

Chromatografické metody

RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB

amikuskova@fnbrno.cz

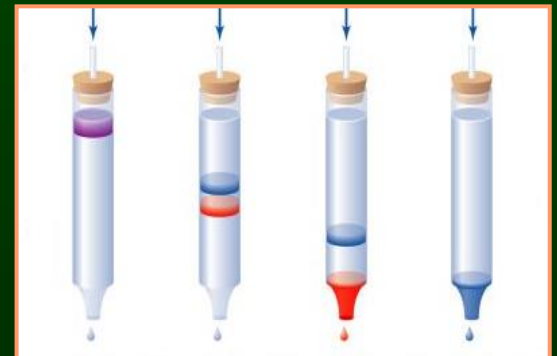


CHROMATOGRRAFIE

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

Fáze = homogenní část heterogenního systému oddělená od okolí fázovým rozhraním

- MF proudí přes nosič nebo kolonu obsahující SF
- Distribuce komponent směsi mezi obě fáze dle rozdílné afinity ke SF, MF
 - jednotlivé složky směsi procházejí systémem různou rychlostí:
 - látky s vyšší afinitou ke SF migrují pomaleji
 - látky s nižší afinitou ke SF migrují rychleji
- Objevitel - ruský botanik Cvět
 - přelom 19. a 20. století
 - dělení rostlinných pigmentů

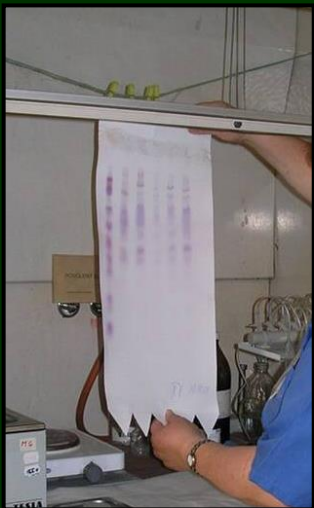


Klasifikace chromatografických metod

- Podle uspořádání systému

Chromatografie plošná (planární)

- SF (voda nebo polární rozpouštědlo) zakotvená na vláknách papíru (papírová chromatografie)
- SF (silikagel, alumina, celulóza, aj.) rozprostřená na inertní podložce (chromatografie na tenké vrstvě, TLC)



Chromatografie kolonová (sloupcová)

- SF (silikagel, polymer, ...) tvoří náplň kolony
- SF nanesená / chemicky navázaná na nosné částice
- SF nanesená přímo na vnitřní povrch kolony
- dle mobilní fáze - LC, GC



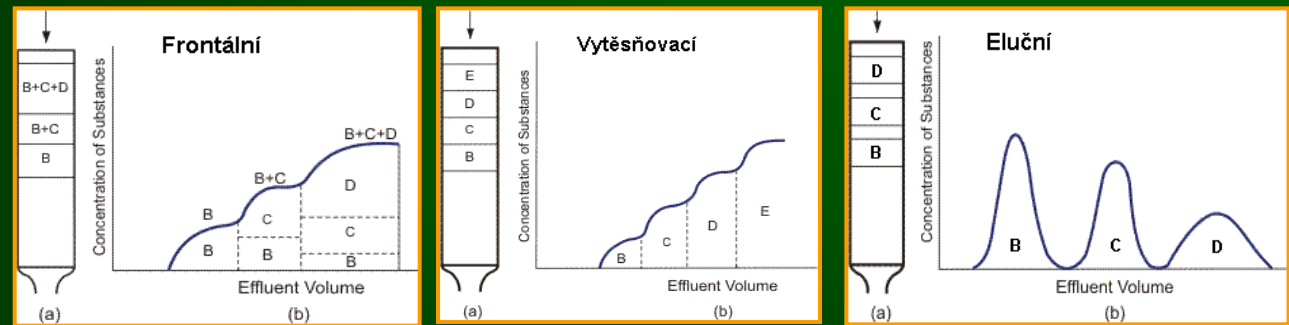
Klasifikace chromatografických metod

- Podle skupenství mobilní fáze

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

- Podle způsobu vymývání frakcí vzorku z kolony

- frontální
- vytěšňovací
- eluční



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

Klasifikace chromatografických metod

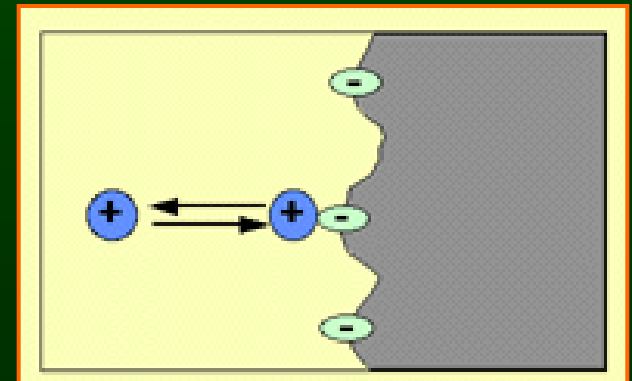
Podle separačního mechanismu:

- Iontová výměna - rozdílná afinita nabitých částic k opačně nabitým funkčním skupinám SF
- Rozdělování – interakce kapalina – kapalina
- Adsorpce – interakce kapalina – pevná látka
- Gelová permeační chromatografie – omezení transportu látek pórovitým materiálem
- Afinitní chromatografie – interakce ligand – vázaná látka
 - Kombinace metod

Klasifikace chromatografických metod

Iontoměničová chromatografie (ionexová, ion-exchange, IEC)

- výměna iontů elektrostaticky vázaných na nabitém povrchu SF a iontů v roztoku
- SF - iontoměnič (ionex): částice gelu s navázanými nabitými funkčními skupinami:
 - **Katexy** (umožňují výměnu kationtů)
 - silně kyselé sulfonové skupiny $-\text{SO}_3\text{H}^+$
 - slabě kyselé karboxy-, karboxymethyl-, sulfomethyl-, fosfo-, apod. skupiny
 - **Anexy** (umožňující výměnu aniontů)
 - silně bazické triethylaminoethylové skupiny
 - slabě bazické aminoethyl-, diethylaminoethyl-, guanidoethyl- apod. skupiny
- na těchto skupinách vázán opačně nabitý ion (zachování elektroneutality)
- tento je na začátku analýzy vyměněn za ionty analytů ze vzorku
- složky dělené směsi pak z kolony eluovány
 - postupnou změnou pH
 - a/nebo změnou iontové síly MF
- IEC umožňuje dělit ionty
 - nízkomolekulární - aminokyseliny, nukleotidy
 - vysokomolekulární - peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny



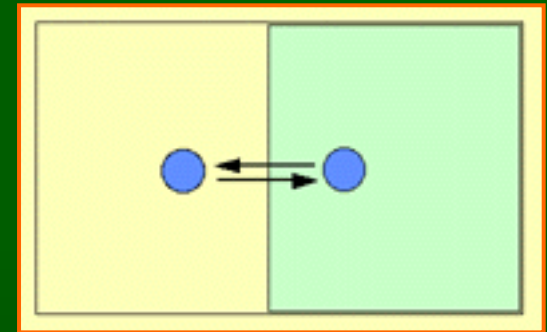
Klasifikace - Podle separačního mechanismu

Rozdělovací chromatografie

- Distribuce látek mezi dvě nemísitelné tekutiny
 - rozdíly v rozpustnosti složek vzorku v MF a SF (LC)
 - rozdíly hodnot rozpustnosti složek vzorku ve SF (GC)
- **SF** - vždy kapalina:
 - naadsorbovaná / chemicky navázaná na nosiči
 - (např. na vlákních papíru u papírové chromatografie, na nosných částicích u HPLC)
 - nanesena na vnitřním povrchu kapilární kolony (GLC)
- **MF** – kapalina nebo plyn
 - plynová (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 (častější provedení)
 - vhodnější pro separaci méně polárních látek
- Rozdělovací koeficient (K) - rozhoduje o pohyblivosti jednotlivých složek směsi

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

c org ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi
c vod ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi



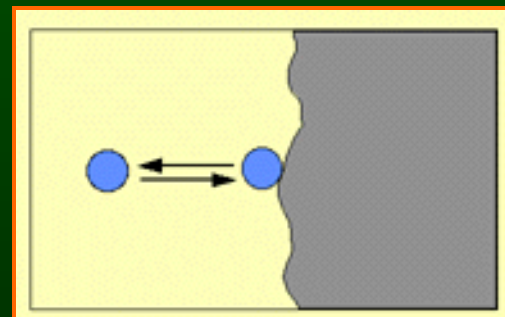
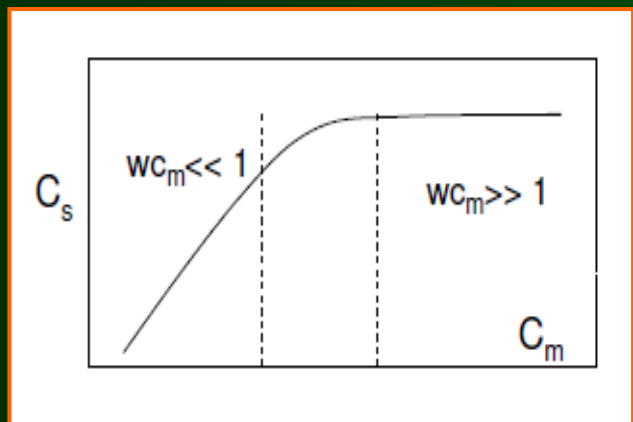
Klasifikace chromatografických metod

Adsorpční chromatografie

- Dělení založeno na rozdílech v adsorpci a desorpci látek směsi na pevný povrch sorbentu (elektrostatické síly, vodíkové můstky, disperzní síly)
- Adsorpci popisuje tzv. Langmuirova adsorpční izoterma (závislost množství analytu ve stacionární fázi na koncentraci v mobilní fázi)

$$C_S = w \cdot z \cdot C_M / (1 + w \cdot C_M)$$

- w ... adsorpční koeficient pro daný analyt
- z ... počet volných interakčních míst na povrchu
- C_S, C_M ... koncentrace analytu v obou fázích

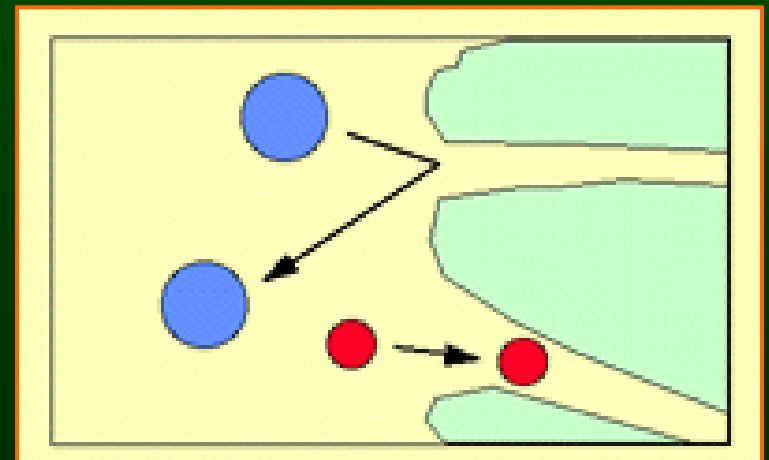
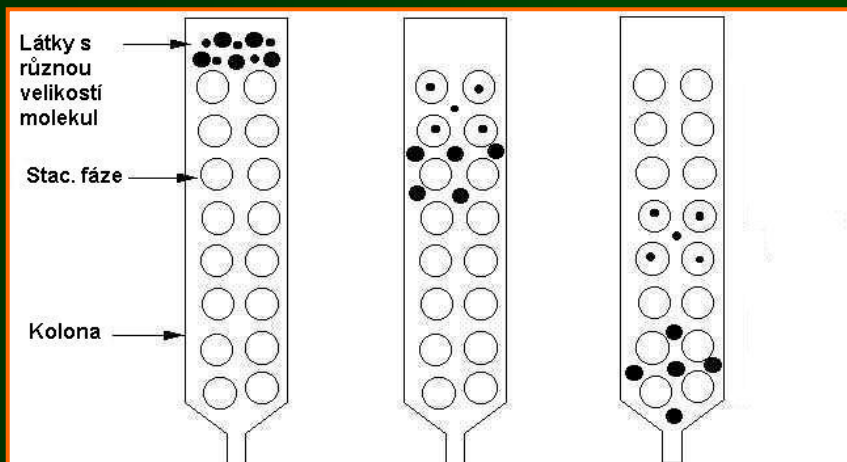


- nízké koncentrace analytu v MF - lineární závislost C_S na C_M
- vysoké koncentrace C_M - vysycení interakčních míst sorbentu, závislost se zakřivuje

Klasifikace chromatografických metod

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
- Malé molekuly - difusním pohybem vnikají do vnitřních prostor gelových částic - na koloně zadržovány
- Velké molekuly - nedostanou se do pórů, jsou unášeny proudem MF a vytékají z kolony dříve



Klasifikace chromatografických metod

Afinitní chromatografie

■ využívá specifické interakce molekul:

■ interakce biologické povahy

- enzym - substrát
- enzym - inhibitor
- antigen - protilátka
- receptor - hormon apod.

■ biologickou interakci napodobující

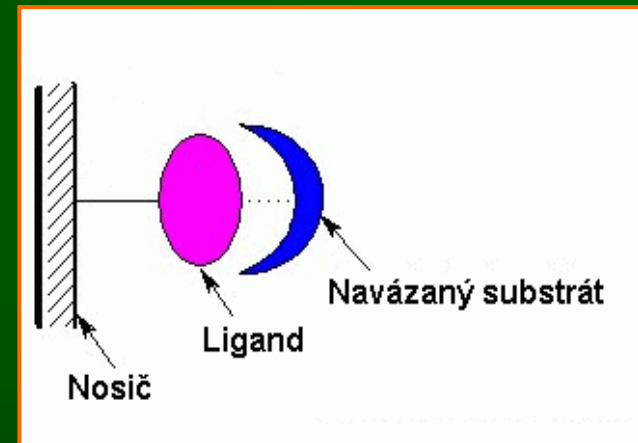
- bílkovina - triazinové barvivo
- bílkovina - kovové ionty apod.

