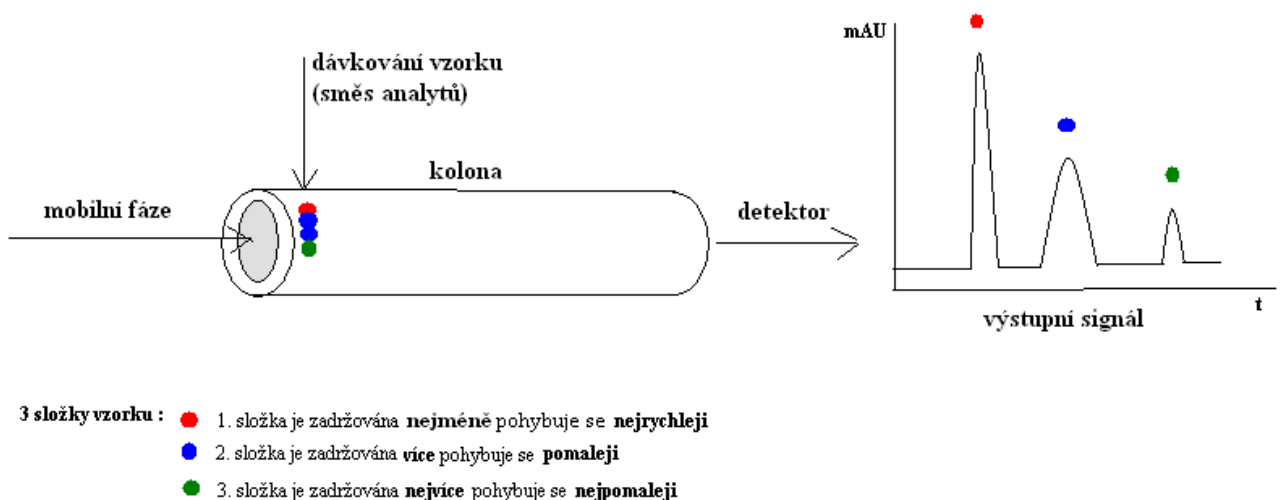


**MONOLITICKÉ KAPILÁRNÍ KOLONY PRO SEPARACE**  
**BIOLOGICKÝCH VZORKŮ**

# 1. Teorie k cvičení

## *Kapalinová chromatografie na reverzní fázi*

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze je vázána na povrchu porézních částic nebo monolitů, kterými jsou plněny kolony. Monolity jsou separační média, tvořená jediným kusem pórovitého materiálu (má odpovídající chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti), která zcela svým tvarem a objemem zaplňují vnitřek separační kolony. Monolity neobsahují mezičásticové prostory, proto veškerá mobilní fáze protéká póry monolitu [1-4]. Chromatografie na reverzních fázích využívá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Jednotlivé složky vzorku (analytu) se dělí mezi tyto dvě fáze na základě odlišné rozpustnosti (rozdělovací chromatografie). Dalším mechanismem, který se uplatňuje v kapalinové chromatografii je adsorpce [5,6]. Princip chromatografie je znázorněn na obrázku 1. Dnes se při separacích nejvíce využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography).

