HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

(High Performance Liquid Chromatography)

Lízalová Martina
LPVR - BFÚ, v.v.i.
26. 11. 2009

Chromatografie

- jedna z nejvýznamnějších moderních separačních analytických metod
- objevil ji botanik Cvet (v roce 1903 zveřejněna práce o separaci listových barviv na sloupci sorbentu)
- prudký rozvoj chromatografie nastal v 60. letech
- je separační metoda založena:
  - na různé distribuci jednotlivých složek mezi 2 fáze – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou)
  - na rychlosti pohybu jednotlivých složek v téže fázi

Rozdělení chromatografických technik

Chromatografie

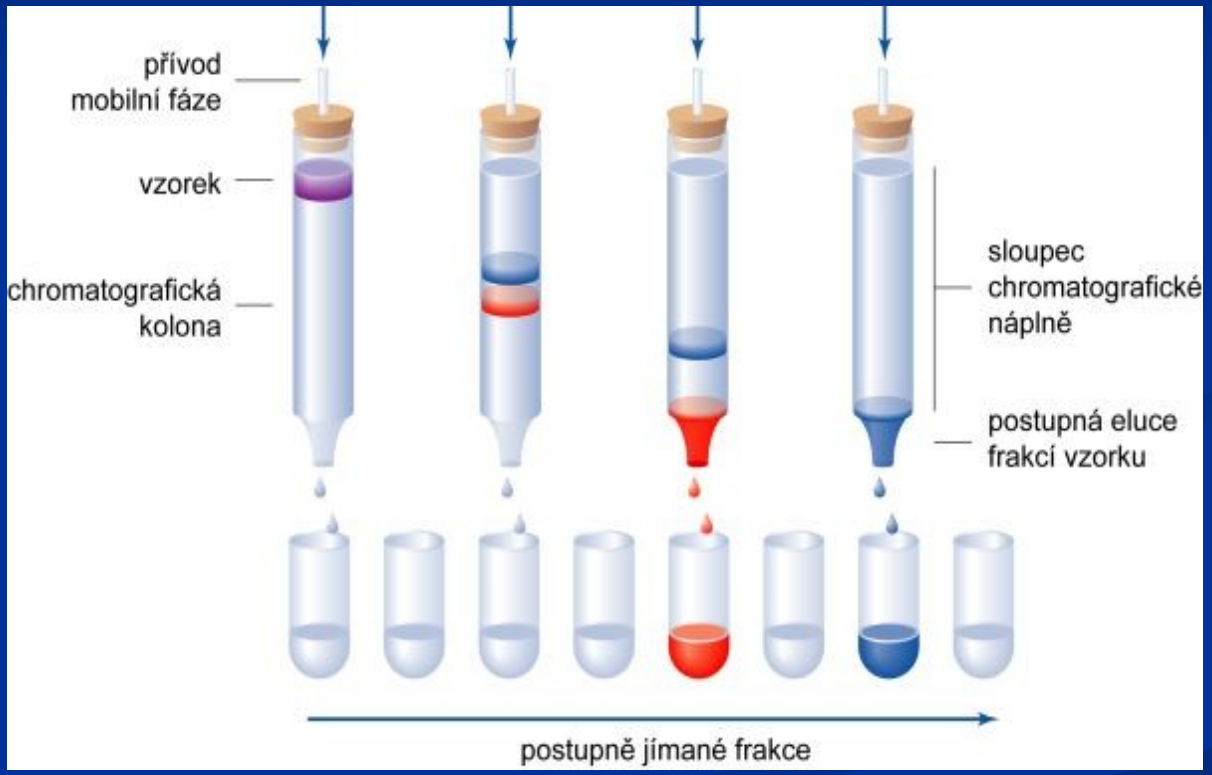
přehled nejdůležitějších technik

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografická technika	Symbol
Plyn (plynová chromatografie)	Kapalina	Plynová rozdělovací chrom.	GLC
	Tuhá látka	Plynová adsorpční chrom.	GSC
Kapalina (kapalinová chromatografie)	Kapalina	Kapalinová rozdělovací chrom.	LLC
		Gelová permeační chrom.	GPC
		Papírová rozdělovací chrom.	PC
		Tenkovrstvá rozdělovací chrom.	TLC
	Tuhá látka	Kapalinová adsorpční chrom.	LSC
		Tenkovrstvá adsorpční chrom.	TLC
		Iontově výměnná chrom.	IEC

Chromatografie

- *Mobilní fáze:* pohyblivá
- *Stacionární fáze:* nepohyblivá

- *Chromatografická kolona:*



- **v současné době se rozvoj chromatografických metod odehrává zejména v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie**

Kapalinová chromatografie
(Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC)

- **je založena na kontinuálním opakovaném ustavování rovnovážné distribuce (dělení) složek vzorku mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi:**
  - **Stacionární fáze – nepohyblivá (sorbent)**
  - **Mobilní fáze – pohyblivá (kapalina)**

- **Separované složky vzorku jsou vnášeny na začátek kolony do proudu mobilní fáze a opouštějí ji v pořadí, v jakém jsou v koloně zadržovány. Nejméně zadržované složky opouštějí kolonu jako první, nejvíce zadržované jako poslední. Mírou zadržení (retence) složky v chromatografické koloně je její retenční čas t_R.**

- **Rozdělené složky dále vstupují do detektoru, který poskytuje kvantifikovatelnou odezvu na konkrétní (charakteristickou) vlastnost separovaných složek – jako např.:**
  - **absorpce záření určité vlnové délky**
  - **vodivost**
  - **index lomu apod.**

Kapalinová chromatografie
(Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC)