■ Jeden z partnerů (tzv. ligand) - pevně navázán na nosič (náplň kolony)

■ V dělené směsi (v MF) - přítomna řada molekul, z nich jen některé mají afinitu k ligandu → naváží se, ostatní složky směsi se z kolony vymyjí

■ změna složení mobilní fáze tak, aby se oslabila interakce ligand – navázaná molekula → uvolnění z kolony

■ separace, izolace, čištění složek vzorku



Přehled chromatografických technik

Chromatografie

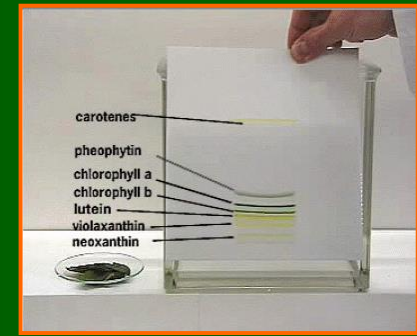
■ planární

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

■ kolonová

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

Planární chromatografie

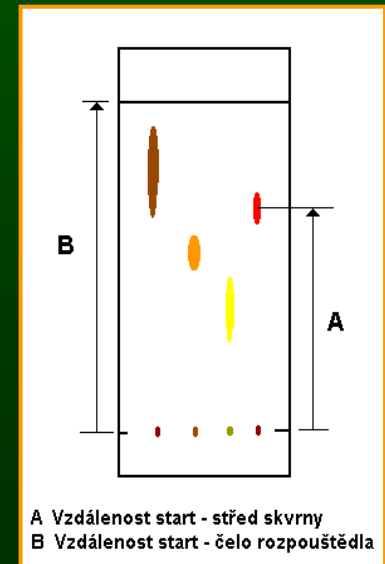


- Nanesení chromatogramu - vzorky na startovní pozici blízko okraje plošného nosiče (papíru, tenké vrstvy) ve formě malých kapek nebo tenkých čar
- Vyvíjení chromatogramu – v chromatografické vaně:
 - spodní konec nosiče ponořen do MF pod úroveň startovací linie
 - MF v důsledku kapilárních sil migruje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

$$R_f = A / B$$

A...vzdálenost start – střed skvrny

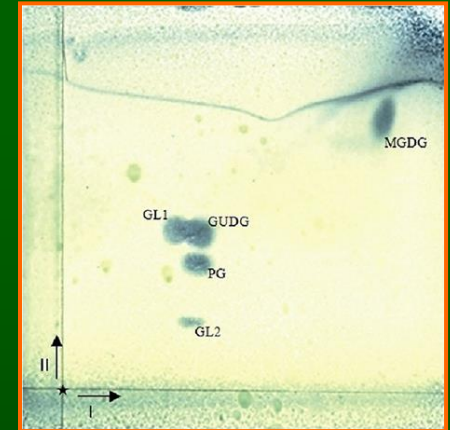
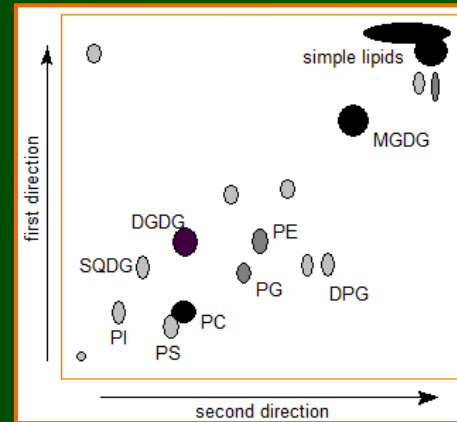
B...vzdálenost start – čelo rozpouštědla



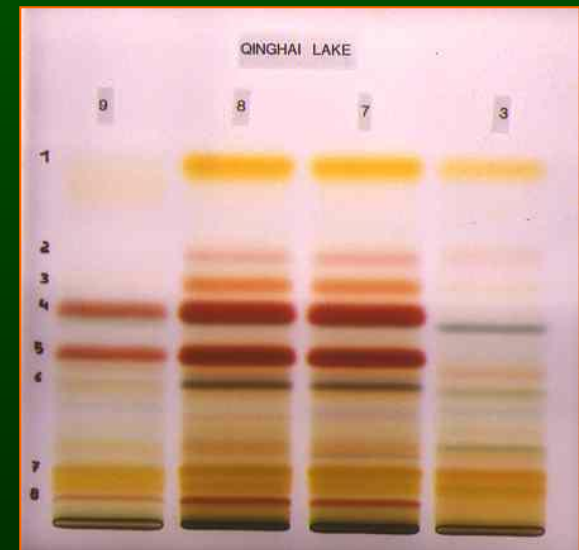
Planární chromatografie

▪ Dvourozměrná TLC

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



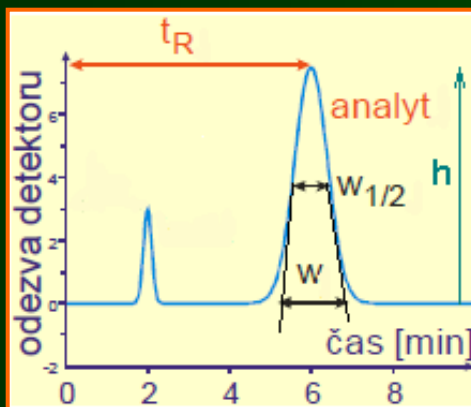
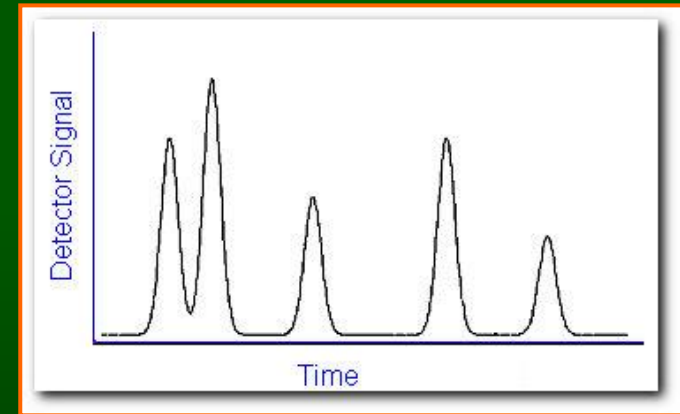
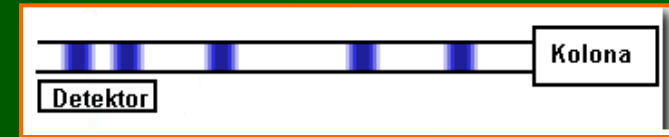
- HPTLC (high performance thin layer chromatography) - tenká vrstva sestává z částic o malém průměru (4,5 μm)
- Planární techniky - metody kvalitativní nebo semikvantitativní s vizuálním hodnocením - srovnáním se skvrnami standardů chromatografovaných na témže nosiči



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:

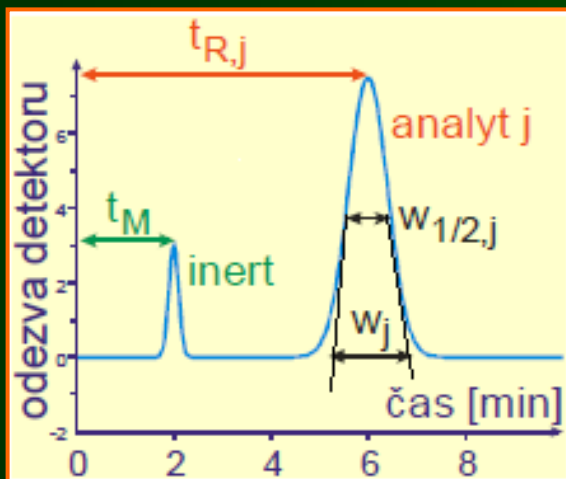


- retenční čas t_R – kvalitativní charakteristika analytu
- plocha chromatografického vrcholu – kvantitativní charakteristika
- koncentrace analytu vypočítána na základě porovnání plochy píku analytu s plochou píku standardu
- plochu píku lze vypočítat jako: výška x poloviční šířka ($h \times w_{1/2}$)

Kolonová chromatografie

Základní pojmy – popis chromatografického píku

- $t_{R,j}$ (min)...retenční čas j-tého analytu (celkový čas, který příslušný analyt stráví v koloně)
- t_M (min)...mrtvý čas kolony (retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. pohybuje se stejnou rychlostí jako MF)
- $W_{1/2,j}$...šířka píku j-tého analytu v polovině výšky
- W_j ...šířka píku j-tého analytu u základny
- $t'_{R,j}$ (min)...redukovaný retenční čas j-tého analytu (čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi)



$$t'_{R,j} = t_{R,j} - t_M$$

Obdobně:

- retenční objem $V_{R,j}$
- mrtvý objem V_M
- redukovaný retenční objem $V'_{R,j}$

$$V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$$

Kolonová chromatografie

Termodynamika a kinetika separace na koloně

- Postup vzorku kolonou → jednotlivé složky vzorku (analyty) se separují, tj. dospějí do detektoru v různých retenčních časech
 - tento děj popisují termodynamické pojmy
 - distribuční (rozdělovací) konstanta K_D
 - kapacitní faktor (retenční faktor, kapacitní poměr) k
- Při postupu vzorku kolonou se zóny analytů postupně rozšiřují vlivem difúze
 - tento děj popisují kinetické pojmy
 - počet teoretických pater dané kolony n
 - výškový ekvivalent teoretického patra H
- Termodynamika a kinetika spolu úzce souvisí
 - obě určují, jak dokonale budou zóny sousedních analytů odděleny

Kolonová chromatografie

Termodynamika separace na koloně

➤ Distribuční (rozdělovací) konstanta $K_{D,i}$

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

- $(c_i)_s$, $(c_i)_m$...koncentrace i-tého analytu ve SF a MF ($c = n / V$)
- $(n_i)_s$, $(n_i)_m$...látkové množství i-tého analytu ve SF a MF
- V_s (ml)...objem SF kolony
- V_m (ml)...objem MF v koloně

➤ Kapacitní faktor (retenční faktor, kapacitní poměr) k_i

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

➤ lze zjistit přímo z chromatogramu

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M}$$

$$k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,i}}{V_M}$$

Kolonová chromatografie

Kinetika separace na koloně

- Teoretické patro chromatografické kolony
 - pomyslná část kolony, ve které dojde k jednomu ustavení rovnováhy mezi SF a MF
 - Délka této části kolony = tzv. **výškový ekvivalent teoretického patra**
 - vyšší počet teoretických pater → vyšší účinnost kolony

- počet teoretických pater dané kolony – **n**

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2$$

- w_j ...šířka píku analytu při základně

- **výškový ekvivalent teoretického patra – H (mm)**

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \cdot \left(\frac{w_j}{t_{R,j}} \right)^2$$

- L...délka kolony (mm)

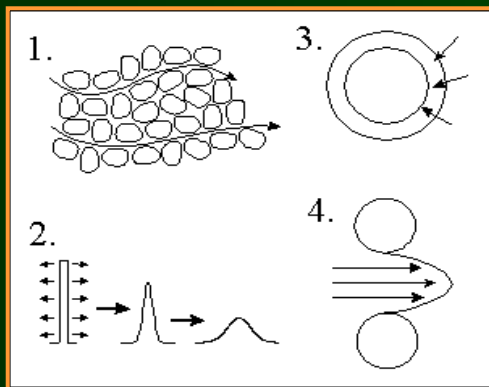
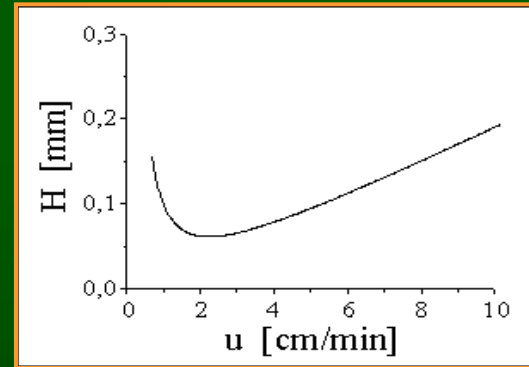
Kolonová chromatografie

Termodynamika a kinetika separace na koloně

- Výškový ekvivalent teoretického patra (H) závisí na lineární rychlosti mobilní fáze (u)
- Závislost vyjadřuje **Van Deemterova rovnice**

$$H = A + B / u + C \cdot u$$

- **A**...vířivá difúze,
- **B**...podélná molekulární difúze,
- **C**...odpor proti přenosu hmoty v SF a MF



- **Vířivá difúze (1)** – úměrná velikosti částic SF (hlavně u HPLC) - různé molekuly urazí při pohybu kolonou různé vzdálenosti
- **Podélná molekulární difúze (2)** - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací
- **Odpor proti přenosu hmoty ve SF (3)** - různé molekuly difundují různě hluboko do SF (závisí na typu SF), hlavně u GC
- **Odpor proti přenosu hmoty v MF (4)**

- minimum Deemterovy křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které
 - daná kolona vykazuje největší účinnost (má největší počet pater)
 - minimálně rozšiřuje zóny analytů

Kolonová chromatografie

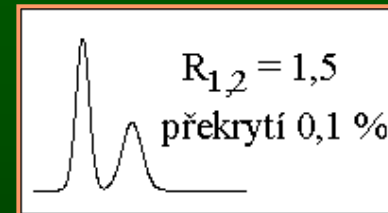
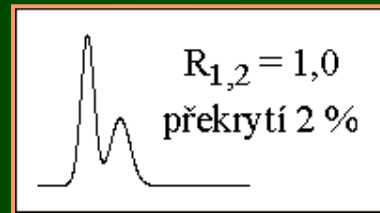
Termodynamika a kinetika separace na koloně

■ Rozlišení R - míra chromatografické separace

- pro dobré rozdělení dvou sousedních analytů) je nutné, aby analyty měly
 - dostatečně rozdílné retenční časy (správná volba SF, MF - termodynamika)
 - dostatečně úzké zóny (délka kolony, velikost částic SF, u - kinetika)

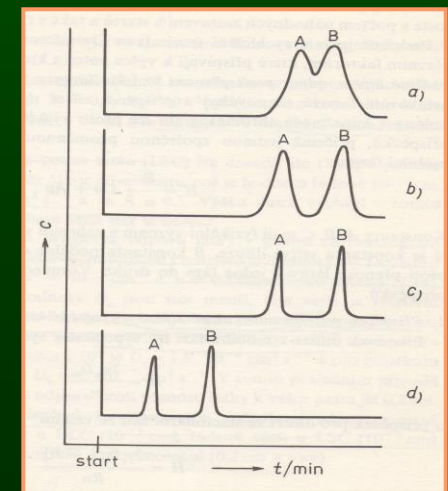
■ $R_{i,j}$...rozlišení i-tého a j-tého analytu

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j}$$



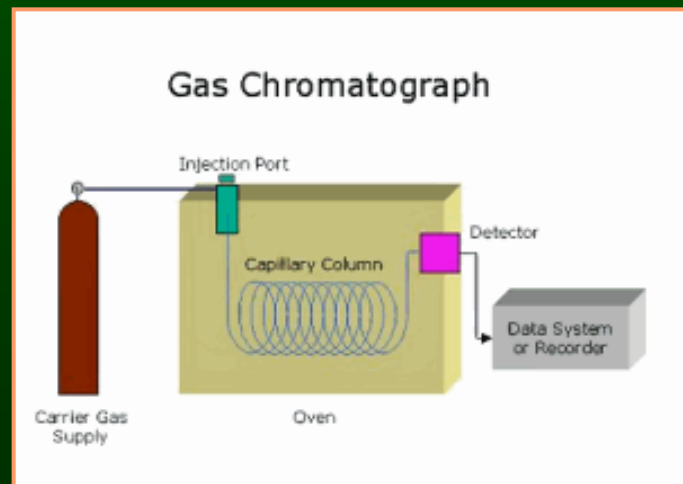
Zlepšení špatného rozlišení látek A, B (a)

- změnou termodynamických faktorů (b),
- kinetických faktorů (c)
- zkrácení analýzy změnou průtokové rychlosti 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 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



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)
 - regulace průtoku plynu z tlakové nádoby - programovatelné elektronické regulační systémy
 - náplňové kolony: průtok 10 - 60 ml/min
 - kapilární kolony: 1 - 2 ml/min (stabilní !)