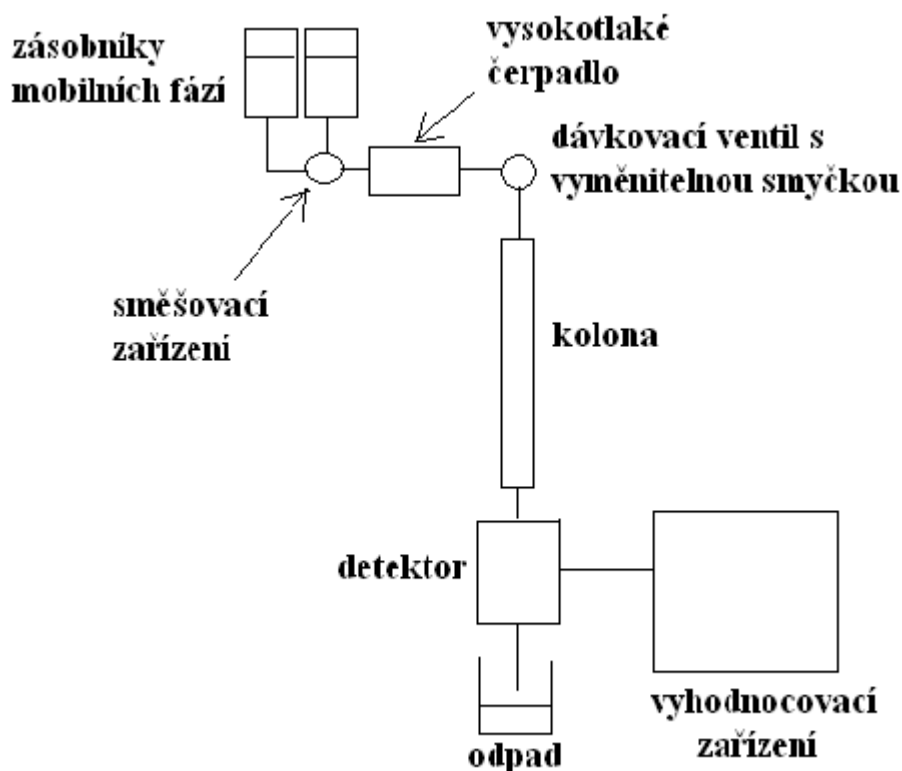


Obrázek 1 Schéma principu chromatografie

Základní části aparatury pro kapalinovou chromatografii:

- čerpadlo (pístové, membránové)
- směšovací zařízení – zajišťuje složení mobilní fáze
- dávkovací zařízení (injekční stříkačka, dávkovací ventil)
- kolona – různá délka, vnitřní průměr, náplně
- detektor (UV-VIS, fluorescenční)

Uspořádání je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2 Schéma zařízení pro vysoce účinnou kapilární chromatografii

## 2. Zadání úlohy

Vzhledem k vysoké pořizovací ceně komerčních kolon a HPLC systémů je pro manipulaci a analýzu biologických vzorků, např. bakteriálních lyzátů, ekonomicky výhodnější použít laboratorně připravené monolitické kapilární kolony. Ty jsou zapojené do jednoduchého experimentálního uspořádání (viz. obr. 3), jehož součástí je mikrostríkačka sloužící jako generátor gradientu. Další výhodou tohoto uspořádání je nižší spotřeba mobilní fáze, než je tomu u komerčních systémů (70  $\mu$ l na analýzu). To je dáno menším objemem vyrobené kolony a použitím mikrostríkačky. Délka, průměr i náplň kolon jsou značně variabilní. Každý pracovník si je volí podle svého uvážení. Pokud je námi připravená kolona nevratně poškozena nebo je-li kolona příliš znečištěna, může být bez velké ekonomické ztráty vyhozena a vyrobená nová. To je výhodné pro separace komplexních biologických vzorků.

Cílem úlohy je separace tryptického digestu hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin BSA) na koloně C<sub>12</sub> (délka 30 mm, průměr 0,32 mm). BSA je jeden z mnoha albuminů, proteinů krevního séra. Je jedním ze základních proteinů používaných při mnoha experimentech. Použitím BSA se zjistí, zda je správně namíchán gradient v mikrostříkačce a zda kolona správně separuje.