- ***Mobilní fáze:*** **vícesložková (ACN, H_2O)**
  - ***Izokratická eluce:***
    - ✓ **složení mobilní fáze je po celou dobu analýzy konstantní**
  - ***Gradientová eluce:***
    - ✓ **složení mobilní fáze se mění s časem**
    - ✓ **vznik koncentračního gradientu mobilní fáze => pozitiva:**
      - ✓ **zlepšuje rozdělení složitějších směsí**
      - ✓ **krátí čas analýzy**
      - ✓ **zvyšuje citlivost**

Kapalinová chromatografie
Základní aplikace metody HPLC

- separace, identifikace a stanovení látek ve směsích
  - *Stanovení:* organických kyselin, polyaromatických uhlovodíků, bílkovin, sacharidů, vitamínů, léčiv a různých metabolitů
- kvantitativní analýza látek ve směsi
- kontrola čistoty preparátů
- čistění a mikropreparace látek
- kontrola surovin, výrobních meziproduktů a produktů
- kontrola životního prostředí (pesticidy v ekosystémech, potravinách, krmivech)
- klinická a toxikologická analýza (hormony, léčiva, metabolity v tělních tekutinách)
- kontrola potravinářských produktů
- biologické a biochemické aplikace (analýza bílkovin a nukleových kyselin)
- zemědělské aplikace (sledování migrace herbicidů v půdě)

Kapalinový chromatograf (Agilent Technologies 1100)

Kabinet (rezervoár mobilní fáze)

Vakuová odplyňovací jednotka (degasér, odplyňovač s pumpou)

Kvartérní čerpadlo

Dávkovač (injektor) vzorku

Termostatované oddělení kolon

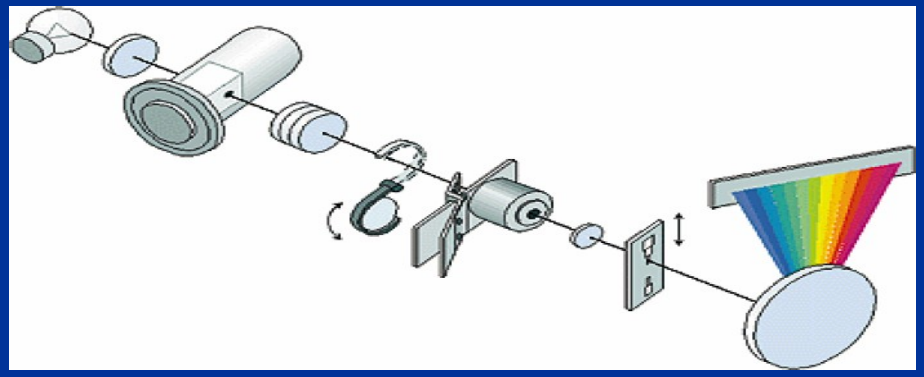
Detektor DAD

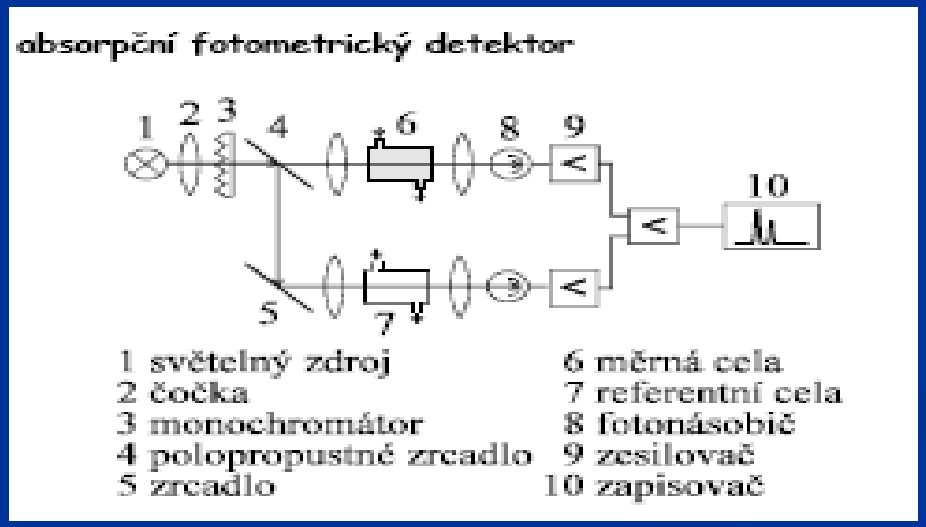
Kapalinový chromatograf (Agilent Technologies 1100)

Detektor DAD (Diode – Array):

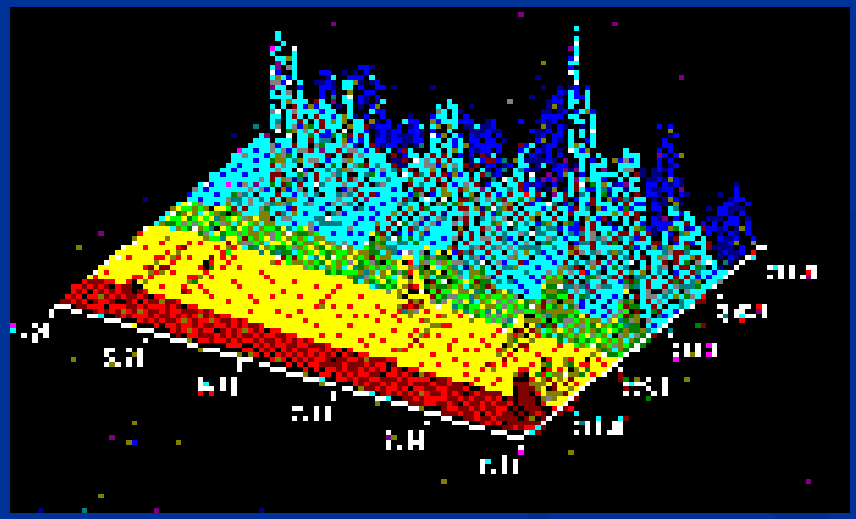
- **spektrofotometrický UV-VIS detektor – měří se absorbance; kontinuálně sleduje celé spektrum UV-VIS v rozmezí vlnových délek: 190 – 950 nm (deuteriová lampa) a umožňuje tvorbu 3D chromatogramů**

