



# **Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek**

**Praha  
2006**

Tato skripta vznikla pro potřeby kurzu „**Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek**“, pořádaného v rámci projektu „Pražské analytické centrum inovací“ CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu JPD3 „Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací“. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky.

Odborný garant prof. Ing. Karel Štulík, DrSc.  
Technická redakce RNDr. Eva Juláková, CSc.

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>Obecný úvod do problematiky .....</b>	<b>3</b>
	<i>Karel Štulík</i>	
1.1	Vymezení tématiky probírané v kursu	
1.2	Typy analýz biologicky aktivních látek	
1.3	Současná analytická chemie	
1.4	Analytické separace organických látek	
1.5	Závěr	
<b>2.</b>	<b>Moderní separační techniky.....</b>	<b>11</b>
	<i>Pavel Coufal</i>	
2.1	Úvod	
2.2	Kapilární elektroforéza	
2.3	Kapilární kapalinová chromatografie	
2.4	Kapilární monolitické kolony	
2.5	Závěr	
<b>3.</b>	<b>HPLC/MS a CE/MS .....</b>	<b>19</b>
	<i>Ivan Jelínek</i>	
3.1	Úvod	
3.2	Tandemová hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií	
3.3	Volba separačních kolon a mobilní fáze v LC-MS	
3.4	Aplikační oblast LC-MS	
3.5	Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie (CE-MS)	
3.6	Optimalizace experimentálních podmínek v CE-MS	
3.7	Aplikační oblast	
<b>4.</b>	<b>Afinitní chromatografie .....</b>	<b>28</b>
	<i>Věra Pacáková a Tereza Vařilová</i>	
4.1	Úvod	
4.2	Princip metody	
4.3	Nosiče pro afinitní chromatografii	
4.4	Aktivace nosičů pro afinitní chromatografii	
4.5	Imobilizace afinitního ligantu na tuhý nosič	
4.6	Blokace nezreagovaných aktivních skupin	
4.7	Stanovení množství imobilizovaného ligantu	
4.8	Příklady použití afinitní chromatografie	
4.9	Závěr	
<b>5.</b>	<b>Afinitní techniky .....</b>	<b>36</b>
	<i>Věra Pacáková a Tereza Vařilová</i>	
5.1	Úvod	
5.2	Principy afinitní elektroforézy	
5.3	Analýza rovnovážných směsí	
5.4	Analýza založená na změně mobilit	
5.5	Požadavky na CE systém	
5.6	Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze	
5.7	Příklady použití ACE	
5.8	Závěr	
<b>6.</b>	<b>Chirální separace .....</b>	<b>45</b>
	<i>Zuzana Bosáková</i>	
6.1	Cyklodextriny	
6.2	Makrocyclická antibiotika (MA)	

<b>7.</b>	<b>Separace aminokyselin a příbuzných látek .....</b>	<b>53</b>
	<i>Petr Šimek a Petr Hušek</i>	
7.1	Úvod	
7.2	Extrakce AK z matrice a příprava vzorku k separaci	
7.3	Přehled současných hlavních metod vysoceúčinné separace AK a příbuzných látek	
7.4	Závěr	
<b>8.</b>	<b>Separace peptidů .....</b>	<b>61</b>
	<i>Jana Suchánková</i>	
8.1	Úvod	
8.2	Chromatografické separační techniky	
8.3	Elektromigrační separační techniky	
8.4	Závěr	
<b>9.</b>	<b>Separace proteinů – MALDI .....</b>	<b>67</b>
	<i>Jiří Hudeček</i>	
9.1	Separační metody v chemii proteinů	
9.2	Separační metody v proteomice	
9.3	Hmotnostní spektrometrie a proteomika	
<b>10.</b>	<b>Mikrofluidika a nanotechnologie pro proteomiku .....</b>	<b>77</b>
	<i>František Foret</i>	
10.1	Úvod	
10.2	Technologie	
10.3	Závěr	
<b>11.</b>	<b>Glykoproteomika .....</b>	<b>83</b>
	<i>Miloš V. Novotný</i>	
11.1	Importance of Glycosylation	
11.2	Glycoproteins: Basic Structural Aspects and Tools	
11.3	Isolation of Glycoproteins and Direct Analysis	
11.4	Site-OF-Glycosylation Determinations	
11.5	Investigations at Glycan Level	
11.6	Developing Analytical Platforms	
<b>12.</b>	<b>Chromatografické metody v analýze lipidů a mastných kyselin .....</b>	<b>95</b>
	<i>Eva Tvrzická</i>	
12.1	Úvod	
12.2	Lipoproteiny	
12.3	Apoproteiny	
12.4	Jednoduché lipidy	
12.5	Stanovení jednotlivých lipidových tříd	
12.6	Stanovení molekulárních druhů lipidových tříd	
12.6	Stanovení mastných kyselin, sterolů a alkoholů	
12.7	Složené lipidy	
<b>13.</b>	<b>Extrakce stlačenými tekutinami k přípravě organických vzorků pro analýzu .....</b>	<b>106</b>
	<i>Michal Roth</i>	
13.1	Úvod	
13.2	Superkritická fluidní extrakce	
13.3	Extrakce stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla ( <i>pressurized fluid extraction, PFE</i> )	
13.4	Extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou	

# 1. OBECNÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

*prof. Ing. Karel Štulík, DrSc.*

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2

[stulik@natur.cuni.cz](mailto:stulik@natur.cuni.cz)

## 1.1 Vymezení tématiky probírané v kursu

Analýza biologicky aktivních látek je neobyčejně rozsáhlé a složité pole. Zasahuje do mnoha oblastí lidského života. Bez spolehlivých analýz se neobejde výzkum v biologii, lékařství či v environmentalistice, právě tak jako každodenní život, kdy lékařská a veterinární praxe, kontrola životního prostředí či hygienická kontrola vyžadují denně obrovské počty stanovení. S rozširováním našich znalostí o zákonitostech života roste počet hodnot, které je třeba určit a zvyšují se nároky na kvalitu stanovení a jejich aplikační flexibilitu. To vše, spolu se specializovanými nároky odběratelů analytických výsledků z nejrůznějších oborů lidské aktivity, vede k velkému tlaku na zdokonalování analytických technik a na zjednodušování jejich aplikace. Tento kurz, v rámci PACI, chce přispět k informacím o současném stavu analýzy biologicky aktivních látek a o výhledech do nejbližší budoucnosti, přičemž se koncentruje na jednu ze zásadních složek analytického postupu, na separační krok..

Především je zapotřebí vymezit probírané pole, protože snaha o vyčerpávající zpracování celé oblasti je předem odsouzena k nezdaru:

1. Co je **biologicky aktivní látka** – zcela obecně řečeno, prakticky všechny existující látky jsou více či méně biologicky aktivní, tj., ovlivňují život organismů. V tomto kurzu se zabýváme pouze těmi skupinami látek, které se buď přímo podílejí na stavbě a fungování organismů, nebo jejich funkci zásadně ovlivňují. Přestože některé prvky a některé anorganické sloučeniny jsou biologicky velmi významné, nebudeme se jimi zabývat a budeme se věnovat pouze organickým sloučeninám.
2. Základní schéma výstavby a funkce organismů spočívá na řadě organických sloučenin, která, velmi zhruba řečeno, počíná aminokyselinami a pokračuje peptidy, až po proteiny; je zde samozřejmě řada bočních větví. Druhou podstatnou skupinou jsou sacharidy. Tyto dvě skupiny a všechny jejich kombinace jsou základem probírané problematiky. Pozornost věnujeme i lipidům, jako třetímu základnímu stavebnímu kameni živé hmoty.
3. Jemně vyladěné interakce, které umožňují a řídí život, jsou mnohdy závislé na optické izomerii – až na výjimky, L-izomery přejí životu, zatímco D-izomery nebývají v živé hmotě přítomny a jsou buď biologicky inaktivní, nebo pro organismy i toxické. Proto je problematika chirálních separací důležitou součástí kurzu.
4. Jak plyne z výše uvedeného, rozmanitost analyzovaných systémů je neobyčejně velká a požadavky na analýzy se pohybují ve velmi širokých mezích, podle účelu stanovení. Analyzované vzorky se liší jak charakterem a složitostí matrice, tak komplikovaností systému analytů. Další přednášky tohoto kurzu uvádějí některé možnosti řešení, z hlediska separačního stupně v analytickém postupu..

## **1.2 Typy analýz biologicky aktivních látek**

Analýzy biologicky aktivních látek lze rozdělit do více skupin, podle různých hledisek:

**(1) Podle charakteru činnosti, která analýzy využívá:**

- (a) výzkum;
- (b) rutinní aktivity.

Zatímco obě tyto činnosti jistě budou požadovat zcela obecné kvality analytického postupu, jako jsou spolehlivost měření, dostačná selektivita a citlivost a co nejnižší finanční náklady, při výzkumných pracech bude kladen velký důraz na flexibilitu analýzy a možnosti modifikací procedury podle stále vznikajících nových požadavků. Na druhé straně výzkum mnohdy strpí, i když s těžkým srdcem, složitost a časovou náročnost analytického postupu a případně i zvýšené náklady. Rutinní aplikace naopak budou vyžadovat konstantní postup, dokonale ověřený pro daný účel, nepříliš složitý, aby jej mohli provádět i pracovníci nespecializovaní na analytickou chemii, pokud možno co nejrychlejší a nejlacinější.

**(2) Podle obecného zadání analytického problému:**

- (a) (identifikace a) stanovení jediného analytu, často ve velmi složité matrici vzorku;
- (b) (identifikace a) stanovení velké skupiny analytů, které si mohou být velmi podobné a mohou být přítomny ve velmi složitých matricích;
- (c) (identifikace a) stanovení isomerů určité látky (určitých látek), např. enantiomerů;
- (d) sledování přeměn určité látky (určitých látek), např. rozklad mateřské látky a vznik produktu(ů), v mnoha případech včetně určení kinetiky reakce (reakcí).

V případě (d) samozřejmě výrazně vystupuje do popředí časový faktor – nejlepším přístupem je jistě kontinuální monitorování.

**(3) Podle charakteru analytů a matric vzorků:**

Zde je nepřeberné množství možností, které ovlivňuje výběr měřicí metody a volbu experimentálních podmínek.

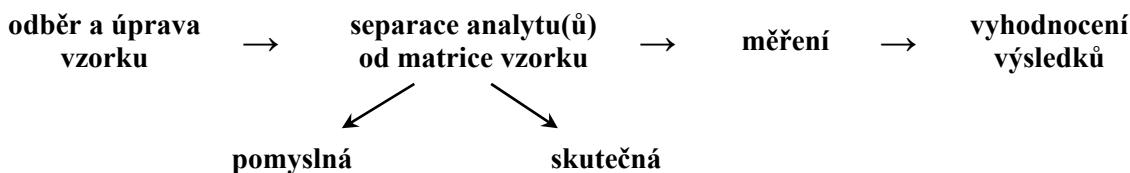
**(4) Podle účelu konkrétního měření:**

- (a) co nejrychlejší a nejjednodušší orientační sledování přetržitých hodnot určitého parametru (např. glukosa u diabetiků);
- (b) co nejjednodušší monitorování určitých parametrů (např. analytická kontrola při dialýze na umělé ledvině);
- (c) periodická kontrolní měření nejrůznějších klinických, biochemických, hygienických a environmentálních faktorů;
- (d) systematické sledování rozsáhlého problému měřeními téhož typu – např. genomika, proteomika, cellomika, .... ;
- (e) analytická kontrola všemožných přírodních či vyráběných látek, např. léčiv;
- (f) spolupráce na výzkumu nově objevených či připravených látek – formule, struktura, konformace, čistota, ....

Je zcela zřejmé, že řešení takto rozsáhlého komplexu problémů vyžaduje nasazení co nejširší palety analytických prostředků. Co tedy má současná analytická chemie k dispozici?

### 1.3 Současná analytická chemie

Jakýkoli analytický postup lze znázornit tímto obecným schématem:



Zjistit přítomnost určité látky v objektu našeho zájmu a event. stanovit její množství lze totiž pouze měřením. Měřit pak umíme jediným způsobem (s výjimkou měření přirozené radioaktivity a spektroskopie vesmírného záření): systému dodáme definovaným a reprodukovatelným způsobem určitou energii (např. tepelnou, zářivou, elektrickou), tím systém perturbujeme (vyvedeme z rovnovážného či ustáleného stavu) a pak sledujeme bud' množství energie, kterou systém absorbuje, nebo množství energie, která se uvolní při následném přechodu systému zpět do stavu s nižší energií či do původního stavu. Jde nyní o to odlišit množství energie absorbované či uvolněné látkou, která nás zajímá (analytem), od energie absorbované či uvolněné ostatními složkami systému.

Je přirozeně nejvýhodnější, dovoluje-li toto odlišení vlastní, dostatečně selektivní měřicí metoda. Pak dokážeme oddělit měřenou hodnotu odpovídající charakteru a množství analytu (signál) od hodnoty dané sumou všech ostatních složek systému (pozadí, šum), provedeme tedy pomyslnou separaci. V současnosti existují neobyčejně selektivní metody, např. hmotnostní spektrometrie, vibrační spektrometrické metody či spektrometrie NMR, přesto však analýz, které vystačí s pomyslnou separací, je podstatně méně než těch, které vyžadují separaci skutečnou, vzhledem ke složitosti systémů analytů a matric vzorků – jak uvedeno výše, je např. třeba stanovovat stopy látek ve velmi složitých matricích, dále pak je stále častěji zapotřebí jediným postupem stanovovat velký počet látek, které se od sebe velmi málo liší strukturou či hmotností. Při většině analýz se proto musíme uchýlit ke skutečné separaci analytu(ů) od matrice a většinou i k separaci analytů mezi sebou, před vlastním měřením. A zde jsme u vlastního tématu tohoto kurzu.

V poslední době došlo k nevýdanému rozvoji experimentálních technik, kterých využívá řada oborů a mezi nimi i analytičtí chemici. Zcela obecně platný je pokrok ve výpočetních metodách, sloužících jak pro navrhování a řízení experimentů, tak pro zpracování experimentálních výsledků a modelování procesů a systémů. Právě tak se nesmírně rychle rozvíjí technologie měřicích přístrojů. V kontextu tohoto kurzu nás zajímají především pokroky v prostředcích separace látek a navazujících způsobech měření na výstupu ze separačních systémů. Řadou konkrétních aspektů této problematiky se zabývají jednotlivé přednášky kurzu, v této úvodní přednášce je však namísto povídat si některých obecnějších rysů.

Lze myslí říci, že rozvoj technologie separací a následných měření je výraznější než pokrok v objevování nových separačních a měřicích principů. Zatímco zdokonalování technologie chromatografických kolon, obrovský rozvoj elektromigračních technik, miniaturizace a čipová technologie a nevýdaný pokrok v hmotnostní spektrometrii, která se již stala zcela běžnou součástí analytického repertoáru, jsou hlavní nosné směry, zcela nových přístupů ke stanovením a separacím je pomalu. Vidíme vlastně jen jeden, i když velmi významný, a tím je využití enzymatických a imunochemických interakcí pro vysoko selektivní měření i separace. Vznikají tak téměř specifické sensory a afinitní metody separací.

## 1.4 Analytické separace organických látek

Kdyby to bylo možné, používali bychom všichni **plynovou chromatografií**, která má řadu výhod: je jednoduchá, procesy v plynné fázi jsou rychlé, systém není příliš vzdálen ideálnímu chování a je tedy relativně snadné dospět k teoretickým modelům a interpretovat výsledky měření. Bohužel je plynová chromatografie omezena na látky, které lze bez rozkladu a za přijatelných experimentálních podmínek převést do plynné fáze - to není více než asi 30 % známých látek. Počet stanovitelných analytů lze poněkud rozšířit převedením málo těkavých látek na těkavější deriváty, tím se však analytický postup komplikuje. Navíc při vyšších teplotách, zvláště při styku s částicemi nosiče, může docházet k vedlejším reakcím těkavějších složek. Dále pak mobilní fáze v plynové chromatografii, nosný plyn, je inertní a tudíž neumožňuje ovlivňovat separaci.

**Kapalinová chromatografie** je složitější než chromatografie plynová a nevýhodná v tom, že všechny děje v kondenzovaných fázích jsou pomalejší a složitější než ve fázi plynné. Systém je tedy vzdálen ideálnímu chování a teoretické modely se tvoří těžko. Kromě toho je metoda poměrně pomalá, méně účinná než plynová chromatografie a podstatně nákladnější. Výhodou ovšem je to, že komplex technik, které dohromady tvoří celek kapalinové chromatografie, umožňuje dělit přinejmenším 80 % všech známých látek a složitost systému umožňuje ladit podmínky separace změnami stacionární i mobilní fáze.

Mezi těmito dvěma krajnostmi leží **chromatografie v nadkritické tekutině (SFC)**, která je jakýmsi kompromisem mezi plynovou a kapalinovou chromatografií, trpí však nepříliš rozsáhlým výběrem separačních systémů, a různé techniky **kapilární elektroforézy**, které jsou vysoce účinné, rychlé, avšak poněkud méně spolehlivé než chromatografické techniky, přičemž možnosti ovlivnění separačního děje jsou doposud menší než v kapalinové chromatografii.

Konečně je třeba mít na paměti rutinní použití **separací v plošném uspořádání**, které jsou empirické, avšak jednoduché, rychlé a nepříliš nákladné; mají proto velmi důležitou roli především v biomedicínském výzkumu i praxi (viz např. dělení a identifikace peptidů a proteinů dvojrozměrnou elektroforézou na vrstvě gelu, kde se látky v jednom rozměru dělí podle náboje, tedy podle izoelektrického bodu, a ve druhém rozměru podle své molekulové hmotnosti).

Přednášky v tomto kursu se blíže zabývají některými konkrétními metodickými otázkami analytických separací z hlediska aplikací na důležité skupiny biologicky aktivních organických látek. V tomto obecném úvodu bych chtěl upozornit na důležitou tendenci současné experimentální chemie, která přesahuje hranice analytické chemie, má však pro její rozvoj zcela zásadní význam. Vychází ze dvou příčin: na jedné straně je to nesmírný **vzrůst požadavků na experimentátora**, jak z hlediska stále větší složitosti studovaných systémů, tak z hlediska nároků na objem a kvalitu získávaných informací. Na straně druhé je to velmi rychlý **růst technických možností**, takže lze realizovat experimentální přístupy ještě donedávna nemyslitelné. Touto tendencí jsou kombinace a vzájemná propojení více měřících metod při řešení daného problému. Jednodušší, avšak těžkopádnější možností je následné použití většího počtu metod, tedy to, co se anglicky označuje jako spojení „*off-line*“. Stále více se však uplatňuje přímé spojení, tedy anglicky „*on-line*“, či „*hyphenation*“.

Tato cesta, neobyčejně fascinující, však přináší jeden zásadní problém: jak donutit metody, které jsme vzájemně propojili, aby spolu nebojovaly, ale naopak v dobrém souladu pracovaly synergicky ke společnému cíli. Je zajímavé, že mnohdy se vztahy takto spojených metod velmi podobají mezilidským vztahům. Z hlediska analytických separací má tento problém dva stupně:

- (a) kombinace separačního a detekčního kroku;
- (b) kombinace dvou (či dokonce více) separačních kroků, následovaná detekcí (jednoduchou či kombinovanou).

Musíme tedy najít experimentální podmínky, které nejsou zcela nepřijatelné pro žádného člena systému a hlavně musíme ustanovit dohazovače (interface), který spolupráci členů dojedná. Pro ilustraci uvedu pár poznámek ke kombinaci separace a detekce a příklad vztahů mezi dvěma z nejdůležitějších separačních metod, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou.

#### **(a) Vztah mezi separací a detekcí**

V ne tak dávné minulosti došlo k velkému posunu v nazírání na separační a detekční systém. Klasický pohled považuje detekci za koncovku vysokoúčinné separace a příliš se nestará o její vlastnosti – stačí, když je schopna zachytit zóny látek vycházejících ze separačního systému s postačující citlivostí a spolehlivostí. Při nepříliš složitých, většinou rutinních separacích je tomu tak dodnes. Mezitím však došlo k obrovskému rozvoji měřicích technik a nárustu požadavků na analýzy složitých systémů. Metody hmotnostní spektrometrie, vibračních spektrometrií, nukleární magnetické resonance a další se nyní staly běžnými detekčními technikami. Ale pozor - není tomu úplně tak! Zatímco klasická detekce, dejme tomu spektrometrická v UV/VIS oblasti, skutečně především sloužila pro pouhé zachycení látek vycházejících ze separační jednotky a tyto látky byly identifikovány a charakterizovány především na základě separačních charakteristik, moderní detekční techniky mají zásadní roli při identifikaci a charakterizaci separovaných látek. Vede to k tomu, že např. mnozí hmotnostní spektrometristé považují separační krok za předběžnou úpravu vzorku. Jak tomu bývá, pravda je kdesi uprostřed.

Rozhodně je nyní podstatně náročnější rozhodnout, jaká kombinace separačního a detekčního postupu je optimální. Odhlédneme-li od materiálních otázek, je stále zapořebí volit ten nejjednodušší systém, který poskytne požadované informace. Druhou zásadní otázkou je kompatibilita separační a detekční části – čím větší jsou rozdíly v požadavcích na experimentální podmínky, tím náročnější je volba a realizace rozhraní, neboli interface.

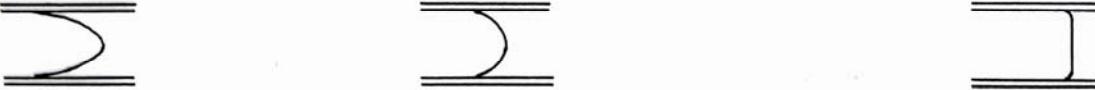
#### **(b) Kombinace více separačních kroků**

Těchto kombinací je velmi mnoho a opět zde platí dvě hlavní pravidla. Jednak volit co nejjednodušší systém, který poskytne dostatečný objem a kvalitu požadované informace, dále pak vybrat techniky, které jsou si co nejbližší z hlediska experimentálních podmínek, aby nebyly kladený těžko splnitelné požadavky na rozhraní (interface). Jako příklad uvádím srovnání některých vlastností dvou velmi důležitých technik, tradiční vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a dynamicky se vyvíjející kapilární elektroforézy (CE).

Myslím, že vztah mezi HPLC a CE se, jak uvedeno výše, v mnohém podobá lidským vztahům – HPLC je již zcela dospělý jedinec, má bohaté zkušenosti, široké známosti, je sebevědomý a umí se široce uplatnit, avšak někdy začíná být poněkud těžkopádný a konzervativní a je i dost náročný na peníze. Naproti tomu CE představuje dravé mládí – dychtivě se hrne vzhůru, zkušeností ještě tolik nepobralo, ale je ambiciozní, nabízí jednoduchá řešení, i když ne vždy plně opodstatněná, je rychlé, flexibilní a dokáže si poradit i v materiálně jednodušších podmírkách. Výhodou mládí CE je i schopnost se učit – hlavním problémem CE jsou omezené možnosti ovlivnění selektivity separačního systému a zde se s výhodou využívají zkušenosti staršího souputníka a vznikají hybridní techniky kapilární elektrochromatografie (CEC), micelární elektrokinetické chromatografie

(MEKC) a kapilární gelové elektroforézy (CGE). Naopak hlavní předností CE oproti HPLC je podstatně vyšší účinnost separace, daná především příznivější distribucí lokálních rychlostí v proudu kapaliny, dále pak i jednoduchostí a rychlostí interakcí analytů se separačním systémem; jak lze očekávat, hybridní techniky mají i hybridní vlastnosti, mezi krajnostmi HPLC a CE (viz tab. 1.1).

**Tab. 1.1:** Difuzní hranice mezi HPLC a CE

HPLC	CE			
	CEC	CGE	MEKC	CZE
stacionární fáze	stacionární fáze	polyakrylamidový gel	pseudostacionární fáze	nosný elektrolyt
mobilní fáze	nosný elektrolyt	nosný elektrolyt	nosný elektrolyt	
rozdělovací hydrofobní elektrostatická vylučovací	rozdělovací (hydrofobní, elektrostatická)	rozdělovací vylučovací	rozdělovací hydrofobní elektrostatická + rychlosť migracie micel	rychlosť migracie (náboj, hmotnosť)
<b>Hlavní rozdíl – hnací síla</b>				
Přetlak	Elektrické pole (gradient potenciálu)			
parabolický rychlostní profil	přechod mezi parabolickým a plochým profilem			plochý profil elektroosmotického toku
				

**Tab. 1.2:** Typické operační parametry HPLC a CE

Parametr	HPLC	CE
vzorek	1-50 µl	< 1-5 nl
objemový průtok	0,1-2,0 ml min <sup>-1</sup>	0,1-2,0 µl min <sup>-1</sup>
objem píku	cca 500 µl	1-10 nl
eluční čas píku	cca 30 s	1-5 s
doba analýzy	10-40 min	5-15 min
cena kolony či kapiláry	300 USD	cca 10-15 USD
cena mobilní fáze či nosného elektrolytu	cca 15-25 USD	cca 0,5-2,0 USD
počet teoretických pater	cca 10 <sup>4</sup>	cca 10 <sup>5</sup>
LOD (UV detekce)	cca 10 <sup>-7</sup> to 10 <sup>-9</sup> mol l <sup>-1</sup>	cca 10 <sup>-5</sup> to 10 <sup>-7</sup> mol l <sup>-1</sup>
reprodukovanost retenčních parametrů	< 2,0 %	< 5 %
přesnost a správnost stanovení	cca 2,0 %	cca 2,0-5 %

**Tab. 1.3:** HPLC a CE z hlediska detekce

Základní operační parametry HPLC a CE jsou schematicky shrnuty v tab. 1.2 a vlastnosti těchto technik z hlediska detekce analytů v tab. 1.3. Z těchto údajů plynou některé důležité závěry:

- a) CE je obecně jednodušší, levnější a rychlejší než HPLC a méně ovlivňuje životní prostředí (omezené použití organických rozpouštědel).
  - b) Objem vzorků pro CE je podstatně menší než u HPLC. Vzácné vzorky se proto snáze analyzují pomocí CE, avšak pro preparativní účely (i pro odběr frakcí pro následná měření) je daleko vhodnější HPLC.
  - c) CE poskytuje lepší hodnoty rozlišení než HPLC, avšak identifikace analytů bývá obtížnější.
  - d) Hodnota kapacity píků bývá poněkud menší u CE, zvláště použije-li se u HPLC gradientová eluce.
  - e) Vývoj nových postupů a jejich optimalizace je jednodušší a rychlejší u CE.
  - f) Spolehlivost kvantitativních analytických dat je poněkud horší u CE.
  - g) Z hlediska detekce přináší CE výhody v jednoduchosti realizace detekčních prostorů o malém objemu a dobře definované geometrii přímo v kapiláře, avšak citlivost detekce a paleta dostupných detekčních technik jsou prozatím horší ve srovnání s HPLC. Pro hmotnostně spektrometrickou detekci mají obě metody určitou nevýhodu buď ve složitosti eluátu (HPLC), nebo v přítomnosti silných elektrolytů (CE); u klasické HPLC je objem eluátu příliš velký, u CE bývá příliš malý – s rychlým rozvojem instrumentace jsou však tyto problémy řešitelné.

K nejdůležitějším kritériím patří aplikační rozsah. Zde jednoznačně vede HPLC, která reprezentuje rozsáhlou skupinu technik a umožňuje analýzy většiny známých látek. Za tuto výhodu ovšem platí složitost systému a mnohdy značnou empiričnost analytických postupů. Metoda CE nachází přímočaré využití především při analýzách malých iontů; analýzy nenabitých molekul o různé velikosti již vyžadují kroky, které ve větší či menší míře potlačují základní výhody CE, tj. jednoduchost, rychlosť a nenákladnost.

Myslím, že vše, co je uvedeno výše, jasně ukazuje, že HPLC a CE jsou kolegové, plnohodnotní partneři při řešení analytických problémů, že se vzájemně inspirují a doplňují jak při spojení „*off-line*“, tak v „*hyphenated systems*“.

## 11.5 Závěr

Víme všichni, jak nesmírně se rozšiřuje objem našich znalostí a možností řešení vědeckých i praktických problémů. Tento vývoj vede ke stále větší specializaci pracovníků a ke stále větším problémům v jejich vzájemné komunikaci. Domnívám se, že nedostatečná komunikace je jedním z největších problémů současného lidstva. Proto jsem se snažil v této úvodní přednášce zdůrazňovat společné rysy předmětu, kterým se zabývá tento kurs a důležitost širokého obecného rozhledu při řešení i velmi specializovaných úkolů. Doufám, že komunikaci napomůžeme i bohatou diskusí po přednáškách.

## 2. MODERNÍ SEPARAČNÍ TECHNIKY

*doc. RNDr. Pavel Coufal, Dr.,*

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2  
[pcoufal@natur.cuni.cz](mailto:pcoufal@natur.cuni.cz)

### 2.1 Úvod

Miniaturizace je významný směr dnešní doby, který zasahuje do všech oblastí vědeckého bádání a ovlivňuje výzkum a vývoj, technický pokrok a jakékoliv lidské činění. V posledních několika desítkách let se miniaturizace velmi významně začala projevovat a uplatňovat i v analytické chemii, neboť i tato vědní disciplína byla a je pod neustálým tlakem analytické praxe na zvýšení citlivosti, zlepšení selektivity, zrychlení analýzy, zmenšení vzorku, použití méně běžných substancí, snížení neurčitosti, zajistění správnosti a přesnosti, snížení nákladů a minimalizaci vlivu na životní prostředí. Analytické postupy založené na metodách využívajících přednosti miniaturizace dokáží mnohem lépe vyhovět všem těmto náročným požadavkům analytické praxe. Kapilární separační techniky, jako je kapilární elektroforéza a kapilární kapalinová chromatografie, jsou pak důsledkem rozvoje miniaturizace v oblasti analytických separačních metod.

V posledních letech dosáhla miniaturizace v analytických separačních metodách tak významného pokroku, že mnohé z téhoto technik byly přeneseny do planární čipové podoby. Bezprostředně po konstrukci prvních plynových chromatografů na čipu se pozornost obrátila především ke kapilární elektroforéze, neboť její realizace v čipové podobě je snazší než u chromatografie. Kapilární elektroforéza však neoplývá tak velkou všeobecností a univerzálností v separačních mechanismech, jako je tomu u kapalinové chromatografie, jejíž miniaturizace a přenos na čip je spojena s mnohými technickými problémy. Přes všechny tyto instrumentální obtíže se daří v posledních letech realizovat v čipové podobě i kapalinovou chromatografii, která nachází uplatnění při řešení tak složitých analytických problémů, jako je například identifikace bílkovin.

Kapilární separační techniky představují miniaturizační stupeň, který se nachází mezi konvenčními analytickými přístupy a planárními čipovými separačními metodami. Kapilární separační techniky přinášejí výhody miniaturizace a nepotýkají se s tak velkými technickými problémy, jaké nastávají u čipových technik. Navíc kapilární techniky jsou velmi dobře kompatibilní s hmotnostním spektrometrem jako detektorem umožňujícím identifikaci analyzovaných látek. Kapilární zónová elektroforéza je všeobecně považována za separační techniku umožňující rychlé vyvinutí analytické metody a poskytující v krátkém analytickém čase levné výsledky, avšak s nižší reprodukovatelností a spolehlivostí. Kapilární kapalinová chromatografie naopak poskytuje analytické výsledky reprodukovatelnější a spolehlivější, jsou však dražší a časově náročnější. Částečného snížení finanční, ale i časové náročnosti analytických výsledků produkovaných kapilární kapalinovou chromatografií lze dosáhnout použitím kapilárních monolitických kolon. Tyto kolony, připravované nejčastěji polymerací vhodných monomerů na pórovitý monolit uvnitř kapiláry, se vyznačují jednoduchou přípravou v porovnání se stacionárními fázemi chemicky vázanými na silikagelu a navíc umožňují, v důsledku své dobře definované a rozsáhlé pórovitosti, zkrátit dobu analýzy. Monolitické kolony připravené polymerací nejrůznějších organických i anorganických monomerů se dokonce ukázaly být velmi vhodnými separačními médií pro bioaktivní látky, tedy pro biomolekuly s velkými relativními molekulovými hmotnostmi.

## 2.2 Kapilární elektroforéza

První elektroforetické experimenty v různých médiích byly prováděny již na konci 19. století. Hjertén a Tiselius [1,2] v 50. a 60. letech minulého století prováděli první zónově elektroforetické experimenty v rotujících kapilárách o vnitřním průměru 1 až 3 mm. Na počátku 80. let minulého století použili Jorgenson a Lukacs [3,4] křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  pro kapilární zónovou elektroforézu a demonstrovali její velkou separační účinnost.

**Kapilární elektroforéza** (CE) je účinná analytická separační metoda, která umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci nabitéch iontů i neutrálních molekul, neboť zahrnuje několik elektroforetických technik lišících se svým separačním mechanismem. **Kapilární zónová elektroforéza** (CZE) je elektroforetická technika, jejíž separační mechanismus je založen výhradně na rozdílných elektroforetických pohyblivostech analyzovaných iontů. Přídavkem vhodných komplexotvorých činidel do separačního média lze v CZE dosáhnout dalších separačních mechanismů, které mohou být vhodnější a účinnější pro příslušné, právě analyzované látky. Velmi specifickým případem je přídavek tenzidu, který při nadkritické micelární koncentraci vytváří v separačním médiu nabité micely, jež umožňují separaci neutrálních molekul v kapilární elektroforéze na principu rozdílné distribuce mezi pseudostacionární (micelární) a vodnou fází. Tuto elektroforetickou techniku, vhodnou pro separaci a kvantifikaci neutrálních molekul, pak nazýváme **micelární elektrokinetická chromatografie**.

Abychom v elektroforéze dosáhli separace velkých biomolekul, které mají značně podobné vlastnosti, musíme separační médium zkomplikovat přídavkem vhodného gelu, jenž zvýrazní rozdíly v elektroforetických pohyblivostech vzájemně podobných biomakromolekul tím, že k prosté elektroforetické pohyblivosti přistoupí i rozdílná rychlosť pohybu v pórech gelu. V plošné elektroforéze se již po několik desetiletí pro tyto účely používá sesíťovaný polyakrylamid a agarosa. Kombinace sesíťovaného polyakrylamidového gelu s dodecylsíranem sodným umožňuje dokonce elektroforeticky dělit bílkoviny podle jejich relativních molekulových hmotností. V kapilární gelové elektroforéze se osvědčily stejné typy gelů, včetně fyzikálních gelů (*entangled polymers*), které nejsou sesíťovány pomocí chemické vazby, a jsou tudíž snadno vyměnitelné v separační kapiláře. Pro separaci biomolekul, které velmi často mají amfolytický charakter, lze s výhodou použít další elektroforetickou techniku, a to je **kapilární izolektrické fokusování**, jež dělí molekuly podle jejich izolektrických bodů.

Kapilární zónová elektroforéza, jako nejjednodušší kapilární elektroforetická technika, nachází široké uplatnění při analýze nejrůznějších analytů ve velmi složitých a komplikovaných matricích s minimální předúpravou analyzovaného vzorku. Při použití této separační techniky musí nést analyty náboj, aby vykazovaly elektroforetickou pohyblivost. Mohou se však nacházet ve velmi komplexní matrici, neboť ta, na rozdíl od kapilární kapalinové chromatografie, může být po každé analýze velmi jednoduchým způsobem odstraněna ze separační kapiláry jejím vypláchnutím a naplněním novým separačním médiem.

Křemenná separační kapilára pokrytá polyimidovou vrstvou nabízí v CZE mnohé výhody. Křemennou kapiláru lze vyrobit v různých průměrech, díky svému sendvičovému uspořádání je pružná, lze ji snadno upravit na požadovanou délku keramickým nožem, po odstranění povrchové polyimidové vrstvy je velmi dobře prostupná pro viditelné i ultrafialové záření, je levná a díky ionizovatelným silanolovým skupinám na vnitřním povrchu vykazuje rychlý elektroosmotický tok (EOF), který většinou podstatně zkracuje dobu analýzy. Vnitřní povrch křemenné kapiláry však není jednoznačně definován, velmi lehce podléhá fyzikálně-chemickým změnám vlivem látek ob-

sažených v separačním médiu a jako důsledek generuje nestabilní EOF kolísající od analýzy k analýze, ba dokonce i během jedné analýzy. V křemenných kapilárách je navíc velikost EOF silně závislá na pH separačního média. Nestabilita elektroosmotického toku se projevuje i z analytického hlediska, protože právě ta činí CZE analytickou technikou méně reprodukovatelnou než chromatografii [5]. Stabilitu EOF, a tedy i reprodukovatelnost CZE lze zvýšit dynamickým pokrytím, nebo trvalým, chemickým pokrytím vnitřní stěny křemenné kapiláry vhodným činidlem, které stabilizuje či úplně eliminuje EOF. Tím se ovšem doba analýzy mnohdy prodlužuje a ztrácí se významný prostředek manipulace separační selektivity. Křemenné kapiláry modifikované na vnitřním povrchu silně kyselými funkčními skupinami (např.  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) vykazují stabilní EOF v široké oblasti pH a výrazně zlepšují reprodukovatelnost migračních časů analytů v CZE.

Množství vzorku potřebné pro analýzu v kapilární zónové elektroforéze je velmi malé, což přináší obrovskou výhodu při analýze obtížně dostupných vzorků, např. tělních tekutin. Nadávkovat do křemenné kapiláry o průměru několika desítek mikrometrů reprodukovatelně vzorek o objemu několika nanolitrů však může být značný technický problém. Nereprodukovanost dávkování vzorku v CE se pak promítá do nereprodukovanosti kvantitativních analytických výsledků, získaných touto separační technikou při analýze reálných vzorků [6].

Přestože CZE obecně vykazuje nižší reprodukovatelnost získaných analytických dat v porovnání s kapilární kapalinovou chromatografií, je účinným analytickým nástrojem k separaci anorganických iontů [7], aminokyselin v reálných vzorcích [8], metabolitů v moči [9] či ke kvantifikaci nečistot farmaceutických preparátů [10]. CZE je i užitečná fyzikálně chemická metoda k určování disociačních konstant nových analytů, které mají slabě kyselé či zásadité vlastnosti [10].

### 2.3 Kapilární kapalinová chromatografie

První pokusy o použití kolon malých průměrů v kapalinové chromatografii byly prováděny ke konci 60. let minulého století. V této době jako první Horváth se svými spolupracovníky [11,12] zrealizoval mikrokapalinově chromatografický experiment v naplněné ocelové kapiláře o vnitřním průměru 1 mm. Kapilární kapalinová chromatografie (CLC) se stala záhy experimentální náplní dalších významných chromatografistů, jako Scotta a Kučery [13], Ishiiho se spolupracovníky [14], dále pak Kennedyho a Jorgensonu [15].

Separační mechanismus v CLC, podobně jako v HPLC, tenkovrstvé či papírové chromatografii a na rozdíl od CE, je založen na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Mobilní fází je v CLC kapalina, neboli eluent, a stacionární fází může být tuhá látka nebo nemísitelná kapalina, tedy sorbent. Eluent po nadávkování vzorku na separační kolonu unáší zóny analytů ze vzorku, které více či méně interagují se sorbentem, čímž se zpožďují ve svém transportu kolonou, a tím se vzájemně dělí. Transport zón analytů sorbentem pomocí eluentu vede kromě separace analytů i k rozmyvání zón separovaných látek v důsledku výřivé difuze, podélné molekulární difuze a odporu proti přenosu hmoty ve stacionární a mobilní fázi. Oba dva jevy, tedy separace a disperze, působí vzájemně proti sobě a naši snahou je neustále maximizovat separaci a minimalizovat disperzi, abyhom získali v chromatogramu dobře rozlišené, úzké pásky analyzovaných látek.

Z hlediska separačních mechanismů je CLC v porovnání s CE metodou všeestrannější a univerzálnější, neboť umožnuje libovolně kombinovat nepřeberné množství stacionárních a mobilních fází s celou škálou nejrozmanitějších vlastností. Dnes nejčastěji používanou kombinací sorbentu a eluentu pro řešení většiny separačních problémů v kapalinové chromatografii je hydrofobní sor-

bent promývaný hydrofilním vodně-organickým eluentem, který jako organický modifikátor obsahuje methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Toto nepolárně/polární uspořádání stacionární/mobilní fáze se běžně označuje jako **reverzní kapalinová chromatografie**. Pro silně polární látky iontové povahy se mnohem lépe uplatňuje kombinace iontoměničového sorbentu s eluentem o vhodném pH a iontové síle. Mnoho molekul analytů, včetně biologicky aktivních látek, vykazuje částečně hydrofobní a zároveň částečně i hydrofilní charakter a pro jejich separaci se osvědčily stacionární fáze, které kombinují reverzní a iontoměničový separační mechanismus na jednom a tomtéž sorbentu.

Chceme-li určovat relativní molekulovou hmotnost biomakromolekul, oligomerů či polymerů, zvolíme vylučovací gelovou chromatografii na stacionární fázi o vhodné a dobře definované velikosti pórů. Pro separaci enantiomerů se používají stacionární fáze s navázaným chirálním selektorem, který při separaci interaguje s opticky aktivními analyty za vzniku diastereomerů. Sorbenty pokryté vhodným afinantem slouží k separaci biologicky aktivních látek, které jsou schopné jedinečné vazby s afinantem pomocí velmi specifické interakce.

Dříve běžně používané separační kolony v HPLC o vnitřním průměru 4-5 mm jsou dnes velmi často nahrazovány kolonami s průměry menšími (1-3 mm), neboť to umožní dosáhnout stejných, v mnoha případech dokonce lepších výsledků z hlediska účinnosti separace při současné redukci finančních nákladů na jednu analýzu. Kapalinová chromatografie prováděná v kolonách o vnitřním průměru 0,5 až 1,5 mm se označuje jako **mikrokapalinová**; operuje s průtoky desítek mikrolitrů eluentu za minutu. Kapilární kapalinová chromatografie používá průtoky jednotek desítek mikrolitrů eluentu za minutu v kapilárních separačních kolonách o vnitřním průměru 0,15 až 0,50 mm. O **nanokapalinové chromatografii** mluvíme tehdy, používáme-li kapilární kolony o vnitřním průměru 0,010 až 0,150 mm s průtoky stovek nanolitrů eluentu za minutu. Nanokapalinovou chromatografii lze také realizovat v plošném čipovém uspořádání a čipy k tomu určené velmi často označujeme obecnějším termínem **mikrofluidní zařízení** (*microfluidic devices*).

Zmenšování vnitřního průměru separačních kolon v kapalinové chromatografii přináší mnohé výhody, ale i některé nevýhody. Ty jsou spojeny především s technickými problémy realizace kapilární, popř. nanokapalinové chromatografie. K výhodám separačních kolon o menších průměrech patří především menší spotřeba stacionární a mobilní fáze, která umožňuje použít dražší sorbenty a komponenty eluentů s vyhraněnými specifickými vlastnostmi, vyžaduje-li to řešení daného analytického problému. Redukované množství stacionární fáze v koloně si žádá menší objem vzorku, který má být nadávkován na separační kolonu. Nižší průtok mobilní fáze kolonou vede k menšímu naředění analytů eluentem během jejich transportu kolonou k detektoru, což může vést k větším citlivostem u některých detektorů. Neplatí to však obecně pro všechny typy detektorů, neboť menší množství nadávkovaného vzorku a nižší průtok mobilní fáze vyžaduje detekční celu menšího objemu s kratší optickou dráhou u spektrofotometrických detektorů. Při použití tohoto detektoru nevede obecně redukce průměru separační kolony ke zvýšení koncentrační citlivosti, ale pouze ke zmenšení absolutně detegovaného množství analytu.

Kapilární kapalinová chromatografie, pokud to finanční situace dovolí, se v mnoha laboratořích kombinuje s hmotnostní spektrometrií a laserem indukovanou fluorescencí. Hmotnostní spektrometr je velmi citlivý, téměř univerzální detektor, umožňující získat další velmi důležité informace o analytech sloužící k jejich identifikaci. Laserem indukovaná fluorescence je velmi citlivá, ale zároveň i velmi specifická detekční technika, neboť pouze některé analyzované látky fluoreskují.

K dalším detekčním metodám, které mohou být snadno využity v CLC, patří vodivostní a elektrochemické detektory.

Komplikace, které jsou spojeny s miniaturizací separačních kolon, leží především v oblasti **instrumentace**. Menší množství dávkovaného vzorku a nižší průtoky eluentu kladou velké nároky na minimalizaci mimokolonových mrtvých objemů kapilárního kapalinového systému, chceme-li dokonale využít větší separační účinnost, jež kapilární kolony nabízejí. Nejčastějšími technickými problémy CLC mohou být příprava účinné kapilární separační kolony, efektivní napojení vstupu kapilární kolony na dávkovací ventil a výstupu kolony na detekční celu, konstrukce detekční cely kompatibilního objemu, realizace nadávkování malého objemu vzorku na kolonu, termostatování kolony během analýzy a zajištění dostatečně malého stabilního toku mobilní fáze kolonou.

Přes všechny tyto nevýhody, se kterými se můžeme setkat při nasazení CLC pro řešení analytických problémů [16,17], je CLC stále více využívána k separaci a kvantifikaci řady substancí ve vzorcích s nejrůznějšími matricemi [18-24]. Výhody a strasti spojené s použitím CLC pro separaci a kvantifikaci analytů ve vzorcích s reálnými matricemi mohou být demonstrovány na léčivu proti Parkinsonově chorobě, ropinirolu, a jeho pěti nečistotách ze syntézy [25] a na potenciálních chemoterapeutikách, kterými mohou být thioakridiny [26-29] a pyridochinoliny [30].

## 2.4 Kapilární monolitické kolony

První pokusy o vytvoření jednoho bloku porézního sorbantu, který by vyplňoval celý vnitřek separační kolony, byly prováděny již v 60. a 70. letech minulého století [31-33]. Praktické použití těchto kolon však nebylo možné kvůli jejich nízké propustnosti a stabilitě v některých organických rozpouštědlech. Hjertén se svými spolupracovníky [34] v roce 1989 připravil stlačený měkký polyakrylamidový gel, který nazval **kontinuální lože** (*continuous bed*), a úspěšně použil toto monolitické separační médium jako stacionární fázi v kapalinové chromatografii. Švec a Fréchet [35] o tři roky později zavedli nový typ sorbantu založený na pevném makroporézním organickém polymeru, tzv. monolitu, který se stal díky svým jedinečným vlastnostem široce se rozvíjející stacionární fází v kapalinové chromatografii a elektrochromatografii [36-41].

V posledních deseti letech se výzkum v oblasti separačních kolon pro CLC velmi silně orientuje právě na přípravu a vývoj monolitických kolon, jež se připravují začleněním vhodných monomerních jednotek do bloku porézního polymeru. Do polymerační směsi se přidává směs vhodných porogenních rozpouštědel, která vytvoří ve vzniklé monolitu póry, jimiž může prostupovat mobilní fáze. Celý blok takto vzniklého porézního polymeru vyplňuje vnitřek kapilární separační kolony a plní funkci stacionární fáze v koloně. Přípravu a vývoj monolitických kolon podnítil především v posledních letech prudký rozvoj kapilární elektrochromatografie (CEC), protože monolitické kolony můžeme na rozdíl od náplňových kolon připravit velmi elegantně a pohodlně v křemených kapilárách i o průměru pouze několika desítek mikrometrů. Monolity připravované pro CEC musí mít navíc zabudované monomery s ionizovatelnými funkčními skupinami, aby docházelo v jejich pórech při aplikaci elektrického pole ke vzniku EOF, který unáší molekuly analytů póry monolitu během vlastní separace. Jedním z monomerů sloužících k tomuto účelu je např. 2-akrylamido-2-methylpropan-1-sulfonová kyselina.

K dosažení vhodné pevnosti monolitu se do polymerační směsi kromě funkčního monomeru přidává i síťující monomer, který při polymeraci propojí lineární řetězce funkčního monomeru do trojrozměrné prostorové sítě. Monomery zabudovávané do monolitů zpravidla obsahují dvojnou vazbu, a proto se s výhodou používá k jejich propojení radikálová polymerace. Iniciace této radiká-

lové polymerace lze dosáhnout použitím vhodného iniciátoru, který rozpuštěný v polymerační směsi rozštěpíme na radikály termostatováním při vyšší teplotě, nebo UV-zářením. Iniciace vyšší teplotou je univerzální, ale iniciaci UV-zářením lze použít pouze u křemenných kapilár pokrytých speciálním polymerem propustným pro toto záření, protože hnědá polyimidová vrstva pokryvající běžně používané křemenné kapiláry viditelné ani ultrafialové záření téměř nepropouští. Další možností iniciace radikálové polymerace je rozklad iniciátoru v polymerační směsi za laboratorní teploty za přispění vhodného katalyzátoru.