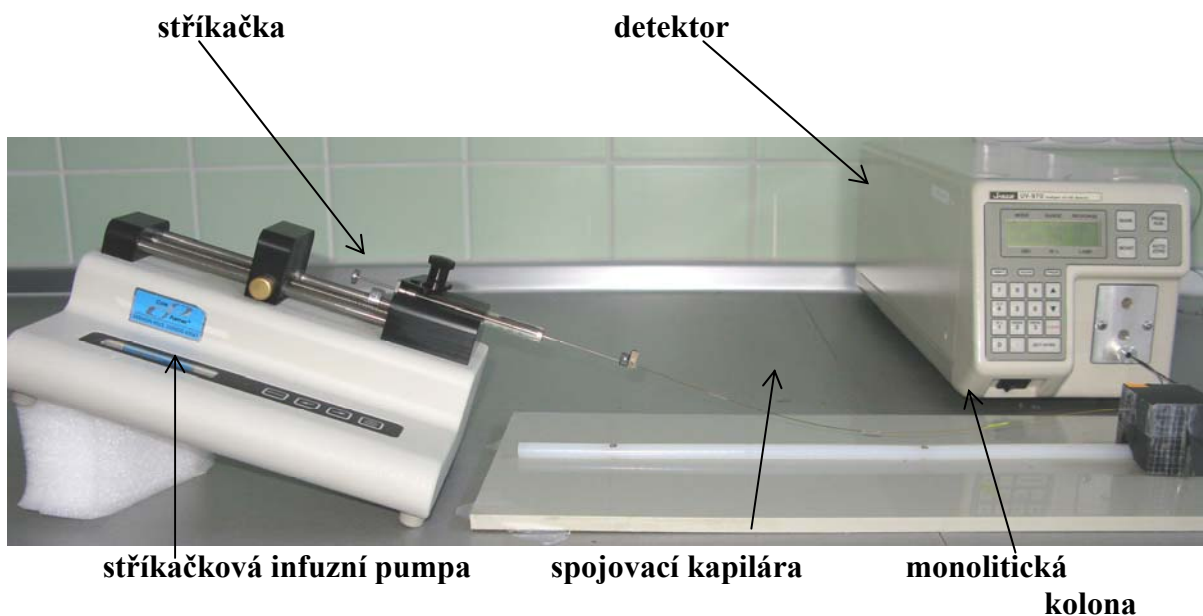
### ***2.1. Přístrojová technika***

- stříkačková infúzní pumpa (lineární dávkovač) od firmy Cole-Parmer; Vernon Hills, Illinois USA
- UV/VIS detektor UV-790 od firmy Jasco; Hachioji, Tokio, Japonsko
- ultrazvuk Bandelin SONOREX<sup>®</sup> Digital 10 P Ultrasonic baths od firmy BANDELIN electronic; Berlín, Německo
- třepačka TTS 3 digital yellow line od firmy IMLAB; Boutersem, Belgie

### ***2.2. Experimentální uspořádání***

- stříkačková infuzní pumpa (lineární dávkovač)
- mikrostříkačka (objem mikrostříkačky 100 µl)
- teflonové spojky 1/16<sup>˚</sup> (1 palec = 25,4 mm) x 0,25 mm; spojovací kousky
- křemenná kapilární dávkovací smyčka; délka koresponduje s objemem dávkovaného vzorku 2 µl + 0,5 cm křemenné kapiláry navíc, abychom měli jistotu, že se vzorek nedostane do stříkačky
- křemenná kapilára plněná monolitem pro odsolení, zakoncentrování a separaci biologických vzorků
- UV detektor

Experimentální uspořádání je na obrázku 3.



Obrázek 3 Experimentální sestava pro analýzu

### **2.3. Pomůcky a chemikálie**

- acetonitril
- tryptický digest BSA
- redestilovaná voda
- isopropanol
- trifluoroctová kyselina
- špičky, pipety, vialky eppendorf, vialky, mikrostříkačky, teflonové spojky, křemenné kapiláry potažené polyimidem

### **2.4. Příprava roztoků**

#### Příprava mobilních fází

Pro eluci je nutné připravit mobilní fáze, ze kterých se bude tvořit gradient. Složení mobilních fází je uvedeno v tabulce 2. Součástí mobilních fází je i kys. trifluorocotvá. Její přítomnost je potřebná pro dobrou eluci, protože:

- zlepšuje tvar piků a rozlišení separovaných látek (potlačuje ionizaci karboxyl. skupin)
- má nízkou absorpci při použitých vlnových délkách

Každý roztok připravte do samostatné vialky. Nezapomeňte si vialky řádně označit.

