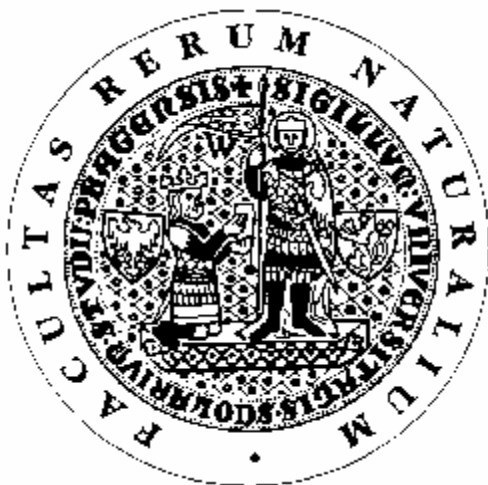


# Miniaturizace v separačních metodách: Od kapilár k čipům



Pavel Coufal

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

# Obsah

## 1. Úvod

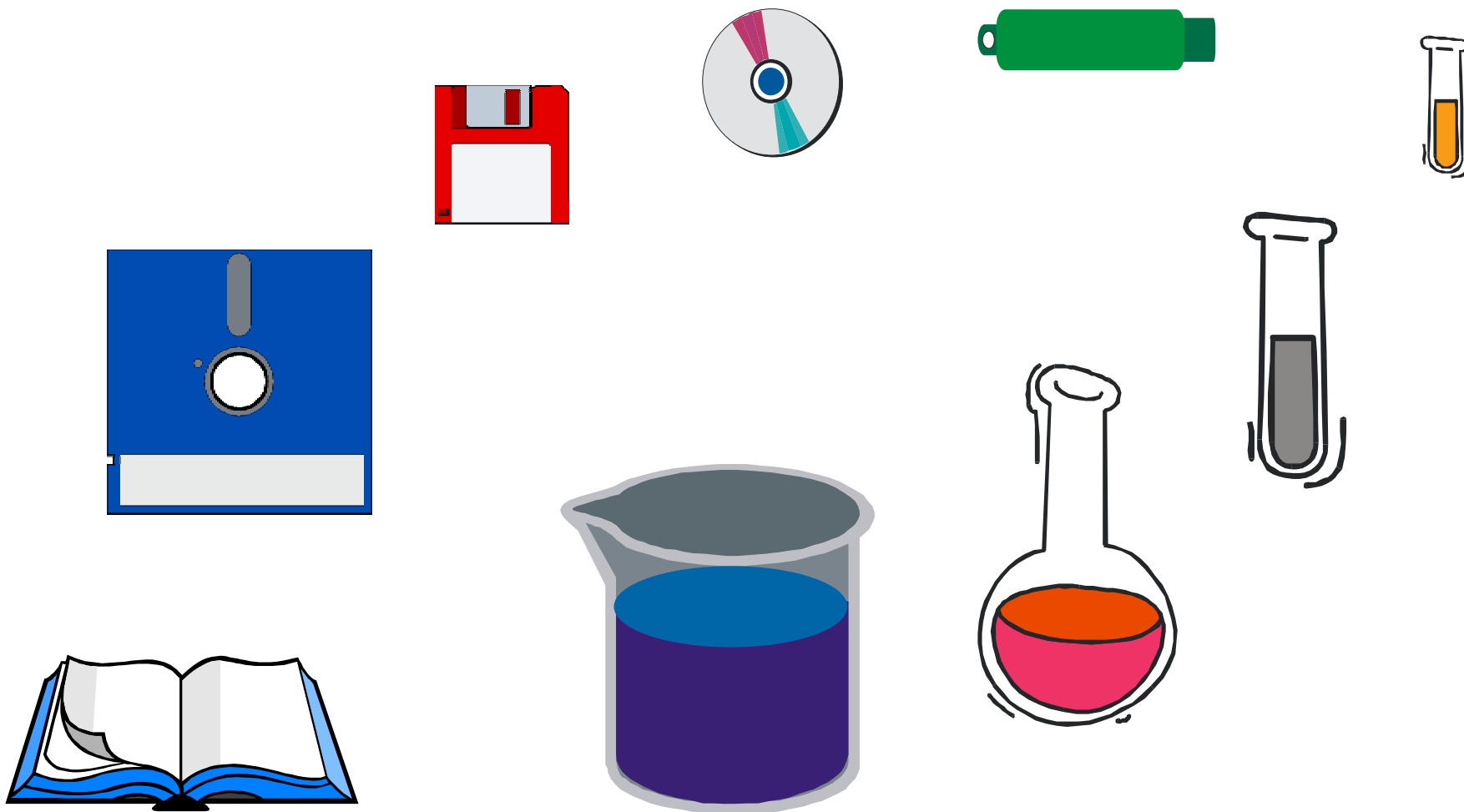
- 1.1. Miniaturizace v analytické chemii
- 1.2. Přednosti a nevýhody CZE
- 1.3. Přednosti a nevýhody CLC
- 1.4. Přednosti a nevýhody nano-HPLC na čipu

## 2. Nano-HPLC-ESI-MS<sup>2</sup> na plastovém čipu

- 2.1. Identifikace bílkovin
- 2.2. Pohled analytického chemika
- 2.3. Analýza komplexních přírodních vzorků

# Miniaturizace

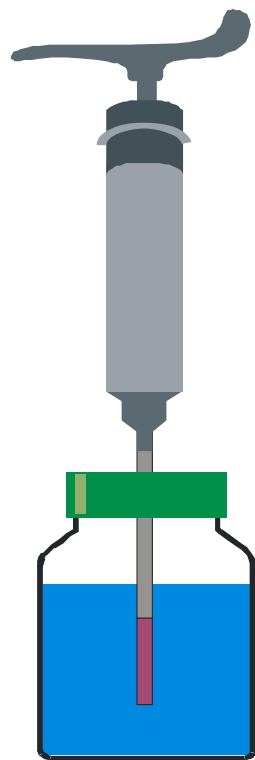
významný trend dnešní doby



# Miniaturizace v separačních metodách

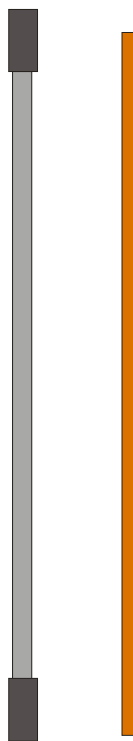
Mikroextrakce  
na tuhé fázi

SPME



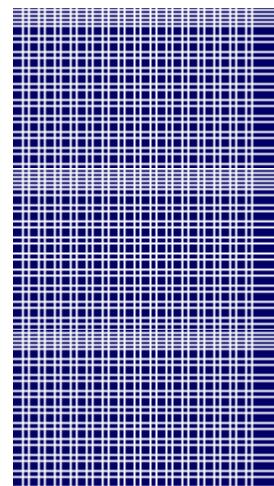
Kapilární  
separační  
techniky

CLC, CZE a CEC



Tištěná  
mikropole

Microarrays



Čipy

Lab-on-chip



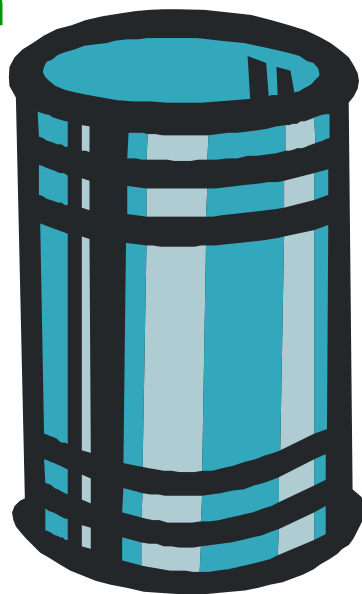
# Proč zmenšujeme separační prostor?

