

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

O qf gt p||ugr ct c p||vgej plm{

Rcxgn'E qwhcn
''''R H'WM'Rtcj c



Obsah

1. Úvod

1.1. Miniaturizace v analytické chemii

1.2. Přednosti a nevýhody kapilárních technik

1.2.1. Kapilární zónová elektroforéza

1.2.2. Kapilární kapalinová chromatografie

1.2.3. Nanokapalinová chromatografie na čipu

2. Použití miniaturizovaných separačních technik

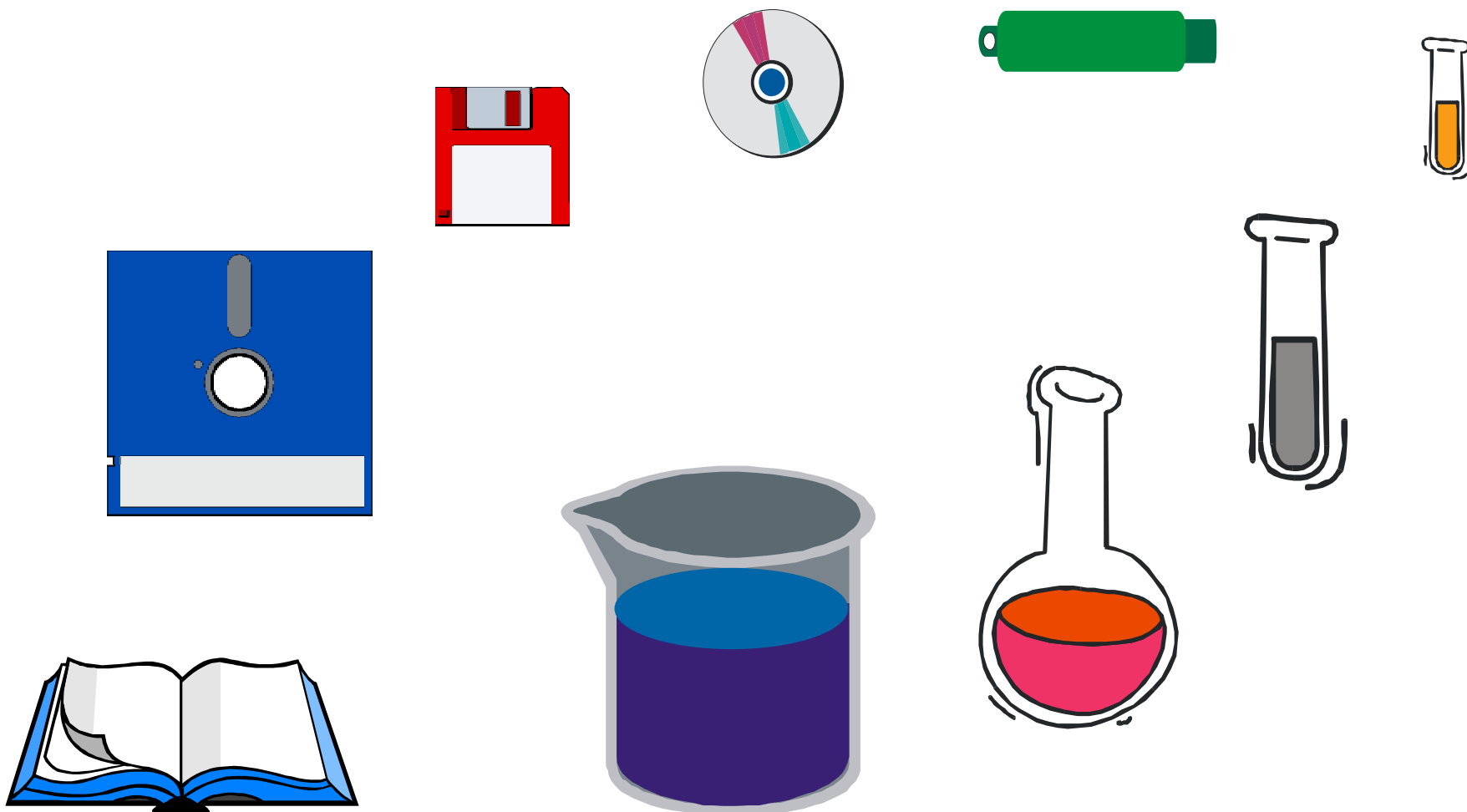
2.1. NanoLC-ESI-MS/MS

2.2. Srovnání CZE a CLC

2.3. Monolitické kolony pro CLC

Miniaturizace

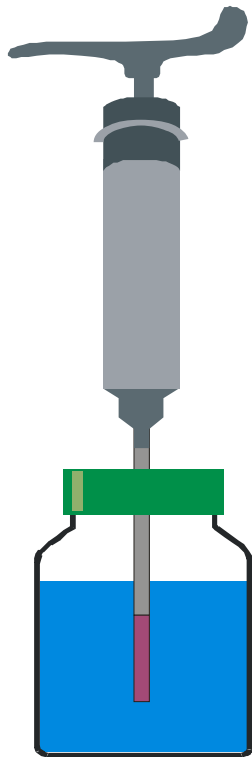
významný trend dnešní doby



Miniaturizace v separačních metodách

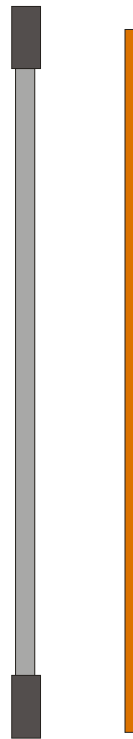
Mikroextrakce
na tuhé fázi

SPME



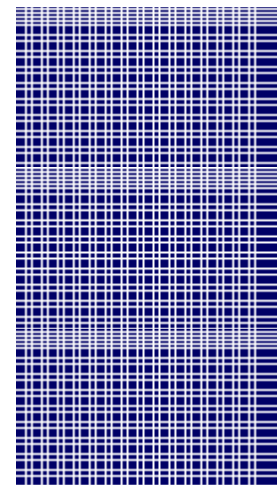
Kapilární
separační
techniky

CLC, CZE a CEC



Tištěná
mikropole

Microarrays



Čipy

Lab-on-chip



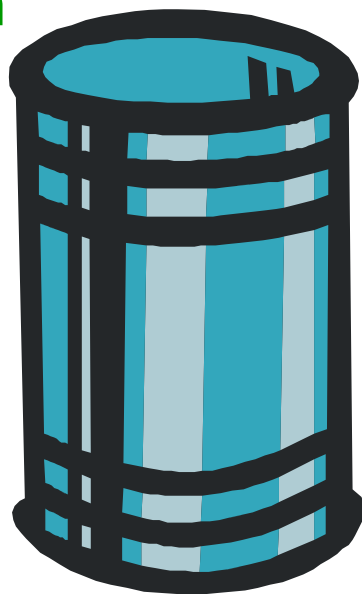
Proč zmenšujeme separační prostor?

Vysokoúčinná
kapalinová
chromatografie

HPLC

1 mL/min

525 L



Kapilární
kapalinová
chromatografie

CLC

3 μ L/min

1,6 L



Nano
kapalinová
chromatografie

nanoLC

0,3 μ L/min

158 mL



Požadavky analytické praxe

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

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

miniaturizace

Kapilární separační metody používané v analytické chemii

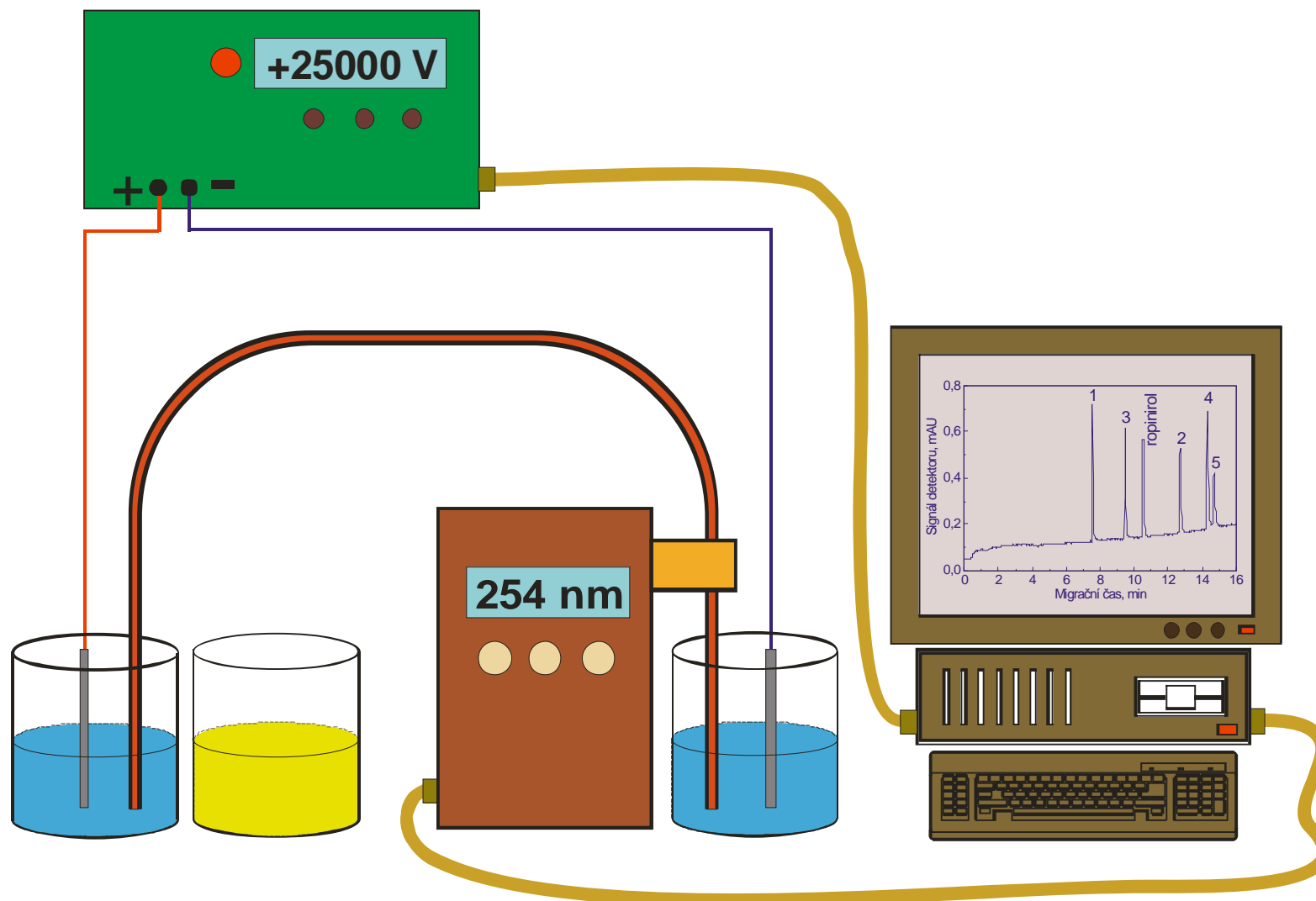
1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární kapalinová chromatografie (CLC)
3. Kapilární elektrochromatografie (CEC)
4. Kapilární plynová chromatografie (CGC)
5. Nanokapalinové mikrofluidní techniky realizované na čipu v plošném uspořádání (Lab-on-a-chip)

