

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Analýza metabolických markerů: stanovení inosinu, adenosinu a jejich 2'-deoxy forem

Teoretická část úlohy:

- ✓ Úvod do problematiky stanovovaných metabolických markerů
- ✓ Základní principy a charakteristiky ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC)
- ✓ Způsoby kvalitativního a kvantitativního vyhodnocení výsledků v HPLC
- ✓ Seznámení se s vývojem HPLC metod a jejich validacemi

Praktická část úlohy:

- ✓ HPLC separace zvolených analytů – charakteristika separačního systému a chromatografických podmínek
- ✓ Vyhodnocení výsledků v HPLC – identifikace a kvantifikace látek
- ✓ Srovnání výsledků, získaných různými způsoby kvantitativního hodnocení
- ✓ Validace metody – statistické vyhodnocení

Úvod do problematiky stanovovaných metabolických markerů

Puriny a jejich metabolity jsou přirozeně se vyskytující látky, které se v lidském těle účastní řady důležitých biochemických procesů. Purinové nukleotidy, společně s pyrimidinovými tvoří základ nukleových kyselin a vyskytují se dále jako součást některých koenzymů. Jejich přítomnost v organismu není závislá na příjmu potravou (jak je tomu například u vitamínů), ale všechny potřebné nukleotidy jsou v těle syntetizovány z příslušných prekurzorů.

Obecně řečeno jsou nukleotidy fosforečné estery pentos (ribosy nebo deoxyribosy), ve kterých je na uhlík C1' sacharidu vázána purinová nebo pyrimidinová báze. Při jejich odbourávání jsou nejprve hydrolyzovány na nukleosidy (ztráta fosfátu). Následuje cyklus metabolických přeměn, jejichž konečným produktem je v lidském organismu kyselina močová, která je z těla vylučována močí. Volné purinové báze jsou však touto cestou metabolizovány jen zčásti, další část je vrácena zpět k syntéze nových nukleotidů (tzv. purinový cyklus). Celý tento cyklus je ovlivňován správným působením příslušných enzymů, jejichž nerovnovážné působení může vést k závažným metabolickým poruchám.

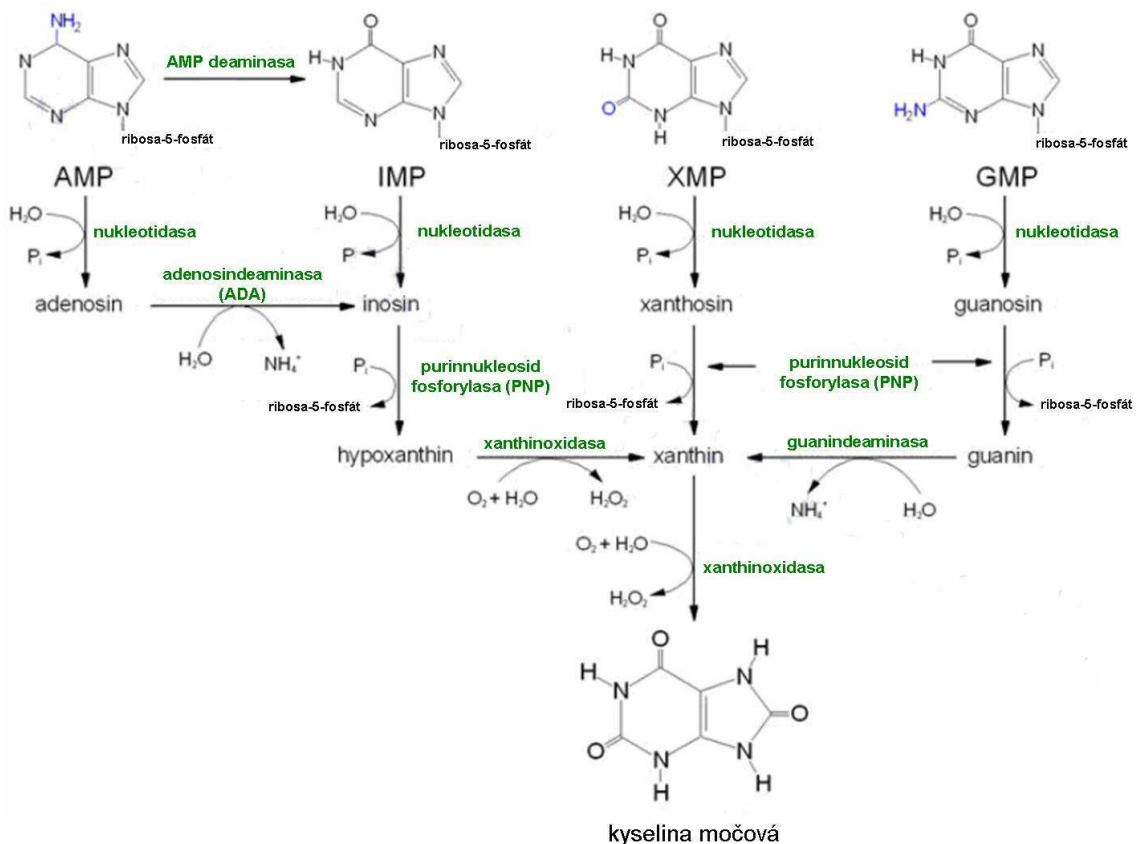
Deficit adenosindeaminasy (ADA)