Připravte roztoky podle tabulky 2, která je uvedena níže. Roztoky krátce protřepete na třepače nebo dobře promíchejte. Z každého roztoku odpipetujte 3  $\mu$ l a přidejte zpět stejné množství kys. trifluoroctové. Vzniklý roztok nechte 10 minut odvzdušňovat v ultrazvuku.

	acetonitril (ml)	voda (ml)	TFA ( $\mu$ l)
0 %	----	3	3
10 %	0,3	2,7	3
20 %	0,6	2,4	3
40 %	1,2	1,8	3
60 %	1,8	1,2	3


Tabulka 2 Složení mobilních fází


### **2.5. Příprava vzorků**


Trypsinem naštípané BSA rozpuštěné ve vodě s přidavkem TFA dostanete od vedoucího cvičení. Nechejte jej rozmrazit a ihned poté jej použijte k dávkování

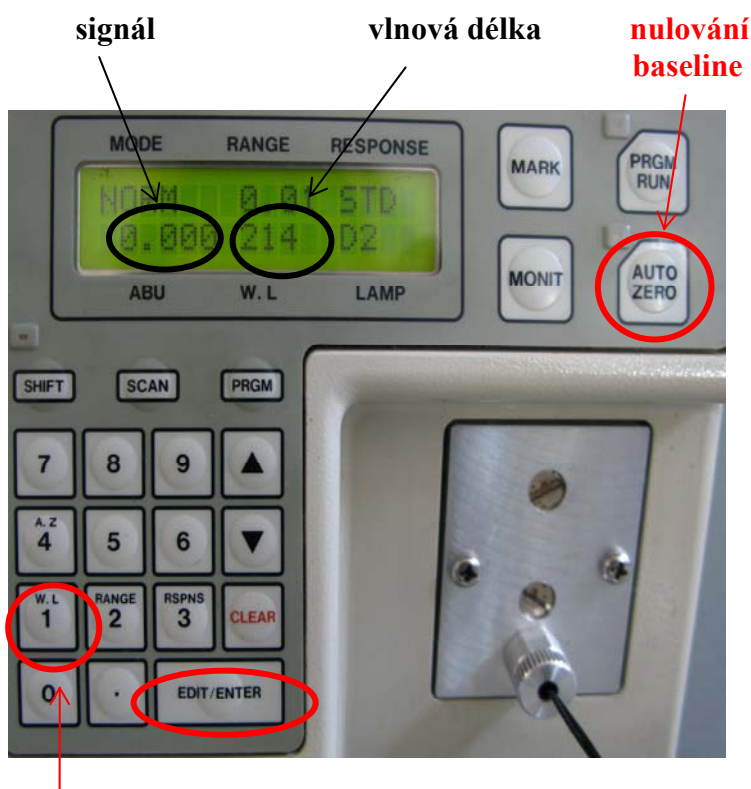
### **2.6. Vlastní analýza**

K eluci použijte gradient acetonitrilu (A) ve vodě (B) s 0,1 v/v % kys. trifluoroctové. Připravte si smyčku a teflonové spojky. Objem smyčky musí být nejméně 2  $\mu$ l, aby se dávkovaný vzorek analytu nedostal do stříkačky. Kolonu potřebnou pro analýzu dostanete od vedoucího cvičení. Zkraťte ji na délku maximálně 40 mm. Sestavte aparaturu podle obrázku

3. Na detektoru nastavte vlnovou délku 214 nm, zmáčkněte tlačítko , navolte hodnotu a poté zmáčkněte enter (viz obrázek 4). Na pumpě zvolte program pro stříkačku, kterou budete