Problémy miniaturizace

vyplývají z principu separačních metod a technických možností doposud známých technologií

1. instrumentální náročnost
2. zmenšení průtoku eluentu a detekční cely
3. nestabilita elektroosmózy u CZE
4. reprodukovatelnost dávkování malých objemů
5. plnění kolon pro CLC
6. frity u kolon pro CLC

Kapilární zónová elektroforéza



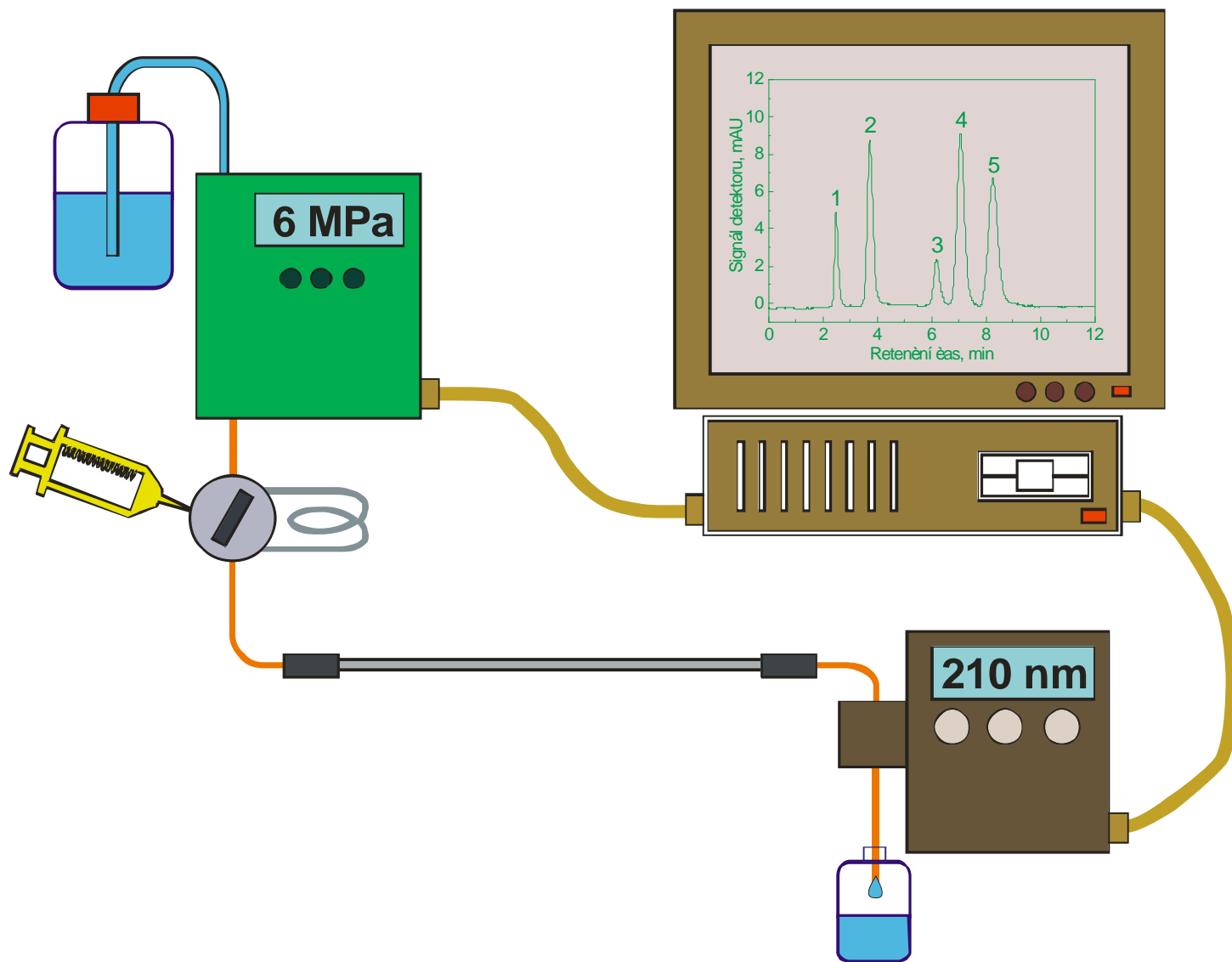
Přednosti a nevýhody CZE

vhodná pro látky iontové povahy
(rozdílné elektroforetické pohyblivosti)