Uvnitř kapilár náplňových kolon pro CLC je nutné vytvořit frity zabraňující vymytí částic sorbentu eluentem z kolony, což je značně složitý technický problém. Velkou výhodou monolitických kolon používaných v CLC je právě to, že nemusí být na vstupním a výstupním konci opatřeny fritou, tak jako náplňové sparační kolony. Aby však nedocházelo v CLC k vytlačení celého bloku monolitu z kapiláry mobilní fáze, která je do monolitické separační kolony pumpována pod tlakem, musí být monolit zachycen chemickou vazbou k vnitřní stěně kapiláry. K tomuto účelu se vnitřní povrch kapiláry před vlastní polymerací silanizuje činidly obsahujícími dvojnou vazbu, která se účastní radikálové polymerace, a tím se vlastní blok monolitu zachytí kovalentní vazbou k vnitřní stěně kapiláry. Silanizační činidlo s dvojnou vazbou, vhodné pro tyto účely, je např. 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát.

Charakterem funkčního monolitu v polymerační směsi lze velmi jednoduše a efektivně měnit charakter a separační vlastnosti vzniklého monolitu. Pro přípravu monolitických kolon se používá řada různých monomerů. Polyakrylamidové monolity se připravují polymerací akrylamidu nebo jeho derivátů a síťujícího methylenbisakrylamidu či piperaziindiakrylamidu. Polystyrenové monolitické kolony syntetizujeme ze styrenu nebo jeho derivátů a síťovadla divinylbenzenu. Pro přípravu polybutylmethakrylátových, polymethakrylátových a polyglycidylmethakrylátových monolitů používáme butylmethakrylát, methakrylovou kyselinu a glycidylmethakrylát sesíťované ethylendimethakrylátem. Díky možnosti připravit monolity nejrůznějších chemických vlastností jsou monolitické kolony využívány k separacím širokého spektra analytů, jako jsou peptidy a bílkoviny, oligonukleotidy, oligosacharidy, fragmenty DNA a další organické látky. Kromě monolitických kolon na bázi porézních organických polymerů byly vyvinuty monolitické kolony připravené z chemicky modifikovaného silikagelu či spečených, chemicky modifikovaných silikagelových částic. Dnes jsou silikagelové a polystyrenové monolitické kolony již komerčně dostupné na trhu.

Polymerní monolitické kolony převážně používané pro separace biomakromolekul se nechají využít i k separacím malých organických molekul. Podařilo se připravit polybutylmethakrylátové monolitické kolony o vnitřním průměru 320 µm, použitelné v CLC pro separaci malých organických molekul, jako je uracil, toluen, anilin, fenol, ethylbenzen, 4-ethylanilin a *N,N*-dimethylanilin [42-45]. Tyto práce o kapilárních monolitických kolonách jasně demonstруjí jejich hlavní přednost v porovnání s kapilárními náplňovými kolonami, a to je jednoduchost jejich přípravy, která určuje i jejich nízkou výrobní cenu. Je zřejmé, že v oblasti monolitických kolon jsou stále ještě nevyřešené otázky a problémy, jež čekají na svoji jednoznačnou odpověď a elegantní řešení. Jedním z nich je například účinné a oddělené řízení velikosti velkých pórů (tzv. *through-pores*) o velikosti mikrometrů, nutných pro tok eluentu monolitem, a malých pórů (tzv. *mesopores*) o velikosti nanometrů, potřebných pro interakci analytu s monolitem. I navzdory témtoto faktůmu jsou kapilární monolitické kolony velmi jednoduchým a levným konkurentem náplňových kolon nejen pro CLC, ale i CEC.

## 2.5 Závěr

CZE a CLC jsou kapilární separační techniky, které se liší především svým separačním mechanismem. CZE jako instrumentálně jednodušší umožňuje rychle vyvinout analytickou metodu a následně analyzovat vzorky malých objemů s komplexní matricí bez nutnosti větší předúpravy vzorku. CLC je komplikovanější metoda z hlediska technické realizace, avšak oplývá větší robustností a univerzálností v separačních možnostech a navíc poskytuje reprodukovatelnější kvantifikační data za cenu větší finanční a časové náročnosti. Přes všechny tyto rozdíly nelze CZE a CLC chápát jako vzájemně si konkurenční techniky, ale zejména jako doplňující se nástroje chemické analýzy. Kapilární monolitické kolony jsou jednoduchou a levnou alternativou k náplňovým kolonám, jejichž přednosti může úspěšně využívat jak CLC, tak i CEC. Přestože miniaturizace v separačních metodách dospěla v posledních letech od kapilárních technik dále, až k mikrofluidním čipům, budou se zajisté kapilární separační techniky i nadále rozvíjet a plnit své úkoly v analýze praktických vzorků.

Kapilární separační techniky zaujímají v analytické chemii nezastupitelné místo, které si vybudovaly zejména v posledním desetiletí svým posunem z oblasti akademického výzkumu směrem do analytické praxe. Jejich společným jmenovatelem je hlavně to, že umožňují analýzu složitých vzorků s větší separační účinností, menšími finančními náklady, v kratším čase a s menším negativním vlivem na životní prostředí. Všechny tyto klady kapilárních separačních technik jsou spojeny nejen s větší technickou a instrumentální náročností při jejich realizaci, ale také s většími nároky na znalosti a dovednosti obsluhujícího personálu.

## Literatura

1. Hjertén, S., Arkiv Kemi, 1958, 13, 151.
2. Tiselius, A., Hjertén, S., Jerstedt, S., Arch. Ges. Virusforsch., 1965, 17, 512.
3. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., Anal. Chem., 1981, 53, 1298.
4. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., J. Chromatogr., 1981, 218, 209.
5. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. High Resolut. Chromatogr., 1994, 17, 325.
6. Coufal, P., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. Liquid Chromatography, 1993, 16, 3623.
7. Pacáková, V., Coufal, P., Štulík, K., J. Chromatogr. A, 1999, 834, 257.
8. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., Gaš, B., Electrophoresis, 2003, 24, 671.
9. Samcová, E., Kvasnicová, V., Urban, J., Jelínek, I., Coufal, P., J. Chromatogr. A, 1999, 847, 135.
10. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Hardy, M.J., Webb, M., J. Chromatogr. B, 1998, 720, 197.
11. Horváth, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R., Anal. Chem., 1967, 39, 1422.
12. Horváth, C.G., Lipsky, S.R., Anal. Chem., 1969, 41, 1227.
13. Scott, R.P.W., Kučera, P.J., J. Chromatogr., 1976, 125, 251.
14. Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., Nagaya, M., J. Chromatogr., 1977, 144, 157.
15. Kennedy, R.T., Jorgenson, J.W., Anal. Chem., 1989, 61, 1128.
16. Vissers, J.P.C., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. Chromatogr. A, 1997, 779, 1.
17. Vissers, J.P.C., J. Chromatogr. A, 1999, 856, 117.
18. Koivisto, P., Tornkvist, A., Heldin, E., Markides, K.E., Chromatographia, 2002, 55, 39.
19. McKenzie, J.A.M., Watson, C.J., Rostand, R.D., German, I., Witowski, S.R., Kennedy, R.T., J. Chromatogr. A, 2002, 962, 105.

20. Ogawa, C.A., Diagone, C.A., Lancas, F.M., J. Liq. Chromatogr., 2002, 25, 1651.
21. Chankvetadze, L., Kartozia, I., Yamamoto, C., Chankvetadze, B., Blaschke, G., Okamoto, Y., J. Sep. Sci., 2002, 25, 653.
22. Delinsky, D.C., Greis, K.D., J. Proteome Res., 2002, 1, 279.
23. Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M.E., Perez-Arribas, L.V., Polo-Diez, L.M., Anal. Chim. Acta, 2002, 470, 147.
24. Zhang, S., Huang, F., Zhao, J.W., Wen, L.J., Zhou, F., Yang, P.Y., Talanta, 2002, 58, 451.
25. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Hardy, M.J., Webb, M., J. Chromatogr. B, 1999, 732, 437.
26. Bosáková, Z., Tesařová, E., Coufal, P., Kafková, B., Barbe, J., Chem. Listy, 2001, 95, 569.
27. Coufal, P., Bosáková, Z., Tesařová, E., Kafková, B., Suchánková, J., Barbe, J., J. Chromatogr. B, 2002, 770, 183.
28. Kafková, B., Bosáková, Z., Tesařová, E., Suchánková, J., Coufal, P., Štulík, K., Chromatographia, 2002, 56, 445.
29. Srbek, J., Bosáková, Z., Tesařová, E., Suchánková, J., Coufal, P., Němcová, I., Chromatographia, 2004, 60, S37.
30. Srbek, J., Coufal, P., Tesařová, E., Bosáková, Z., Suchánková, J., J. Sep. Sci., 2003, 26, 1582.
31. Kubín, M., Špaček, P., Chromeček, R., Collect. Czech. Chem. Commun., 1967, 32, 3881.
32. Ross, W.D., Jefferson, R.T., J. Chromatogr. Sci., 1970, 8, 386.
33. Hileman, F.D., Sievers, R.E., Hess, G.G., Ross, W.D., Anal. Chem., 1973, 45, 1126.
34. Hjertén, S., Liao, J.-L., Zhang, R., J. Chromatogr., 1989, 473, 273.
35. Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1992, 64, 820.
36. Švec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Yu, C., Fréchet, J.M.J., J. High Resolut. Chromatogr., 2000, 23, 3.
37. Švec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Fréchet, J.M.J., J. Chromatogr. A, 2000, 887, 3.
38. Peters, E.C., Petro, M., Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1998, 70, 2288.
39. Fujimoto, Ch., Fujise, Y., Matsuzawa, E., Anal. Chem., 1996, 68, 2753.
40. Peters, E.C., Petro, M., Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1997, 69, 3646.
41. Zou, H., Huang, X., Ye, M., Luo, Q., J. Chromatogr. A, 2002, 954, 5.
42. Coufal, P., Čihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Chem. Listy, 2001, 95, 509.
43. Coufal, P., Čihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., Štulík, K., J. Chromatogr. A, 2002, 946, 99.
44. Holdšvendová, P., Coufal, P., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., J. Sep. Sci., 2003, 26, 1623.
45. Grafnetter, J., Coufal, P., Tesařová, E., Suchánková, J., Bosáková, Z., Ševčík, J., J. Chromatogr. A, 2004, 1049, 43.

### 3. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE-HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (LC-MS)

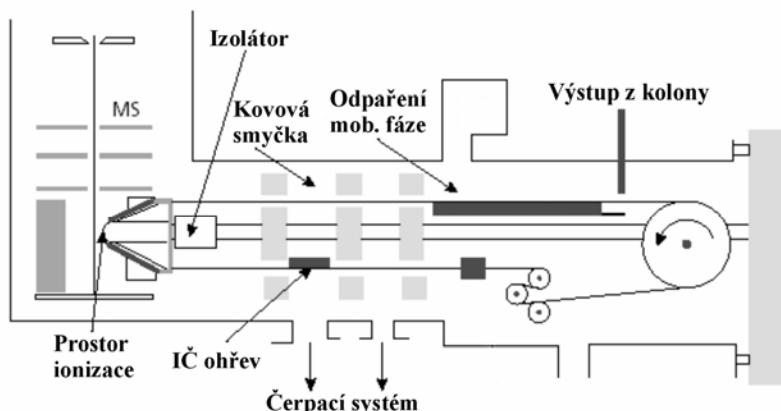
doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.,

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2

ijelinek@natur.cuni.cz

#### 3.1 Úvod

Základním předpokladem úspěšného spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací. K tomuto účelu byla vyvinuta specializovaná zařízení, dodnes je ve spojení s EI/CI iontovými zdroji používáno tzv. **rozhraň s pohybujícím se kovovým páskem** (*moving belt interface*), jehož schéma je uvedeno na obr. 3.1. Mobilní fáze a separované látky vystupující z kolony jsou naneseny na rotující kovovou smyčku, těkavé složky mobilní fáze jsou před vstupem do iontového zdroje odpařeny a čerpacím systémem odvedeny mimo prostor ionizace. Po opuštění iontového zdroje je povrch kovového pásku intenzivním infračerveným ohřevem zbaven zbytků separovaných látek a připraven pro další cyklus.



Obr. 3.1: Rozhraní s pohybující se kovovou smyčkou

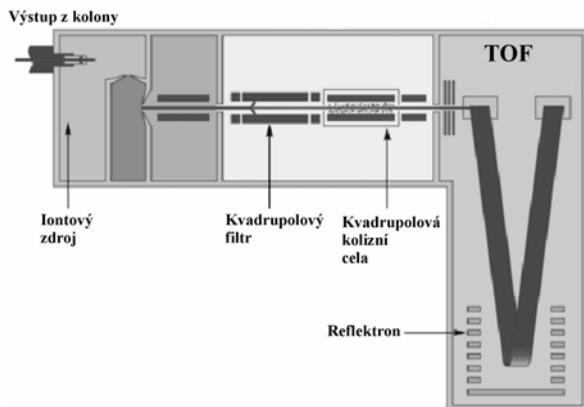
Současná komerční instrumentace pro LC-MS prakticky výhradně využívá **sprejové ionizační techniky** typu termospreje, elektrospreje a APCI, jež jsou principiálně upraveny pro práci s průtokem kapalné fáze a jsou schopny v průběhu ionizace odvést většinu těkavých složek mimo prostor hmotnostního spektrometru. Přesto je nutno zdůraznit, že průtoky mobilní fáze v řádu jednotek mililitrů za minutu, obvyklé u běžné HPLC, jsou pro některé komerční zdroje příliš velké, a proto je nutno za výstup separační kolony zařadit dělič odvádějící část mobilní fáze mimo iontový zdroj. Velkou výhodu pro spojení LC-MS je využití mikrokolonové kapalinové chromatografie, jež je svými průtoky mobilní fáze zcela kompatibilní s moderními sprejovými iontovými zdroji typu nanoelektrospreje. Volba konkrétního typu iontového zdroje se řídí typem analyzovaných látek: TSI a APCI jsou primárně určeny pro ionizaci nízkomolekulárních látek do  $m/z < 1\,000$ , ESI je možno použít pro ionizaci makroolekulárních látek typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin.

Z hlediska instrumentální kompatibility s kapalinovým chromatografem neexistuje žádné omezení volby hmotnostního analyzátoru. Jeho konkrétní volba se řídí především požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením a samozřejmě též hlediskem pořizovacích a provozních nákladů. V oblasti komerční instrumentace LC-MS je v současnosti stále ještě nejběžnější použití **kvadrupolových hmotnostních analyzátorů**. Jsou prakticky univerzální, mezi hlavní přednosti systémů LC-MS s těmito typy hmotnostních analyzátorů patří dostatečná citlivost, zejména v SIM-módu, vysoká rychlosť skenování a především cenová dostupnost. Svými parametry minimálně srovnatelné jsou **iontové pasti**; přístroje s tímto typem hmotnostního analyzátoru umožňují ve srovnání s kvadrupolovými přístroji dosáhnout nižších mezí detekce a hodí se zejména pro stopovou analýzu. V případě požadavku vysokého rozlišení může být alternativně použit magnetický hmotnostní analyzátor uzpůsobený pro rychlé skenování (supravodivé cívky elektromagnetu, jádro ze slitin ceru) a nebo cyklotronový rezonanční analyzátor (ion-cyclotron resonance – ICR). Požadavek velmi vysokého hmotnostního dosahu, jež je logickým požadavkem rostoucího zájmu o analýzu biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin, velmi dobře splňuje **průletový hmotnostní analyzátor**.

Volba vhodného typu detektoru může být kritická zejména pro aplikace na vysokomolekulární látky. Pro detektory typu elektronnásobiče a fotonásobiče platí, že citlivost detekce klesá s rostoucím  $m/z$  detegovaného iontu. Proto byly vyvinuty různé typy tzv. **postakceleračních detektorů**, jež mohou s pomocí vhodné iontové optiky ionty před vlastní detekcí urychlit.

### 3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií

Zásadní nevýhodou použití sprejových ionizačních technik je povětšinou zanedbatelný rozsah fragmentace vznikajících iontů. Strukturní informace systému LC-MS s jedním hmotnostním analyzátem je omezena v naprosté většině případů na určení molekulové hmotnosti separované látky na základě pozorovaného molekulárního, kvazi-molekulárního či aduktového iontu. Pro účely podrobnějších strukturních studií je nutno použít komplexní systémy tandemové hmotnostní spektrometrie sdružující dvojici hmotnostních analyzátorů oddělených kolizní celou. Nejstarším instrumentálním uspořádáním tohoto typu je tandemový hmotnostní spektrometr sdružující dvojici magnetických hmotnostních analyzátorů, v prvním je volbou intenzity magnetického pole vybrán ion určitého  $m/z$  (tzv. mateřský ion), jež je následně řízeně fragmentován v kolizní cele, vzniklé fragmentové ionty (dceřiné ionty) jsou podle  $m/z$  rozděleny v druhém magnetu a následně detegovány. Tandemový hmotnostní spektrometr není vzhledem k pomalému skenování příliš vhodný pro spojení se separačními metodami, proto byl speciálně pro účely spojení s kapalinovou chromatografií vyvinut **systém se třemi kvadrupoly**. Prvý kvadrupól slouží pro výběr mateřského iontu, do druhého se přivádí pod vhodným tlakem inertní plyn a slouží jako kolizní cela pro řízenou fragmentaci mateřského iontu, skenováním třetího kvadrupolu se rozdělí vzniklé dceřiné ionty podle hodnoty  $m/z$ . Pro účely strukturní analýzy makromolekul byly vyvinuty hybridní systémy, vyznačující se vysokým dosažitelným rozlišením a vysokou citlivostí a vhodné pro spojení s kapalinovým chromatografem. Schematický nákres tandemového hmotnostního spektrometru sdružujícího dvojici kvadrupolů a průletový hmotnostní analyzátor je uveden na obr. 3.2.



**Obr. 3.2:** Schema hybridního tandemového hmotnostního spektrometru s dvojicí kvadrupólů a průletovým hmotnostním analyzátorem

### 3.3 Volba separačních kolon a mobilní fáze v LC-MS

Použití hmotnostního spektrometru jako detektoru nijak nezužuje výběr typu stacionární fáze z hlediska její chemické povahy. V praxi nejběžnější je reverzní chromatografie na stacionárních fázích typu C8 a C18, v souvislosti s vývojem metodik vhodných pro analýzu peptidů a proteinů se využívá využívací chromatografie na mikroporézních stacionárních fázích, afinitní chromatografie na strukturně selektivních fázích s navázanými ligandy a iontově výměnná chromatografie. Současná praxe LC-MS upřednostňuje použití kratších kolon, o menším vnitřním průměru, naplněných menšími částicemi stacionární fáze. Pro současné sprejové iontové zdroje, jež tolerují průtokové rychlosti mobilní fáze do  $2 \text{ ml min}^{-1}$ , jsou optimální kolony o vnitřním průměru 2 mm, délce 5 až 15 cm a velikosti částic stacionární fáze 3 až 4  $\mu\text{m}$ , u nichž se průtoky mobilní fáze pohybují v řádu desetin mililitrů za minutu, kdy veškerou mobilní fázi je možno s dostatečnou rezervou přivést přímo do iontového zdroje. Velmi perspektivní z hlediska požadovaného množství vzorku a ekonomiky provozu je i použití kapilárních separačních kolon o průměrech pod jeden mm (obvykle 75 až 350  $\mu\text{m}$  s průtoky mobilní fáze v řádu jednotek mikrolitrů za minutu) ve spojení se sprejovými iontovými zdroji s minimálním průtokem kapalné fáze, například nanoelektrosprejem.

Užití hmotnostního spektrometru klade jistá omezení pro volbu použité mobilní fáze, a to zejména z hlediska těkavosti jejich složek. Tato skutečnost může komplikovat převedení experimentálních podmínek HPLC s použitím konvenčního fotometrického detektoru na LC-MS. Při návrhu složení mobilní fáze je vhodné respektovat následující, z praxe vyplývající doporučení:

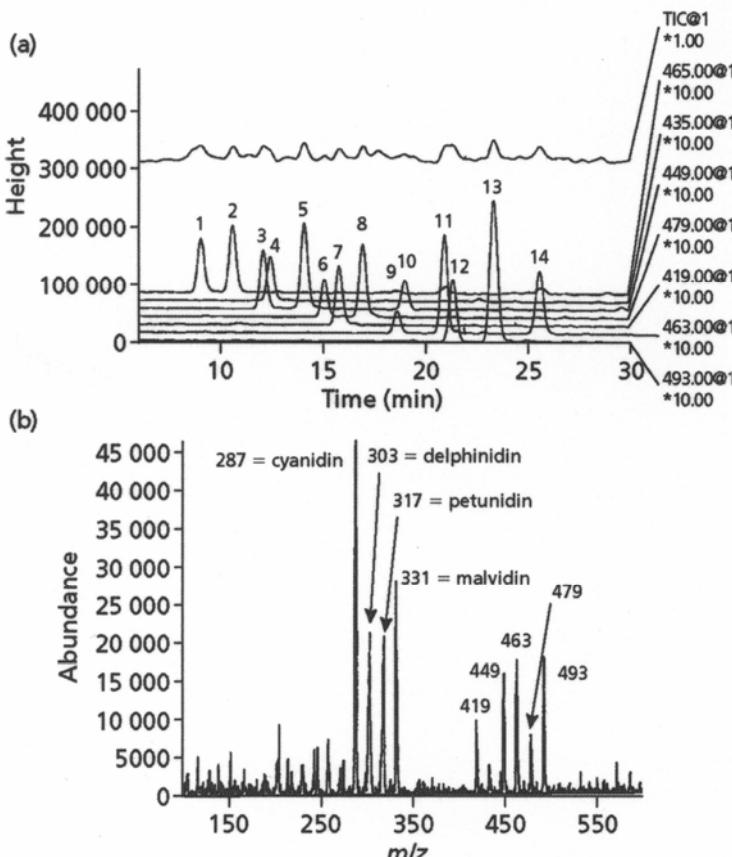
- Je třeba minimalizovat obsah netěkavých složek mobilní fáze, nežádoucí je přítomnost anorganických sodných a draselných solí jako pufrujících přísad. V jejich přítomnosti dochází k rychlému zanesení iontového zdroje a přítomnost  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  významně snižuje výtěžek ESI a APCI ionizace pozitivních iontů. Pokud je nutno mobilní fázi pufrovat, je vhodné k tomuto účelu použít přídavek těkavé soli typu octanu či mravenčanu amonného.
- Pokud je nezbytný přídavek netěkavé anorganické soli, je vhodné optimalizovat její obsah z hlediska minimalizace iontové síly mobilní fáze. V přítomnosti netěkavého elektrolytu je problematická realizace gradientové eluce spojené se změnou iontové síly mobilní fáze, kdy může dojít k nežádoucímu přerušení tvorby spreje.
- Pokud je nutno z hlediska dosažení dostatečné separační účinnosti a rozlišení použít mobilní fázi s vyšší iontovou silou, je vhodné provést postkolonové odsolení zařazením vhodné ionto-měničové kolony za kolonu separační.

- Z hlediska lepší výtěžnosti ESI a APCI je vhodné dát přednost přídavku methanolu do mobilní fáze před acetonitrilem. Výtěžek ionizace, a tedy citlivost detekce hmotnostním spektrometrem mohou zvyšovat některé v kapalinové chromatografii méně běžné složky mobilní fáze, jež tvoří koordinačně kovalentní komplexy se stanovanými látkami. Příkladem může být přídavek dusičnanu stříbrného a měďnatého, protože ionty  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  tvoří komplexy s širokou škálou polárních i nepolárních heterocyklických sloučenin.

## 3.4 Aplikační oblast LC-MS

### 3.4.1 Potravinářský průmysl

Metoda se využívá pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci netěkavých složek podmiňujících chuť a nutriční vlastnosti nebo způsobujících toxicitu potravin. Jde zejména o analýzu umělých i přirozených barviv, farmak typu antibiotik a růstového hormonu v potravinách živočišného původu, peptidů, proteinů, lipidů, sacharidů, glykoproteinů a vitaminů významně ovlivňujících nutriční hodnotu potravin. S pomocí LC-MS je možno sledovat i strukturní změny jmenovaných typů látek během procesů tepelné úpravy a stárnutí potravin. Z hlediska zajištění nezávadnosti potravin je důležitá i informace o struktuře a obsahu netěkavých xenobiotik. Na obr. 3.3(a) je uveden záznam LC-APCI-MS-analýzy netěkavých barviv v extraktu z borůvek, jež odpovídají za jeho charakteristické zbarvení a v procesu oxidace při skladování působí nežádoucí barevné a chut'ové změny produktu. Na obrázku 3.3 (b) je uvedeno směsné APCI-hmotnostní spektrum, odpovídající přímému nástříku extraktu do iontového zdroje bez předchozí chromatografické separace s identifikovanými molekulárními a fragmentovými ionty těchto barviv.



Obr.3.3:

- (a) Záznam LC-APCI-MS-separace netěkavých barviv v extraktu z borůvek; identifikované páky:  
 1 - delphinidin-3-gal ( $M_r$  465),  
 2 - delphinidin-3-glu ( $M_r$  465),  
 3 - cyanidin-3-gal ( $M_r$  449),  
 4 - delphinidin-3-ara ( $M_r$  435),  
 5 - cyanidin-3-glu ( $M_r$  449),  
 6 - petunidin-3-gal ( $M_r$  479),  
 7 - cyanidin-3-ara ( $M_r$  419),  
 8 - petunidin-3-glu ( $M_r$  479),  
 9 - petunidin-3-gal ( $M_r$  463),  
 10 - petunidin-3-ara ( $M_r$  449),  
 11 - petunidin-3-glu ( $M_r$  463),  
 12 - malvidin-3-gal ( $M_r$  493),  
 13 - malvidin-3-glu ( $M_r$  493),  
 14 - malvidin-3-ara ( $M_r$  463);  
 (b) směsné APCI-hmotnostní spektrum s identifikovanými molekulárními a fragmentovými ionty těchto barviv

### 3.4.2 Farmaceutický průmysl

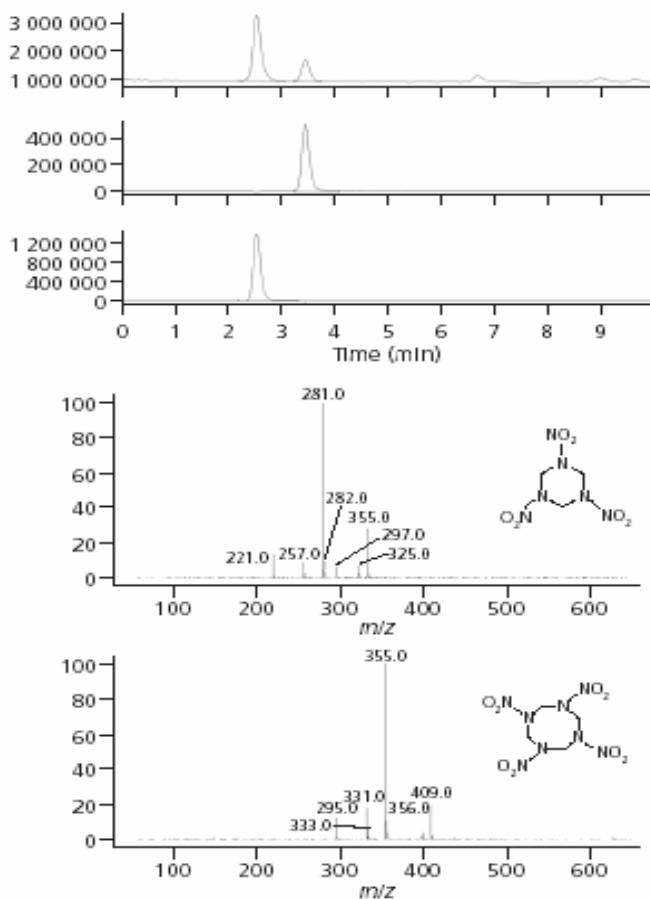
Metoda LC-MS nalezla významné uplatnění v oblasti strukturní charakterizace a kvantifikace léčiv, jejich syntetických meziproduktů, doprovodných nečistot a rozkladních produktů. Je často využívána pro studium kinetiky a mechanismu odbourávání léčiv v organismu a strukturní identifikaci vznikajících metabolitů. Technika LC-MS je nezbytná pro strukturní charakterizaci bílkovin jako potenciálních vazebných míst léčiv, kde nahrazuje dvojdimensionální gelovou elektroforézu a izoelektrickou fokusaci.

### 3.4.3 Toxikologie

Metoda LC-MS se nově využívá pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci polárních a netěkavých návykových látek a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Je v současnosti nejvýznamnějším nástrojem kontroly nové generace dopingových látek (steroidů, prostaglandinů, peptidů, proteinů) bez nutnosti jejich derivatizace.

### 3.4.4 Ekologie

Metoda se využívá pro analýzu polárních a málo těkavých polutantů ve vzorcích vody a půd. Na obr. 3.4 je uveden záznam separace stop netěkavých výbušin v extraktu z půdy metodou LC-APCI-MS s příslušnými hmotnostními spektry umožňujícími jejich strukturní identifikaci.

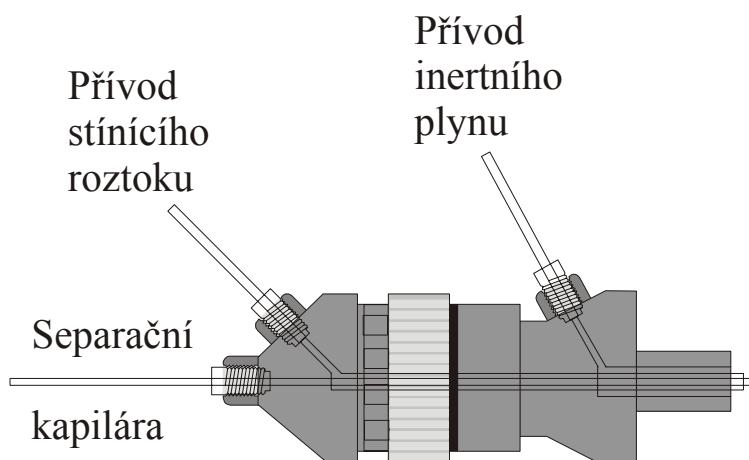


Obr. 3.4: Analýza stop netěkavých výbušin v extraktu z půdy metodou LC-APCI-MS

### 3.5 Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie (CE-MS)

Je to další, pro analytickou praxi užitečná kombinace vysokoúčinné separační metody s hmotnostním spektrometrem. Obdobně jako v případě kapalinové chromatografie je spojení realizováno nejčastěji pomocí iontového zdroje typu elektrosprej. Mezi hlavní technické problémy komplikující propojení obou přístrojů patří především příliš nízký průtok nosného elektrolytu separační kapilárou a problém realizace vodivého spojení konce separační kapiláry se zemnící elektrodou vysokonapěťového zdroje pro elektroforézu.

Běžný průtok nosného elektrolytu, daný elektroosmotickým tokem v křemenné separační kapiláře, se pohybuje v řádu nanolitrů za minutu, což neposkytuje dostatečné objemové množství pro vytvoření stabilního spreje v běžném ESI-zdroji. Chybějící objem kapaliny je tedy nutno dodat z externího zdroje; obvykle se pro tyto účely používá tzv. stínící roztok (*sheet fluid*), což bývá nejčastěji vodný roztok těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla. Stínící roztok je protlačován do ESI-zdroje tak, aby se celkový objem přiváděné kapalné fáze (tj. nosného elektrolytu a stínícího roztoku) pohyboval v řádu jednotek mikrolitrů za minutu. Kromě této funkce stínící roztok umožňuje i vodivé spojení mezi koncem separační kapiláry a zemnící elektroforetickou elektrodou, jež je ponořena do zásobní nádobky se stínící kapalinou. Pro podpoření tvorby spreje a zvýšení jeho stability se do prostoru ESI-zdroje přivádí pod vhodným tlakem inertní zmlžovací plyn. Možná realizace spojení CE-MS s přídavným tokem stínící kapaliny je znázorněna na obr. 3.5. V principu jde o soustavu tří koncentrických kapilár, vnitřní je vlastní separační kapilára, jež je upevněna v kapiláře pro přívod stínícího roztoku, vně je kovová kapilára přivádějící inertní plyn, jež je spojena přes redukční ventil se zásobní tlakovou nádobou. Stabilní přívod stínící kapaliny je zajištěn nejčastěji lineárním dávkovačem s mikrostříkačkou nebo chromatografickou pumpou s děličem. Zemnící elektroforetická elektroda je ponořena do zásobní nádobky se stínící kapalinou, v případě použití mikrostříkačky tuto elektrodu tvoří přímo její kovový hrot.



Obr. 3.5: Možná realizace spojení CE s ESI zdrojem s přídavným tokem stínícího roztoku

Tok stínící kapaliny způsobuje naředění vzorku při vstupu do prostoru ionizace a snižuje dosažitelnou citlivost detekce hmotnostním spektrometrem. Proto se vyvíjejí alternativní techniky spojení CE-MS bez přídavného toku stínící kapaliny. Nejjednodušší způsob, tzv. *sheetless interface*, spočívá v pokovení konce separační kapiláry přímo přivedené do prostoru ionizace; kovový povlak

slouží jako zemnící elektroda elektroforetického zdroje. Postup je využitelný pouze za podmínek dostatečně rychlého elektroosmotického toku, problém mohou působit produkty elektrolýzy složek nosného elektrolytu, jež kontaminují vzorek a způsobují ucpání ústí kapiláry. V uspořádání s vodivým kapalným spojením (*liquid-junction interface*) je separační kapilára ukončena před vstupem do ESI v nádobce s nosným elektrolytem. Proti jejímu ústí je orientována pomocná kapilára, jež vstupuje do elektrospreje. V nádobce s nosným elektrolytem je umístěna elektroda, která slouží k uzavření obvodu vysokonapěťového zdroje pro elektroforézu a zároveň poskytuje napětí pro tvorbu elektrospreje. Pro zachování dostatečné separační účinnosti by vzdálenost mezi ústím separační kapiláry a pomocnou kapilárou neměla přesáhnout 20 µm. Z hlediska dosažitelné citlivosti je optimální použití nanoelektronspreje, u něhož je možno dosáhnout stabilních podmínek sprejové ionizace i pro velmi nízké průtoky kapalné fáze (10 až 1 000 nl min<sup>-1</sup>). Separáční kapilára u tohoto uspořádání je vytažena do zúženého konce o vnitřním průměru 5 až 30 µm a její ústí je pokoveno. Kovový povlak tvoří vodivé spojení se zemnící elektroforetickou elektrodou. Tento typ spojení s hmotnostním spektrometrem je náchylný k ucpání v místě zúženého ústí.

### 3.6 Optimalizace experimentálních podmínek v CE-MS

Při volbě složení nosného elektrolytu je nutno respektovat dodatečná omezení vyplývající z použití hmotnostního spektrometru. Aby se zabránilo kontaminaci iontového zdroje a přerušení tvorby spreje během analýzy, je vhodné používat při přípravě nosného elektrolytu pouze těkavé soli typu mravenčanu nebo octanu amonného. Pokud je z důvodů dosažení dostatečné separační účinnosti a rozlišení nutno použít nosné elektrolyty s obsahem netěkavých složek (jako je běžně používaný fosfátový nebo borátový puf), je nutno tyto pufry používat v podstatně nižších koncentracích než je v CE běžné. Z hlediska volby pH je u kombinace CE-MS obvyklé pracovat v alkalické oblasti, za podmínek stabilizované rychlosti elektroosmotického toku. Dostatečný přívod stínícího roztoku nevylučuje práci za podmínek nulového elektroosmotického toku v kyselých nosných elektrolytech nebo při použití některých chemicky modifikovaných kapilár, může však dojít k nežádoucí migraci iontů ze stínícího roztoku dovnitř separační kapiláry a ovlivnění složení nosného elektrolytu. Pro potlačení tohoto efektu je výhodné přidávat do nosného elektrolytu a stínicí kapaliny stejnou sůl o stejně koncentraci.

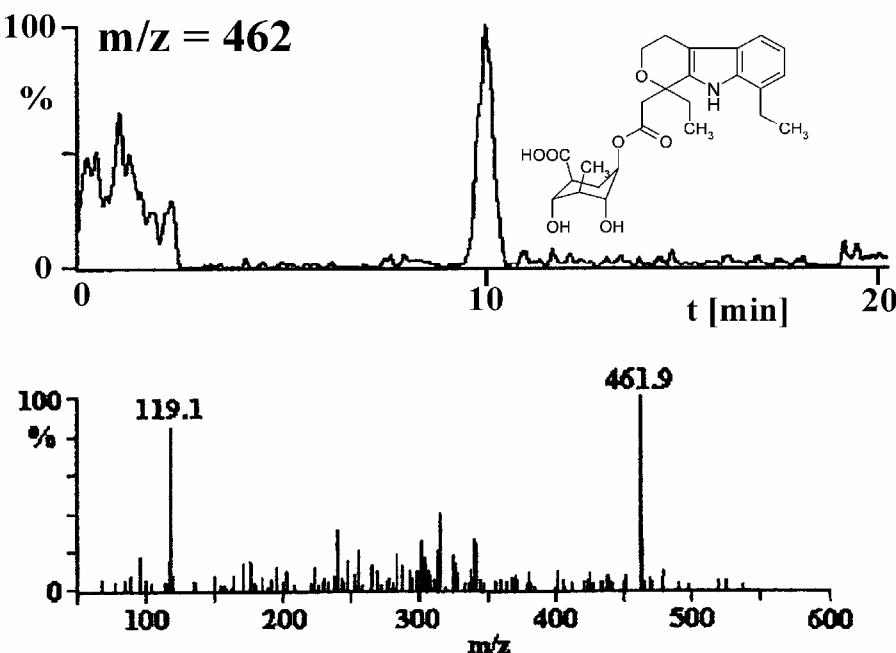
Volba složení a průtoku stínícího roztoku je kritická z hlediska dostačné účinnosti sprejové ionizace a přímo ovlivňuje citlivost a meze detekce stanovení. Jako organický modifikátor se používají běžná, s vodou mísetelná rozpouštědla o koncentraci 50 % a více, velmi dobrým modifikátorem je např. methanol a isopropylalkohol, méně vhodný je acetonitril. Pro zajištění dostačné iontové síly a elektrické vodivosti jsou do stínícího roztoku přidávány těkavé soli typu mravenčanu a octanu amonného. Zvolená iontová síla *I* stínícího roztoku je vždy kompromisem mezi požadavkem dobré elektrické vodivosti pro spojení zemnící elektrody vysokonapěťového zdroje s ústím separační kapiláry (žádoucí je vysoké *I*) a nutností zajistit stabilní podmínky tvorby spreje v ESI-zdroji bez nežádoucího jiskření (požadavek nízkého *I*). Také volba pH stínícího roztoku může výrazně ovlivnit efektivitu ionizace separovaných slabých elektrolytů. Je žádoucí, aby při zvoleném pH byly separované a následně ionizované látky dostačně disociovány. Z hlediska minimalizace šumu je důležité zajistit plynulý přívod stínícího roztoku do ESI-zdroje. Z tohoto hlediska je velmi výhodné použití kvalitních chromatografických pump, u nichž je zajistěn prakticky bezpulsní průtok kapaliny.

Problémy s hodnotami vloženého elektroforetického a elektrosprejového napětí může působit vzájemné ovlivňování obou vysokonapěťových zdrojů. Z hlediska jednoduchosti je optimální

elektrické zapojení, kdy konec separační kapiláry je spolu se zemnící elektroforetickou elektrodou na společném zemnícím potenciálu - pak hodnoty napětí elektroforetického a elektrosprejového zdroje odpovídají zobrazovaným hodnotám. V případě detekce negativních iontů je nutno na konec kapiláry vkládat nenulové napětí, jehož aktuální hodnota se přičítá k hodnotě vkládaného elektroforetického napětí. Nejproblematičtější je periodická generace pozitivních a negativních iontů, kdy se hodnota elektroforetického napětí periodicky mění se změnou napětí vkládaného zdrojem elektrospreje na konec kapiláry. Protože se velikosti elektroforetického a elektrosprejového napětí liší zhruba o řad (desítky kV v elektroforeze, jednotky kV v elektrospreji), je podstatně větší nebezpečí nežádoucích změn podmínek v elektrospreji, kde při poklesu napětí dochází k přerušení tvorby spreje a vzrůst napětí zvyšuje nebezpečí elektrických výbojů mezi koncem separační kapiláry a cylindrickou protielektrodou.

### 3.7 Aplikační oblast

Spojení CE-MS nachází uplatnění v oblasti analýzy látek iontové povahy v komplikovaných matričích, kde se dobře uplatní vysoká účinnost kapilární elektroforézy s možností strukturně selektivní detekce hmotnostním spektrometrem. Významnou aplikační oblastí je farmaceutická analýza, kde je metoda CE-MS v praxi využívána při stanovení obsahu a strukturní charakterizaci peptidových léčiv. Metoda CE-MS se velmi dobře uplatňuje při analýzách biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. Je možno předpokládat, že spolu s LC-MS bude jednou z klíčových analytických metod využívaných v oblasti genomiky a proteomiky. Obr. 3.6 dokumentuje možnosti využití kombinace CE-ESI-MS při farmakokineticích studiích, v horní části obrázku je uveden SIM-chromatogram analýzy kumulativního vzorku moči pacienta 3-7 hodin po podání léčiva ethodolak, ve spodní části je uvedeno odpovídající hmotnostní spektrum této látky s výrazným molekulárním iontem ( $m/z = 461,9$ ), umožňujícím její identifikaci. Možnosti aplikací dále rozšiřuje kombinování separačních metod před vstupem do hmotnostního spektrometru, např. HPLC-CE-MS.



Obr. 3.6: SIM-chromatogram a ESI-hmotnostní spektrum analýzy vzorku moči pacienta po podání léčiva ethodolak

## **Doporučená literatura**

Robert E. Ardrey Liquid Chromatography Mass Spectrometry" by. John Wiley and Sons (2003); ISBN: 0471498017.

"A Global View of LC/MS, How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems" by Ross Wil-loughby, Ed Sheehan & Sam Mitrovich. Global View Publishing Inc. (2nd. edition, 2002); ISBN 0966081307.

"Mass Spectrometry Desk Reference" by O. David Sparkman. Global View Publishing Inc. (2nd. edition 2006); ISBN 0966081390.

"Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" by W. M. A. Niessen & M. Niessen. Marcel Dekker (1999); ISBN 0824719360.

## 4. AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc., a Mgr. Tereza Vařilová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2

terezavařilova@seznam.cz

### 4.1 Úvod

Analýza biologicky aktivních látek je dnes nepostradatelnou a velmi rozvinutou oblastí analytické chemie. Mezi tyto látky patří hlavně proteiny, peptidy, léčiva a drogy a také složité směsi, které je požádáno rozdělit a přečistit. Biologické systémy jsou komplexní směsi, takže použitá separační technika by měla být vysoce selektivní a také dostatečně účinná, aby bylo možno izolovat jednotlivé složky. Jednou z metod vhodných pro analýzy biologicky aktivních látek je **afinitní chromatografie** (AC).

Princip afinitní chromatografie je znám už dlouho, ale její širší uplatnění umožnily až nové, rigidní stacionární fáze, které snesou práci za vysokých tlaků a nezpůsobují denaturaci proteinů. Afinitní metody, založené na molekulovém rozpoznávání, vykazují vysokou selektivitu, proto jsou často využívány pro analýzy proteinů a dalších biologicky aktivních látek, ačkoliv jejich separační účinnost je nižší než u ostatních separačních metod.

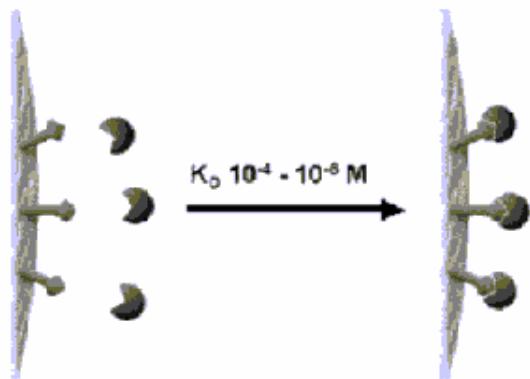
Komerční stacionární fáze nejsou příliš dostupné, protože většina proteinů pro tvorbu bioaktivního komplexu vyžaduje specifický ligand navázaný na pevný nosič. Proto jsou stacionární fáze často připravovány na míru pro daný protein a každá část procesu musí být optimalizována.

### 4.2 Princip metody

Afinitní chromatografie je typ adsorpční chromatografie založený na výjimečné schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reverzibilně komplementární struktury, např. enzym – substrát, enzym – inhibitor, protilátka – antigen, hormon – receptor. Molekuly, které jsou takovýchto interakcí schopné, se nazývají **afinitní ligandy**. Biospecifické interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce.

Celý proces analýzy se skládá ze tří kroků. Na začátku je nutné promýt stacionární fázi, aby došlo k ustálení startovacích podmínek. V prvním kroku dojde k nadávkování vzorku. Pouze komplementární molekuly se mohou z roztoku sorbovat na ligand stacionární fáze (viz obr. 4.1). Ve druhém kroku se kolona promyje, aby byly vymyty nečistoty a sloučeniny, které neinteragují se stacionární fází (pík v mrtvém čase). Ve třetím kroku je molekula sorbované látky eluována zpět do toku mobilní fáze: nejčastěji se toho docílí buď změnou pH nebo hodnoty iontové síly (nespecifická eluce), nebo přídavkem disociačních činidel, kdy přidaná látka vytvoří s ligandem pevnější komplex (specifická eluce). Eluci biologicky aktivních látek lze provést buď izokraticky (vhodnější pro jednoduché látky s malou afinitou k ligandu), nebo pomocí gradientu (nutné zvolit optimální strmost gradientu, aby se analyty dobře rozdělily a pásky byly úzké). Po každé analýze je nutné stacionární fázi regenerovat a tím připravit pro další použití.

Pokud např. enzym E interaguje s ligandem L, vznikne komplex E...L, jehož tvorbu popisuje příslušná rovnice a rovnovážná konstanta  $K$  [1]:



**Obr. 4.1:** Princip navázání molekuly na ligand stacionární fáze.  $K_D$  - hodnota konstanty stability komplexu [2]



$$K = \frac{[E \cdots L]}{[E][L]}$$

Hodnota této rovnovážné konstanty bývá běžně v rozmezí  $10^4 - 10^6$ . Pokud je její hodnota menší než  $10^4$ , vazebná interakce je příliš slabá a cílová molekula se může uvolnit do mobilní fáze příliš snadno a tím dávat široké zóny. Je-li konstanta je větší než  $10^9$ , tak se molekula vzorku váže příliš silně a k jejímu vymytí jsou zapotřebí drastické podmínky. V takovém případě hrozí ztráta biologické funkce dané molekuly nebo její ireverzibilní vazba na afinitní medium [3].

Jednou z modifikací této metody je afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech – *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC). Jako chelatotvorné kovy se velmi často užívají  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  nebo  $Co^{2+}$ . Metoda IMAC se stala jedním za základních purifikačních postupů pro rekombinantní proteiny [4]. Tato metoda je založena na specifických interakcích biopolymerů v roztoku s ionty kovů, které jsou vázány na stacionární fázi. Podmínkou separace je, aby protein byl schopen vytvořit s iontem dostatečně stabilní komplex. Protein se ke kovu váže přes vhodnou reaktivní skupinu. Kovové ionty jako akceptorzy elektronů interagují se skupinami, které mohou naopak elektrony poskytovat (v proteinech atomy N, S, O, případně P) [5].

### 4.3 Nosiče pro afinitní chromatografii

Jak již bylo zmíněno na začátku, komerční stacionární fáze pro afinitní chromatografii nejsou příliš dostupné, proto je ve většině případů nutné připravit si fázi vlastní. Celý proces se skládá z několika kroků. Na začátku je důležitý výběr vhodného nosiče, protože stacionární fáze se připravují navázáním afinitního ligantu na tuhý nosič. Matrice musí splňovat určité požadavky: co nejslabší interakce s aynalytem, chemická i mechanická stabilita a stabilita proti změnám pH (teplotní stabilita není určující, protože většina analýz se provádí při laboratorní teplotě). Dále matrice musí obsahovat velké množství chemických skupin, které umožní kovalentní připojení ligantu. Některé nosiče dodávce již v aktivované formě, ostatní je nutné předem aktivovat.

**Silikagel** je běžný nosič pro různé stacionární fáze. Na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny schopné disociace ve vodném prostředí, ale to nestačí pro kovalentní navázání ligandu. Proto je nutné zavést do silikagelu reaktivní funkční skupiny. To se většinou provádí reakcí se silany, které modifikují povrch reaktivními epoxy-skupinami [4]. Silikagel snese vysoké tlaky, ale je stabilní pouze v rozmezí pH 2 až 8 [6].

**Oxidy Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub>** tvoří další skupinu anorganických nosičů. Jsou chemicky stabilnější než silikagel a také odolávají vysokým tlakům. Alumina má heterogenní povrch, proto vykazuje nižší účinnost. Oxidy TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> jsou velmi odolné, snázejí práci i v extrémních podmínkách pH [3].