Dávkovač

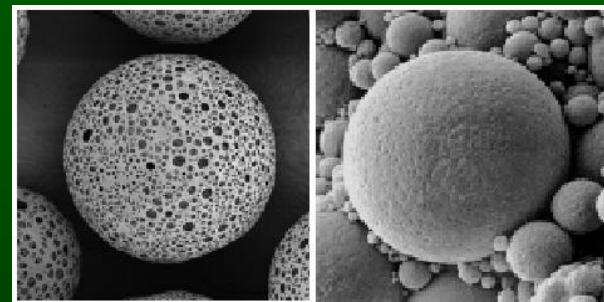
- vnáší alikvot vzorku (μl) do kolony
- vzorky v org. rozpouštědle dávkovány injekční jehlou přes septum do vyhřívaného prostoru - ihned převedeny do plynné fáze a vneseny do kolony nosným plynem
- split - splitless technika dávkování vzorku na kolonu:
 - split mód - do kolony vstupuje pouze malá část zplyněného vzorku - pro kapilární kolony
 - splitless mód - do kolony vstupuje většina vzorku



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, porapaky,...)
- částice jsou stacionární fází potaženy (GLC)
 - užší kolony
 - vyšší účinnost
 - menší kapacita pro vzorek
 - delší kolony
 - vyšší účinnost
 - nutné zvýšené tlaky nosného plynu



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

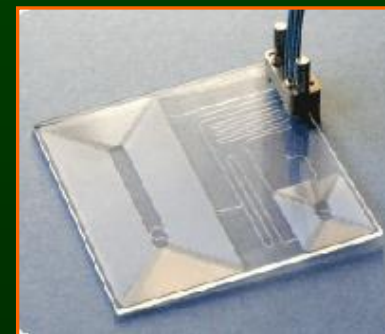
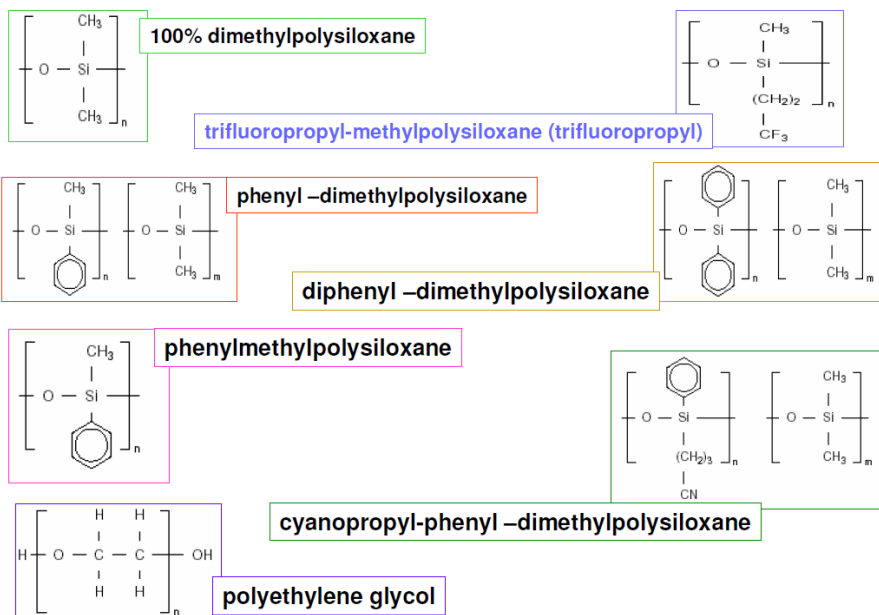
- kapiláry z křemenného skla (vnitřní průměr 0,1 - 0,5 mm, délka 10 - 150 m)
- na povrchu potaženy polyimidem (pevnost a pružnost)
- vnitřní povrch potažen tenkým filmem SF
- velmi účinné
- malá kapacita pro vzorek



Plynová chromatografie, GC - kolony

Stacionární fáze pro GLC

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



- Dostupné i GC mikrokolony na bázi silikonového čipu

Plynový chromatograf - detektory

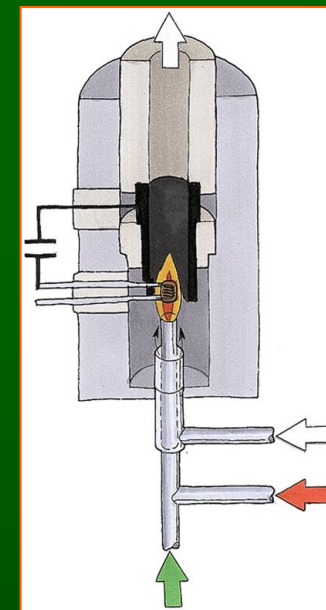
- **Univerzální detektory** - detegují většinu analytů
- **Selektivní detektory**
 - kombinace více detektorů

Plamenově ionizační detektor (flame ionization detector, FID)

- univerzální detektor pro GC
- efluent z kolony smísen s H₂ a vzduchem, eluované analyty jsou 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

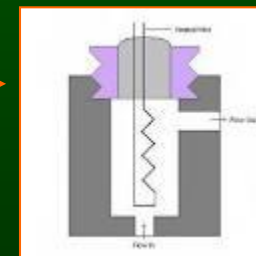
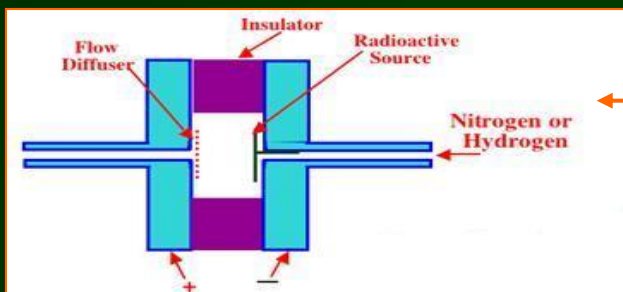
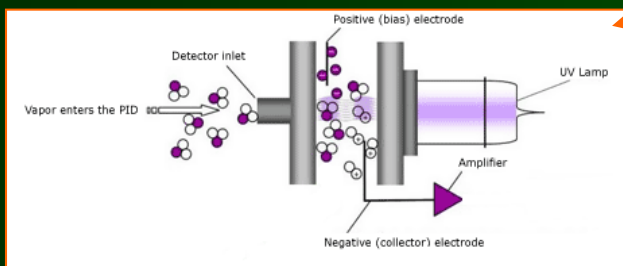
Termovodivostní detektor (thermal conductivity, TCD)

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

Detektor elektronového záchytu (electron capture, ECD)

- snížení ionizace nosného plynu v důsledku vychytávání elektronů z ionizujícího β -zářiče elektronegativními skupinami

Hmotnostní detektor (mass spectrometry detector, MSD)



Plynová chromatografie

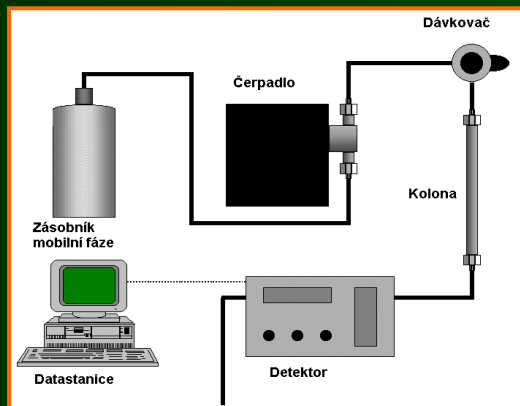
Příprava vzorků pro GC analýzu:

- extrakce sledovaných analytů ze vzorku biologického materiálu do organického rozpouštědla
+ odpaření rozpouštědla z extraktu
- chemická derivatizace - zvýšení těkavosti a termostability látek pro GC analýzu (klinicky významné látky jsou zpravidla netěkavé)
 - silylace – substituce atomu vodíku funkčních skupin látek silyl-skupinou (R_3Si-)
 - oximace – tvorba oximů kondenzací aldehydů nebo ketonů s hydroxylaminem NH_2OH
 - acylace, esterifikace



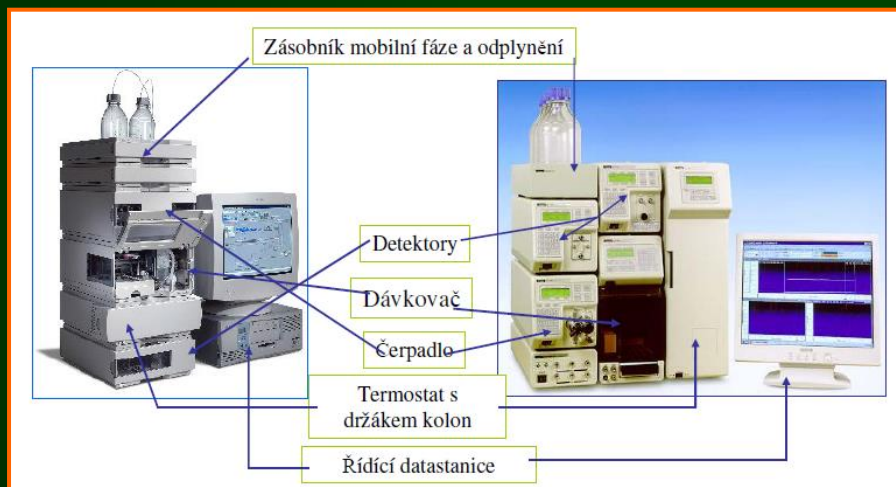
Kapalinová chromatografie - LC

- 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 je 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



Kapalinový chromatograf

Zásobníky s mobilními fázemi

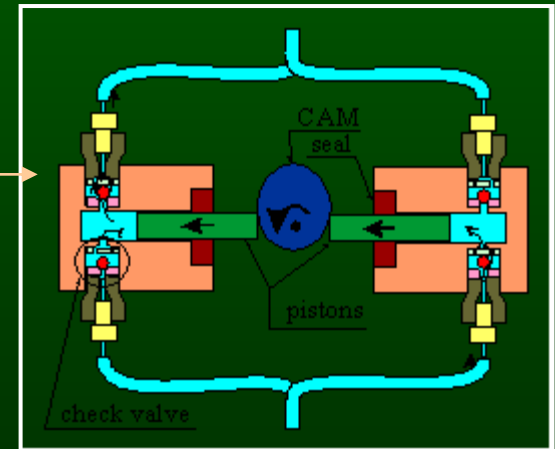
- v nejjednodušší formě skleněné lahve s přívodními hadičkami k čerpadlům
- MF připraveny z čistých rozpouštědel určených pro chromatografii (HPLC grade)
- MF přefiltrovány přes membránový filtr pro odstranění případných pevných částic
- MF zbaveny rozpuštěných plynů – sonikace, vakuové degassery (odplyňovače)

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)

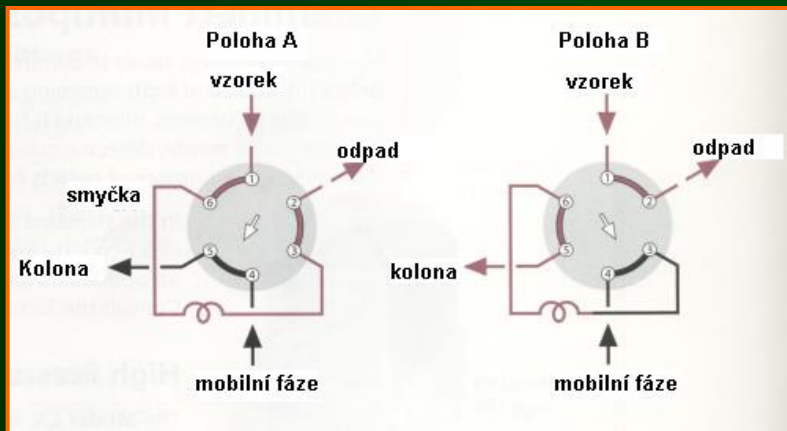
- **bezpulzní tzv. lineární dávkovač** - pro malé průtoky MF
 - pracuje na principu injekční stříkačky
- **pulzní pístová dvojúčinná (reciproká) čerpadla**
 - činnost je fázově posunutá pro minimalizaci pulzů
 - Vyhlazení pulzů
 - tlumič pulzů na principu svinuté odporové kapiláry
 - nebo redukce pulzů 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 (obdobu splitovacího zařízení v GC)
 - dávkovače s možností smísení vzorku s derivatizačním činidlem před nadávkováním na kolonu (předkolonová derivatizace)

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
 - 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)
- Typy částicových náplní LC kolon
- náplně s navázanou fází - SF chemicky navázána na povrch částic silikagelu (C18, C8,...)
 - polymerní náplně - SF na povrchu polymerních částic – vysoká pH odolnost
 - chirální náplně - pro separaci enantiomerů
 - restricted-access náplně - analýza biologických směsí s vysokým obsahem proteinů



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)

- dostupné jsou i analytické HPLC čipy



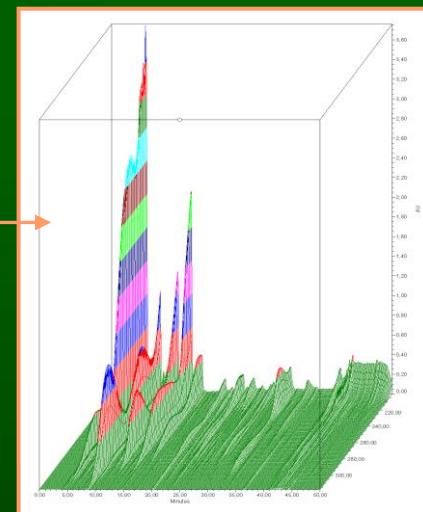
■ Předkolona

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



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 vlnovou délkou
 - Detektory s variabilní vlnovou délkou
 - Detektory diodového pole (PDA) - schopné měřit v celé oblasti λ
 - 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**
 - oxidace nebo redukce elektroaktivního analytu v průtokové cele 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 detektor



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. firma Waters, Thermo, Perkin-Elmer, Dionex, BioRad a další.



- UPLC Waters Acquity (s MS detektorem)

Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Deproteinace, čištění vzorku a zakoncentrování analytů

Srážení proteinů – org. rozpouštědlo, kyselina

Ultrafiltrační techniky - úprava roztoků pomocí polopropustných membrán

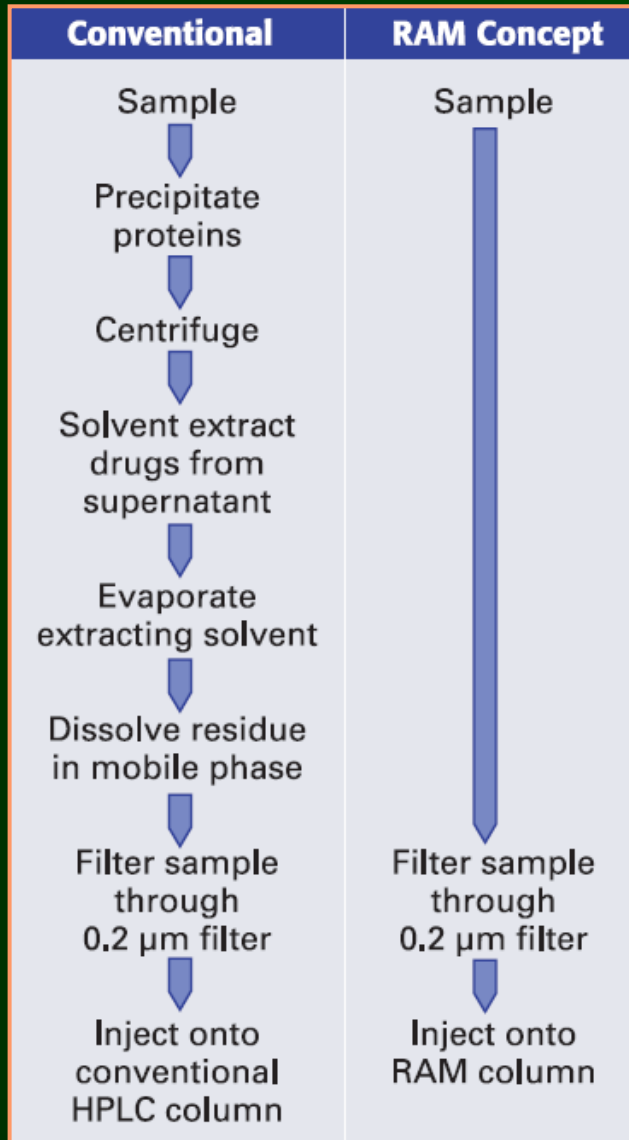
- hustota membrány limituje velikost separovaných molekul
- technika je vhodná pro deproteinaci vzorků

Extrakční techniky

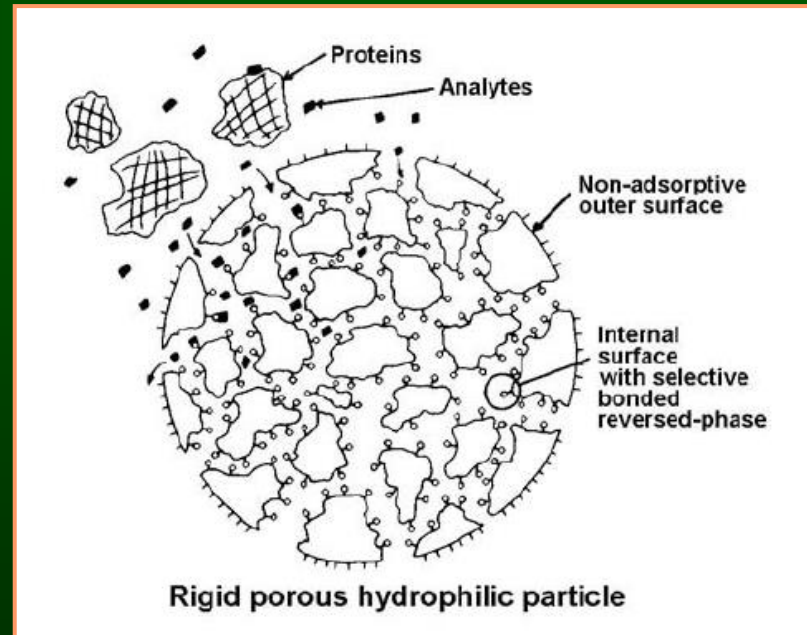
- **Kapalinová extrakce** analytů do organického rozpouštědla
 - L-L extrakce při vhodném pH
 - organický extrakt se odpařuje v proudu inertního plynu (N_2)
 - odparek se rozpustí v nezbytném objemu mobilní fáze
- **Extrakce pevnou látkou** (solid phase extraction, **SPE**)
 - využití kolonek naplněných médiem dle charakteru látky -
- sorbent, iontoměnič, gel atd.
 - vzorek v roztoku se kolonkou prolévá pod tlakem
 - nezachycené složky (proteiny,...) se vymyjí
 - zachycené složky se uvolní vhodným rozpouštědlem
 - SPE je automatizovatelná