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

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

Kapilární kapalinová chromatografie

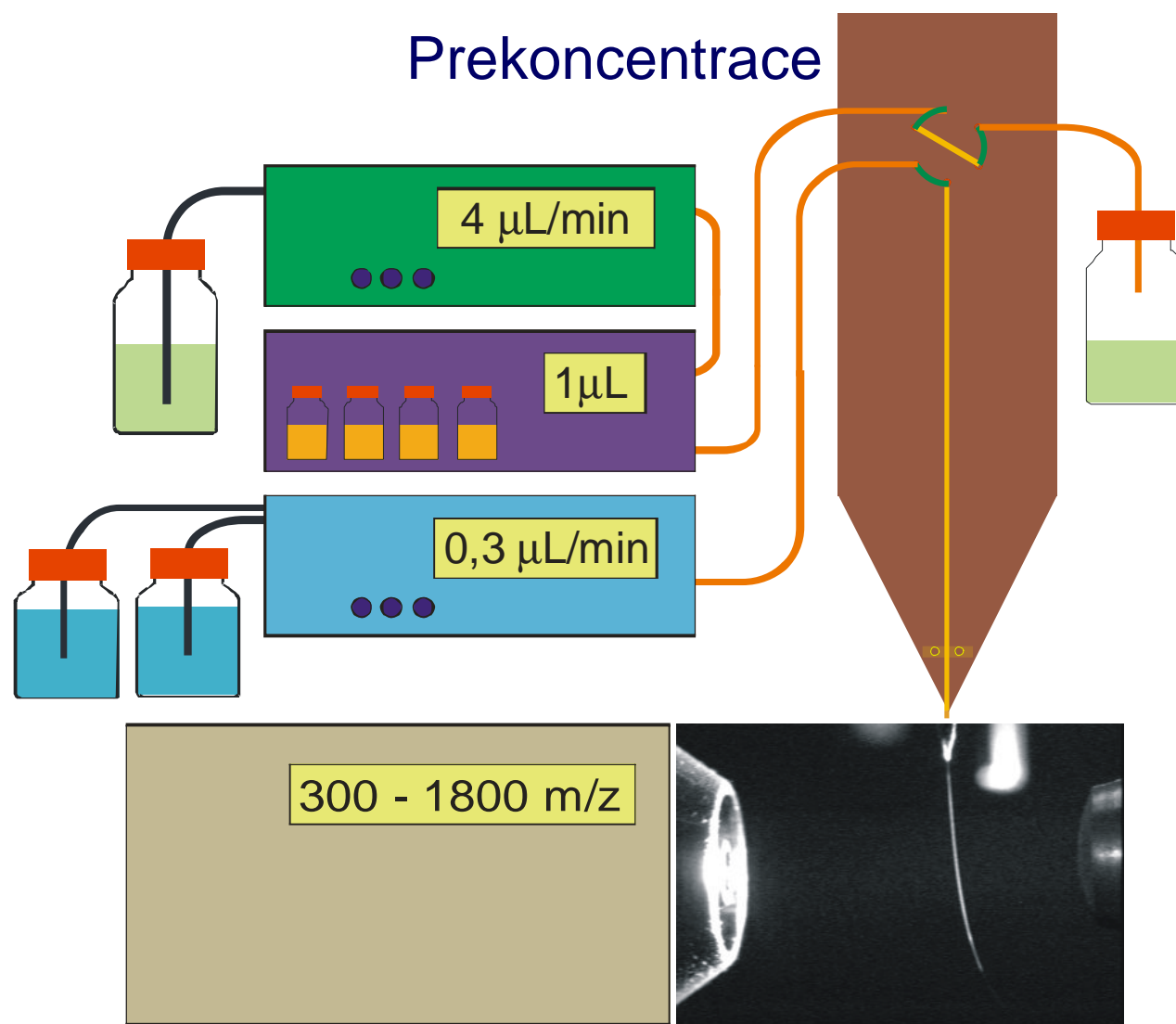


Přednosti a nevýhody CLC

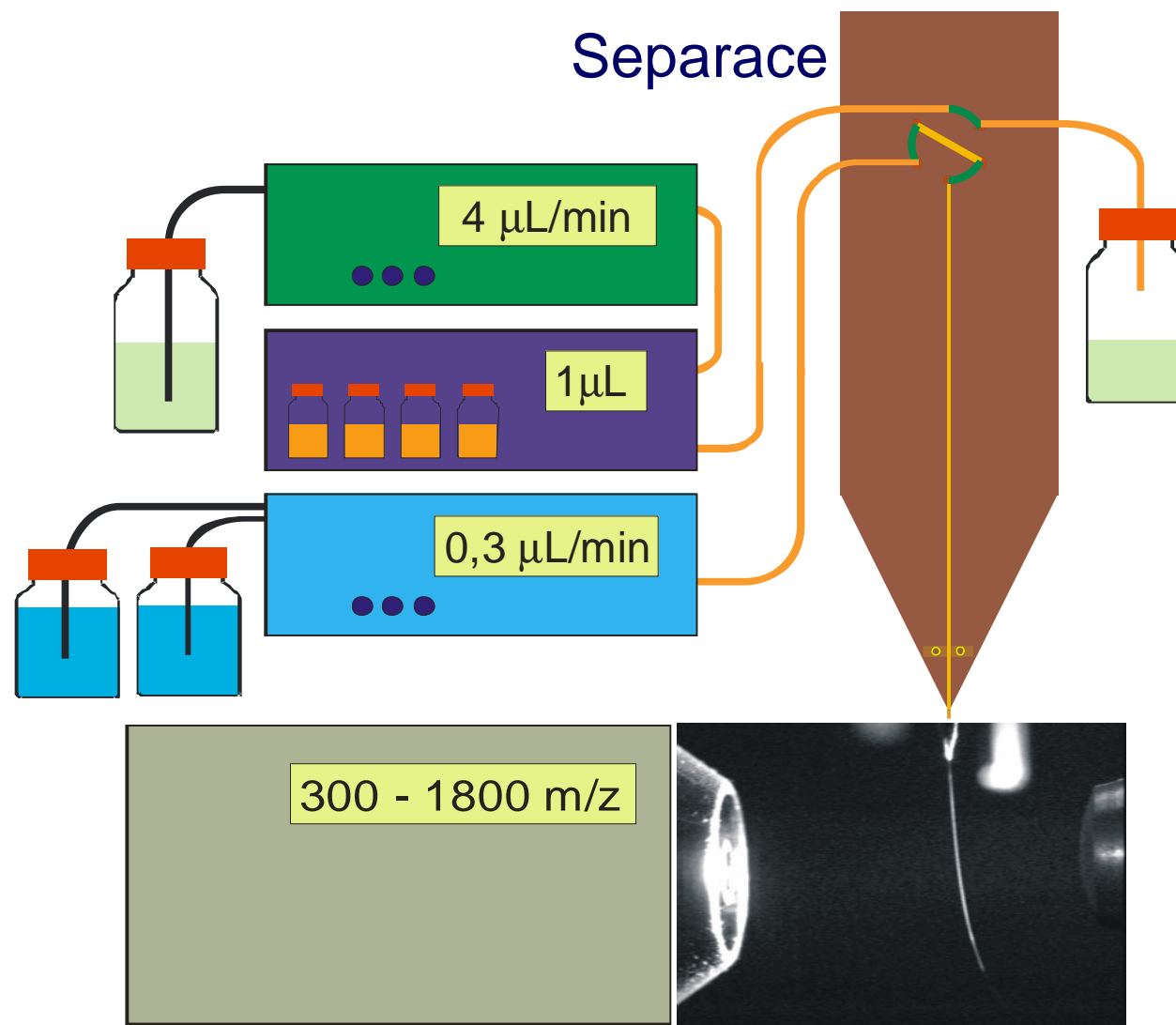
vhodná pro neutrální látky a ionty
(rozdílná distribuce mezi mobilní a stacionární fází)

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

Nanokapalinová chromatografie na čipu



Nanokapalinová chromatografie na čipu



Čip a jeho příslušenství



Přednosti a nevýhody nanoLC na čipu

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

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

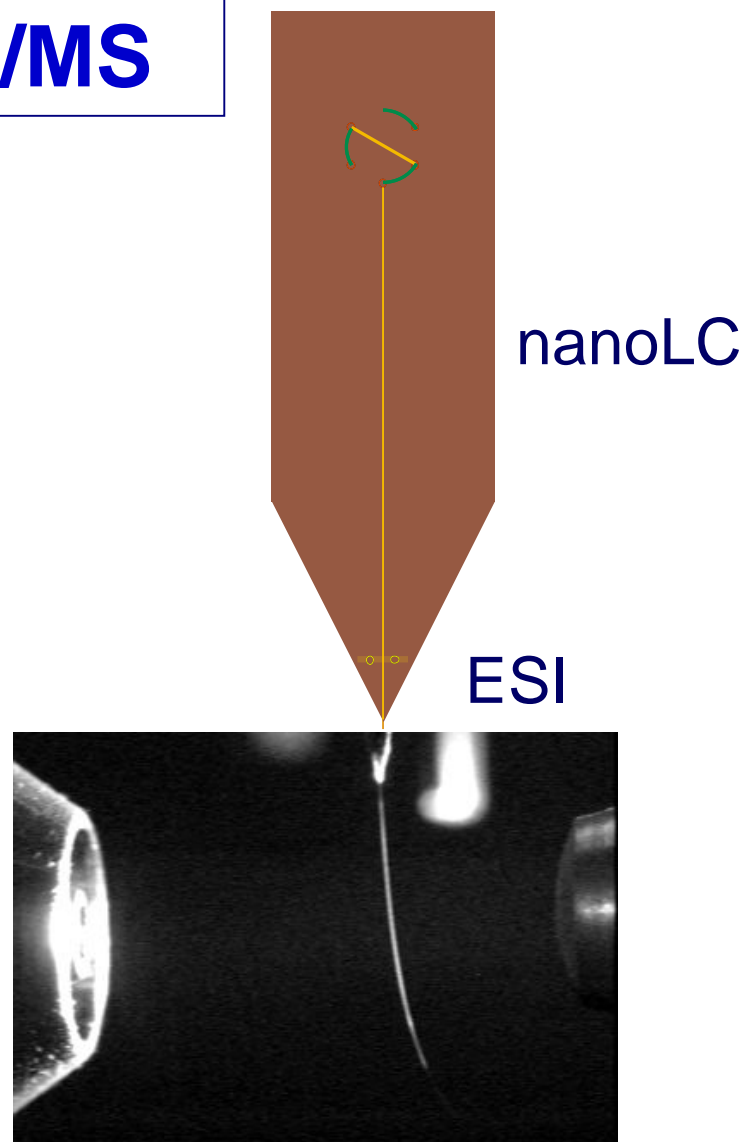
1. instrumentální náročnost na pumpy
2. instrumentální náročnost na dávkovací ventil
3. obtížná výroba čipu ve vlastní laboratoři

Identifikace bílkovin pomocí nanoLC-ESI-MS/MS

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

proteomika

MS/MS

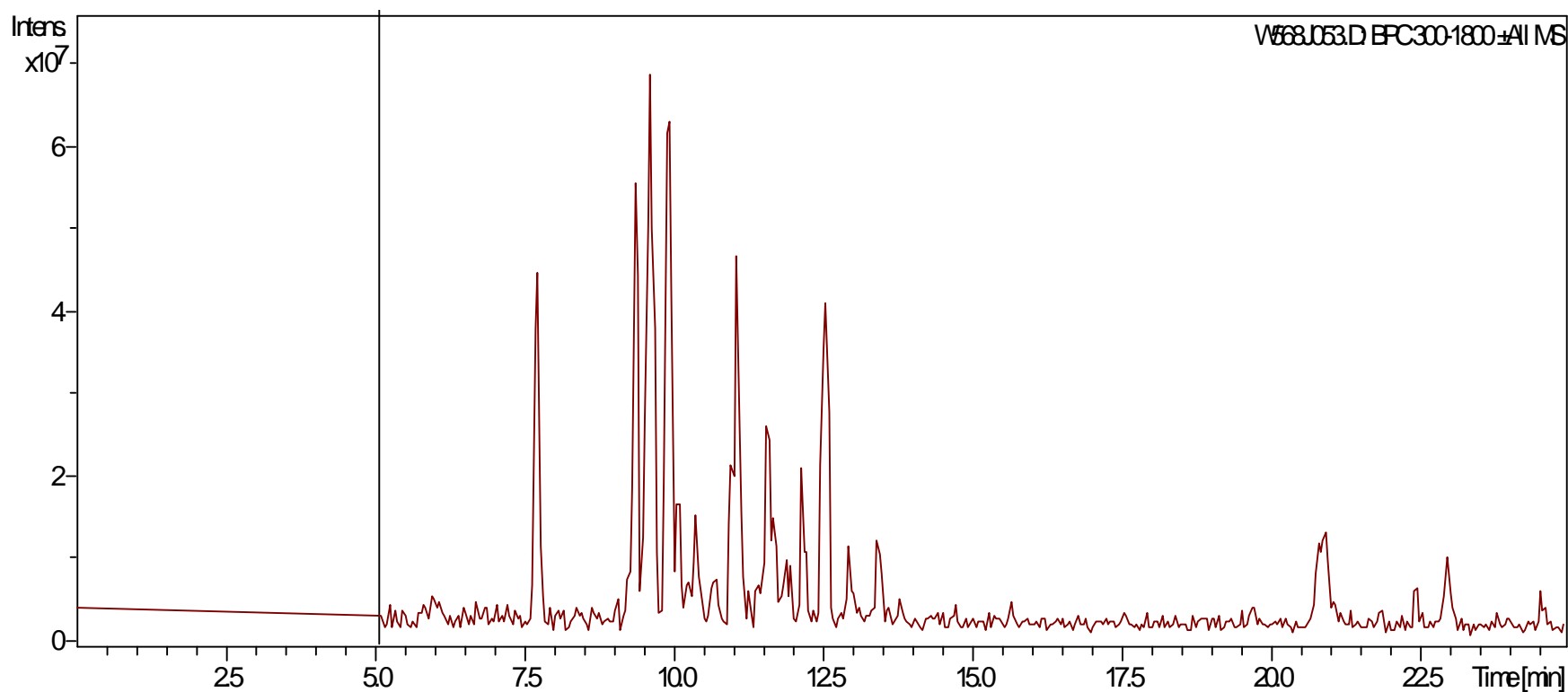


Chromatogram

Identifikováno 10 fmol hovězího α -S1 kaseinu.

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

MKLLILTCLVAVALARPK**HPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEK**VNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESI
SSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERY**LGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYF**
Y**PELFR**QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW



Štěpení bílkovin trypsinem

Trypsin je bílkovina o $M_r = 23300$.