Vysokoúčinná  
kapalinová  
chromatografie

HPLC

1 mL/min

525 L



Kapilární  
kapalinová  
chromatografie

CLC

3  $\mu$ L/min

1,6 L



Nano  
kapalinová  
chromatografie

Nano-LC

0,3  $\mu$ L/min

158 mL



# Požadavky analytické praxe

Tlak analytické praxe na zlepšení některých parametrů vyvinutých a vyvíjených analytických metod

1. zvýšení citlivosti
2. zlepšení selektivity
3. zrychlení analýzy
4. zmenšení vzorku
5. použití méně běžných substancí
6. snížení neurčitosti
7. zajištění správnosti a přesnosti
8. snížení nákladů
9. minimalizace vlivu na životní prostředí
10. kompatibilita s hmotnostní spektrometrií

**miniaturizace**

# Kapilární separační metody používané v analytické chemii

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární kapalinová chromatografie (CLC)
3. Kapilární elektrochromatografie (CEC)
4. Kapilární plynová chromatografie (CGC)
5. Nanokapalinové mikrofluidní techniky  
realizované na čipu v plošném uspořádání  
(Lab-on-a-chip)

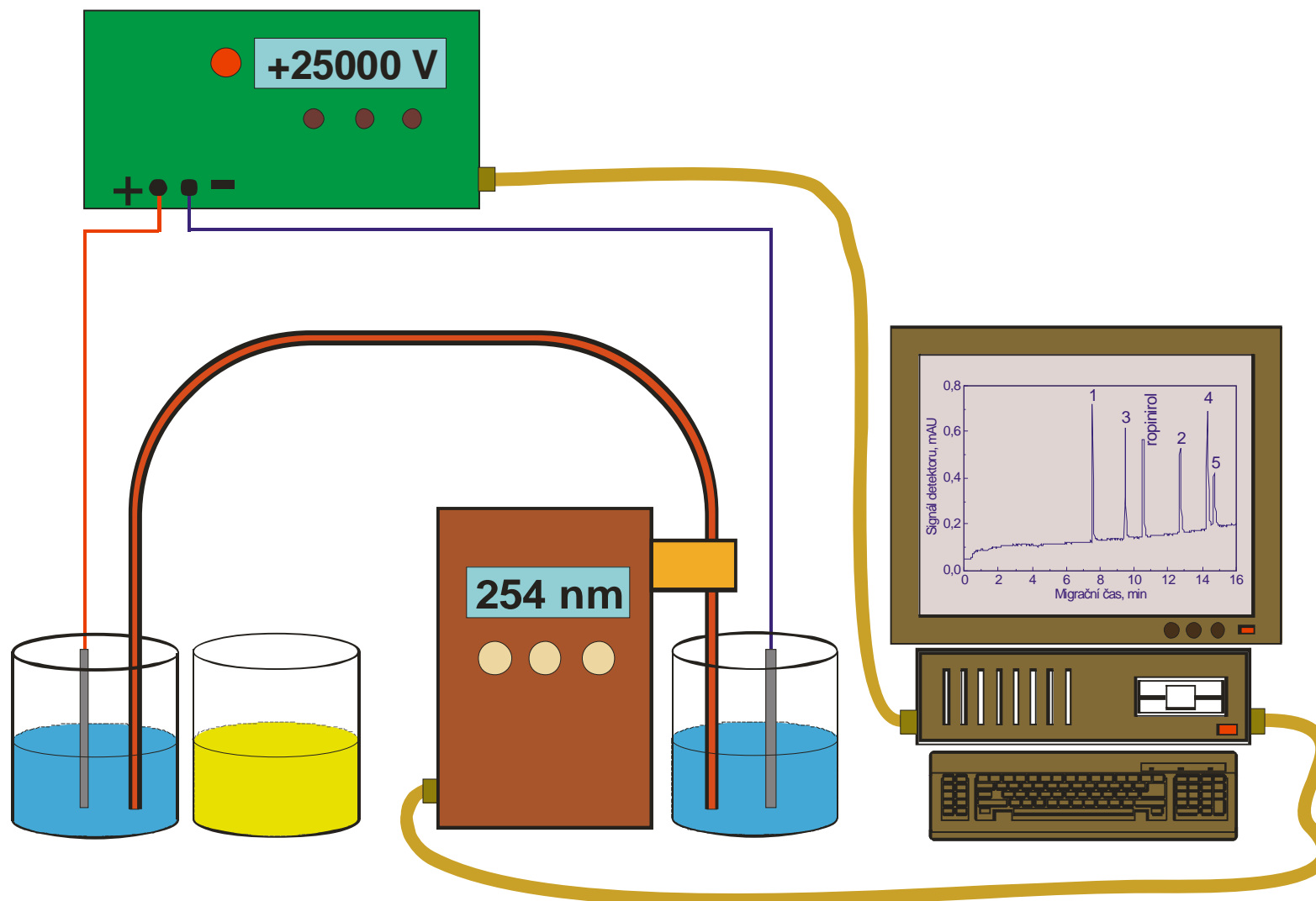
# Problémy miniaturizace

vyplývají z principu separačních metod a technických možností doposud známých technologií

1. instrumentální náročnost
2. zmenšení průtoku eluentu a detekční cely
3. nestabilita elektroosmózy u CZE
4. reprodukovatelnost dávkování malých objemů
5. plnění kolon pro CLC
6. frity u kolon pro CLC
7. reprodukovatelnost výroby čipů
8. ucpávání čipů po několika analýzách
9. nestabilita elektrospreje