**Agarosové nosiče** se skládají ze dvou polysacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou  $\beta$ -(1,4)-O-. Jsou vysoce chemicky stabilní, hydrofilní a vykazují nízkou tendenci k nespecifickým interakcím. Jejich nevýhodou je omezená pH-stabilita [4-9] a tendence k mikrobiálnímu ataku [7]. Nejběžnějším agarosovým nosičem je Sepharosa.

**Polyakrylamidové gely** jsou syntetické kopolymery na bázi akrylamidu. Jejich výhodou je stabilita ve zředěných roztocích solí, v organických rozpouštědlech, močovině i guanidinium chlорidu. Kvůli svému syntetickému původu nejsou napadány mikroorganismy. Jejich nevýhodou je nízký stupeň porozity. Tento materiál je komerčně dostupný pod názvem Bio-Gel [8].

**Hydroxyalkylmethakrylátové nosiče** jsou rovněž syntetické matrice, které se připravují kopolymerací hydroxyalkylesterů kyseliny methakrylové s alkylen-bis(methakrylát). Jejich výhodou je chemická i mechanická stabilita (pH 2-12, kompatibilnost s většinou organických rozpouštěadel, tlaková odolnost až do 20 MPa) a rezistence vůči mikroorganismům. Jejich nevýhodou je částečně hydrofobní charakter, a tedy náchylnost k nespecifickým hydrofobním interakcím. Mezi nejrozšířenější patří hydroxyalkylmethakrylát (HEMA), což je makroporézní kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu. Dodává se v rozdílné velikosti částic a s různými aktivními skupinami. Dále sem patří Toyopearl (komerčně dostupný pod názvem TSK-gel), což je makroporézní sorbent na bázi ethylenglykolu a methakrylátu. Výhodou oproti nosiči HEMA jsou nižší nespecifické interakce [3].

**Dextran** je větvený polysacharid složený z glukosových jednotek spojených vazbou  $\alpha$ -1,6- a větvených vazbami 1,2-, 1,3- a 1,4-. Je chemicky stálý (snese prostředí NaOH), i když glykosidické vazby jsou citlivé k hydrolyze při nízkých hodnotách pH. Jeho nevýhodou, jako všech přírodních nosičů, je tendence k bakteriálnímu ataku [1]. Tyto gely jsou komerčně známé pod názvem Sephadex a Superdex.

**Celulosa** se skládá z lineárních glukosových jednotek spojených vazbou  $\beta$ -1,4, v malém množství se vyskytuje i vazba 1,6. Komerčně dostupná mikrokristalická celulosa je obvykle zesílena činidlem se dvěma funkčními skupinami, např. epichlorhydrinem, a je značně chemicky stálá. Protože je snadno dostupná a levná, je nejvíce využívána v průmyslové oblasti. Perlivá celulosa je všeobecnější, makroporézní, hydrofilní materiál s velkou kapacitou. Vláknitá celulosa je důležitý sorbent pro vazbu DNA [3].

**Monolitické fáze** kompaktněji zaplňují prostor kolony (v porovnání s náplňovými stacionárními fázemi), která je vyplňena polymerem o definované pórovitosti. Polymer se vytváří vhodnou polymerační reakcí přímo v koloně. Monolity mají několik výhod oproti klasickým stacionárním fázím v rychlé separaci, což je velmi důležité při analýze labilních látek [9].

**Vtištěné polymery** (imprinted polymers) jsou rovněž syntetické materiály. Jejich příprava spočívá v polymeraci monomeru se zesíťovadlem a iniciátorem polymerace v přítomnosti ligandu. V polymeru zůstanou „obtisky“ s umělými vazebnými místy, do kterých se specificky váže vtištěná molekula. Toho se často využívá pro chirální separace, při nichž lze oddělit např. L- a D-formy aminokyselin [9].

#### 4.4 Aktivace nosičů pro afinitní chromatografii

Pokud není nosič dodán v aktivované formě od výrobce, je nutné jej ještě před navázáním ligandu aktivovat. Aktivačních reakcí existuje mnoho, nejběžnější jsou:

- bromkyanová metoda (CNBr);
- aktivace bisoxiranem (zavedení epoxy skupin);
- aktivace divinylsulfonem (DVS);
- aktivace organickými sulfonylchloridy (tosylchlorid = p-toluensulfonylchlorid, tresylchlorid = 2,2,2-tri-fluoroethansulfonylchlorid)

#### 4.5 Imobilizace afinitního ligandu na tuhý nosič

Imobilizace ligandů na povrchu tuhého nosiče je obvykle založena na kovalentní vazbě (méně často se využívá fyzikální adsorpce, zachycení v semipermeabilní membráně či mikroenkapsulace v polymerních kuličkách nebo hydrogelech; tyto způsoby se používají jen pro vybrané specifické analyty a aplikace).

Podmínky imobilizace se liší v závislosti na vlastnostech ligandu a typu aktivních skupin nosiče. Na většinu běžných nosičů je možné imobilizovat afinitní ligand v teplotním rozmezí 4-25 °C (při imobilizaci stejně jako při analýze se většinou pracuje při laboratorní teplotě, proto teplotní stabilita nosičů není určujícím limitem), pouze pro epoxy-aktivované nosiče lze teplotu zvýšit až na 60 °C. Ligandy se navážou na nosič řádově v hodinách (na většinu nosičů se ligand naváže do 12 hodin, imobilizace se nejčastěji provádí přes noc). Hodnota pH se liší podle konkrétního typu ligandu a jeho reagující skupiny (většinou se ale nepracuje s extrémními hodnotami pH) [1].

Jako ligandy mohou být použity všechny látky schopné biospecifické reverzibilní vazby. Nízkomolekulární ligandy jsou stabilnější a stéricky lépe dosažitelné než vysokomolekulární ligandy, které jsou hůře definovatelné a mohou podléhat denaturaci [9].

#### 4.6 Blokace nezreagovaných aktivních skupin

Protože po imobilizaci afinitního ligandu na tuhý nosič zůstane na nosiči vždy část skupin aktivních, je nutné je zablokovat. K tomu se nejčastěji využívá dvou postupů [3]:

1. Na zbytkové aktivní skupiny nosiče (na nezreagované aktivní místo nosiče) se váže vhodná látka, např. glycín, glycerol nebo ethanolamin, která by neměla ovlivňovat sorpci a desorpci analytu.
2. Hydrolýzou se odstraní zbytkové aktivní skupiny; hydrolýza se provádí v alkalickém prostředí a je využitelná pouze pro ligandy, které jsou v tomto prostředí stálé.

## 4.7 Stanovení množství imobilizovaného ligandu

Důležitou charakteristikou afinitní stacionární fáze je množství kovalentně navázaného ligandu. Ke zjištění jeho koncentrace bylo vypracováno mnoho metod [10]:

**Diferenční analýza:** množství ligandu vázaného na nosič se vypočítá z rozdílu mezi celkovým množstvím ligandu přidaného do reakční směsi a množstvím nezreagovaného ligandu, které se získá po důkladném promytí sorbantu. Tato metoda je velmi nepřesná, zejména když se kovalentně váže jen malá část ligandu, nebo je-li ligand špatně rozpustný.

**Přímá spektroskopie:** v případě transparentních nosičů lze zjistit množství kovalentně navázaného ligandu přímou spektroskopii.

**Kyselá nebo enzymová analýza:** působením kyseliny za drastičtějších podmínek dochází k hydrolyze vazby mezi ligandem a nosičem a uvolní se ligand nebo produkt jeho degradace, který lze stanovit (např. v případě proteinů analýzou aminokyselin). Tato metoda není příliš výhodná, protože může dojít k současnemu rozkladu nosiče (tent problém lze částečně řešit enzymovou hydrolyzou za mírných podmínek).

**Elementární analýza:** množství navázaného ligandu lze také určit z elementární analýzy. Stanovuje se přítomný prvek, např. síra, jod, dusík nebo fosfor. Elementární analýza dusíku může poskytovat zkreslené výsledky, protože jeho obsah vzrůstá při aktivaci bromkyanem.

**Radioaktivita:** v některých případech lze použít ligand značený radioizotopem. Jako radioizotopy se nejčastěji používají  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  nebo  $^{57}\text{Co}$ .

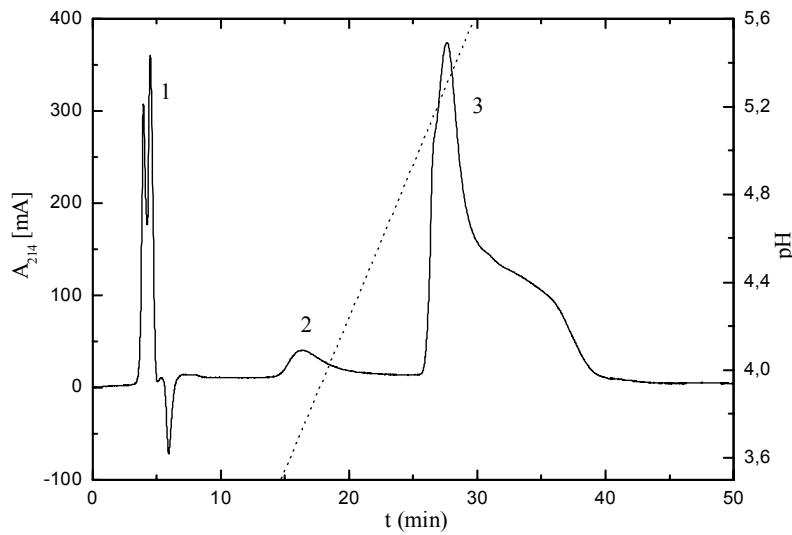
## 4.8 Příklady použití afinitní chromatografie

Metoda afinitní chromatografie se nejčastěji používá k izolaci peptidů, proteinů, glykoproteinů a obecně biologicky aktivních látek. Možnosti aplikace metody jsou velmi široké. Afinitní metody se hodí pro prekoncentraci stopových množství sloučenin, čistění analytů v komplexních směsích i k analýze látek. Také se používají v oblasti životního prostředí, např. pro analýzy pesticidů a toxinů. Četné aplikace jsou v lékařství a medicíně, např. enzymy, hormony, viry a jejich genetický fond, rakovinotvorné markery, protilátky, proteiny semenné plazmy a léky/drogy. Afinitní chromatografie je nepostradatelnou metodou v proteomice [3]. Důležité jsou práce zaměřené na stanovení vazebních konstant pro kvantifikaci interakce protein-ligand. Jako příklad je možné uvést stanovení vazební konstanty komplexu heparinu s protrombinem III ( $3,4 \cdot 10^7$ ) [11]. Afinitní chromatografie se často kombinuje a doplňuje s dalšími separačními technikami, např. s dvoudimensionální elektroforézou (2-DE). Před vlastní separací proteinů pomocí 2-DE lze afinitní chromatografii použít pro prekoncentraci a předúpravu vzorku [3].

Na naší katedře jsme se zabývali několika různými aplikacemi afinitní chromatografie:

### 1. Pepsin

Prasečí pepsin A byl analyzován stacionární fázi HEMA-3,5-dijod-L-tyrosin (HEMA-DIT), kterou jsme sami připravili. Kolona byla před analýzou ekvilibrována roztokem acetátového pufru o pH 3,5. Při tomto pH byl vzorek také dávkován. Pepsin byl eluován zvýšením pH na hodnotu 5,6. Jednotlivé chromatografické frakce byly testovány na chymasovou aktivitu, aby se potvrdila či vyloučila přítomnost pepsinu. Průběh analýzy je znázorněn na obr. 4.2. Pro tento typ analýz byly připraveny tři různé typy stacionární fáze: DIT byl navázán na HEMA s aktivními vinylsulfonovými nebo epoxidovými skupinami a na epoxy-aktivovaný Toyopearl<sup>12</sup>.



**Obr. 4.2:** Afinitní chromatografie prasečího pepsinu A na stacionární fázi HEMA-DIT [12]  
1, 2 - nečistoty; 3 - prasečí pepsin

### 2. Proteiny semenné plazmy

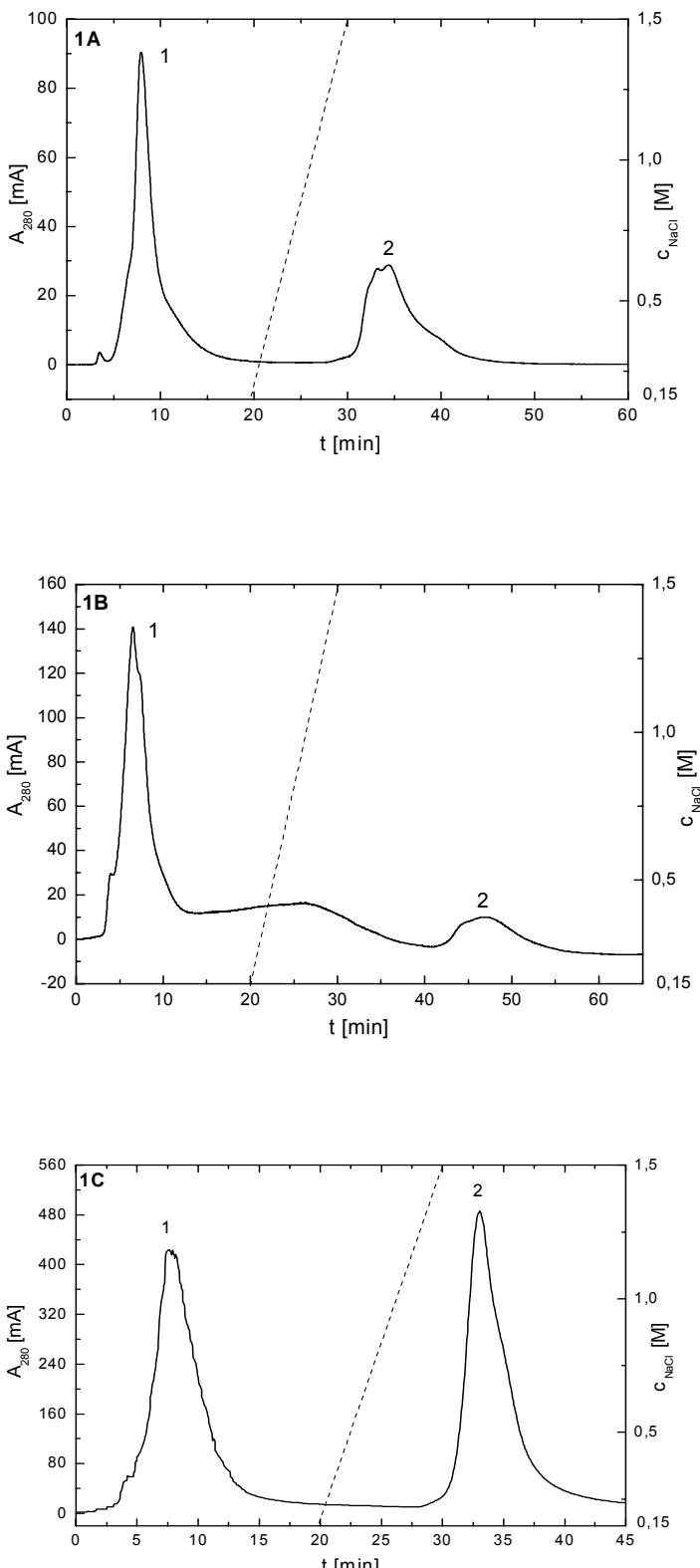
Dalším příkladem aplikace afinitní chromatografie je separace proteinů semenné plazmy. Byly provedeny analýzy kančí, býčí a lidské semenné plazmy na komerčně dostupné stacionární fázi Toyopearl-heparin. Heparin vázající ( $H^+$ ) frakce byla eluována zvýšením iontové síly roztoku (z  $0,15M\text{-NaCl}$  na  $1,50M\text{-NaCl}$ ). Fosforylcholin vázající ( $P^+$ ) frakce byla eluována přídavkem fosforylcholínu ( $c = 50 \text{ mmol l}^{-1}$ ) do mobilní fáze. Průběh analýzy plné semenné plazmy býčí, kančí a lidské je na obr. 4.3 A-C [13].

### 3. Glykoproteiny

Také jsme se také zabývali analýzou glykoproteinů. Reálnými vzorky byly vybrané alergeny, které často patří do skupiny glykoproteinů. Jako ligand byl na nosič navázán konkanavalin A (Con A). Analýzy byly provedeny na připravené stacionární fázi Toyopearl-Con A. Pro tento projekt jsme vyrábili a otestovali dvě různé stacionární fáze na nosiči Toyopearl, který byl aktivován skupinami epoxy- a trestů-. Na epoxy-aktivované koloně došlo k rychlejší eluci všech sledovaných látek. Příklad analýzy pylového alergenu Artemisia vul. je na obr. 4.4.

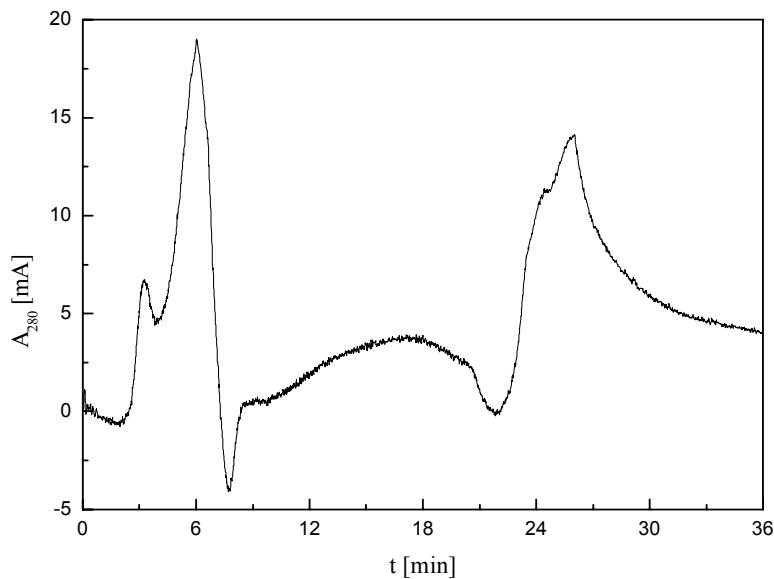
## 4.9 Závěr

Afinitní chromatografie je účinná metoda pro selektivní čištění a izolaci velkého množství sloučenin. Současným cílem je, aby bylo možné izolovat jednotlivé sloučeniny ze složitých směsí a matric ve vysokém stupni čistoty. Během posledních dvaceti let metoda prošla velkým vývojem a stala se účinným nástrojem pro řadu aplikací. V dnešní době dochází k velkému pokroku ve vývoji afinitních stacionárních fází (vtištěné polymery a monolitické fáze) i v miniaturizaci techniky (např. afinitní membrány). Budoucnost této metody spočívá v dalším vývoji a pokroku technologických postupů a zvýšení účinnosti celého systému.



**Obr. 4.3:** Afinitní chromatografie plné semenné plazmy na stacionární fázi Toyopearl-heparin [13]

A - kančí; B - býčí; C – lidská; 1 - proteiny nevázající heparin; 2 - proteiny vázající heparin



**Obr. 4.4:** Afinitní chromatografie pylového alergenu Artemisia vul. na stacionární fázi Toyopearl-Con A

## Literatura

1. Turková J.: Bioaffinity Chromatography. Elsevier, druhé vydání, Amsterdam 1993.
2. <http://www.amershambiosciences.com>, staženo 17. února 2005.
3. Vařilová T.: Chem. Listy 99 (2005) 570.
4. Zouhar J.: Chem. Listy 93 (1999) 683.
5. Zatloukalová E.: Chem. Listy 98 (2004) 254.
6. Unger K.K.: Porous silica, its properties and use as support in column liquid chromatography. New York: Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam 1979.
7. Carlsson J., Janson J.-C., Sparrman M.: Affinity Chromatography. In Protein Purification, (eds. J.-C. Janson & L. Rydén), VCH Publishers, Inc., Uppsala 1989.
8. Bio-Rad: <http://www.biorad.com>, staženo 17. února 2005.
9. Štulík K. a kol.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha 2004.
10. Lowe C. R., Dean P.D.G.: Afinitní chromatografie. SNTL, Praha 1979.
11. Hogg P.J., Jackson C., Winzor D.: J. Anal. Biochem. 153 (1986) 380.
12. Vařilová T., Vránková A., Pacáková V., Tichá M., Štulík K.: J. Chromatogr. A 1084 (2005) 207.
13. Vařilová T., Seménková H., Horák P., Maděra M., Pacáková V., Tichá M., Štulík K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1110.

## Doporučená literatura

- Linhult M., Gulich S., Hober S.: Protein Peptide Lett. 12, 205 (2005).  
 Leonard M.: J. Chromatogr. B 699, 3 (1997).  
 Tozzi C., Anfossi L., Giraudi G.: J. Chromatogr. B 797, 289 (2003).  
 Zusman R., Zusman I.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 175 (2001).  
 Jin W., Brennan J.D.: Anal. Chim. Acta 461, 1 (2002).  
 Lee W.-Ch., Lee K. L.: Anal. Biochem. 324, 1 (2004).  
 Winzor D.J.: Biochem. Soc. Trans. 31, 101 (2003).  
 Kaliszan R.: J. Chromatogr. B 715, 229 (1998).

## 5. AFINITNÍ KAPILÁRNÍ ELETROFORÉZA

prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc., a Mgr. Tereza Vařilová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2

pacakova@natur.cuni.cz

### 5.1 Úvod

Současný pokrok v biologických vědách závisí do značné míry na vývoji nových moderních analytických separačních technik, jako jsou chromatografické a elektroforetické metody. U elektroforetických metod se kromě molekulové hmotnosti uplatňuje i elektrický náboj. Metody, které využívají bioafinitní princip, mají výhodu v tom, že se v nich uplatňuje snad vůbec nejvýznamnější vlastnost biomolekul, tj. specifické rozpoznávání, které tvoří základ všech vysoce selektivních biologických procesů. Aplikace separačních metod ke studiu specifických interakcí vedla ke vzniku řady technik, které ve svém názvu nesou slovo „afinitní“ (afinitní chromatografie, afinitní elektroforéza).

Význam a rozsah aplikací elektroforetických metod značně vzrostl rozvinutím a komerциalizací kapilární elektroforézy (CE). Vysoká citlivost, vynikající rozlišovací schopnost, krátká doba analýzy, dobrá přesnost stanovení, malý objem vzorků potřebný pro analýzu, nízká spotřeba reagencí a rozsáhlé možnosti automatizace jsou hlavní výhody CE. Kapilární elektroforéza se obvykle provádí v homogenním roztoku (kapilární zónová elektroforéza, CZE), avšak je možné využít kapiláry naplněné gelem (kapilární gelová elektroforéza, CGE) nebo chromatografickou stacionární fází (kapilární elektrochromatografie, CEC). Afinitní elektroforéza v kapiláře se nazývá afinitní kapilární elektroforéza (ACE) a využívá se jak pro analytické účely, tak ke studiu molekulárních interakcí.

### 5.2 Principy afinitní elektroforézy

Dvě molekuly A a B, které mají různou elektroforetickou pohyblivost ( $\mu_A$ ,  $\mu_B$ ), vytvářejí komplex AB, jehož pohyblivost  $\mu_{AB}$  se liší od pohyblivosti molekul A a B (v důsledku různého poměru náboje k hmotnosti),



kde  $k_{\text{on}}$  je rychlostní konstanta pro tvorbu komplexu a  $k_{\text{off}}$  je rychlostní konstanta pro jeho disociaci. Existují v podstatě dva způsoby provádění ACE:

1. Obě složky A i B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE).
2. Jedna ze složek je imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu (CGE) či na chromatografickém nosiči (CEC).

Metodu CZE (ad 1) můžeme aplikovat dvěma různými způsoby, v závislosti na rychlosti rozpadu vzniklého komplexu AB. Pokud je disociace komplexu AB pomalá vzhledem k době analýzy, můžeme v CZE přímo detegovat komplex. Analyzuje se vzorek, který obsahuje rovnovážnou směs receptoru a ligantu (analýza rovnovážných směsí). Pokud je disociace komplexu AB rychlá, kom-

plex nelze detegovat. Komplexotvorné reakce však ovlivňují elektroforetické pohyblivosti interagujících složek (*analýza založená na změně elektroforetických pohyblivostí*).

Pohyblivost komplexu leží obvykle mezi pohyblivostmi složek A a B. Pokud je však jedna ze složek nerozpustná nebo immobilizovaná, pak je pohyblivost komplexu nulová. V případě interakcí proteinů s ligandy je změna náboje ligandu hlavním zdrojem změny pohyblivosti komplexu, protože změna molekulové hmotnosti je zanedbatelná.

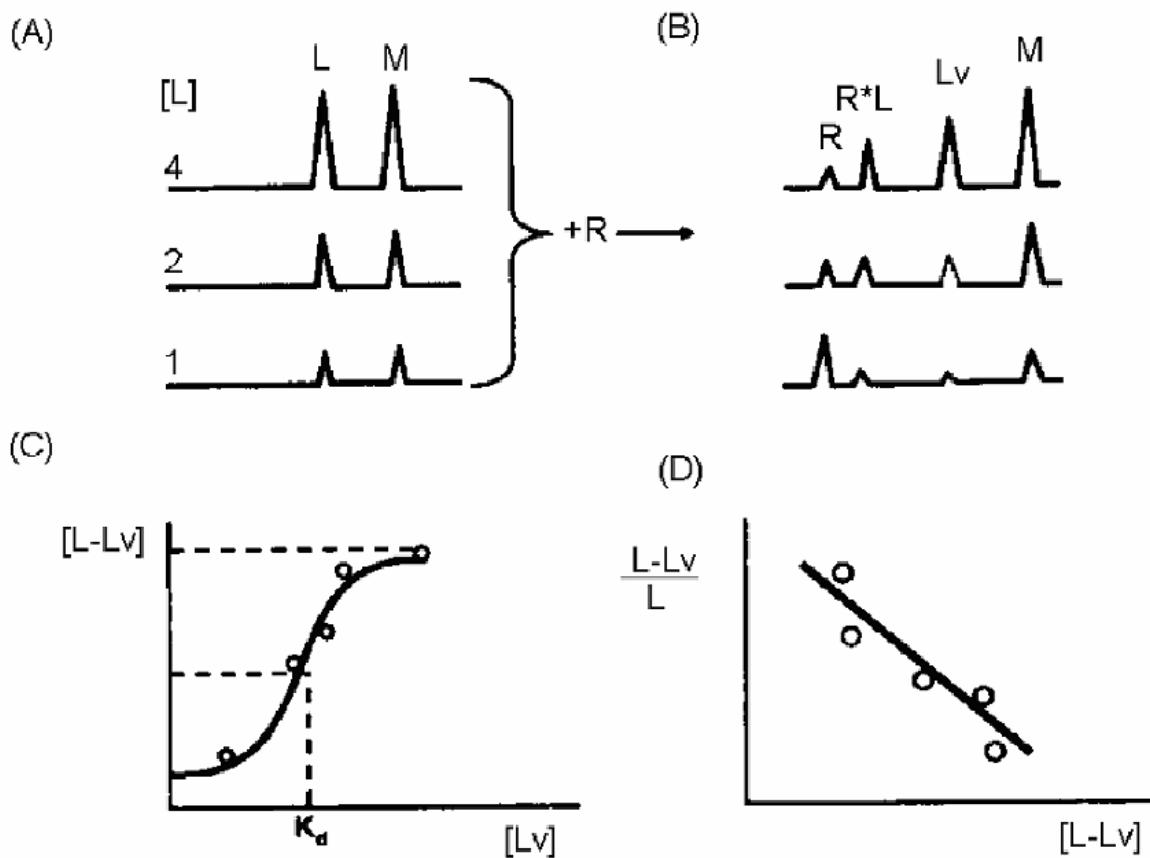
Techniky prováděné v homogenním roztoku jsou nejrozšířenější, protože jsou aplikovatelné na široký rozsah analytů i separačních podmínek. Jsou použitelné za předpokladu, že tvorbou komplexu dojde k měřitelné změně pohyblivosti migrujících částic. V tomto případě lze určit vazebné konstanty vznikajících komplexů buď z měření posunů migračních časů, nebo na základě zjištění koncentrací složek komplexu. Pokud separace volných složek od komplexu není dostatečná (separační faktor  $R > 1$ ), nelze tuto techniku použít.

Techniky využívající immobilizovaných ligandů mají výhody i nevýhody: Výhodou je, že interakce probíhají s maximální účinností. To však přináší i nevýhodu v tom, že koncentrace aktivních molekul po immobilizaci je velmi malá, a tedy obtížně stanovitelná. Dále může dojít v důsledku immobilizace k pozměnění procesu rozpoznávání. Může být také obtížné regenerovat povrch s immobilizovaným ligandem, aniž by došlo ke snížení aktivity a koncentrace immobilizovaného materiálu.

### 5.3 Analýza rovnovážných směsí

Analýza rovnovážných směsí je vhodná pro systémy s pomalou kinetikou, což je většina systémů s vysokou afinitou. Oddělení komplexu od rovnovážné směsi a jeho detekce je nejpřímějším důkazem molekulárních interakcí mezi složkami. Koncentrace komplexu během analýzy klesá v důsledku disociace; proto jsou výhodné krátké doby analýzy, kterých se v CE běžně dosahuje. V tomto případě je CE pouze prostředkem jak separovat a kvantifikovat volné a vázané molekuly.

Ligand a receptor, přítomné ve vzorku v různých poměrech, jsou po ekvilibraci separovány v systému CE a páky odpovídající volnému a vázanému ligandu vyhodnoceny. Třebaže koncentrace komplexu během analýzy klesá, koncentrace původních složek A a B se během analýzy nemění. Protože jsou složky A a B od komplexu separovány, nemohou se zúčastnit opětovné tvorby komplexu a reprezentují rovnovážné koncentrace. Rovnovážné konstanty a stechiometrie vazebné interakce se určí ze závislosti koncentrace vázaného ligandu  $[L-L_v]$  na koncentraci volného ligandu  $[L_v]$  či na celkové koncentraci ligandu  $[L]$  nebo z poměru koncentrací vázaného a volného ligandu  $[L-L_v/L_v]$  jako funkce koncentrace vázaného ligandu  $L-L_v]$  (obr. 5.1). Podobný postup se používá i v jiných měření, např. ve vylučovací chromatografii, ale výhodou ACE metody je, že receptor nemusí být čistý a dále že ligand a receptor nemusí mít rozdílnou velikost. Dobu potřebnou pro ustálení rovnováhy lze snadno zjistit z opakováných analýz, což umožňuje velmi malá spotřeba vzorku (v nl). Sycením jedné složky druhou složkou (titrantem) se zjistí stechiometrie komplexu. Nasycení se pozná buď tím, že pik komplexu dosáhne maximální konstantní hodnoty, nebo se objeví pik titrantu. Pokud má molekula více vazebních míst, jako např. protilátky, pak se postupně nasycení jednotlivých míst projeví sérií piků příslušných komplexů a tím získáme další cennou informaci o stechiometrii jednotlivých vazeb.



**Obr. 5.1:** Princip stanovení vazebných konstant na základě CE analýzy rovnovážných směsí - adaptováno podle Heegaard N. H. H. a spol., J. Chromatogr. B 715, 29 (1998)

**A.** Generace dat pro kalibrační křivku (závislost plochy píků na koncentraci ligantu L; M – značkovač (marker)

**B.** CE analýza rovnovážné směsi různých koncentrací ligantu [L] s fixní koncentrací receptoru R; vzorky byly ekvilibrovány před CE analýzou (R – receptor, R\*L komplex, L<sub>v</sub> – volný ligand)

**C.** Vyhodnocení dat - přímé vazebné křivky, z koncentrace [L<sub>v</sub>] se určí koncentrace vázaného ligantu, [L-L<sub>v</sub>], a z této koncentrace na koncentraci L<sub>v</sub> se určí K<sub>D</sub> jako L<sub>v</sub> v polovině saturace

**D.** Scatchardova závislost poměru koncentrací vázaného ligantu k volnému ligandu na koncentraci volného ligandu. Směrnice této závislosti je 1/K<sub>D</sub>

Tuto metodu lze použít jen tehdy, když je disociace komplexu v průběhu CE analýzy zanebatelná. Další omezení použitelnosti této techniky představuje poměrně nízká citlivost UV fotometrické detekce, daná krátkou dráhou paprsku. Pro silně interagující složky je koncentrace volného ligantu velmi nízká a tedy obtížně stanovitelná. Tento problém se většinou řeší použitím fluorescenční detekce buzené laserem (LIF).

Základním požadavkem je dostatečná separace ligantu od komplexu. Pokud se pohyblivost komplexu liší jen velmi málo od pohyblivosti jedné ze složek, lze komplex detektovat na základě vymizení píku jedné ze složek při saturaci a jeho opětovném objevení po nasycení všech vazebných míst. Další možností je označit jednu ze složek fluoroforem a detektovat technikou LIF.

## 5.4 Analýza založená na změně mobilit

Nízkoafinitní (nestabilní) komplexy s krátkým poločasem je možné charakterizovat pomocí CE na základě změny pohyblivosti jedné ze složek v důsledku multiasociačních a disociačních reakcí v roztoku. Při tomto postupu je receptor přítomen ve vzorku a ligand v nosném elektrolytu. Jedná se o obdobu klasické afinitní chromatografie, avšak v ACE je snazší kontrolovat koncentraci ligantu. Podmínka pro použití této metody je, aby kinetika tvorby komplexů byla rychlá ve srovnání s dobou analýzy. Převrácená hodnota rychlostní konstanty disociace komplexu,  $1/k_{\text{off}}$ , musí být mnohem nižší než migrační doba receptoru, a poločas rozpadu komplexu vyjádřený jako  $\ln 2/k_{\text{off}}$ , musí být menší než 1 % migračního času. Pokud jsou tyto podmínky splněny, můžeme tuto techniku považovat za rovnovážnou. Pokud však je stabilita komplexu vysoká, pak počet následných rovnovážných mezi receptorem a ligandem ustavených v kapiláře během analýzy je nízký a pík dávkované složky je široký a rozmytý. Rychlostní konstanty vazebních reakcí mohou být určeny analýzou elučních profilů píků.

Provádíme-li elektroforézu složky A v roztoku B, pak elektroforetická pohyblivost složky A se v okamžicích disociace a asociace diskontinuálně mění mezi hodnotami  $\mu_A$  a  $\mu_{AB}$  a pozorovaná pohyblivost  $\mu$  složky A je pak váženým průměrem časových intervalů, po něž se pohybuje jako volná molekula a jako komplex AB. Pokud  $\alpha_{AB}$  je doba, po kterou existuje komplex AB, pak je pohyblivost  $\mu$  dána vztahem

$$\mu = (1 - \alpha_{AB}) \mu_A + \alpha_{AB} \mu_{AB} \quad (2)$$

Tuto rovnici můžeme přepsat ve formě

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} \alpha_{AB} \quad (3)$$

kde  $\Delta\mu = \mu - \mu_A$  je pozorovaná změna pohyblivosti složky A v přítomnosti B a  $\Delta\mu_{\max} = \mu_{AB} - \mu_A$  je maximální změna pohyblivosti A v přítomnosti B při nekonečném zředění neboli rozdíl pohyblivostí volné složky A a komplexu AB. Protože  $\alpha_{AB}$  můžeme vyjádřit jako molární zlomek,

$$\alpha_{AB} = [\text{AB}] / ([\text{A}] + [\text{AB}]) \quad (4)$$

který souvisí s rovnovážnou konstantou  $K_d$

$$K_d = [\text{A}][\text{B}] / [\text{AB}] \quad (5)$$

vztahem

$$\alpha_{AB} = [\text{B}] / (K_d + [\text{B}]) \quad (6)$$

lze pro změnu pohyblivosti  $\Delta\mu$  odvodit rovnici (7)

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} [\text{B}] / (K_d + [\text{B}]) \quad (7)$$

Veličiny  $\Delta\mu_{\max}$  a  $K_d$  lze určit nelineární regresní analýzou změrených hodnot  $\Delta\mu$  při různé koncentraci B. Na základě analogie s rovnicí Michaelise a Mentenové pro kinetiku enzymů lze použít řadu linearizovaných závislostí, např.  $\Delta\mu = F(\Delta\mu / [\text{B}])$ , podle rovnice

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} - K_d (\Delta\mu / [\text{B}]) \quad (8)$$

Změna pohyblivosti se zjistí z experimentálních proměnných

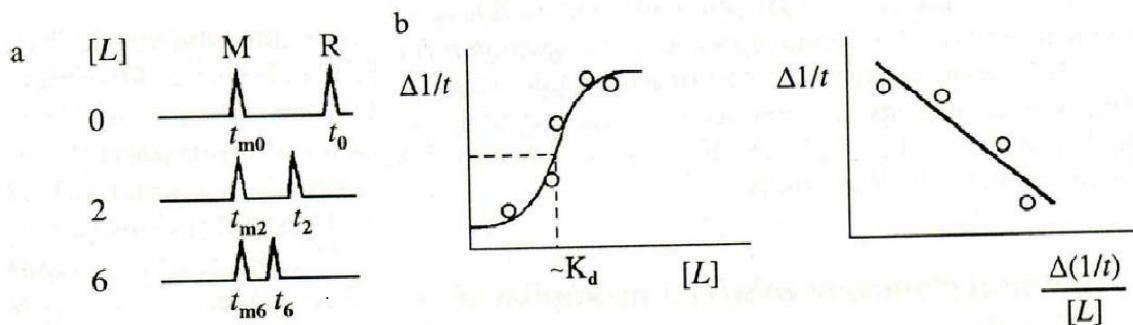
$$\Delta\mu = L_D/E \left\{ (1/t_m - 1/t_0) - (1/t'_m - 1/t'_0) \right\} = (L_D/E) \cdot \Delta(1/t_m) \quad (9)$$

takže dostaneme

$$\Delta(1/t_m) = \Delta(1/t_m)_{\max} - K_D \Delta(1/t_m)/[B] \quad (10)$$

kde  $t_m$  a  $t_0$  jsou migrační časy složky A a značkovače (markeru) elektroosmotického toku EOF za nepřítomnosti složky B v nosném elektrolytu a  $t'_m$  a  $t'_0$  jsou tyto časy za přítomnosti složky B,  $L_D$  je délka kapiláry k detektoru,  $E$  je intenzita elektrického pole.

Rovnovážné konstanty se experimentálně stanoví takto: Kapilára se naplní pufrem, který obsahuje jednu ze složek, např. ligand (A). Stejný pufr, avšak bez ligandu, se použije v elektroodových nádobkách. Dávkujeme se roztok druhé složky, receptoru (B), a měří se jeho mobilita při různých koncentracích ligandu. Rovnovážná konstanta se určí na základě rovnic (7) až (10) (viz obr. 5.2). Pokud má ligand menší pohyblivost než receptor, musí být obsažen v pufru u anody. Rozhodnutí, která složka bude přítomna ve vzorku a která v pufru, závisí na dostupnosti interagujících látek a relativní snadnosti pozorování změn pohyblivosti. Rozpustíme-li v základním elektrolytu vysokomolekulární složku, pak zaznamenáme největší změnu pohyblivosti u nízkomolekulární složky. Proto studujíme se interakce proteinů s léčivy, pak je třeba rozpustit protein v základním elektrolytu. Jsou-li interakce receptoru s ligandem slabé, je vhodné snížit pohyblivost ligandu např. tím, že ho kovalentně navážeme na gel, který vytvoříme v kapiláře.



**Obr. 5.2:** Princip stanovení vazebních konstant na základě měření změn pohyblivostí - adaptováno podle Heegaard N. H. H. a spol., J. Chromatogr. B, 715, 29 (1998)

**A.** CE analýza receptoru v elektrolytu, který obsahuje různé koncentrace ligantu; M - značkovač,  $t_{m0}$ ,  $t_{m2}$ ,  $t_{m6}$  jsou migrační časy značkovače M a  $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_6$  jsou migrační časy receptoru R při různé koncentraci ligantu [L]; **B.** vyhodnocení dat na základě rov. (10)

Koncentrace se volí tak, aby jejich numerické hodnoty byly srovnatelné s hodnotou disociacní konstanty a koncentrační rozsah byl dostatečně široký pro přesné stanovení. V případě proteinů jako receptorů postačuje rozsah koncentrací 0,1 až 0,5 mg/mL pro UV detekci při 214 nm. Dávkovaný objem receptoru je řádově v nL a tím i množství spotřebovaného ligandu je zanedbatelné. Ustavení rovnováhy po nadávkování je rychlé, pokud je koncentrace ligandu vysoká ve srovnání s koncentrací receptoru.

Metodu lze použít za těchto podmínek: reakce musí být dostatečně rychlá, vazebná stichioometrie 1 : 1 a koncentrace receptoru musí být mnohem nižší než koncentrace ligandu (méně než 0,1  $K_D$ ), avšak jeho absolutní koncentrace nemusí být známa (stanovení nízkých koncentrací, např.

proteinů, je obtížný úkol). Dále se předpokládá, že vazebná místa jsou homogenní a rovnoměrně distribuována, že nedochází k interakci s vnitřními stěnami kapiláry a vložené napětí neovlivňuje tvorbu komplexu.

Výhodou této metody je, že vzorek nemusí být čistý, což je zvláště významné, je-li ligand nestálý a tvoří neaktivní produkty. Lze tak stanovit současně afinitní konstanty isoenzymů. Přesnost stanovení změn mobility závisí na stabilitě komplexu vzhledem k době separace. Lze postihnout i změny v mobilitě proteinů, které se liší o jediný elementární náboj.

## 5.5 Požadavky na CE systém

Vzhledem k tomu, že molekulární interakce závisí na teplotě, je nutné v ACE termostatovat separační kapiláry a při kvantitativní práci (stanovení rovnovážných konstant) používat kapiláry dostatečně dlouhé, aby délka části, která není termostatována, byla zanedbatelná vůči celkové délce kapiláry. Vliv elektrického pole na molekulární interakce je zanedbatelný. Významný je vliv adsorpce, kterou lze omezit modifikací vnitřních stěn kapiláry, např. filmem vhodného polymeru.

Vnitřní objem kapiláry a dávkované množství vzorku jsou zhruba tisíckrát nižší v CE než v HPLC nebo při elektroforéze v gelové vrstvě. Meze detekce při UV-fotometrickém měření se pohybují pro proteiny kolem absolutního množství 0,1 až 1 ng, což pro CE aplikace představuje koncentraci 0,1 až 1 mg ml<sup>-1</sup>. Citlivost detekce lze zvýšit použitím fluorescenčního detektoru s laserovou excitací (LIF), při níž se jedna z interagujících složek označí fluoroforem. Meze detekce jsou zhruba o 3 rády nižší než při UV-spektrofotometrické detekci.

Koncentrace nosných elektrolytů používaná v CE je obecně výrazně nižší než koncentrace solí ve fyziologickém roztoku. Vyšší koncentrace nosného elektrolytu je tolerována při nižším separačním napětí. Doporučené pufry pro ACE jsou např. 0,1M-tricin, 0,2M-glycin, 50mM-taurin nebo 0,5M-trimethylammoniumpropylsulfonát.

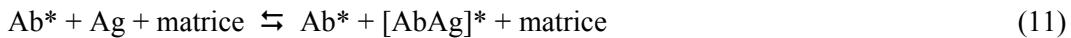
Hodnoty  $K_d$  určené metodou ACE jsou v dobré shodě s výsledky získanými jinými metodami. Relativní směrodatná odchylka pro 5 měření byla 10 % u přístrojů s manuálním řízením a 6 % u přístrojů s automatickou kontrolou. Pravé rovnovážné konstanty jsou získány pouze tehdy, když jsou obě výše uvedené metody měření kombinovány, tj. receptor přítomný ve vzorku je předem ekvilibrován s ligandem a poté jsou stanoveny rovnovážné konstanty na základě měření mobilit interagujících složek.

## 5.6 Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze

ACE je alternativní metodou k existujícím imunitním stanovením. Její výhody spočívají v možnosti oddělit volné protilátky od komplexu i látek přítomných ve vzorku, ve schopnosti současně stanovovat více látek, např. drogy i jejich metabolity, v kratší době analýzy ve srovnání s imunitními testy na pevné fázi a snížené ceně analýzy dané malými objemy dávkovaných vzorků (cca nanolitory). Citlivá LIF detekce je umožněna označením antigenu, buď fluoroforem, nebo enzymaticky, např. alkalickou fosfatasou ve spojení s fluorogenním substrátem (fluoresceindifosfátem). V některých případech však takto zvýšená citlivost nepostačuje, např. při stanovení estradiolu a hCG proteinu, kde je vyžadováno určení koncentrací nižších než 10<sup>-12</sup> mol l<sup>-1</sup>. Nevýhodou ACE je možnost sorpce analytů na stěny kapiláry a nižší produktivita (max. 20 vzorků za hodinu). Kompetitivní imunitní stanovení jsou běžnější než přímá stanovení.

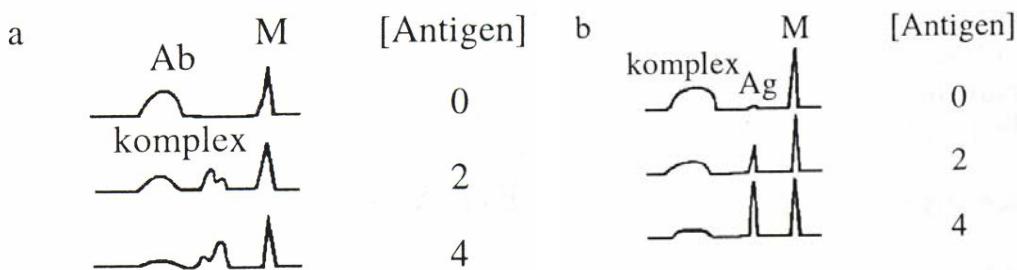
### 5.6.1 Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení

Nekompetitivní stanovení spočívá v přidání přebytku protilátky nebo jejího fragmentu,  $Ab^*$ , označených fluoroforem nebo enzymaticky, ke vzorku, aby bylo zajištěno, že veškerý antigen,  $Ag$ , přítomný ve vzorku, interaguje s protilátkou:



Po proběhlé interakci (inkubaci) se část vzorku nadávkuje do CE-kapiláry, separuje se komplex  $[AbAg]^*$  od nadbytku  $Ab^*$  a detegují se obě složky pomocí LIF (viz obr. 5.3a). Při vazbě značených protilátek na antigen dochází k významné změně jejich elektroforetické pohyblivosti.

Příklady využití ACE k přímému imunitnímu stanovení jsou v literatuře zatím ojedinělé a není prokázána její výhodnost ve srovnání s běžným uspořádáním. Hlavní problém těchto stanovení je heterogenita značených protilátek nebo jejich fragmentů, která má za následek řadu píků v elektroferogramu. Příprava a čištění fragmentů z monoklonálních protilátek není snadné, avšak aplikace genového inženýrství může tento problém vyřešit a rozšířit použitelnost této metody.



**Obr. 5.3:** Princip přímého a kompetitivního imunitního stanovení pomocí CE s LIF - adaptováno podle Heegaard N. H. H. a spol., J. Chromatogr. B, 715, 29 (1998)

a) Přímé stanovení: Protilátky značené fluoroforem,  $Ab$  a fluoreskující značkovač  $M$ , jsou přidány k roztoku, který obsahuje neznačený antigen  $Ag$  ve zvyšující se koncentraci. Dva píky komplexu jsou důsledkem mono- a divalentní protilátky

b) Nepřímé (kompetitivní) stanovení: Antigen značený fluoroforem je smíchán s rostoucím množstvím protilátky  $Ab$ , která vytěsňuje FITC-Ag z komplexu Ag-FITC-Ag. Měří se plocha píku značeného  $Ag$ , která je úměrná množství neznačeného  $Ag$

### 5.6.2 Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení

Při této metodě se vzorek, který obsahuje neznačený antigen  $Ag$  v přítomnosti matrice, inkubuje s protilátkou (antisérem)  $Ab$  a značeným antigenem  $Ag^*$  (nebo jeho fragmentem):



Během inkubace soutěží  $Ag^*$  s  $Ag$  přítomným ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky  $Ab$ . Po ustavení rovnováhy se dávkuje alikvot směsi do CE systému s LIF detekcí, kde se oddělí volný  $Ag^*$  od komplexu  $[AbAg]^*$ . Výška nebo plocha píku volného  $Ag^*$  a  $[AbAg]^*$  nebo jejich poměr jsou úměrné obsahu antiguenu v původním vzorku (viz obr. 5.3b). Kalibrační křivky jsou nelineární; ke stanovení se používá pouze jejich lineární úsek. Důležité je správně zvolit koncentrace  $[Ag^*] + [Ag]$ , aby ležely v lineární části kalibrační křivky.

Kompetitivnímu imunitnímu stanovení se dává přednost před přímým stanovením tehdy, když je obtížné separovat volnou protilátku od komplexu (nelze tudíž použít přímé stanovení). Tento případ nastává u nízkomolekulárních protilátek, např. peptidů, které významně neovlivňují pohyblivost komplexu [AbAg]\*.