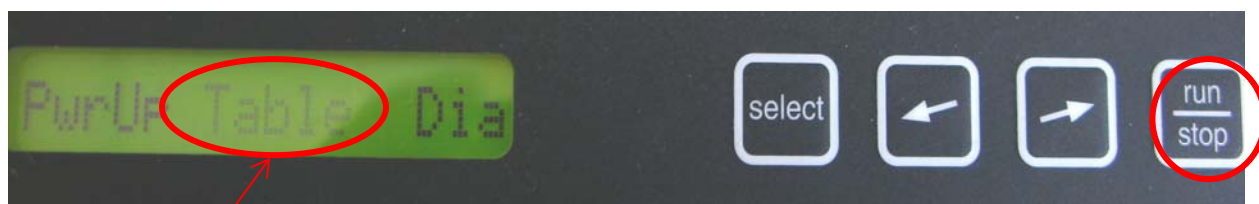
používat (SGE nebo Hamilton), zmáčkněte tlačítko select , pohybem šipky zvolte nápis TABLE a vyberte příslušný druh stříkačky (viz. obrázek 5a). Opět zmáčkněte tlačítko select a tentokrát vyberte nápis VOL pro nastavení objemu a RATE pro nastavení průtoku (viz. obrázek 5b). Do stříkačky naberte vodu s 0,1% v/v TFA. Stříkačku umístěte do pumpy. Spusťte program Clarity. Z nabídky si zvolte instrument 1. Klikněte na ikonu stříkačky (viz. obrázek 6a) a pojmenujte analýzu (viz. obrázek 6b). Poté klikněte na ikonu obrazovky (viz. obrázek 6a). Otevře se okno se záznamem analýzy. Zapijte připravenou kolonu do aparatury

a zapněte pumpu tlačítkem . Nechte aparaturu promývat (cca 3x objem kolony), dokud na obrazovce počítače nevidíte rovnou čáru. Pokud není odezva signálu na nule, vynulujte detektor (viz. obrázek 4). Zastavte pumpu a do stříkačky přes kapiláru naberte gradient: 40  $\mu$ l 60% A, 10  $\mu$ l 40% A, 10  $\mu$ l 20%, 10  $\mu$ l 0% a nakonec 2  $\mu$ l A v B. V dialogovém okně pojmenujte analýzu. Zapojte aparaturu a spusťte analýzu kliknutím na příslušnou ikonu (viz. obrázek 7a). Po skončení gradientu analýzu stopněte (viz. obrázek 7b), tím dojde k jejímu uložení.