# Kapilární zónová elektroforéza



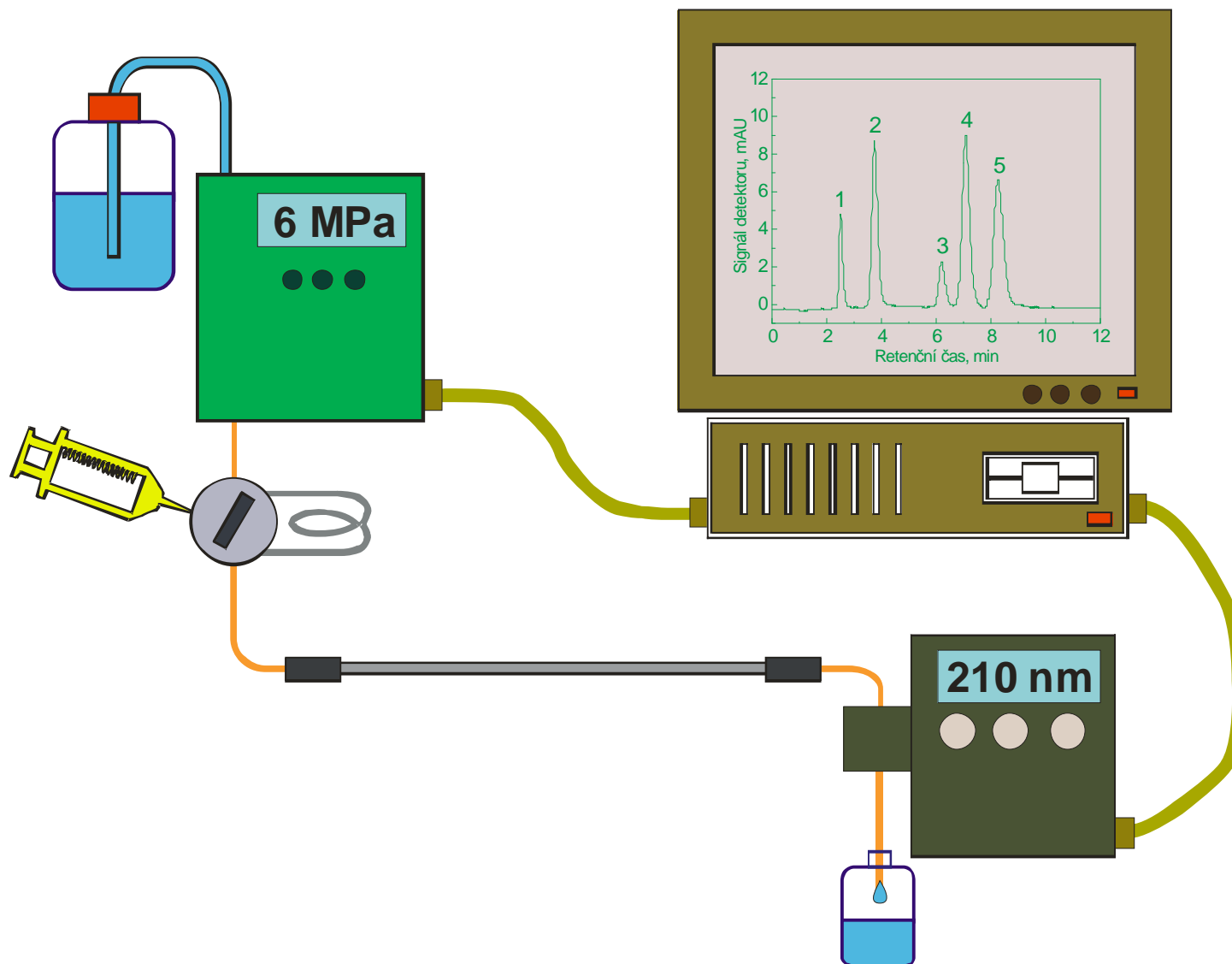
# Přednosti a nevýhody CZE

vhodná pro látky iontové povahy  
(rozdílné elektroforetické pohyblivosti)

1. velká separační účinnost
2. rychlý vývoj metody
3. krátká doba analýzy
4. malá spotřeba vzorku
5. snadné odstranění všech látek z předchozí analýzy
6. snadné a rychlé určení  $pK_a$  analytů
7. dobrá kompatibilita s MS detekcí

1. menší selektivita
2. malá robustnost
3. nestabilita elektroosmotického toku
4. horší opakovatelnost a reprodukovatelnost
5. problémy s validací