Pozn.: Možnost přímé HPLC analýzy vzorků s obsahem proteinů



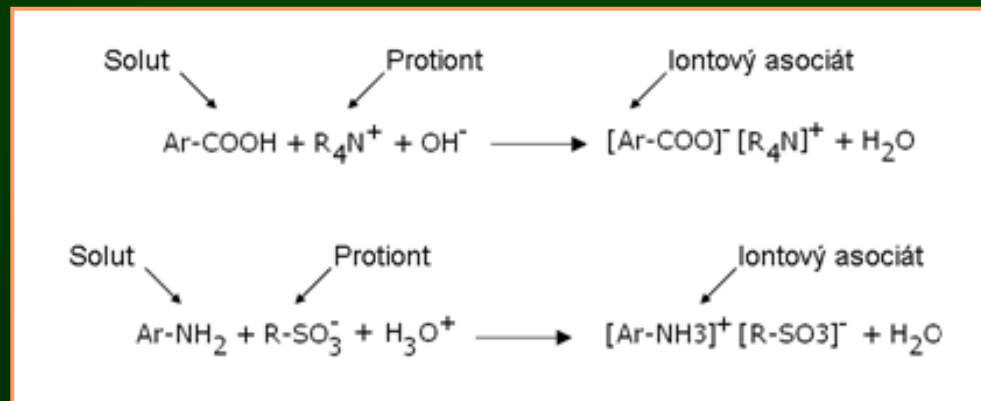
- **Restrict – access material**



Pozn.: Možnost analýzy látek iontové povahy pomocí RPC

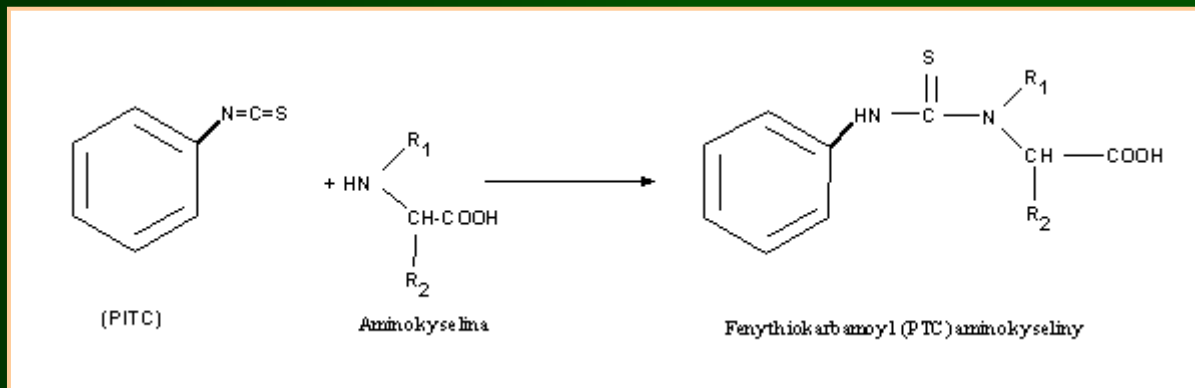
Iontově párová chromatografie (IPC)

- modifikace RPC (LLC s obrácenou fází, revers-phase chromatography)
 - zlepšuje separaci sloučenin iontové povahy
- přídavek do MF: iontově párující činidlo mající hydrofobní část (alifatický řetězec) a hydrofilní část
 - např. N-alkyl kvartérní amoniové soli pro separaci látek aniontového typu
soli alkylsulfonových kyselin pro separaci látek kationtového typu
+ vhodné pH MF, aby bylo dosaženo úplné ionizace dělených analytů
- dělená látka iontové povahy a opačně nabitý ion vytvoří iontový asociát
 - asociáty jsou neutrální, vykazují zvýšenou retenci na nepolární SF



Derivatizace analytů

- zlepšení separace na koloně
- umožnění nebo usnadnění detekce analytů
 - **předkolonová derivatizace**
 - např. derivatizace aminokyselin a jiných primárních aminů
 - vznik fluorescenčních sloučenin → detekce fluorometrem
 - Vznik UV absorbující látky → detekce v UV



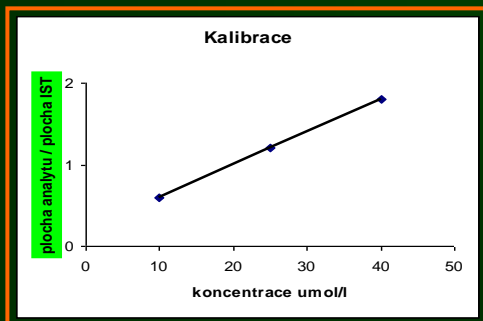
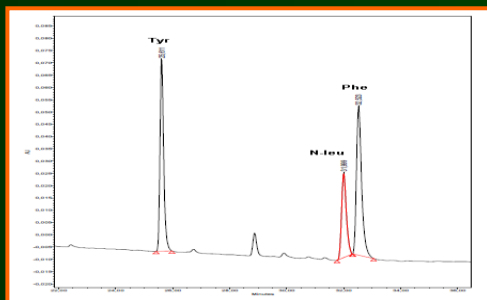
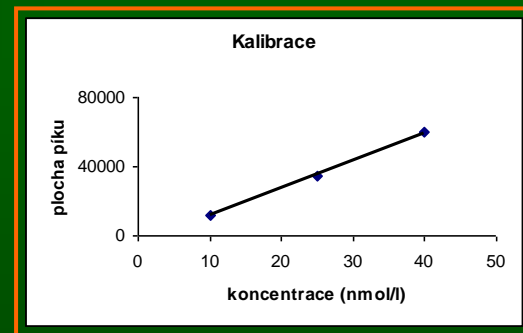
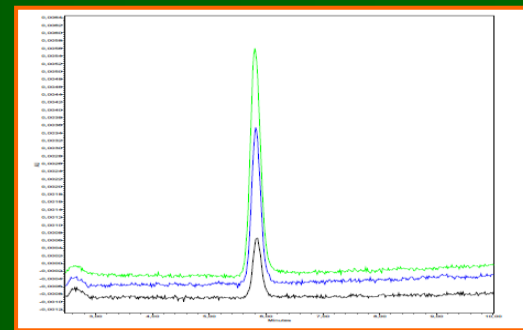
- **postkolonová derivatizace**
 - např. u analyzátorů aminokyselin
 - eluované aminokyseliny za kolonou derivatizovány ninhydrinem
 - fotometrická detekce

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



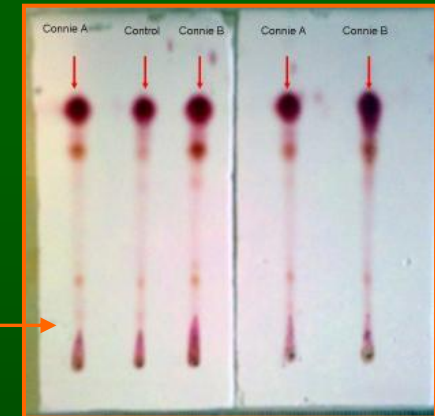
Interní kalibrace (kalibrace s vnitřním standardem):

- 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)

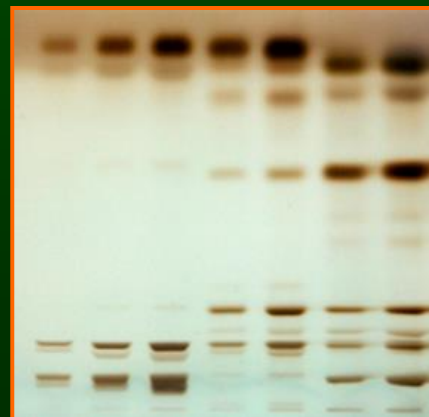
- kvalitativní, příp. semikvantitativní analýza
- flexibilní levná metoda
- umožňuje souběžně analyzovat více vzorků
- nevyžaduje přístroje a náročnou přípravu
- velmi časté využití v **toxikologii**
 - cílené průkazy nejrůznějších tox (jedů, škodlivin)
 - orientační screening léků a drog
 - pozitivní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



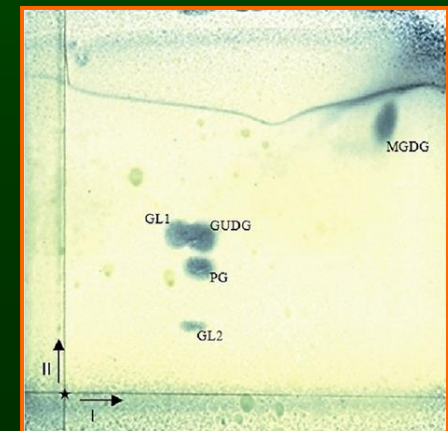
HPTLC – sacharidy



HPTLC – lipidy



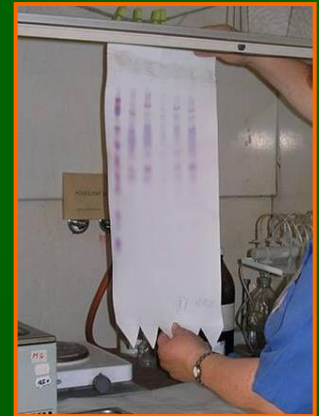
dvojměrná TLC – složené lipidy



Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Papírová chromatografie

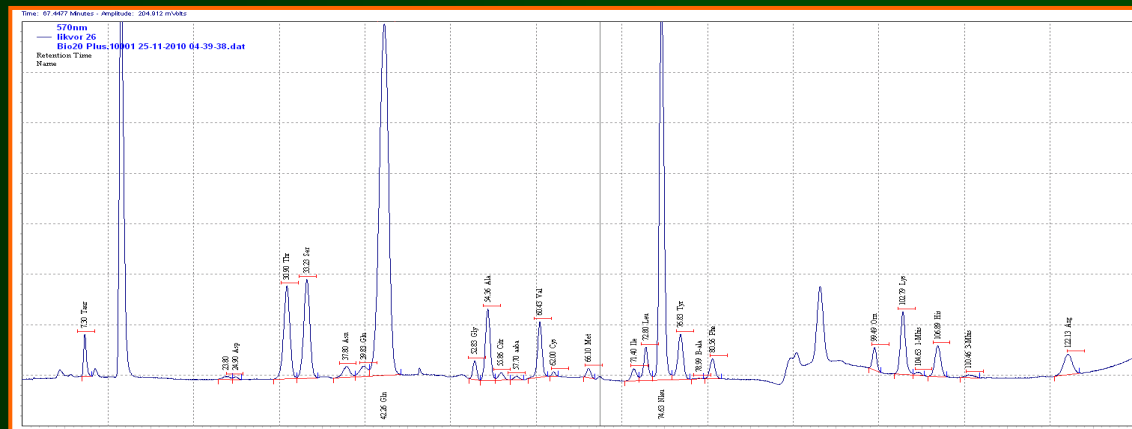
- jednoduchá, již málo používaná technika př. screening aminokyselin v moči



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 (syntetická AMK norleucinu)



Analyzátor AMK (Perkin – Elmer)

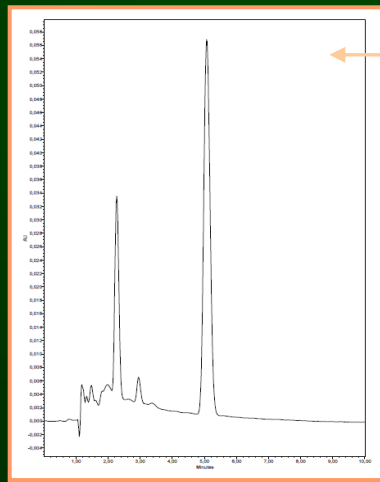
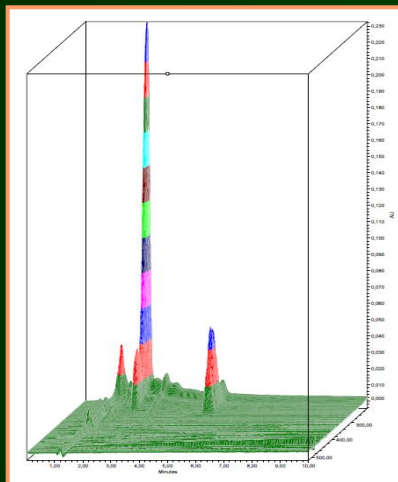
➤ Další využití IEC

- nukleotidy, peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny

Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

HPLC rozdělovací

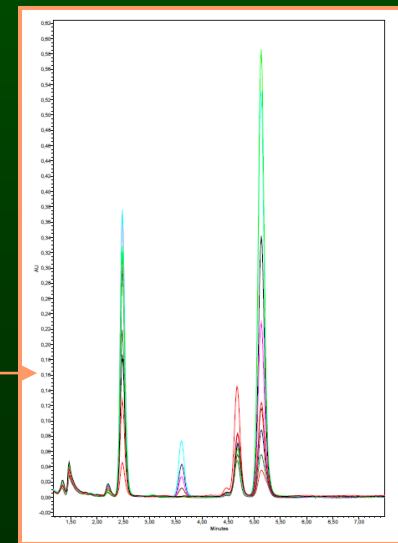
- z chromatografických metod nachází nejširší uplatnění v klinické biochemii
- většina aplikací využívá HPLC s reverzní fází
- lze ji aplikovat na široké spektrum analytů v závislosti na způsobu detekce
 - sacharidy
 - lipidy
 - **léky**
 - pteriny
 - karboxylové kys.
 - steroidy
 - **drogy**
 - CDT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



Analýza

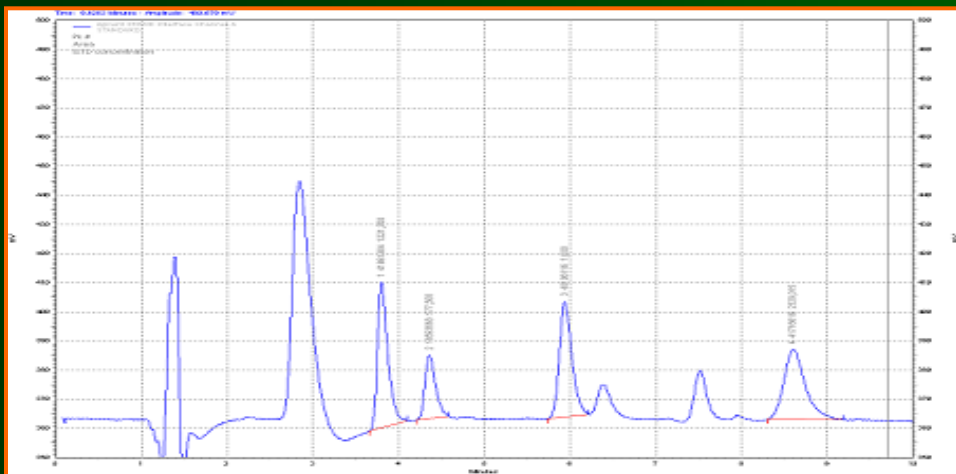
- 7-dehydrocholesterolu (prekursor cholesterolu – endogenní syntéza):
 - záznam z PDA
 - chromatogram při λ_{max}

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)

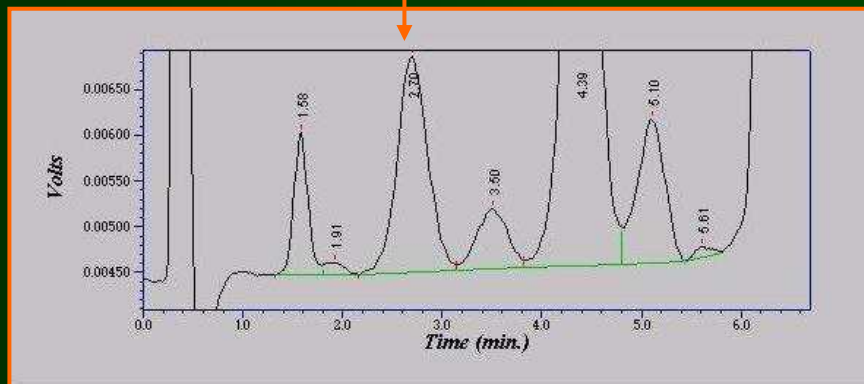
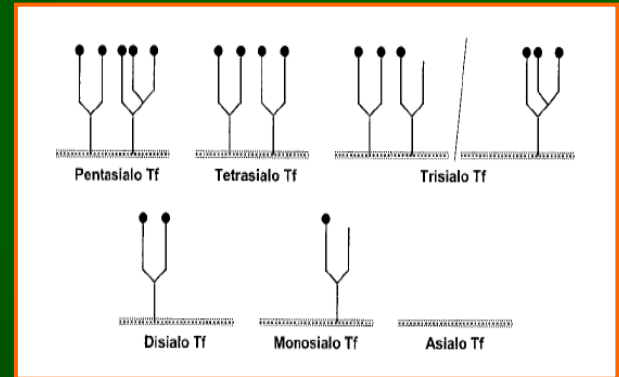
Kys. vanilmandlová (metabolit katecholaminů)

