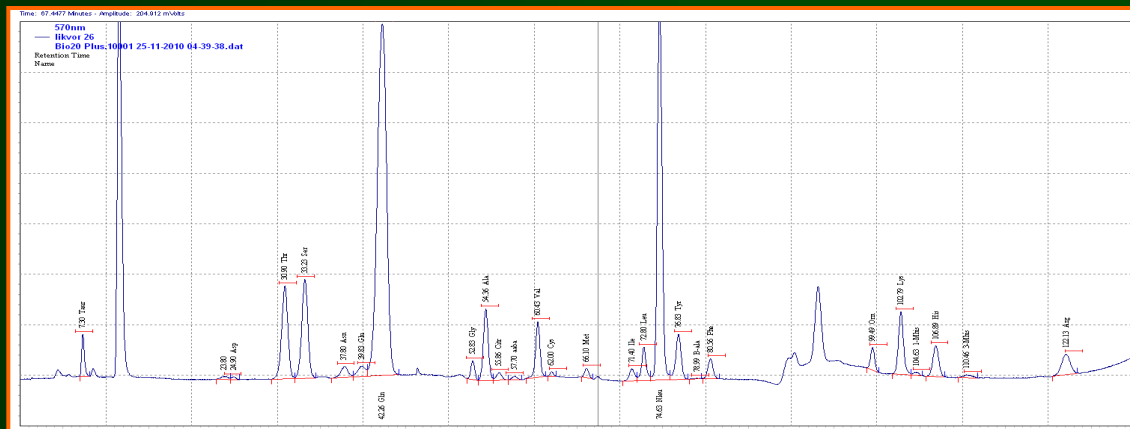
- jednoduchá, již málo používaná technika př. screening aminokyselin v moči



## 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)

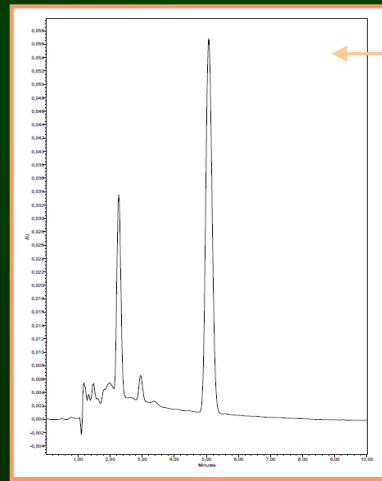
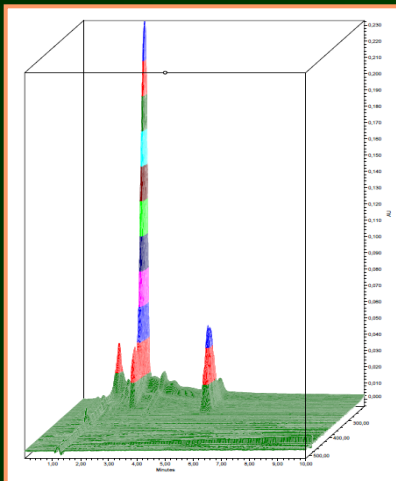
### ➤ Další využití IEC

- nukleotidy, peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny

# Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

## HPLC

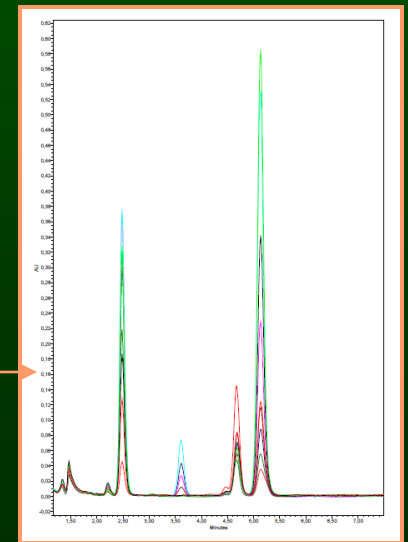
- z chromatografických metod nachází nejširší uplatnění v klinické biochemii
- většina aplikací využívá HPLC s reverzní fází
- lze ji aplikovat na široké spektrum analytů v závislosti na způsobu detekce
  - sacharidy
  - lipidy
  - léky
  - pteriny
  - karboxylové kys.
  - steroidy
  - drogy
  - CDT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



Analýza

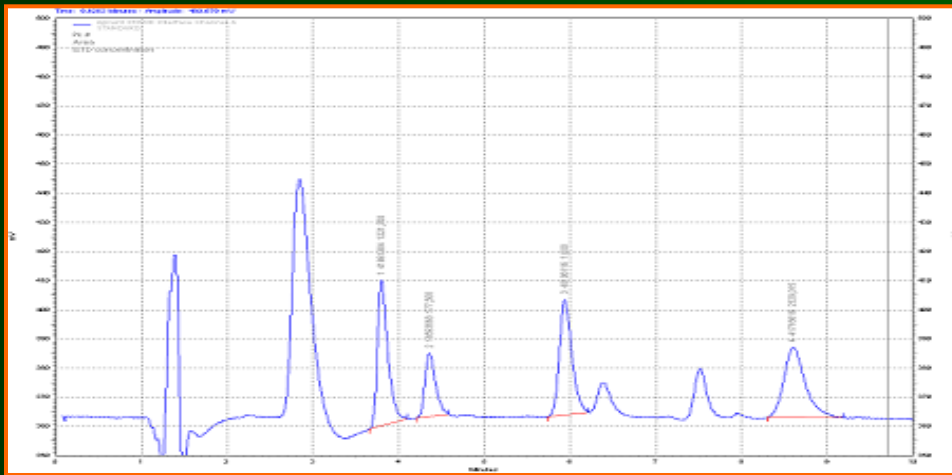
- 7-dehydrocholesterolu (prekursor cholesterolu – endogenní syntéza):
  - záznam z PDA
  - chromatogram při  $\lambda_{max}$