# Kapilární kapalinová chromatografie

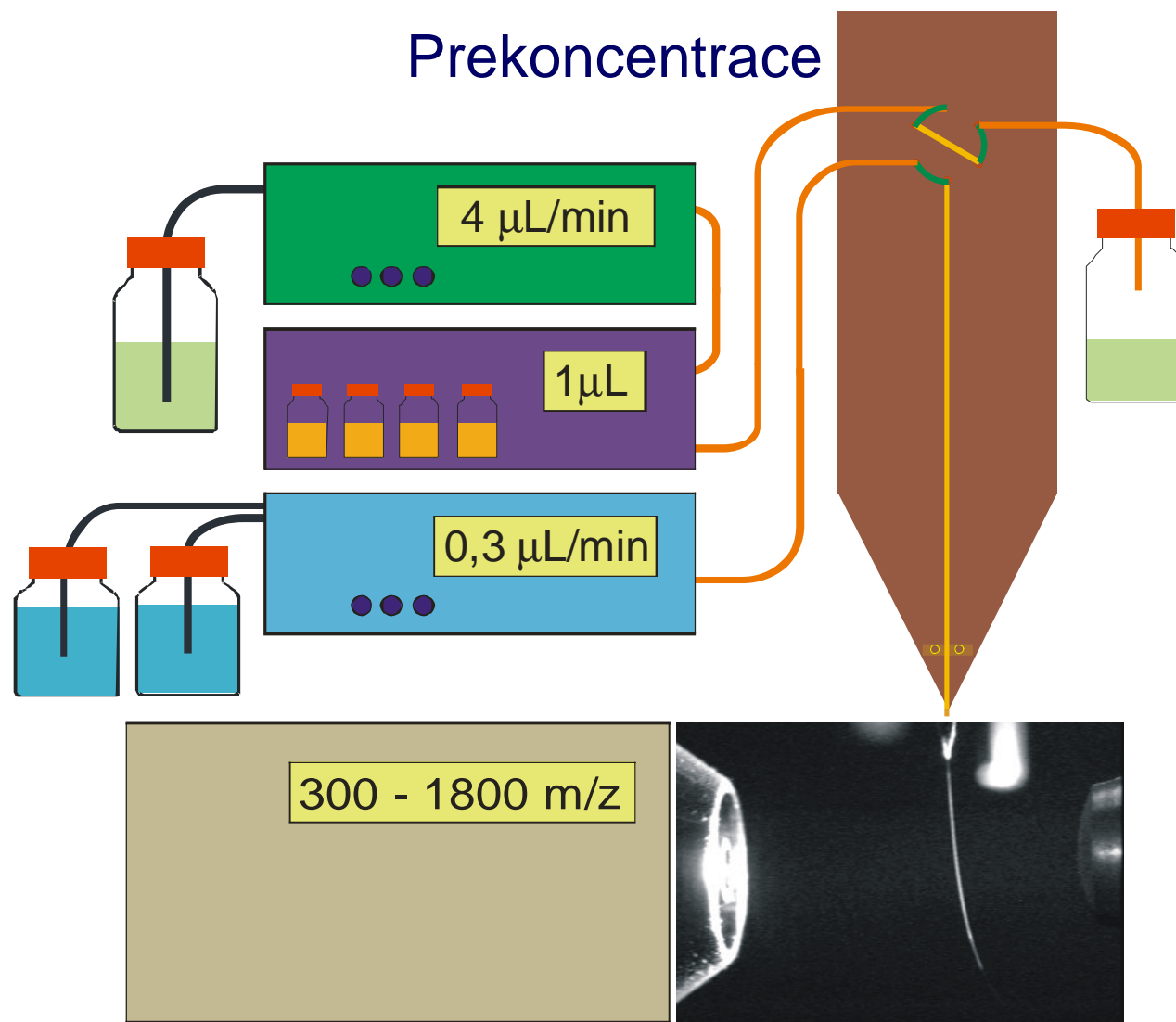


# Přednosti a nevýhody CLC

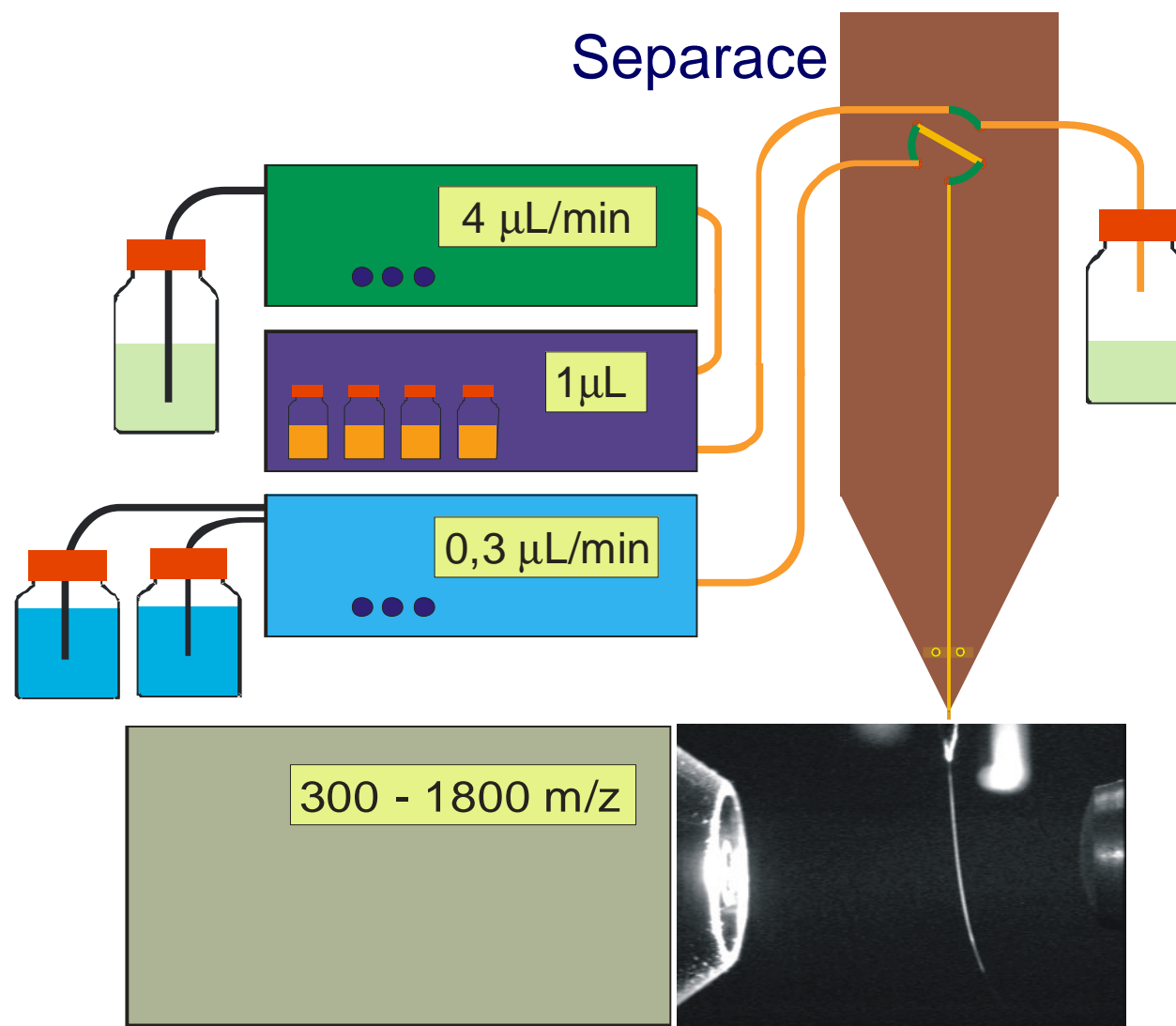
vhodná pro neutrální látky a ionty  
(rozdílná distribuce mezi mobilní a stacionární fází)

1. velká separační účinnost
  2. velká selektivita
  3. možnost gradientové eluce
  4. velká robustnost
  5. výborná opakovatelnost a reprodukovatelnost
  6. možnost validace
  7. dobrá kompatibilita s MS detekcí
- 
1. komplikovaná příprava separační kolony
  2. pomalejší vývoj metody
  3. delší doba analýzy
  4. větší spotřeba vzorku
  5. látky z předchozí analýzy mohou zůstat v koloně

# Nano-HPLC na čipu



# Prekoncentrace a separace



# Čip a jeho příslušenství



# Přednosti a nevýhody nano-HPLC na čipu

vhodná pro neutrální látky a ionty  
(rozdílná distribuce mezi mobilní a stacionární fází)

1. výborná kompatibilita s MS detekcí
2. dobrá selektivita, robustnost a opakovatelnost
3. žádná šroubovací spojení
4. prekoncentrace vzorku
5. možnost výměny plastového čipu po několika analýzách

1. nestabilita nanoelektrospreje
2. reprodukovatelnost čipů
3. instrumentální náročnost na pumpy
4. instrumentální náročnost na dávkovací ventil
5. obtížná výroba čipu ve vlastní laboratoři



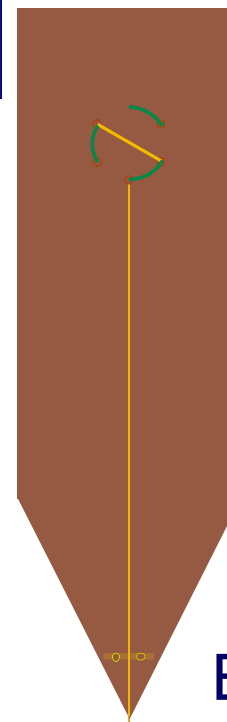
# Identifikace bílkovin pomocí nano-HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>

1. bílkovina
2. štěpení trypsinem
3. specifické peptidy
4. separace na čipu
5. elektrosprej
6. hmotnostní spektrometrie
7. sekvence aminokyselin
8. porovnání s databází
9. identifikace peptidů
10. identifikace bílkoviny