Jedná se o metabolickou poruchu, která postihuje imunitní systém. Deficit ADA je spojen s často se opakujícími infekcemi a je jednou z příčin tzv. těžkého kombinovaného imunodeficitu. Klinické projevy (nejčastěji to bývají plicní infekce, kandidóza, chronické průjmy) se projevují už od narození a postižení tímto onemocněním obvykle bez léčby během jednoho roku umírají. Prvním krokem diagnostiky deficitu ADA je průkaz adenosinu a 2'-deoxyadenosinu v moči. Při nedostatku zmíněného enzymu totiž dochází v těle k hromadění těchto metabolitů a k jejich následnému nadměrnému vylučování.

Deficit purinnukleosidfosforylasy (PNP)

Nedostatek enzymu PNP je v porovnání s ADA poněkud vzácnější, avšak jeho deficit bývá opět spojován s poruchami imunity. Díky deficitu PNP dochází k hromadění specifických enzymových substrátů (guanosinu, inosinu, 2'-deoxyguanosinu, 2'-deoxyinosinu), které jsou ve zvýšené míře pro organismus toxické. Všechny zmíněné metabolity jsou v tělních tekutinách za normálních okolností téměř nedetekovatelné, proto jejich vylučování a prokázání v moči patří k prvním krokům v diagnostice této metabolické poruchy.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography - HPLC) je v současnosti nejrozšířenější separační technikou, užívanou v klinických a bioanalytických laboratořích, která slouží k identifikaci a kvantifikaci bioanalytů. Její stále se zdokonalující instrumentace a s tím související vývoj nových metod pomáhají efektivně analyzovat stále širší spektrum biologicky významných analytů.

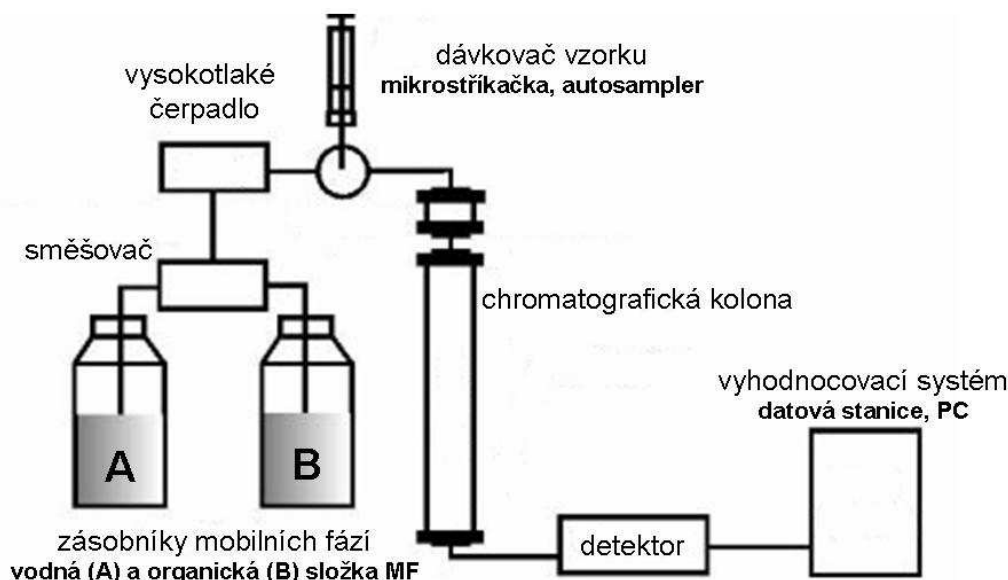


Základní principy a charakteristiky vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

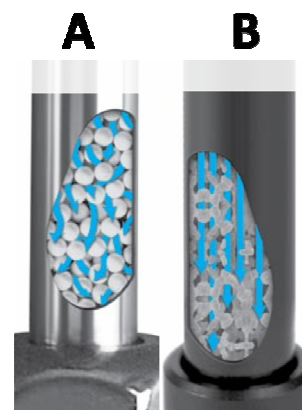
Chromatografii lze obecně definovat jako fyzikálně-chemickou metodu, která je založená na distribuci látek mezi tzv. stacionární (SF) a mobilní fází (MF). Stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina, ukotvená na tuhém nosiči, zatímco mobilní fáze je výhradně tvořená tekutinou. Stacionární fáze je umístěna v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, hnaná v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie pomocí vysokotlakého čerpadla.