Karboxylové kyseliny - dynamika přeměny kys. benzoové na kys. hippurovou (detoxikační reakce)



# 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)

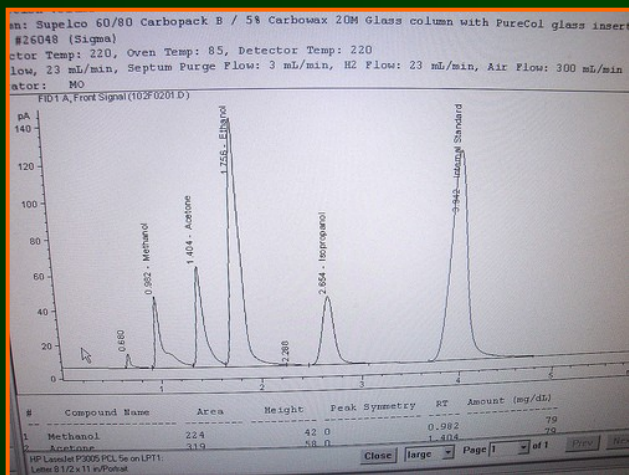


# Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

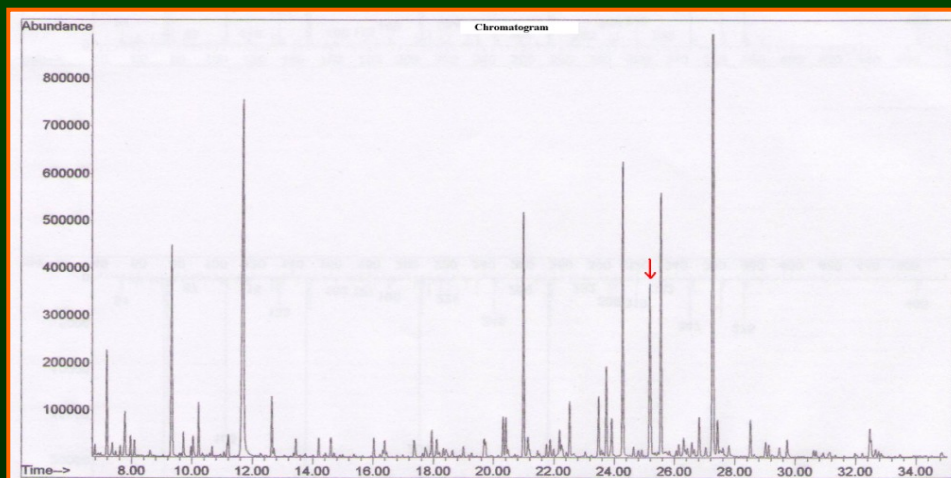
## Plynová chromatografie

- 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 magnetickými a elektrickými 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