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

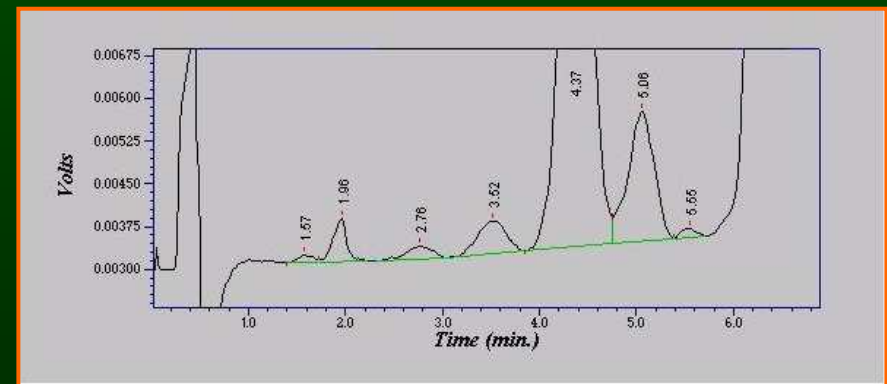
Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Analýza CDT (karbohydrát-deficientní transferin)

- detekce nadměrného užití alkoholu
- monitorování abstinence v průběhu léčby
- **Transferin** - glykoprotein vázající železo
 - obsahuje 2 polysacharidové řetězce
 - variabilní množství kyseliny sialové
 - podle počtu skupin kyseliny sialové - 6 izoformem
 - a-, mono-, di-, tri-, tetra- a penta-sialotransferin
 - disialotransferin - cílová sloučenina pro stanovování CDT HPLC analýzou



- pozitivní pacient



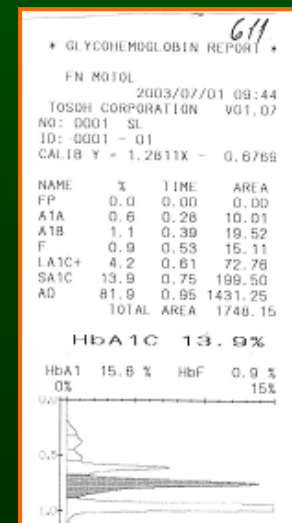
- negativní pacient

Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

HPLC analýza glykovaného hemoglobinu

- **HbA1c** - stabilní adukt glukózy s N-terminální aminoskupinou valinu β -řetězce hemoglobinu
 - Diferenciální diagnostika diabetu
 - Určení kompenzace a stability glukózového metabolismu
 - Monitorování terapie
- **Izolace a hemolýza erytrocytů**
 - EDTA krev
 - izolace erytrocytů centrifugací, promytí fyziologickým roztokem
 - lyzace erytrocytů
 - HPLC analýza (ionex. kolona)

HPLC Analyzátor HbA1c
Tosoh



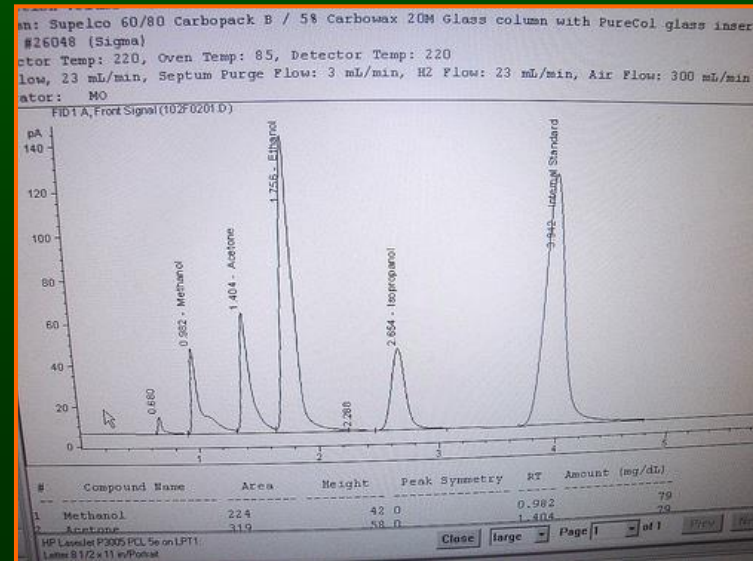
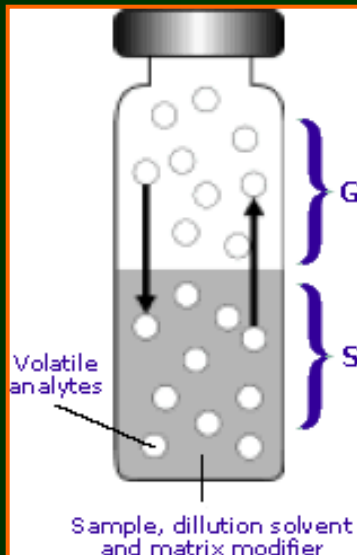
Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

Analýza těkavých látek v kapalných nebo pevných vzorcích:

GC v uspořádání head-space

- „head space“ – dávkování z prostoru nad vzorkem (plynná fáze po ustavení rovnováhy)

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

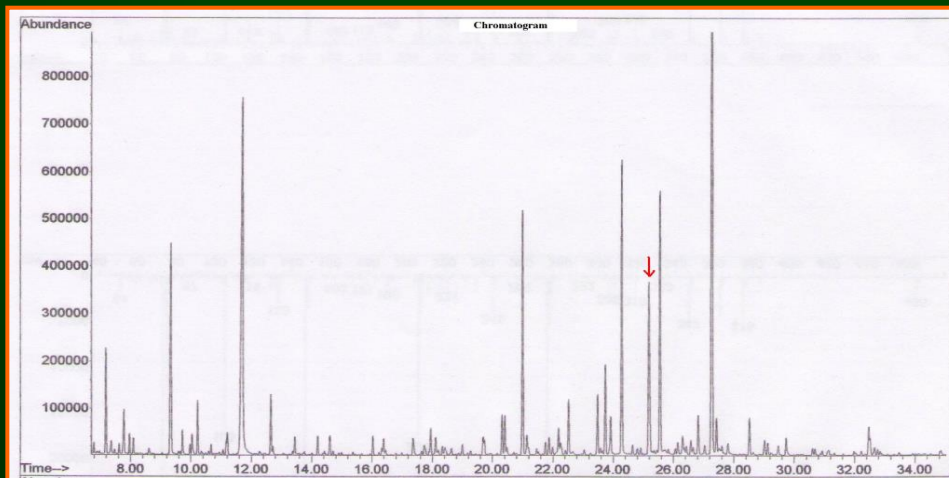


Praktické aplikace chromatografických technik v klinické biochemii - příklady

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)

Organické kyseliny v moči – diagnostika dědičných metab. poruch



Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

MS - fyzikálně-chemická metoda – kvalitativní i kvantitativní analýza

- převedení molekul analytů na ionty
- separace iontů ve vakuu podle jejich hmotnosti při průchodu magnetickými a elektrickými poli

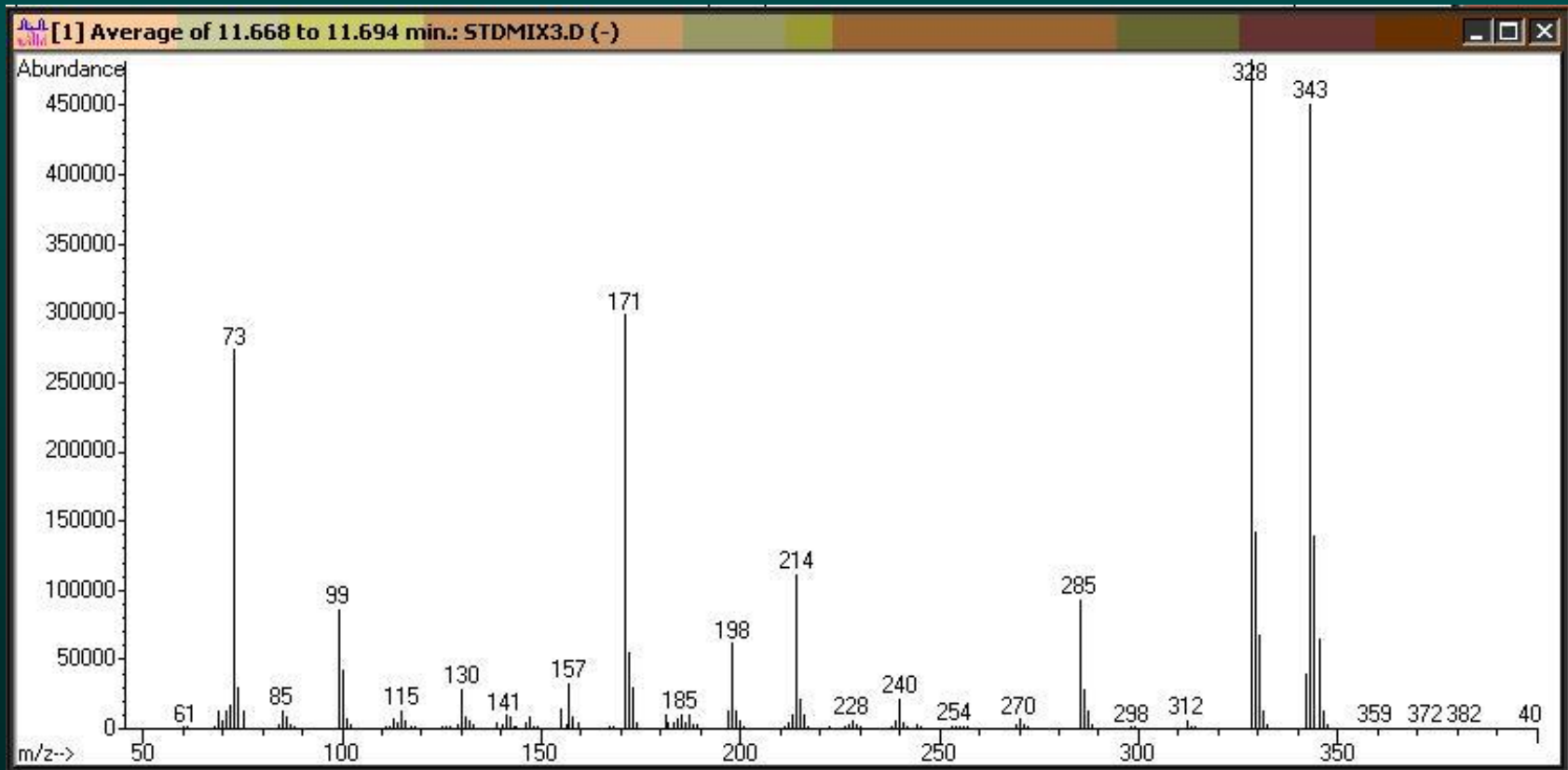
- MS řazena mezi spektrální techniky, i když v principu se liší (nesleduje rozdíly energetických stavů molekul)

- **MS** vyvinuta počátkem 20. století
- klinická biochemie – detekce a stanovení nízkomolekulárních látek ve spojení s plynovou chromatografií (1980)
- 90. léta 20.století - nové techniky, které umožnily využívat metodu
 - ve spojení s kapalinovou chromatografií
 - pro látky vysokomolekulární
 - samostatně bez napojení na separační techniku

Hmotnostní spektrum

Výstup MS - hmotnostní spektrum – čarový diagram

- Osa x - hodnota m/z (hmotnost / náboj iontu)
- Osa y - odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu (%)



Hmotnostní spektrometr

- převádí molekuly analytů na ionty
- separuje a rozlišuje ionty podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- zaznamenává intenzity jednotlivých iontů

Složený ze tří funkčních celků:

Iontový zdroj:

- molekuly analytů převedeny do plynné fáze (do vysokého vakua)
- přitom se ionizují

Iontový separátor:

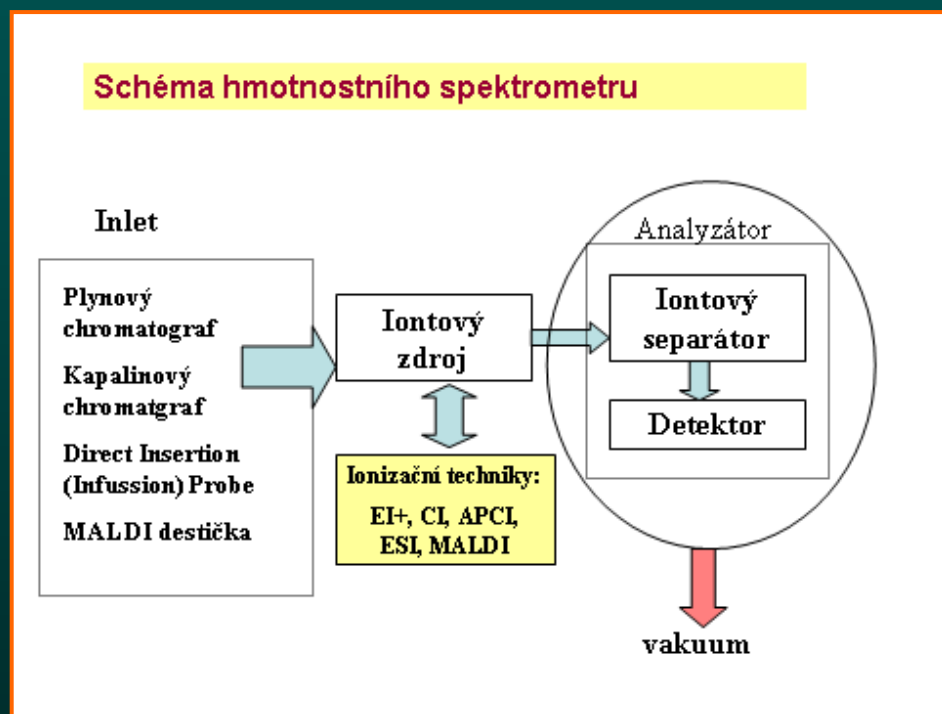
- rozdělení iontů různých hmotností:
 - ionty urychleny
 - z charakteru pohybu vakuovaným prostorem - vypočet jejich m/z

Detektor:

- detekce iontů podle hodnoty m/z
- určení intenzity (četnosti) iontů

Další části přístroje

- vakuový systém
- iontová optika k urychlení a fokusaci iontů



- zařízení pro zavádění vzorků (dávkoř) - počítač na ovládání přístroje, sběr a ukládání dat

Iontový zdroj - Ionizační techniky

- Existuje celá řada ionizačních technik - vytvoření nabitě částice, která je následně analyzována
- Použitá technika záleží na
 - charakteru analyzovaných látek
 - separační metodě, na kterou je MS napojen (chromatografie, elektromigrační techniky, bez napojení na separaci)

➤ GC/MS

- Elektronová ionizace **EI**
- Chemická ionizace **CI**

➤ LC/MS (CE / MS, MS s přímým nástřikem)

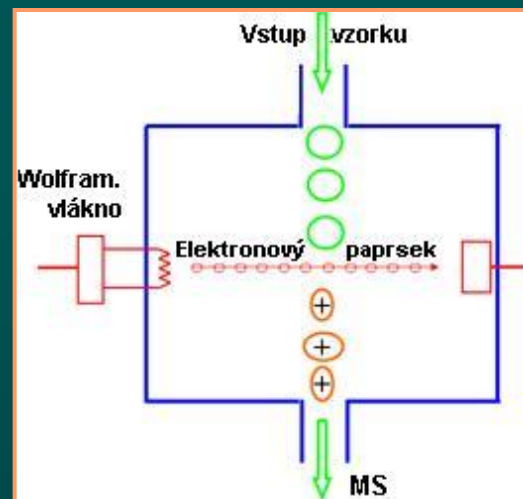
- **ESI** Elektrospray
- **APCI** Chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization,)
- **APPI** Fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization,)

➤ MALDI (SELDI)