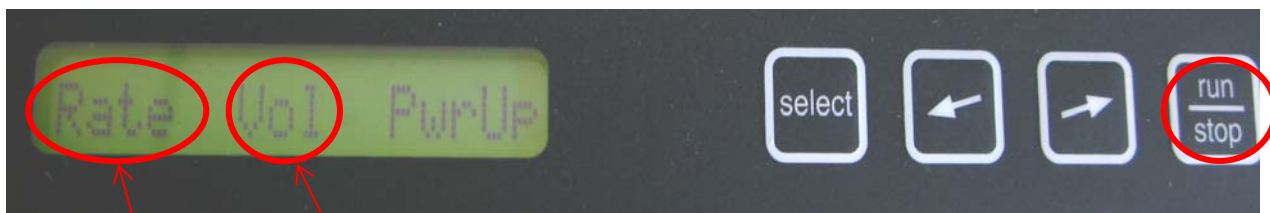
**změna vlnové délky**

Obrázek 4 Detail detektoru



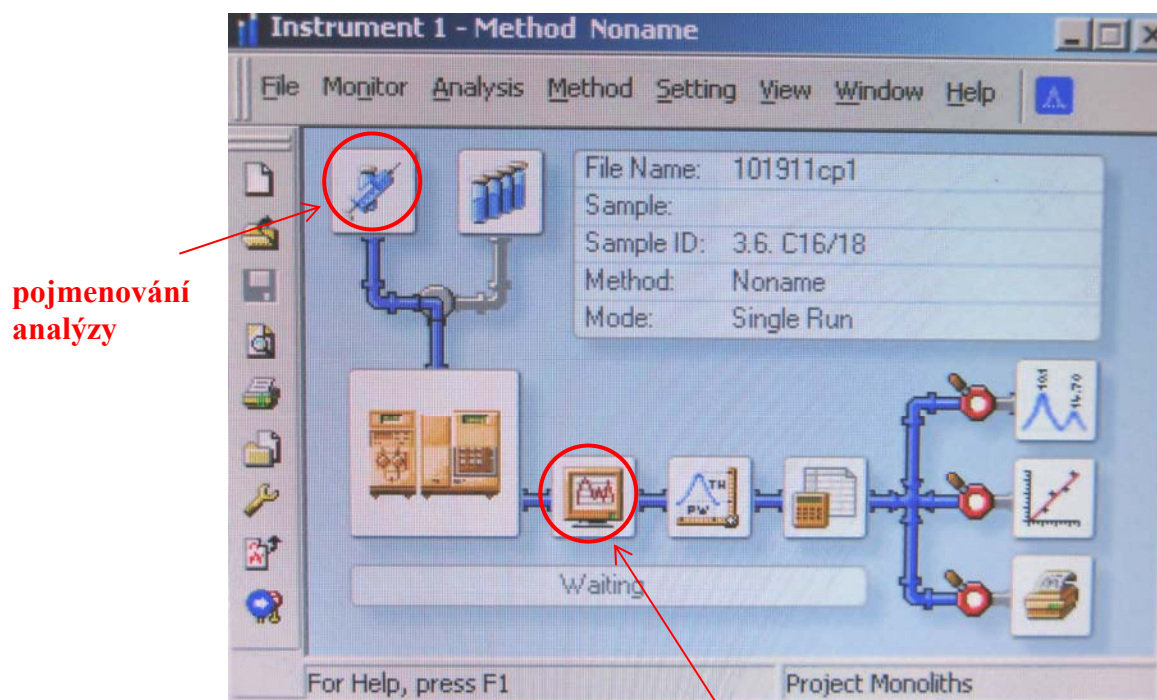
**výběr druhu stříkačky**

Obrázek 5a Nastavení druhu stříkačky