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

hovězí α -S1 kasein

MKLLILTCLVAVALARPK**HPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNE**
LSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSER**YLG**
Y**LEQLLR**RLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE**GIHAQQKEPMIGVNQELAYFY**
PE
LFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

YLGYLEQLLR

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

Fragmentace peptidu v MS

Kolizí indukovaná disociace (CID)

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



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

Experimentální podmínky

kapalinová chromatografie

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

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

průtok nanopumpy: 300 nL/min

průtok kapilární pumpy: 4 μ L/min eluentu A

objem vzorku: 1 μ L, prekoncentrace vzorku: 5 minut

hmotnostní spektrometrie

sušící plyn: N₂, průtok: 2,5 L/min, teplota 230 °C

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

NanoLC-ESI-MS/MS

**je vynikajícím analytickým nástrojem
pro identifikaci
bílkovin v proteomice
ale i menších organických molekul,
jako např. metabolických produktů
léčiv ve farmacii.**

Nanokapalinová nebo kapilární kapalinová chromatografie

	Průměr kolony
Mikrokapalinová chromatografie	1 mm
Kapilární kapalinová chromatografie	300 μm
Nanokapalinová chromatografie	75 μm

Vhodná detekce

CLC	UV-VIS, CCD, ED
NanoLC	MS, LIF, CCD, ED

CZE

látky iontové povahy
rozdílné elektroforetické pohyblivosti

výborná separační účinnost
rychlý vývoj metody
krátká doba analýzy
malá spotřeba vzorku
snadné odstranění všech látek
z předchozí analýzy

nestabilita elektroosmotického toku
horší opakovatelnost
a reprodukovatelnost
problémy s validací

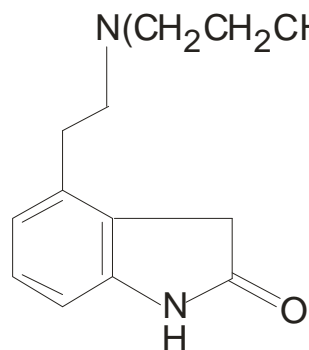
CLC

neutrální látky a ionty
rozdílná distribuce mezi mobilní
a stacionární fází

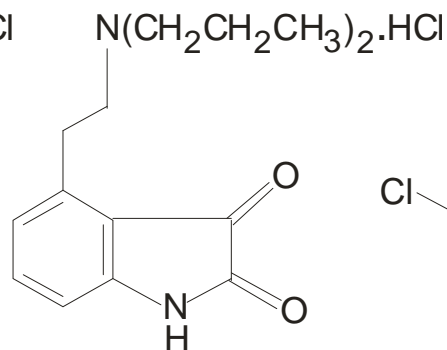
velká separační účinnost
výborná opakovatelnost
a reprodukovatelnost
možnost validace

komplikovaná příprava
separační kolony
pomalejší vývoj metody
delší doba analýzy
větší spotřeba vzorku
látky z předchozí analýzy
mohou zůstat v koloně

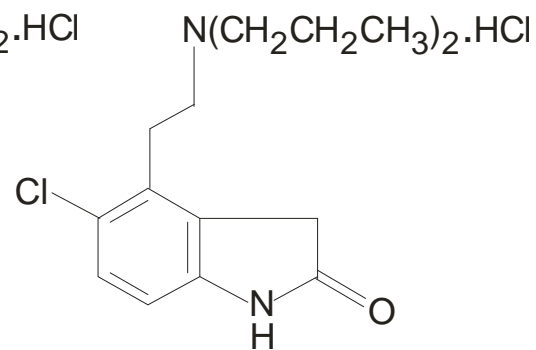
Ropinirol a jeho nečistoty



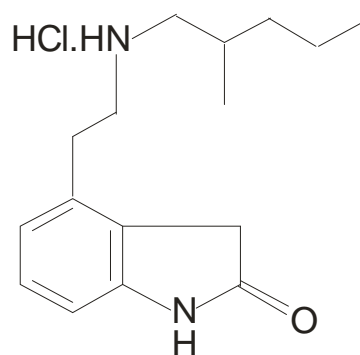
ropinirol



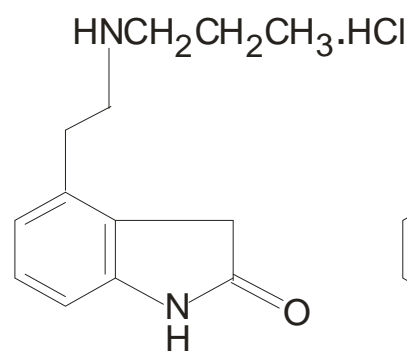
1



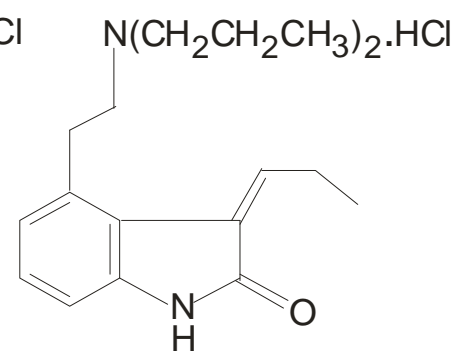
2



3



4



5

Experimentální podmínky

Obě analytické metody byly optimalizovány pro separaci a stanovení ropinirolu v reálných vzorcích ze syntézy.

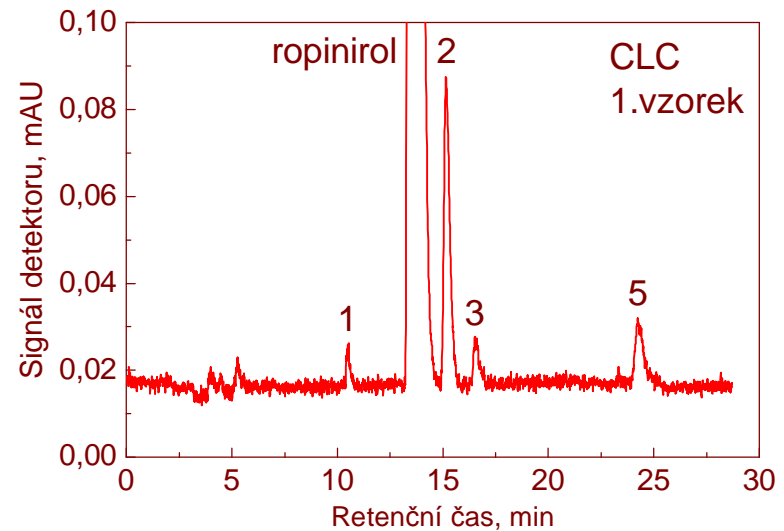
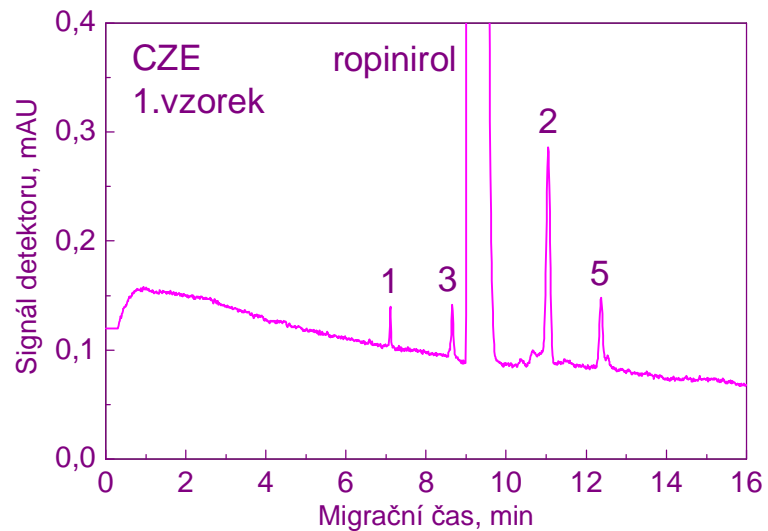
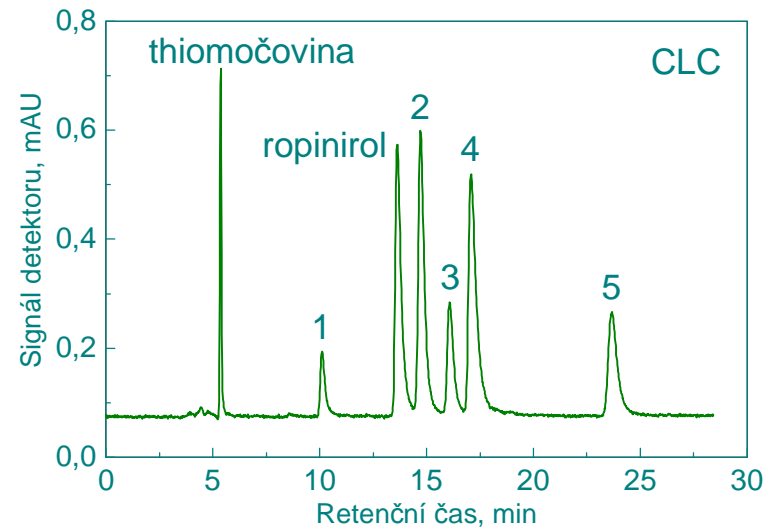
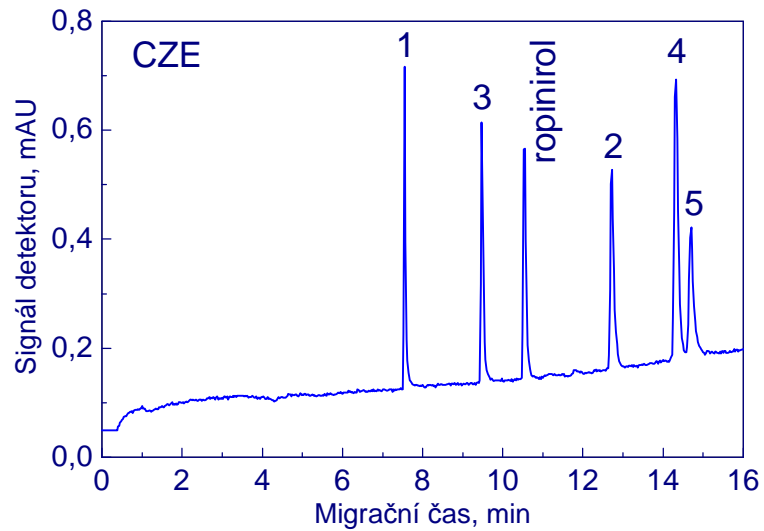
CZE

křemenná kapilára
50 μm x 40 cm x 47 cm
100 mM boritanový pufr
30 mM MgSO_4
pH = 8,7
20 % acetonitril
2 nl vzorku
+30 kV, 51 μA
detekce při 254 nm

CLC

Nucleosil 100-5 C18, 5 μm
320 μm x 41 cm
8,7 mM pufr MES
pH = 6,0
55 % acetonitril
60 nl vzorku
4 $\mu\text{L}/\text{min}$
detekce při 254 nm

Separace a stanovení pomocí CZE a CLC



Kvantifikace pomocí CZE a CLC

Korelační koeficient (r) lineárních kalibračních křivek
a limity stanovení (LOQ) v $\mu\text{g/mL}$.

Analyt	CZE r	CZE LOQ	CLC r	CLC LOQ
Ropinirol				
0-2,5 mg/mL	0,998		0,995	
0-25 $\mu\text{g/mL}$	0,996	3,6	0,997	5,6
1	0,998	2,3	0,998	3,6
2	0,998	3,0	0,998	4,3
3	0,998	2,0	0,999	6,9
4	0,999	2,6	0,996	6,3
5	0,996	3,3	0,997	7,9

Porovnání obou kapilárních metod

Dva různé vzorky ropinirolu ze syntézy byly analyzovány pomocí optimalizovaných metod CZE a CLC.