...a další

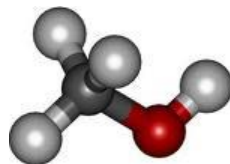
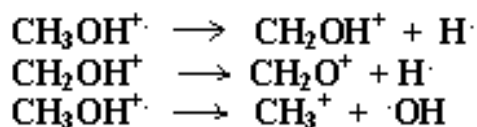
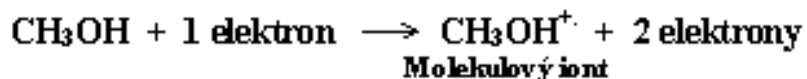
Elektronová ionizace, EI (GC / MS)

- V iontovém zdroji - ionizace molekul analytu v plynném stavu pomocí proudu elektronů
 - odtržení elektronu z molekuly při srážce s paprskem elektronů (molekula získává kladný náboj)
 - následně dochází k fragmentaci (rozpadu) molekuly přebytkem energie

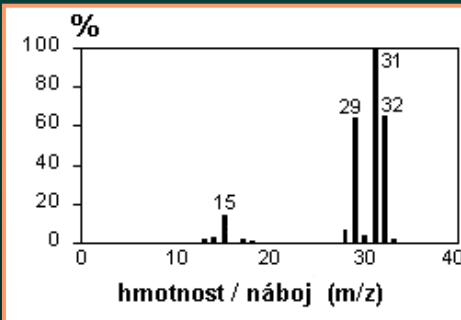


EI - tvrdá ionizační technika (fragmentace)

- Příklad: fragmentace molekuly MeOH, hmotnostní spektrum



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



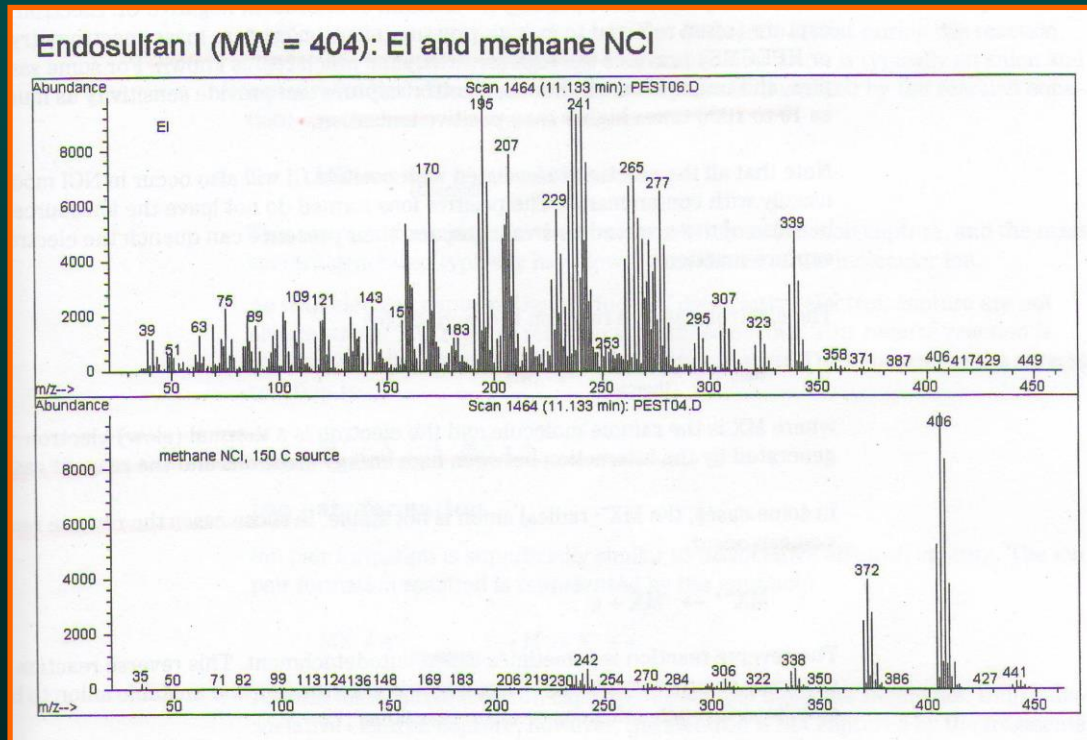
- fragmenty rozděleny v další části analyzátoru podle hodnoty m/z a detegovány
- EI - pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky (50 – 800 Da)

Dalton – jednotka molekulové hmotnosti

Chemická ionizace CI

(GC / MS)

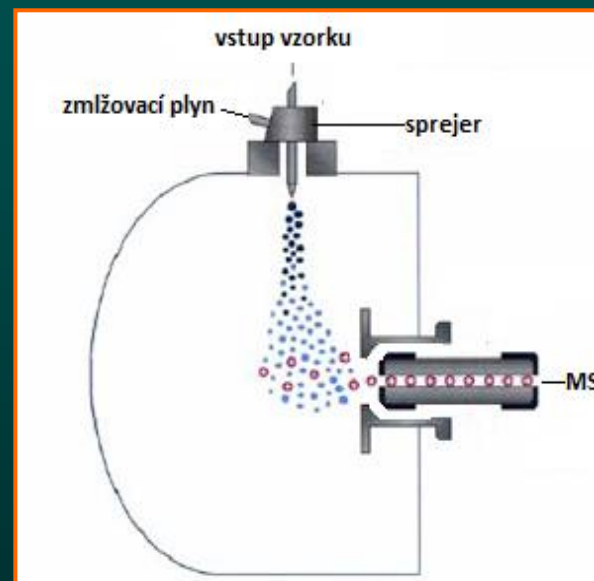
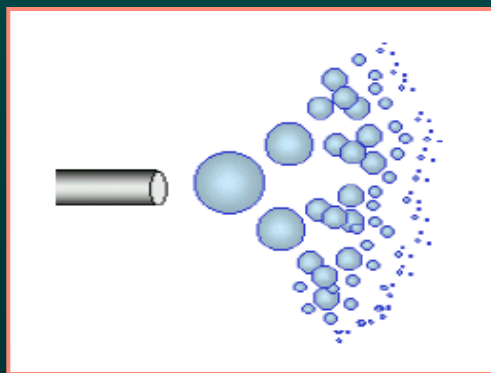
- „Měkčí“ varianta elektronové ionizace - šetrnější, nedochází k rozsáhlé fragmentaci
 - do iontového zdroje je přiváděn ionizační plyn (př. metan)
 - proud elektronů ionizuje nejdříve molekuly ionizačního plynu
 - tyto předávají energii molekule analytu (M)
- Srovnání hmotnostního spektra při elektronové a chemické ionizaci



Elektrospray ionizace, ESI

(LC / MS)

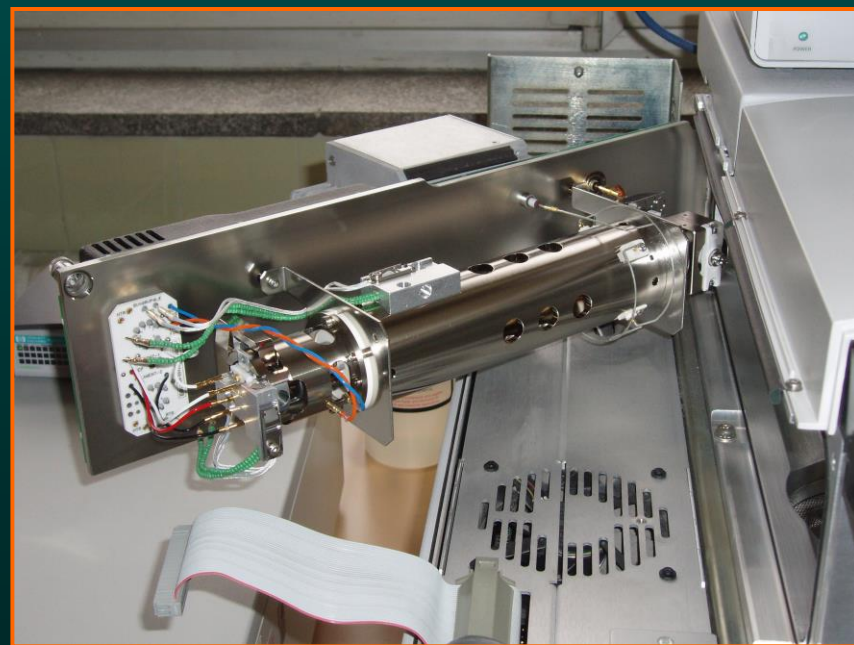
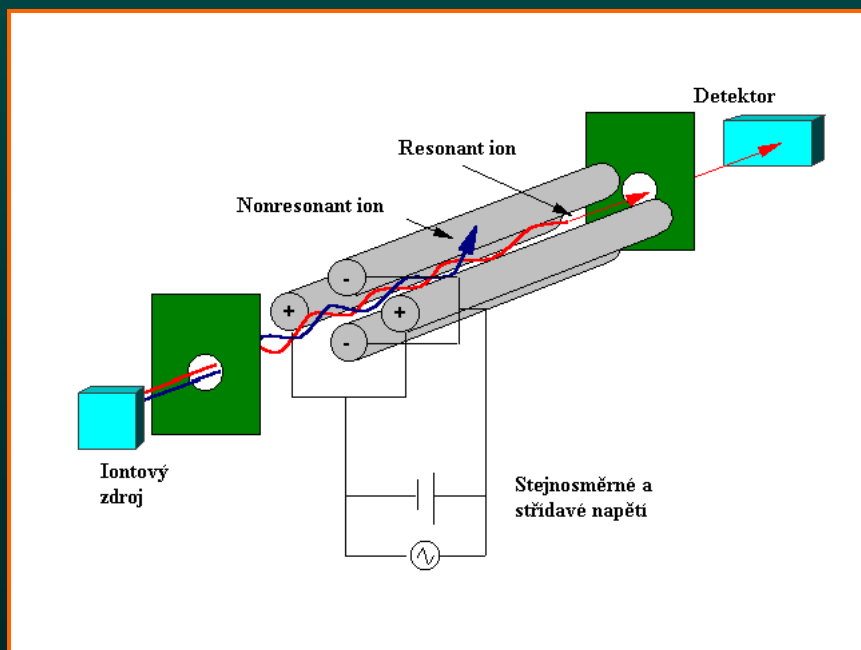
- „měkká“ ionizační technika
- převod kapalného vzorku do plynné fáze při současné tvorbě (pseudo)molekulárních iontů
 - eluát z kolony prochází kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí
 - vytváří se sprej vysoce nabitých kapiček
 - odpařením rozpouštědla vznikají ionty (i vícenásobně nabité)



- vhodná pro nízkomolekulární i vysokomolekulární látky (peptidy, sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny,...)
- Iontový separátor – kvadrupól, iontová past

Kvadrupól (iontový separátor)

- konstrukce - 4 kovové tyče připojené ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí
- ionty, které vletnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat
- při vhodné kombinaci obou složek napětí projdou kvadrupolem v daném okamžiku pouze ionty o určitém poměru m/z
- změnou vkládaných napětí projdou postupně kvadrupolem postupně ionty v celém rozsahu m/z
- lze použít pro GC/MS i LC/MS

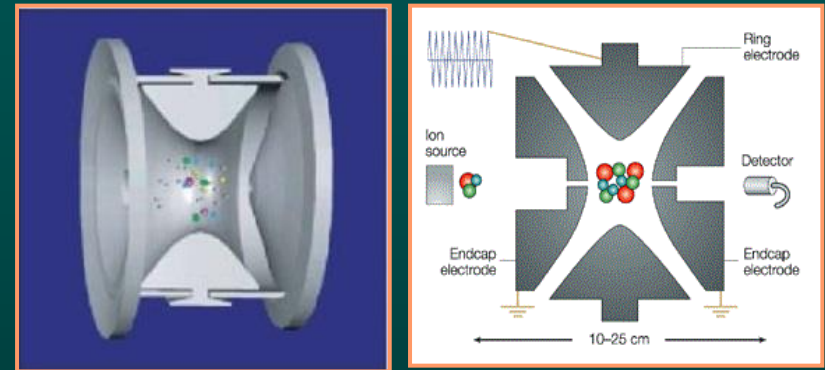


Iontové pasti

- stejné fyzikální principy jako kvadrupól
 - regulace pohybu iontu v určitém prostoru elektrickými poli

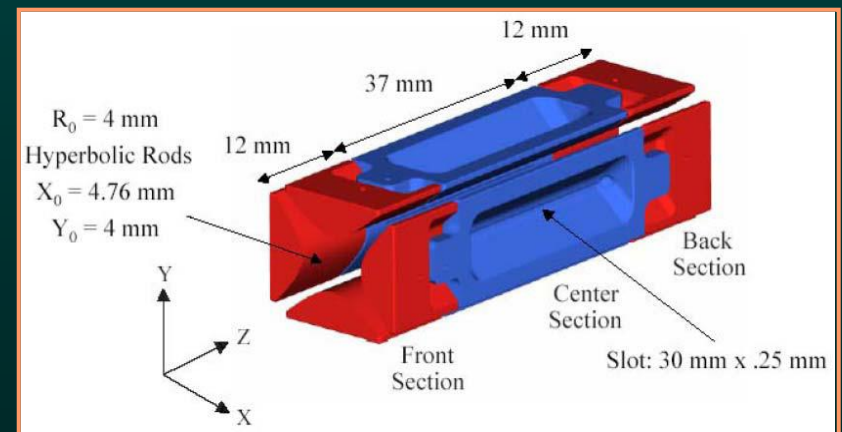
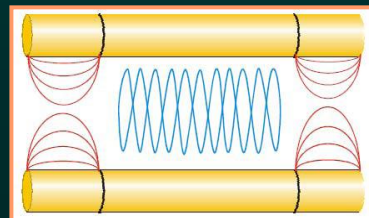
Sférická iontová past

- omezuje pohyb iontu ve všech třech směrech
- ionty se pohybují po určitou dobu v prostoru iontové pasti
- vypuzovány z pasti selektivně podle hodnoty m/z



Lineární iontová past

- podobný tvar jako kvadrupól
- na oba konce vkládáno elektrostatické pole - zabraňuje iontům opustit vnitřní prostor



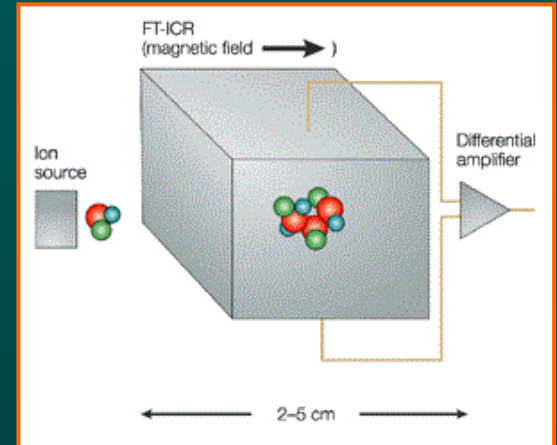
Iontové pasti

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT - ICR)

- princip - pohyb iontu v magnetickém poli
 - ion se v silném magnetickém poli pohybuje po kruhové dráze s frekvencí ω

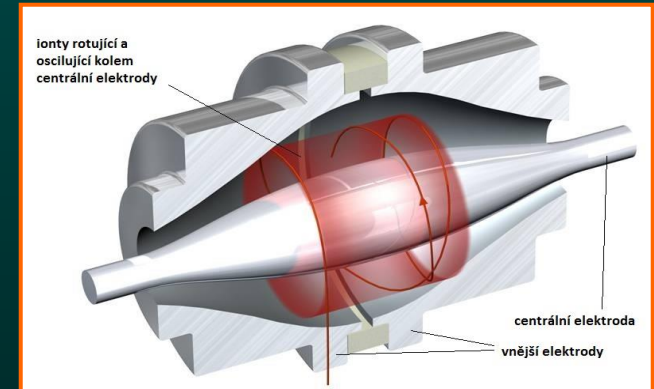
$$\omega = B \cdot z / m \quad B \dots \text{intenzita magnet. pole}$$

- Fourierova transformace - frekvence ω překonvertovány na hmotnostní spektrum
- extrémně vysoké rozlišení, velmi přesné měření hmotnosti



Orbitrap

- nejnovější iontový analyzátor
- vysoké rozlišení
- ionty vlivem elektrických polí obíhají a oscilují okolo centrální elektrody
- frekvence závislá na m/z
- oscilace snímají vnější detekční elektrody
- Fourierova transformace - konverze na hmotnostní spektrum