Na fázovém rozhraní mezi SF a MF dochází k opakovanému dynamickému procesu sorpce a desorpce stanovovaných látek, který je pro každou látku charakterizován tzv. distribuční konstantou K_D . Tento parametr udává poměr rovnovážné koncentrace látky strávené v SF k rovnovážné koncentraci látky strávené v MF. Pro rozdělení dvou látek je nutné, aby se jejich distribuční konstanty dostatečně lišily.

Základní instrumentace HPLC je znázorněna níže. Mobilní fáze je podle potřeby smíchána z vodné a organické složky a pomocí vysokotlakého čerpadla přiváděna na kolonu. Mezi kolonou a čerpadlem je umístěno zařízení pro dávkování vzorku, ze kterého je proudem mobilní fáze vzorek unášen na kolonu. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, z něhož je signál veden obvykle do osobního počítače.



K nejběžněji používaným kolonám v klasické HPLC patří částicové kolony (A), kdy je tělo kolony, vyrobené např. z nerezové oceli, naplněno částicemi sorbentu o definovaném průměru a velikosti pórů. Na částicích je pak navázána funkční skupina, udávající charakter stacionární fáze. Alternativou k těmto kolonám jsou kolony monolitické (B). Jedná se o separační média, která můžeme přirovnat k jedné velké částici, mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřní část kolony. Výhodou oproti částicovým typům kolon je absence mezičásticových prostor, kdy je mobilní fáze nucena protékat póry monolitu. Vysoká pórovitost a mimořádně nízký odpor vůči proudění kapaliny je předpokladem vysokých průtokových rychlostí, vhodných k velmi rychlým separacím.



V naší úloze použijeme monolitickou kolonu s reverzní fází C18, kde je monolit tvořen oxidem křemičitým a uzavřen v trubici z poly(ether-ether-ketonu). Navázání funkční skupiny je provedeno následnou reakcí v již vytvořené koloně. Křemičitanové monolity se skládají z dobře uspořádaných, přibližně stejně velkých skeletů, prostoupených téměř monodisperzními póry o velikosti 1 μm . V porovnání s částicovou kolonou stejných rozměrů a porozity poskytují monolitické kolony kratší doby analýz, nižší tlaky při vyšších průtokových rychlostech, lepší reprodukovatelnost i životnost.

Chromatografické systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC) jsou majoritní technikou s více než 85% aplikací a často jsou první volbou při vývoji a optimalizaci nových HPLC metodik. Mobilní fáze v RP-HPLC je polární. Obvykle je tvořena vodnou složkou (voda nebo zředěný roztok kyseliny, báze nebo pufru) a organickou složkou (s vodou mísitelné organické rozpouštědlo, nejběžněji metanol nebo acetonitril). Stacionární fáze má nepolární charakter, kdy se nejčastěji jedná o navázané uhlíkaté řetězce na povrchu nosiče (nejčastěji oktadecyl C18 či oktyl C8).

Mezi faktory nejvíce ovlivňující separaci v RP-HPLC patří eluční síla mobilní fáze, její iontová síla a pH. Voda jako nejběžněji používaná složka mobilních fází má nízkou eluční sílu, proto se zvyšujeme přidávkem organické složky (metanol, acetonitril), která má eluční sílu vyšší. Eluční síla některých rozpouštědel stoupá v následujícím pořadí:

voda < methanol < acetonitril < propan-2-ol < dioxan < tetrahydrofuran

Iontová síla je určena přítomností solí v mobilní fázi a roste s jejich koncentrací. Iontová síla ovlivňuje sílu interakcí separovaných látek se stacionární fází díky změně solvatačního obalu molekul. S vyšší iontovou silou je solvatační obal molekul tenčí a interakce se stacionární fází se více projevují. Maximální doporučená koncentrace solí je 50 mM. Koncentrace protonů ovlivňuje ionizovatelné molekuly (např. organické kyseliny a báze). Zde je nutné si uvědomit, že ionizace molekuly vede v případě reverzní stacionární fáze k dramatickému poklesu retence a je proto ve většině případů žádoucí se jí volbou pH vyhnout. Na druhou stranu je možné volbou pH cíleně ionizovat součásti matrice vzorku a zjednodušit si tak výsledný chromatogram. pH mobilní fáze nastavujeme v rozmezí daném většinou pH stabilitou stacionární fáze (např. pH 2-8) použitím vhodného pufru.