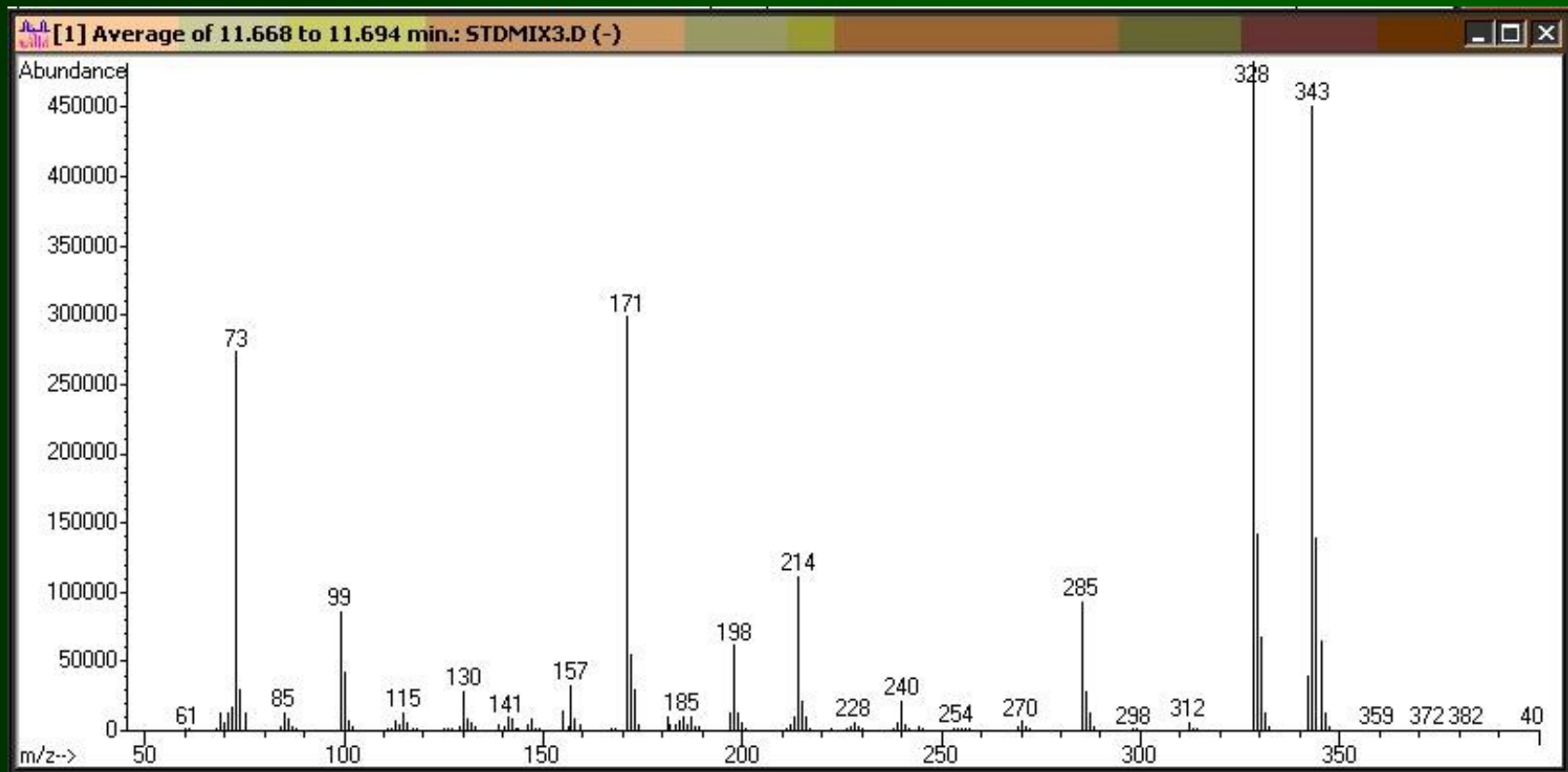
# Hmotnostní spektrum

Výstup MS - hmotnostní spektrum

- čarový diagram

- vodorovná osa - hodnota  $m/z$  (hmotnost / náboj iontu)

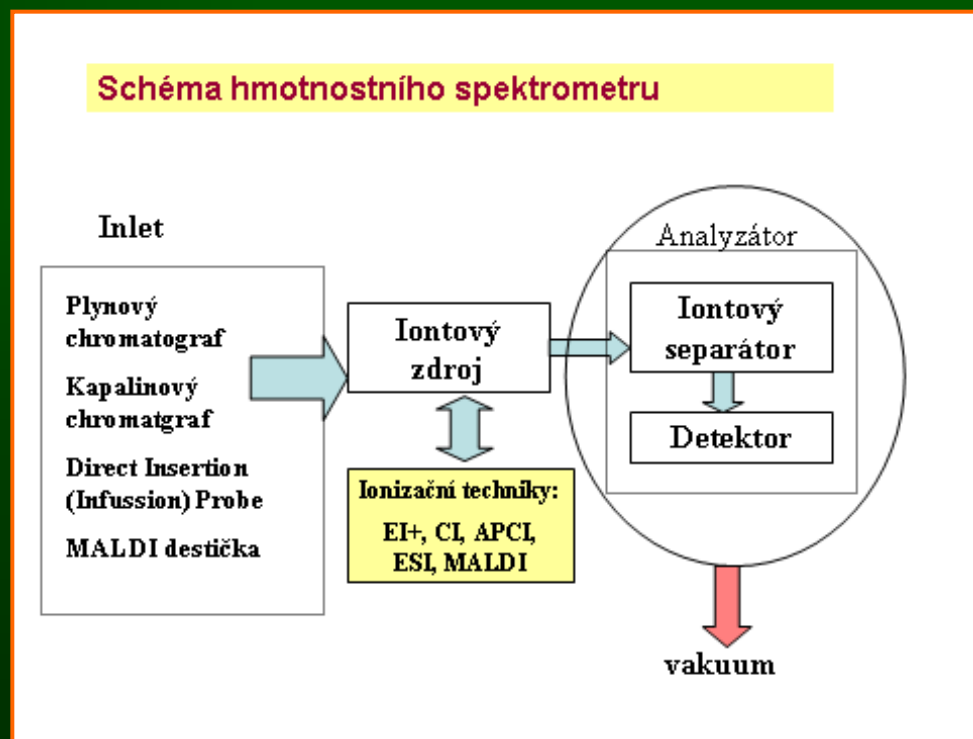
- svislá osa - odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu



# 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 nabitých částic, 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:

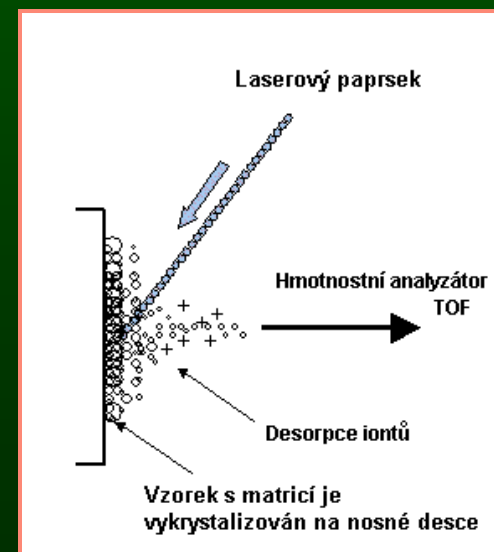
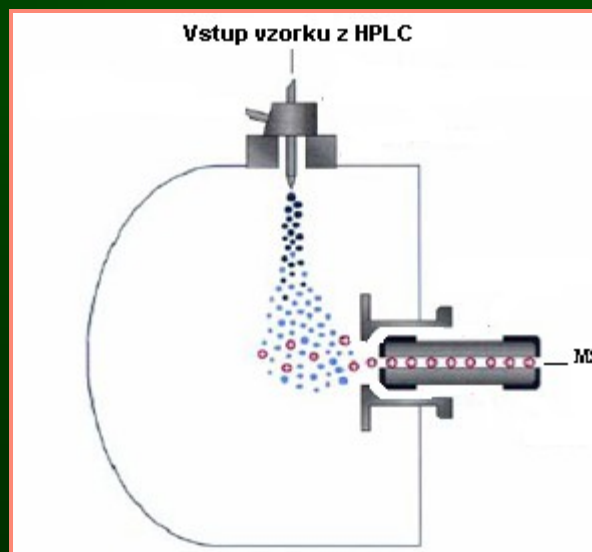
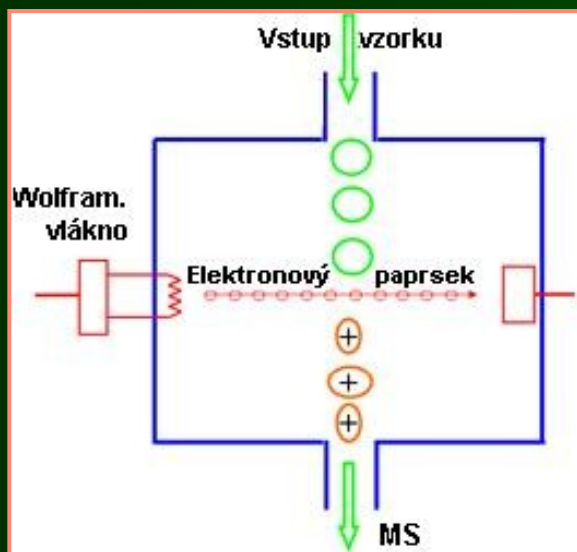
- Elektronová ionizace EI