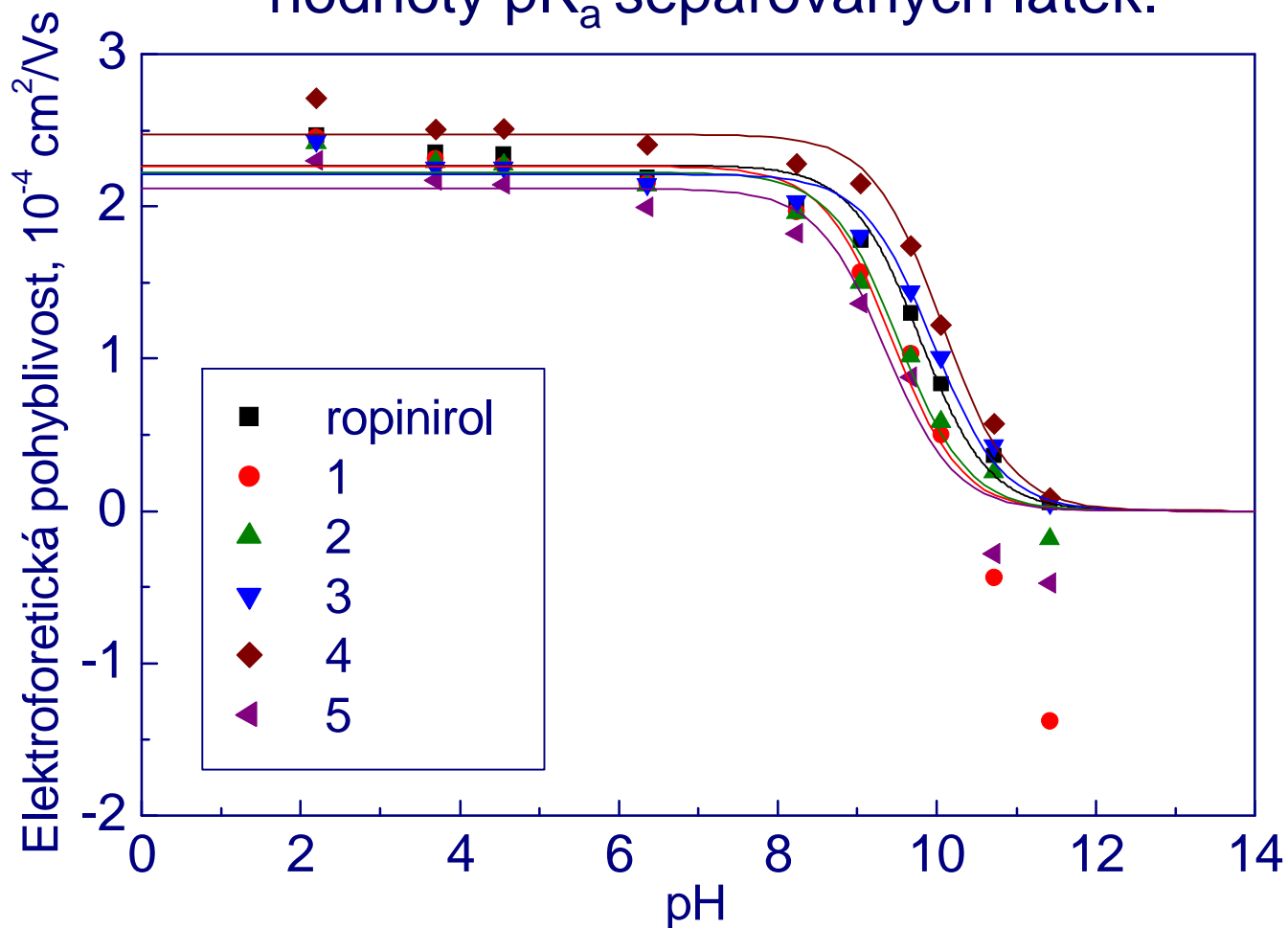
	CZE	CLC
Doba analýzy	13 min	27 min
Opakovatelnost	0,1 – 19,7 %	0,1 – 2,9 % (n = 6)
Čistota ropinirolu		
1.vzorek	98,69 %	98,24 %
2.vzorek	99,65 %	99,59 %

(1.vzorek metodou HPLC: 98,3%)

(2.vzorek metodou HPLC: 99,6%)

Optimalizace pH základního elektrolytu

Optimalizace pH základního elektrolytu v CZE poskytuje hodnoty pK_a separovaných látek.



Určení disociačních konstant

$$m = m_i \cdot \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}}$$

Analyt	pK _a (CZE)	m _i	r
Ropinirol	9,79	2,27	0,991
1	9,43	2,26	0,955
2	9,52	2,22	0,989
3	9,95	2,21	0,991
4	10,06	2,47	0,992
5	9,36	2,12	0,986

Reprodukovatelnost a opakovatelnost v CZE

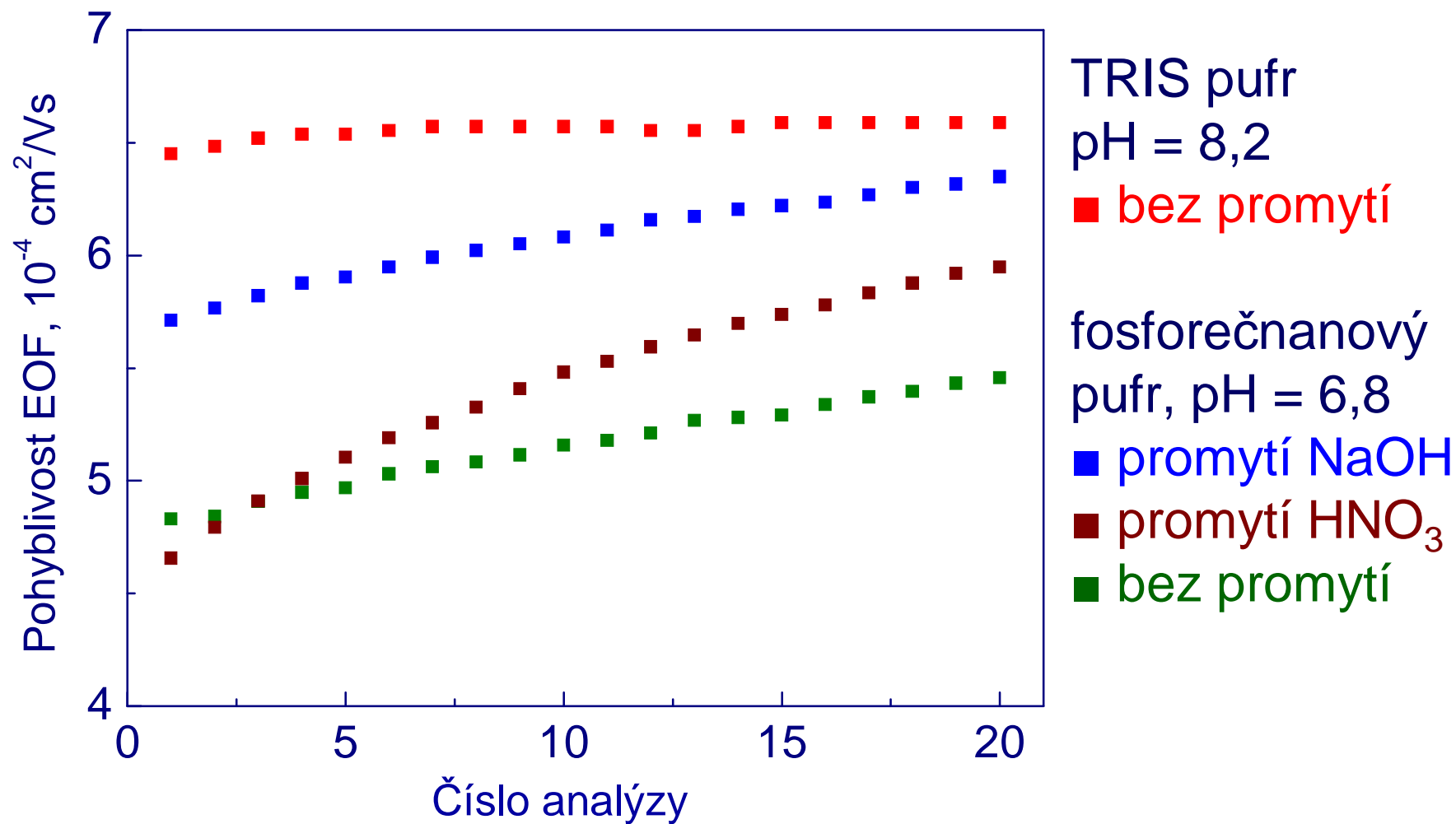
Elektroosmotický tok se často mění i v průběhu jedné analýzy.

Nestabilní elektroosmotický tok vede ke špatné

- a) reprodukovatelnosti a opakovatelnosti migračních časů
(řešení: kovalentní či dynamické pokrytí vnitřní stěny)
- b) opakovatelnosti plochy píků
(řešení: normalizace plochy A/t , vnitřní standard)

Validace analytických metod v CZE je obtížná.