Zádrž analytů na koloně je hodnocena pomocí tzv. retenčních charakteristik. Základní veličinou je retenční (eluční) čas t_r , což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maximu eluční křivky (vrcholu píku analytu). Lze se také setkat s pojmem retenční (eluční) objem, který udává objem mobilní fáze, která proteče kolonou za dobu retenčního času.

Mírou retence dělených látek je tzv. kapacitní (retenční) faktor k_i , který charakterizuje selektivitu a slouží ke srovnání separace a retence analytu v různých systémech. Dá se vyjádřit pomocí následující rovnice

$$k_i = \frac{(t_r - t_m)}{t_m}$$

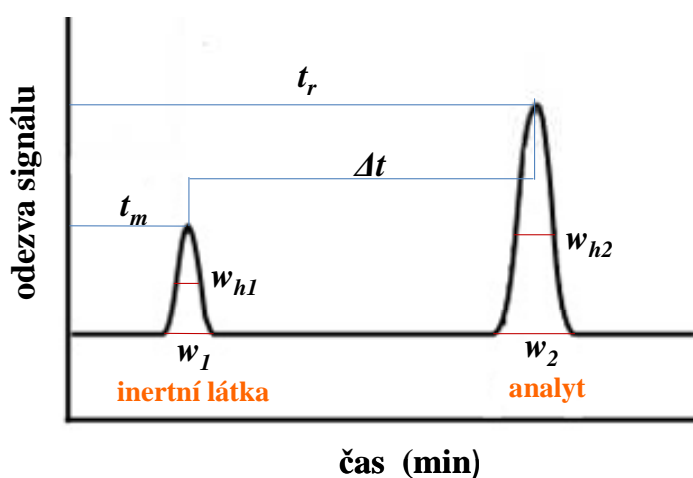
kde t_r je retenční čas analytu a t_m je tzv. mrtvý čas, což je čas složky, která se pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze a není na koloně vůbec zadržována (tzv. inertní látka). Retenční čas, který pak analyt stráví ve stacionární fázi se nazývá redukovaný retenční čas t_r' a určí se rozdílem retenčního a mrtvého času

$$t_r' = t_r - t_m$$

Hlavním cílem HPLC analýz je dosažení co nejlepšího rozdělení látek v co nejkratším čase, tzv. s co nejvyšší účinností. Parametr, který hodnotí separační systém z pohledu jeho účinnosti je vyjádřen počtem teoretických pater N a charakterizuje míru rozmyvání složek vzorku při transportu kolonou (rozšiřování elučních zón). Tento parametr lze experimentálně zjistit z naměřených parametrů dosazením do vztahu

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

kde t_r je retenční čas analytu, w je šířka píku při základně a w_h šířka píku v polovině výšky.



Pro porovnání účinnosti kolon různých délek je používán tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H , který vyjadřuje délku kolony, připadající na jedno teoretické patro.

$$H = \frac{L}{N}$$

Při rozdělení dvou složek vzorku je snaha o dosažení co nejpříjemnějšího rozdělení. Pro hodnocení míry vzájemného překrývání dvou sousedních píků se používá veličina zvaná rozlišení R .

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 (w_{h1} + w_{h2})}$$

kde t_{r1} a t_{r2} jsou retenční časy analytů a w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v polovině jejich výšky.

Rozlišení lze vypočítat z retenčních časů analytů a šířek píků. Z hodnoty R lze odhadnout míru překrývání sousedících píků. Při hodnotě $R = 1$ jsou píky překryty z 2 % plochy. Odděleny z 99,9 % a více jsou při hodnotě $R \geq 1,5$.

Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení výsledků v HPLC

K identifikaci látek slouží retenční čas, který lze získat z chromatografického záznamu. Další možností identifikace látek je použití specifických detektorů, jakými jsou např. NMR nebo MS detektor.