Hlavní výhody CE při kompetitivním imunitním stanovení jsou vysoká citlivost (mez detekce  $0,1 \text{ nmol l}^{-1}$ ), malé množství vzorku potřebné k analýze (méně než attomol), možnost analyzovat několik analytů současně a vysoká přesnost stanovení. Vzhledem k tomu, že postačí stanovit pouze značený antigen, lze zjednodušit CE separaci a zkrátit dobu analýzy až na 0,5 až 1 min. Rovněž není nutné používat elektroforeticky čisté protilátky; polyklonální protilátky byly použity v řadě případů. Miniaturizace CE systému s umístěním celého přístroje na mikročip je jedním ze současných trendů. Zvýšení výtežnosti analýz umožňuje uspořádání s více kapilárami (až 48 kanálové uspořádání).

## 5.7 Příklady použití ACE

Do ACE jsou v současné době zahrnovány všechny separace, při nichž se využívají selektivní interakcí. V tomto širokém pojetí sem patří všechny selektivní interakce s aditivy, přítomnými v elektrolytu, tedy i chirální separace. ACE se především využívá ke stanovení vazebních konstant. Zabývali jsme se měřením disociačních konstant komplexů konkanavalinu A s glykoproteiny ovalbuminem, fetuinem a kyselým  $\alpha$ -glykoproteinem. Analýzou rovnovážných směsí byly zjištěny hodnoty  $K_D$  pro ovalbumin  $8,1 \cdot 10^{-6}$ , pro fetuin  $9,5 \cdot 10^{-6}$  a pro kyselý  $\alpha$ -glykoprotein  $18 \cdot 10^{-6}$ . Dále jsme zjišťovali disociační konstanty komplexu prasečího pepsinu A s 3,5-dijod-L-tyrosinem (DIT) metodou založenou na měření posunu migračních časů. Nalezená hodnota  $K_D$  činila  $6 \cdot 10^{-6}$ .

## 5.8 Závěr

ACE je vhodnou komplementární separační metodou k afinitní HPLC a lze předpokládat, že ji bude v řadě případů postupně nahrazovat pro svou vysokou separační účinnost, rychlosť analýzy, nízké nároky na množství vzorku a tím i podstatně nižší náklady na analýzu. Můžeme proto očekávat další rozvoj kapilárních elektromigračních metod, zejména jejich spojení on-line s hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí při určování struktury biologicky aktivních látek. Do budoucna lze očekávat další vývoj nových separačních medií zvyšujících účinnost a selektivitu separací, zdokonalování detekčních metod a další miniaturizaci. Miniaturizace, které se dosahuje v CE, je velmi vhodná pro studium interakcí ve velmi malých objemech, které se blíží objemu buňek. Elektroforéza na čipu je slibnou alternativou pro miniaturizaci CE. Nově používaná separační media v ACE jsou vtištěné polymery (imprinting polymers), které dovolují přípravu materiálu požadované afinity. Další zvýšení citlivosti fluorescenční detekce bude možné dosáhnout laserovými diodami, které jsou menší a často účinnější než ostatní lasery. Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda již má nezastupitelné místo v ACE.

## Doporučená literatura

- Gayton-Ely, M., Pappas, T., Holland, L., Bioanal. Chem., 382, 570-580 (2005).  
Heegaard, N. H. H., Electrophoresis, 24, 3879-3891 (2003).  
Ostergaard, J., Heegaard, N. H. H., Electrophoresis, 24, 2903-2913 (2003).  
Villareal, V., Kaddis, J., Azad, M., et al., Anal. Bioanal. Chem., 376, 822-831 (2003).  
Heegaard, N. H. H., Nissen, M. H., Chen, D. D. Y., Electrophoresis 23, 815-822 (2002).

- Tseng, W. L., Chang, H. T., Hsu, S. M., et al., Electrophoresis 23, 836-846 (2002).
- Pacáková V., Štulík K., Hubená S., Tichá M., Chem. Listy 94, 97 (2000).
- Guijt-van Duijn, R. M., Frank, J., van Dedem, G. W. K., et al., Electrophoresis 21, 3905-3918 (2000).
- Heegaard, N. H. H., Kennedy, R. T., Electrophoresis 20, 3122-3133 (1999).
- Kajiwara, H., Anal. Chim. Acta, 383, 61-66 (1999).
- Colton, I. J., Carbeck, J. D., Rao, J., et al., Electrophoresis 19, 367-382 (1998).
- Heegaard N. H. H., Nilsson S., Guzman N. A., J. Chromatogr. B, 715, 29-54 (1998).

## 6. CHIRÁLNÍ SEPARACE V HPLC

doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov  
2030, 128 43 Praha 2  
bosakova@natur.cuni.cz

Optická aktivita byla objevena na počátku devatenáctého století francouzským vědcem Jeanem-Baptistem Biotem, který studoval povahu rovinně polarizovaného světla. Ale byl to Louis Pasteur, kdo v roce 1848 poprvé izoloval krystaly čistých optických izomerů z racemické směsi vínanu sodno-amonného. Dalšími následovníky byli Van't Hoff a Le Bel, kteří jsou považováni za zakladatele stereochemie svým návrhem čtyřvazného atomu uhlíku, jehož vazby směřují do vrcholu tetraedru a uhlíkový atom je v jeho centru. A tak nejznámější a nejsnadněji rozpoznatelná forma chirality je spojena s atomem uhlíku, který nese čtyři různé substituenty. Takový uhlík je nazýván **stereocentrum** nebo také **chirální centrum**. Cesta od Pasteurovy první izolace čistého enantiomeru k dnešním rychlým chromatografickým technikám je vydlážděna řadou poznatků z oblasti stereochemie. Objasnění reakčních mechanismů, jako jsou nukleofilní substituce nebo eliminační reakce, by nebylo možné bez studia opticky aktivních látek. A znalost těchto mechanismů vedla v konečném důsledku i k úplné syntéze tak důležitých biologicky aktivních látek, jakými jsou například reserpin nebo prostaglandin F<sub>2α</sub>.

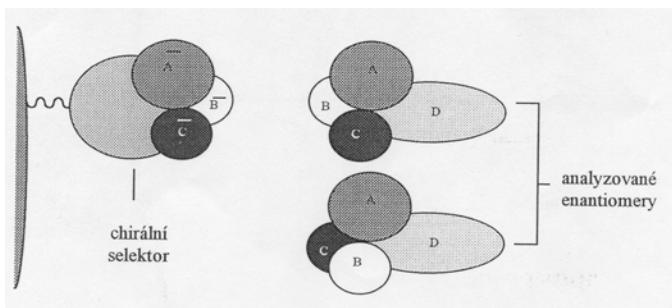
Schopnost živých organismů produkovat a konvertovat chirální látky s významnou stereospecifitou je velká. Pohled na vnitřní strukturu enzymů ukazuje, jak důležité je prostorové uspořádání s mnohonásobnými aktivními místy, uzpůsobenými pro interakci substrátu. Podobně i interakce mezi biologicky aktivní látkou a příslušným proteinovým receptorem vykazuje vysokou nebo prakticky úplnou stereospecifitu. Identifikace, charakterizace, separace a stanovení takovýchto látek má tedy naprosto zásadní význam především v biologii, biotechnologií a lékařství.

Protože optické izomery (enantiomery) mají prakticky totožné fyzikálně-chemické vlastnosti, prostředky pro jejich dělení musí být vysoce selektivní a separace musí být dostatečně účinné. Proto přichází v úvahu především vysokoúčinné separační techniky, které využívají interakcí biologického rozpoznávání.

Pro přímé dělení enantiomerů (bez předchozí derivatizace opticky čistou látkou) lze v podstatě použít libovolný separační systém (např. plynovou chromatografií, kapalinovou chromatografií, kapilární zónovou elektroforézu, elektrochromatografií aj.), v němž se vhodné enantioselektivní prostředí vytvoří zabudováním nebo přidáním příslušného chirálního selektoru(ů). Jednotlivé enantiomery analytu pak vytváří s chirálním selektorem (opticky čistou látkou) tzv. diastereoizomery, jejichž vlastnosti se mohou lišit a následně je lze separovat.

Většina modelů chirálního rozpoznávání je založena na teorii tzv. tříbodové interakce, navržené Dalglishem v roce 1952, podle které jsou pro úspěšnou chirální diskriminaci (a tím i separaci) potřebné tři současně probíhající interakce mezi enantiomerem a chirálním selektorem, jak naznačuje obr. 6.1. Celková vazebná energie není v konečném důsledku tak důležitá jako vzájemný rozdíl celkových vazebných energií vytvářejících se přechodných diastereoizomerů, tzn. jejich rozdílná stabilita. Úspěšnému stereoselektivnímu dělení napomáhá velká stereogenní odlišnost mezi enantiomery analytu a chirálním selektorem (rozdílná velikost, strukturní odlišnost, rigidita skupin

vázaných v těsné blízkosti chirálního centra) a vzájemná blízkost stereogenních center. Důležitým faktorem je i kinetika vzniku diastereoizomerních komplexů, kdy pomalejší přenos hmoty má zpravidla za následek horší účinnost separace. Na chirálním rozlišení se podílí řada molekulových interakcí. Stupeň asociace mezi enantiomerem a chirálním selektorem, vyjádřený pomocí rovnovážné konstanty, je funkcí typu a velikosti vazeb i funkcí repulsních interakcí. Mezi nejčastější interakce krátkého dosahu patří vodíková vazba, interakce přenosu náboje, hydrofobní interakce, elektrostatické a dipól-dipolové přitažlivé nebo odpudivé síly. Jako chirální selektor může být použita v podstatě libovolná sloučenina, která vykazuje molekulovou asymetrii, tzn. neobsahuje žádný prvek symetrie.



**Obr. 6.1:** Schéma tříbodové interakce

V posledním desetiletí prudce vzrostl zájem o chirální separace opticky aktivních látek, zejména léčiv a pesticidů. Novější se zájem soustřeďuje i na enantioseparace složek potravin a potravinového řetězce. Je známo, že se jednotlivé enantiomery mohou v chirálním prostředí, jaké představuje živý organismus, výrazně kvalitativně i kvantitativně lišit ve svých účincích. Tuto skutečnost lze vysvětlit rozdílnou stereoselektivní interakcí enantiomerů na proteinových receptorech. Často má pouze jeden optický izomer léčiva požadované pozitivní účinky, zatímco druhý je v lepším případě několikanásobně méně aktivní nebo neaktivní, v horším případě má protichůdné terapeutické vlastnosti nebo je dokonce toxicický. V současné době tvoří téměř polovinu všech léčiv chirální látky, ale pouze malá část synteticky připravených preparátů je produkovaná v opticky čisté formě. Získání čistého enantiomeru léčiva enantioselektivní syntézou je v mnoha případech značně komplikované (někdy i nemožné) a drahé. V souvislosti s přípravou selektivně působících léčiv sílí poptávka po vývoji metodik, schopných separovat racemát v dostatečně krátkém elučním čase, ať už pro účely mezioperační kontroly nebo hodnocení lékových forem, a zároveň s vysokou hodnotou rozlišení, umožňující semipreparativní až preparativní dělení, rozšiřující klasické metody purifikace (např. použití stereoselektivních enzymů, opakovánou rekristalizaci diastereoizomerních párů: enantiomer-chirální činidlo nebo jejich destilaci). Pro tyto účely je nejčastěji využívána metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie.

V literatuře je publikována řada prací, týkajících se problematiky optimalizace separace velkého počtu opticky aktivních látek a snahy formulovat schematické modely, jimiž lze vysvětlovat principy enantioseparace. Vzhledem ke složitosti interakce chirální solut-chirální selektor, která je v kapalinové chromatografii navíc komplikována i vlivem použité mobilní fáze, mohou tyto modely poskytnout pouze přibližné vysvětlení enantioselektivity. Tak i u strukturně velmi podobných látek může být za stejných experimentálních podmínek výsledný chirálně diskriminační mechanismus díky odlišnému prostorovému uspořádání jednotlivých enantiomerů značně rozdílný.

V současné době existuje velký počet chirálních selektorů (CS), vázaných ve formě komerčně dostupných chirálních stacionárních fází (CSP) pro techniku vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Řada z nich vykazuje vysokou selektivitu vůči úzkému okruhu analytů a postrádá prvky určité univerzálnosti, několik z nich poskytuje vysoké enantiorozlišovací schopnosti i pro velký počet chirálních sloučenin. Mezi ně patří zejména,  $\pi$ -komplexující a H-vazebné (např. dinitrobenzoyl- deriváty) chirální selektory, CS na bázi proteinů, derivátů amylosy a celulózy, cyklodextrinů a makrocyclických antibiotik, přičemž nejvyšší počet aplikací vykazují poslední dva výše jmenované typy chirálních selektorů, resp. chirálních stacionárních fází. Důvodem je dostupnost řady jejich derivátů a možnost pracovat s nimi v různých separačních módech – normálním, reverzním a polárně-organickém. V jednotlivých separačních módech se uplatňují více či méně rozdílné stereoselektivní i nestereoselektivní interakce, které mohou přispívat k enantiorozlišení širokého spektra látek.

## 6.1 Cyklodextriny

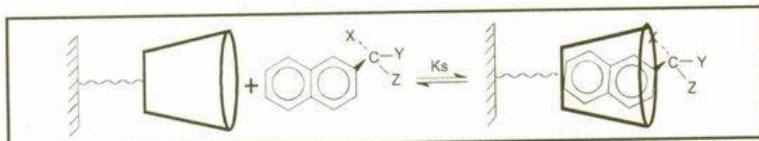
Cyklodextriny (CD) vznikají enzymatickým působením amylas některých mikroorganismů na škrob a jakožto biodegradační produkty jsou dostupné výhradně ve formě pravotočivého enantiomeru. Jsou tvořeny cyklickými polysacharidy, ve kterých jsou D-(+)-glukopyranosové jednotky spojené  $\alpha$ -(1-4)-vazbami. Ze směsi cyklických oligosacharidů s 6 až 12 molekulami glukosy v cyklu mají praktický význam pouze tři – se šesti ( $\alpha$ -cyklodextrin,  $\alpha$ -CD), sedmi ( $\beta$ -cyklodextrin,  $\beta$ -CD) a osmi ( $\gamma$ -cyklodextrin,  $\gamma$ -CD) glukopyranosovými jednotkami. Ve vodných roztocích mají cyklodextriny tvar komolého kužele s otevřenými základnami. Širší okraj je ohraničen sekundárními hydroxylovými skupinami (glukosových jednotek C2 a C3), užší základna je ohraničena primárními hydroxylovými skupinami (C6) schopnými rotace. Vnitřek dutiny (kavity) je hydrofobní, vnější povrch je hydrofilní díky již zmíněným hydroxylovým skupinám na obou okrajích kužele. Ty umožňují snadnou derivatizaci cyklodextrinů polárními i nepolárními substituenty, jejichž výsledkem je široké spektrum derivátů, využívaných v různých separačních systémech, v současné době např. sulfatovaný  $\beta$ -cyklodextrin, methyl-, hydroxyethyl- a hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin nebo heptakis(2,6-di-O-methyl)- a heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyklodextrin. Základní interakci analytu s cyklodextrinem představuje inkluze hydrofobní části analytu do apolární dutiny cyklodextrinu na úrovni slabých van der Waalsovských vazebních interakcí. Volné nebo substituované hydroxylové skupiny, zejména v poloze 2 a 3, mohou poskytnout další potřebné stereoselektivní interakce. Významnou úlohu hraje rozměrová kompatibilita komplexované části hostující molekuly (solutu) a hostitele (cyklodextrinu), jež je závislá nejen na velikosti, ale i na tvaru hostující molekuly. Obecně lze říci, že dutina  $\alpha$ -cyklodextrinu je rozměrově nevhodnější pro nesubstituovanou fenylovou skupinu, pro substituované fenylové, naftylové a bifenylové kruhy je vhodná kavita  $\beta$ -cyklodextrinu a polycyklické aromáty se třemi až pěti cykly jsou silně komplexovány  $\gamma$ -cyklodextrinem. Zatímco struktura  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrinu je zcela rigidní a stabilní jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech, flexibilnější  $\alpha$ -cyklodextrin je schopný v prostředí o vysokém obsahu vody komplexovat i rozsáhlější molekuly.

### 6.1.1 Chirální stacionární fáze založené na bázi cyklodextrinů v HPLC

Díky svým vysoce stereoselektivním vlastnostem, poměrně snadné dostupnosti a příznivé ceně našly cyklodextriny uplatnění prakticky ve všech důležitých separačních technikách. Prvními chirálními selektory ze skupiny cyklodextrinů, použitými k přípravě chirálních stacionárních fází v HPLC, byly nativní  $\alpha$ -,  $\beta$ -, a  $\gamma$ -cyklodextriny. Pomocí jedné nebo dvou primárních hydroxylo-

vých skupin je cyklodextrin kovalentně navázán na nosič (nejčastěji silikagel), zatímco sekundární hydroxylové skupiny jsou dostupné pro selektivní derivatizaci, přednostně v pozici 2.

Všechny cyklodextrinové stacionární fáze mohou být použity v reverzním separačním módu. Ve vodně-organické mobilní fázi dominuje inkluzní retenční mechanismus (viz. obr. 6.2), z jehož podstaty vyplývá, že separovaný analyt by měl obsahovat alespoň jeden aromatický kruh. Výjimkou je separace některých heterocyklů a blokovaných aminokyselin na hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinové CSP. Určité funkční skupiny, např. -I, -Br, -NO<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>4</sub> vykazují silnou afinitu k cyklodextrinové dutině, skupiny jako karboxylová, karbonylová nebo aminoskupina preferují vodíkovou vazbu s hydroxylovými skupinami na širším okraji cyklodextrinového kuželu. Oba typy substituce mohou zvyšovat retenci aromatické struktury analytu na cyklodextrinových CSP. Volbu složení mobilní fáze ovlivňuje několik faktorů. S cyklodextrinovou kavitou interaguje nejméně voda a má tedy nejmenší vytěšňovací schopnost. Ta roste u alkoholů se stoupajícím počtem methylenových skupin, silně interagujících s glykosidickými kyslíky cyklodextrinového prstence. Methanol je schopný vytvářet slabé vodíkové vazby se sekundárními hydroxylovými skupinami cyklodextrinu a blokovat je tím pro interakci s akceptorovým místem vodíkové vazby analytu. Stupeň rozlišení je ovlivňován i typem pufru, jeho koncentrací a hodnotou pH. S výjimkou možné deprotonace hydroxylových skupin jsou nativní cyklodextriny ve vodných roztocích stabilní v neutrálním až silně alkalickém prostředí, ale snadno podléhají hydrolyze při pH < 3. Vhodnou volbou hodnoty pH vodné složky mobilní fáze vzhledem k hodnotám pK analytu lze podpořit či omezit vznik vodíkové vazby u polárních skupin analytu, vázaných přímo nebo v těsné blízkosti chirálního centra. Díky inkluzi pufru do kavity cyklodextrinu ovlivňuje typ pufru a jeho koncentrace retenci analytu.

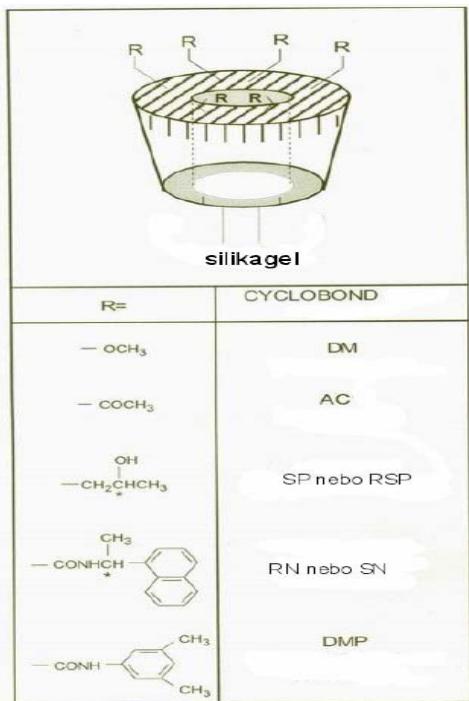


**Obr. 6.2:** Schématické znázornění inkluze analytu do dutiny cyklodextrinu vázaného ve formě CSP.

Možnosti ovlivňovat inkluzní komplexaci analytu přímo přes interakci se sekundárními hydroxylovými skupinami nativních cyklodextrinů nebo s karbamátovými, acetátovými a hydroxypropylovými funkčními skupinami derivatizovaných cyklodextrinů využívá polárně-organický separační mód. Majoritní složku mobilní fáze tvoří acetonitril s menším přídavkem methanolu, kontroloující retenci analytu. Zvýšení obsahu methanolu vede ke snížení retence. Přídavek velmi malého množství kyseliny octové a triethylaminu (v desetinách objemových procent) ovlivňuje selektivitu enantioseparace. Použití kyseliny a báze v bezvodém prostředí stimuluje vznik vodíkové vazby. Polárně-organický mód je proto vhodný pro enantioseparace látek, obsahujících alespoň dvě funkční skupiny, schopné elektrostatických interakcí, z nichž jedna by měla být v těsné blízkosti stereogenního centra.

Při enantioseparaci v normálním separačním módu se uplatňují především interakce  $\pi-\pi$  a vodíková vazba. Mobilní fáze se nejčastěji skládá z hexanu, zprostředkovávajícího interakce, který je zpravidla modifikován propan-2-olem nebo ethanolem, někdy i malými přídavky kyseliny octové a triethylaminu pro podpoření vzniku vodíkové vazby.

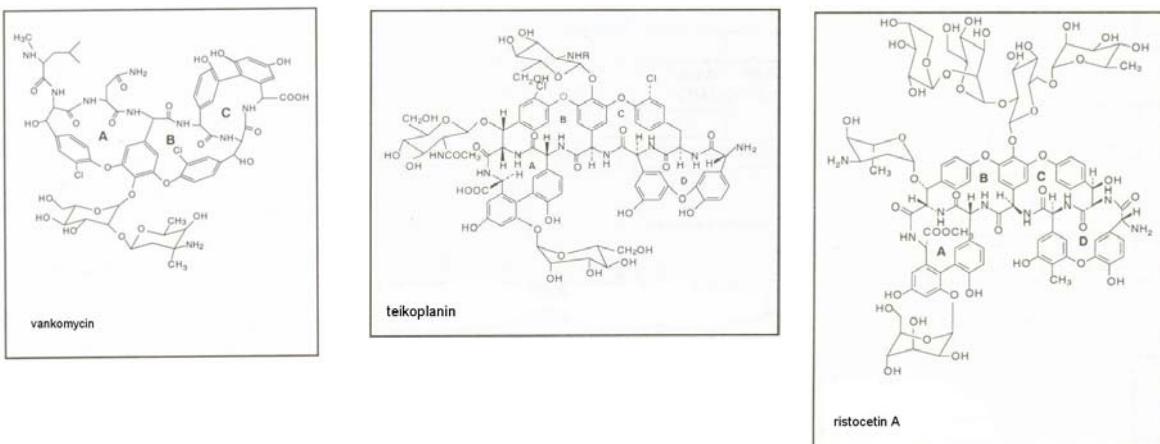
Vedle chirálních stacionárních fází založených na bázi nativních cyklodextrinů existuje celá řada derivatizovaných cyklodextrinů, vázaných ve formě CSP, které na svých substituentech nesou další chirální centra, aromatické zbytky nebo skupiny, schopné tvořit vodíkové vazby a poskytují tak další interakční možnosti a rozšiřují okruh analytů, chirálně separovatelných pomocí cyklodextrinových selektorů. Díky své významné rozměrové kompatibilitě s malými molekulami z oblasti farmaceutické i environmentální analýzy se stal základem pro přípravu stéricky odlišných derivátů  $\beta$ -cyklodextrinu, jehož základní deriváty jsou uvedeny na obr. 6.3.



Obr. 6.3: Chirální stacionární fáze založené na bázi derivatizovaného  $\beta$ -cyklodextrinu

## 6.2 Makrocyklická antibiotika (MA)

Chirální selektory na bázi makrocyklických antibiotik (ansamyciny a glykopeptidy) byly zavedeny do praxe v 90. letech minulého století D. W. Armstrongem a během deseti let se několik z nich (vankomycin, teikoplanin, ristocetin A) zařadilo mezi jedny z nejčastěji využívaných chirálních selektorů jak v HPLC, tak v kapilární elektroforéze a kapilární elektrochromatografii. Přírodní makromolekuly glykopeptidů jsou syntetizovány přírodní cestou jako fermentační produkty určitých bakterií. Na obr. 6.4 jsou uvedeny struktury tří nejpoužívanějších glykopeptidů: vankomycinu, syntetizovaného bakterií *Streptomyces orientalis*, vankomycinu podobného teikoplaninu, který je produkován bakterií *Actinoplanes teichomyceticus* a ristocetinu A, jenž je fermentačním produktem bakterie *Nocardia lurida*. Základní kostru všech tří glykopeptidů tvoří peptidický řetězec, substituovaný navzájem propojenými fenyly, cukernými zbytky, řadou funkčních skupin (z nichž některé jsou schopné ionizace) a velkým počtem stereogenních center. Písmeny A-D jsou označeny mělké kavyty, v jejichž blízkosti se nacházejí stereoselektivně důležitá donor/akceptorová místa vodíkové vazby. Stereoselektivní interakce poskytované makrocyklickými antibiotiky akcentují především elektrostatické interakce, vodíkové vazby a  $\pi$ - $\pi$  interakce. Na rozdíl od  $\beta$ -cyklodextrinových chirálních selektorů, inkluze do více či méně prostorově uzavřené struktury glykopeptidů je podstatně méně významná. Také hodnoty vazebné energie mezi solutem a selektorem jsou slabší, takže kinetika separačního děje je rychlejší.



Obr. 6.4: Struktura vankomycinu, teikoplaniu a ristocetinu A

### 6.2.1 Chirální stacionární fáze, založené na bázi makrocyklických antibiotik

Vankomycin (glykopeptid), rifamycin (ansamycin) a thiostrepton (polypeptid) byly prvními chirálními selektory, navázanými na silikagelový nosič ve formě chirální stacionární fáze. Z těchto tří CSP byla do praxe zavedena pouze vankomycinová CSP (CHIROBIOTIC V), následovaná teikoplaninovou (CHIROBIOTIC T), ristocetinovou (CHIROBIOTIC R) a avoparcinovou CSP, komerčně nedostupnou. Chirobiotické CSP mohou pracovat ve třech základních separačních systémech, a to v reverzním, normálním a novém polárně organickém separačním módu. Každý z nich preferuje jiný typ z možných interakcí (komplexace  $\pi-\pi$ , vodíková vazba, inkluze, sterické interakce, elektrostatické interakce).

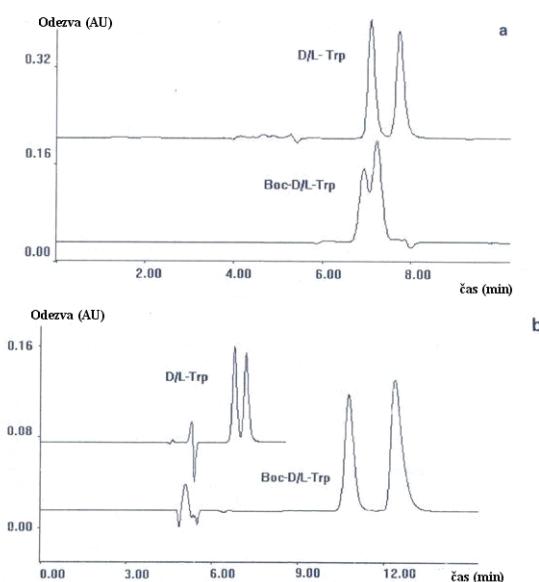
Binární mobilní fáze - polární rozpouštědlo/vodný roztok pufu - tvoří základ reverzního módu. Typ a množství organického modifikátoru ovlivňují retenci analytu, typ pufu a hodnota pH jeho vodného roztoku kontrolují selektivitu. V mobilní fázi s vysokým obsahem organického modifikátoru se uplatňují především elektrostatické interakce a vodíková vazba. Se zvyšujícím se podílem vodné složky nabývají na významu hydrofobní interakce a inkluze analytu do více či méně prostorově uzavřené struktury selektoru. Stabilita přechodných diastereoizomerních komplexů chirální stacionární fáze/analyt je závislá zejména na ionizaci analytu. V případě, že skupina schopná ionizace je v těsné blízkosti stereogenního centra analytu, preferují bazické analyty nízkou a kyselou vysokou hodnotu pH pufu (3,5 až 7,0). Nový polárně-organický separační mód je modifikací polárně-organického módu, zavedeného pro cyklodextrinové CSP. Díky přítomnosti silně ionizovatelných funkčních skupin v molekulách glykopeptidů, může být organický podíl v mobilní fázi realizován pouze methanolem. Velmi malé přídavky kyseliny a báze (jednotky až tisícein oběmových procent) do methanolické mobilní fáze ovlivňují retenci polárních analytů. Z hlediska rozlišení je klíčový jejich vzájemný poměr, stimulující převažující elektrostatické interakce. Tento separační mód je účinný zejména v případě, že molekula analytu obsahuje alespoň dvě funkční skupiny, schopné interakce se stacionární fází (např. hydroxylovou, karbonylovou, karboxylovou skupinu, aminoskupinu, halogenidy aj.), z nichž alespoň jedna se nachází v těsné blízkosti stereogenního centra.

Normální separační mód, upřednostňující hydrofobní interakce, je realizován mobilní fází – nepolární/polární rozpouštědlo – přičemž podíl polárního rozpouštědla řídí retenci analytu. Na rozdíl od cyklodextrinových CSP mohou být vedle propan-2-olu, ethanolu aj. použita jako polární složka také halogenovaná rozpouštědla.

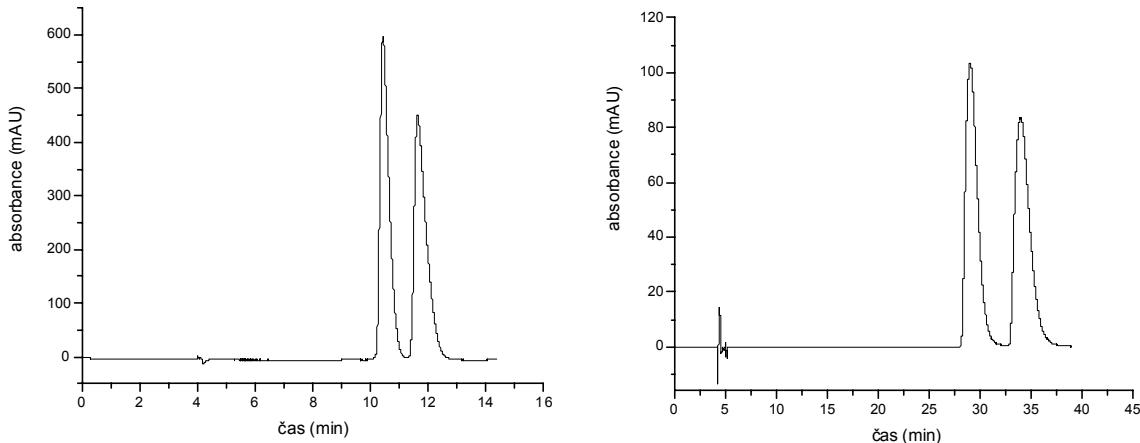
Chirobiotické CSP vykazují stereoselektivní specifitu k velkému počtu chirálních látek, lišících se jak svou strukturou, tak polaritou. I když mají glykopeptidy podobnou strukturu, mohou vůči jednotlivým analytům vykazovat odlišnou, ale komplementární enantioselektivitu. Díky drobným odlišnostem je stereodiskriminační mechanismus podobný, ale ne identický.

Vankomycinová CSP vykazuje selektivitu mimo jiné k barbiturátům, cyklickým amidům, semi-syntetickým námelovým alkaloidům aj. Teikoplaninová CSP byla s úspěchem použita pro enantioseparaci nativních aminokyselin a jejich blokovaných analogů a malých peptidů. Ristocetinová CSP vykazuje afinitu zejména k anionogenním chirálním molekulám. Ve snaze rozšířit okruh chirálních látek, separovatelných pomocí glykopeptidových chirálních selektorů, byly připraveny i CSP na bázi jejich derivatizovaných analogů. DMP – vankomycinová CSP (vankomycin derivatizovaný 3,5-dimethylfenylisokyanatanem) a vankomycin-aglykonová (CHIROBIOTIC VAG) CSP vykazovaly komplementární enantioselektivitu k vankomycinové CSP16. Komerčně dostupná CSP s vázaným teikoplanin-aglykonem (CHIROBIOTIC TAG), poskytovala např. vyšší hodnoty enantiorozlišení nativních i cyklických aminokyselin než teikoplaninová CSP. Pro enantioseparaci hydrofobních látek byla připravena CSP s vázaným methylovaným teikoplanin-aglykonem.

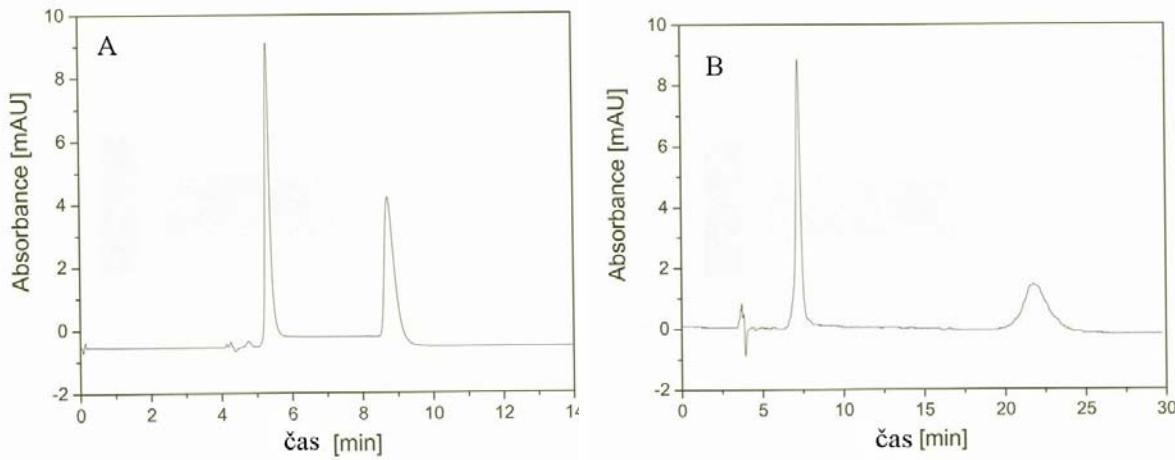
CSP připravené s vyšším pokrytím nosiče chirálním selektorem (CHIROBIOTIC V2 a T2) poskytují větší množství stereoselektivních vazebních míst, zvyšující možnost chirální diskriminace. Vyšší kapacita kolon, spolu s často lepšími hodnotami dosahovaných enantiorozlišení jsou výhodné i pro aplikaci semipreparativního módu. Na následujících obrázcích (obr. 6.5 až 6.7) jsou uvedeny příklady enantioseparace léčiv či jejich prekursorů na cyklodextrinových a glykopeptidových chirálních stacionárních fázích.



**Obr. 6.5:** Ukázka enantioseparace tryptofanu (L/D-Trp) a N-tert.-butyloxycarbonyl tryptofanu (L/D-Boc-Trp) ve dvou mobilních fázích ACN/1% TEAA, pH 4,1 s různým obsahem acetonitrilu: (a) 60:40 (v/v), (b) 20:80 (v/v) na teikoplaninové CSP



**Obr. 6.6:** Ukázka enantioseparace thioridazinu na  $\beta$ -cyklodextrinové CSP v mobilní fázi 20:80 (v/v)  
ACN/1%TEAA, pH 4,1 (vlevo) a promethazinu na vankomycinové CSP v mobilní fázi 80:20 (v/v)  
MeOH/1%TEAA pH 4,1 (vpravo)



**Obr. 6.7:** Porovnání enantioseparace lorazepamu na teikoplaninové (A) a teikoplanin-aglykonové (B) chi-  
rální stacionární fázi v mobilní fázi o složení MeOH/ 1% TEAA, pH=4, 80:20 (v/v)

## Studijní materiály

Chirobiotic Handbook, Advanced Separation Technology, Wippany, NY, USA, 2005

Cyclobond Handbook, Advanced Separation Technology, Wippany, NY, USA, 2005

Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences, ed. Deyl Z., Elsevier, Amsterdam,, 1998, kap. 5

## 7. SEPARACE AMINOKYSELIN A PŘÍBUZNÝCH LÁTEK

RNDr. Petr Šimek, CSc., a Ing. Petr Hušek, DrSc.

Biologické centrum AV ČR, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice

[psimek@bclab.eu](mailto:psimek@bclab.eu), [phusek@bclab.eu](mailto:phusek@bclab.eu), [www.bclab.eu](http://www.bclab.eu)

### 7.1 Úvod

Analýza aminokyselin (AK) patří odedávna mezi nejvýznamnější úkoly a výzvy v oboru analytické chemie organických látek. Fundamentální úloha AK v živých organismech vyvolala rychlý zájem o separaci a stanovení individuálních AK v průkopnickém období rozvoje separačních věd. První automatizovaná analýza této třídy látek pomocí iontově výmenné chromatografie (IEC) byla publikována Spackmanem, Steinem a Moorem v roce 1958 a oceněna Nobelovou cenou v roce 1972 [1]. Od této doby zaznamenaly separační techniky ohromný rozvoj a vedle IEC, dosud běžně a rutinně používané zejména v klinické chemii a potravinářství, postupně nastupují rychlé a citlivé separační techniky: napřed kolonová a později kapilární plynová chromatografie (GC), následovaná vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a o dekádu později pak kapilární elektroforézou (CE), nejnověji také separací látek na mikrofluidním čipu [2,3,4].

Prakticky každá nově vyvinutá technika vysokoúčinné separace přírodních látek je vždy přednostně testována na stanovení AK, protože separace i případná chemická modifikace těchto polyfunkčních sloučenin představuje vzhledem k přítomnosti rozmanitých funkčních skupin mimořádně náročný problém.

V současné době se analytikovi nabízí několik technik a velký počet metod pro analýzu AK moderními vysoceúčinnými separačními technikami. Jejich podrobný přehled, popis současného stavu a metodické návody lze nalézt v recentních monografiích a přehledných článcích [2, 3]. Je zřejmé a obecně známé, že neexistuje jediná univerzální metoda pro řešení konkrétního problému analýzy AK. Zvolený postup analýzy se odvíjí od konkrétního přístrojového vybavení, znalostech a zkušenostech řešitele, od jeho invence, zájmu laboratoře a povahy samotného analytického problému.

Kvalita stanovení a účinnost separace zpravidla úzce souvisí s přípravou vzorku k vlastní analýze. Reálné vzorky, v prvé řadě biologický a klinický materiál (tělní tekutiny), představují komplexní, heterogenní směsi nízkomolekulárních látek, anorganických solí a polymerních struktur (proteiny, polysacharidy, lipidy), jež negativně ovlivňují či přímo znemožňují separační proces, v případě chemické modifikace (derivatizace) pak také reakční průběh.. Jak tyto soli, tak polymerní struktury jako proteiny, polysacharidy, lipidy a jejich kombinace (lipo- a glykoproteiny, glykolipidy atp.), u rostlinných vzorků typicky flavonoidy, antokyany, jsou v biologických vzorcích často ve velkém nadbytku. Navíc jsou v mobilních fázích analytického systému často málo rozpustné, irreverzibilně se sorbuje na povrchy stacionárních fází, ucpávají nebo postupně “otravují“ separační systém, což vede k rychlé ztrátě účinnosti a kvality stanovení. Interferující složky ze separační kolony mohou dále zahlcovat detektor tvorbou nežádoucího šumu a potlačovat odezvu sledovaných analytů. Z uvedených důvodů je třeba mít na paměti, že o úspěchu analýzy AK, zvláště ve složité biologické matrici, rozhoduje dobře promyšlená a provedená příprava vzorku. Ta zpravidla představuje, navzdory pokroku v separačních metodách, časově i metodicky nejnáročnější krok celé analýzy.

## 7.2 Extrakce AK z matrice a příprava vzorku k separaci

Vzhledem k rozpustnosti AK ve vodných médiích o definovaném pH (kyselé či zásadité prostředí), představuje první krok stanovení volných AK např. v živočišných matricích jejich extrakce, vesměs vždy spojená se srážením proteinových struktur vhodným médiem. V tomto směru se osvědčily zejména vodné roztoky kyseliny chloristé, 5-sulfosalicylové, dále acetonitril, alkoholy, aceton ap. [5]. Po vysrážení proteinů či případném uvolnění AK hydrolyzou je vodné médium odděleno od pevné frakce a jeho pH vhodně upraveno podle potřeby dalšího kroku analýzy.

V mnoha aplikacích je naopak nutno uvolnit a stanovit AK vázané v proteinových strukturách. V těchto případech je první krok analýzy zaměřen na izolaci konkrétního proteinu a jeho následnou hydrolyzu, prováděnou většinou působením 6 M HCl za přesně definovaných podmínek reakční teploty a doby hydrolyzy.

Při přípravě vzorku k analýze AK se v principu nabízejí čtyři hlavní praktické přístupy:

- Naředit biologický vzorek vhodným médiem, zpravidla pufrem o definovaném pH a nadávkovat vzorek přímo do separačního systému, tzv. postup „dilute and shoot“;
- Nadávkování extraktu do separačního systému po vysrážení polymerních struktur;
- Záchyt aminokyselin přímo z matrice vzorku nebo vodného extraktu na vhodném sorbantu, zpravidla silném katexu;
- Derivatizace AK vhodným derivatizačním činidlem na reakční produkt žádaných separačních a detekčních vlastností.

První přístup, pro analytický systém nejdrastičtější, toleruje téměř výhradně pouze metoda IEC ve spojení s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a UV detekcí. Tato metodologie vychází z původního sdělení [1] a je nedílnou součástí tzv. analyzátorů aminokyselin (AAAnalyser), stále hojně a úspěšně využívaných především v klinických aplikacích.

Druhý přístup je založen na deproteinaci vzorku a dávkování supernatantu AK do separačního systému, kde jsou v efluentu volné AK a příbuzné látky následně detekovány [6]. V současné době je dávána přednost stanovení nativních AK, tedy bez jakékoli derivatizace, pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) [7-10].

Třetí přístup formou záchytu AA na vhodném ionexu byl zaveden v souvislosti s požadavky odsolit a vysušit extrakty AK před derivatizační úpravou, pro účely stanovení těkavých derivátů technikou GC nebo i HPLC. Výsledkem je vyčlenění třídy AK odstraněním ostatních látok.

Poslednímu přístupu, tj. derivatizaci AK, byla věnována největší pozornost a bylo navrženo ohromné množství derivatizačních postupů před vlastním stanovením [2]. V současné době je tento krok využíván více v kombinaci s technikami HPLC a CE, kdy modifikovaná aminoskupina slouží jako fluorofor nebo chromofor pro detekční účely. Tím je eliminováno podstatné omezení uvedených separačních metod, tj. nedostupnost dostatečně citlivých a selektivních detektorů pro stanovení AK. V GC technice, jež vyžaduje pokud možno úplnou derivatizaci molekuly, tedy i esterifikaci nebo silylací karboxylu, nastal ústup od klasických a časově náročných derivatizačních technik [11]. Nedávný objev okamžité konverze AK na vhodné formy působením alkylchlorformiátů (RCF) na vodné roztoky [12] však znamenal zásadní obrat ve využití GC techniky pro účely stanovení AK.

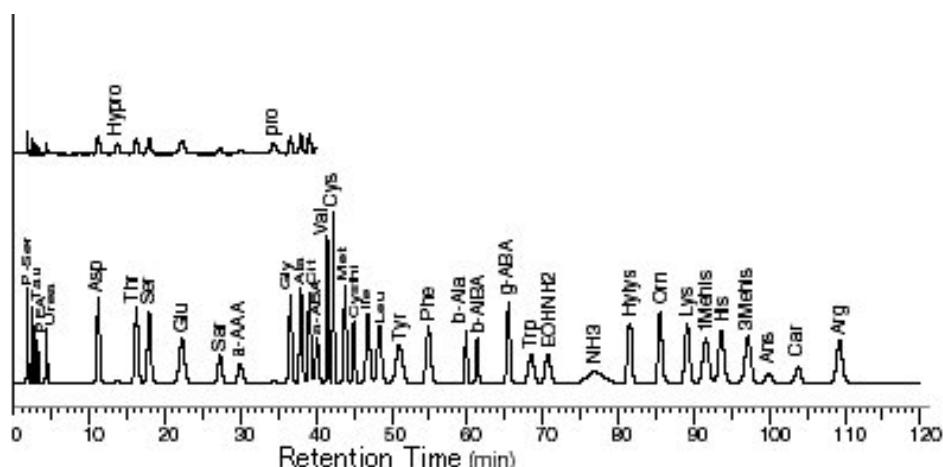
Při praktickém řešení analýzy AK je problematika přípravy vzorku neoddělitelně spojena se zvolenou metodou separace a způsobu detekce analytů. V následující části je jsou všechny kroky analýzy, tj. metoda přípravy vzorku, vysoceúčinná separační metoda a způsob detekce diskutovány v závislosti na použité separační technice.

### **7.3 Přehled současných hlavních metod vysoceúčinné separace AK a příbuzných látek**

### **7.3.1 Iontově výměnná chromatografie s postkolonovou ninhydrinovou deprivatizací a UV-detekcí**

Ačkoli byla tato metoda popsána již koncem 50.let [1], je stále rozšířena a oblíbena pro svoji robustnost a schopnost přesně a kvantitativně stanovit kolem 80 AK a příbuzných látek v krevní plazmě, moči a jiných tekutinách pomocí automatizovaných analyzátorů během 120 min. Analyzátor AK jsou stále nabízeny na trhu, např. Beckman 6300, Hitachi L-8900, Biochrom 30.

Ukázka separace 50 fyziologických AK a příbuzných látek technikou IEC pomocí analyzátoru Hitachi L8900 je na obr. 7.1.



**Obr. 7.1:** Separace a stanovení AK analyzátorem Hitachi L8900. Kolona Hitachi IEC, gradientová eluce citronanem sodným. UV detekce současně při 440 a 570 nm. Zdroj: firemní materiály Hitachi

### **7.3.2 HPLC a CE nederivatizovaných AK**

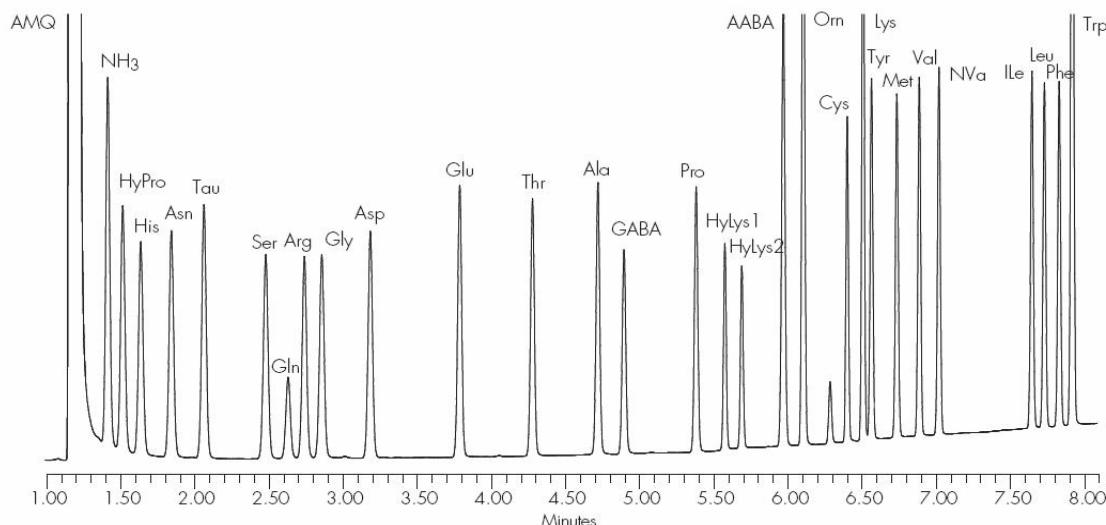
Přímé HPLC/MS/MS analýze volných AK a příbuzných látek v extraktech tělních tekutin pro diagnostiku metabolických poruch je věnována velká pozornost. Byly vyvinuty separační systémy pro separaci souboru 76 AK a příbuzných metabolitů [6-10]. Přes značné úsilí však kompletní validace metody nebyla dosud publikována. Validace stanovení 17 proteinotvorných AK v nederivativizované formě technikou UPLC/MS/MS byla nedávno prezentována firmou Waters na konferenci HPLC 2006 v San Franciscu [13]. Na koloně 50 x 2,1 mm (BEH C18) a sorbantu nové generace o velikosti částic 1,7 µm bylo dosaženo gradientové separace a kvantifikace 17 proteinových AK během 8 min.