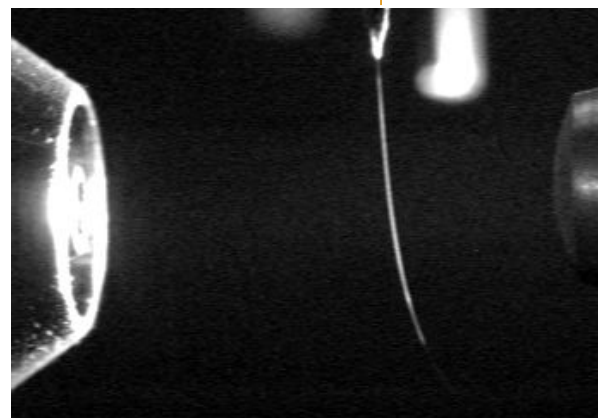
**proteomika**

MS<sup>2</sup>

nano-HPLC



ESI

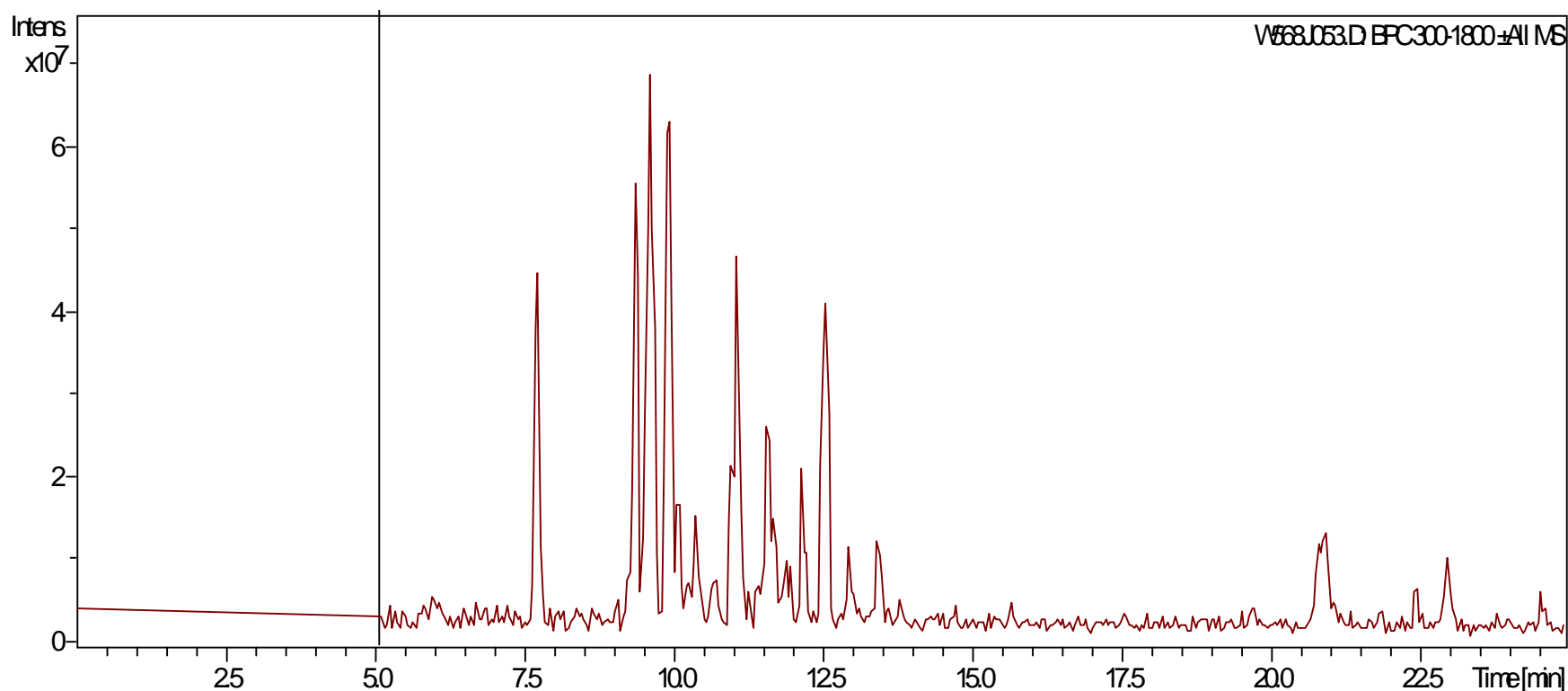


# Chromatogram

Identifikováno 10 fmol hovězího  $\alpha$ -S1 kaseinu.

70 ze 214 aminokyselin, 3 peptidy identifikovány, 32% pokrytí

MKLLILTCLVAVALARPK**HPIKHQGLPQEV****LNENLLRFFVAPFPEVFGKEK**VNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESI  
SSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERY**LGYLEQLLR**LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE**GIHAQQKEPMIGVNQELAYF**  
**YPELFR**QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW



# Štěpení bílkovin trypsinem

**Trypsin** je bílkovina o  $M_r = 23300$ .

Enzym katalyzující hydrolýzu peptidických vazeb za **Lys** (K) a **Arg** (R) nenásleduje-li **Pro** (P).

hovězí  $\alpha$ -S1 kasein

MKLLILTCLVAVALARPK**HPIKHQGLPQEV**LNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNE  
LSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEASISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSE**RYLGY**  
**LEQLLR**RLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE**GIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPE**  
**LFR**QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

**YLGYLEQLLR**

$H_3N^+$ -Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-COOH

# Fragmentace peptidu v MS

## Kolizí indukovaná disociace (CID)

srážkou iontu peptidu s atomem hélia v iontové pasti MS dochází k fragmentaci peptidu na peptidické vazbě **-CO-NH-** a vznikají fragmenty **b** a **y**.

YLGYLEQLLR<sup>+</sup>

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-COOH

Y <sup>+</sup>	b <sub>1</sub>	LGYLEQLLR <sup>+</sup>	y <sub>9</sub>
YL <sup>+</sup>	b <sub>2</sub>	GYLEQLLR <sup>+</sup>	y <sub>8</sub>
YLG <sup>+</sup>	b <sub>3</sub>	YLEQLLR <sup>+</sup>	y <sub>7</sub>
YLG <sup>+</sup> Y <sup>+</sup>	b <sub>4</sub>	LEQLLR <sup>+</sup>	y <sub>6</sub>
YLG <sup>+</sup> YL <sup>+</sup>	b <sub>5</sub>	EQLLR <sup>+</sup>	y <sub>5</sub>
YLG <sup>+</sup> YLE <sup>+</sup>	b <sub>6</sub>	QLLR <sup>+</sup>	y <sub>4</sub>
YLG <sup>+</sup> YLEQ <sup>+</sup>	b <sub>7</sub>	LLR <sup>+</sup>	y <sub>3</sub>
YLG <sup>+</sup> YLEQL <sup>+</sup>	b <sub>8</sub>	LR <sup>+</sup>	y <sub>2</sub>
YLG <sup>+</sup> YLEQLL <sup>+</sup>	b <sub>9</sub>	R <sup>+</sup>	y <sub>1</sub>