Elektroosmotický tok, EOF



Analýza aminokyselin pomocí CZE

Experimentální podmínky:

křemenná kapilára 50 μm x 66,5 cm x 80 cm

2,3 M CH_3COOH (pH 2,1) s 0,1% hydroxyethylcelulosou

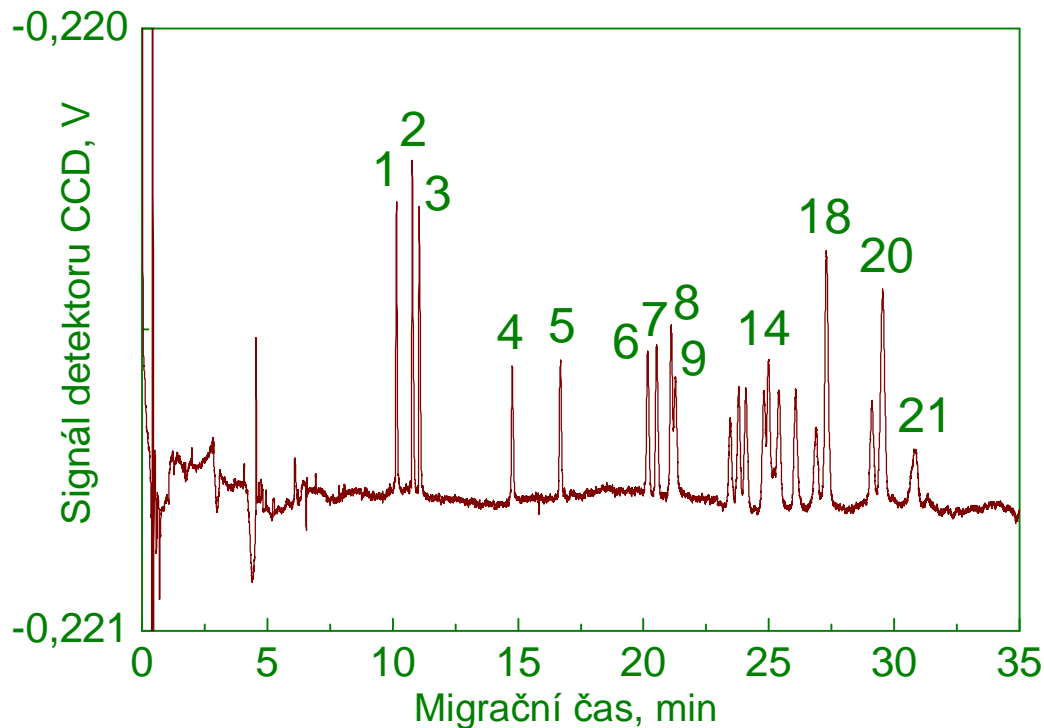
300 mbar.s, 0,1 – 0,5 mM roztok aminokyselin

+30 kV, 15,3 μA , 25 °C

bezkontaktní vodivostní detekce (CCD)

Hydroxyethylcelulosa (HEC) významně zlepšuje reprodukovatelnost a opakovatelnost použité analytické metody.

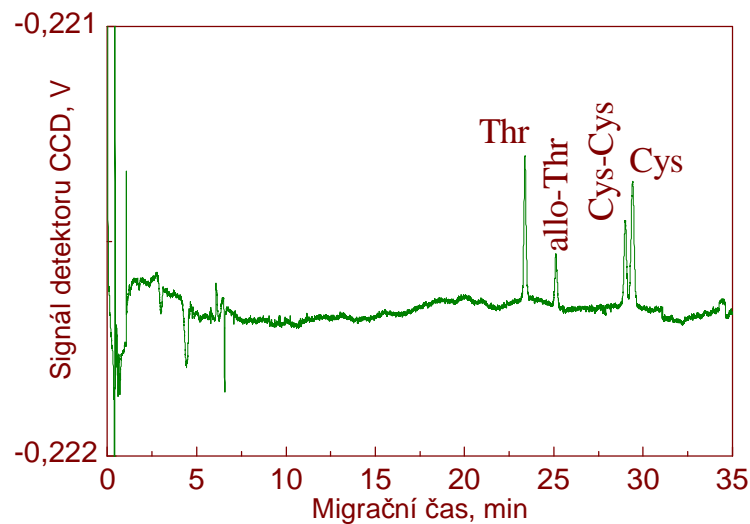
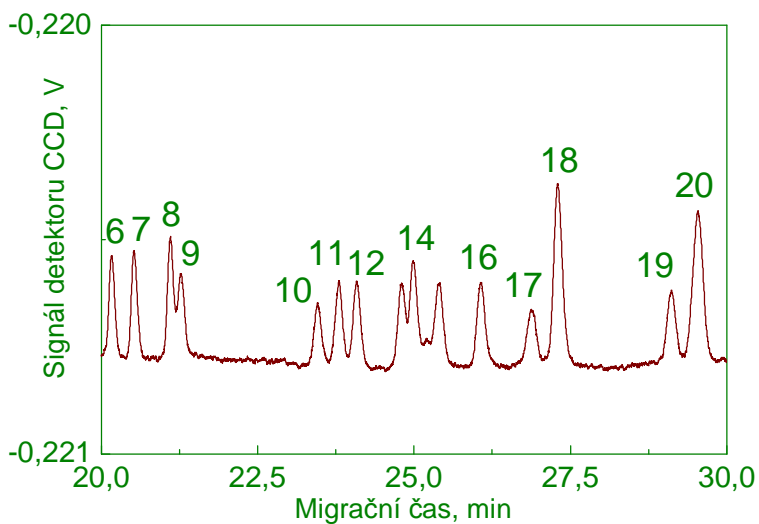
20 nederivatizovaných aminokyselin



1 Lys	8 Leu	15 Glu
2 Arg	9 Ser	16 Phe
3 His	10 Thr	17 Pro
4 Gly	11 Asn	18 Tyr
5 Ala	12 Met	19 Cys-Cys
6 Val	13 Gln	20 Cys
7 Ile	14 Trp	21 Asp

Elektroosmotická pohyblivost bez HEC	$0,12 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$
Elektroosmotická pohyblivost s 0,1% HEC	$0,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$
RSD migračních časů prolinu	0,19 % (n = 12)
RSD migračních časů kys. asparagové	0,22 % (n = 12)

Efektivní elektroforetické pohyblivosti



1 Lys	$2,91 \cdot 10^{-4}$	8 Leu	$1,40 \cdot 10^{-4}$	15 Glu	$1,16 \cdot 10^{-4}$
2 Arg	$2,74 \cdot 10^{-4}$	9 Ser	$1,39 \cdot 10^{-4}$	16 Phe	$1,13 \cdot 10^{-4}$
3 His	$2,67 \cdot 10^{-4}$	10 Thr	$1,26 \cdot 10^{-4}$	17 Pro	$1,10 \cdot 10^{-4}$
4 Gly	$2,00 \cdot 10^{-4}$	11 Asn	$1,24 \cdot 10^{-4}$	18 Tyr	$1,08 \cdot 10^{-4}$
5 Ala	$1,77 \cdot 10^{-4}$	12 Met	$1,23 \cdot 10^{-4}$	19 Cys-Cys	$1,02 \cdot 10^{-4}$
6 Val	$1,47 \cdot 10^{-4}$	13 Gln	$1,19 \cdot 10^{-4}$	20 Cys	$1,00 \cdot 10^{-4}$
7 Ile	$1,44 \cdot 10^{-4}$	14 Trp	$1,18 \cdot 10^{-4}$	21 Asp	$0,96 \cdot 10^{-4}$
		allo-Thr	$1,17 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$		

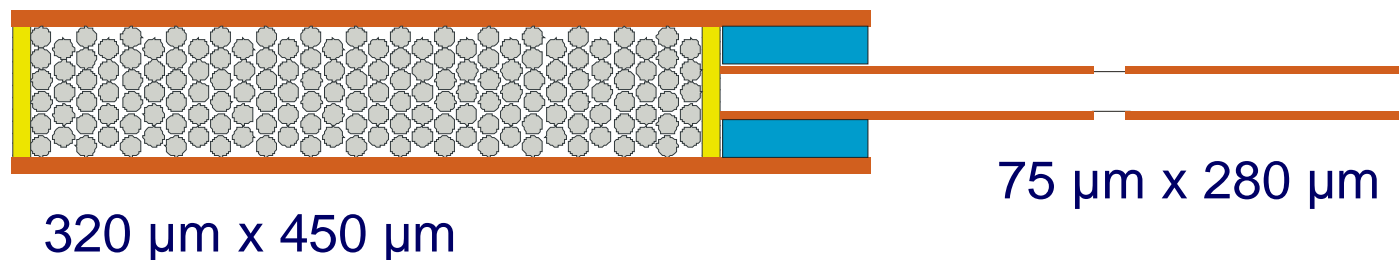
CZE a CLC

**jsou slibným konkurentem
konvenční HPLC.**

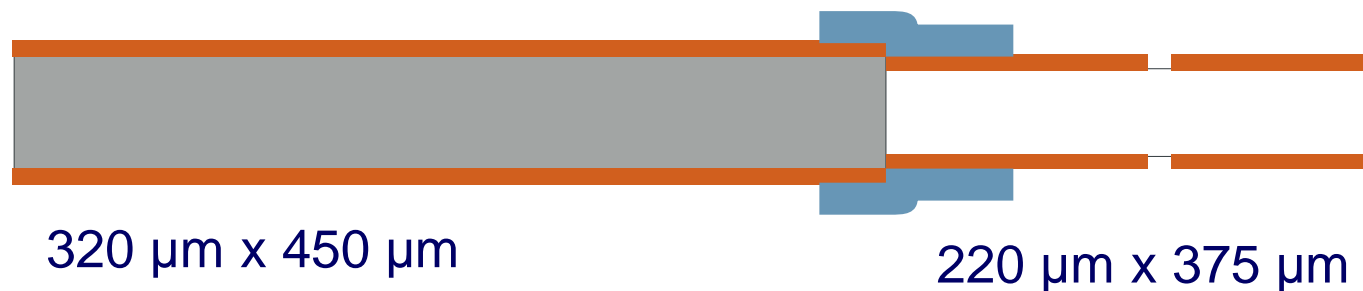
**Vyznačují se lepší separační účinností,
sníženou spotřebou
základního elektrolytu / eluentu,
menšími nároky na množství vzorku
a nízkou cenou každodenního provozu.**