Schéma DAD:





3D chromatogram:

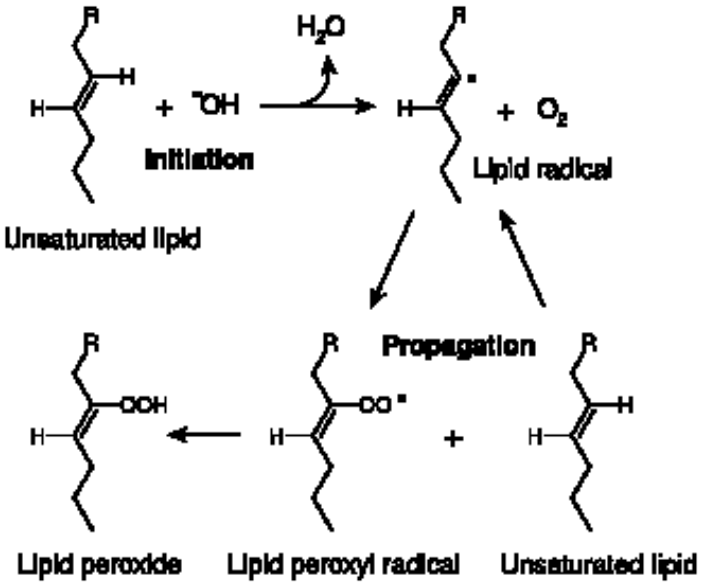


Náplň naší práce – stanovení MDA a 4-HNE na HPLC

- *Produkty poškození volnými radikály:*

✓ Volné radikály mohou reagovat s různými makromolekulami buňky, jako je DNA, buněčné membrány nebo proteiny, což může vést ke tvorbě dalších produktů (De Zwart et al. 1998).

- *Lipidová peroxidace:*



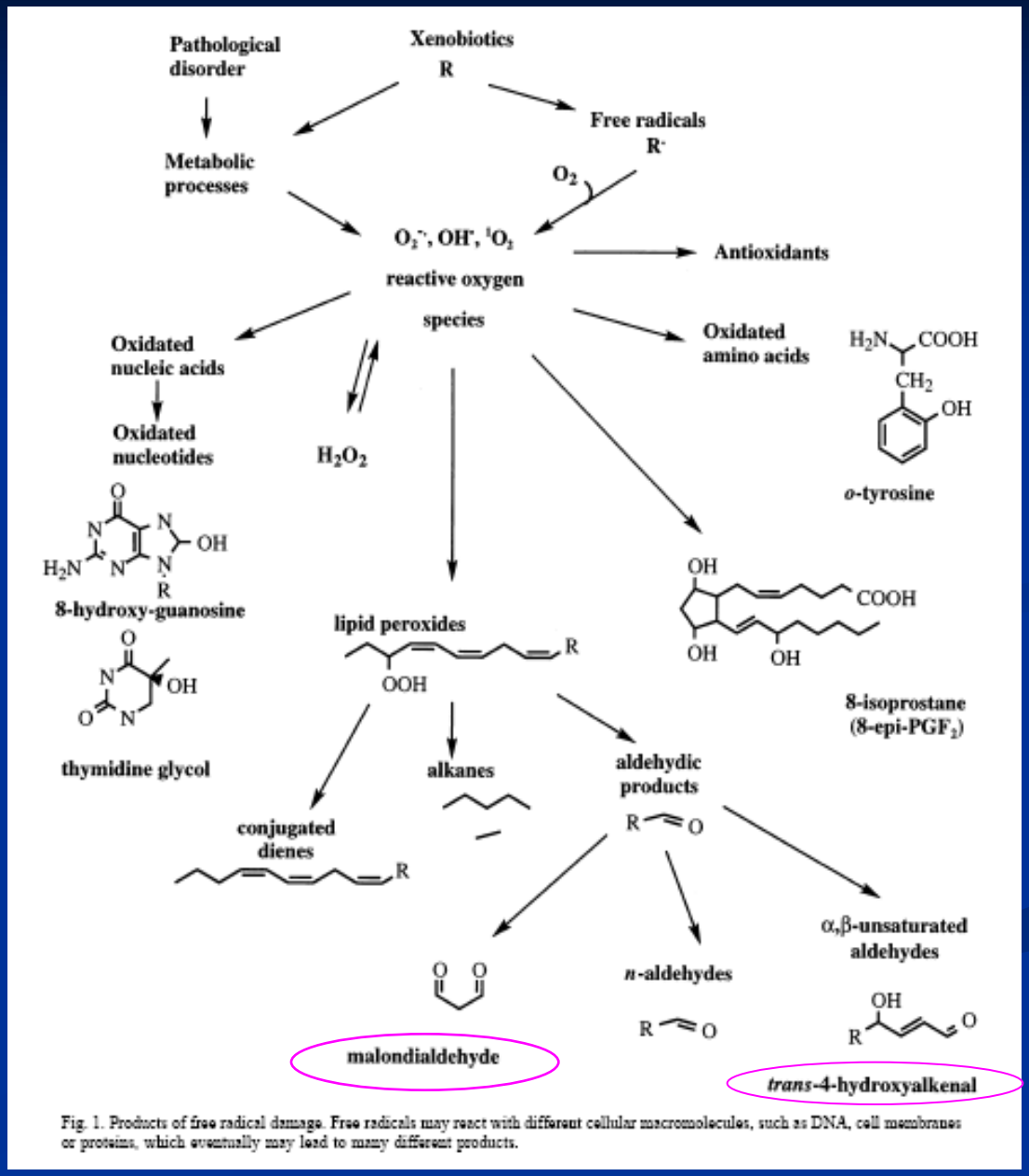
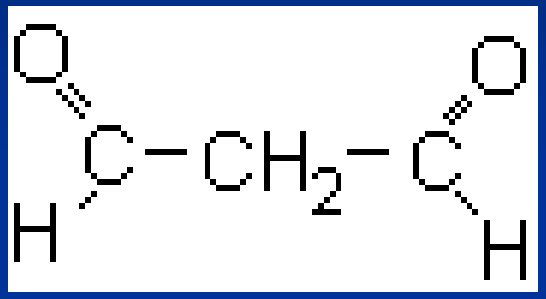