Při kvantitativním stanovení se hledá vztah mezi množstvím eluované látky a plochou zaznamenaného píku (v případě symetrického píku Gaussova tvaru je možné počítat i s výškou píku). Problém však často nastává s určením začátku a konce píku a s nastavením způsobu integrace ve vyhodnocovacím softwaru. Určení plochy je poté nepřesné a vede k chybně provedené kvantifikaci. Jelikož má vyhodnocení dat v HPLC relativní charakter, je možné vztah mezi plochou nebo výškou píku a neznámou koncentrací stanovovaného analytu určit empiricky pomocí standardů. Při kvantitativním stanovení pak lze použít například následující metody:

- Metoda vnějšího standardu (metoda kalibrační křivky)
- Metoda přídatku standardu
- Metoda vnitřního standardu

Metoda vnějšího standardu

Tato metoda patří mezi nejjednodušší způsoby kvantifikace a je známa jako metoda kalibrační křivky. Analyzují se při ní roztoky standardů o známé, ale rozdílné koncentraci a je hledána závislost mezi koncentrací a plochou (případně výškou) píku. Metoda přídatku standardu předpokládá linearitu kalibrační závislosti, kdy pro kalibrační přímku lze napsat vztah

$$x_i = a + bc_i$$

kde a je úsek na ose y , b je směrnice kalibrační přímky (vyjadřuje citlivost) a x_i je hodnota veličiny X pro koncentraci c_i . Obvykle se měří 5 – 7 bodů přímky, přičemž každý bod se doporučuje měřit alespoň 2 – 3x, aby se dosáhlo co nejspolehlivějších výsledků. Tento způsob kvantitativního vyhodnocení je vhodný pro práci se standardy a v případě, kdy má vzorek a standard srovnatelné vlastnosti. Nelze jej použít pro složité reálné vzorky, u kterých není možné zanedbat vliv matrice. Je třeba vždy ověřit statistickou významnost úseku a .

Metoda přídatku standardu

Principem tohoto kvantitativního stanovení je přidavek přesného a známého množství standardu stanovované látky ke vzorku. Lze se setkat s několika variantami této metody:

Metoda jednoho přídatku standardu: První analýza vzorku o určitém objemu V_i a neznámé koncentraci c_i zjistí plochu A_i . Po přidání známého objemu standardu V_s o známé koncentraci c_s se stanoví plocha A_{si} a pro neznámou koncentraci c_i pak platí vztah

$$c_i = \frac{A_i c_s V_s}{(A_{si} (V_i + V_s) - A_i V_i)}$$

Tato metoda snižuje riziko systematických chyb, naopak ale zvyšuje riziko výskytu chyb náhodných.

Metoda více přídavků standardu: K roztoku vzorku jsou přidávány přídavky standardů v celých násobcích předpokládané koncentrace. Poté je vynesena závislost plochy píku na změnách koncentrace a s použitím extrapolace regresní přímky je stanovena neznámá koncentrace sledovaného analytu. Neznámá koncentrace c_x odpovídá podílu odezvy původního vzorku A_0 a směrnice přímky b

$$c_x = \frac{A_0}{b}$$

Metoda přídavku standardu do konstantního objemu: Stejně podíly vzorku o objemu V_i a neznámé koncentraci c_i , k nimž jsou přidány různé objemové jednotky standardu V_s ($n = 1, 2, 3, \dots$) o koncentraci c_s jsou doplněny na stejný konečný objem V_c a je změřena plocha píku A_n . Z přímkové závislosti, kdy je směrnice b a úsek a určen graficky, pak pro neznámou koncentraci platí

$$c_x = \left(\frac{a}{b} \right) \left(\frac{c_s V_s}{V} \right)$$

Výhodou této metody kvantitativního stanovení je fakt, že koncentrace standardu v jednotlivých přídavcích nemusí být použita pro výpočet.

Metoda vnitřního standardu

Metoda je založená na přídavku chemické látky, tzv. vnitřního standardu, která je svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobná stanovovanému analytu a k jejíž eluci dochází v blízkosti stanovovaného analytu. Tento způsob kvantifikace eliminuje vliv změny pracovních podmínek a má dvě varianty provedení:

Metoda přímého porovnání: Známy objem vnitřního standardu V_{is} o známé koncentraci c_{is} se přidá k roztoku analyzovaného vzorku o neznámé koncentraci analytu c_x a k roztoku standardu o známé koncentraci c_s . Po analýze jsou v jednom experimentu stanoveny plochy píků analytu A_i a vnitřního standardu $A_{is,i}$ a ve druhém experimentu plochy píků standardu A_s a vnitřního standardu $A_{is,s}$. Hledané koncentrace je následně stanovena z následujícího vztahu:

$$c_x = \left(\frac{A_i}{A_s} \right) \left(\frac{A_{is,s}}{A_{is,i}} \right) c_s$$

Metoda kalibrační křivky: K několika roztokům standardu je přidán konstantní objem vnitřního standardu V_{is} o jedné známé koncentraci c_{is} . Z kalibrační přímky, znázorňující koncentrace standardů c_s na poměru ploch standardu A_s a vnitřního standardu A_{is} je poté přímo odečtena koncentrace hledaného analytu c_x .