# Experimentální podmínky

## kapalinová chromatografie

gradientová eluce: eluent A: voda s 0,1 % HCOOH  
eluent B: acetonitril s 0,1 % HCOOH

0 min	2% B
40 min	42% B
42 min	85% B
44 min	85% B
45 min	2% B
50 min	2% B

průtok nanopumpy: 300 nL/min

průtok kapilární pumpy: 4 µL/min eluentu A

objem vzorku: 1 µL, prekoncentrace vzorku: 5 minut

## hmotnostní spektrometrie

sušící plyn: N<sub>2</sub>, průtok: 2,5 L/min, teplota 230 °C

napětí ESI: -2400 V, skenovaný rozsah: 300 – 1800 m/z

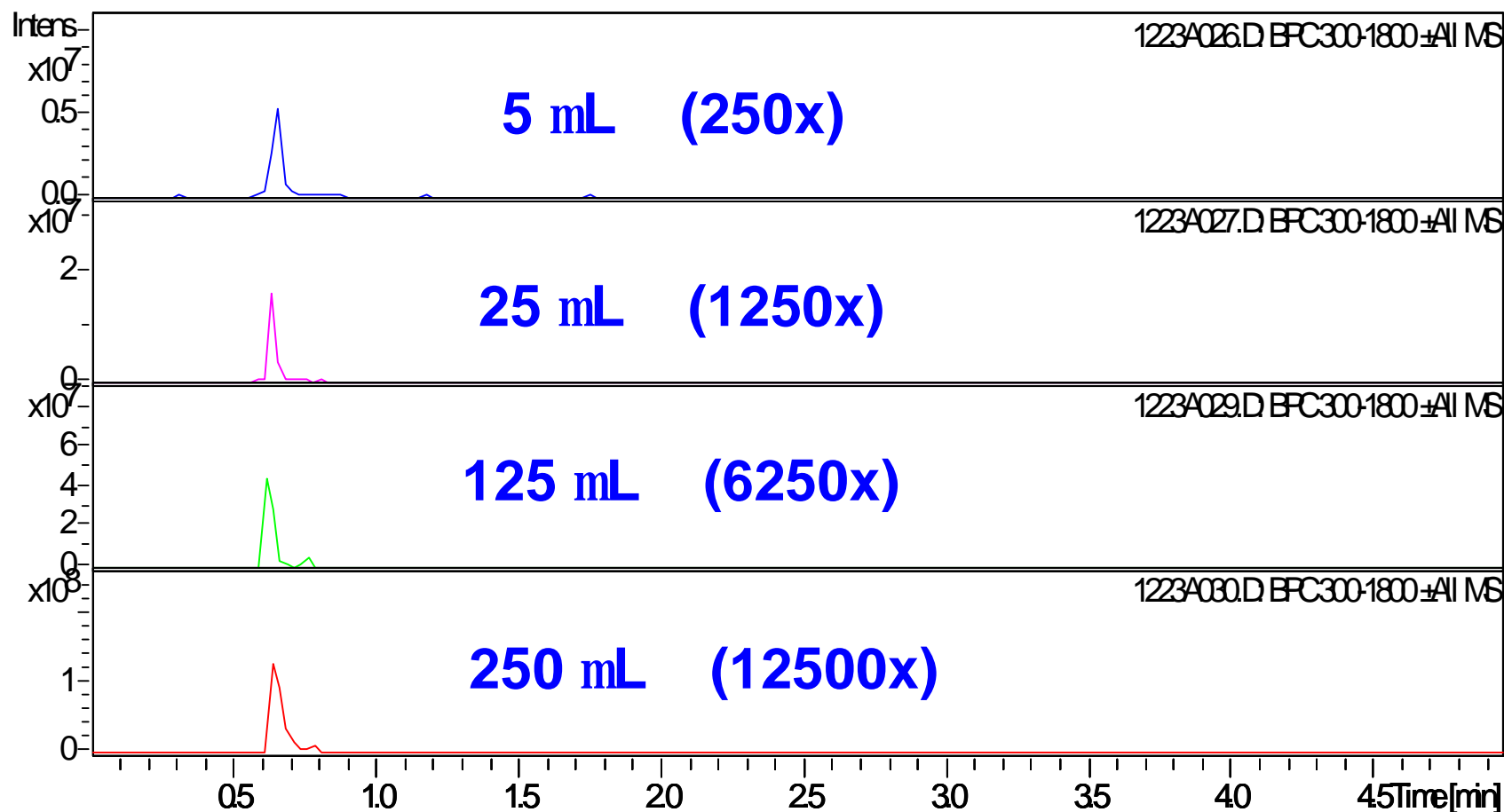
# Pohled analytického chemika

1. Účinnost prekoncentrace
2. Účinnost separace
3. Kontaminace vzorku
4. Tlaková stabilita

# Prekoncentrace velkých objemů

Příslušný objem angiotensinu o koncentraci 0,1 ppm  
byl zachycen na prekoncentrační kolonce o objemu 20 nL.

angiotensin III: Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe



# Účinnost separace

Objem vzorku	Retenční čas	Patra na koloně	Patra na 1 m	HETP
5 mL	0,7 min	1800	60000	16 mm
25 mL	0,6 min	1900	63000	15 mm
125 mL	0,6 min	1100	37000	27 mm
250 mL	0,6 min	661	22000	45 mm