Fig. 1. Products of free radical damage. Free radicals may react with different cellular macromolecules, such as DNA, cell membranes or proteins, which eventually may lead to many different products.

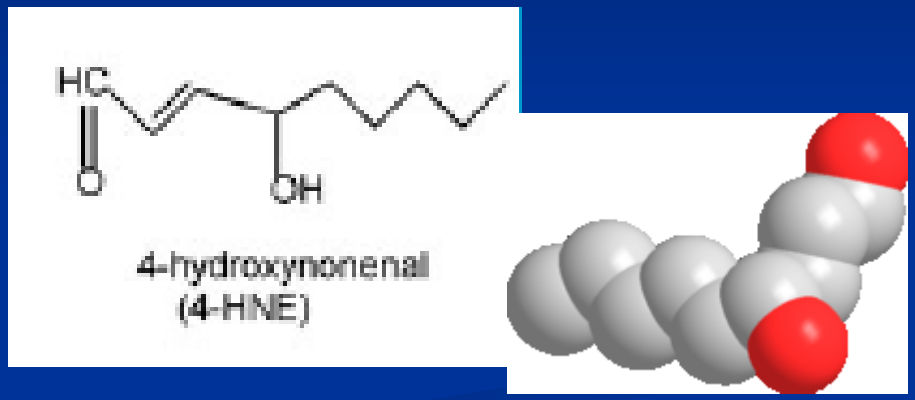
Přehled stanovovaných látek a vstupujících reaktantů

- **MDA (Malondialdehyd):**



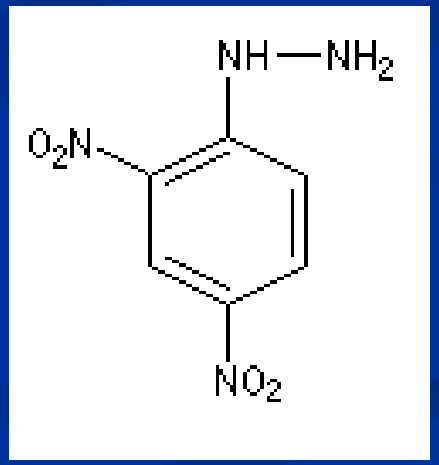
  - ✓ 1,3 - propandialdehyd

- **4 – HNE (4-hydroxynonenal):**



- **2 – TBA:**

- **DNPH:**



Podmínky separace MDA na HPLC

- ✓ **izokratická eluce**
- ✓ **složení mobilní fáze: ACN : H_2O (40% : 60%)**
  - voda okyselena => 0,2% vodný roztok CH_3COOH
- ✓ **průtok mobilní fáze: 1 ml/min**
- ✓ **dávkovaný objem: 100 µl vzorku**
- ✓ **detekce: 310 nm (absorpční maximum MDA)**

Podmínky separace 4-HNE na HPLC

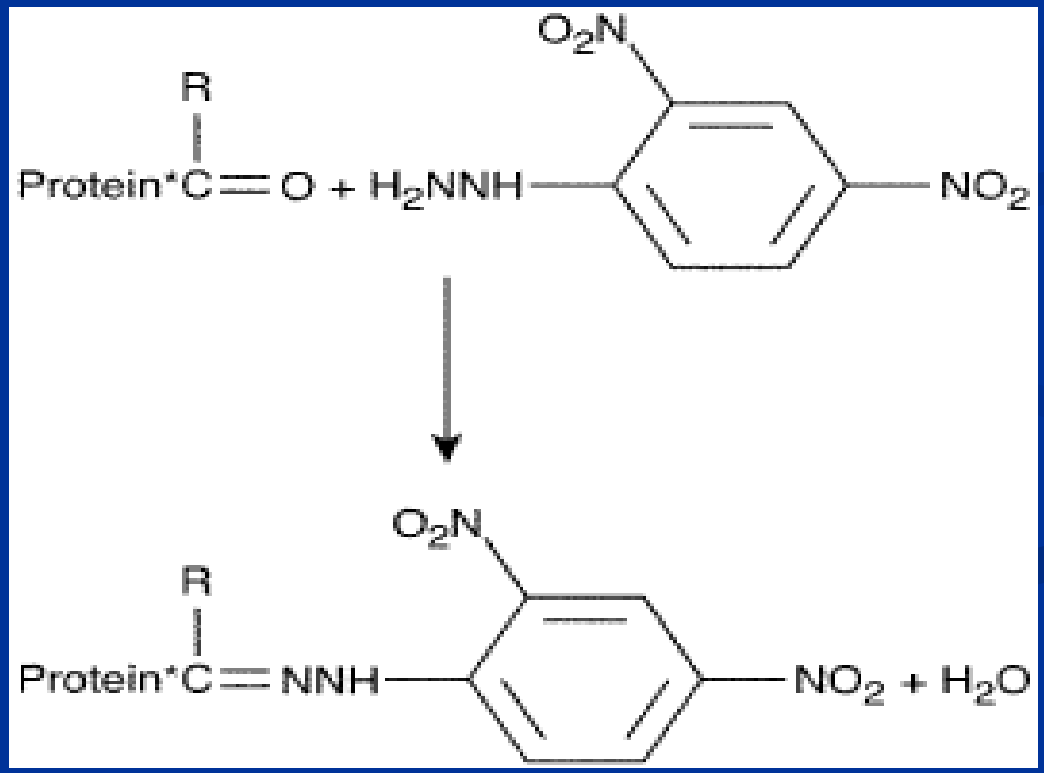
- ✓ **gradientová eluce:**
- ✓ **složení mobilní fáze ACN : H_2O (50% : 50%)**
  - voda okyselena => 0,2% vodný roztok CH_3COOH
- ✓ **průtok mobilní fáze: 1 ml/min**
- ✓ **dávkovaný objem: 100 µl vzorku**
- ✓ **detekce: 350 nm (absorpční maximum 4-HNE)**