Současný stav a možnosti separace volných AK a aminů bez derivatizace technikou CE byly nedávno publikovány Klampflem [14]. Derivativaci rovněž nevyžaduje elektrochemická detekce, publikovaná sdělení na téma stanovení AK jsou shrnuta v nedávném přehledném článku [15].

### 7.3.3 HPLC a CE derivativizovaných AK

Předkolonová derivativizace je v současné době nejoblíbenějším metodou při analýze AK technikami HPLC i CE. Mezi nejčastěji používaná derivatizační činidla patří fenylizokyát (PITC) ve spojení s UV-detekcí, o-ftaldialdehyd (OPA), dimethylaminonaftalensulfonylchlorid (Dansyl-Cl), 9-fluorenylmethyl chloroformiát a 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), které poskytují fluoreskující deriváty. Přednosti a omezení těchto činidel a jejich využitelnost v HPLC a CE byly nedávno podrobně diskutovány v literatuře [2]. Obecně platí, že tato činidla reagují s primární, a s vyjímkou OPA i sekundární aminoskupinou AA ve vysokých výtěžcích. Každé z činidel má určité přednosti a nevýhody. Kritické faktory bývají: rušivý nadbytek derivatizačního činidla, nestabilita produktů, zejména v případě isoindolových derivátů AA s OPA a omezená rozpustnost činidel ve vodných pufrovaných médiích, což snižuje reaktivitu činidel a ovlivňuje celkově separační procesy a kvantitativní stanovení.

Zavádění nových chromatografických materiálů, ultravysokotlakové LC (UPLC), rychle skenujících a o řád citlivějších detektorů neustále rozšiřují možnosti kvalitnější a rychlejší analýzy AK, aminů a dalších přibuzných látek. Recentní ukázku excelentní UPLC separace 27 AK během 8 min po derivativizaci činidlem AQC (AccQ•TagTM Ultra reagent) a UV-detekci při 260 nm prezentovala firma Waters na 54. konferenci ASMS v Seattlu [16], obr. 7.2.



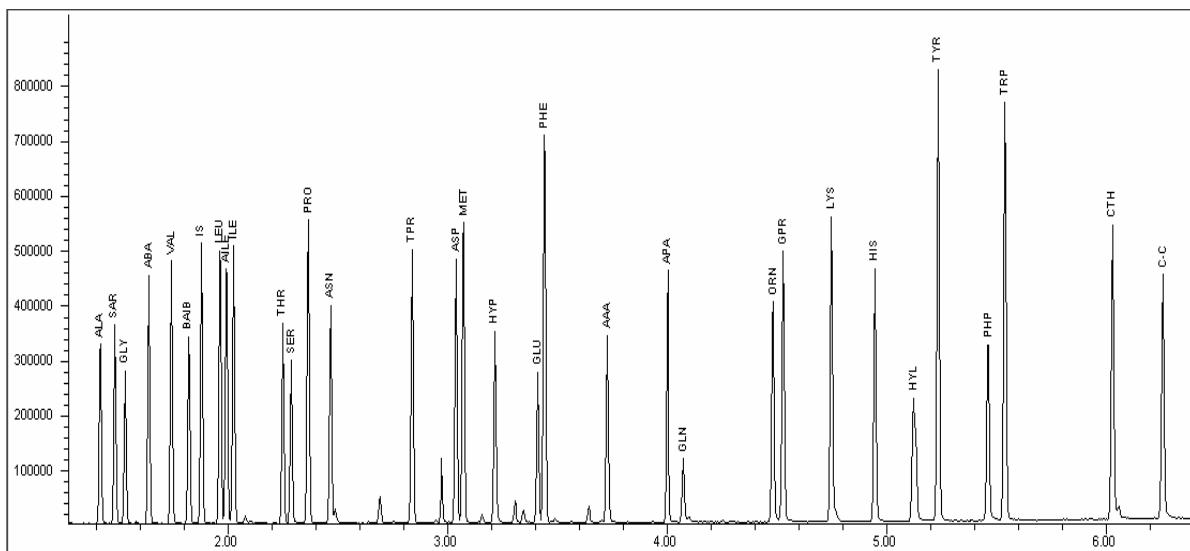
**Obr. 7.2:** Separace 10 pmol 27 fyziologických aminokyselin pomocí UPLC na koloně Xbridge C18, 2,1x100 mm, sorbent 1,7  $\mu$ m

### 7.3.4 GC aminokyselin

V GC je transformace pokud možno všech protických funkčních skupin AK a jejich převedení na těkavé deriváty nezbytnou podmínkou pro nasazení této separační techniky a celé škály citlivých a selektivních detektorů, včetně GC-MS [12,13]. Předchozí derivatizační metody vyžadovaly dlouhé reakční doby a bezvodé prostředí (silylace) anebo 2-stupňové metody s oddělenými kroky esterifikace karboxylu a následné alkylace ostatních skupin po odpaření předchozího média. Zahřívání reakčního média bylo téměř pravidlem a výtěžky často značně závislé na povaze matrice, podmínkách reakce, čistotě činidel a rozpouštědel [2, 11].

Ojev schopnosti RCF činidel esterifikovat okamžitě karboxylovou skupinu ve vodně-alkoholických roztocích v přítomnosti pyridinu změnil podstatně přístup k derivatizaci protických, hydrofilních sloučenin pro účely GC stanovení [12, 17]. A to za téměř ideálních podmínek, obecně kladených na derivatizaci: v přítomnosti katalytických množství pyridinu probíhá reakce přímo ve vodném prostředí a to pouhým fázovým převodem, tzv. extrakční alkylací. Derivatizace a extrakce jsou tak spojeny do jednoho kroku a chemická transformace hydrofilních látek na organofilní, jež je výchozím předpokladem pro GC stanovení, je záležitostí několika sekund, případně minut. Mluvit o derivatizaci v původním slova smyslu zde ztrácí význam.

Metodika byla optimalizována pro mastné kyseliny, AK po reakci s činidly ECF a MCF a i pro jiné třídy karboxylových kyselin [17]. Vedle primární studie analýzy AK ve formě N(O,S)-ethoxycarbonyl (EOC) ethylesterů, jež umožnila stanovení celého spektra proteinových složek v době kratší 5 min [18], byl později pro komerční stanovení „EZ-faast“ kitem (Phenomenex, Torrance, USA) použit hydrofobnější PCF (propylCF) (obr. 3) [3]. Kit je rovněž nabízen pro stanovení technikou LCMS, kdy je možno kvantifikovat i arginin, jež není na GC-záznamu přítomen pro nedostatečnou modifikaci guanidiniové skupiny.



**Obr. 7.3:** TIC chromatogram GC-MS analýzy standard AK (10 pmol) derivatizovaných kitem EZ-Faast a analyzovaných na kapilární koloně ZB-PAAC, 10 m x 0,25 mm, za předepsaných podmínek

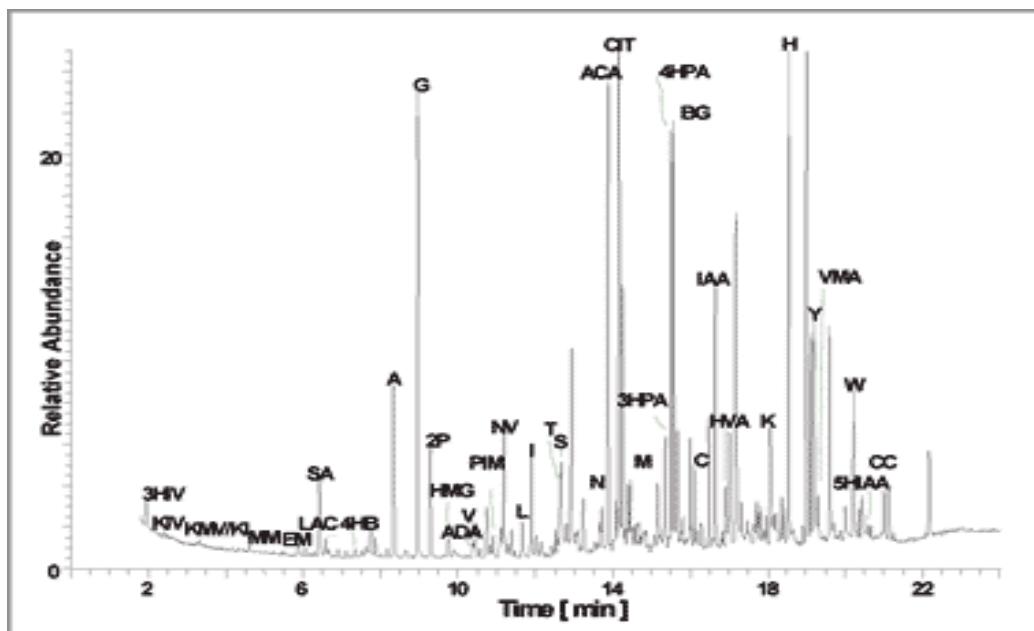
Kombinací činidla a alkoholu o nestejných alkylech se dosáhlo metodického rozšíření při zachování téhož základního přístupu a alkoholyza byla potvrzena jako mechanismus tvorby esteru. Tak byla mj. úspěšně vyzkoušena např. kombinace IBCF s heptafluorbutanolem (HFB) a AK analyzovány ve formě N(O,S)-IBOC HFBesterů [19].

Použití fluorovaných činidel bylo výhodné pro GC analýzu optických antipodů AK na chirálních fázích, jejichž teplotní stabilita je oproti nechirálním fázím výrazně omezena. Jelikož analyty s fluorovanými alkyly vykazují obecně nižší retenci, je jejich eluce v daném teplotním rozmezí fáze usnadněna. Tak byly enantiomery analyzovány např. ve formě N-trifluorethyl(TFE) TFEesterů [20]. Alternativně, pro analýzu enantiomerů AK na nechirálních, teplotně stabilnějších fázích byl vypracován postup derivatizace menthylchlorformiatem (MeCF) v přítomnosti methanolu nebo ethanolu [21].

V průběhu dekády se nový metodický přístup stal základem mnoha aplikací v nejrůznějších oborech [2, 17]. Byl využit např. k cílenému stanovení AK obsahujících síru nebo selen v molekule, ke stanovení AK a jiných polyfunkčních látek v klinických, farmaceutických a biologických preparátech, potravinářských produktech, vzorcích z kosmu i starožitných předmětů. K analýze stopových množství polyhydroxyaminosloučenin byly syntetizovány komerčně nedostupné chlorformiáty s dlouhými fluorovanými alkyly [22]:

Ke klinickým aplikacím patří kromě stanovení profilu AK rovněž sledování zastoupení všech kyselých metabolitů v tělních tekutinách, krvi a moči. Již v polovině 90. let jsme vypracovali metodický postup pro současné stanovení keto, amino, mastných a dikarboxylových kyselin v plazmě [23] a v moči [24] po derivatizaci činidlem ECF. Ve světle nových poznatků, jež souvisejely s tvorbou paralelních forem u diC4 (jantarová) a diC5 (glutarová) kyselin v důsledku snadné cyklizace na vlastní anhydryidy, jejichž teplotní nestabilita znemožňovala jejich stanovení, jsme předložili nový metodický postup pro derivatizaci metabolitů moče [25]. Záznam profilu močových metabolitů technikou GC-FID je na obr. 4. Tento modifikovaný postup byl použit i pro plazmatické kyseliny a je detailně popsán v monografii [2].

Výzkumem nových derivatizačních činidel separace aminokyselin se zabýváme na pracovišti Biologického centra. V současnosti se jeví velmi perspektivní využití metodiky v metabolomice, zvláště po syntéze nových činidel s fluorovanými alkoholy, mj. pentafluorpropyl a heptafluorbutylchlorformiátů (PFPCF, HFBCF). Tato syntéza byla uskutečněna na našem pracovišti a široké spektrum použití je předmětem probíhajícího projektu (GAČR, č. 203/04/0192).



**Obr. 7.4:** Komplexní GC-MS analýza organických kyselin včetně AA v lidské moči po derivatizaci metabolitů činidlem ECF in situ [2]

AK mají mezinárodní jednopísmenové označení. Zkratky karboxylových kyselin: 3HIV =  $\beta$ -OH-isovalerát, KIV = ketoisovalerát, KMV = ketomethylvalerát, KIC = ketoisokapronát, MMA = methylmalonát, EMA = ethylmalonát, SA = sukcínát, LAC = laktát, 4HB = 4-hydroxybutyrát, 2PB = 2-fenylbutyrát = I.S1., HMG = 3-hydroxy-3-methylglutarát, ADA = adipát, NV = norvalin (I.S.2), PIM = pimelát, ACA = aconitát, CIT = citrát, 3HP = 3-hydroxyfenylacetát, 4HP = 4-hydroxyphenylacetát, BG = hippurát (benzoylglycine), IAA = indoleacetát, HVA = homovanilát, 5HIAA = 5-hydroxyindoleacetát, VMA = vanilmandelát

## 7.4 Závěr

Problematice analýzy AK je stále věnována mimořádná pozornost. Navzdory enormnímu úsilí je již od zavedení klasické IEC metody stále pociťován nedostatek spolehlivě validovaných metod pro rychlou separaci a stanovení této velmi obtížné třídy látek. Nové technologie výroby náplní LC kolon, jejichž produkty jsou využity v technikách UPLC, LC-MS-MS i LC-LIFD, lepší citlivost a skenovací rychlosti hmotnostních spektrometrů, laserové technologie a v neposlední řadě nové, rychlé a nenáročné způsoby chemické modifikace směsi AK, jak to prokázala metodika používající RCF činidel, otevírají nové možnosti při analýze AK, aminů a s nimi metabolicky spojených sloučenin.

## Poděkování

Grantové agentuře České Republiky patří naše poděkování za přidělené finanční prostředky na řešení stávajícího projektu č. 203/04/0192 na léta 2004-2006.

## Literatura

- [1] Spackman D.H., Stein W.H., Moore S., Anal. Chem. 1958, 30, 1190.
- [2] Quantitation of amino acids and amines by chromatography, Method and protocols, J. Chromatogr. Library – Vol 70., Molnar-Perl I, ed., Elsevier 2005. Amsterdam.
- [3] Hušek P., Šimek P., LC-GC North America 19 (2001) 986-999.
- [4] Rios A., Escarpa A., Gonzales M.C., Crevillen A.G., TrAC 2006, 25, 467-479.
- [5] Deyl Z., Hynek J., Horakova M., J. Chromatography, 1986, 379, 177-250.
- [6] Elfakir C., HPLC of amino acids without derivatization, kap.1.2.1 ve [2].
- [7] Piraud M., Vianey-Saban C., Bourdin C., Acquaviva-Bourdain C., Boyer S., Elfakir C., Bouchu D., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003, 17, 1297-1311..
- [8] Piraud, M., Vianey-Saban, C., Bourdin, C., Acquaviva-Bourdain, C., Boyer, S., Elfakir, C., Bouchu, D., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19(22), 1587-1602.
- [9] Zoppa M., Gallo L., Zucchiello, F., Giordano G., J. Chromatogr. 2006, 831, 267-273.
- [10] Piraud, M., Vianey-Saban, C., Bourdin, C., Acquaviva-Bourdain, C., Boyer, S., Elfakir, C., Bouchu, D., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19(22), 3287-97.
- [11] Gehrke Ch. W., Quantitation of amino acids by gas-liquid chromatography, kap.1.1.2 ve [2].
- [12] Hušek P., Quantitation of amino acids as chloroformates – a return to gas chromatography, kap. 1.1.1., str. 2-38 ve [2].
- [13] Alden P., Yu K., Plumb R., High throughput direct amino acid analysis by UPLC/tandem mass spectrometer, poster No.720001774EN, HPLC conference, San Francisco, 2006, June 17-23.
- [14] Klampfl Ch. W., Determination of underivatised amino acids by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, kap. 1.3.1. a kap. 2.3.1. ve [2].
- [15] Jandik, P.; Cheng, J.; Avdalovic, N. J. Biochem. Biophys. Methods 2004, 60(3), 191-203.
- [16] Wheat T.E., Grumbach E.E., Mazzeo J.R., A new amino acid analysis application solution, LC-GC North America, 2006.
- [17] Hušek, P.; Šimek P. Current Pharmaceut Analysis 2006, 2(1), 23-43.
- [18] Hušek P. J. Chromatogr. 1991, 552, 289-99.
- [19] Wang, J.; Huang, Z.H.; Gage D.A.; Watson J.A. J. Chromatogr. A, 1994, 663, 71.
- [20] Abe, I.; Fujimoto, N.; Nishiyama, T.; Terada, K.; Nakahara. T. J. Chromatogr. A, 1996, 722, 221.
- [21] Domergue, N.; Pugniere, M.; Previero, A.. Anal. Biochem. 1993, 214, 420.

- [22] Vincenti, M.; Ghiglione, N.; Valsania, M.C.; Davit, P.; Richardson, S.D. *Helv. Chim. Acta*, 2004, 87(2), 370.
- [23] Hušek, P. *J. Chromatogr. B*, 1995, 669, 352.
- [24] Hušek, P. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1999.
- [25] Hušek, P; Šimek, P; Matucha, P. *Chromatographia*, 2003, 58, 623.

## **8. SEPARACE PEPTIDŮ VYSOKOÚČINNÝMI SEPARAČNÍMI TECHNIKAMI**

*RNDr. Jana Sucháneková, Ph.D.*

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2  
[suchan@natur.cuni.cz](mailto:suchan@natur.cuni.cz)

### **8.1 Úvod**

Peptidy jsou předmětem výzkumu bioanalytického, biochemického a lékařského, neboť mnoho z nich jsou biologicky aktivní a nejen v lidském organismu vykonávají speciální funkce. Nejznámějšími a nejdůležitějšími bioaktivními proteiny jsou enzymy a hormony, rezervní a transportní proteiny; peptidy slouží i jako neurotransmitery, hormony, toxiny či antibiotika. Zájem farmakologického výzkumu o analogy peptidů jako terapeutika v posledních letech stoupal; mnoho těchto látek má silný účinek při velmi nízké dávce, a proto farmakologické a farmakokinetické studie musí být podpořeny vysoce citlivou a specifickou analytickou metodou. Řada peptidových a proteinových sloučenin a analogů je syntetizována, aby napomáhaly studiu metabolismu a působení v organismu. Kontrola syntézy, identity a čistoty proto nabývá na důležitosti. Zde mají také své nezastupitelné místo vysokoúčinné separační metody.

Separace peptidů vzniklých enzymatickým štěpením bílkovin či bílkovinných směsí je klíčovým krokem při proteomických studiích. Pro účinné peptidové mapování je nezbytné kombinovat vysokoúčinné separační metody s výkonnou detekční technikou, jakou je hmotnostní spektrometrie. Často je třeba rozpoznat záměnu jedné aminokyseliny v peptidové či proteinové sekvenci, neboť tato drobná modifikace změní strukturu molekuly daného peptidu či proteinu, a tak významně ovlivní jeho biologickou funkci. Příkladem může být záměna hydrofobní aminokyseliny valinu za kyselou aminokyselinu kyselinu glutamovou v  $\beta$ -řetezci hemoglobinu. Tato substituce způsobí, že se redukovaný protein (bez kyslíku) sráží v erytrocytech, které tak získávají typický srpkovitý tvar a předčasně zanikají. Výsledkem sníženého počtu červených krvinek je onemocnění nazývané srpkovitá anémie. Využití vysokoúčinných separačních metod pro charakterizaci peptidů je nezbytným krokem při tvorbě tzv. peptidových knihoven. Takovéto databáze, které obsahují informace o peptidech různých velikostí a vlastností, jsou důležité pro farmaceutické společnosti při vyvoji a testování nových lečiv. Lze tak snáze a rychleji určit protein, peptid či pouze jeho část zodpovědnou za bioaktivitu, kterou vyvíjené léčivo má vykazovat.

Pro studium peptidů a proteinů máme k dispozici chromatografické a elektroforetické separační metody, které využívají odlišné dělící mechanismy, a proto jsou technikami komplementárními, doplňujícími se. Kombinace těchto separačních technik nám umožňuje získat spolehlivá a nezkreslená data o analyzovaném celku. V následujícím textu budou popsány jednotlivé chromatografické metody používané pro dělení peptidů a proteinů. Stručně budou také popsány elektromigrační metody.

## 8.2 Chromatografické separační techniky

**Vylučovací (gelová permeační) chromatografie** (SEC, *size-exclusion chromatography*) využívá jeden ze základních principů dělení molekul, a to na základě jejich rozdílné velikosti. Vylučovací chromatografie je nerovnovážná separační technika, při které se neustavuje rozdělovací rovnováha analytu mezi stacionární a mobilní fází a k dělení nedochází vlivem selektivních interakcí se stacionární fází. Tato chromatografická technika využívá jako stacionární fázi nerozpustný porézní gel, proto se také vžilo označení gelová chromatografie. Při průchodu proteinů či peptidů kolonou dochází k dělení analytů podle velikosti a tvaru molekul. Malé molekuly jsou schopny penetrovat hluboko do pórů částic stacionární fáze, a tak jsou zpožďovány ve svém průchodu kolonou oproti velkým molekulám, které do pórů gelu vstupují jen částečně, nebo vůbec ne. Výběrem sorbentu o určité velikostí pórů ovlivňujeme rozsah molekulových hmotností analytů separovatelných na zvoleném sorbetu (tzv. vylučovací limit kolony). Rozšíření vylučovací chromatografie jako nástroje pro separace peptidů a proteinů je úzce svázáno s komerční dostupností stacionární fáze Sephadex. Podmínky eluce při vylučovací chromatografii nezpůsobují inaktivaci biologické aktivity dělených látek, a proto je tato technika běžně užívána jako důležitý krok při čištění peptidů, proteinů, enzymů a podobných látek. Ke všeobecnému rozšíření a oblíbenosti této metody přispívá i její rychlosť, jednoduchost a univerzálnost použití. Rozvoj tohoto typu vysokoúčinné kapalinové chromatografie nastal v 80. letech 20. století s nástupem semirigidních (např. polystyrenových) a rigidních (silikagelových) částic s jednotnou a dostatečnou velikostí pórů pro vstup bílkovin. Aplikační pole vylučovací chromatografie ovšem není omezeno jen na separaci a/nebo čištění peptidů a proteinů, které se významně liší svou velikostí. Vylučovací chromatografii lze také využít ke změně prostředí vzorku, jako je tomu při odsolování bílkovin (obecně oddělení nízkomolekulárních látek od vysokomolekulárních) před následnou chromatografickou analýzou, a především jako nástroj k určení molekulové hmotnosti neznámé látky na základě porovnání retenčních charakteristik neznámé látky a látek standardních o známé molekulové hmotnosti.

**Iontově výměnná chromatografie** (IEC, *ion-exchange chromatography*) byla první chromatografická technika převedená z klasického sloupcového uspořádání do vysokoúčinné formy, i když tlaková odolnost tehdejších iontově výměnných kolon byla velice nízká. Velký pokrok v iontově výměnných materiálech pro HPLC nastal v 70. letech 20. století, kdy se začaly používat iontoměničové materiály na bázi silikagelu. Hlavním aplikačním polem IEC je purifikace bílkovin. IEC je často jedním z kroků při tomto procesu, neboť prakticky všechny proteiny mají povrchový náboj umožňující jejich interakci s iontoměničovou stacionární fází. Peptidy a proteiny vykazují, na základě funkčních skupin obsažených v jejich struktuře, celkový kladný nebo záporný náboj, který závisí na hodnotě izoelektrického bodu peptidu či proteinu a na pH okolního prostředí. Některé peptidy či proteiny budou tedy při zvoleném pH kladně nabité, jiné záporně nabité. Této vlastnosti peptidů a proteinů je využito při iontově výměnné chromatografii. Mechanismus dělení, který se uplatňuje při IEC, využívá reverzibilní elektrostatické či iontové interakce mezi nabitymi analyty (peptidy, proteiny nebo solemi) v mobilní fázi a nabitymi iontově výměnnými skupinami stacionární fáze. Při dělení IEC se mohou uplatňovat i jiné procesy jako adsorpce či hydrofobní interakce. Iontově výměnné stacionární fáze jsou silikagelové materiály či materiály na bázi organických polymerů, které obsahují ve své struktuře negativně nabité funkční skupiny (měnič kationtů) nebo pozitivně nabité funkční skupiny (měnič aniontů). Měniče kationtů a aniontů jsou dále podle přítomných funkčních skupin dále děleny na slabé a silné. Peptidy či proteiny, s opačným nábojem než má stacionární fáze, soutěží se stejně nabitymi ionty z mobilní fáze o funkční skupiny stacionární fáze a jsou tak děleny. Při použití eluce s gradientem iontové síly jsou peptidy a proteiny

eluovány z kolony podle své stoupající afinity k měniči. V oblasti analýzy peptidů je iontově výmenná chromatografie vytlačována reverzní chromatografií, především pro její univerzální použití. I přes tuto skutečnost se iontově výmenná chromatografie v poslední době opět dostává do popředí zájmu jako metoda alternativní právě k reverzní chromatografii pro dělení peptidů. Dalším důvodem vzrůstající oblíbenosti IEC je skutečnost, že téměř vždy zůstává zachována biologická aktivita dělených látek a také tato metoda umožňuje jednoduchým způsobem zakoncentrovat zředěné vzorky peptidů a proteinů.

**Chromatografie s reverzními fázemi** (RPC, *reversed phase chromatography*) je důležitou a účinnou metodou identifikace, charakterizace a čištění peptidů, peptidových směsí a bílkovin. Díky této atributům je reverzní chromatografie nepostradatelnou technikou nejen v analytických laboratořích, ale i v biofarmaceutickém průmyslu, kde velice rychle roste množství peptidových a proteinových léčiv a peptidové mapování se stalo standardní metodou identifikace, zjištění stability a shodnosti produkovaných šarží terapeutických bílkovinné povahy. RPC je účinná separační metoda aplikovatelná na široký okruh analytů, látky nepolární i látky iontové povahy. Mechanismus dělení v reverzní chromatografii je kombinací tří interakcí, a to interakce analytu s mobilní fází, interakce mobilní a stacionární fáze a distribuce analytu mezi mobilní a stacionární fází. Nejpoužívanější stacionární fáze v RPC jsou chemicky vázané fáze, neboť mají řadu výhod, mezi které patří dostupnost fází s velkým rozsahem polarity a v dostatečné čistotě, velké aplikační pole, rychlé ustavování rozdělovací rovnováhy a možnost jejich kombinace s vodnými mobilními fázemi, což usnadňuje aplikaci na biologické vzorky se složitou matricí (krev, plasma, moč). Vlastnosti chemicky vázané fáze závisí na druhu a koncentraci funkčních skupin, kterými jsou nejčastěji okta-decylové C18, oktylové C8, butylové C4 či fenylové skupiny. Klasickým a nejdéle používaným nosičem reverzní chemicky zakotvené stacionární fáze je silikagel. Způsob přípravy velice čistého silikagelu i postupy zachycení chemicky vázané fáze na silanolové skupiny, které jsou lokalizovány na povrchu silikagelu, jsou dobře propracovány a popsány. V dnešní době existuje velká variabilita charakteru komerčně dostupných reverzních silikagelových fází. Separace látek peptidového a proteinového charakteru, stejně jako jiných biologicky aktivních látek, především s bazickými oblastmi ve své struktuře, jsou na kolonách se silikagelovým nosičem komplikovány nežádoucími jevy, mezi které patří především interakce se zbytkovými, nezreagovanými silanolovými skupinami silikagelového nosiče stacionární fáze. Tyto sekundární interakce způsobují nežádoucí adsorpci dělených látek, značně komplikují retenční mechanismus, zhoršují separační účinnost, symetrii píků a také možnost identifikace a kvantifikace. Jednou z možností, jak snížit nežádoucí silanofilní interakce, je dodatečná úprava silikagelového nosiče navázáním alkylových skupin, tzv. endcapping. Další možností zlepšení průběhu separace problematických analytů je přídavek iontově párových činidel nebo pufrů o nízké hodnotě pH do vodně organické mobilní fáze. V neposlední řadě lze použít kolony speciálně určené pro analýzu problematických látek, at už na bázi silikagelu či na bázi jiných materiálů (polymery, oxidy zirkonu, titanu či hliníku). Příkladem speciální silikagelové stacionární fáze je například silikagel modifikovaný pentafluorfenylovými skupinami. Pentafluorfenylové stacionární fáze jsou schopné dělit určité skupiny problematických analytů s výbornou selektivitou a její další výhodou je snadná přenesitelnost metody vypracované pro C18 kolony. Fluorovaná stacionární fáze se vyznačuje dobrými tvary píků a zvýšenou stabilitou v porovnání s klasickými silikagelovými materiály. Je tedy vhodná pro spojení LC/MS, kdy nízká ztráta stacionární fáze (tzv. low bleed) je nutností. Pentafluorfenylpropylová stacionární fáze je komplementárním HPLC materiélem pro reverzní analýzy peptidů a je využívána pro rychlé LC/MS analýzy komplexních směsí analytů, bazických léčiv a jejich metabolitů.

Obecně však mají kolony na bázi silikagelu omezenou chemickou stabilitu, která souvisí s pevností vazby mezi silikagelem a chemicky vázanou fází při nízkém pH (pH < 2) a naopak rozpustností silikagelových částic v bazických roztocích (pH > 7-8). I tepelná stabilita silikagelových kolon je omezena, limitní hodnotou je většinou 70 °C. Nevýhody silikagelových nosičů se projevují nejen u klasických kolon, ale i u speciálně upravených materiálů. Trendem posledních let je snaha nahrazovat silikagelové nosiče reverzních chemicky vázaných fází stabilnějšími materiály. Reverzní kolony na bázi organických polymerů jsou stabilní v širokém rozsahu pH, nemají zbytkové aktivní skupiny, ale také vykazují rušivé interakce s analyty, např. kromě hydrofobních interakcí se objevují i vylučovací efekty. Velice slibnými materiály pro reverzní chromatografii jsou fáze na bázi oxidu zirkoničitého, titaničitého a hlinitého. Zatím se jako nevhodnější alternativa jeví oxid zirkoničitý, který se v porovnání se silikagelem vyznačuje větší chemickou stabilitou v kyselé i alkalické oblasti (rozsah pH 1-12) a podstatně vyšší teplotní stabilitou, až do 200 °C. Možnost separace při vyšších hodnotách pH výrazně rozšiřuje aplikační možnosti sorbentů, lze tedy analyzovat i silně bazické látky. Termostatování chromatografického systému na vyšší teploty snižuje viskozitu mobilní fáze, umožňuje tedy zvýšit průtokovou rychlosť, a pozitivně ovlivňuje kinetiku separačního děje, což se projevuje zejména zlepšením symetrie píků. Za vyšších teplot dochází i ke zkrácení doby analýzy, což je velkým přínosem hlavně ve farmaceutických a klinických laboratořích, kde se analyzují velká množství vzorků.

Separace peptidů a proteinů v RPC využívají jak izokratickou, tak i gradientovou eluci. Jako mobilní fáze se používají směsi vody a organického rozpouštědla (acetonitril, methanol, tetrahydrofuran) v různých objemových poměrech. Do mobilní fáze jsou dále přidávány modifikátory jako kyselina fosforečná, trifluoroctová či heptafluormáselná kyselina, jejichž typ a koncentrace má velký vliv na selektivitu separace peptidů a proteinů.

**Hydrofobní interakční chromatografie** (HIC, *hydrophobic interaction chromatography*) se v posledních letech stala velmi důležitou technikou využívanou pro separaci proteinů i peptidů. Výhodou této metody je minimalizace či úplné odstranění nebezpečí denaturace peptidů a bílkovin, která je velice častým problémem při použití reverzní chromatografie. Ačkoliv je separační mechanismus uplatňující se u HIC a RPC obdobný, dělení je založeno na relativní síle interakcí mezi nepolární stacionární fází a hydrofobními částmi separovaného peptidu či proteinu, lze mezi oběma metodami nalézt několik zásadních odlišností. RPC a HIC techniky se jednak liší používanými sorbenty. Na nosič stacionární fáze jsou v případě HIC navázány ligandy, které jsou mnohem méně hydrofobní v porovnání s ligandy v RPC (například hydroxypropyl, methyl, butyl, benzyl). Také hustota navázaného ligantu je odlišná – HIC kolony mají výrazně nižší hustotu pokrytí nosiče než reverzní stacionární fáze. Dalším výrazným rozdílem HIC techniky od reverzní chromatografie je používání vodné mobilní fáze o vysoké iontové síle a neutrálním pH. Není tedy třeba aplikovat mobilní fáze o nízkém pH a obsahující organická rozpouštědla tak, jak je tomu při RPC.

**Afinitní chromatografie** (AC, *affinity chromatography*) je metoda, která v posledních letech zaznamenává velký rozvoj v důsledku zvýšeného zájmu o biomedicínskou a biotechnologickou problematiku. Afinitní chromatografie je považována za techniku, která za posledních zhruba 30 let nejvíce ovlivnila v pozitivním smyslu proces čištění biomolekul. Díky vysoké specifitě této techniky postačuje pro účinnou purifikaci pouze jediný krok, během něhož zůstává zachována biologická aktivita nadávkovaného vzorku. Afinitní chromatografie využívá schopnosti biomolekul se pevně, specificky a reverzibilně vázat na tzv. komplementární látky, kterými mohou být jejich substráty, kofaktory, prostetické skupiny, receptory či protiľátky. Dělení separovaných biomolekul závisí na jejich konformaci a vazebné afinitě k ligandu, imobilizovanému na vhodném nosiči (sili-

kagel či syntetické hydrofilní gely). Afinitní interakce se velmi liší svou silou a specifitou. Příkladem vysoce specifické interakce je vazba protilátky na její antigen. Naopak vazba mezi konkanavalinem A jako ligandem a glykoproteiny jako dělenými analyty je méně specifická, a proto je konkanavalin A řazen mezi tzv. multifunkční ligandy se skupinovou selektivitou. Kromě jiných kritérií, jakými jsou výběr vhodného nosiče, způsobu a podmínek navázání ligandu, je volba ligandu krok odpovídající za úspěch či neúspěch tohoto typu chromatografie. Afinitní chromatografie je všeobecně považována za nejvíce specifickou dělící techniku užívanou při analýze biomolekul. AC je také důležitým nástrojem při studiu interakcí mezi bílkovinami či mezi bílkovinami a peptidy.

### 8.3 Elektromigrační separační techniky

Elektromigrační metody lze vedle chromatografických metod použít k analýze peptidů a proteinů. K dělení látek dochází v elektrickém poli vlivem rozdílného náboje a tvaru; analyty pak mají rozdílnou elektroforetickou pohyblivost. Elektromigrační metody lze realizovat v plošném nebo kapilárním uspořádání. Z plošných technik se pro analýzu peptidů a proteinů používá **gelová elektroforéza** (SDS – PAGE). Polyakrylamidový gel (PAGE) je umístěn mezi dvěma skleněnými deskami a k denaturaci peptidů a proteinů je použit negativně nabité detergent dodecylsulfát sodný (SDS). Denaturované peptidy a proteiny pak mají stejný negativní náboj a rychlosť migrace v gelu je pak funkcí pouze velikosti molekuly. Gelovou elektroforézu lze provádět i v kapilárním formátu. **Kapilární gelová elektroforéza** (CGE, capillary gel electrophoresis) využívá stejný dělící princip a stejně typy gelů jako plošná technika. V posledních letech se začaly v CGE využívat jako separační média tzv. fyzikální gely, které nejsou síťovány pomocí chemické vazby a lze je tak snadno vyměnit po každé analýze.

**Kapilární zónová elektroforéza** (CZE, *capillary zone electrophoresis*) je technika, při které dělené látky musí nést náboj, aby se v elektrickém poli pohybovaly a měly nenulovou elektroforetickou pohyblivost. CZE se provádí v křemenných kapilárách naplněných vhodným elektrolytem, pufrem o různé hodnotě pH. V případě silné adsorpce dělených látek na stěny kapiláry nebo nereprodukovaných migračních časů se používají modifikované kapiláry, jejich vnitřní povrch je potažen vhodným polymerem.

**Micelární elektrokinetická chromatografie** (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*), jako další elektromigrační technika, využívá přídavek povrchově aktivních látek do základního elektrolytu; dojde tak k vytvoření tzv. pseudostacionární fáze. Techniku MEKC lze řadit mezi dvou dimensionální techniky, neboť zde ve stejném prostoru a ve stejném čase dochází ke kombinaci dělení na základě náboje a hydrofobnosti. Hydrofobní interakce a následné dělení probíhá na fázovém rozhraní elektrolytu a povrchu micel, zatímco separace na základě náboje probíhá v elektrolytu.

Pro separace biomolekul amfolytické povahy, mezi které peptidy a proteiny bezesporu patří, lze využít další elektromigrační techniku, a to **kapilární izoelektrické zaostřování** (IEF, *isoelectric focusing*). Tato metoda dělí molekuly podle jejich izoelektrických bodů; tedy hodnoty pH, při které má daná molekula stejný počet kladných a záporných nábojů a navenek je tedy elektroneutrální.

Metodou kombinující principy chromatografické a elektromigrační a využívající výhodné vlastnosti obou metod je **kapilární elektrochromatografie** (CEC, *capillary electrochromatography*). CEC je metoda, která se velmi rychle rozšiřuje do analytické praxe. Separace probíhá v kapilárách, které jsou naplněny stacionární fází, a průtok mobilní fáze je zajišťován elektroosmo-

tickým tokem. Získán je tak rovný profil průtoku mobilní fáze, který umožňuje dosažení velmi účinných separací. Výhodou této metody je možnost automatizace pro tzv. high-throughput analýzy, analýzy velkého počtu vzorků. Ve spojení s hmotnostní detekcí je silným nástrojem pro charakterizaci peptidů obsažených ve složitých vzorcích bílkovinné povahy.

## 8.4 Závěr

Analýza látek peptidové povahy je prvořadá a klíčová pro řadu oborů na pomezí chemie a biologie, například biochemii, molekulární a buněčné biologii či lékařský výzkum. Úspěšné řešení této problematiky není možné bez vysokoúčinných separačních technik, které je navíc vhodné kombinovat s hmotnostní spektrometrií jako detekční technikou. Stále se zvyšující složitost analyzovaných vzorků, větší komplexnost matrice, vyžaduje neustálý vývoj v oblasti separačních technik. Kromě vývoje v oblasti materiálů pro stacionární fáze (nosiče, ligandy) dochází k neustálému zmenšování separačních systémů při zachování, nebo i zlepšení, jejich účinnosti a selektivity. Proces zmenšování se kromě používané instrumentace samozřejmě týká i použitých separačních médií. Používají se kratší kolony o menším průměru naplněné menšími časticemi. Dříve byly standardně používány částice o průměru 5  $\mu\text{m}$ , nyní jsou běžné částice o průměru 1-2  $\mu\text{m}$ . Je tak dosahováno velmi účinných a rychlých analýz. Velký zlom v oblasti stacionárních fází způsobily monolitické kolony, které se velice rychle rozvíjí a nachází uplatnění v mnoha oblastech bioanalytického výzkumu. Dalším směrem vývoje bioanalytiky jsou multidimensionální separační techniky, které kombinují více separačních mechanismů; například pro peptidů je velice výhodné spojení vylučovací či iontově výměnné chromatografie s reverzní chromatografií či spojení reverzní-reverzní chromatografie.

V přednášce budou podrobněji diskutovány vybrané vysokoúčinné separační techniky používané pro látky peptidové povahy. Kromě výběru vhodné kolony a mobilní fáze budou uvedeny parametry ovlivňující selektivitu a retenci a konkretní příklady využití jednotlivých instrumentálních technik. Nejvíce času bude věnováno vysokoúčinné kapalinové chromatografii s reverzními fázemi jako technice vykazující nejenom vysokou separační účinnost, ale také velkou univerzálnost, a tedy využitelnost pro široké spektrum analytů o různých vlastnostech.

## 9. SEPARACE PROTEINŮ A PROTEOMIKA

doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie, Albertov 2030,  
128 43 Praha 2

hudecek@natur.cuni.cz

Chceme-li se podrobněji zabývat metodami separace proteinů, je vhodné začít od stručného přehledu separačních metod, které se postupně prosadily v proteinové chemii, a v dalším se zaměřit na speciální potřeby proteomiky a postavení separačních metod v proteomickém výzkumu.

### 9.1 Separační metody v chemii proteinů

Chemie proteinů se zabývá studiem vlastností (struktury, funkce, reaktivity, stability atd.) jednotlivých proteinů. Odtud vyplývá zásadní význam separačních metod pro tento obor: jejich úkolem je získat studovaný protein z výchozího biologického materiálu (izolace a purifikace proteinu, preparativní použití) a ověřit čistotu studovaných preparátů proteinů (analytické použití).

Hlavní problémy při izolaci proteinů vyplývají z těchto skutečností:

- a) Biologický materiál je komplexní a obsahuje velké množství (řádově tisíce až desetisíce) často jen velmi málo chemicky odlišných bílkovin, samozřejmě vedle řady dalších sloučenin různých typů. To si vynucuje použití dostatečně selektivních separačních metod, nejčastěji je nutno použít kombinaci po sobě následujících separačních kroků, při nichž postupně zmenšujeme počet proteinových komponent soustavy. (Obvykle o něco výhodnější je situace při izolaci rekombinantních proteinů v molekulární biologii - izolovaný protein často tvoří značný podíl celkového množství bílkovin, navíc je možné jej vhodným způsobem modifikovat a usnadnit tak jeho purifikaci.) Po-sloupnost použitých metod většinou není možné libovolně měnit, typicky je např. nutno začínat metodami s vysokou kapacitou (často mají nižší selektivitu) a postupně přecházet k selektivnějším postupům s nižší kapacitou. (Někdy se v tomto smyslu purifikační postup dělí na tři fáze - označované jako "capture, purification and polishing", v praxi může být ale počet purifikačních kroků různý.)
- b) Proteinové molekuly jsou relativně velmi citlivé vůči vnějším vlivům. Tento faktor je velmi důležitý, nemá-li být izolovaný protein pozměněn proti své původní (v širším slova smyslu nativní) struktuře, a nemá-li být následující zkoumání izolované bílkoviny ovlivněno artefakty. Omezuje se tím výběr metod a technik a celá izolace musí být prováděna za podmínek, které chrání izolované proteiny (snížená teplota, přídavek inhibitorů proteolytických enzymů, kosmotropních činidel atd.). Při analytickém použití separačních metod je naproti tomu často možné připustit určité omezené strukturní změny analyzovaných molekul.

Přehledně je možno separační metody nejčastěji používané v chemii proteinů rozdělit do tří velkých skupin, které jsou popsány dále.

#### 9.1.1 Separace na základě rozdílů v rozpustnosti

K témuž patří historicky nejdéle používané izolační postupy (vsolování a vysolování, frakcionace srážením), mnohé z nich se však staly také standardní součástí molekulárně biologických pracovních protokolů (např. rozpouštění tzv. inkluzních tělisek pomocí případku chaotropních činidel).

V podstatě se tento dělicí princip uplatňuje prakticky při všech experimentech, obvykle totiž biochemická práce s biologickým materiélem začíná jeho dezintegrací a extrakcí (solubilizací). Ve většině případů tedy dochází i k určitému vydělení nejméně dvou základních frakcí, totiž těch proteinů, které se podařilo převést do roztoku, a (daným postupem) nerozpuštěných (neextrahovaných) proteinů. Při vědomém využití rozdílů v rozpustnosti (např. postupná extrakce roztoky se stoupající koncentrací solí, detergentů, chaotropů atd.) je možno získat hned několik frakcí. Velmi často používaným postupem je také vysolování (frakční srážení) síranem amonným.

Selektivita těchto postupů je velmi nízká, jde však obvykle o přístrojově a pracovně nenáročné, rychlé metody s vysokou kapacitou, při nichž je možno zpracovávat velké objemy biologického materiálu (tvoří obvykle základ fáze "capture").

### 9.1.2 Chromatografické separace

Při izolaci proteinů se uplatňuje výhradně kapalinová chromatografie, volba stacionárních fází a konkrétního provedení je obvykle omezena požadavkem na jejich "biokompatibilitu" (v praxi to omezuje preparativní použití většiny hydrofobních stacionárních fází a většiny nevodných rozpouštěidel, která obvykle denaturují proteiny, řada proteinů také špatně snáší zvýšený tlak). Z pohledu separačního principu lze oddělit gelovou permeační chromatografii od ostatních metod, které by bylo možno chápat jako modifikace adsorpční chromatografie s různou mírou selektivity interakce mezi dělenými proteiny a sorbentem.

Gelová permeační chromatografie (SEC) proteinů využívá obvykle hydrofilních gelů na bázi polysacharidů (dextran, agarosa) nebo polyakrylamidu s různým stupněm zesítění a dělení probíhá podle (hydrodynamické) velikosti molekul, v analogických řadách molekul pak prakticky podle relativní molekulové hmotnosti (největší molekuly jsou eluovány s čelem mobilní fáze, molekuly v pracovním rozmezí gelu postupně podle své klesající velikosti).

Také v dalších chromatografických separacích se využívají nejčastěji sorbenty na bázi modifikovaných hydrofilních gelů. Na jeden pól selektivity "adsorpčně" chromatografických metod by bylo možno zařadit afinitní chromatografií, v ideálním případě (v reálném světě však dosti vzácném) umožňující získání čistého izolovaného proteinu z komplexního extraktu v jediném kroku. Podstatou této metody je využití specifických biologických interakcí mezi izolovaným proteinem a další sloučeninou ("afinantem"). Tento afinant je imobilizován na stacionární fázi (obvykle s pomocí tzv. raménka, které zaručuje jeho sterickou dostupnost) a při aplikaci vzorku "vychytává" svého vazebného partnera, izolovaný protein. Eluce probíhá vytěšňovacím mechanismem po "odmytí" balastních proteinů (adsorbovaných jen slabě, nebo vůbec ne), používá se při ní buď přídavek volného afinantu do mobilní fáze, nebo taková změna vnějších podmínek (pH, iontová síla), která vede k uvolnění interakce a eluci navázaného proteinu (to je případně možné realizovat v několika krocích a získat tak frakce se stoupající afinitou k zakotvené sloučenině).

Jako afinant je možné použít protílátku k izolovanému proteinu (v tomto případě má afinitní chromatografie obvykle nejblíže k ideálnímu, bioselektivnímu provedení), substráty enzymů nebo jejich analogy, oligo- a mononukleotidy apod. Využívá se také známých interagujících dvojic sloučenin (např. avidin-biotin) s tím, že se jeden z interakčních partnerů uměle připojí na izolovaný protein jako jakási "jmenovka" (tag). Výhodou tohoto přístupu (který je stále více využíván zejména v molekulární biologii, kde je k dispozici řada různých "tagů" na bázi antigenních peptidů apod.) je možnost použít opakovaně stejných protokolů, popřípadě komerčně dodávaných sorbentů, pro izolaci různých proteinů. Pravděpodobně nejznámější a nejrozšířenější aplikací tohoto přístupu

je použití tzv. His-tagů, histidiny bohaté sekvence exprimované současně s izolovaným proteinem. Tato sekvence slouží jako "kotva" pro sorbci izolovaného proteinu na Ni-chelatační kolonu, ze které je po odmytí balastních sloučenin požadovaný protein eluován obvykle pufrem s obsahem imidazolu.

Právě popsaná metoda ukazuje na možnosti přechodů od "absolutní selektivity" biochemických interakcí v afinitní chromatografii přes skupinově selektivní sorbenty např. v chelatační chromatografii, využití interakcí lektinů s oligosacharidovými strukturami glykoproteinů, tzv. hydrofobní chromatografii (při které jsou na hydrofilním sorbantu imobilizovány hydrofobní řetězce např. oktylu nebo fenylu a k eluci se používá vodná mobilní fáze) až po metody, které se obvykle přímo k adsorbční chromatografii nepřiřazují, jako je iontově výmenná chromatografie s velmi širokou selektivitou pro kationty nebo anionty. Také v tomto případě se v proteinové chemii používají obvykle ionexy na bázi hydrofilních gelů.

Použití klasických anorganických hydrofilních sorbentů je v separaci proteinů velmi omezené (s výjimkou hydroxyapatitu pro dočišťování proteinových preparátů), naopak se v současnosti lze stále častěji setkat s využitím chromatografie s reverzní fází na bází speciálních biokompatibilních sorbentů, častěji ovšem stále k analytickým účelům nežli pro preparaci větších množství proteinů. Tato oblast prožívá v dnešní době bouřlivý rozvoj.

### 9.1.3 Elektromigrační metody

Také tyto metody se uplatňují v proteinové chemii spíše pro analytické účely nebo pro preparaci malých množství proteinů. Z hlediska mechanismu separace je lze zhruba rozdělit na elektroforetické metody, izotachoforézu a izoelektrické fokusace.