LC/MS, CE/MS,

MS s přímým nástřikem

- Elektrospray ESI

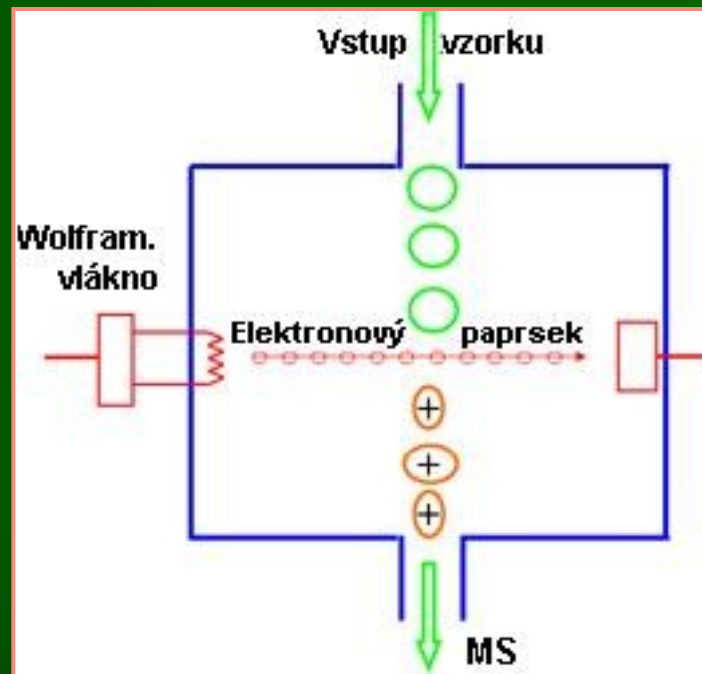
**MALDI**



# 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

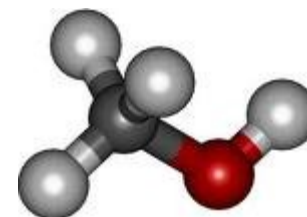
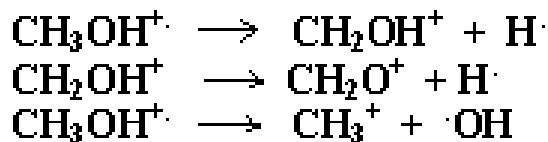
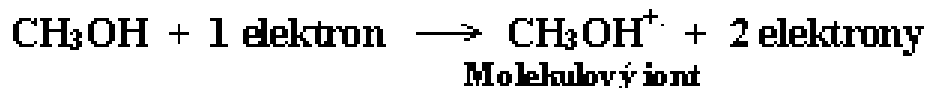


## EI - tvrdá ionizační technika (fragmentace)

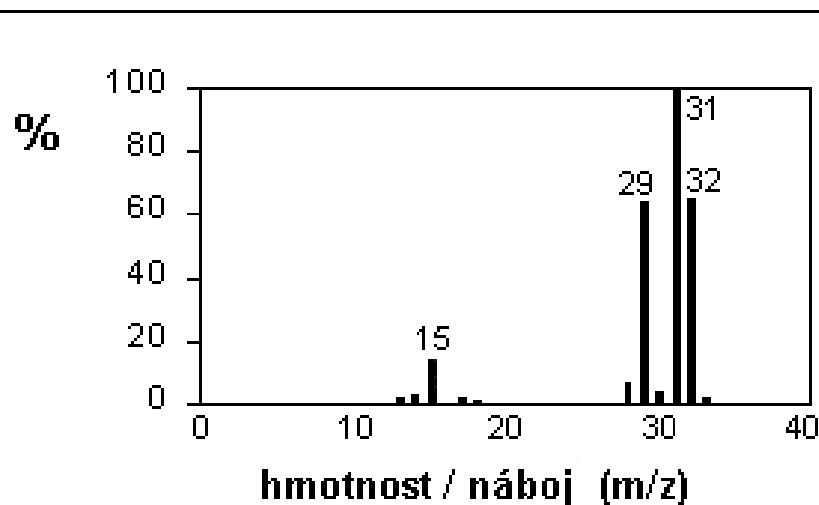
- fragmenty rozděleny v další části analyzátoru dle hodnoty  $m/z$  a detegovány
  - separace magnetickým analyzátozem, kvadrupólem
- Pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky (50 – 800 Da)
  - Dalton – jednotka molekulové hmotnosti