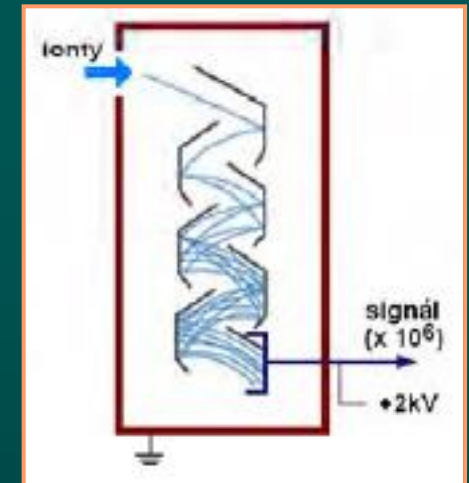


Detektor

- detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z
- určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

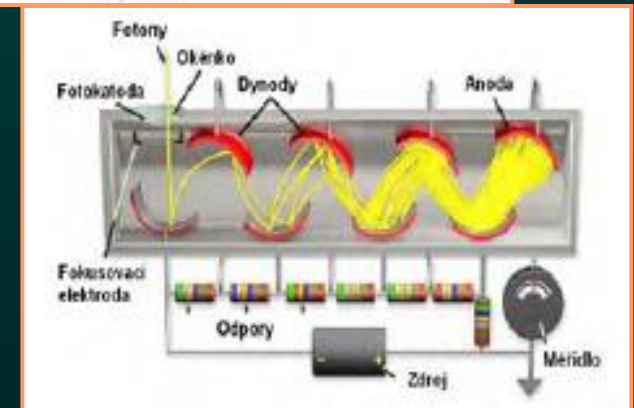
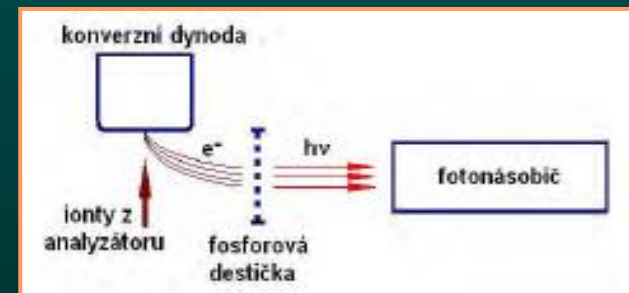
Elektronový násobič

- série dynod se vzrůstajícím potenciálem
- ion narazí na povrch první dynody - emise elektronu
- dopad elektronu na další dynodu - vícenásobná emise
- kaskádový efekt - velké množství elektronů
- detekce



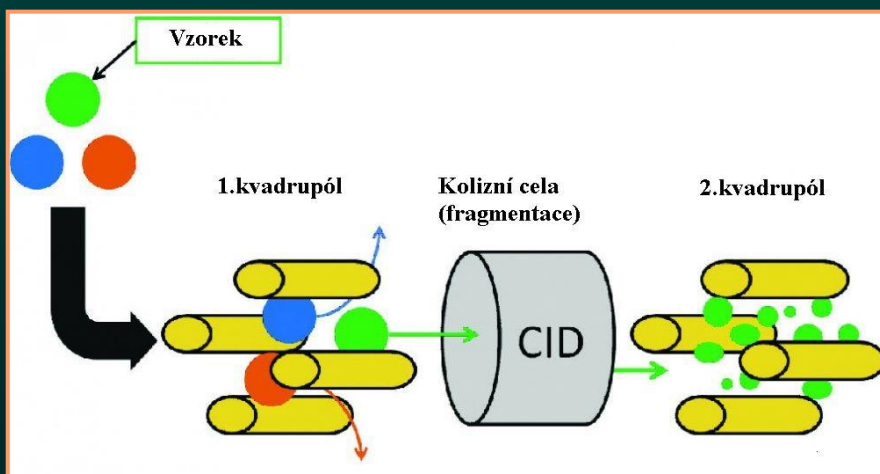
Fotonásobič

- před vlastním fotonásobičem umístěna fosforová destička
- dopad částice z konverzní dynody na P-destičku - emise fotonů
- dopad fotonů na fotokatodu - fotoelektrický jev - emise elektronů
- zmnožení elektronů stejně jako v elektronovém násobiči



Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS

- ionty podrobeny dvěma (nebo více) hmotnostním analýzám
 - zapojení dvou (nebo více) iontových separátorů v tandemu
- MS/MS - rychlá a citlivá analýza i bez použití separačních metod ve složité matici
- **MS1** - výběr iontů s určitou hodnotou m/z - prekurzorové (mateřské) ionty
- **kolizní cela** - fragmentace prekurzorových iontů – vznik produktových iontů
- **MS2** - záznam spektra produktových (dceřinných) iontů
 - různé režimy práce
 - sken produktových iontů - charakterizace struktury
 - sken prekurzorových iontů - pro analýzu určitých skupin látek



Trojité kvadrupól QqQ - nejčastější

- **Q1** - výběr prekurzorového iontu
- **q** - kolizní cela - fragmentace srážkou iontu s atomy inertního plynu
- **Q2** - analýza fragmentů

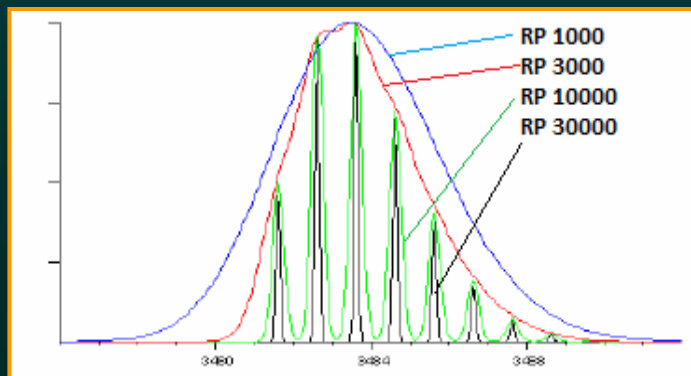
Parametry hmotnostního analyzátoru

Rozlišení R

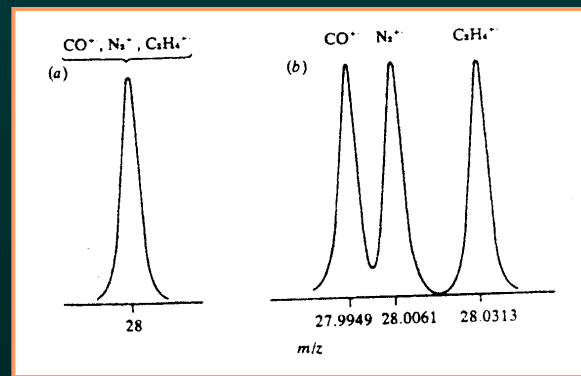
- základní parametr hmotnostního analyzátoru
- vyjadřuje schopnost analyzátoru rozlišit blízké hodnoty m/z
- nejmenší hmotnostní rozdíl dvou iontů, které lze ještě rozlišit, vztažený k velikosti m

$$R = (m_1 - m_2) / m_1 \quad m_1, m_2 \dots \text{hmotnosti 1. a 2. iontu (pro } z_1, z_2 = 1)$$

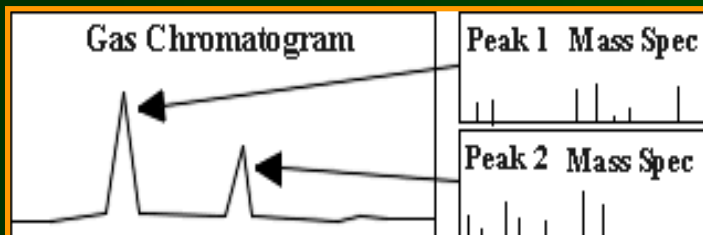
- **1/R = RP (Resolving power)** 1/R může být 1 000 – 1 000 000
 - **spektra s nízkou RP** - pouze rozlišení iontů lišících se o jednotku m/z
 - **spektra s vysokou RP** - možnost určení elementárního složení jednotlivých iontů
- např. pro nominální hmotu m/z = 28:
CO (27.9949) × N₂ (28.0061) × C₂H₄ (28.0313)



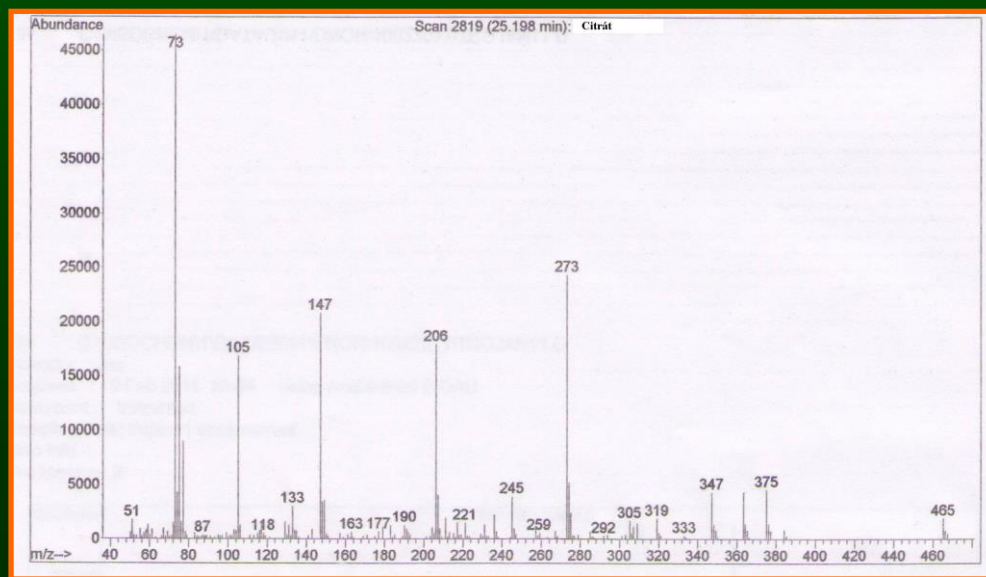
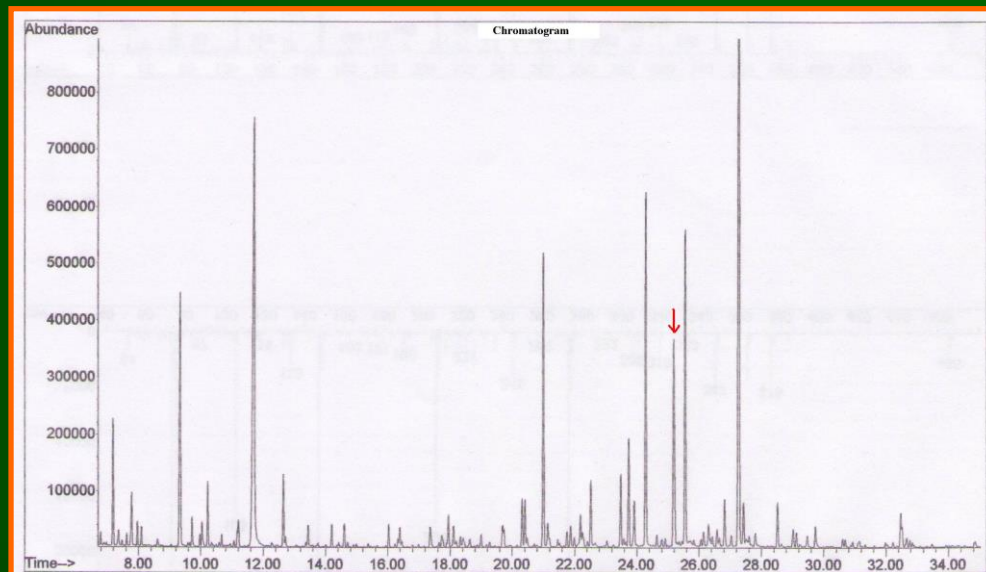
Spektrum v tzv. **profilovém módu** - kontinuální záznam ve formě píků (na rozdíl od běžného čárového módu)



Příklady použití – GC/MS



- Pro analýzu neznámých složek směsi
 - pro každou složku směsi se získá hmotnostní spektrum
 - Identifikace složky porovnáním s PC databází spekter
- Potvrzení či vyloučení metabolitů svědčících pro určité metabolické onemocnění
- Kvantifikace určitých metabolitů
- Toxikologie – standardní metoda
 - léky
 - drogy
 - jedy

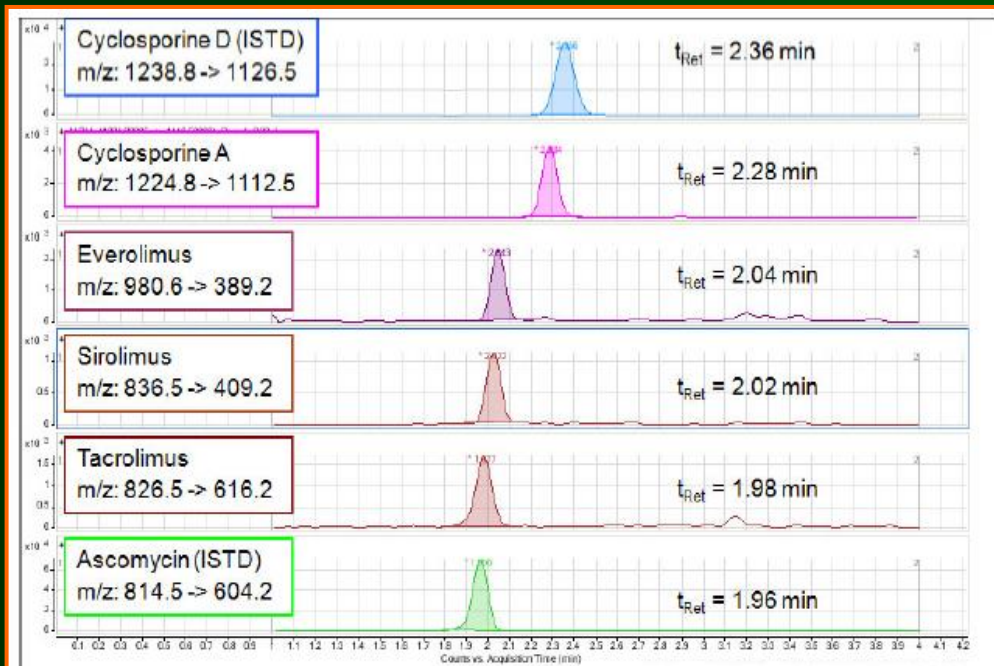


Ukázka – organické kyseliny v moči

Příklady použití - LC/MS, LC/MS/MS

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

Stanovení léků LC/MS (LC/MS/MS)



Pozn.: Záznam v SIM módu
(Selected Ion Monitoring):

- Hmotnostní detektor sleduje pouze vybrané hmotnosti, nikoli celé spektrum iontů

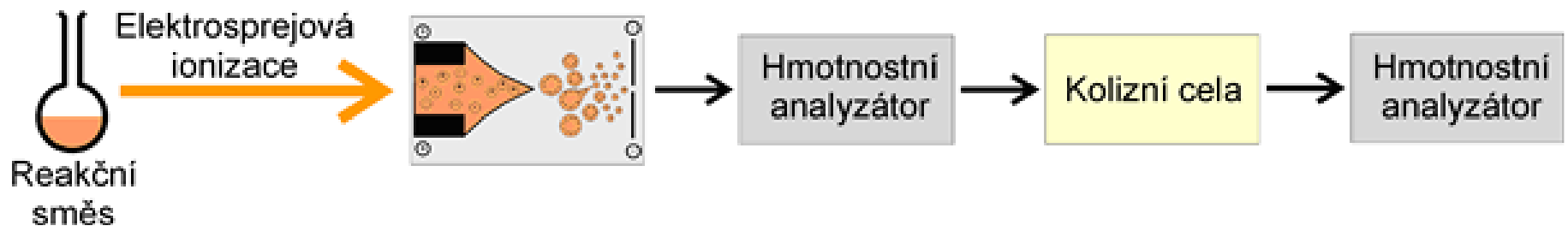
Příklady použití MS/MS

Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu

- Stanovení analytů ve výluhu ze suché krevní kapky
 - koncentrace aminokyselin
 - koncentrace acylkarnitinů
 - 10 různých metabolických poruch
např. fenylketonurie