Společným technickým problémem využití těchto metod je - vedle odvodu tepla vznikajícího průchodem proudu - nutnost stabilizovat separované zóny proti promíchávání konvekcí a difuzí. Lze použít několika přístupů: nejrozšířenějším je stabilizace hmotným nosičem (dnes obvykle gellem) nebo provedením separačního děje v kapiláře. Oba přístupy však omezují měřítko metody prakticky pouze na analytické využití. Zvětšení škály separace umožňuje použití stabilizace hustotním gradientem nebo provedení separace ve speciálních labyrinthových celách se semipermeabilními membránami, obyčejně v kombinaci s dělením izoelektrickou fokusací.

Velkého rozšíření jako analytická metoda v biochemických laboratořích dosáhla diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (fakticky kombinace izotachoforetického a elektroforetického dělicího kroku). Tato metoda slouží k odhadu relativní molekulové hmotnosti proteinů a rutinně se využívá také pro základní charakterizaci čistoty bílkovinných preparátů.

Repertoár elektroforetických metod rozšířily v nedávné minulosti také tzv. přenosové (blotovací) techniky, při nichž se separované zóny proteinů přenesou (např. elektroforeticky s využitím nízkého napětí) z dělicího gelu na vhodnou membránu (nitrocelulosovou, PVDF), kde mohou snáze reagovat i s makromolekulárními vazebnými partnery, např. protilátkami (tzv. Western blot). Z hlediska možností automatizace vyhodnocování jsou nejperspektivnější kapilární metody (s možností kombinovat elektromigrační separaci s chromatografickou), kde lze registrovat postupný průchod separovaných látek podobně jako při chromatografii.

Vedle metod z uvedených tří skupin se mohou - zejména např. při oddělování nízkomolekulárních kontaminantů preparátu - uplatnit ještě další postupy jako dělení na základě velikosti částic

(ultrafiltrace a dialýza), na základě rozdílů v hustotě (ultracentrifugace), na základě rozdílů ve stabilitě vůči tepelné denaturaci, frakcionace tokem v silovém poli apod.

K hodnocení průběhu a efektivity separace je nezbytné, abychom mohli měřit nějakou charakteristiku  $A$ , typickou (a co možná výlučnou) pro daný protein (např. enzymovou aktivitu, interakci s protílátkou). Separační postup je pak možné hodnotit buď na základě výtěžků jednotlivých kroků (tj. pomocí extenzivních veličin typu  $\Sigma A$ ), nebo častěji pomocí tzv. faktorů načištění, pomocí "specifických", intenzivních veličin, kde je charakteristika  $A$  vztažena na nějakou jinou extenzivní veličinu, obvykle celkový obsah proteinu. Ačkoliv jde o velmi obvyklý postup, je třeba si uvědomit, že prakticky neexistuje spolehlivá metoda pro stanovení "celkového obsahu proteinu" v určitém preparátu. Omezuje to zejména meziklínové srovnávání výsledků separací, resp. kvality preparátů.

## 9.2 Separační metody v proteomice

Proteomika se rozvinula v posledním desetiletí jako samostatná disciplina, zabývající se soubory proteinů (proteomy). Pojem proteomu byl vytvořen jako analogie k pojmu genom (= soubor genů daného organismu) a vznikl v reakci na zjištění, že není přímá korelace mezi existujícími geny (tj. genomem) a tím, jaké proteiny se v určité buňce v daném čase vyskytují (tj. proteomem v užším, původním slova smyslu). Tato disproporce mezi genomem a proteomem má celou řadu přičin:

1. Už na úrovni regulace transkripce probíhá určitá "selekcí", takže počet různých mRNA je výrazně menší než počet genů
2. Množství určitého proteinu v buňce je řízeno jak rychlosťí jeho syntézy, tak jeho "poločasem rozpadu", takže není přímá korelace mezi úrovní mRNA a úrovni jejího produktu.
3. Proteiny mohou podléhat různým posttranslačním modifikacím, takže jednotlivým mRNA může odpovídat několik produktů.

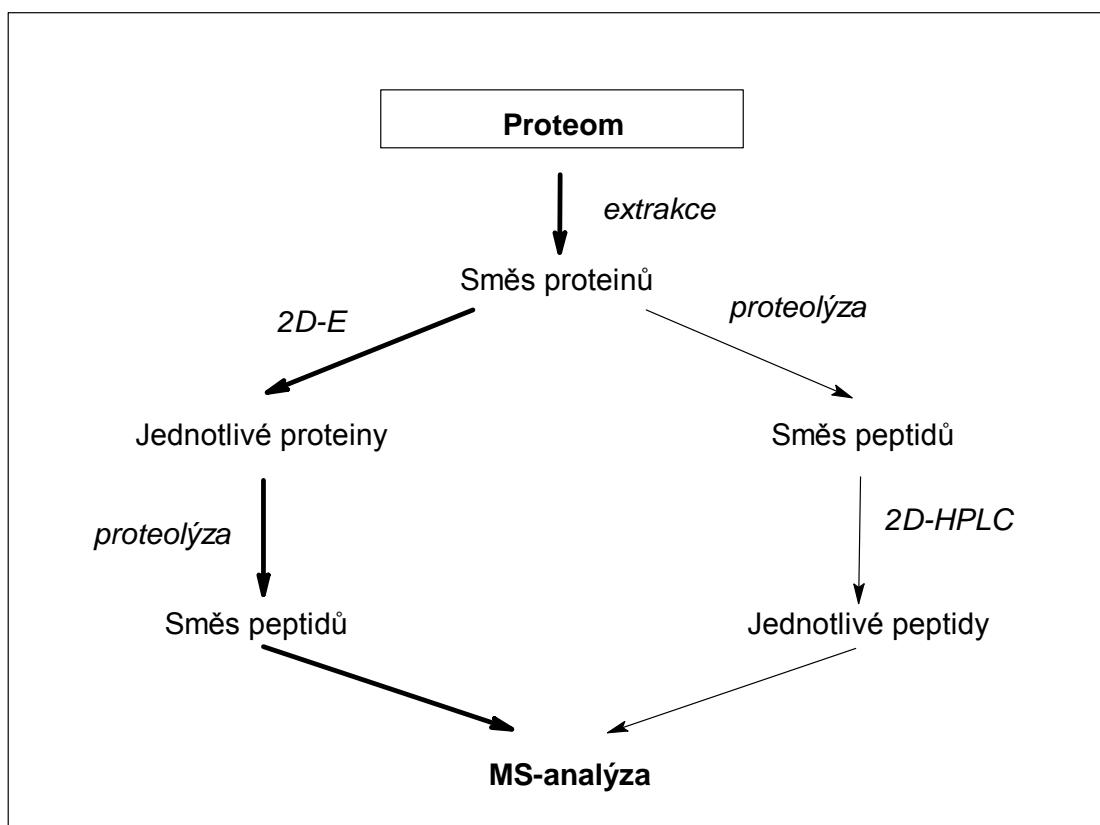
Protože jednotlivé životní funkce jsou realizovány proteiny a nikoliv geny, je s ohledem na výše zmíněné rozdíly genom–proteom nezbytné samostatně zkoumat i proteom, v současnosti se pod tímto pojmem obvykle rozumějí i soubory proteinů, vyskytující se v určitých tkáních nebo např. tělních tekutinách.

### 9.2.1 Dvourozměrná elektroforéza

Původní a dodnes převládající přístup k proteomice je "katalogizační" (proteome mining) a je spojen zejména s použitím kombinace velkého potenciálu separační metody označované nepřesně jako dvourozměrná elektroforéza (2D-E, ve skutečnosti jde o obvykle o kombinaci izoelektrické fokuseace a elektroforézy ve dvou na sebe kolmých směrech) s detekčním potenciálem hmotnostní spektrometrie (MS), která umožňuje identifikaci proteinů na základě analýzy peptidových štěpů, získaných z nich trypsinem nebo jinými specifickými proteasami (obvykle metodou MALDI-TOF), popř. stanovením sekvence na základě fragmentace molekulárních iontů.

Kombinace 2D-E/trypsinolýza/ MALDI-TOF je natolik typická a sehrála ve vývoji proteomiky takovou úlohu, že se občas chápe jako synonymum samotného pojmu proteomika. Proto je na místě se věnovat podrobněji použitému separačnímu postupu (schema průběhu takové analýzy přináší obr. 9.1, detekci proteinů MS popíšeme později). Základem je, stejně jako při purifikaci proteinů, extrakce biochemického materiálu; důraz je ovšem v tomto případě kladen spíše na úplnost extrakce než na zachování funkčního stavu proteinů. Extrakt je rozdelen nejprve izoe-

lektrickou fokusací v polyakrylamidovém gelu s immobilizovaným gradientem pH, dnes v převážné většině případů pomocí komerčně dostupných "proužků" (IPG strips). Po této první separaci, založené na rozdílech v izoelektrických bodech proteinů, je k proužku "dopolymerována" tenká vrstva (slab) polyakrylamidového gelu a provedena separace elektroforézou v denaturujícím (obvykle i redukujícím) prostředí v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS). Tento ionogenní detergent uděluje v podmírkách separace proteinům záporný náboj, jehož velikost je (s jistou aproximací) úměrná velikosti molekul, resp. jejich relativní molekulové hmotnosti (jinak řečeno, poměr náboj/hmotnost je víceméně konstantní). Dělení takto nabitych částic pak probíhá v závislosti na velikosti pórů polyakrylamidového gelu ("hustotě", obvykle se vyjadřuje v procentech síťovacího činidla v polymerační směsi). Kombinaci těchto separačních metod lze rozdělit řádově až tisíce proteinů.



**Obr. 9.1:** Schematické shrnutí hlavních postupů proteomickej analýzy. První operací je převedení proteinů do roztoku. Směs je pak buď nejprve rozdělena dvourozměrnou elektroforézou, jednotlivé proteiny štěpeny specifickými proteasami a vzniklé peptidy (směsi odpovídající jednotlivým proteinům) analyzovaný (silnější šipky v levé části, rozšířenější postup), nebo jsou proteiny přímo štěpeny a vzniklé peptidy rozděleny např. vícerozměrnou chromatografií nebo jinou kombinací separačních metod, poté jednotlivě analyzovaný hmotovou spektrometrií (slabší šipky v pravé části)

Jednotlivé proteiny jsou detegovány obarvením gelu (které umožňuje denzitometricky přibližně stanovit jejich koncentraci) a štěpeny specifickou proteasou, nejčastěji trypsinem (který štěpí vazby na karboxylové straně argininu a lysinu). Štěpení je možné provádět přímo v gelu, nebo často výhodněji po přenosu (blotování) proteinu na povrch membrány (nitrocelulosa, PVDF).

Přes velký potenciál "dvourozměrné elektroforézy" má i tato separační metoda svá omezení. Za nejdůležitější lze považovat relativně malý dynamický rozsah (přibližně dva řády) jak vlastní dělicí metody (tj. rozlišení), tak většiny používaných metod barvení (tj. kvantifikace). Přitom rozsah koncentrací, v nichž se různé proteiny vyskytují v buňce, je minimálně čtyři řády. Metoda tedy není vhodná pro detekci nejméně zastoupených proteinových komponent. Zdánlivě by bylo možno tento problém odstranit tím, že by se do separace vzalo větší množství extraktu (tak, aby byly patrné i skvrny příslušející méně koncentrovaným proteinům), ale v takovém případě koncentrovanější proteiny "zahltí" dělicí gel. Také celková rozlišovací schopnost metody je zhruba o řád menší, než počet proteinů (resp. jejich rozličných forem), které se mohou vyskytovat např. v lidské buňce. Toto rozlišení je možno zvětšit např. použitím menšího rozsahu pH pro dělení izoelektrickou fokusací, ovšem za cenu ztráty kompletnosti zkoumání proteomu (které tak musí být rozděleno na několik samostatných proteomických studií). Stejný význam mají i další metody "redukování" složitosti proteomu např. nezávislými analýzami subsetů proteinů, získaných postupnou extrakcí za proměnných podmínek, nebo použitím vhodných separačních metod (vysolování, chromatografické frakcionace). Klíčovým problémem při jejich použití je standardizace a reprodukovatelnost.

### 9.2.2 Vícerozměrná chromatografie

Alternativou k eletroforetickému dělení proteinů je možnost použít chromatografické dělení peptidů, vzniklých tryptickým štěpením původního proteomu (viz. obr. 9.1, pravá strana) s jejich následnou identifikací hmotnostní spektrometrií. Je si ovšem třeba uvědomit, že počet různých tryptických štěpů je obrovský (typický protein dává 10-30 štěpů), a proto je nelze dostatečně rozdělit v jednom chromatografickém kroku. Řešením, alespoň teoreticky, je kombinace několika chromatografických kroků. Například v metodě označované akronymem MudPIT (**M**ultidimensional **P**rotein **I**dentification **T**echnique) se směs nejprve dělí na silném měniči kationtů, z něhož jsou peptidy postupně po krocích eluovány mobilní fází se stoupající iontovou silou a děleny na další koloně adsorpční chromatografí s reverzní fází. Eluce probíhá v cyklech, takže každá frakce z první kolony je rozdělena gradientovou elucí na druhé koloně.

Hlavní obtíže této a podobných metod jsou spojeny s obrovským objemem dat a jejich nesnadnou interpretací, proto jsou zatím využívány podstatně méně, než postup popsaný v předchozím oddílu. Na druhou stranu jejich výhodou je, že umožňují lépe studovat i ty proteiny, které jsou v proteomu jen velmi málo zastoupeny.

### 9.2.3 Další typy proteomických studií a alternativy v použití separačních metod

Hlubším cílem proteomických studií je poznání proteomu jako systému, tj. zejména funkce a významu jednotlivých proteinů a vzájemných vztahů mezi nimi. K tomu nepostačuje výše popsaná "katalogizace" komponent proteomu. Rozvíjejí se proto i další přístupy k řešení proteomických úloh a uplatňují se v nich také další separační metody. Zásadním rozdílem oproti "proteome mining" je to, že se tyto studie často zaměřují jen na určitý výsek proteomu, resp. skupinu několika proteinů.

Identifikace rozdílů mezi proteomy (např. zdravé a rakovinné buňky) se označuje jako "protein expression profiling" nebo "proteome profiling". Může být zaměřena kvalitativně (výskyt jiných proteinů, resp. jiných modifikací stejných proteinů) i kvantitativně (rozdíly v koncentracích týchž proteinů mezi různými proteomy). I pro tento úkol má zásadní význam metoda dvourozměrné elektroforézy, ať už ve výše popsaném provedení, nebo vhodným způsobem modifikovaná (použití menších rozsahů pH pro fokusaci, omezení rozsahu zesítění gelu pro elektroforézu, provedení

v nedenaturujím/neredukujícím prostředí atd.). Protože dvourozměrné elektroforetické metody nejsou obvykle dokonale reprodukovatelné, využívá se pro srovnávání elektroforeogramů tzv. markerových proteinů, které umožňují přesnější srovnávání výsledků.

Přechodem ke "klasické" proteinové chemii jsou metody, zaměřené na studium několika málo (resp. jednotlivých) proteinů s využitím protilátek nebo jiných "afinitně" reagujících sloučenin. Například provedení separace s přídavkem takového činidla a bez něj (za podmínek, při nichž je zachována specifická interakce) umožňuje selektivně identifikovat interagující komponenty (jejichž pohyblivost je v obou pokusech rozdílná). Specificky interagující látky mohou být využity také k selektivní detekci (a tedy zjednodušení analýzy výsledku), typickým případem je metoda označovaná jako "Western blot" či "dot-blot", při níž se využívá k vizualizaci výsledků separace kombinace specifických (primárních) protilátek proti detekovaným proteinům a s nimi reagujících enzymově značených nespecifických protilátek (sekundární, druhá protilátka).

Zvláštní možností je použití tzv. izotopových značek (**Isotope Coded Affinity Tags**), které využívá možnosti MS detekce k výraznému zjednodušení problému separace. Porovnávané proteomy reagují v přípravném pokusu s chemicky identickým činidlem, které se liší obsahem stabilních nuklidů a které usnadňuje následnou separaci. Typicky takové činidlo obsahuje jodacetamid, reagující s thioly proteinu, krátký spojovací "linker" (v jednom případě deuterovaný) a biotin (afinitně reagující s avidinem). Po reakci s činidlem jsou obě srovnávané soustavy smíšeny ve známém poměru (např. 1:1) a podrobny specifické proteolýze. Vniklá směs peptidů je rozdělena afinitní chromatografií a analyzována hmotovou spektrometrií. Stejně peptidy pocházející z rozdílných proteomů se liší o pevný hmotnostní rozdíl (daný rozdílem ve hmotnosti linkeru) a poměr jejich zastoupení odráží poměr koncentrací "mateřských" proteinů v obou soustavách.

Protilátky se často využívají také ke studiu vzájemných interakcí mezi proteiny. Mohou sloužit jako "návnada" (bait), na kterou je zachycen při afinitní chromatografii jeden ze studovaných proteinů a spolu s ním i další s ním interagující proteiny. Šetrnou elucí je možné tento "cluster" oddělit od ostatních komponent proteomu a podrobit jej oddělené proteomické analýze. Opatrováním pokusu s protilátkami proti takto identifikovaným interagujícím proteinům ("reverse bait") je možno nejen potvrdit informaci získanou v prvném pokuse, ale také postupně rozšiřovat informace o síti vzájemných interakcí (protein networking, pathway building).

### 9.3 Hmotnostní spektrometrie a proteomika

Rozvoj technik hmotnostní spektrometrie (MS) umožnil jejich použití pro identifikaci resp. sekvenaci peptidů a proteinů a stal se jedním z klíčových faktorů vývoje proteomiky. Stručně se tedy zmíníme o hlavních technikách a způsobech jejich aplikace v proteomice.

Základní uspořádání hmotnostního spektrometru obsahuje tři klíčové součásti: zdroj iontů (který poskytuje ionty analyzovaných sloučenin), jejich analyzátor (který pomocí elektromagnetického pole třídí ionty na základě rozdílu v hodnotě  $m/z$ ) a detektor. Použití MS v proteomice je spjato s rozvojem šetrných metod produkce iontů a metod analýzy velkých iontů s dostatečně vysokým rozlišením a přesnosti, z nichž nejrozšířenější se stala kombinace označovaná jako MALDI-TOF, které se budeme věnovat nejpodrobněji, zmíníme se ale i o dalších možnostech.

#### 9.3.1 MALDI-TOF analýza peptidů a identifikace proteinů

V této metodě se využívá fotochemická ionizace studovaných molekul v pevné fázi pomocí vhodných "prostředníků", jako jsou např. deriváty skořicové kyseliny (**Matrix-Assisted Laser Desorpti-**

on Ionization). Jde o velmi šetrnou metodu ionizace, která typicky nevede k fragmentaci molekulových iontů. Při proteomické aplikaci jsou nejčastěji analyzovány proteolytické štěpy. Separované peptidy jsou smíseny s pomocnou sloučeninou - "matricí" - a směs na vhodné podložce odpařena do sucha. Ionty jsou pak získávány pulsy laseru vhodné vlnové délky, který ionizuje nejprve pomocnou sloučeninu, z níž se náboj (obvykle proton) přenáší na analyzovaný peptid (nejčetnější tedy budou ionty  $m+[H^+]/1$ ).

Takto získané ionty jsou analyzovány metodou TOF (Time Of Flight) v analyzátoru, který je "třídí" v pořadí klesajících hodnot  $m/z$ . Soudobé přístroje pracují s vysokým rozlišením, kterého je dosahováno jakousi "fokusací" iontů, bud' ve fázi jejich produkce (tzv. delayed extraction s použitím pulsních laserů) nebo jakýmsi "zdvojením" analyzátoru pomocí tzv. reflektronu (tato modifikace umožňuje pomocí modulace napětí na reflektronu získávat informaci i o fragmentaci původního iontu, a tedy v zásadě sekvenovat daný peptid, i když pro tento účel jsou vhodnější jiné metody MS).

Získaná informace o hmotnostech tryptických štěpů pak slouží k nepřímé identifikaci původních proteinů, komponent studovaného proteomu. Metoda se označuje jako "peptide fingerprinting" a je založena na zjištění, že výskyt určitého peptidu v délce 6 až 20 aminokyselin je vzhledem k obrovskému množství možných kombinací obvykle charakteristický ("unikátní") pro určitý protein, popř. jeho analogy. Prozkoumáním databáze možných peptidů - proteolytických štěpů získatelných danou proteasou - s výsledkem MS-analýzy je tedy možné identifikovat i původní protein. Musí být ovšem splněna celá řada předpokladů, zejména musí být k dispozici taková kompletní databáze (např. z analýzy genomu nebo z proteomu příbuzných druhů).

Metoda MALDI-TOF ovšem obvykle poskytuje pouze informaci o hmotnostech (resp.  $m/z$ ) peptidů, nikoliv o jejich sekvenci. Tato informace je výrazně méně "unikátní", než by byla znalost přesné sekvence. Protože však relativní hmotnosti jednotlivých atomů (nuklidů) nejsou celočíselné, je hodnota  $m/z$  změřená s dostatečnou přesností charakteristická pro určité složení peptidu a je ji možno použít pro identifikaci (obvykle je k tomu ovšem třeba použít shody s větším počtem štěpů odvoditelných z daného proteinu). Pro tento "peptide fingerprinting" je k dispozici specializovaný software, který hodnotí pozorované shody také ze statistického hlediska (zohlednění větší pravděpodobnosti shody pro menší peptidy a větší proteiny apod.). Je logické, že spolehlivost takto získaných výsledků kriticky závisí na přesnosti a správnosti získaných hodnot  $m/z$ , komplikací zde mohou být postranslační modifikace i jiné, artificiální chemické modifikace peptidů (např. reakcí s nezreagovaným akrylamidem).

Výhodou metody MALDI-TOF je její vysoká citlivost a rozlišení, relativní robustnost a cena přístrojů ve srovnání s jinými technikami MS a kompatibilita s proteomickými roboty. Určitou nevýhodou je, že řada sloučenin běžně používaných v proteomice může komplikovat ionizaci a proto je někdy nutné zařadit před hmotnostní analýzu dodatečný purifikační krok.

### 9.3.2 Alternativní možnosti analýzy MS

Základem těchto alternativních metod je odlišný způsob ionizace tzv. elektrosprejem (Electrospray Ionization), kombinovaný s použitím analyzátorů, umožňujících kontrolovat fragmentaci separovaných původních iontů a analyzovat vzniklé dceřinné ionty. Souhrnně se proto tyto techniky označují jako ESI-MS-MS (ESI-tandem MS).

Ionizace ESI je založena na faktu, že proteiny (a peptidy) jsou polyelektrolyty, v závislosti na hodnotě pH roztoku proto mohou nést větší počet kladných nebo záporných nábojů (proteiny se

převážně ionizují z kyselých roztoků, jsou tedy kladně nabité, obvykle jsou schopny navázat 5 až 15 protonů na  $M_r = 10\ 000$ ). Z jedné molekuly proteinu tak vzniká celá série iontů (tzv. multicharge envelope), lišících se hodnotou  $z$  v poměru  $m/z$  (např. z hypotetického proteinu o  $M_r = 10\ 000$  bychom získali mj. ionty s hodnotami  $m/z$  rovnými 1 112 (= 10 009/9), 1001 (= 10 010/10) a 910 (= 10 011/11). To umožňuje stanovit relativní molekulovou hmotnost daného proteinu (jako spořečný násobek získaných hodnot  $m/z$ ), v praxi (směs proteinů) je ovšem tato možnost jen omezeně využitelná a je nutné použít dokonalejších algoritmů.

Při ionizaci ESI prochází roztok ionizovaných molekul nerezovou tryskou nebo kapilárou, udržovanou na vysokém pozitivním elektrickém potenciálu. Vznikající drobné kapičky jsou rychle desolvatovány ("vysušeny") a molekuly rozpolštědla separovány od iontů, které jsou zavedeny do analyzátoru. V tandemovém analyzátoru jsou nejprve rozděleny molekulární ionty (první analýza), ty jsou pak fragmentovány kolizním mechanismem (**Collision Induced Dissociation**) a vzniklé fragmenty analyzovány (druhá analýza).

Tandemová analýza umožňuje získat kromě informace o výchozí molekule také informaci o jejím štěpení a vniklých fragmentech, tedy sekvenovat jednotlivé peptidy. Sekvenace peptidů *de novo* vychází z vědomostí o preferovaných mechanismech a způsobech fragmentace a je obecně obtížná (zejména pokud bychom vycházeli ze směsi peptidů), ale tento úkol může zjednodušit srovnávání s databázemi nebo jiné předběžné vědomosti, k dispozici je i specializovaný software.

Podle stavby a principu použitého analyzátoru je možno rozlišit několik typů přístrojů. Tzv. trojité kvadruplové analyzátoře (triple-quad) využívají principu kvadruplového filtru. Kvadruplový filtr je v zásadě čtverice rovnoběžných vodivých tyčí, na které je vloženo elektromagnetické pole s proměnnou (radiofrekvenční) složkou. Ionty se v kvadrupolu pohybují po spirálních drahách, při daném nastavení pole "proletí" kvadrupolem jen ionty s určitou hodnotou  $m/z$  (pro níž je spirála souosá s kvadrupolem). Postupnou změnou pole je možné tuto hodnotu  $m/z$  měnit ( $m/z$  skan).

V trojitém analyzátoru prolétají ionty postupně třemi kvadrupoly (obvykle označovanými jako Q1, q2 a Q3). První a třetí kvadrupol slouží k analýze, prostřední q2 funguje jako tzv. kolizní cela pro řízenou fragmentaci (srážkami iontů a plynným argonem). Nejprve se provede analýza hmotového spektra molekulárních iontů ("full-scan"), při které se mění nastavení kvadrupolu Q1 (bez fragmentace). Poté je tento kvadrupol použit jako hmotnostní filtr, nastavený na pevnou hodnotu a vydělující určitý molekulární ion. Fragmenty, vznikající z tohoto iontu v q2 jsou pak analyzovány skanováním v kvadrupolu Q3. Na podobném ("prostorovém") principu pracuje také kombinace kvadrupolu s analyzátem TOF (Q-TOF), na místo kvadrupolu Q3.

Naproti tomu v tzv. iontové pasti (ion trap) je analýza rozdělena "v čase". Ionty jsou nejprve akumulovány v iontové pasti, kterou tvoří systém elektrod a uvnitř které se pohybují po kruhových drahách. Změnou elektromagnetického pole je možno ionty postupně "vystřelovat" v závislosti na hodnotě  $m/z$ . Vzhledem k uspořádání je nutno pracovat v cyklech (plnění/jejekce). Nejprve je analyzováno spektrum molekulárních iontů. Zvyšováním napětí vloženého na past jsou ionty uvnitř pasti urychlovány a dochází k jejich fragmentaci, vzniklé fragmenty je možno analyzovat opět jejich vypuzením z iontové pasti. Postupným "řetězením" tohoto postupu je v principu možno realizovat nejen tandemové, ale i vícestupňové dělení ( $MS^n$ ). Iontové pasti fragmentují intenzivněji než trojity kvadrupol, což představuje výhodu pro sekvenaci.

Všechny popsané přístroje jsou ve srovnání s MALDI-TOF dražší a složitější variantou. Ještě více toto konstatování platí pro tzv. FT-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), kde je na

místě iontové pasti cyklotron se silným magnetickým polem a spektrum (naráz) vypuzovaných iontů je analyzováno metodou Fourierovy transformace. Jedná se ovšem o potenciálně nejsilnější nástroje MS pro proteomiku.

## Literatura

Isaaq, H.J.: *Electrophoresis* **2001**, 22, 3629-3638

Lieber, D.C.: Introduction to Proteomics. Tools for New Biology. Humana Press, Totowa 2002.

Zhu, H., Bilgin, M., Snyder, M.: *Annu Rev Biochem* **2003**, 72, 783-812

# 10. MIKROFLUIDIKA A NANOTECHNOLOGIE PRO PROTEOMIKU

*Ing. František Foret, CSc.*

Ústav analytické chemie AVČR, Veveří 97, 61142 Brno  
foret@iach.cz

## 10.1 Úvod

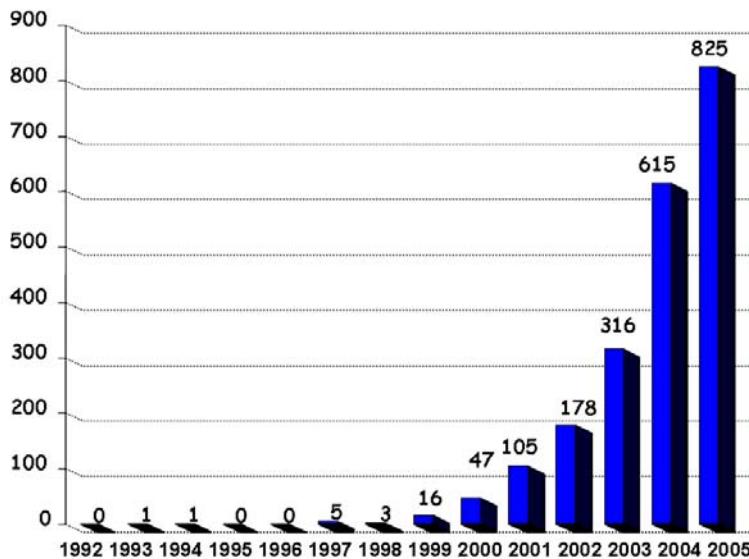
Mikrofluidika a nanotechnologie představují v chemické analýze dva vzájemně se doplňující směry pro rychlé manipulace a separace velmi malých množství vzorků (mikrofluidika) a přípravy senzorů a monitorování interakcí na strukturách o rozdílných stupeňech stovek nanometrů a menších (nanotechnologie).

Když kolem roku 2000 vrcholila exploze na americkém akciovém trhu, kterou tehdejší předseda Banky federálních rezerv Alan Greenspan nazval „iracionální nevázaností“, byla orientace firem na mikrofabrikační a mikrofluidické technologie zárukou úspěchu. Řada začínajících společností zbohatla prakticky přes noc. Dnes jich po několika letech přežívá jen několik a ještě méně z nich má ze své činnosti profit. Paradoxně se objevují také stálé nové společnosti, které zkouší štěstí navzdory současné nepřízní investorů. Tato skutečnost souvisí s nástupem nových cílených vědeckých projektů, které pro své uskutečnění vyžadují rychlejší a citlivější analytické metody, vhodné pro hromadné analýzy velkého množství vzorků. Po úspěšném zakončení projektu sekvenování lidského genomu nastupují další a podstatně složitější projekty, které se často souborně označují jako „-omics“ jako například proteomika (proteomics).

Spolu s mikrofluidikou jsou i některé aplikace nanotechnologií považovány za směry, jejichž rozvoj umožní proteomické analýzy, které v současnosti nelze efektivně provádět. Předpokládané dopady rozvoje nanotechnologií mají ovlivnit řadu průmyslových odvětví a většina rozvinutých zemí (USA, EU) také podporuje národní nanotechnologické iniciativy. Tento trend následuje i řada dalších států. Například thajská vláda vyhlásila program NANOTEC. Na druhé straně jsou však investoři, poučeni finančními ztrátami z přelomu století, zdrženliví. Je to dáno také velmi předběžným stavem výzkumu, jehož významnější masové aplikace jsou vzhledem k základnímu výzkumu očekávány s posunem mnoha let.

Přestože na hlavní praktické aplikace nových technologií budeme ještě několik let čekat, lze na základě současného vývoje s jistotou říci, že budou mít značný podíl na formování mnoha vědeckých, technických a lékařských oborů. Počátky miniaturizace, jako vědeckého odvětví lze sledovat již od konce padesátých let dvacátého století, kdy Richard P. Feynman přednesl svou slavnou přednášku [<sup>i</sup>] „*There's Plenty of Room at the Bottom*“. Příkladem využití nových výrobních postupů vyvinutých v mikroelektronice i pro konstrukci chemického analyzátoru je plynový chromatograf na křemíkovém plátku, publikovaný v sedmdesátých letech [<sup>ii</sup>].

Současný ternd nástupu miniaturizace v chemii a biologii lze dokumentovat na frekvenci slova „microfluidic“ ve vědecké literatuře. Paradoxně, jak ukazuje obr. 10.1, lze skutečný nástup mikrofluidiky datovat do doby korekce na akciových trzích.



**Obr. 10.1:** Počet článků obsahujících slovo „microfluidic“ v databázi PubMed, [www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)

Lze očekávat, že mikrofluidika a koncept „laboratoř na čipu“<sup>[iii]</sup> bude hrát důležitou roli v nové instrumentaci pro vysoce citlivé hromadné analýzy. Mezi hlavní výhody nové technologie patří rychlosť analýz, minimální spotřeba vzorků a činidel, možnost integrace řady funkčních prvků v malém zařízení a možnost snadné replikace pro přípravu paralelních systémů. Jako příklad úspěšného využití mikrofluidických systémů může sloužit komerční sekvenátor DNA, založený na detekci uvolnění pyrofosfátu při DNA-sekvenační reakci (pyrosequencing) prováděné současně v několika stech tisících jamek na mikrofluidické destičce<sup>[iv]</sup>, nebo paralelní mikrofluidické sekvenátory s desítkami až stovkami separačních kolon na skleněném plátku<sup>[v,vı]</sup>.

Z pohledu separačních možností je jednou z nejdůležitějších vlastností mikrofluidické technologie možnost vytvářet mnohočetná spojení kanálků bez nebezpečí tvorby mrtvých objemů a netěsností. Typické „jednotkové operace“ vyvájené pro využití v proteomice zahrnují mikrokolnové separace (elektroforézu, chromatografii), předúpravy vzorků (odsolení, předkoncentraci, afinitní výběr), chemické mikroreaktory (imobilizované enzymy), nebo elektrosprejové rozhraní<sup>[vıi]</sup>. Spojení mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií je pro využití v proteomice velmi důležité a první komerční zařízení jsou již na trhu.

## 10.2 Technologie

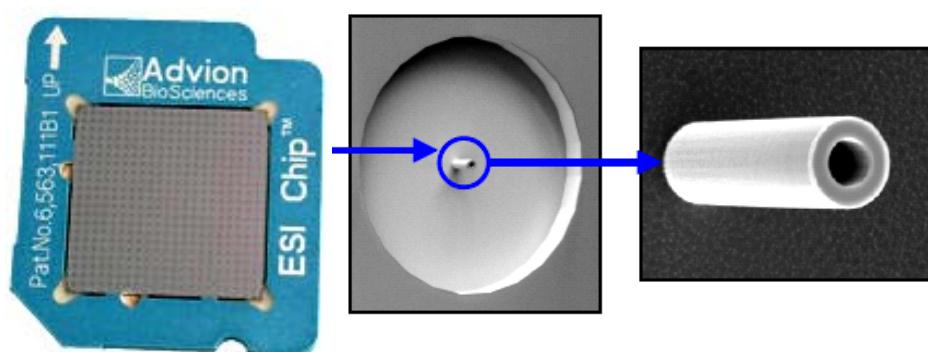
Technologie pro přípravu mikrofluidiky vychází z postupů využívaných v mikroelektronice kde je standardním materiálem křemík. Nejmodernější postupy dnes umožňují tvorbu struktur s velikostí 60 nm. Mikrofluidická zařízení jsou obvykle podstatně jednodušší, s velikostí kanálků v rozsahu desítek mikrometrů, a celé mikrofluidické bloky dosahují rozměrů 5-100 cm<sup>2</sup>. Mikrofluidické „čipy“ mohou být vyrobeny z různých materiálů, např. skla, křemene, křemíku nebo polymerních substrátů, v závislosti na povrchových vlastnostech, dostupné technologii výroby a ceně. Nejpoužívanější technika pro výrobu mikročipů je fotolitografie následovaná chemickým leptáním, kdy je na výchozí materiál ve vakuu nanesena asi 100 nm silná ochranná kovová vrstva (chrom, zlato) a následně tenká vrstva fotoresistu (0,4-2 µm). Poté je přes masku se zvolenou strukturou expono-

ván fotoresist UV-zářením při vlnové délce 300-400 nm. Fotochemická reakce během expozice buď rozruší polymerní strukturu fotoresistu (positivní resist), nebo ji zesíťuje (negativní resist). Po chemickém vyvolání a odstranění ochranné kovové vrstvy je pak exponovaný substrát leptán roztokem HF do požadované hloubky kanálků (5-50  $\mu\text{m}$ ). Při použití skla jako substrátu je leptání aniztropické a šířka výsledného kanálku je větší než rozměry masky. Po důkladném vyčištění jsou vyleptané kanálky shora uzavřeny krycím sklem pomocí tepelného slinutí (thermal bonding) při 500-600 °C.

Na rozdíl od mikrofluidiky, která je definována celkem ohraničeně, představuje nanotechnologie spíše řadu různých struktur a efektů, jejichž styčným bodem je velikost, typicky menší než 100 nm. Také potenciální využití zahrnuje podstatně širší okruh problémů, od chemie (např. katalýza), přes biologii (např. fluorescenční značení - quantum dots), medicínu (např. cílená doprava léčiv) a spotřební aplikace („chytré“ textilie), až po průmyslové aplikace (např. těžba a zpracování ropy).

### 10.2.1 Spojení s hmotnostní spektrometrií

Na rozdíl od analýzy DNA, v jejichž molekulách se vyskytují jen čtyři různé nukleotidy, což umožňuje snadnou analýzu s kódováním pomocí fluorescenčních značek, je analýza proteinů podstatně složitější. Nejde jen o větší počet stavebních jednotek, ale i o časté chemické modifikace a nedostupnost sekvenačních a amplifikačních reakcí běžných ve světě DNA. Proteinové vzorky jsou tak podstatně složitějším analytickým problémem, vyžadujícím přesné stanovení hmotnosti jednotlivých proteinů a peptidových štěpů pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostně spektrometrické měření je dnes typický sériový proces a současné přístroje umožňují velmi rychlá měření. V porovnání se stovkami sekund potřebnými pro typickou chromatografickou separaci může hmotnostní spektrometr zaznamenat i desítky spekter za sekundu. To platí zejména pro průletové analyzátory (time-of-flight, TOF) s laserovou ionizací za přítomnosti matrice (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI), jejíž rychlosť umožňuje i hmotnostně spektrometrické zobrazování povrchu vzorku [viii], ale i pro moderní spektrometry z ionizací elektrosprejem (ESI). Je proto možné navrhovat spojení s mikrofluidickými systémy pro zpracování většího počtu vzorků [ix,x]. První komerčně dostupná zařízení byla vyvinuta pro infuzní analýzy s ESI ionizací [xi] využívající pole 100 elektrosprejových špiček připravených reaktivním iontovým leptáním v plátku křemíku. jejhož detail je na obr. 10.2.

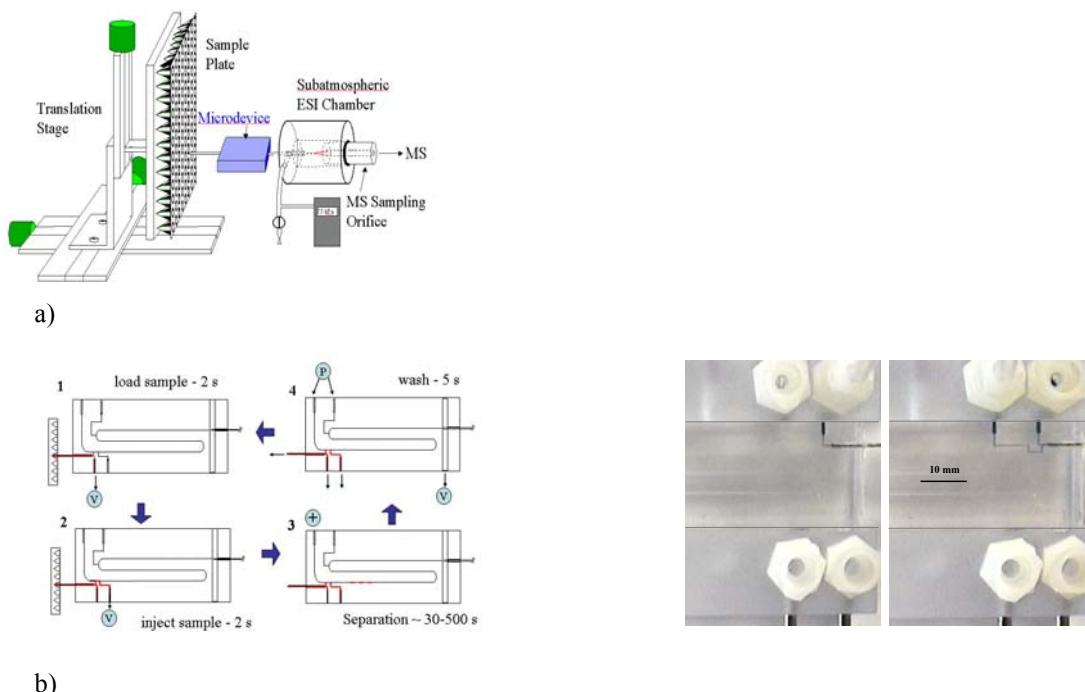


**Obr. 10.2:** Pole ESI špiček vytvořené na plátku křemíku. Každá špička o průměru 20  $\mu\text{m}$  je umístěna v ochranné jamce

Přímá integrace dalších jednotkových operací, např. „solid phase extraction“ s využitím monolitických materiálů byla také úspěšně testována [xii]. Hlavní výhodou pole elektrosprejů však zůstává vysoká reproducibilnost, citlivost, odstranění kontaminace mezi vzorky a snadné použití plně automatizovaného systému. Detaily vývoje a použití mikrofluidiky pro MS lze najít v přehledných článcích [vii,xiii-xix].

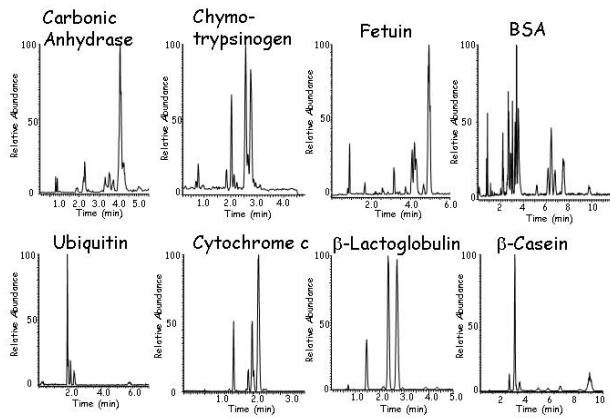
### 10.2.2 Spojení se separacemi

Mikrofluidická zařízení pro infuzní aplikace jsou vhodná hlavně pro aplikace s limitovanou komplexitou vzorků. Pro využití v proteomice je obvykle nutné využít hmotnostní spektrometrii ve spojení se separačními metodami, které v miniaturizovaném provedení slouží jako rozhraní mezi sadou vzorků a hmotnostním spektrometrem [xx-xxx] – viz obr. 10.3.



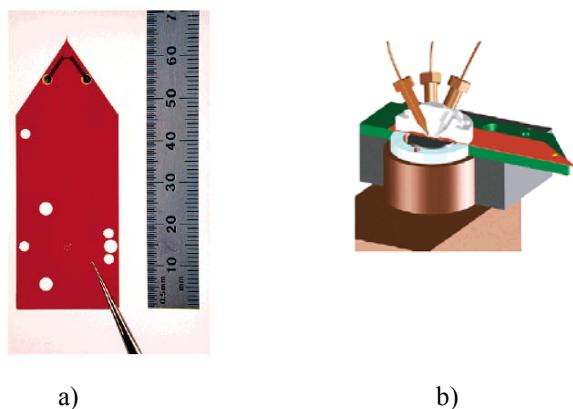
**Obr. 10.3:** a) Koncept stacionární mikrofluidické jednotky sloužící jako rozhraní mezi vzorkem a hmotnostním spektrometrem  
b) Schéma analýzy: P = vstupní port pro stlačený dusík; V = vstupní port pro vakuum. Fotografie zobrazují postup dílkování vzorku s pomocí zeleného barviva. V první fázi je vzorek přes vstupní kapiláru vnesen do zařízení a následně vyplní dávkovací segment separační kolony

Tento koncept byl mnohokrát testován hlavně ve spojení s kapilární elektroforézou a integrovaným trypsinovým reaktorem [xxiv,xxx,xxxii]. Vzhledem k malým rozměrům čipu může separace proběhnout velmi rychle, s rozlišením podobným jako ve standardních kapilárních analyzátorech. Příklad následných analýz proteinových fragmentů po štěpení trypsinem je na obr. 10.4.



**Obr. 10.4:** Rychlá sekvenční analýza (CE/ESI/MS) peptidových fragmentů po střpení trypsinem. Vzorky byly dávkovány z mikrotitrační destičky pomocí počítačem řízeného x-y-z stolku a pneumatického dávkovačího systému. Původní koncentrace proteinů 50 µg/mL. Elektroforetická separace proběhla v 10 mM kyselině mravenčí, pH 2,9 a elektrickém poli 500 V/cm

Důležitou součástí zařízení pro spojení s hmotností je návrh elektrosprejové špičky. Přímé použití otevřené části kanálku se po počátečních studiích ukázalo jako nedostatečné. Další možnosti zahrnují integraci pneumatického rozprašovače [xxviii,xxxiii] nebo monolitických materiálů ve výstupním kanálku [xxxiv]. Nejčastěji jsou však studovány možnosti integrace elektrosprejové špičky připraveneé z materiálů jako poly(dimethylsiloxane) (PDMS) [xxxv,xxxvi], fotoresistu SU-8 [xxxvii-xxxix], nebo polyimidu [xl-xlii]. Polyimid byl také použit v prvním komerčním zařízení integrujícím dávkovací smyčku, chromatografickou předkoncentrační a separační kolonu a electrosprejovou špičku [xlii,xliv]. Tento systém, vyráběný laserovou ablací, je na obr. 10.5. V tomto systému tvoří mikrofluidická kolona stator dávkovacího kohoutu, připojenému k externím mikropumpám dodávajících mobilní fázi. Typické průtoky během separace jsou na úrovni 50-300 nL min<sup>-1</sup>.



**Obr. 10.5.** Polyimidový čip pro nano-LC/ESI/MS (a) a schéma připojení k rotoru dávkovacího kohoutu (b)

### 10.2.3 Spojení s MALDI MS

Přímé (on-line) spojení separací s MALDI je sice technicky proveditelné [<sup>xlv,xlvii</sup>], ale nepatří k časté praxi. Běžně se rozseparované frakce sbírají přímo na MALDI-terčík a následně analyzují dle potřeby [<sup>xlvii</sup>]. Pro podobný účel jsou vyvíjena i miniaturizovaná zařízení využívající struktury připravené v křemíkových plátcích a piezoelektrického nanášení [<sup>xviii,xlviii</sup>]. V nedávné době byl též popsaný systém využívající kontinuální přenos separovaných látek z elektroforetického čipu do vakuumové části hmotnostního spektrometru pomocí rozhraní s rotující kkuličkou [<sup>xlix</sup>]. Donedávna byl na trhu též mikrofluidický systém velikosti kompaktního disku kombinující paralelní předkoncentraci/odsolení s přídavkem MALDI matrice pro 96 vzorků [<sup>lii</sup>].

## 10.3 Závěr

Vývoj mikrofluidiky a nanotechnologií pro analytickou instrumentaci a použití v proteomice teprve začíná. Nejnovější trendy jsou publikovány v přehledných článcích [<sup>xix,vii</sup>], specializovaných časopisech [<sup>lii,liii</sup>] nebo zvláštních číslech renomovaných časopisů [<sup>liv</sup>]. Potenciál nových technologií, zvláště pro rychlé hromadné analýzy velmi malých množství vzorků, byl již jasně demonstrován. Pro další praktické rozšíření budou třeba jak investice na straně výrobců instrumentace, spolehlivost a nízká cena přístrojů, tak i potřeby uživatelů tyto nové technologie využít.

## Literatura

- 
- i H<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>H
  - ii S. C. Terry, G. H. Jerman, J. B. Angell, IEEE Trans. El. Dev., 1979, 26, 12, 1880–1886.
  - iii P. S. Dittrich, A. Manz, Nat. Rev. Drug Discov. 2006, 5, 210-218.
  - iv H[www.454.com](http://www.454.com)H
  - v Paegel, B. M., Blazej, R. G. Mathies, R. A., Curr Opin Biotechnol 2003, 14, 42-50.
  - vi Mitnik, L., Carey, L., Burger, R., Desmarais, S., Koutny, L., Wernet, O., Matsudaira, P., Ehrlich, D., Electrophoresis 2002, 23, 719-726.
  - vii Lazar, I.M., Grym, J., Foret, F. Mass Spectrometry Reviews, 2006, 25, 573– 594.
  - viii Chaurand, P., Cornett, D. S. Caprioli, R. M., Curr Opin Biotechnol 2006.
  - ix Xue, Q. F.; Dunayevskiy, Y. M.; Foret, F.; Karger, B. L. Rapid Communications in Mass Spectrometry 1997, 11, 1253-1256.
  - x Xue, Q., Foret, F., Dunayevskiy, Y.M., Zavracky, P.M., McGruer, N.E., Karger, B.L. Anal.Chem., 69, 1997, 426-430.
  - xi H[www.advion.com](http://www.advion.com)H
  - xii Tan, A. M., Benetton, S. Henion, J. D., Anal Chem 2003, 75, 5504-5511.
  - xiii Zamfir, A. D., Bindila, L., Lion, N., Allen, M., Girault, H. H. Peter-Katalinic, J., Electrophoresis 2005, 26, 3650-3673.
  - xiv Sung, W. C., Makamba, H. Chen, S. H., Electrophoresis 2005, 26, 1783-1791.
  - xv Lion, N., Reymond, F., Girault, H. H. Rossier, J. S., Curr Opin Biotech 2004, 15, 31-37.
  - xvi Schasfoort, R. B. M., Expert Rev Proteomic 2004, 1, 123-132.
  - xvii Zhang, S. Van Pelt, C. K., Expert Rev Proteomic 2004, 1, 449-468.
  - xviii Foret, F., Preisler, J. Proteomics, 2002, 2, 360-372.
  - xix Grym, J., Foret, F. Chem. Listy , 2005, 99, 915 – 921.