Vývoj metod v HPLC a jejich validace

Analytická metoda popisuje konkrétní využití analytické techniky a příslušné metodiky ke stanovení konkrétního analytu. Volba chromatografických podmínek by měla vést k tomu, aby byly analyty co nejlépe a nejrychleji separovány v co nejkratším čase. Při vývoji metody se vychází z nejen z teoretických principů, ale také z experimentálních zkušeností a literární rešerše. Celková analýza je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří například výběr stacionární fáze a rozměrů kolony, pH a složení mobilní fáze, teplota, průtoková rychlost apod. Optimalizací zmíněných faktorů hledáme nejvhodnější podmínky pro stanovení daného analytu.

Většina metod, používaných v praxi, musí být v rámci tzv. systému kontroly kvality (QC) validována. Validací se rozumí ověření a prokázání vhodnosti určitého postupu pro zamýšlené použití a k získání relevantních dat. Mezi nejběžnější validační parametry v HPLC patří:

Správnost (accuracy) – těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou. Poměr množství analytu získaného měřením k přijaté referenční hodnotě je nazýván návratností nebo výtěžností (*recovery*), přičemž přijatelná výtěžnost by se měla pohybovat v rozmezí 95 – 105%. Výtěžnost v HPLC se nejčastěji vyhodnocuje analýzou vzorku s přidaným standardem na minimálně třech koncentračních hladinách v co nejširším kalibračním rozsahu. Počet paralelních opakování by se měl pohybovat kolem 7 a relativní směrodatná odchylka pro každou koncentrační hladinu by neměla být větší než 3%.

Rozdíl mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou je pak nazýván chybou výsledku, kdy celková chyba stanovení může být ovlivněna chybou systematickou (předvídatelně se měnící) a/nebo náhodnou (mění se nepředvídatelným způsobem). Systematické chyby jsou způsobeny např. nesprávnou kalibrací (pipet, odměrných baněk, analytických vah a podobně) a lze je odstranit či minimalizovat, chyby náhodné vznikají v průběhu celého postupu stanovení zcela nahodile a nelze je žádným způsobem odstranit.

Přesnost (precision) – hodnota, udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky analýz, získaných za daných podmínek. Lze ji vyjádřit jako:

Opakovatelnost (repeatability) – těsnost shody výsledků, získaných opakovaným použitím téže metody, na identickém materiálu, v téže laboratoři týmž pracovníkem během krátkého časového rozmezí.

Mezilehlá přesnost (intermediate precision) – přesnost měření, kdy se nemění postup, materiál, místo stanovení, ale sleduje se v delším časovém úseku, případně může zahrnovat lehkou variabilitu – novou kalibraci, nového pracovníka, nový přístroj apod.

Reprodukovatelnost (reproducibility) – těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky, získanými měřením stejného materiálu stejnou metodou různými laboratořemi, operátory, na různé instrumentaci v různý čas apod.

Linearita (linearity) – schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi koncentrací analytu a získaným signálem. Pro určení linearity se volí minimálně 5 vzorků o různých koncentračních úrovních, pokrývajících rozsah v celé měřící oblasti. V některých farmakologických a bioanalytických případech se využívají také nelineární závislosti, které lze následně linearizovat popisem funkce nebo speciálními matematickými aparáty.

Mez detekce (*limit of detection, LOD*) – odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významný od šumu

Mez stanovitelnosti (*limit of quantification, LOQ*) – koncentrace, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

Nejčastějším způsobem určení zmíněných parametrů je výpočet například s využitím poměru signálu a šumu, ze směrodatné odchylky odezvy a ze směrnice kalibrační přímky

$$LOD = \frac{3 s_d}{b} \qquad LOQ = \frac{10 s_d}{b}$$

kde s_d je směrodatná odchylka výšky šumu a b je směrnice přímky z kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci.

Selektivita metody (*method selectivity*) – schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Neselektivní metoda dává signál, který neodpovídá skutečnému obsahu analytu, ale je zesílen signálem rušivé složky. Pokud je k dispozici matrice vzorku, analyzujeme matrici, dále vzorek bez matrice i bez analytu (v případě HPLC nastříkneme mobilní fázi), standardní roztoky sledovaných látek, kontrolní vzorky (matrice + standardy stanovované složky), vzorky s přidavkem standardní (stanovované) složky. Zjistíme, zda interference pochází ze srovnávacího vzorku metody, pak je potřeba odstranit zdroj interference (kontaminace rozpouštědla, laboratorního nádobí, přístrojů atd.) nebo pochází ze srovnávacího vzorku matrice a je nutné optimalizovat extrakci vzorku, předseparaci (čištění vzorku). Odezva interferujících látek musí být menší než 1% odezvy nejnižší koncentrační hladiny analytu ve vzorku.