# Elektronová ionizace (fragmentace)



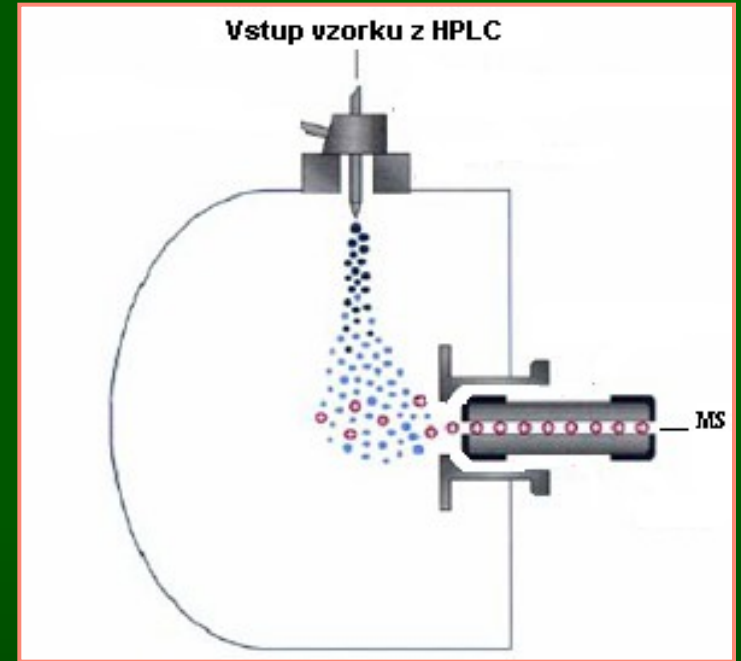
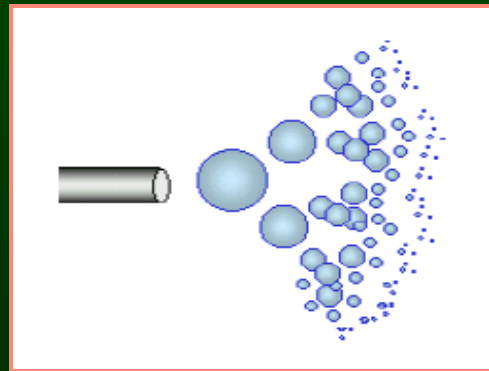
ions	m/z
$\text{CH}_3\text{OH}^{+\cdot}$	32
$\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$	31
$\text{HC}\equiv\text{O}^+$	29
$\text{H}_3\text{C}^+$	15



- Hmotnostní spektrum metanolu

# 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 (kvadrupól, TOF)
- **Měkká ionizační technika** (bez fragmentace)
- Vhodné pro nízko- i vysokomolekulární látky (peptidy, sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny,...)





# Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI

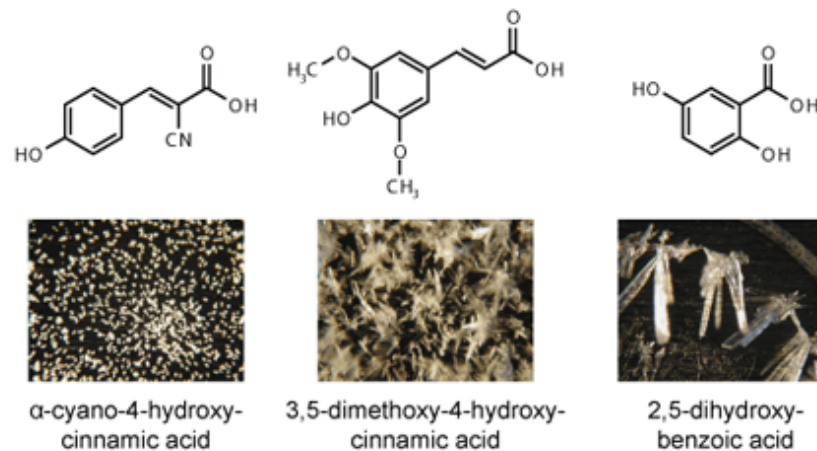
- Vzorek v roztoku smíchán s matricí
  - matrice - deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin
    - absorbují energii laserového záření ve VIS nebo blízké UV oblasti
- Roztok nakápnut a vysušen (vykrytalizován) na MALDI destičce
- Pulzní ozáření směsných krystalů zábleskem laseru
  - prudké odpaření 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

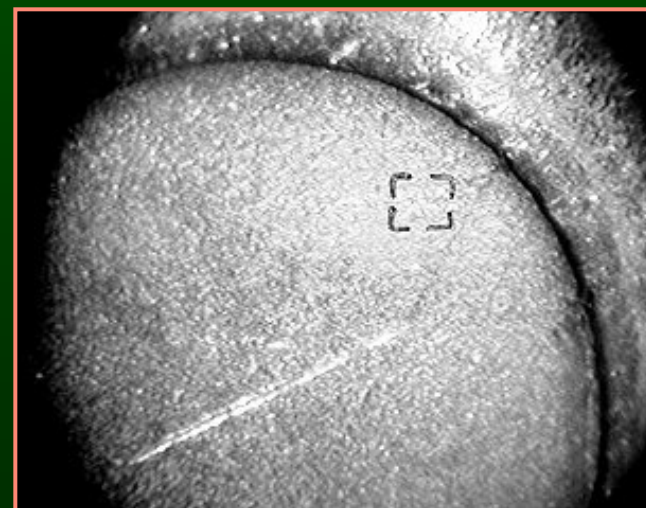
Matrice →



Spotovací destička



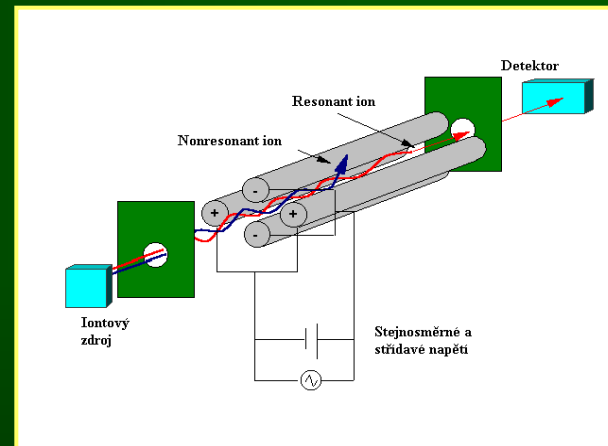
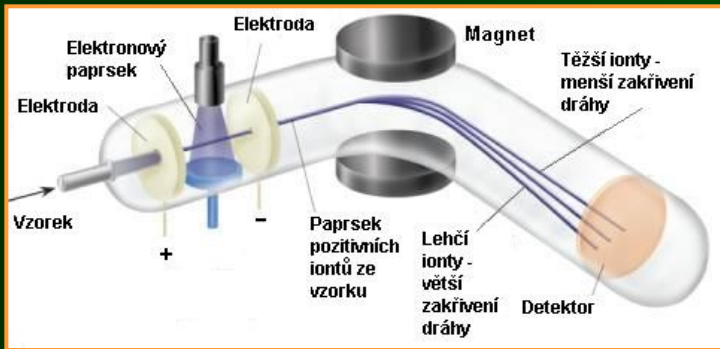
Spotovací destička na monitoru