nastavení průtoku    nastavení objemu

Obrázek5b Nastavení průtoku a objemu

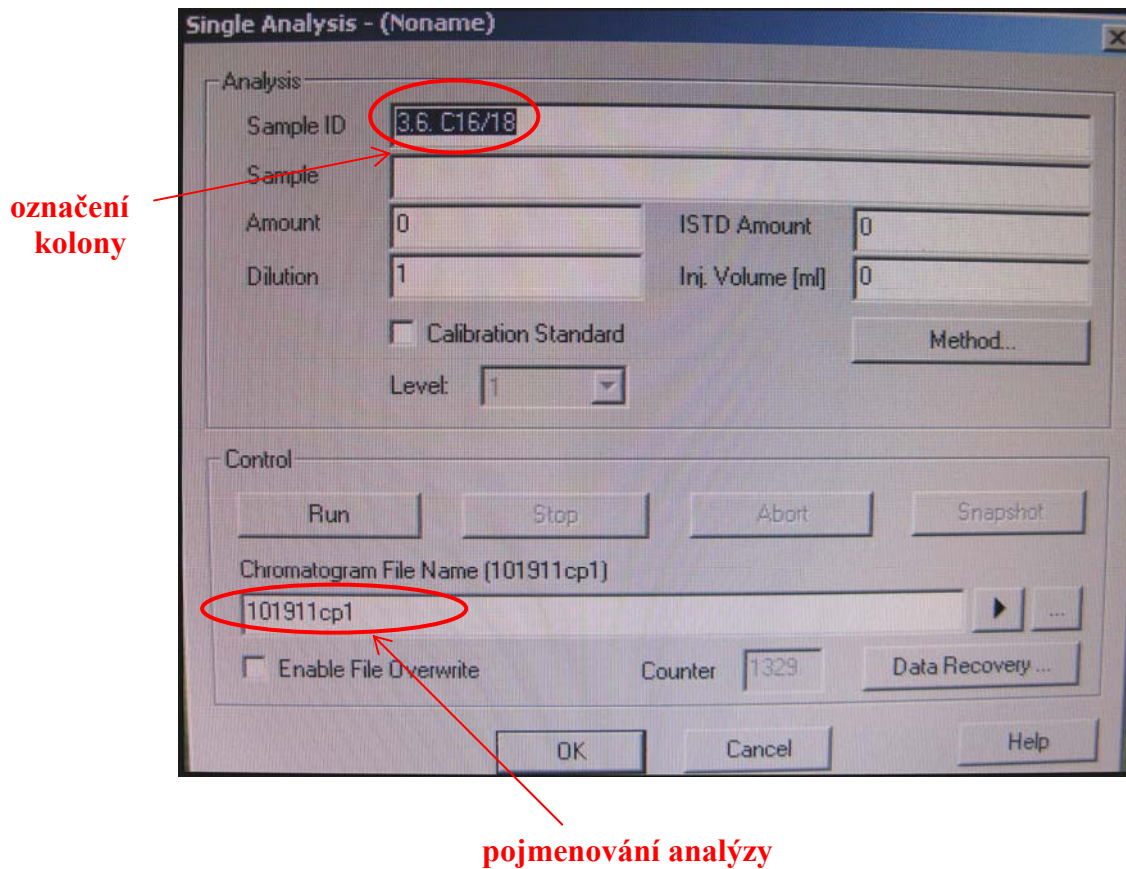


pojmenování  
analýzy

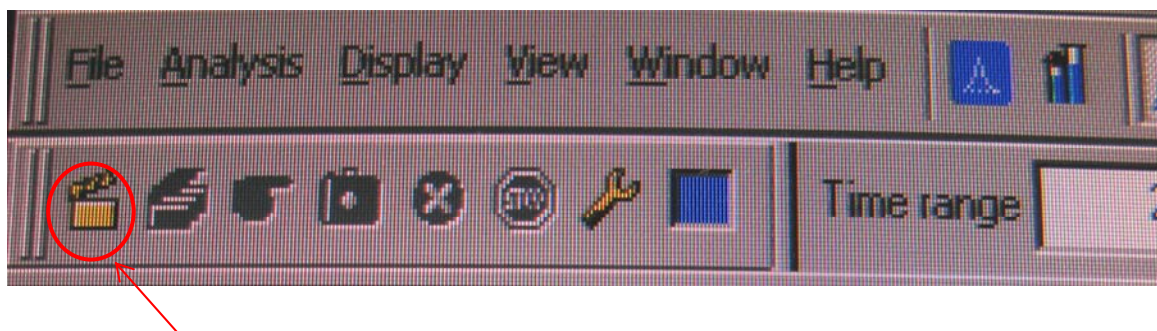
ikona pro spuštění okna se záznamem analýzy