Společné podmínky separace

- *Předkolona:* **Varian Inc., MetaGuard tloušťka 4,6 mm, Polaris 5u C18 - A**
- *Kolona:* **Agilent C18, Ø 5 µm, 4,6 x 150 mm**

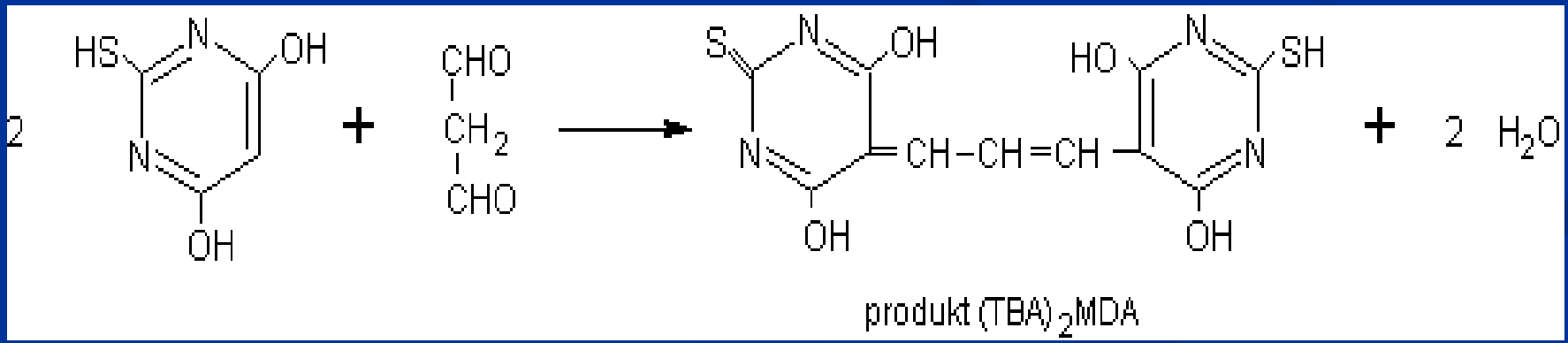
Náplň naší práce – stanovení MDA a 4-HNE

- ***Metodika stanovení MDA i 4-HNE pro HPLC:***
  - **lidské krevní sérum => deproteinováno 15% TCA a hydrolyzováno 0,25 N HCl**
    - **40 min ve vodní lázni při t = 60^{0}C**
    - **centrifugace: 3 000 ot/min; 10 min; t = 4^{0}C**
  - **reakce supernatantu s DNPH**
    - **45 min v temnu při laboratorní teplotě**
  - ***Příslušná reakce :***



Spektrofotometrické stanovení MDA vs. HPLC

- ***Metodika stanovení MDA reakcí s kyselinou thibarbiturovou (TBA):***
  - **reakce s TBA je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod pro stanovení lipidové peroxidace v buňkách (LP mastných kyselin, membrán a potravin => nejkritizovanější)**
    - **principem je vznik barevného produktu, který je spektrofotometricky stanoven a který absorbuje záření při vlnové délce 532 nm**
  - ***Příslušná reakce MDA s kyselinou thiobarbiturovou:***



Porovnání stanovení MDA reakcí s TBA vs. HPLC

- *Koncentrace MDA stanovené HPLC:*
  - **Neřízená peroxidace:** 1 nmol/ml
  - **Řízená peroxidace:** 1,1 nmol/ml
- *Koncentrace MDA stanovené reakcí s kyselinou thiobarbiturovou:*
  - **Neřízená peroxidace:** 2,14 nmol/ml
  - **Řízená peroxidace:** 3,18 nmol/ml