# Kontaminace vzorku

## Analýza

2262D003.D

2262D004.D

2262D005.D

2262D006.D

2262D007.D

2262D008.D

2262D009.D

2262D010.D

2262D011.D

2262D012.D

2262D013.D

2262D014.D

2262D015.D

2262D016.D

2262D017.D

2262D018.D

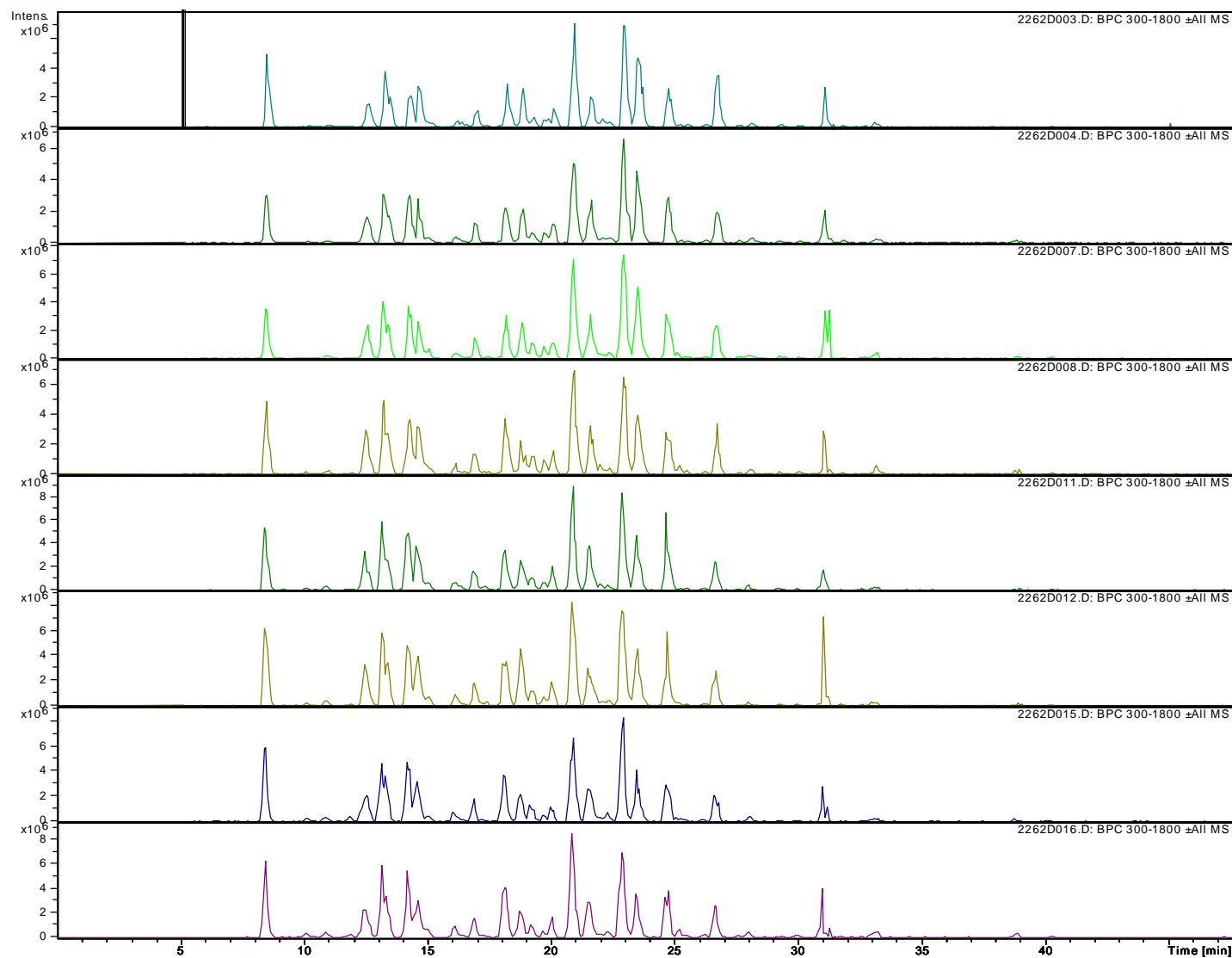
1.vzorek: hovězí sérový albumin (100 nM BSA)  
2.vzorek: deionizovaná voda s 0,1 % HCOOH

## Podmínky dávkování

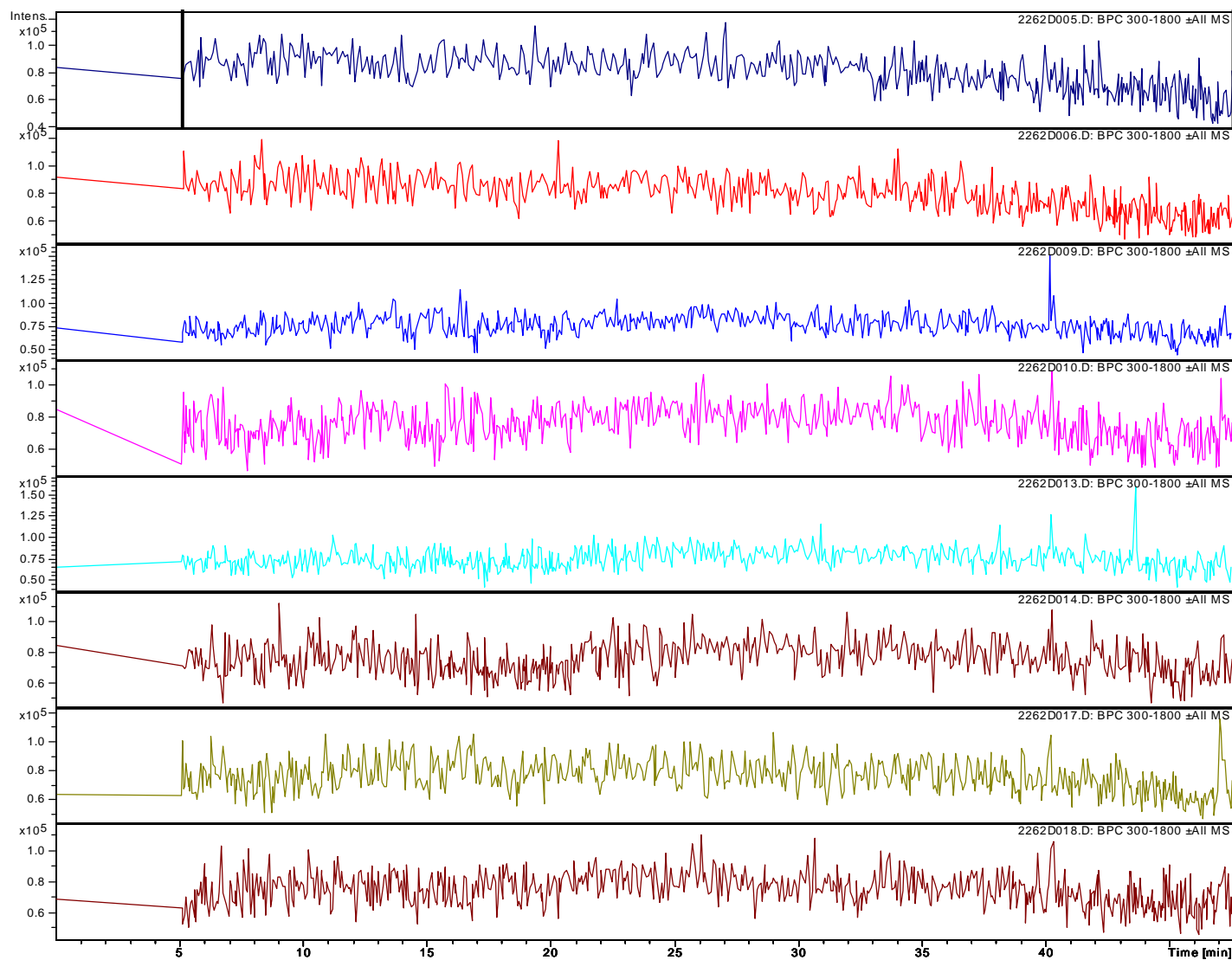
0,1 pmol BSA nadávkován v 1  $\mu$ L vzorku  
a prekoncentrován po dobu 5 minut.

Omytí dávkovací jehly deionizovanou vodou  
s 0,1 % HCOOH po dobu 5 sekund.