Obrázek 6a Pojmenování analýzy a spuštění záznamu





Obrázek 6b Pojmenování analýzy



Obrázek 7a Ikona pro zapnutí analýzy



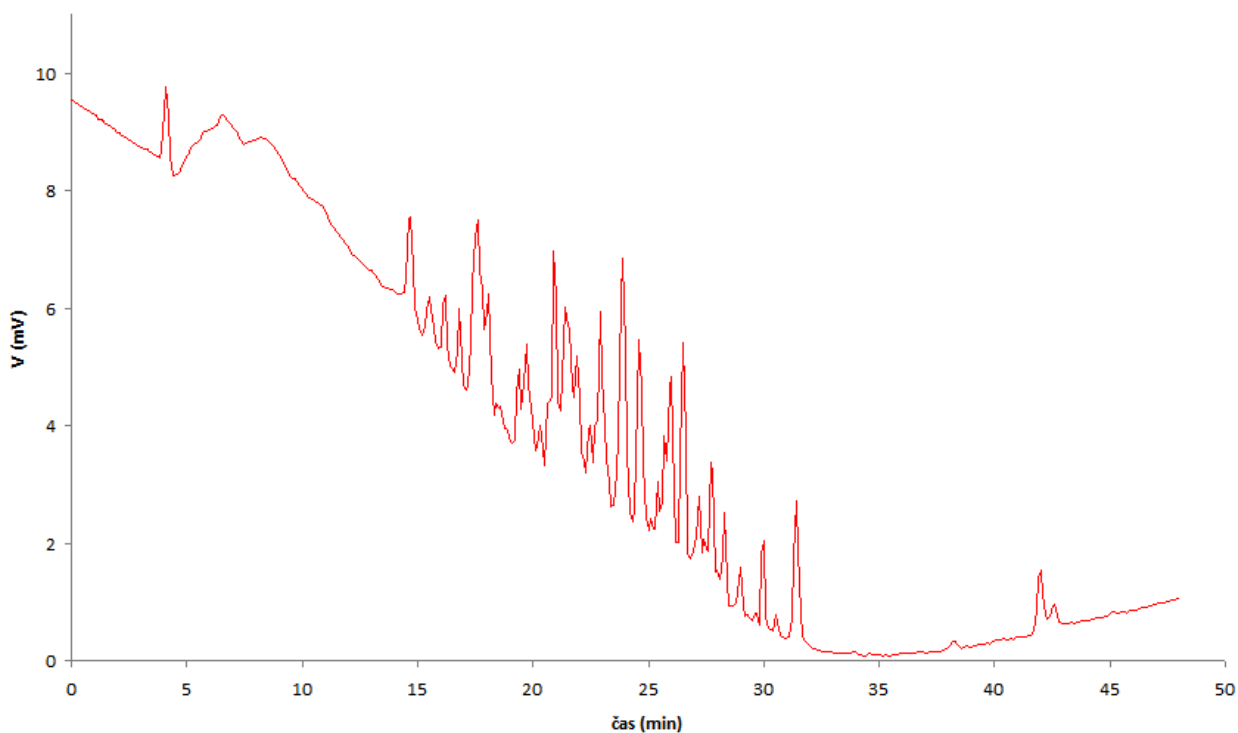
**„abort“zrušení analýzy ukončení a uložení analýzy**

Obrázek 7b Ikony pro zrušení a ukončení analýzy

### 3. Závěr

Požadovaná výsledná separace je na obrázku 8. Zda je gradient správně namíchán poznáte podle toho, že nulová linie klesá. Zda kolona správně separuje poznáte podle tvaru, množství píků a jejich rozlišení.

**Analýza BSA na kolně C<sub>12</sub>**



Obrázek 8 Separace BSA na kolně C<sub>12</sub>

## **Literatura**

- [1] František Švec, Journal of Chromatography B, 841 (2006) 52–64
- [2] František Švec, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 902–924
- [3] Hanfa Zou et al, Journal of Chromatography A, 954 (2002), 5-32
- [4] E. Kłodzińska et al, Journal of Chromatography A, 1109 (2006) 51–59
- [5] Pavel Klouda, Moderní analytické metody; druhé, upravené a doplněné vydání nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003 ISBN 80-86369-07-2
- [6] Karel Štulík a kolektiv, Analytické separační metody, Univerzita Karlova v Praze Nakladatelství Karolinum, Praha 2005 ISBN 80-246-0852-9