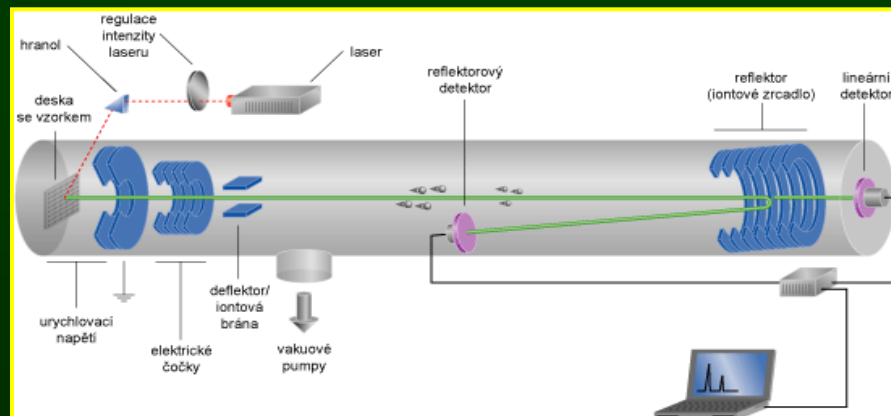
# MS – separace iontů

- **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



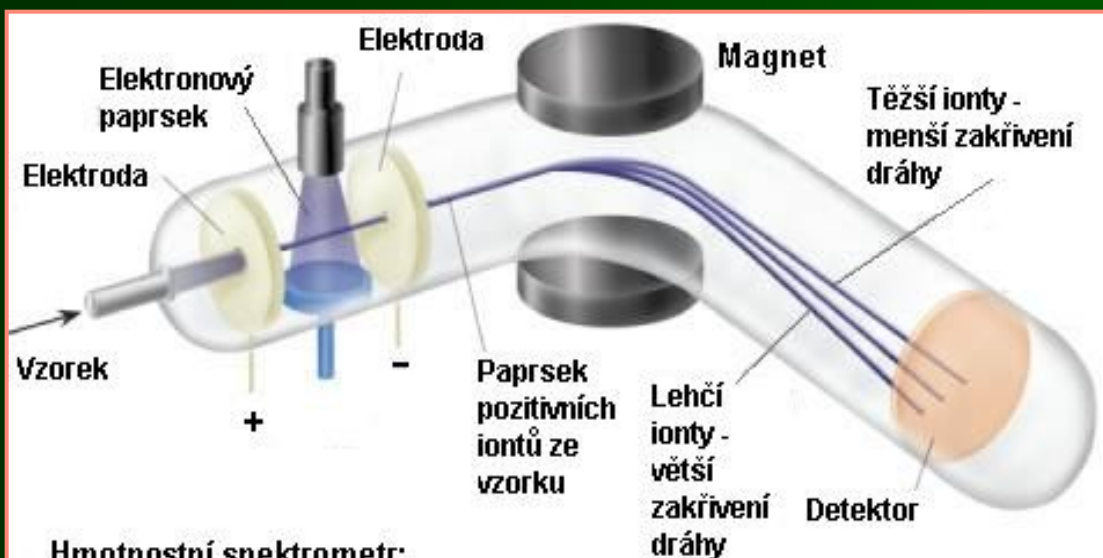
Kvadrupól



TOF

# 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 běžně používaný)



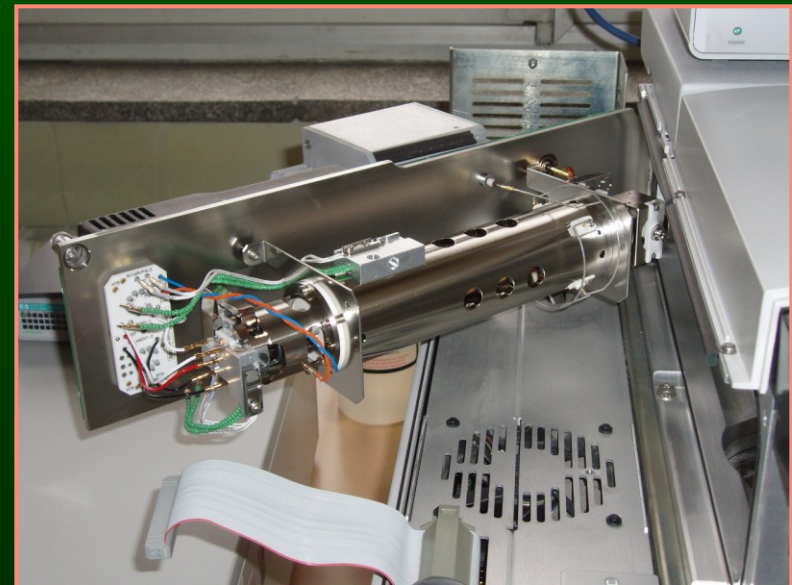
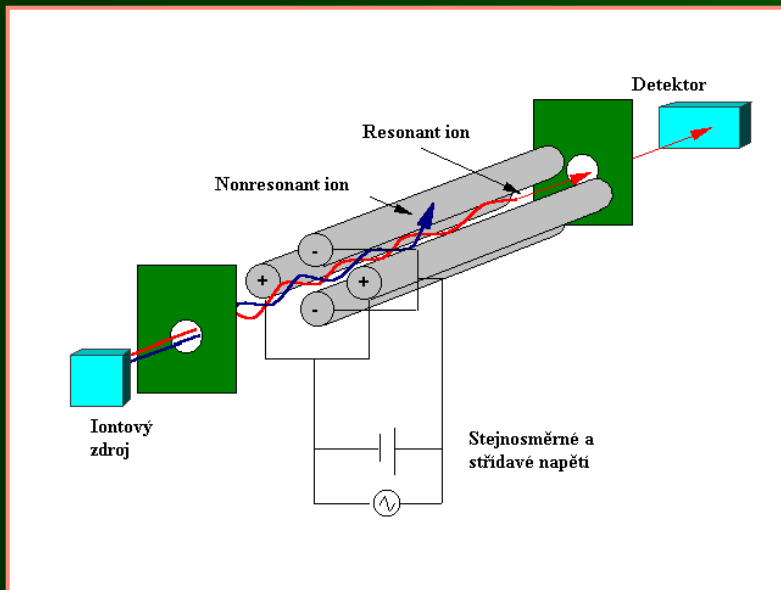
## Hmotnostní spektrometr:

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

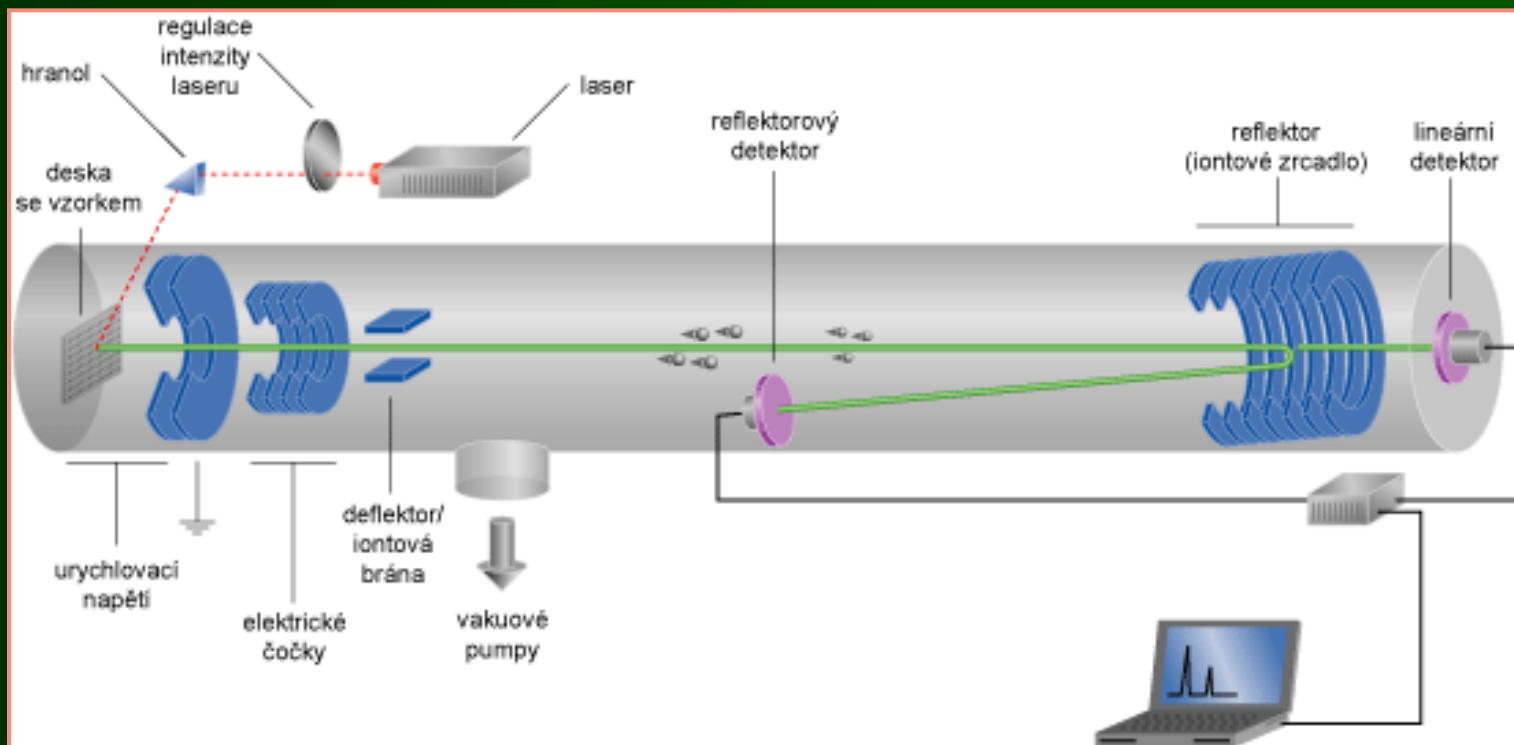
- Konstrukce - 4 kovové tyče, na ně vloženo stejnosměrné a střídavé napětí
  - Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat
  - Při vhodné kombinaci obou složek napětí prochází kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru  $m/z$
  - změnou vkládaných napětí je možné nechat projít kvadrupolem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





# TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

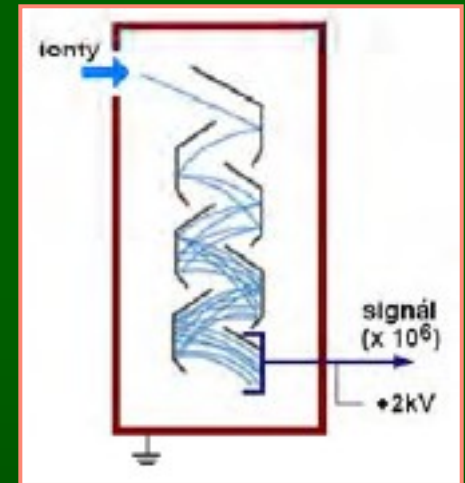
- Deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí
- rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti  $m/z$ 
  - lehčí molekula letí rychleji
- V kombinaci s MALDI ionizací