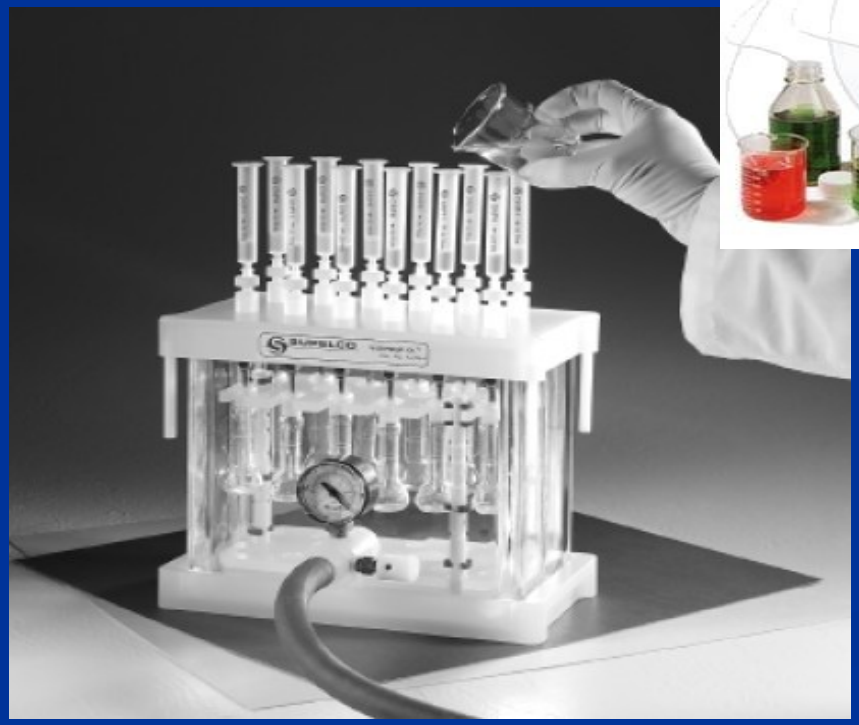
✓ **Stanovení MDA prostřednictvím HPLC (reakce séra resp. MDA s DNPH) je specifičtější metoda, neboť se stanovuje jednoznačně pouze MDA. Zatímco vzniklé barevné produkty $(TBA)_2MDA$ vykazují 2-3x vyšší koncentrace => je zřejmé, že TBA reaguje nekontrolovaně s množstvím aldehydických skupin a ne pouze s MDA.**

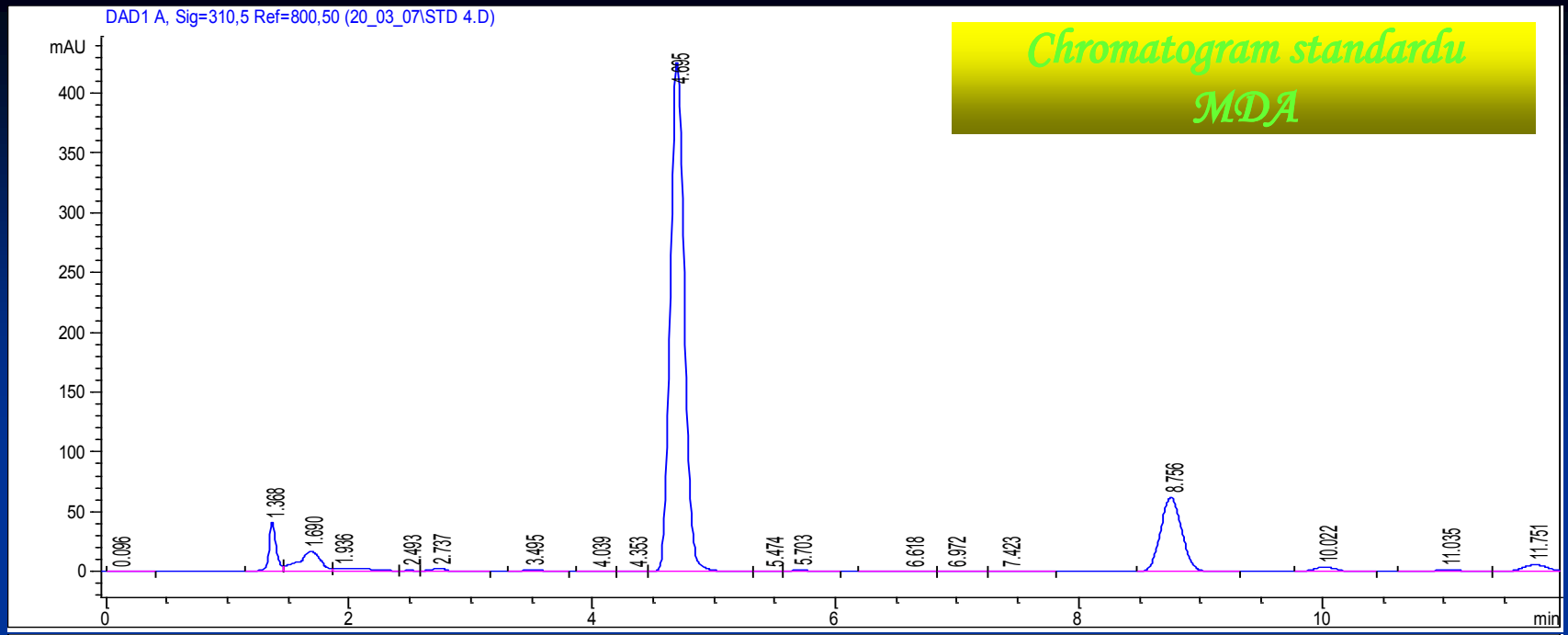
SPE – Solide Phase Extraction

- extrakce na tuhou fázi = technika přípravy vzorku => neustále roste její význam!
- principem je sorbce stanovovaného analytu na tuhou fázi (příslušný sorbent v kolonce) z fáze kapalné (organická rozpouštědla např. MeOH, ACN…)
- *její přednosti a použití:*
  - ✓ *zakoncentrování vzorku*
  - ✓ *odstranění nežádoucích látek => přečištění vzorku*
  - ✓ *izolace stanovovaného analytu ze vzorku*