- 
- xx HLi JH, HTremblay TLH, HHarrison JH, HThibault PH. HMethods Mol Biol.H 2004, 276, 305-24.
- xxi HLi JH, HLeRiche TH, HTremblay TLH, HWang CH, HBonneil EH, HHarrison DJH, HThibault PH. HMol Cell Proteomics.H 2002, 2, 157-68.
- xxii HLi JH, HTremblay TLH, HWang CH, HAttiya SH, HHarrison DJH, HThibault PH. HProteomics.H 2001, 1, 975-86.
- xxiii HDeng YH, HHenion JH, HLi JH, HThibault PH, HWang CH, HHarrison DJH. HAnal Chem.H 2001, 73, 639-46.
- xxiv HWang CH, HOleschuk RH, HOuchen FH, HLi JH, HThibault PH, HHarrison DJH. HRapid Commun Mass Spectrom.H 2000, 14, 1377-83.
- xxv HLi JH, HKelly JFH, HChernushevich IH, HHarrison DJH, HThibault PH. HAnal Chem.H 2000, 72, 599-609.
- xxvi HLi JH, HWang CH, HKelly JFH, HHarrison DJH, HThibault PH. HElectrophoresis.H 2000, 21, 198-210.
- xxvii HLi JH, HThibault PH, HBings NHH, HSkinner CDH, HWang CH, HColyer CH, HHarrison JH. HAnal Chem.H 1999, 71, 3036-45.
- xxviii B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger, F. Foret Anal. Chem. 1999, 71, 3258-3264.
- xxix Zhang, B.; Foret, F.; Karger, B. L. Anal. Chem., 2000, 72, 1015-1022.
- xxx Zhang, B., Foret, F. Karger, B.L. Anal. Chem. 2001, 73, 2675-2681.
- xxxi Ekstrom, S., Onnerfjord, P., Nilsson, J., Bengtsson, M., Laurell, T. Marko-Varga, G., Anal Chem 2000, 72, 286-293.
- xxxii Yun Liu, Haojie Lu, Wei Zhong, Pengyu Song, Jilie Kong, Pengyuan Yang, Hubert H. Girault, Baohong Liu Anal. Chem. 2006, 78, 801-808.
- xxxiii Grym, J., Otevrel, M., Foret, F. Lab-on-Chip, submitted.
- xxxiv Bedair, M. F.Oleschuk, R. D., Anal Chem 2006, 78, 1130-1138.
- xxxv Dahlin, A. P., Bergstrom, S. K., Andren, P. E., Markides, K. E.Bergquist, J., Anal Chem 2005, 77, 5356-5363.
- xxxvi Liljegren, G., Dahlin, A., Zettersten, C., Bergquist, J.Nyholm, L., Lab Chip 2005, 5, 1008-1016.
- xxxvii Huikko, K., Ostman, P., Grigoras, K., Tuomikoski, S., Tiainen, V. M., Soininen, A., Puolanne, K., Manz, A., Franssila, S., Kostiainen, R.Kotiaho, T., Lab Chip 2003, 3, 67-72.
- xxxviii Carlier, J., Arscott, S., Thomy, V., Camart, J. C., Cren-Olive, C.Le Gac, S., J Chromatogr A 2005, 1071, 213-222.
- xxxix Le Gac, S., Rolando, C.Arscott, S., J Am Soc Mass Spectr 2006, 17, 75-80.
- xl Lion, N., Gellon, J. O., Jensen, H.Girault, H. H., J Chromatogr A 2003, 1003, 11-19.
- xli Lion, N., Gellon, J. O.Girault, H. H., Rapid Commun Mass Sp 2004, 18, 1614-1620.
- xlii Rohner, T. C.Girault, H. H., Rapid Commun Mass Sp 2005, 19, 1183-1190.
- xliii Yin, H., Killeen, K., Brennen, R., Sobek, D., Werlich, M.van de Goor, T., Anal Chem 2005, 77, 527-533.
- xliv [Hwww.agilent.com](http://www.agilent.com)H
- xlv Preisler, J., Foret, F., Karger, B.L. Anal.Chem., 1998, 70, 5278-5287.
- xlvi Preisler, J., Hu, P., Rejtar, T., Moskovets, E.Karger, B. L., Anal Chem 2002, 74, 17-25.
- xlvii [Hwww.lcpackings.com](http://www.lcpackings.com)H
- xlviii Ekstrom, S., Wallman, L., Malm, J., Becker, C., Lilja, H., Laurell, T. Marko-Varga, G., Electrophoresis 2004, 25, 3769-3777.

- 
- xlix Musyimi, H. K., Guy, J., Narcisse, D. A., Soper, S. A. Murray, K. K., Electrophoresis 2005, 26, 4703-4710.
- <sup>l</sup> Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jornvall, H., Bergman, T., Anal Chem 2004, 76, 345-350.
- li Ehrnstrom, R., Lab Chip 2002, 2, 26N-30N.
- lii <http://www.rsc.org/publishing/journals/LC>
- liii <http://www.iop.org/EJ/journal/Nano>
- liv Electrophoresis - Miniaturization.

# 11. ANALYTICAL GLYCOBIOLOGY

*Professor Milos V. Novotny*

Department of Chemistry, Indiana University, 800 E. Kirkwood Ave., Bloomington,  
IN 47405, USA  
[novotny@indiana.edu](mailto:novotny@indiana.edu)

## 11.1 Importance of Glycosylation

New directions of modern biology have been increasingly associated with the creation of novel enabling technologies. The “systems biology” approach, advocating the utilization of extensive molecular and quantitative data for enhancing our knowledge of basic physiological processes in different species, has been an outstanding example of this trend. This approach is congruent with the central theme of the field of life sciences: from empirical and descriptive toward more exact, molecular, and dynamically characterized. Following the examples of genomics and proteomics, the other “omics” entities (transcriptomics, lipidomics, glycomics and glycoproteomics, etc.) emerge as specialized fields in their own right, as they all contribute to creating the integrated knowledge base under “systems biology”. The basic technologies, measurements and instrumentation for the molecular aspects of these fields are now amply provided by separation science, mass spectrometry, and an extensive use of modern computational tools and techniques (bioinformatics).

Unraveling the complexities of processes in the living cells is a daunting task. With the current knowledge of various genomes, there is an increasing awareness that genes of any biological organism are merely a “blueprint” that must be amply supplemented by additional regulatory mechanisms to enhance the sophistication of different phenotypes. Posttranslational modifications (PTMs) of proteins now emerge as a most important aspect of the more developed biological entities (e.g., mammalian cells). Among the many PTMs recognized at this time, glycosylation appears to be the most sophisticated, varied, abundant, and functionally most important mode. For example, it is estimated that at least 50% of all mammalian proteins are glycosylated. Preponderance of this PTM has been traditionally attributed to eukaryotic cells, although there is now increasing evidence that even the lower forms of living organisms are capable of some, however, primitive types of glycosylation.

Along different lines, the field of glycoscience has evolved over the years to a high degree of sophistication. The structural uniqueness of carbohydrates has fascinated many generations of scientists since the time of Emil Fischer. While the structural diversity of different sugar molecules in Nature is enormous already, it is the capability of the sugar-like molecules to link with each other and additional molecular entities, such as peptides and lipids that provides the enormous versatility to different glycoconjugate biomolecules: from the relatively small glycolipids to structurally diverse glycoproteins, to the giant extracellular biomolecules called proteoglycans. In contrast to the other highly important biomolecules (nucleic acids and polypeptides), sugars provide various branching forms and unparalleled types of isomerism. In no small part, this contributes to the three-dimensional intricacies of glycoconjugate molecules and their selective biological roles.

An increasing awareness that oligosaccharides are the major determinants of sophisticated biological processes (through sugar-sugar or sugar-lectin interactions) has led to the recent emphasis on the field of glycomics as a “glycan-centric” approach to understand human and animal diseases and their important biosynthetic pathways, to promote diagnostic array technologies, and

design new therapeutic agents and vaccines, among other activities. These directions are now being substantially influenced by our capabilities of providing ever more details on the structure of glycoproteins. The field of glycoproteomics then emerges as an important extension of the wide-ranging activities in proteomics with one important and overwhelming task: to understand how the glycans, or their local “arrays” within a polypeptide backbone, act as biological determinants in a fine-tuning process. Indeed, substantial evidence now links glycosylation and its fine-tuning attributes to the processes as important as cell growth and development, tumor growth and metastasis, immunological responses, and microbial pathogenesis. While glycosylation occurs with proteins small and large, with their location ranging from membrane receptors, intracellular and extracellular entities and even the nucleus, many glycans seem to modulate protein activities at the cell-extracellular interface. Among many different activities (functional genetic approaches, development of glyco-gene microarrays, antibody-based diagnostics, etc.) of the glycobiology field, the molecular analysis assumes a very substantial role in providing the structural information to supplement functional knowledge. Glycoprotein isolation strategies and structural characterization of both the protein and oligosaccharide parts (sequencing) are the first essential steps in the process of molecular analysis. Owing to the recent advances in high-sensitivity glycomic and glycoproteomic measurements, it has now become feasible to design unified analytical platforms for the initial assessment of glycosylation/protein expression in the health-disease and other biological processes.

## 11.2 Glycoproteins: Basic Structural Aspects and Tools

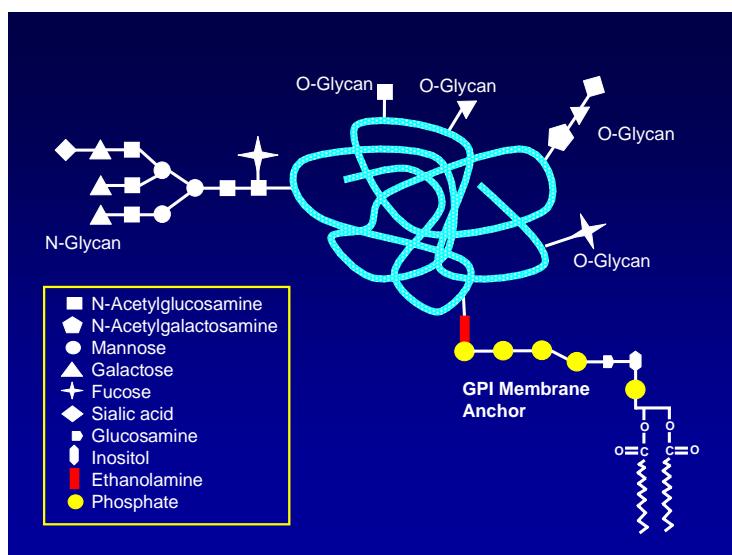
The functional uniqueness of glycoproteins goes hand-in-hand with the multitude of structural variants in which they may occur. Being a “composite” of the polypeptide core and the sugar substitutions at distinct amino acid residues, glycoproteins can be quite diverse molecules. While the primary structure of the polypeptides is relatively tightly controlled by the genetic code, proteins conjugate with various sugar chains through asparagine (N-linked glycans), serine and/or threonine (O linked glycans) and only very seldom with additional residues (e.g., hydroxylysine or hydroxyproline, but these are rare). In contrast, glycans (broadly classified as “linear” or “branched”) can be expressed as numerous isomers, with not only a variable sequence and chemical modifications of certain sugar residues, but also with a different degree of branching, combinations of such branched forms, and various linkages between different sugar residues. Interestingly, the biosynthesis of oligosaccharides is basically a non-template driven process which may involve a complex, quantified expression of numerous glycosyltransferases – this may have important biological implications in forming tissue-specific “isoforms”. In the strict sense, what we call a glycoprotein may well be a conglomerate of the structures with a well-defined (in terms of primary structure) polypeptide, but very variable glycan substitutions at certain residues. These substitutions may, however, have a very pronounced effect on proteins’ overall advanced structural dynamic behavior and/or interactions with other biomolecules in their biological environment. Such important structural variations represent a formidable challenge to our structural/analytical tools. To understand the varied functions of glycoproteins, the relevant structural finesse must be recognized by our tools as well as Nature recognizes them in the functional sense.

In accordance with the varied structures and functions, some glycoproteins may feature a minor sugar substitution, whereas others are glycosylated heavily, resembling a molecular equivalent of a sugar-coated pill. Heavily substituted large proteins (e.g., mucins) are methodologically quite challenging. While biochemists and bioanalysts have gradually learned how to isolate numerous glycoconjugates, the isolated molecules can seldom be studied structurally in their intact form

by X-ray crystallography or NMR spectrometry directly. Thus, modern glycomics and glycoproteomic methodologies often utilize controlled degradation procedures by protein-cleaving enzymes (proteases) or sugar-releasing enzymes (endo- or exoglycosidases) to simplify the overall analytical task.

Using a “generic glycoprotein” (Figure 1) as the starting point of our structural discussion, i.e. determination of its primary structure(s), we can recognize that the extending structures of different glycans can be released (either enzymatically or chemically) from the protein “backbone” to yield a mixture of oligosaccharides for analysis. Alternatively, we can cleave just N-glycans or O-glycans, separately, or as a mixture. In a glycomics determination, we can display this mixture as a “glycan map” (either through mass-spectral (MS) methodologies or a separation-based procedure), and with further diligence and the use of additional methodologies, we can determine which sugars are contained in the individual glycans, and what is their sequence. In doing so, we do not gain much information as to where in the overall protein structure are these oligosaccharides conjugated (sites of glycosylation and the relative ratios of different glycans). Different techniques must alternatively be used to extract this information (see below).

The variation in sequence and linkage between the individual monosaccharides that constitute each oligosaccharide chain are being assessed with a different degree of difficulty for N-linked and O-linked structures. It so happens that the complexity of the determination with the N-linked structures is reduced by the known existence of their core structure (consensus sequence) of the common trimannosyl chitobiose core, with the variable antennas extending from it (Figure 2). The biosynthetic pathways leading to the functional N-glycans have been studied extensively and the distinct genes for the glycosidases and glycosyltransferases located in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (GA) have now been identified. N-Glycosylation is wide-spread among different surface and secreted proteins. The key steps in the biosynthesis of the additional class of proteins, linked to membranes through glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Figure 1), have also been elucidated. In contrast, much less is known about the O-linked structures, in spite of their perceived biological significance.

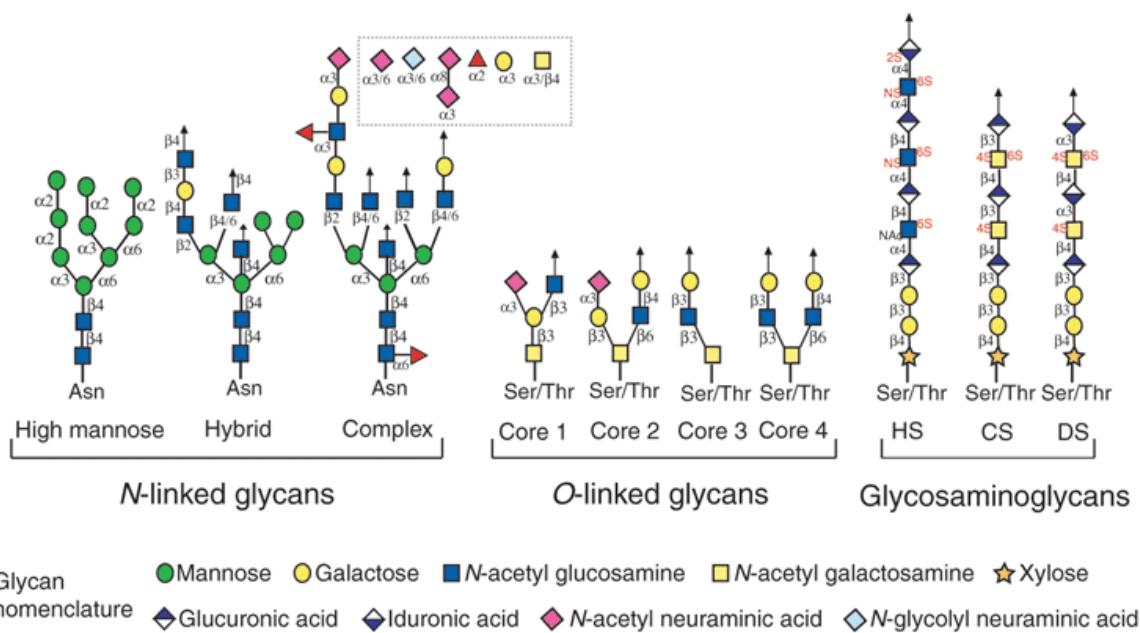


**Fig. 11.1:** General features of a glycoprotein structure

The studies of O-glycans have been made more difficult by the unavailability of glycosidases that could cleave quantitatively these glycans from glycoproteins. The apparent lack of a consensus sequence for O-glycans is yet another drawback, although it is obviously possible to classify

these oligosaccharides into distinct cores (Figure 2). Serine and threonine residue are often encountered in patches within the proteins, making it methodologically difficult to assign correct structures for glycosylation. Most O-linked structures involve N-acetylgalactosamine (GalNAc) in their linkage to a protein, but the simplest type of O-glycosylation features just one sugar residue, N-acetylglucosamine (O-GlcNAc). O-GlcNAc-modified proteins are quite abundant in eukaryotic cells. They are being increasingly perceived as highly important in intracellular signaling.

Unlike in protein science, where amino acid residues have been distinctly designated by the letter coding already for some time, there was no uniform glycan nomenclature until recently. As seen in Figure 2, the most common sugar components have their color and signs now assigned, as recommended by the Consortium for Functional Glycomics (USA).



**Fig. 11.2:** Main variations in glycan structure

The figure also indicates different linkages between the sugar residues. Based on the number of antennae, we can distinguish them as biantennary, triantennary, etc. systems, with a further structural and functional distinction of N-glycans as “high-mannose”, “hybrid” and “complex” types. Based on the extent of sialylation, we also distinguish between neutral and acidic glycans. The remainder of this figure features the linear O-linked structures with heparin, heparin sulfate, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate, which the biochemists commonly associate with the modifications in proteoglycans, but find increasingly in other glycoconjugates as well.

For the most detailed structural studies of glycoproteins, it is often advisable to isolate them as highly purified entities through affinity-based steps or an extensive use of chromatographic and/or electrophoretic principles. This is not without a danger of adsorptive losses of minor proteins and introducing analytical artifacts. In studying glycoproteins in mixtures, as is increasingly popular in comparative glycoproteomic studies, glycoproteins are often subjected to a common protease digestion, followed by a mass-spectrometric measurement, possibly preceded by a fractionation of glycosylated and non-glycosylated peptides.

Many attempts have also been made to resolve differently glycosylated entities within the same protein (glycoforms) in a direct fashion. Based on the common observations that some glycoproteins with a different content of sialyl residues migrate differently in isoelectric focusing and form distinct “spot trains” in 2-D gel electrophoresis, it became appealing to use newer methodologies with higher resolving power (e.g., capillary electrophoresis) to characterize further the systems. So far, most of these investigations have not been very successful due to the extreme complexity of most glycoproteins.

### 11.3 Isolation of Glycoproteins and Direct Analysis

In biological materials such as cellular extracts and physiological fluids, glycoproteins are often encountered in minute quantities, placing high demands on isolation methodologies. Such demands are less stringent when working with typical recombinant proteins. Clearly, the strategies will differ, depending on the amount of material available for analysis, a protein mixture complexity and the concentration range in which the studied glycoproteins may be encountered. This has been well illustrated (see below) with the challenging analysis of blood plasma or serum samples.

Glycoproteins of interest may be encountered as either soluble or membrane-bound molecules. The isolation strategies may also vary, depending on whether such biomolecules occur in cytosolic space, nucleus, extracellular space, membrane, etc. While some general principles of these procedures have been described in the recent reviews, specific isolation/analysis may differ in particular cases. A combination of orthogonal separation techniques and the use of affinity principles (antibody-based or lectins) are the most commonly practiced procedures. The practice of analytical glycobiology often demands a multitude of technical approaches to suit a particular problem.

Glycoproteins can often be purified by a proper combination of the conventional protein HPLC methodologies (size-exclusion, ion-exchange, hydrophobic interaction, and reversed phase), so long as sufficient precautions are applied concerning possible adsorption losses. Miniaturized forms of separation (use of microcolumns with appropriately reduced volumetric flow rates) are particularly conducive to glycoprotein analysis at high sensitivity.

Electrophoretic separations in gels have become standard in complex protein analysis. Separations based on both the size and isoelectric points are thus also applicable to glycoprotein isolation, as the MS measurement sensitivity has been advanced to provide both basic proteomic and glycomic information, on the routine basis, from individual gel spots. A “global glycoprotein” screening, based on specific staining procedures, can now certainly be applied to major glycoproteins in a mixture. It is often advisable to lectin-preconcentrate glycoproteins from a complex mixture prior to separation in a gel system.

Lectin affinity provides a unique opportunity to enrich the glycoproteins of interest seen in very complex biological media. Although Nature provides us with very many lectins of plant or animal origin for very specific interactions with glycoproteins, the practical considerations of availability and price confine the uses of lectin affinity to less than about ten alternatives. Some are readily available as the commercial products on typical biochemical solid supports such as agarose. However, there is an increasing awareness that the lectin-saccharide interactions should still be explored more efficiently for creating new valuable analytical reagents.

While some lectin-based isolations emphasize specificity of certain lectins toward different glycan moieties, most studies use germ agglutinin or Concanavalin A (lectins with a broad specifi-

city) to capture most glycoproteins in a biological sample. Large pools of glycan structures are thus sampled in most studies of this type. Due to the gel nature of typical commercial packings, the most popular technique of lectin affinity chromatography involves preparation of a small column containing 1-5 ml of lectin-bound material. Employing a gravity-flow mode, glycoproteins are then displaced from such a column through an addition of haptene saccharides.

Additional analytical approaches utilizing lectin selectivity have stimulated research on the binding conditions to various surfaces: membranes, microchip arrays, and porous silica beads. Due to its mechanical stability under high pressure conditions and a well-defined spherical shape for the benefits of chromatography, silica has been a popular matrix in high-efficiency separations. To bind the lectins to silica surface, it is first necessary to activate the beads through silanization and then employ a series of chemical treatments. Successful uses of this direction in preparing pressure-stable microcolumns for glycoprotein enrichment have recently been demonstrated, with sample capacities comparable to the agarose-based materials. These microcolumns can be readily incorporated into the integrated analytical systems for quantitative glycoproteomic investigations (see below). The sample enrichment can either be accomplished, for a comprehensive trapping of glycoconjugates, through (a) mixed-lectin mode interactions; or (b) use of lectin microcolumns in a serial arrangement. The use of microcolumns is particularly beneficial for high-sensitivity determinations, while a trapping step is feasible at the level of intact glycoproteins or glycopeptides generated through the action of proteases.

## 11.4 Site-OF-Glycosylation Determinations

The mass spectrometers utilizing either MALDI or ESI sources are now readily employed in the structural studies of glycoproteins. To a variable extent, the intact glycoproteins can be resolved to their individual glycoforms (if different in mass) by both methodologies, dependent on their size and the extent of glycosylation. The success of these methodologies is, at the initial stage, due to an appropriate selection of a MALDI matrix for desorption/ionization of intact glycoproteins as well as optimized instrumental conditions. While broad and partially resolved peaks are typically observed in the case of large glycoproteins with multiple glycosylation sites, some recent studies using FT-MS have shown impressive gains due to MS resolution.

For each site of glycosylation, there are possible structural variations (extent of substitution, site-specific microheterogeneities, etc.) which can have important biochemical consequences. Investigating protein glycosylation at the level of glycopeptides (generated through protease or other reagents) is at least as important as the investigation of glycan chains. A typical procedure for this involves separation of peptides/glycopeptides by capillary LC, while the eluting peaks are subjected to tandem mass spectrometry (MS/MS) and the system searches for the fragments diagnostic for the sugar-peptide attachment (e.g., sugar oxonium ion fragments, originating from collisionally-excited glycopeptides). Such determinations are typically performed with triple quadrupole instruments or Q-TOF (quadrupole/time-of-flight) instruments, or now even better with a linear ion trap/FT-MS combination. The instrumental sensitivity of such techniques has recently reached impressive gains. It can also be readily demonstrated that separating the studied glycopeptides from the remaining peptides in a digest, i.e. reducing “chemical noise” is highly beneficial for substantial sensitivity gains. Using capillary LC at nanoflows is typically preferable to coupling CE with ESI-MS in high-sensitivity profiling of glycopeptide mixtures.

## 11.5 Investigations at Glycan Level

In order to study glycan sequences, branching, linkages, and other structural aspects, it is customary to cleave them from the polypeptide backbone. This can be accomplished either chemically, using some classical methods of carbohydrate chemistry which have been modified to work at microscale. Alternatively, N-glycans can be readily deconjugated from glycoproteins upon the action of commercially available enzymes, such as PNGase F (peptide N-glycosidase) which has a very wide specificity. For narrower specificities, some other enzymes are also available. For O-glycans, there are no viable alternatives to using enzymes, so that a chemical cleavage ( $\beta$ -elimination) is still the best procedure. During the recent years, the chemical cleavage procedures have been developed for analytical work at microscale.

The glycan pools produced by the cleavage procedures can be very complex, so that their separation is often needed prior to their MS characterization and sequencing. For less complex oligosaccharide mixtures, it is feasible to employ selective exoglycosidase reagent cocktails, in conjunction with MALDI-MS, for structural characterization. Glycans released from the studied glycoproteins can be displayed in a profile (glycan map), but MS alone cannot easily distinguish various types of isomerism that may occur. Although a subsequent  $MS^n$  investigation of a particular glycan (for example, in an ion trap instrument) can provide a substantial improvement in structural terms, this procedure is tedious and consuming large quantities of sample. It seems thus preferable to perform an LC/MS-MS experiment with a mixture of glycans.

In separating glycan mixtures chromatographically, there are different options: hydrophilic interaction mode; size-exclusion chromatography; anion-exchange chromatography; and adsorption chromatography using graphitized carbon columns. Not all of these modes are readily amenable to a direct coupling to MS through ESI. Off-line trapping is an option, which is more tedious to perform with individual glycans. The ESI-coupled micro- or nanocolumns must use “MS-friendly” buffers and mobile phases. Another alternative is to separate the glycans of interest chromatographically and “spot” them in a continuous spot array on a MALDI plate for a further MS investigation. Such procedures have now been developed into analytically acceptable robotic systems for MALDI-MS/MS using time-of-flight technologies.

A plausible alternative in investigating complex glycan pools has recently been quantitative methylation of all sugars, followed by reversed-phase capillary LC and MALDI-MS/MS. Totally methylated oligosaccharides yield a more effective MS (increased fragmentation) and highly sensitive measurements. Additionally, their hydrophobicity allows using reversed-phase LC and resolution of numerous isomers prior to MS detailed analysis.

Capillary electromigration techniques such as CZE or CEC are both competitive and complementary to high-efficiency LC methodologies, although their coupling with MS is still problematic, as is their limited capacity for handling dilute samples. However, their power is perhaps best exemplified in their use with laser-induced fluorescence (LIF) detection of fluorescently-tagged oligosaccharides in high-sensitivity measurements. The capability of CE-LIF in resolving isomeric glycans is also remarkable. Like other capillary separation techniques, CE-based methodologies can potentially be transferred to their microchip equivalent for better and faster separations. Some illustrations of this trend already exist in the recent literature.

## 11.6 Developing Analytical Platforms

### 11.6.1 Glycomics through Capillary LC/MALDI-TOF/TOF-MS

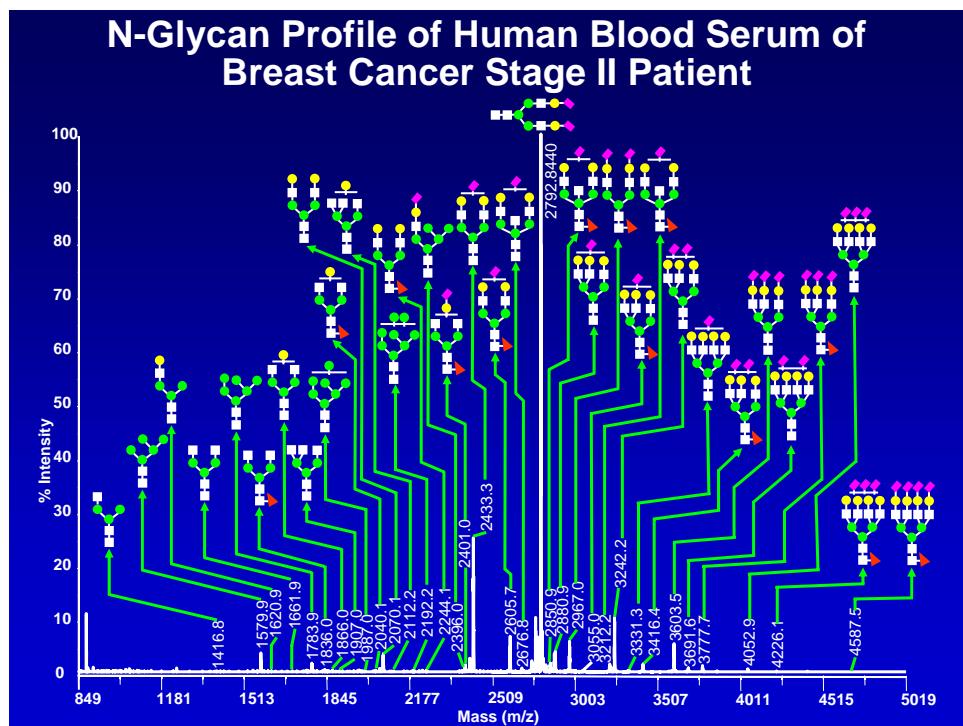
A suitable general platform for functional glycomic measurements must, first of all, consider the best possible structural technique that is capable of distinguishing different forms of sugar isomerism at high sensitivity. The effectiveness of a particular ionization technique, i.e., the use of ESI versus MALDI is highly important here in view of the relatively inefficient ionization of oligosaccharides when compared to peptides. While MALDI forms exclusively the sodium adduct ions in the positive-ion mode, multiply-charged states in ESI cause a loss of sensitivity due to splitting the detectable signal. To recognize the branched structures and differently linked residues, it is not sufficient to generate secondary fragments due to the cleavages at the sites of glycosidic bonds (necessary in sequencing), but sufficient fragmentation energies must be delivered to form the more informative cross-ring fragments. An approach chosen in our laboratory has been to use MALDI-TOF/TOF instrument, which satisfies the needs for extensive fragmentation in complete structural assignments. Other viable alternatives are the recently developed FT-MS-based approaches to enhanced fragmentation.

In choosing the MALDI-TOF/TOF approach, it became useful to evaluate the merits of per-O-methylation as the means to include both acidic and neutral glycans in a single analytical run (e.g., glycan profiling). While sample derivatization represents an additional procedural step, there are substantial advantages of this chemical modification: stabilization of sialylated structures; enhanced sensitivity; and improvements in the MS/MS interpretation capabilities. As oligosaccharides become substantially hydrophobic through quantitative methylation, they can be separated from complex mixtures using capillary reversed-phase LC. While permethylation of the oligosaccharide mixtures is performed inside of a NaOH-filled capillary, the derivatives can be subsequently displayed mass-spectrometrically in a glycan profile, as exemplified in Fig. 11.3. Alternatively, the complex glycan mixtures can be resolved through the reversed-phase LC capillary or a microchip, if the resolution of glycan isomers is required.

In building a complete analytical platform for routine and quantitative glycomic measurements, the individual steps, including the solid-phase permethylation, must be integrated and automated for repeated runs.

### 11.6.2 Glycoproteomics Utilizing Lectin Enrichment

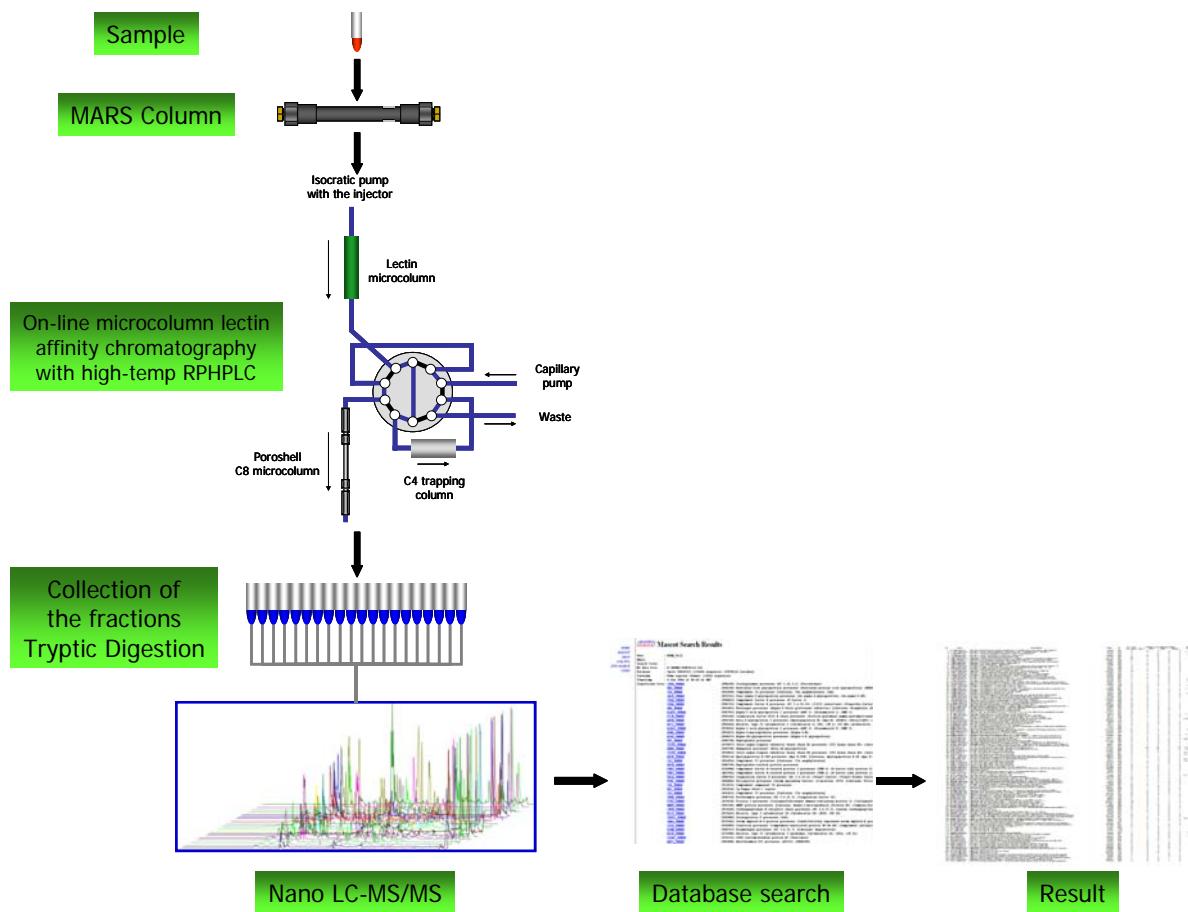
In studying glycoproteins in extremely complex mixtures, it is very tedious to employ multiple fractionation and isolation steps prior to the MS measurements. Moreover, when working with limited volumes and small quantities of biological materials, significant sample losses will inevitably occur due to the manipulation steps. On-line glycoproteomic investigations provide potentially a holistic approach to such situations, but they will undoubtedly generate massive amounts of proteomic data to process and evaluate. Fortunately, the recent advances in proteomic methodologies and MS instrumentation, coupled with advancing bioinformatic tools, have enabled several leading scientific teams to explore this potential.



**Fig. 11.3:** Example of a medically relevant glycan profile determined through MALDI mass spectrometry

Sample fractionation strategies appear crucial in dealing with the problems of comprehensive glycoproteomic analysis. In the analysis of typical biological specimens, such as blood serum or plasma, or a tissue protein extract, glycosylation may occur with both the major components (e.g., transferrin or immunoglobulins) as well as some trace (albeit, extremely important) biomolecules, including disease biomarkers. It has recently become attractive to separate the minor and major proteins through the use of the so-called “depletion columns” based on the immunoaffinity principles. Additionally, lectin-based fractionations have become attractive in searching for disease biomarkers. Alternatively, glycoproteins can be separated from non-glycosylated proteins on the basis of the sugar moieties reacting with a hydrazide-activated, immobilized column matrix.

As an example of the on-going research and development of a versatile glycoproteomic analytical platform, Figure 4 shows the utilization of combined chromatographic column technologies used in front of a standard proteomic, MS-based experiment. A small sample of human serum is first subjected to a chromatographic process that removes several most abundant protein components, while the trace proteins are further subjected (in a valve-based arrangement) to a fractionation on the lectin microcolumn. The lectin-trapped glycoproteins are then released (with a suitable buffer) onto a reversed-phase column, operating at elevated temperature of 70°C, and fractionated into some 30 fractions, which are then collected in a 96-well plate and subjected to a tryptic degradation into peptides/glycopeptides. In turn, each fraction is subjected to the now routine LC/MS-MS experiment involving an appropriate mass analyzer: an ion trap-based instrument or, preferably, the LTQ-FT mass spectrometer.



**Fig. 11.4:** Diagram of a glycoproteomic analytical platform. (M. Madera, Y. Mechref, Y. Klouckova, and M. V. Novotny, *J. Proteome Research*, in press, available on web)

The following database searching then identifies the proteins of interest and, in comparative glycoproteomic runs, putative biomarkers of a disease or altered metabolic conditions. This example is representative of the multimodal/multidimensional approaches needed in solving today's biomedical problems.

## SUGGESTED REFERENCES

- Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans, R. Raman, S. Raghuram, G. Venkataraman, J. C. Paulson, and R. Sasikumar, *Nature Methods* **2**, 817 (2005)
- Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity, Y. Mechref and M.V. Novotny, *Chemical Reviews* **102**, 321 (2002)
- Glycoproteomic Structure Determination by Mass Spectrometry, A. Dell and H.R. Morris, *Science* **291**, 2351 (2001)
- New hyphenated methodologies in high-sensitivity glycoprotein analysis, M.V. Novotny and Y. Mechref, *J. Sep. Science* **28**, 1956 (2005)
- Miniaturized separation techniques in glycomic investigations, Y. Mechref and M.V. Novotny, *J. Chromatogr. B.*, in press, available on web.
- Semiautomated High-Sensitivity Profiling of Human Blood Serum Glycoproteins through Lectin Preconcentration and Multidimensional Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, M. Madera, Y. Mechref, Y. Klouckova, and M.V. Novotny, *J. Proteome Research*, in press, available on web

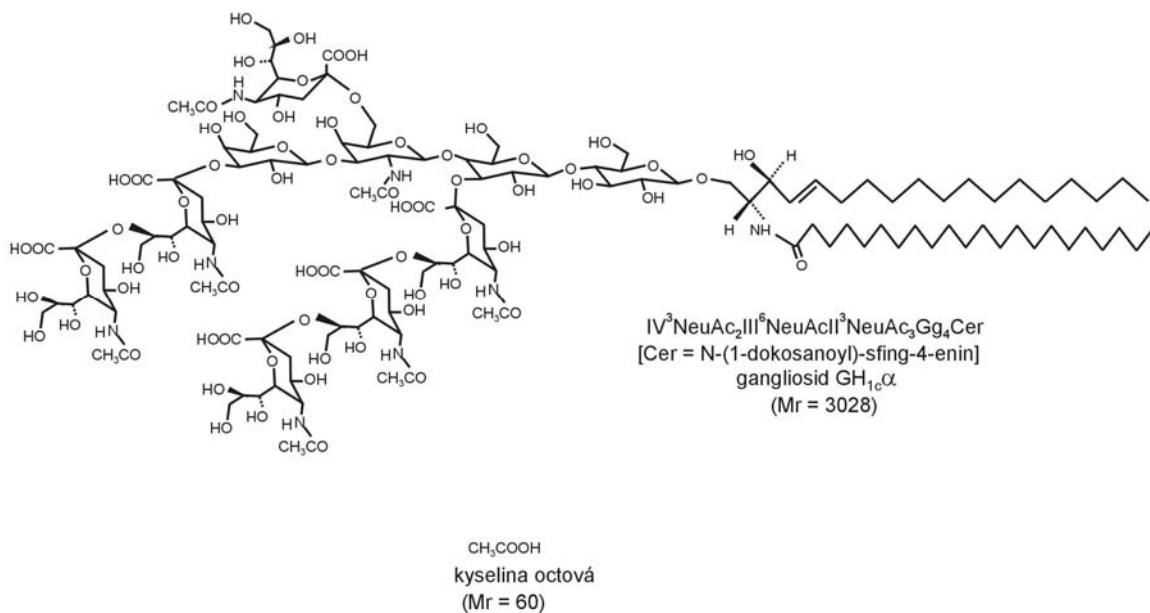
## 12. CHROMATOGRAFICKÉ METODY V ANALÝZE LIPIDŮ

RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta  
email

### 12.1 Úvod

Lipidy, jedna ze tří hlavních složek živé hmoty (vedle bílkovin a uhlohydrátů), představují velmi rozmanitou skupinu látek, které se navzájem liší chemickým složením i biologickou aktivitou. Za nejmenší jednoduchý lipid lze považovat kyselinu octovou s pouhými dvěma atomy uhlíku, za největší složený lipid pak gangliosid GH<sub>1cα</sub> obsahující šest molekul kyseliny N-acetylneuraminové, jehož strukturní vzorec je uveden na obr. 12.1.



Obr. 12.1: Vzorec gangliosidu

Velká rozmanitost jednotlivých lipidů i jejich molekulárních druhů nabízí využití prakticky všech chromatografických technik jak pro základní výzkum, tak pro rutinní biochemické stanovení. Z živočišné říše byly nejpodrobněji prostudovány lipidy obratlovců (zejména savců), v rostlinné říše se těší největší pozornosti semena olejnatých rostlin a dále některé plody a listy, které se uplatňují v potravném řetězci obratlovců. Zvláštní oblast zájmu představují bakterie.

Složení lipidů a jejich molekulárních druhů je pro každý živočišný druh i pro jednotlivé orgány charakteristické a lze je podle tohoto složení identifikovat. V následujících kapitolách budou diskutovány jednotlivé formy lipidů (transportní, tkáňové), lipidové třídy i jejich molekulární druhy se zřetelem na využití chromatografických technik pro jejich stanovení.

## 12.2 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou micelární částice transportující cholesterol a triglyceridy v krevní plasmě. V prostoru zaujímají přibližně kulovitý tvar. Na povrchu mají monovrstvu složenou z molekul fosfolipidů a cholesterolu, uspořádaných tak, že jejich hydrofilní části jsou orientovány vně a hydrofobní dovnitř částice. Proteinová složka je známa pod názvem **apolipoprotein** či **apoprotein** (apo). Molekuly apoproteinů jsou uloženy na povrchu částice, nebo jsou do něho zanořeny a jejich hydrofilní část je orientována do vodného prostředí. Jádro částice tvoří nepolární triglyceridy a estery cholesterolu. Klasifikace a názvosloví lipoproteinů jsou poznamenány historickým vývojem metodologie jejich analýzy. Z praktických důvodů se stále používají názvy charakterizující lipoproteinové částice na základě jejich hustoty, podle níž jsou izolovány ultracentrifugací v hustotním gradientu:

- lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins, HDL),
- lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins, LDL),
- lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoproteins, IDL),
- lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins, VLDL).

Částice, které při této technice flotují vždy na povrchu, se nazývají chylomikrony (chylomicrons, CM). Lipoproteinové třídy se kromě svého chemického složení, jež má vliv na jejich densitu, liší také svou velikostí. Základní charakteristiky jednotlivých lipoproteinů a jejich subfrakcí jsou přehledně uvedeny v tab. 12.1.

**Tab. 12.1:** Základní parametry lipoproteinů lidské krevní plasmy

Frakce	Zdroj	Průměr (nm)	Relativní hustota	Protein (%)	Lipid (%)
<b>CM</b>	střevo	90-1 000	< 0,95	1-2	98-99
<b>VLDL</b>	játra (střevo)	30-90	0,95 - 1,006	7-10	90-93
<b>IDL</b>	VLDL	25-30	1,006 - 1,019	11	89
<b>LDL</b>	VLDL	20-25	1,019 - 1,065	21	79
<b>LDL-I</b>		27,5-26,0	1,025 - 1,034		
<b>LDL-II</b>		26,0-25,5	1,034 - 1,044		
<b>LDL-III</b>		25,5-24,2	1,038 - 1,050		
<b>LDL-IV</b>		24,2-21,8	1,048 - 1,065		
<b>HDL</b>	játra, střevo, VLDL, CM	7,5-20	1,065 - 1,210		
<b>HDL<sub>2</sub></b>		10-20	1,065 - 1,125	33	67
<b>HDL<sub>3</sub></b>		7,5-10	1,125 - 1,210	57	43

Pro klinickou diagnostiku i základní výzkum má význam stanovení velikosti částic jednotlivých lipoproteinů, zejména atherogenního LDL. Tento problém lze řešit buď elektroforézou na gradientu akrylamidu, která je velmi pracná i časově náročná, anebo gelovou filtrací [1,2]. **Gelová filtrace** (angl. synonyma *gel permeation chromatography*, GPC, *size-exclusion chromatography*, SEC, nebo *molecular sieve chromatography*, MSC) je separační technika, která není chromatografií v pravém slova smyslu (nedochází k ustavování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází). Touto technikou jsou separovány molekuly podle své velikosti. Jako hydrofilní stacionární fáze (SF) slouží silikagel nebo methakrylátové pryskyřice s definovanou velikostí pórů, dobrých výsledků bylo dosaženo i na Sepharose (2). Separace probíhá za izokratických podmínek, jako mobil-

ní fáze (MF) slouží fyziologický roztok, který může být pufrováný fosfátem. Velké molekuly se nedostanou do pórů a jsou vyloučeny v nejkratším možném čase; nejmenší velikost molekuly, která nemůže vstoupit do pórů, určuje tzv. vylučovací limit kolony (vrchní limit). Menší molekuly, které do pórů vstoupí, jsou v nich zadržovány podle své velikosti. Nejmenší molekula, kterou lze ještě oddělit, určuje tzv. permeační limit kolony (spodní limit), menší molekuly se již pak nedělí. Separaci rozmezí kolony je určeno velikostmi separovatelných molekul, závisí na velikosti pórů a v tomto rozmezí platí lineární závislost logaritmu molekulové hmotnosti (velikosti molekuly či částice) na elučním objemu (čase). K detekci se využívá buď charakteristická vlnová délka pro bílkoviny v UV-oblasti (280 nm) nebo na základě tzv. „post-column“ reakce cholesterolu s enzymatickým činidlem ve viditelné oblasti (600 nm).

Pomocí afinitní chromatografie na koloně plněné iontovýměnnou pryskyřicí (ligand diethylaminoethyl) a mobilní fází tris pufr pH 7,4 s gradientem NaClO<sub>4</sub> se lipoproteiny dělí v opačném pořadí - HDL, LDL, IDL, VLDL, CM [3]. Detailnější rozdělení lipoproteinů na subfrakce reflekující různé katabolické stavы poskytuje afinitní chromatografie na heparin-Sepharose. Mobilní fází je pufr (fosfát, tris) s gradientem NaCl [4].

Problémem pro obě analytické metody – elektroforézu i gelovou filtrace – je kalibrace. Běžně používané polydextrany nejsou vhodné vzhledem k odlišnému tvaru molekuly. Vhodným modelem se sice zdají být kulovité latexové částice definované velikostí, ty se však vzhledem k rozdílnému povrchovému náboji chovají odlišně při elektroforéze a v chromatografické koloně jsou irreverzibilně zadrženy. Jediným exaktním způsobem kalibrace je sada separovaných lipoproteinových frakcí, jejichž velikost byla stanovena pomocí elektronového mikroskopu [4, 5].

### 12.3 Apoproteiny

Apoproteiny jsou strukturální bílkoviny lipoproteinových částic, které vážou lipidy v povrchovém polárním obalu lipoproteinů a umožňují tak vytvářet rozpustné polydisperzní částice. V každé třídě lipoproteinů se vyskytuje několik apoproteinů, které jsou pro daný lipoprotein charakteristické. Jejich vzájemné poměry v rámci jednotlivých lipoproteinů se za různých patofyziologických stavů liší, a proto má jejich stanovení svůj nezastupitelný význam. Přehled jednotlivých apoproteinů a jejich dosud známých charakteristik udává tab. 12.2.