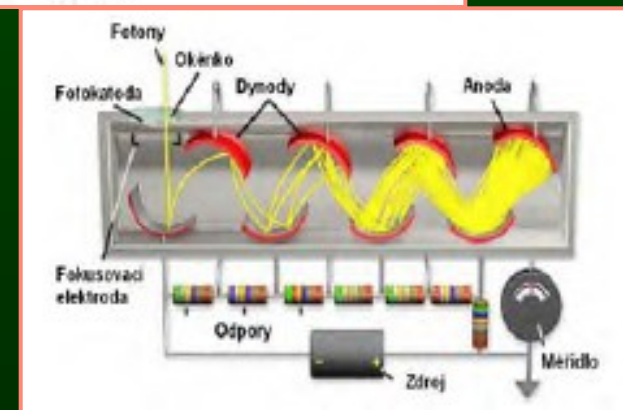
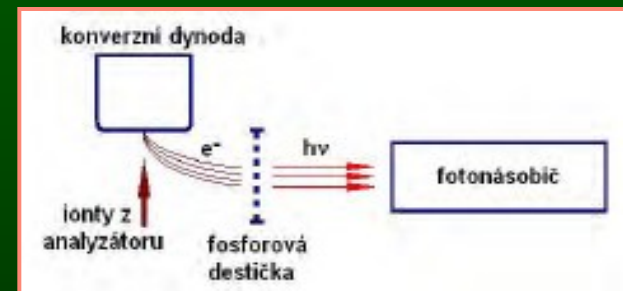


# Detektor

- 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

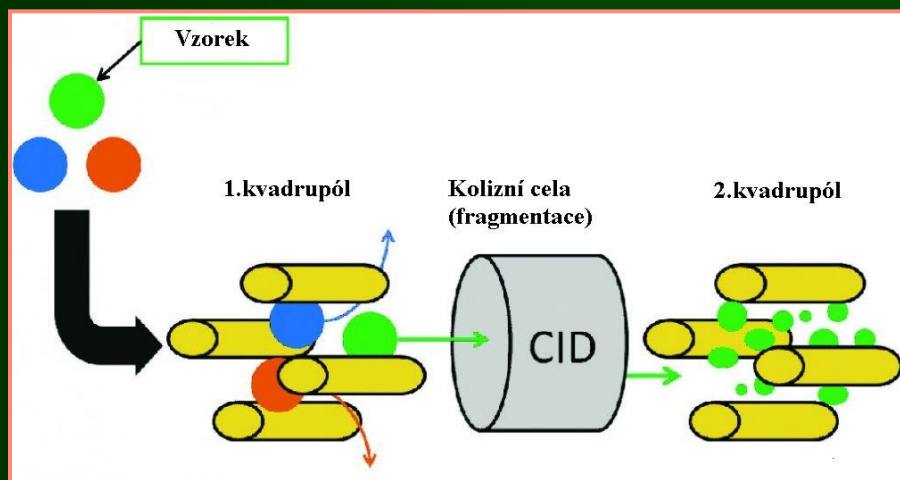


# Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS

- 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**:

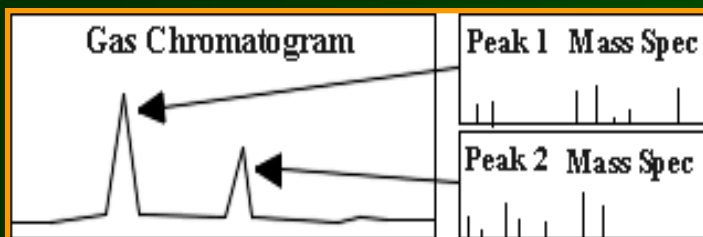
- První kvadrupól vybírá prekursorový ion
- Ve druhé části - kolizní cele - probíhá fragmentace prekursorového iontu (srážkou iontu s atomy inertního plynu)
- Poslední kvadrupól analyzuje fragmenty



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

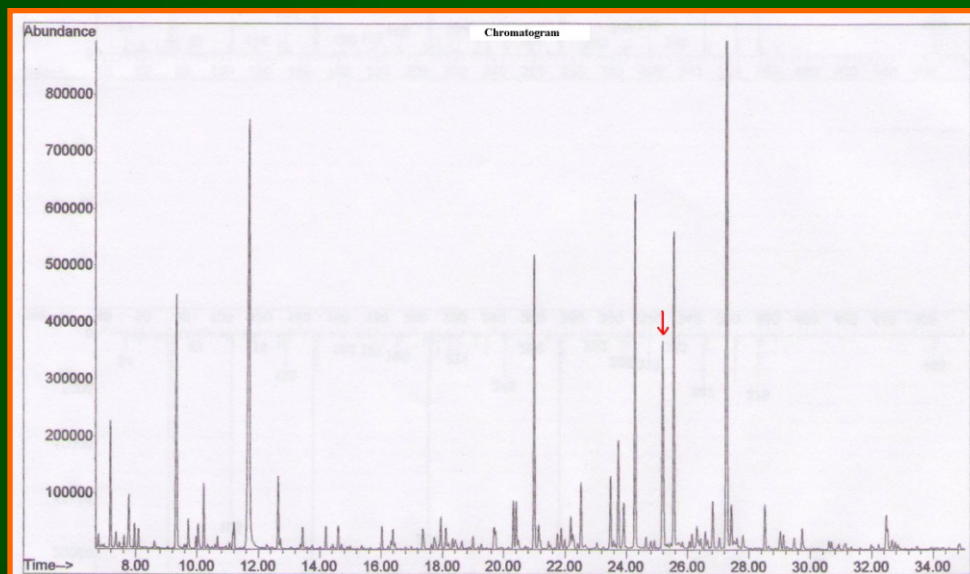
- Obdobně **TOF-TOF** analyzátor
- Hybridní **Q-TOF** analyzátor (kvadrupól – TOF)

# 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**



# *Děkuji za pozornost...*



*...ale i těm,  
kteří se  
nudili !*

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