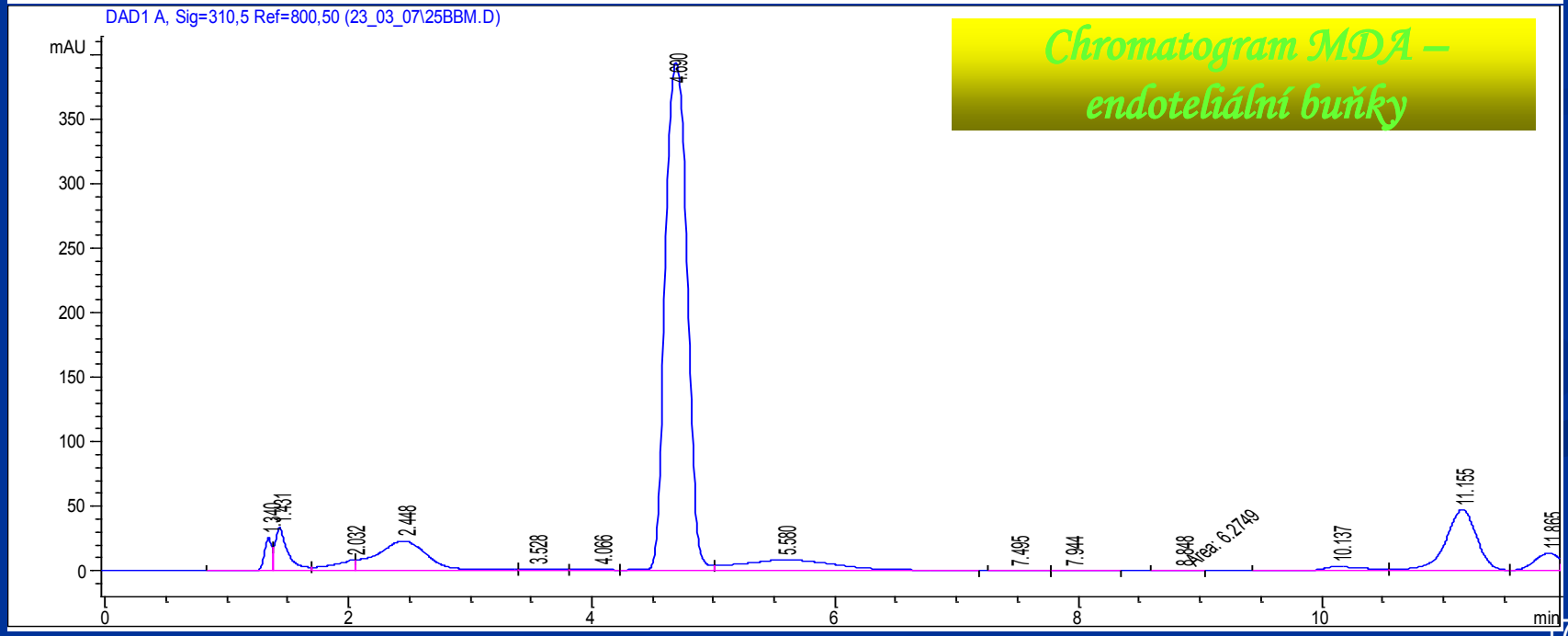
- *SPE kolonky:*

- *Supelco pro SPE:*

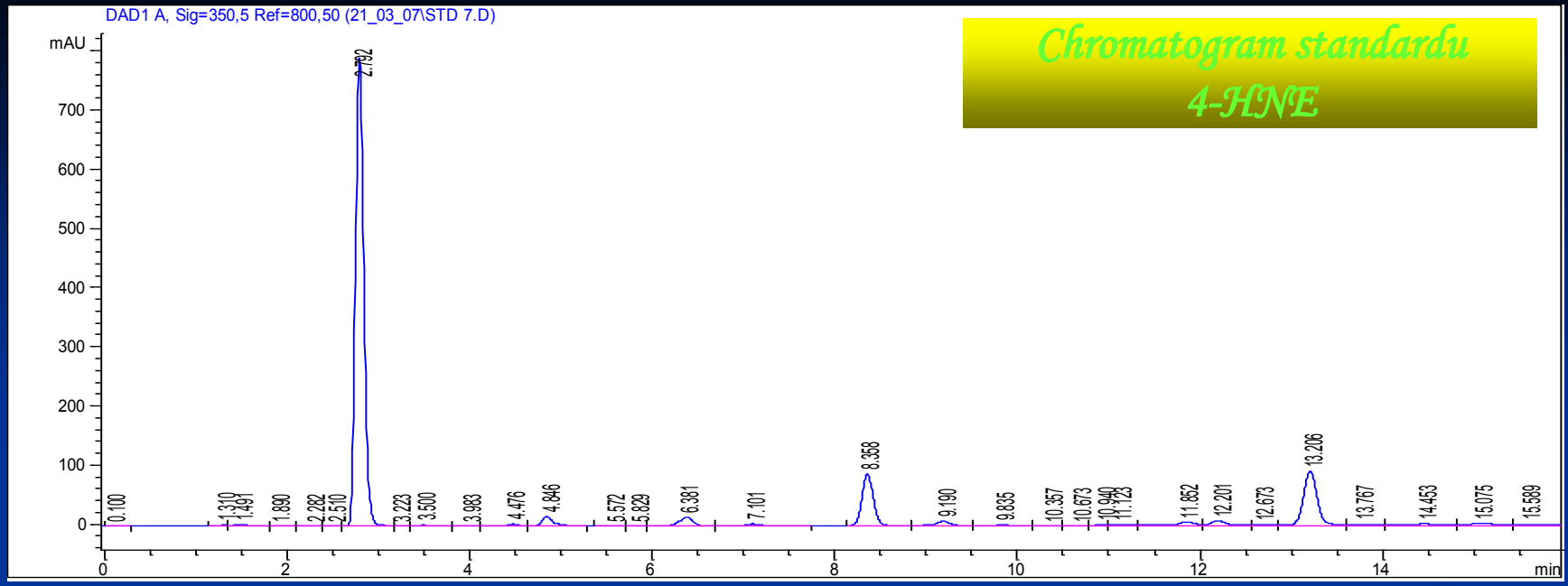


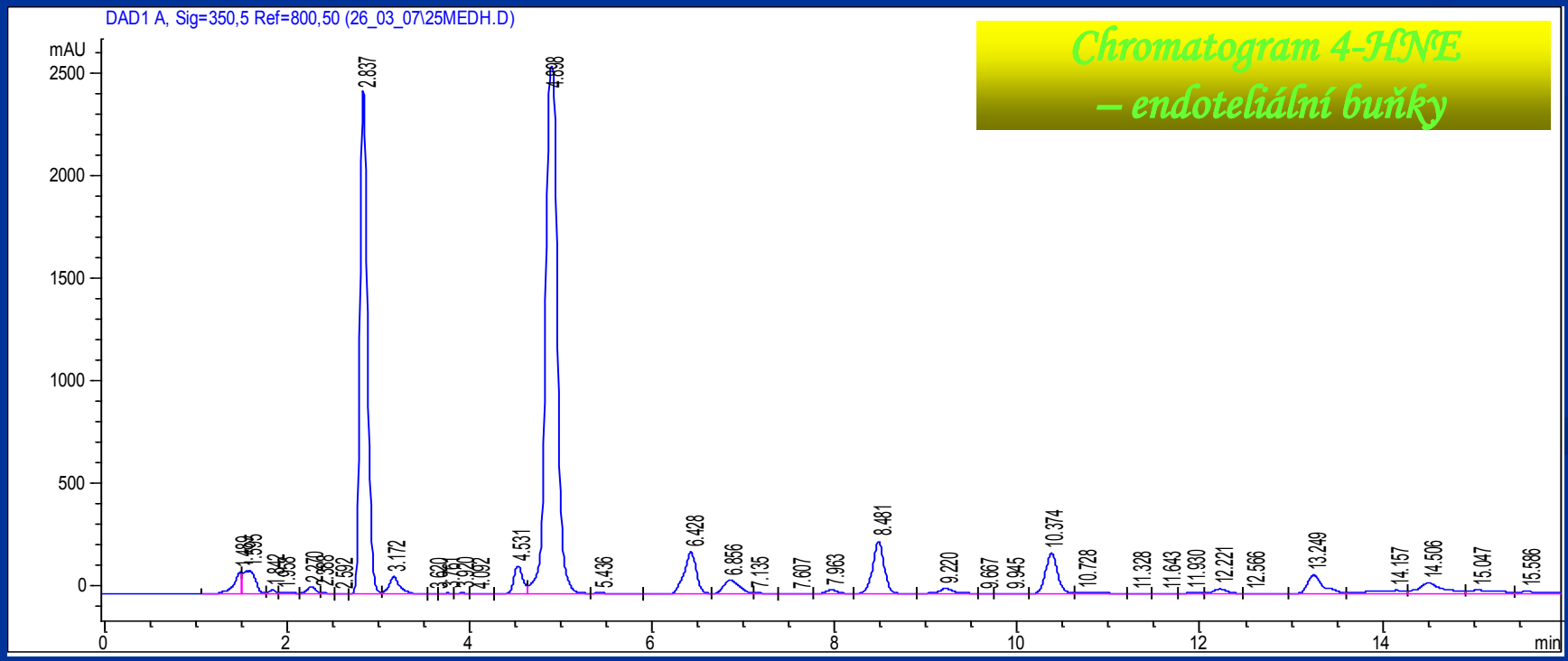


Chromatogram standardu MDA



Chromatogram MDA – endoteliální buňky


DAD1 A, Sig=350,5 Ref=800,50 (21_03_07\STD 7.D)
mAU
min
Chromatogram standardu 4-HNE


DAD1 A, Sig=350,5 Ref=800,50 (26_03_07\25MEDH.D)
mAU
min
Chromatogram 4-HNE – endoteliální buňky

ELISA
(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- ✓ **někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay)**
- ✓ **je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek**
- ✓ **metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen**
- ✓ **ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů:**
  - o **schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu)**
  - o **schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty (viz. protilátka) imunoglobulinových molekul**

❖ **Protilátka (imunoglobulin) je protein, který je schopen jako součást imunitního systému identifikovat a zneškodnit cizí objekty (bakterie a viry) v těle. Protilátky jsou nositeli humorální imunity.**

ELISA

(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- **Pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu:**
  - **Přímá ELISA - pro detekci antigenu**
  - **Nepřímá ELISA - pro detekci specifických protilátek**
  - **Přímá sendvičová ELISA - pro detekci antigenu**
  - **Nepřímá sendvičová ELISA - pro detekci specifických protilátek**

Základní složky ELISA testu

1. Antigen:

- detekovaný v testovaném vzorku
- známý, komerčně připravovaný

2. Protilátka:

- detekovaná v testovaném séru
- známá, komerčně připravovaná

3. Konjugát:

- jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA, viz protilátka), na kterou je navázaný enzym (konjugovaná enzymem)

4. Substrát:

- je chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změní svou barvu

Praktické použití ELISA testu

- Metody ELISA se využívají k diagnostice infekčních nemocí člověka a zvířat.
- Stanovují se buď protilátky proti konkrétnímu patogenu nebo se detekují přímo prionové, virové, bakteriální, parazitární antigeny.
- Dále se používají k detekci některých toxinů, hormonů, celé řady proteinů, případně dalších bioaktivních látek.

Děkuji za pozornost.