Separační kolony pro CLC

Náplňové kolony s částicemi stacionární fáze



Monolitické kolony s roubíkem monolitu



Charakter monolitických kolon

1. snadná příprava kolony radikálovou polymerizací
2. žádné frity k udržení sorbentu
3. polarita monolitu závisí na funkčním monomeru
4. kolony libovolného průměru a délky
5. nízká cena kolony

organické polymery

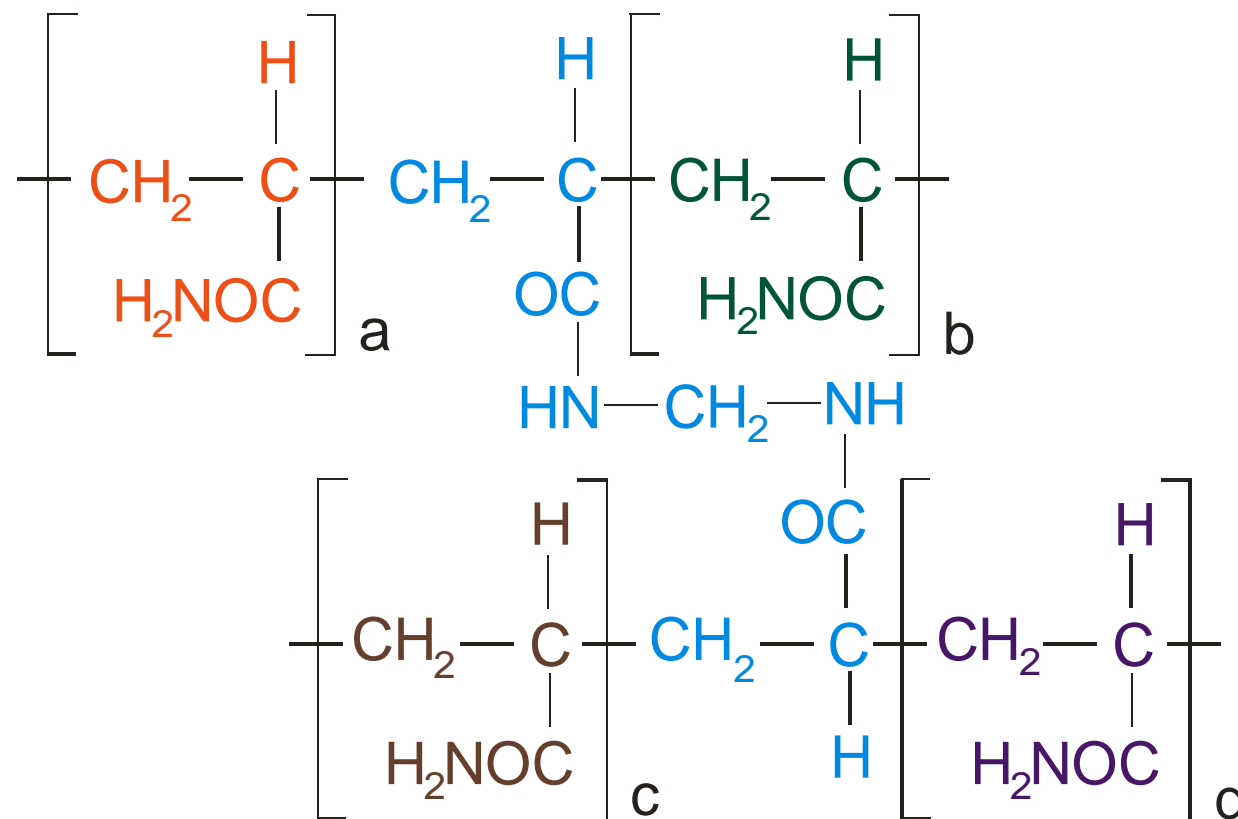
silikagelové monolity

Polyakrylamidový monolit

hydrofilní sorbent

akrylamid $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CONH}_2$

methylenbisakrylamid $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{NHCO}-\text{CH}=\text{CH}_2$

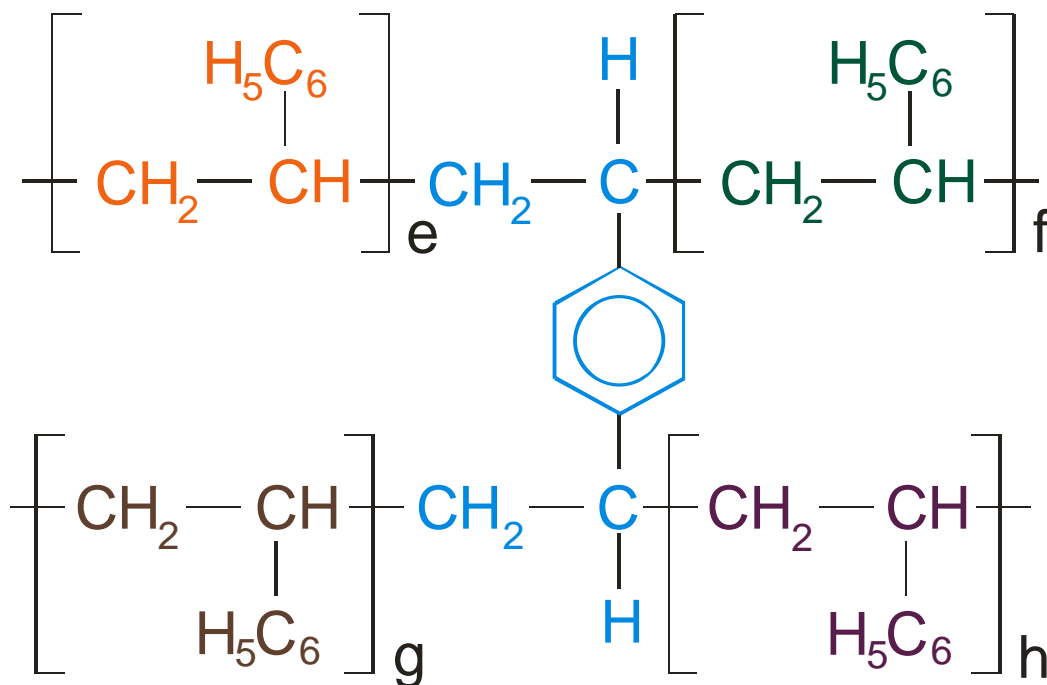


Polystyrenový monolit

hydrofobní sorbent

styren $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$

divinylbenzen $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}_2$

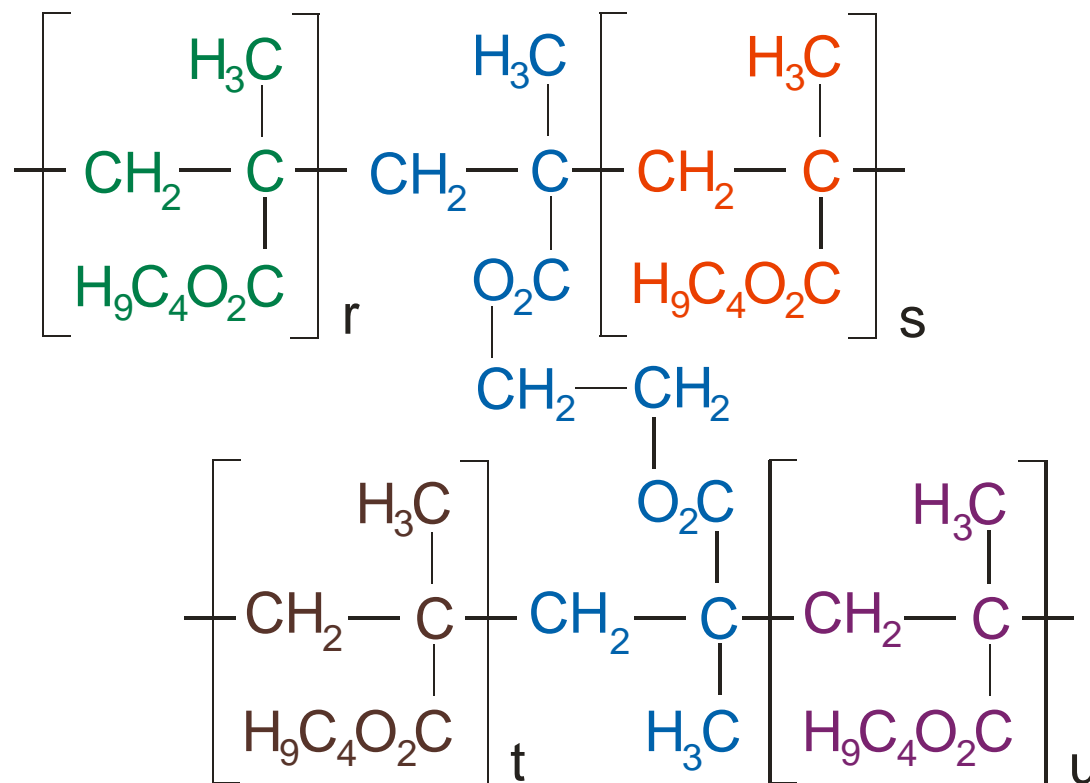


Polybutylmethakrylátový monolit

středně hydrofobní sorbent

butylmethakrylát $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

ethylendimethakrylát $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OOC}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$



Příprava polybutylmethakrylátového monolitu

Silanizace kapiláry

silanizační činidlo: 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát

Polymerizační směs (40:60)

funkční monomer: butylmethakrylát

síťovací monomer: ethylendimethakrylát

iniciátor polymerizace: α, α' -azobisisobutyronitril

porogenní rozpouštědlo: 1-propanol

1,4-butandiol

voda

Složení polymerizační směsi

funkční monomer: butylmethakrylát	17,8 %
síťovací monomer: ethylendimethakrylát	21,8 %
iniciátor polymerizace: α,α' -azobisisobutyronitril	0,4 %
porogenní rozpouštědlo: 1-propanol	36,0 %
1,4-butandiol	18,0 %
voda	6,0 %



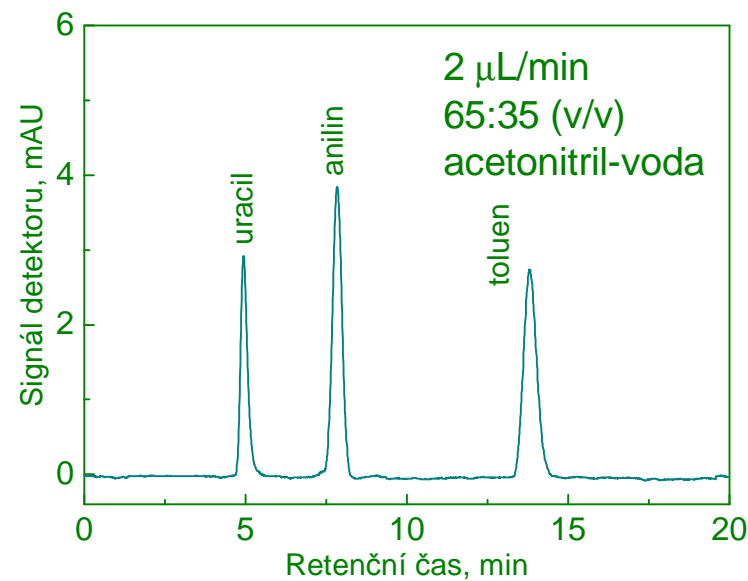
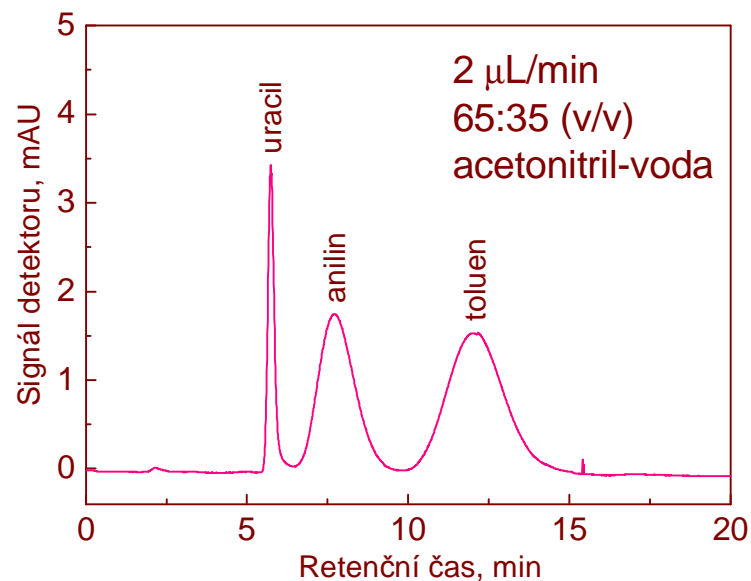
Vliv síťovacího monomeru