# Chromatogramy 1.vzorku



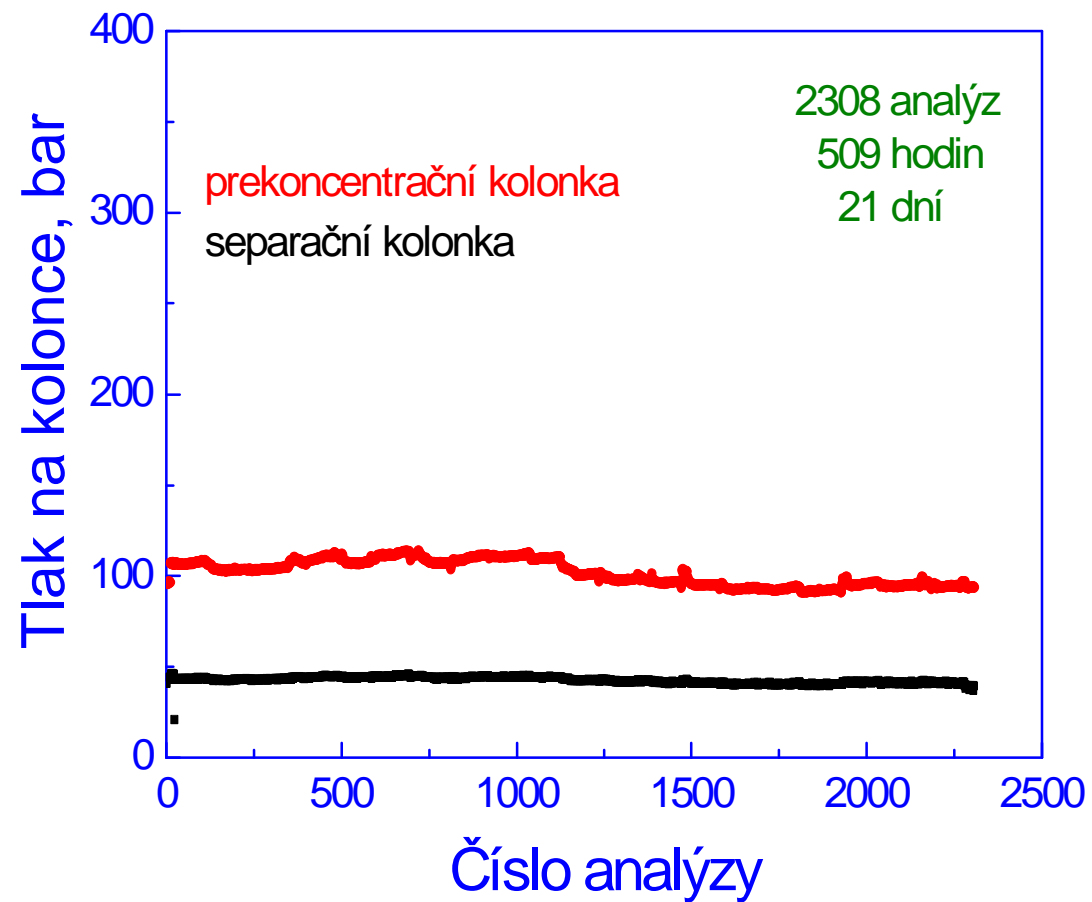
# Chromatogramy 2.vzorku



## Nalezené peptidy ve vzorcích

Analýza	Vzorek	Počet peptidů BSA
2262D003.D	BSA	10
2262D004.D	BSA	10
2262D005.D	voda	0
2262D006.D	voda	0
2262D007.D	BSA	11
2262D008.D	BSA	11
2262D009.D	voda	0
2262D010.D	voda	0
2262D011.D	BSA	14
2262D012.D	BSA	10
2262D013.D	voda	0
2262D014.D	voda	0
2262D015.D	BSA	10
2262D016.D	BSA	10
2262D017.D	voda	0
2262D018.D	voda	0

# Tlaková stabilita



# Izolace, analýza a identifikace bílkovin v přírodních vzorcích

semena rýže, semena čočky, lidský nehet

- a) homogenizace
- b) rozpouštění v 1 M močovíně
- c) srážení kyselinou trifluoroctovou
- d) centrifugace
- e) promytí acetonem
- f) rozpuštění v 8 M močovíně a 0,4 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- g) redukce dithiotreitem
- h) alkylace jodacetamidem
- i) enzymatické štěpení trypsinem

# Rýže

Bílkovina	Označení	Množství vzorku, ng	Pokrytí %	Počet peptidů
13 kDa Prolamin	P17048	12	27	2
Prolamin PPROL 7	P19085	12	23	2
Glutelin type-A 2	P07730	12	15	4
Glutelin type-A 1	P07728	12	14	4
Prolamin PPROL 17	P20698	12	12	1
Glutelin	P14614	12	11	5
Glutelin type-B 2	Q02897	12	9	6
Glutelin type-B 1	P14323	12	4	2
G1/S-specific cyclin C-type	P93411	24	10	3
Granule-bound starch synthase I, chloroplast	P19395	24	7	3
Glutelin type-A III	Q09151	60	10	5
Chloroplast 30S ribosomal protein S11	P12096	120	14	2
19 kDa Globulin	P29835	120	13	2

# Čočka

Bílkovina	Označení	Množství vzorku, ng	Pokrytí %	Počet peptidů
Vicilin	P13918	1,2	29	13
Provicilin	P02854	1,2	19	11
Legumin A	P02857	1,2	7	4
Provicilin	P02855	2,4	25	8
Convicilin	P13915	2,4	5	3
Legumin B	P14594	2,4	3	1
Legumin J	P05692	6,0	8	2
Legumin A2	P15838	6,0	2	1
Convicilin	P13919	12	10	4
Lectin	P02870	12	9	2
Seed lipoxygenase-3	P09918	60	1	1
Beta-conglycinin	P13916	120	2	1
Seed lipoxygenase-2	P14856	120	1	1



# Lidský nehet

Bílkovina	Označení	Množství vzorku, ng	Pokrytí %	Počet peptidů
Keratin, type I cytoskeletal 14	P02533	1,2	23	8
Keratin, type I cytoskeletal 16	P08779	1,2	22	10
Keratin, type I cytoskeletal 12	Q99456	1,2	6	3
Keratin, type I cytoskeletal 13	P13646	1,2	5	2
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	6,0	3	2
Keratin, type I cytoskeletal 17	Q04695	24	16	7
Keratin, type II cytoskeletal 6A	P02538	24	9	4
Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	24	5	3
Calmodulin-like protein 5	Q9NZT1	60	20	2
Keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	60	12	6
Keratin, type II cytoskeletal 5	P13647	60	3	1

# Nano-HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>

umožňuje **identifikovat** jednotlivé **proteiny**  
v komplexních směsích bílkovin  
přímo izolovaných  
z přírodních materiálů.

# Nano-HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>

je vynikajícím analytickým nástrojem  
pro identifikaci bílkovin  
v přírodních vzorcích  
obsahujících komplexní směsi bílkovin,  
tedy vynikajícím analytickým nástrojem  
v proteomice.

**Děkuji Vám za pozornost.**

Chemický  
ústav

Přírodovědecká  
fakulta

Univerzita Karlova  
v Praze