Rutinní stanovení apo AI a apo B je v současné době prováděno imunoelektroforeticky, polymorfismy apo E elektroforézou na agarose nebo polyakrylamidu. Pro stanovení profilu apoproteinů v separovaných lipoproteinech lze využít tyto techniky kapalinové chromatografie s UV-detekcí (280 nm):

- a) SEC – jako stacionární fáze slouží silikagel nebo methakrylátové pryskyřice, mobilní fází je většinou fosfátový pufr s gradientem NaCl [6];
- b) chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) – stacionární fázi je RP C4, C8 nebo C18, mobilní fází 0,1% kyselina trifluoroctová nebo 1% triethylamonium fosfát s gradientem CH<sub>3</sub>CN [7];
- c) iontově výměnná chromatografie (ion exchange fast protein liquid chromatography, IE-FPLC) – jako stacionární fáze slouží celulosa nebo trisakryl s ligandem diethylaminoethyl, jako mobilní fáze 0,01-0,1M Tris-urea pH 7,6-8,2 s gradientem NaCl [8-9];
- d) kombinace imunoafinitní chromatografie (IAC), kde stacionární fázi je sorbent (Sepharosa, Sephacryl) aktivovaný bromkyanem se zakotvenou specifickou protilátkou a mobilní fází 0,002-0,005M pufr pH 7,4 s gradientem NaCl, NaSCN, s dalšími separačními technikami - SEC, UC, SDS-PAGE [9].

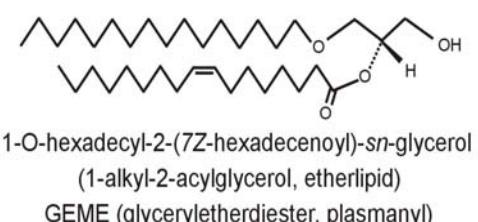
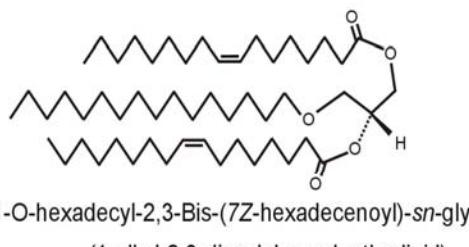
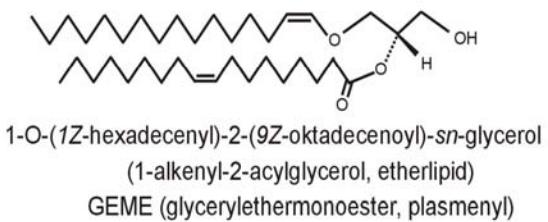
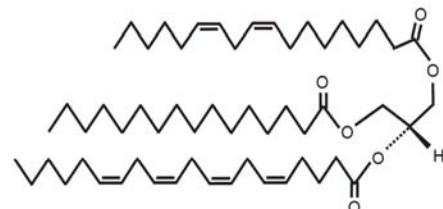
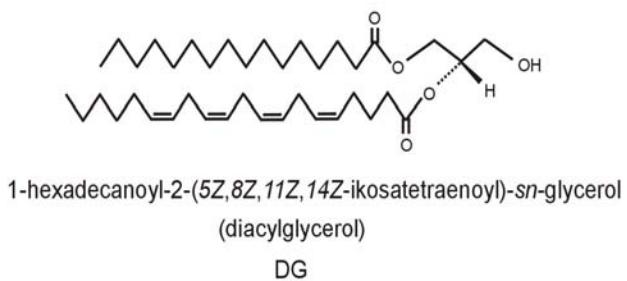
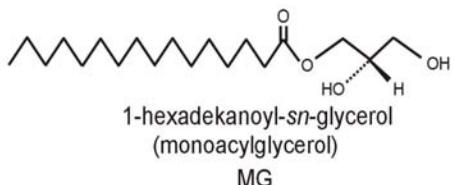
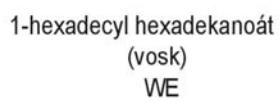
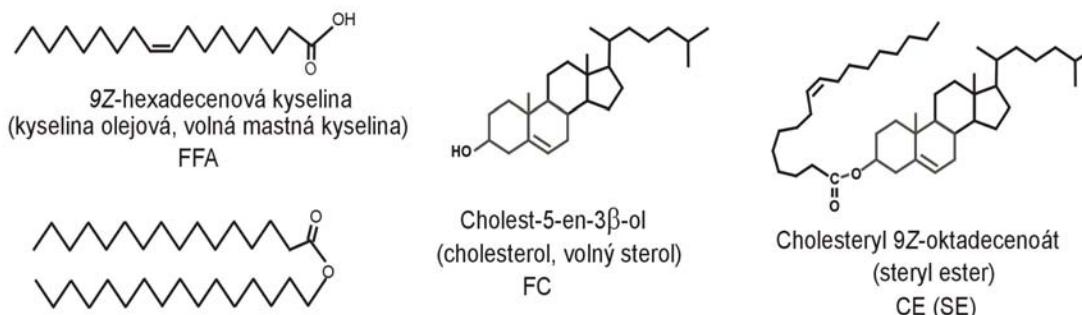
**Tab. 12.2:** Apoproteiny a jejich vlastnosti

Apo	Vznik	M <sub>r</sub> ( v tisících)	Lipoprotein	Funkce
A-I	střevo, játra	28	HDL, CM	aktivátor LCAT, ligand pro HDL receptor
A-II	střevo, játra	17	HDL, CM	strukturální protein, aktivátor HL, inhibitor LCAT
A-IV	střevo	46	HDL, CM	spojen s tvorbou LP bohatých na triglycerid
B-48	střevo	264	CM	strukturální protein, vazba na receptory
B-100	játra	550	LDL	ligand pro LDL receptor
C-I	játra	5,8	CM, VLDL, IDL, HDL	aktivátor LCAT
C-II	játra	9,1	CM, VLDL, IDL, HDL	aktivace LPL
C-III	játra	8,75	CM, VLDL, IDL, HDL	inhibice LPL
D	nadledviny, slezina, ledviny placenta, CNS	30-33 $2 \times 19,3_{\text{mm}}$	HDL, CM	lipokalin – multiligandový a multifunkční protein, ↑ koreluje s poruchami NS, obesitou, DM, Ca,
E	játra, periferní tkáně	35	CM, VLDL, IDL, HDL	strukturální protein, ligand pro receptory CM a LDL
F	játra	33	HDL, LDL	LTIP, reguluje interakci CETP a LP
H	játra	50 <sub>mm</sub> , 90 <sub>dm</sub> , 130 <sub>tm</sub>	CM, VLDL, HDL,	antigen pro anti-PL, s apoC-II aktivace LPL, s apoE aktivace destiček, ↑ u DM
J	HDL, CSF	2 x 40 <sub>dm</sub>	HDL	vazba PON1, transport lipidů a FA, vazba na solubilní amyloid β
L	slinivka	42 a 39	HDL	↑ u schizofrenie
M	játra, ledviny	23 a 26	VLDL, LDL, HDL	

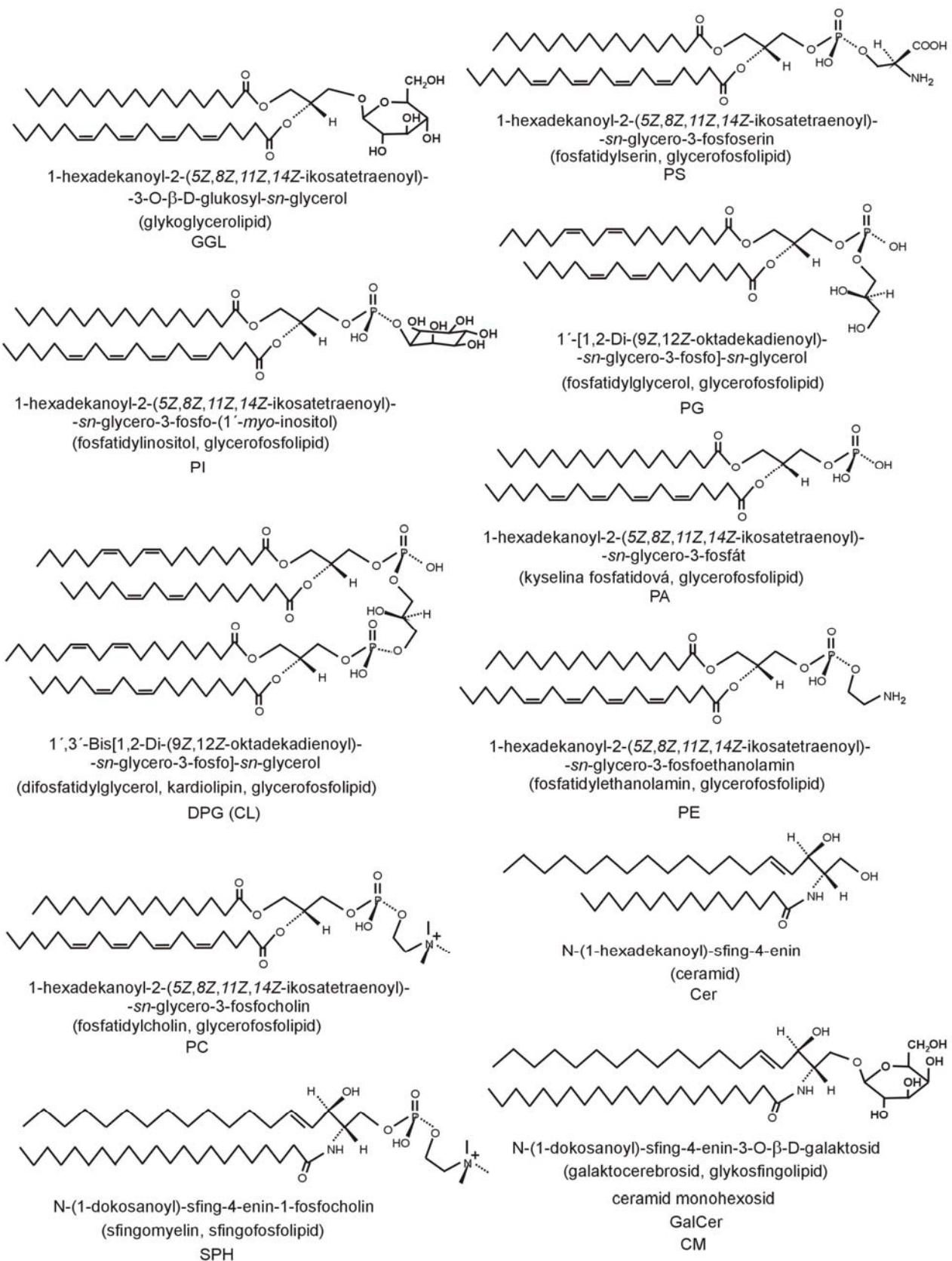
LCAT - lecithin:cholesterol acyltransferasa, HL - jaterní lipasa, LP - lipoprotein, LPL - lipoproteinová lipasa, NS - nervový systém, DM - diabetes mellitus, Ca - karcinom, LTIP - lipid transfer inhibitor protein, CETP - cholestryl ester transfer protein, PON1 - paraoxonasa, FA - mastná kyselina, mm - monomer, dm - dimer, tm - trimer

## 12.4 Jednoduché lipidy

Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů, sterolů či glycerolu. Jejich klasifikace je velmi složitou a stále diskutovanou problematikou. Pro analytické účely je výhodné jejich rozdělení podle chromatografického chování na silikagelu na nepolární (neutrální, NL), které se pohybují v nepolární mobilní fázi (uhlovodík-diethylether-kyselina octová) a polární (PL), které se dělí v polární mobilní fázi (chloroform-methanol-voda, často s přidáním kyseliny octové nebo amoniaku). Strukturní vzorce a jejich systematické i triviální názvy včetně zkratek ukazují obr. 2 a 3. Podle zmíněného chromatografického chování řadíme mezi nepolární lipidy také volné mastné kyseliny, parciální glyceridy a volné steroly, přestože obsahují volnou (neesterifikovanou) funkční skupinu. Biologický výzkum vyžaduje, v závislosti na sledované problematice, analyzovat jak všechny zmíněné třídy NL i PL v intaktní podobě (stanovení obsahu celé lipidové třídy), tak i jejich molekulární druhy. Pro stanovení jednotlivých NL a PL lze využít všechny techniky kapalinové chromatografie, pro stanovení molekulárních druhů jsou vhodné techniky kapalinové i plynové chromatografie.



Obr. 10.2: Strukturní vzorce neutrálních lipidů



Obr. 12.3: Strukturní vzorce polárních lipidů

## 12.5 Stanovení jednotlivých lipidových tříd

Tenkovrstevná chromatografie s densitometrickou detekcí, využívající klasické tenké vrstvy silikagelu jako SF, je stále využívanou analytickou technikou vzhledem k nenáročnosti přístrojového vybavení. Tato technika s fluorescenční detekcí je stále nejvhodnější metodou i pro účely preparativní. Složení MF závisí na separovaných lipidech, jako příklad je uvedeno několik systémů [10]:

- Separace NL s MF hexan-diethylether-kyselina octová (80:20:1), PL zůstávají na startu. Pořadí eluce (klesající  $R_f$ ) je: WE, SE, GEDE, TG, FA, FS, DG, MG, PL.
- Separace PL s MF chloroform-methanol-kyselina octová, voda (60:50:1:4), NL se pohybují s čelem. Pořadí eluce: NL, CL, PE, PI, PS, PC SM, LPL (lysoPL).
- Separace PL a MG s dvojím vyvíjením. První systém hexan-aceton (3:1) oddělí MG a další vyvíjení v systému chloroform-methanol-kyselina octová-voda (80:13:8:0,3) rozvine PL v pořadí: CL, PA, CM, PG, PE.
- Separace PL a fosfátů PI v systému methanol-chloroform-30% amoniak-voda (48:40:5:10) v pořadí: PE, PC, PI, PI-monofosfát, PI-difosfát.

**Dvouozměrná separace NL a PL.** Všechny třídy lipidů (včetně jednotlivých lysoforem) nelze rozdělit jednotlivým vyvíjením, maximální úspěšnosti bylo dosaženo vyvíjení ve dvou směrech. V prvním systému – chloroform-methanol-30% amoniak-voda (90:54:5:5,5) – bylo dosaženo rozdělení skupin: NL, CL, FA+CM+PE+PC, GS+LPE, PI+SM, PA+PS+LPC, LPS+LPI. Nerozdelené skupiny byly pak separovány v druhém systému - chloroform-methanol-aceton-kyselina octová-voda (60:20:80:20:10) – ve směru kolmém k prvnímu vyvíjení. Jednotlivé skupiny jsou takto separovány v uvedeném pořadí (klesající  $R_f$ ).

**Tenkovrstvá chromatografie s plamenoionizační detekcí** využívá jako SF křemenných tyčinek o průměru cca 1 mm se zakotveným silikagelem, případně aluminou. Možnosti dělení jednotlivých tříd jsou obdobné jako u klasické tenké vrstvy. Princip detekce je obdobný jako v plynové chromatografii, spalováním rozdelených frakcí se zároveň regeneruje tenká vrstva pro další použití. Výhodou uspořádání je malé množství vzorku ( $\mu\text{g}$ ), možnost analyzovat až 10 vzorků současně, možnost postupného vyvíjení a spalování skupin látek; nevýhodou je pracnost nanášení vzorku [11].

**Kapalinová chromatografie na normální fázi s detekcí rozptylu světla.** Jako SF jsou využívány silikagel ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ), alumina ( $-\text{Al}-\text{OH}$ ), aminopropyl ( $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ ), kyanopropyl ( $-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$  a diol ( $-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) [12]. Na rozdíl od RP-HPLC je MF méně polární než SF, a k interakci mezi solutem a SF dochází na polárnější straně molekuly (neesterifikovaná funkční skupina, polární „hlava“ fosfolipidu). Jednotlivé lipidové třídy jsou eluovány podle stoupající polarity – nepolární molekuly jsou zadržovány nejméně. Polarita MF v průběhu separace rovněž stoupá. Rozdelení komplexní směsi NL a PL bylo dosaženo postupným gradientem směsi hexan-tetrahydrofuran, chloroform-isopropylalkohol, isopropylalkohol-voda. Pořadí eluce je obdobné jako na tenké vrstvě: SE, TG, FS, FA, CM, CL, PE, PI, LPE, PS, PC, SM, LPC (13). Systém detekce - ELSD (*Evaporative Light-Scattering Detector*), zvaný též „hmotnostní“ detektor, má před všemi ostatními detektory výhodu citlivosti a univerzálnosti. UV detekce není vhodná, protože lipidy absorbují při krátkých vlnových délkách, kterými bývá detektor limitován, při refraktometrické detekci vadí gradient MF, fluorescenční detektor vyžaduje derivatizaci, elektrochemická detekce je možná jen pro snadno oxidovatelné látky, u plamenoionizačního detektoru je třeba předem odstranit MF a není možné použít pufr [14].

## 12.6 Stanovení molekulárních druhů lipidových tříd

Každá lipidová třída v sobě zahrnuje složitý profil molekul, které se liší zastoupením mastných kyselin a alkoholických složek. Nejsložitější jsou triglyceridy, kde je jedna molekula glycerolu esterifikována se třemi různými mastnými kyselinami; následují ether-lipidy, obsahující dvě mastné kyseliny a ethericky vázaný alkyl či alkenyl, vesměs se 16 a 18 atomy C. Také diglyceridy, které bývají minoritní třídou, obsahují dvě mastné kyseliny a mastné kyseliny obsahují i všechny glycerofosfolipidy. Sterolestery obsahují v molekule jednu mastnou kyselinu, ta však může být esterifikována s různými steroly (v lidské plasmě to jsou vedle cholesterolu rostlinné steroly kampesterol a  $\beta$ -sitosterol). Molekula vosku je složena z mastné kyseliny a alkoholu, které se liší počtem atomů C, větvením řetězce a u mastných kyselin i počtem dvojných vazeb. Stanovit molekulární druhy v intaktní formě znamená určit všechny kombinace složek podle délky a větvení řetězce i počtu dvojných vazeb. Toto stanovení se provádí po předchozí separaci lipidové třídy jako celku některou z preparativních metod, většinou tenkovrstvou chromatografií. Při nesmírné rozmanitosti lipidů však nelze nikdy tyto druhy určit beze zbytku, tj. včetně druhů obsahujících minoritní složky. Většinou dochází k překryvu retenčních parametrů u několika složek. Tento problém lze beze zbytku vyřešit kompletní hydrolyzou lipida a separačním stanovením profilů jednotlivých komponent po příslušné derivatizaci.

Pro stanovení molekulárních druhů všech uvedených tříd je možné využít RP-HPLC ( $C_8$  nebo  $C_{18}$ ), jako MF se podle složení vzorku používá kombinace organických rozpouštědel a vodních roztoků (methanol, acetonitril, isopropylalkohol, dichlormethan, chloroform, hexan, isooctan, kyselina octová, voda). Nejnáročnější je z hlediska analytu stanovení molekulárních druhů fosfolipidů, kde je třeba navíc potlačit interakci pozitivně nabité bazické části se silanoly obsaženými v SF [15]. Srovnatelné svou náročností je i stanovení molekulárních druhů triglyceridů, kde vedle RP-HPLC lze využít i GLC [16]. Složení MF je pro TG obdobně jako pro PL, k detekci je nejvhodnější ELSD, případně UV-detektor (205-210 nm). Plynovou chromatografií na nepolární koloně lze separovat TG podle počtu atomů C v molekule bez ohledu na počet dvojných vazeb v kyselinách. Pro separaci molekulárních druhů reflektujících jednotlivé kyseliny je při GLC využíváno tzv. polarizovatelných kolon, které jsou při teplotě do cca 250 °C nepolární a jejich polarita stoupá s dále se zvyšující teplotou [16].

Lipidy s etherickou vazbou jsou analyzovány obdobně jako předchozí skupiny. V zásadě platí pro obě metodiky, že jednotlivé skupiny jsou eluovány v pořadí alkenylacyl, alkylacyl a diacyl. Je výhodné provést nejprve separaci těchto skupin na normální fázi a potom stanovit profily pomocí RP-HPLC nebo GLC. Stanovení molekulárních druhů PL lze zjednodušit jejich převedením na diglyceridy odštěpením polární skupiny fosfolipasou C. Volnou hydroxylovou skupinu lze maskovat esterifikací s krátkým řetězcem nebo silylací (trimethylsilyether).

Obě metody, GLC i HPLC, mají své specifické výhody i nevýhody. Pro GLC je nastřikované množství v řádu nano- až mikrogramů, pro HPLC to jsou mikro- až miligramy. Plyn představuje ekologickou a dokonale reprodukovatelnou mobilní fázi oproti organickým rozpouštědlům. Nástřik za studena přímo na kolonu (*cold on-column*) v GLC nezpůsobuje ztráty těkavějších složek ve srovnání s nástřikem do vyhřívaného injektoru. Díky moderním aparaturám je zajištěna dobrá reprodukovatelnost teplotního programu při GLC, stejně jako reprodukovatelnost gradientu mobilní fáze u HPLC. Při chromatografickém procesu dochází u obou metod ke kontaminaci SF jednak rozkladnými produkty vzorku, jednak samotnou MF, což vede ke změnám v dělení i kvantitativní odezvy jednotlivých složek. U GLC lze problém řešit použitím předkolony, která je v průběhu ži-

votnosti měněna, případně odříznutím části kolony s viditelnými deposity. U HPLC lze rovněž po určitou dobu vyměňovat předkolony, pak následuje částečná výměna náplně kolony. Plamenový ionizační detektor v GLC poskytuje pro stejná množství složek odpovídající odezvy, ELSD v HPLC poskytuje různé odezvy pro jednotlivé lipidové třídy (krystalické látky mají vyšší odezvu než látky amorfni). U obou metod platí, že kalibrační závislost odezvy detektoru na nastřikovaném množství jednotlivých složek není lineární a je třeba ji pro každý systém individuálně určit a v průběhu životnosti kolony kontrolovat.

## 12.6 Stanovení mastných kyselin, sterolů a alkoholů

V přírodě se vyskytuje velké množství mastných kyselin (FA), jen v lidské plasmě jich bylo identifikováno okolo šedesáti. Mají většinou rovný řetězec se sudým počtem atomů C a dvojnými vazbami v pentadienovém uspořádání, převážně v konfiguraci *cis*; jsou obecně značeny CN:P n-x, kde CN je celkový počet atomů C, P počet dvojných vazeb, x poloha první dvojné vazby od methylového konce. Pro různé metabolické studie jsou obvykle stanovovány pouze ty FA, které v metabolismu mají významnou roli (v biochemických a biomedicinských studiích obvykle pouze sudé, s CN 12 – 22). Analýza profilu FA v separovaných lipidových třídách po jejich hydrolýze a následné derivativaci je nejčastějším stanovením v analýze lipidů, s využitím metod GLC nebo RP-HPLC. Pro GLC jsou FA převáděny nejčastěji na methylestery za alkalické či kyselé katalýzy (např. methoxid sodný, fluorid boritý, acetylchlorid, methyl chloroformát, kyselina sírová); pro HPLC jsou derivativizovány chromofory pro detekci UV (např. fenacylbromid, 2-bromo-2'-acetonafton, 2-nitrofenylhydrazin, dibromoacetofenon, 1-naftylamin) nebo fluorescenční (např. panacylbromid, 9-anthryldiazomethan, 9-(2-hydroxyethyl)-karbazol, 9-bromomethylakridin, 3-bromoacetyl-7-methoxykumarin).

Pro stanovení GLC se používají kolony střední či vysoké polarity (25-30, resp. 50-100 m). U středně polárních kolon je pořadí eluce určeno délkou řetězce a stoupajícím počtem dvojných vazeb ( $RT_{FA\ 18:4n-3} < RT_{FA\ 20:0}$ ). Jejich poměrně vysoký teplotní limit umožňuje i eluci sterolů při analýze sterolesterů, nelze však oddělit izomery v konfiguraci *trans*. Ty mohou být analyzovány na velmi polárních kolonách, které mají nižší teplotní limit, *trans*-izomery jsou eluovány před příslušnými *cis*-izomery, pro stejně CN roste RT s počtem dvojných vazeb, ale pořadí eluce je ovlivněno ještě dalšími faktory ( $RT_{FA\ 20:0} < RT_{FA\ 18:3\ n-3}$ ). Analýzy HPLC mohou být izokratické, nebo gradien-tové, pro MF jsou používány směsi methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, kyselina octová. Pořadí eluce je výrazně odlišné – *cis*-izomery jsou eluovány před odpovídajícími *trans*-izomery, při stejném CN jsou FA eluovány podle klesajícího počtu dvojných vazeb ( $RT_{FA\ 20:5\ n-3} < RT_{FA\ 14:0}$ ).

Závislost odezvy detektoru na analyzovaném množství je lineární v širokém rozmezí koncentrací; obsah složek bývá většinou stanovován jako relativní molární procento, méně často je určován absolutně, metodou vnitřního standardu.

V živé hmotě je obsaženo velké množství různých sterolů, které mají společné sterolové jádro s hydroxylovou skupinou na třetím atomu C a liší se počtem a polohou dvojných vazeb v jádru i délku a počtem dvojných vazeb v postranním řetězci. Pro jejich separaci lze využít TLC s densitometrickou či fluorescenční detekcí, HPLC na normální i reverzní fázi s UV detekcí, a GLC s nepolární i středně polární kolonou s plamenoionizační detekcí. Mobilní fáze pro TLC i HPLC je nevodná s využitím kombinací rozpouštědel volených podle charakteru analytu (chloroform, dichlormethan, methanol, isopropylalkohol, acetonitril, hexan, isooctan, diethylether, ethylacetát, kyselina octová). Metodami TLC a HPLC jsou steroly stanovovány obvykle bez derivativace, pro

GLC je výhodnější pracovat s acetáty nebo trimethylsilylethery. Podobně jako u FA je závislost odezvy detektoru na analyzovaném množství lineární a jednotlivé složky jsou kvantifikovány metodou vnitřního standardu na základě kalibrace systému.

Alkoholy jsou součástí vosků a rovněž jejich zastoupení v biologickém materiálu je značně rozmanité. Vosky jsou obsaženy např. v kůži a srsti živočichů, v sekretech ptáků a hmyzu (včelí vosk) a v listech rostlin. Délka řetězce se může pohybovat mezi 8 a 32 atomy C, řetězec je rovný nebo větvený, počet hydroxylových skupin je jedna až tři. Pro chromatografické stanovení jednotlivých složek platí obdobné zásady jako pro steroly co do výběru metod, derivativizace i kvantifikace.

## 12.7 Složené lipidy

Složené lipidy jsou sfingoglykolipidy, které dělíme na cerebrosidy (ceramid-monosacharidy), sulfatidy (ceramid-monosacharid-sulfáty), globosidy (neutrální ceramid-oligosacharidy) a gangliosidy (kyselé ceramid-oligosacharidy obsahující 1 až 6 molekul kyseliny neuraminové). Základ molekuly tvoří ceramid – ester aminoalkoholu sfingosinu nebo dihydrosfingosinu (CN18-20) a nasycené mastné kyseliny, event. hydroxykyseliny (CN16-24). Jejich stanovení v krevním séru novorozence nebo v plodové vodě umožňuje diagnostiku vrozených metabolických poruch (např. choroba Tay-Sachsova, Niemann-Pickova, Gaucherova, Fabryova, Sandhofova, Krabeova).

Pro analysu v intaktní podobě se dnes využívá HPLC na normální i reverzní fázi s detekcí UV (benzoyl-deriváty), fluorescenční nebo ELSD [19]; před 20-30 lety to byla i sloupcová chromatografie (adsorpční na silikagelu nebo florisolu a iontovýměnná na DEAE-celulose, DEAE-Sephadexu nebo DEAE-Sepharose), dále tenkovrstvá chromatografie na silikagelu a dokonce i plynová chromatografie na nepolární koloně, kterou byly možno stanovit cerebrosidy po derivativizaci na trimethylsilylethery [20]. Jako MF pro HPLC slouží opět různé kombinace rozpouštědel s malým množstvím vody nebo vodních roztoků (methanol, isopropylalkohol, acetonitril, chloroform, triethanolamin, hexan, tetrahydrofuran, dioxan, ethylacetát, kyselina mravenčí). Pro kvantifikaci je třeba počítat s nelineárními kalibračními závislostmi.

## Literatura

1. R. M. Krauss, D. J. Burke: *J. Lipid Res.* 23, 1982, 97-104.
2. R. M. Carroll, L. L. Rudel: *J. Lipid Res.* 24, 1983, 200-207.
3. Y. Hirowatari, H. Yoshida, H. Kurosawa, K. Doumitu, N. Tada: *J. Lipid Res.* 44, 2003, 1404-1412.
4. E. Trezzi, C. Calvi, P. Roma, A. L. Catapano: *J. Lipid Res.* 24, 1983, 790-795.
5. J. Macášek, M. Jirkovská, E. Tvrzická, B. Staňková, M. Vecka: *Proceedings of the 6. International Conference on Stereology, Spatial Statistics and Stochastic Geometry, Prague, June 26-29, 2006*, pp. 423-28.
6. M. Okazaki, M. Kinoshita, I. Hara: *J. Chromatogr.* 430, 1988, 135-142.
7. T. A. Hughes, M. A. Moore, P. Neame, M. F. Medley, B. H. Chuang: *J. Lipid res.* 29, 1988, 363-376.
8. H. Mezdour, V. Clavey, I. Kora, M. Koffigan, A. Barkia, J.-C. Fruchart: *J. Chromatogr.* 414, 1987, 35-45.
9. H. Campos, D. Perlov, C. Khoo, F. M. Sacks: *J. Lipid Res.* 42, 2001, 1239-49.
10. I. J. Cartwright: *Methods Mol. Biol.* 19, 1993, 153-67.
11. R. G. Ackman: *Methods Enzymol.* 72, 1981, 205-52.

12. U. D. Neue: HPLC Columns: Theory, Technology and Practice, pp. 164-182, Wiley VCH, New York 1997.
13. W. W. Christie: *J. Lipid Res.* 26, 1985, 507-12.
14. R. A. Moreau: The evaporative light-scattering detector as a tool for the analysis of lipids by HPLC, in *HPLC of Acyl Lipids*, pp. 97-100, HNB Publishing, New York 2005.
15. J. T. Lin: HPLC separations of the intact molecular species of some lipid classes, in *HPLC of Acyl Lipids*, pp. 373-396, HNB Publishing, New York 2005.
16. A. Kuksis: GLC and HPLC of neutral glycerolipids, in *Lipid Chromatographic Analaysis*, pp. 177-222, Marcel Dekker Inc., New York 1994.
17. E. Tvrzická, P. Mareš: Gas-liquid chromatography of neutral lipids, in *Lipid Chromatographic Analaysis*, pp. 103-176, Marcel Dekker Inc., New York 1994.
18. E. Tvrzická, M. Vecka, B. Staňková, A. Žák: *Anal. Chim. Acta* 465, 2002, 337-350.
19. M. Yamane: HPLC and LC-MS of Sphingolipids, in *HPLC of Acyl Lipids*, pp. 445-452, HNB Publishing, New York 2005.
20. A. Suzuki, T. Yamakawa: Sphingoglycolipids and sphingophospholipids, in *CRC Handbook of Chromatography: Lipids*, Vol. II, pp. 1-63, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 1984.

# **13. EXTRAKCE STLAČENÝMI TEKUTINAMI K PŘÍPRAVĚ ORGANICKÝCH VZORKŮ PRO ANALÝZU**

*doc. RNDr. Michal Roth, CSc.*

Ústav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 61142 Brno

[roth@iach.cz](mailto:roth@iach.cz)

## **13.1 Úvod**

Extrakční techniky jsou důležitou částí okruhu postupů, souhrnně označovaných jako “sample treatment” a sloužících k převodu analyzovaných látek z matrice vzorku do formy slučitelné s následnou separací a kvantifikací analytů<sup>1</sup>, která se často provádí chromatografickými metodami. Soudobá tendence odklonu od používání organických rozpouštědel, vedená ohledy na životní prostředí a snahou o trvale udržitelný rozvoj, se projevuje i v této oblasti. Extraktční techniky prováděné za zvýšených tlaků, jako je superkritická fluidní extrakce, extrakce stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla nebo extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou, vesměs splňují požadavek eliminace nebo alespoň minimalizace spotřeby organických rozpouštědel. Všeobecně lze říci, že vývoj v této oblasti extraktčních technik má v posledních letech spíše evoluční než revoluční charakter. Okruhy využití vysokotlakých extrakcí samozřejmě nejsou omezeny na analytickou chemii, protože tyto techniky nacházejí uplatnění i v poloprovozním, případně provozním měřítku. To platí především o superkritické fluidní extrakci, ale v poslední době stále více i o extrakci stlačenou horkou vodou, u které se funkce vody jako pouhého extraktčního rozpouštědla někdy prolíná s její rolí jako reakčního média nebo dokonce reaktantu. Přístroje pro extrakce stlačenými tekutinami jsou kromě svého původního analytického účelu bez velkých úprav využitelné i jinak, především k měření důležitých fyzikálně chemických údajů (např. rozpustnosti), které se jinými postupy zjišťují jen obtížně a přitom mohou být velmi cenné pro návrhy extraktčních procesů v provozním měřítku.

V dalším textu budou stručně probrány specifické rysy, klady a zápory jednotlivých metod, které budou v přednášce doplněny konkrétními příklady z činnosti Ústavu analytické chemie AV ČR. Literární prameny zmíněné v závěru tohoto textu uvádějí především aktuální přehledové články<sup>2-7</sup>, ve kterých může případný zájemce najít podrobnější informace. Výběr dvou původních prací<sup>8,9</sup> byl velmi subjektivní a poplatný autorovu užšímu zaměření, což snad lze zčásti omluvit rozsahem tématu extrakcí stlačenými tekutinami. V této souvislosti se jeví účelně uvést počty publikací, týkajících se jednotlivých extraktčních technik, a to jak pro čtenářovu představu a srovnání s jinými oblastmi analytické chemie, tak i k naznačení korespondence mezi termíny užívanými v anglicky psané literatuře a jejich českými protějšky užívanými v tomto textu. Tab. 13.1 uvádí počty publikací podle databáze Web of Science® za období od roku 1980 do aktualizace ze dne 9. 6. 2006.

Poměrně vysoký počet záznamů u superkritické fluidní extrakce zahrnuje i veškeré aplikace této techniky mimo sféru analytické chemie. Techniky popsané v tab. 13.1 zkratkami PFE, PLE, PSE a ASE označují z věcného hlediska totéž, tedy extrakci stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla. Podobná záměnnost termínů platí do jisté míry i u PHWE a SubWE, i když termín „extrakce subkritickou vodou“ bývá někdy používán pro extrakce za teplot blízkých kritické teplotě vody (374 °C), zatímco označení „extrakce stlačenou horkou vodou“ se obvykle vztahuje k extrakcím za relativně nižších teplot. Nízký počet

záznamů u extrakce **superkritickou** vodou není nijak překvapivý, protože za poměrně extrémních teplot nad kritickým bodem už voda ve vztahu k organickým látkám většinou není pouhým inertním rozpouštědlem, ale reakčním činidlem.

**Tab. 13.1:** Počty publikací o jednotlivých extrakčních technikách podle Web of Science® (1980 – 9.6.2006).

Zkratka	Anglický název	Český název	Počet zá-znamů
SFE	supercritical fluid extraction	superkritická fluidní extrakce	3770
PFE	pressurized fluid extraction	extrakce stlačenými kapalnými	202
PLE	pressurized liquid extraction	organickými rozpouštědly za teplot	260
PSE	pressurized solvent extraction	nad normálním bodem varu roz-	187
ASE	accelerated solvent extraction	pouštědla	465
PHWE	pressurized hot water extraction	extrakce stlačenou horkou vodou	46
SubWE	subcritical water extraction	extrakce subkritickou vodou	106
-	supercritical water extraction	extrakce superkritickou vodou	17

## 13.2 Superkritická fluidní extrakce

Nejcharakterističtějším rysem superkritické fluidní extrakce (SFE) je proměnlivá solvatační síla rozpouštědla, kterou lze v širokých mezích „ladit“ změnami pracovní teploty a tlaku. Zdaleka nejpoužívanějším rozpouštědlem pro SFE je oxid uhličitý ( $t_c = 30.98\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_c = 7.38\text{ MPa}$ ). Zhruba lze říci, že solvatační schopnost superkritického  $\text{CO}_2$  za vyšších hustot odpovídá přibližně hexanu a po expanzi na normální tlak klesne efektivně k nule. Při expanzi fluidního roztoku v superkritickém  $\text{CO}_2$  tedy rozpuštěné organické látky vytvářejí shluky molekul, agregáty a částice, a jde-li o látky s dostatečně vysokým bodem tání, tvoří se práškovitá tuhá fáze. V procesních a preparativních aplikacích má tato vlastnost SFE značnou hodnotu, a to především ze dvou důvodů:

- změnami podmínek při expanzi lze do určité míry ovládat velikost a morfologii vznikajících částic, což má aplikační význam (např. při mikronizaci),
- takto vzniklé částice neobsahují žádná rezidua těkavých organických rozpouštědel, což je důležité např. ve farmaceutických a potravinářských aplikacích.

Z pohledu analytického chemika je ovšem tvorba aggregátů nebo částic při expanzi fluidního roztoku spíše zdrojem potíží. Při použití plamenového ionizačního detektoru v superkritické fluidní chromatografii, kdy stlačený  $\text{CO}_2$  z kolony vstupuje do restriktoru a expanduje do vodíkového plamene, vede shlukování molekul analytu k typickým záškubům (“spikes”) v časovém záznamu odezvy detektoru a k faktické nemožnosti určit skutečnou plochu píku. V analytické SFE přispívá aggregace molekul analytů v expandujícím  $\text{CO}_2$  k potížím s kvantitativním záhytem analytů (“analyte trapping”) před jejich (zpravidla chromatografickou) separací a kvantifikací. Tvorby molekulárních aggregátů analytů bylo naopak s výhodou využito v návrhu sofistikované techniky<sup>8</sup> záhytu analytů s použitím horké páry organického rozpouštědla; tato technika využívá kondenzace organického rozpouštědla na čisticích analytů v expandující směsi, což vede k téměř kvantitativnímu záhytu (převodu) do organického rozpouštědla, čímž tento postup překonává dříve popsané způsoby záhytu, zejména probublávání expandujícího  $\text{CO}_2$  vrstvou organického rozpouštědla.

I když analytické aplikace superkritické fluidní extrakce byly původně soustředěny na tuhé vzorky (zejména půd, sedimentů a dalších vzorků z oblasti životního prostředí), SFE je využitelná

i k analýzám kapalných, především vodních vzorků, protože vzájemná rozpustnost vody a superkritického CO<sub>2</sub> je poměrně nízká. Obr. 13.1 a 13.2 ilustrují přístrojové sestavy pro SFE tuhých a vodních vzorků, vyvinuté v Ústavu analytické chemie AV ČR, a v přednášce bude zmíněno využití přímé kontinuální SFE k analýze vín.



Obr. 13.1: Extraktor pro SFE tuhých vzorků



Obr. 2. Přístrojová sestava pro SFE kapalných vzorků

Pokud jde o uplatnění SFE v analytické chemii, lze říci, že se SFE v posledních letech dostala poněkud „do stínu“ aplikací extrakčních technik, které využívají stlačených kapalných rozpouštědel. Tento stav má řadu příčin. Jednou z nich je skutečnost, že nejpoužívanější rozpouštědlo pro SFE, oxid uhličitý, není pro svůj nepolární charakter vhodné pro zpracování vzorků zajímavých z pohledu biochemie a souvisejících aplikovaných oborů. Zájmové látky z této významné a aktuální oblasti jsou zpravidla vysoce polární, takže omezená účinnost extrakcí čistým superkritickým oxidem uhličitým zde nijak nepřekvapuje. Použití polárních příasad k CO<sub>2</sub>, tzv. modifikátorů (např. vody nebo methanolu), může sice být v určitých situacích schůdným řešením, získané zvýšení účinnosti extrakce však často neodpovídá vynaloženému experimentálnímu úsilí. Další příčinou klesajícího počtu aplikací SFE v analytické chemii mohou být některé „nepřijemné“ vlastnosti látek ve fluidním stavu, především kombinace vysokého tlaku a vysoké stlačitelnosti média, protože personál analytických laboratoří většinou není školen pro práci za těchto podmínek.

### **13.3 Extrakce stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla (“pressurized fluid extraction”, PFE)**

Tato extrakční technika je výsledkem snahy zlepšit některé charakteristiky kapalinových extrakcí za nízkých teplot a tlaků, především pokud jde o rychlosť extrakce (a tedy zvládnutelný počet vzorků za časovou jednotku), usnadnění automatizace a snížení spotřeby rozpouštědel. Ve srovnání s klasickými postupy kapalinové extrakce za nízkých tlaků (např. extrakce podle Soxhleta) tedy PFE nabízí některé důležité výhody:

Zvýšená teplota při extrakci zvyšuje těkavost analyzovaných látek, a tím zpravidla i jejich rozpustnost v použitém rozpouštědle. Kromě toho zvýšená teplota usnadňuje uvolnění analyzovaných látek z matrice vzorku díky urychlení transportních procesů a zeslabení interakcí analyzovaných látek s matricí. Kombinace všech těchto efektů vede ke zrychlení extrakce s rostoucí teplotou. To se dále projevuje celkovým snížením spotřeby rozpouštědel, nižšími náklady na jejich pořízení a likvidaci a nižší zátěží prostředí těkavými organickými rozpouštědly. V případě použití směsných rozpouštědel umožňuje PFE jednoznačnou kontrolu složení rozpouštědla, protože na rozdíl od Soxhletovy extrakce nezahrnuje destilaci a tedy ani žádné změny složení rozpouštědla. Tato výhoda PFE není natolik „akademická“, jak by se snad na první pohled mohlo zdát, protože v aplikacích PFE se směsných rozpouštědel využívá poměrně často. Relativní nevýhodou PFE proti nízkotlaké kapalinové extrakci naopak může být vyšší pořizovací cena zařízení, která je ovšem postupně kompenzována sníženými náklady na rozpouštědla.

Na rozdíl od superkritické fluidní extrakce je PFE využívána výlučně k extrakcím tuhých vzorků. Obr. 13.3 ukazuje jeden z modelů laboratorních extraktorů pro PFE a v přednášce budou podány příklady využití této extrakční techniky při stanovení obsahu nutričně významných látek v rostlinných materiálech.



**Obr. 13.3:** Přístroj pro extrakce stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla (model s jedinou extrakční celou)

### 13.4 Extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou

Extrakce vodou za normálních podmínek ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,1\text{ MPa}$ ) je v povědomí chemiků spojena s rozpouštěním elektrolytů (např. anorganických solí) nebo polárních organických nenelektrolytů (např. cukru). Okruh typů látek, které je možno vodou účinně extrahovat, je však obecně širší a je velmi závislý na použité teplotě a tlaku. Je tomu tak proto, že veličiny, které určují solvatační schopnosti vody, zejména rozpustnostní parametr, relativní permitivita („dielektrická konstanta“) a iontový produkt, se s teplotou a tlakem velmi výrazně mění; několik ilustrativních údajů uvádí tab. 13.2. Za „extrémních“ teplot a tlaků nad příslušnými kritickými veličinami vody jsou proto iontové soli (např. NaCl) ve vodě jen velmi málo rozpustné, zatímco benzen je s vodou plně mísitelný. Kromě zřejmé skutečnosti, že je voda „nejzelenějším“ rozpouštědlem, je tedy i rozpouštědlem „nejladitelnějším“ ve smyslu dosažitelných změn solvatačních schopností s teplotou a tlakem. I když superkritická voda je využívána spíše jako reakční prostředí (zejména pro „supercritical water oxidation“) než jako pouhé rozpouštědlo, je velmi důležité si uvědomit, že „prostor solvatačních schopností“ mezi normálními podmínkami a superkritickou oblastí je spojitý. Netypické solvatační schopnosti, které se plně manifestují v superkritických stavech, se proto částečně projevují i u stlačené kapalné vody za teplot mezi normálním bodem varu ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a kritickým bodem ( $374\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), tedy v pracovní oblasti extrakčních technik označených v tab. 13.1 jako PHWE a SubWE. Slovo „stlačené“ v předešlé větě zdůrazňuje, že má-li voda zůstat v kapalném stavu, musí být pracovní tlak při extrakci vyšší než tenze (tlak) nasycených par vody za příslušné teploty.

**Tab. 13.2:** Rozpustnostní parametr, relativní permitivita a iontový produkt vody v závislosti na teplotě a tlaku; iontový součin je vyjádřen součinem molalit, ( $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>2</sup>

Teplota / °C	Tlak / MPa	Rozpustnostní parametr / $\text{MPa}^{1/2}$	Relativní permitivita	Iontový součin / ( $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) <sup>2</sup>
25	0,1	47,9	78,4	$1,01 \times 10^{-14}$
100	0,1015	44,8	55,4	$5,43 \times 10^{-13}$
200	5	39,7	34,9	$5,38 \times 10^{-12}$
300	10	32,6	20,4	$4,16 \times 10^{-12}$
350	20	27,7	14,1	$9,46 \times 10^{-13}$
400	30	17,9	5,94	$1,59 \times 10^{-15}$
500	15	2,54	1,20	$7,11 \times 10^{-27}$
500	30	5,96	1,68	$1,18 \times 10^{-21}$

Po uvedení<sup>9</sup> PHWE jako metody přípravy vzorku v roce 1994 se další aplikace zabývaly především extrakcemi organických polutantů (zejména polycyklických aromatických uhlovodíků, polychlorovaných bifenylů, fenolů, pesticidů a herbicidů) z tuhých vzorků z oblasti životního prostředí (půdy, sedimenty, tuhé aerosoly). Tuto „klasickou“ oblast využití PHWE postupně doplnily extrakce vybraných bioaktivních látek a silic z rostlinných materiálů; podrobnosti o těchto aplikacích PHWE lze nalézt v několika přehledových článcích.<sup>5-7</sup> Možnost využití stlačené horké vody k extrakci biologických materiálů je samozřejmě vždy podmíněna dostatečnou teplotní stabilitou příslušných cílových látek a jejich odolností vůči hydrolyze za podmínek extrakce. Katalytická aktivita některých kovů obsažených v konstrukčních materiálech extrakční cely (nerezová ocel, speciální slitiny) může vést k nežádoucím chemickým změnám extrahovaných látek. Kromě toho je ve všech aplikacích PHWE vždy nezbytné vodu před extrakcí důkladně zbavit rozpuštěného vzdušného kyslíku.

Analytické aplikace PHWE poskytují více či méně zředěné vodné extrakty. Pokud se k následné separaci a stanovení extrahovaných analytů použije separačních metod pracujících s vodním prostředím (např. HPLC), nepředstavuje přítomnost vody v dávkovaném vzorku žádné komplikace. V případě použití plynové chromatografie je ovšem obsah vody ve vzorku nežádoucí a před plynově chromatografickou analýzou je nutný další krok, např. převod analytů z vodného roztoku do organického rozpouštědla nebo SPME („solid phase microextraction“) analytů z vodného roztoku následovaná jejich termální desorpce přímo do nástříkového portu chromatografu. Posledně uvedený postup zcela eliminuje použití organických rozpouštědel.

Vliv teploty na solvatační schopnosti vody bude v přednášce ilustrován na příkladu měření vodních rozpustností polycyklických aromatických uhlovodíků, která byla provedena v Ústavu analytické chemie AV ČR. Obr. 13.4 ukazuje příslušnou přístrojovou sestavu.



**Obr. 13.4:** Přístrojová sestava pro měření rozpustnosti tuhých látek ve stlačené horké vodě

## Literatura

- (1) Smith, R. M. Before the Injection – Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 3–27.
- (2) Raynie, D. E. Modern Extraction Techniques. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4659–4664.
- (3) Henry, M. C.; Yonker, C. R. Supercritical Fluid Chromatography, Pressurized Liquid Extraction, and Supercritical Fluid Extraction. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3909–3915.
- (4) Raynie, D. E. Modern Extraction Techniques. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3997–4003.
- (5) Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J. Pressurized Liquid Extraction in the Analysis of Food and Biological Samples. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1089*, 1–17.
- (6) Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-By-Products, Algae and Microalgae. A Review. *Food Chemistry* **2006**, *98*, 136–148.
- (7) Ong, E. S.; Cheong, J. S. H.; Goh, D. Pressurized Hot Water Extraction of Bioactive or Marker Compounds in Botanicals and Medicinal Plant Materials. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 92–102.
- (8) Vejrosta, J.; Karásek, P.; Planeta, J. Analyte Collection in Off-Line Supercritical Fluid Extraction. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 905–909.
- (9) Hawthorne, S. B.; Yang, Y.; Miller, D. J. Extraction of Organic Pollutants from Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2912–2920.