Dynamický rozsah (*range, working interval*) – interval hodnot měřeného analytu, pro který je validací potvrzeno, že metoda je v něm aplikovatelná. Spodní mez určuje mez stanovitelnosti, shora je určen měřením vzorků s různým obsahem analytu.

Robustnost (*robustness*) – míra kapacity metody poskytovat shodné výsledky při jejím reprodukování za nepatrně změněných podmínek. V případě HPLC by měla robustní metoda dávat přijatelné výsledky (např. retenční čas, plocha píku, rozlišení) i když dochází v experimentálních parametrech (např. složení mobilní fáze, pH, teplota kolony, průtoková rychlost) k mírné odlišnosti od požadovaných v důsledku běžné nepřesnosti (např. nepřesnosti odměrného nádobí, pomocných přístrojů). Robustnost je experimentálně zjišťována pomocí záměrného vnášení malých změn do metody a zkoumání jejich důsledků.

Test způsobilosti HPLC – test způsobilosti systému (*system suitability test, SST*) je testem pro určení vhodnosti a validity chromatografického systému před jeho použitím a bývá nedílnou součástí metody. Provádí se vždy na počátku každého měření, při změně systému případně při podezření na chybně fungující systém. Obvykle se provádí následující:

Test opakovaného nástřiku

= 6 nástřiků a určení relativní směrodatné odchylky RSD (měla by být menší než 1,5 %)

Test linearity

= z 5 bodů o různé koncentraci sestavit kalibrační závislost a určit koeficient determinace (hodnota koeficientu determinace by neměla dosahovat menší hodnoty než 0,990)

Praktická část úlohy

Přístroje a zařízení

- HPLC systém 10 AVP fy SHIMADZU:
- odplyňovač GT-154
- systémová řídicí jednotka SCL-10AVP
- pumpa LC-10AVP
- páčka CTO-10ASVP
- PDA detektor SPD-M10AVP
- řídicí software Class-VP 5.02
- 2 monolitické kolony 100 x 4.6 mm, Onyx C18
- injekční stříkačka se speciálně upravenou jehlou pro dávkování vzorků (Hamilton)
- mikropipety
- ultrazvuková lázeň
- odměrné baňky a další běžné laboratorní vybavení

Chemikálie

- standardy bází nukleosidů (koncentrace 10mM):
 - 2'-deoxyinosin (dIno)
 - inosin (Ino)
 - 2'-deoxyadenosin (dAde)
 - adenosin (Ade)
- thiomčovina (0,002% roztok ve vodě)
- mobilní fáze pro měření vzorků a standardů
= vodný roztok fosfátu sodného o koncentraci 15mM a pH 3,8; metanol pro chromatografii

Obecný postup při práci s kapalinovým chromatografem

Sběr dat – obsluha řídicího software a sběr dat se provede dle pokynů vedoucího cvičení. Jako kvantitativní parametr bude odečítána plocha píku. Všechna měření se provádí nejméně třikrát.

Příprava dávkovače a vzorku před nadávkováním vzorku na kolonu – roztok vzorku se na kolonu dávkuje dávkovacím kohoutem. Před zahájením vlastního měření je nutné propláchnout dávkovací kohout destilovanou vodou, metanolem nebo mobilní fází (jinak hrozí nebezpečí kontaminace z předchozích vzorků). Vzorek dávkovaný na kolonu musí být čirý, částice nebo zákal mohou nevratně znehodnotit kolonu. Vzorky obsahující rozpuštěné plyny (např. metanolicke roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

Naplnění smyčky dávkovače – při plnění dávkovací smyčky o objemu 20 μ l se páčka dávkovače přepne do pohotovostní horní polohy. Pro analýzu se pomocí injekční stříkačky bere dostatečné množství vzorku, aby byla naplněna celá dávkovací smyčka (přibližně 25 μ l). Do dávkovacího otvoru se jemně zasune jehla injekční stříkačky (nezasouvat násilím na doraz) a tlakem na píst injekční stříkačky se naplní dávkovací smyčka dávkovače (na konci

odpadní kapiláry odkápně přibližně 3-5 kapek). Při dávkování vzorku do smyčky je nutné kontrolovat přítomnost bublinek v injekční stříkačce. Do systému se nesmí dostat plyn!

Nástřik vzorku na kolonu – v momentě, kdy je software připravený sbírat data, se páčka dávkovače otočí do pravé spodní polohy. Tím se uvnitř dávkovače přepne směr toku mobilní fáze tak, že na kolonu prochází mobilní fáze přes smyčku dávkovacího ventilu, kam jsme před chvílí nadávkovali roztok vzorku. Jehla se poté vytáhne.