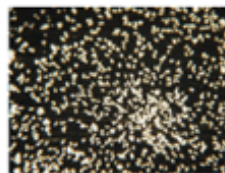
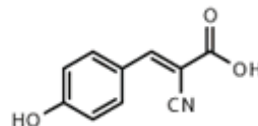
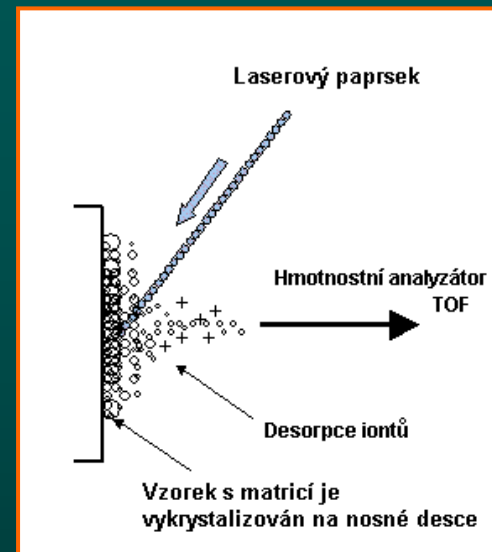


- MS/MS analýza bez použití separační metody (GC, LC)
 - uspořádání ESI – trojitý kvadrupol

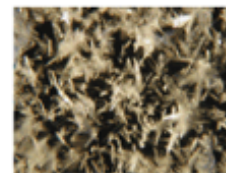
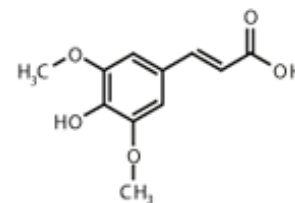


MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

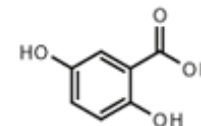
- vzorek v roztoku smíchán s matricí
 - deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin - absorbují energii laserového záření ve VIS nebo blízké UV oblasti
- roztok nakápnut a vysušen (vykrystalizován) na MALDI destičce ve formě spotu
- pulsní ozáření směsných krystalů zábleskem laseru - prudké odpaření látek do vakua
- ionizovaná matrice strhne sebou analyt
- ionizace molekul analytu ion-molekulárními reakcemi s ionizovanou matricí
- ionty urychleny stejnosměrným elektrickým polem do TOF analyzátoru



α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid



3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamic acid



2,5-dihydroxybenzoic acid

Matrice

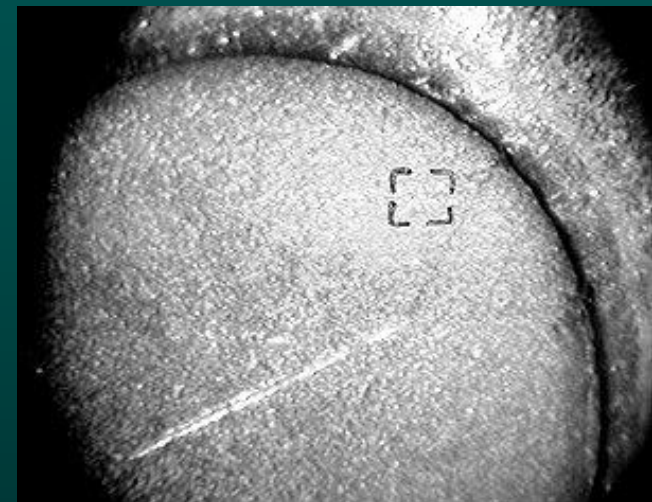
MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

- Velmi měkká, šetrná technika
 - i pro vysokomolekulární látky (proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy)

Spotovací destička



Spotovací destička na monitoru



Pozn.: Technika **SELDI** (Surface Enhanced Laser Desorption / Ionization)
- kombinace afinitního principu a ionizace MALDI

Ionizační techniky dle „tvrdosti“: ESI (nejšetrnější) < MALDI < CI < EI

TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby letu evakuovanou trubicí
 - rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti m/z
 - lehčí molekula letí rychleji

t...čas

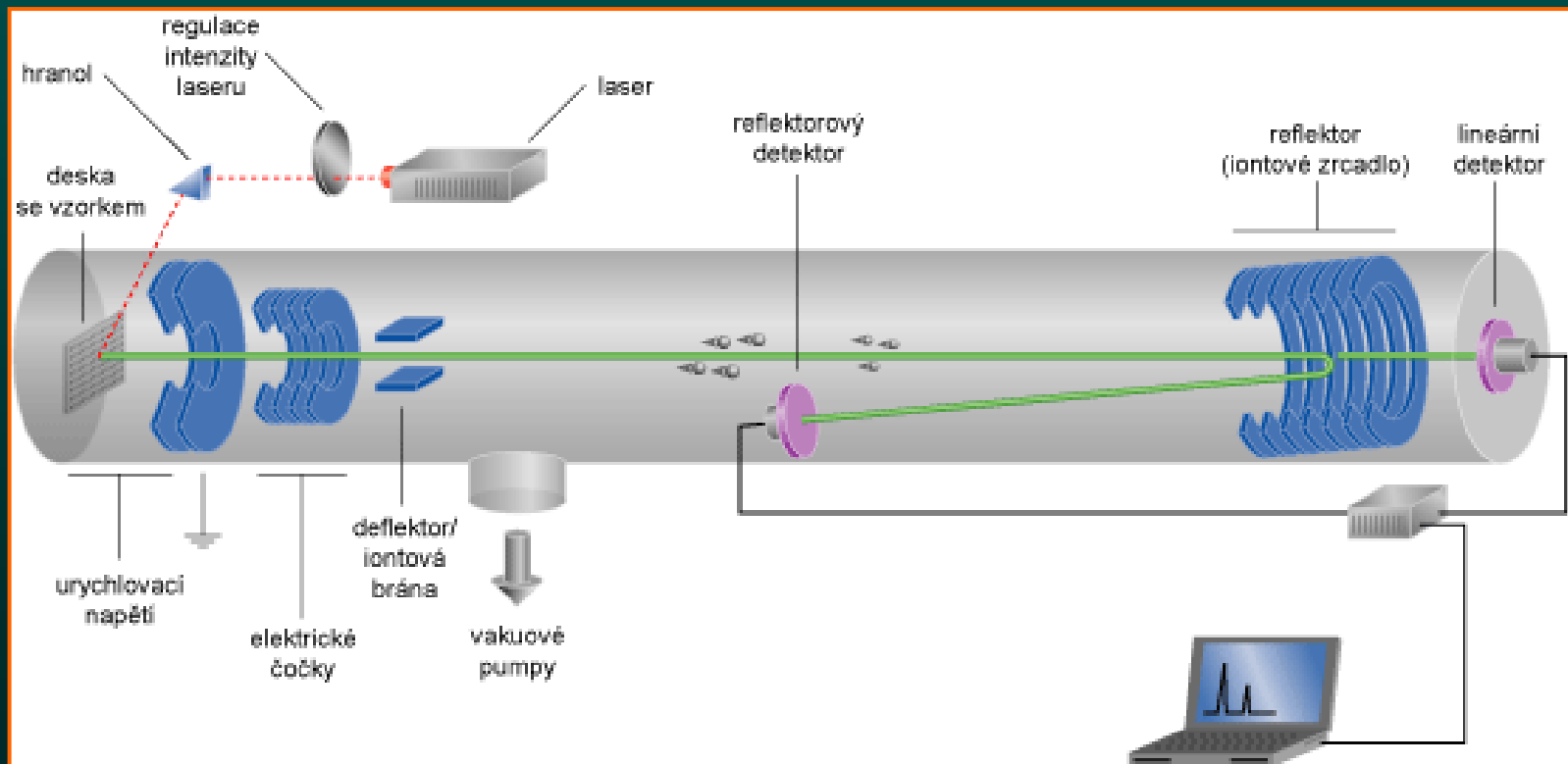
L...délka dráhy

m...hmotnost iontu

E...kinetická energie

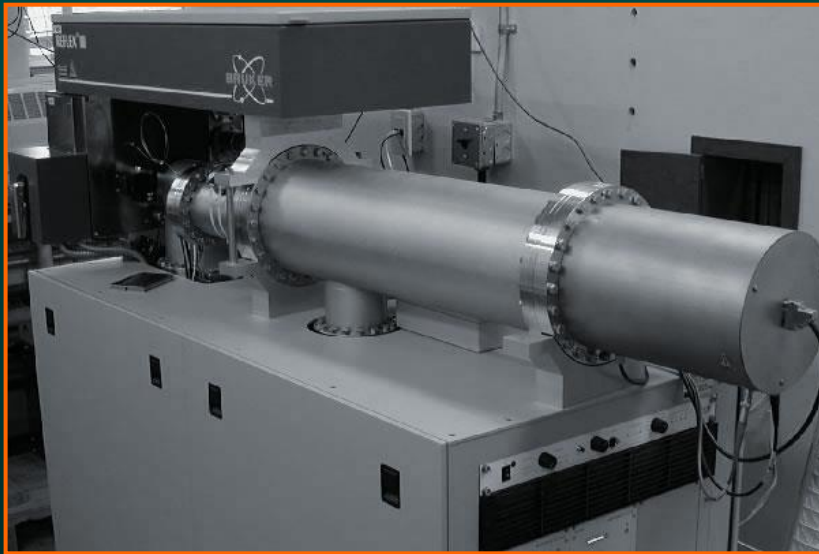
$$t = L \left(\frac{m}{2E} \right)^{1/2}$$

- lineární nebo reflektornový mód (reflektorn - vyšší rozlišovací schopnost)



TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- TOF teoreticky použitelný pro neomezený rozsah hmotností
 - v praxi se mu dává přednost pro velké molekuly
 - MALDI - TOF spektrometry - hlavně pro analýzu proteinů
 - molekuly s hmotností až 100 000 Da
 - TOF v kombinaci s EI nebo ESI - i pro menší molekuly, v jiném provedení



Bruker

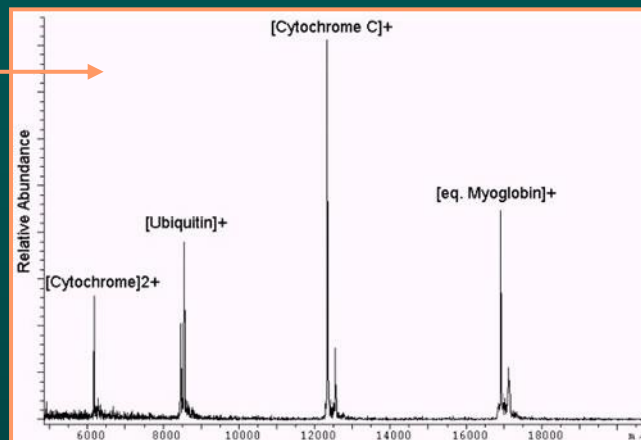


Agilent Technologies

Příklady použití - MALDI-TOF

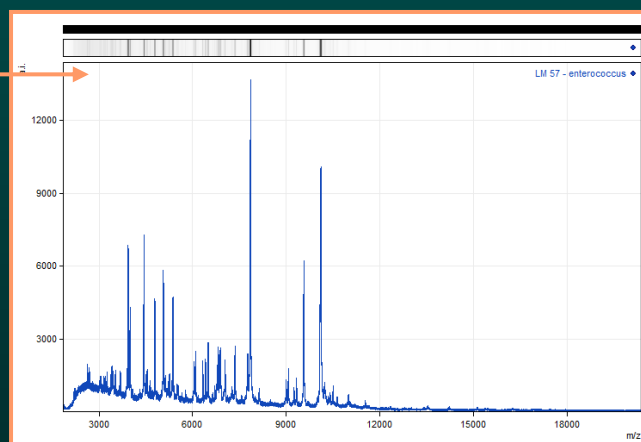
■ Analýza biomolekul

- proteiny
- peptidy
- oligosacharidy
- nukleotidy...

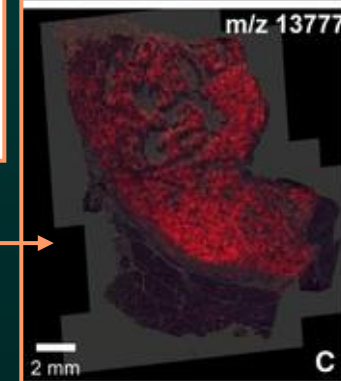
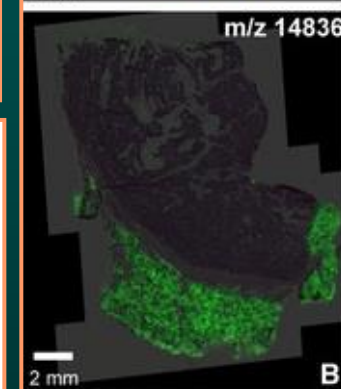
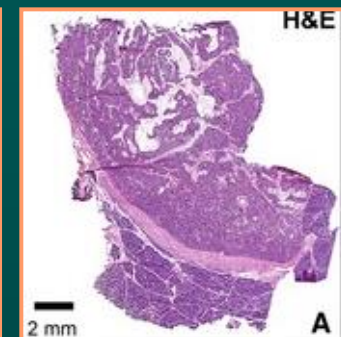


■ Identifikace mikroorganismů

po extrakci proteinů z bakterií nebo i metodou celých buněk



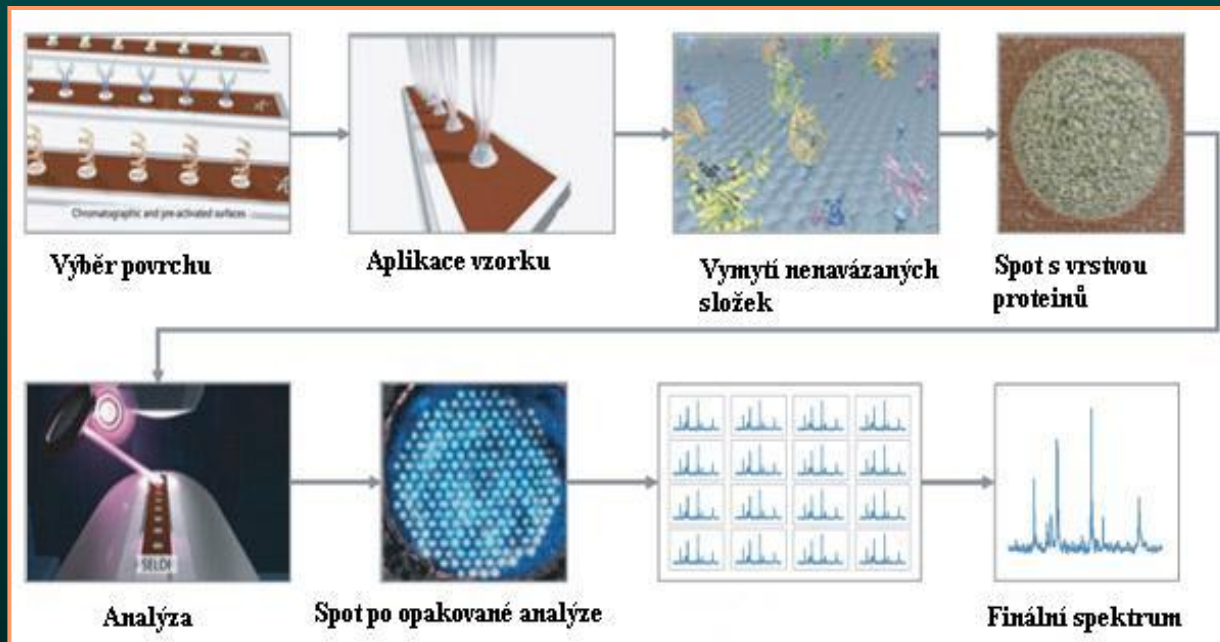
- MALDI - IMS (imaging mass spectrometry) zobrazení rozložení proteinů i nízkomolekulárních látek ve tkáních přímou „in-situ“ analýzou



SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

Analýza proteinů pomocí vazby na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu:

- kombinace afinitního principu a ionizace MALDI
- povrch čipu - tvořen protilátkou, receptorem, ligandem, chemickou úpravou...
- nanesení vzorku - navázání proteinů adsorpcí, el.-stat. interakcí, na afinitním principu,...
- promytí čipu - odstranění nenavázané složky
- Analýza – viz MALDI - TOF



- Vzorek - komplexní směs proteinů může být analyzován současně na několika různých sorbentech, aby byly navázané a analyzovány veškeré proteiny ve vzorku
- Čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka
- Technologie CIPHERGEN

Děkuji za pozornost...



*...ale i těm,
kteří se
nudili !*

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