Polymerizační směs

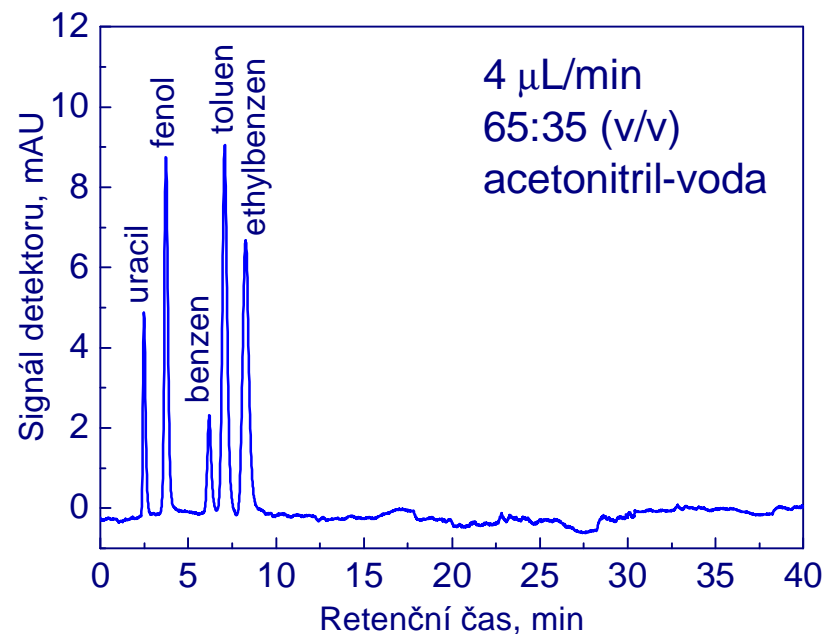
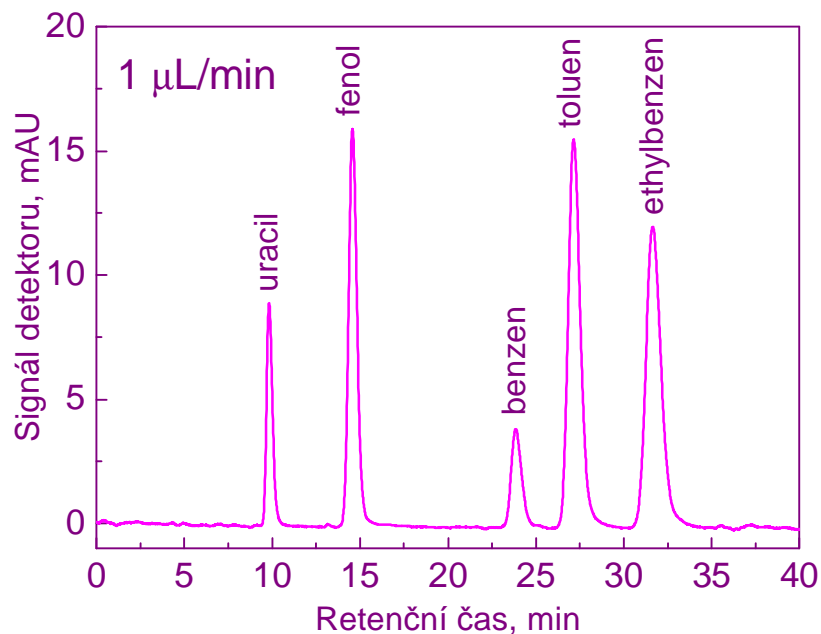
butylmethakrylát
ethylendimethakrylát
 α,α' -azobisisobutyronitril
1-propanol
1,4-butandiol
voda

Hmotnostní %

23,8	19,8	17,8
15,8	19,8	21,8
0,4	0,4	0,4
36,0	36,0	36,0
18,0	18,0	18,0
6,0	6,0	6,0



Separace malých organických molekul



HETP v µm: Analyt

uracil

52

134

fenol

44

132

benzen

27

57

toluen

26

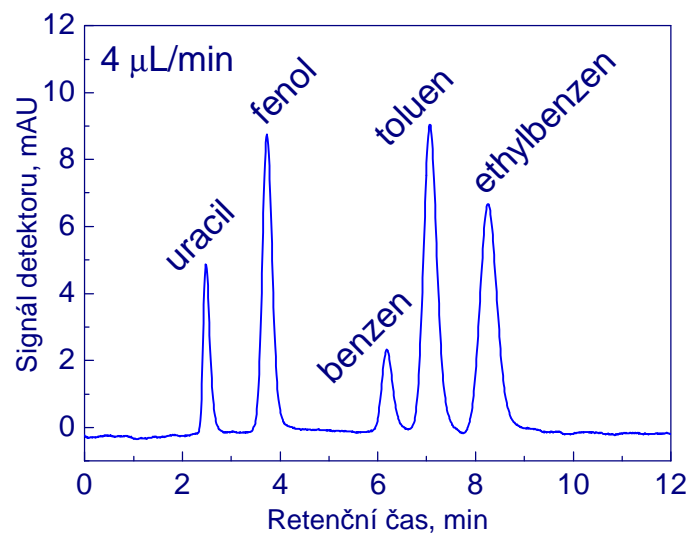
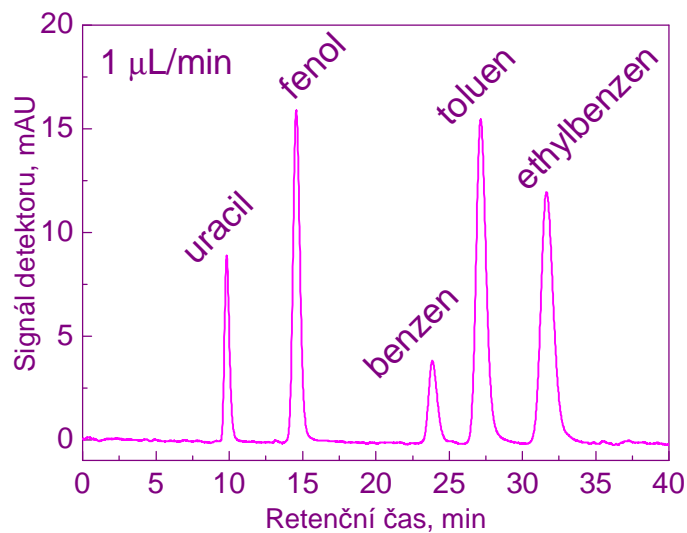
63

ethylbenzen

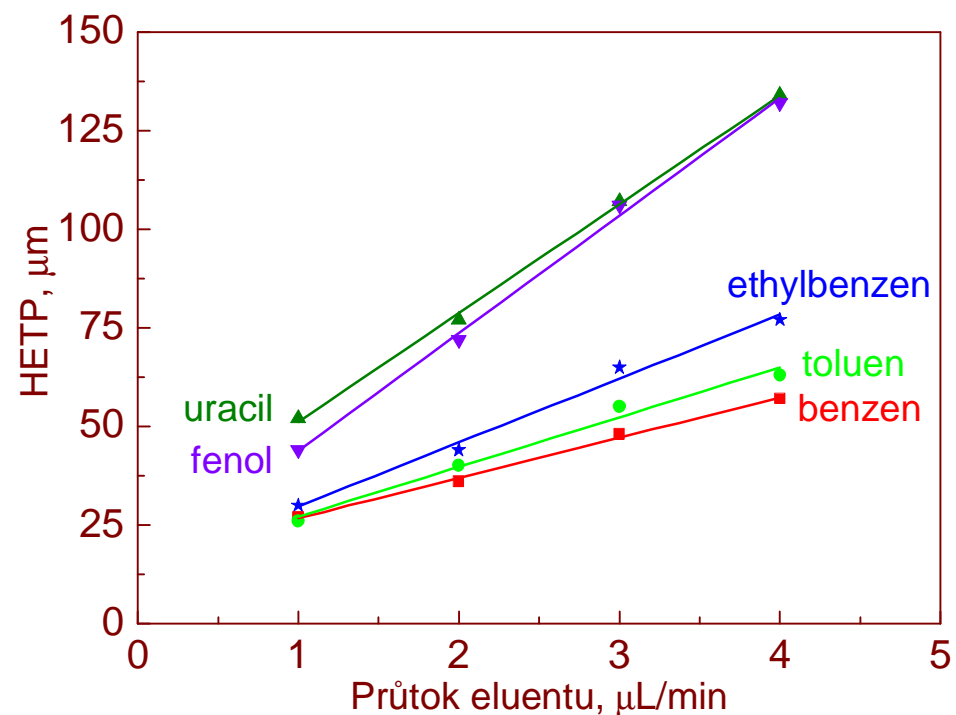
30

77

Separační účinnost kolony



$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$



Kapilární monolitické kolony

**jsou slibnou alternativou
ke kapilárním náplňovým kolonám.
Vyznačují se srovnatelnou
separační účinností a jejich předností
je jejich cena a jednoduchost přípravy.**

Budoucnost kapilárních separačních technik

Problém reprodukovatelnosti CZE je řešitelný použitím kapilárních kolon s **pokrytým vnitřním povrchem**.

Problém přípravy kapilárních kolon pro CLC je řešitelný využitím **monolitických kolon**.

Domnívám se, že CLC a CZE budou postupně nahrazovat HPLC i v komerční sféře chemické analýzy.

CZE se bude více využívat k **rychlé kontrole vzorků z výrobního procesu** a **CLC** bude sloužit především ke **kontrole kvality konečných produktů**.

Děkuji Vám za pozornost.

Chemický
ústav

Přírodovědecká
fakulta

Univerzita Karlova
v Praze