Pracovní postup

Změření testovací směsi – testovací směs (aceton, benzen, toluen) se měří v základní mobilní fázi pro RP-HPLC (70 % MeOH). Měření testovací směsi se optimálně provádí vždy před začátkem a po skončení celého měření. Porovnáním píků (retenční čas, rozlišení, počet teoretických pater, asymetrie) testovací směsi se ověřuje, zda nedošlo ke změně vlastností kolony během měření (např. kontaminací kolony těžko eluovatelnými látkami ze vzorku).

Změna pracovní mobilní fáze – změna mobilní fáze se provede dle instrukcí vedoucího cvičení. Je nutné se řídit obecnými postupy, které zajistí 100% mísitelnost dvou po sobě jdoucích mobilních fází a dostatečnou ekvilibraci kolony mezi dvěma mobilními fázemi. V našem systému se osvědčily následující podmínky pro výměnu mobilní fáze: 1) změnit procento organické složky ze základního stavu (70 % metanolu) na procento použité v cílové mobilní fázi (v našem případě 8 % metanolu); 2) zaměnit vodnou složku z deionizované vody za 15 mM vodný roztok fosfátu sodného o pH 3,8. V obou případech ponechat protéct alespoň 10 kolonových objemů pro dostatečnou ekvilibraci kolony – přibližně 15 minut při průtoku 2 ml/min.

Stanovení mrtvého retenčního času (t_m) – mrtvý retenční čas se stanovuje látkou, která není zadržovaná stacionární fází (v případě RPLC se používá např. thiomocovina) a to v takové mobilní fázi, která se používá pro měření vzorků. Mrtvý retenční čas udává dobu, za kterou projde zcela inertní látka vůči sorbentu systémem až na detektor. Mrtvý retenční čas je nutné znát např. pro výpočet kapacitního faktoru, který má přímý vztah k termodynamickým vlastnostem separace (distribuční konstanty). Je možné jej navíc použít pro porovnání výsledků získaných na jiném chromatografickém systému pomocí totožné metody.

Analýza standardů nukleosidů – připravte si roztok každého standardu o koncentraci 0,05 mM a proveďte 3x analýzu každého standardu. Určete eluční pořadí analytů a vypočítejte základní retenční charakteristiky.

Částečná validace metody

Opakovatelnost – připravte směsi všech čtyř standardních látek v ekvimolárním množství na 2 koncentračních hladinách – 0,5 a 0,005 mM. Každou směs 5x proměřte. Určete směrodatnou odchylku (SD), relativní směrodatnou odchylku (RSD) a intervaly spolehlivosti pro retenční časy a plochy píků. Případné odlehlé hodnoty z vyhodnocování nezapomeňte vyloučit.

Linearita – linearitu ověřte měřením 6 koncentrací standardu. Krajní koncentrace je nutno volit tak, aby bylo možné určit dynamický rozsah metody – minimálně jeden kalibrační bod u hladiny limitu detekce a jeden nad hranicí linearitu. V našem případě sestrojte kalibrační křivky v rozsahu koncentrací 0,001 – 1 mM a z koeficientů determinace určete, zda je závislost lineární (kritická hodnota koeficientu determinace je 0,999).

Limit detekce a kvantifikace: Z předchozího měření sestrojte závislost výšek píků na koncentraci standardů a pomocí směrodatné odchylky šumu vypočítejte příslušné parametry.

Analýza neznámého vzorku – proveďte analýzu neznámého vzorku a určete koncentrace jednotlivých analytů nejprve odečtem z kalibrační závislosti (testování linearity) a poté přídatkem 1 a 2 přídatků standardů. Proveďte test shodnosti získaných výsledků.

Vypracování protokolu

Měření testovací směsi – uveďte základní retenční charakteristiky píků včetně základního statistického vyhodnocení (průměr, rozpětí, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka, interval spolehlivosti + odlehlost bodů). Jako mrtvý čas použijte retenční čas acetonu.

Analýza standardů - uveďte základní retenční charakteristiky píků včetně základního statistického vyhodnocení (průměr, rozpětí, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka, interval spolehlivosti + odlehlost bodů). Jako mrtvý čas použijte retenční čas thiomochoviny.

Validace metody – uveďte vypočtené parametry i s jejich statistickým vyhodnocením

Analýza neznámého vzorku – uveďte stanovené koncentrace jednotlivých nukleosidů v neznámém vzorku a srovnajte výsledky, získané různými postupy kvantifikace. Výsledky okomentujte.

Doporučená literatura

- ✓ Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. a II., Praha 2013
- ✓ Eckschlager K., Horsák I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, Nakladatelství technické literatury Alfa, Praha 1980