

RAM-LPS-Online Sample Prep-MIPS

Απαιτήσεις σύγχρονης κλινικής φαρμακευτικής ανάλυσης

- Ταχύτερες μέθοδοι ανάλυσης
- Υψηλότερη ευαισθησία
- Μεγαλύτερη εκλεκτικότητα
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης
- Συμβατότητα με τεχνικές εκτεταμένης σάρωσης

Προβλήματα ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων

Βιολογικά υλικά π.χ. πλάσμα ορός → ασυμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές λόγω μη αντιστρεπτής προσρόφησης των πρωτεϊνών στο πληρωτικό υλικό → καταστροφή του πληρωτικού υλικού απώλεια διαχωριστικής ικανότητας και αύξησης οπισθοπίεσης.

Προκατεργασία δείγματος

Καταβύθιση πρωτεϊνών → ταχεία, απλή, επαναλήψιμη – μη εκλεκτική (signal suppresion)

Υγρή-Υγρή εκχύλιση

Εκχύλιση στερεάς φάσης

Εκχύλιση υποβοηθούμενη

από μεμβράνες (υπερδιήθηση, διάλυση)

off-line, απαιτητική, χρονοβόρα,
δύσκολα αυτοματοποιήσιμη

Σύγχρονες τεχνικές σε σειρά (on-line)

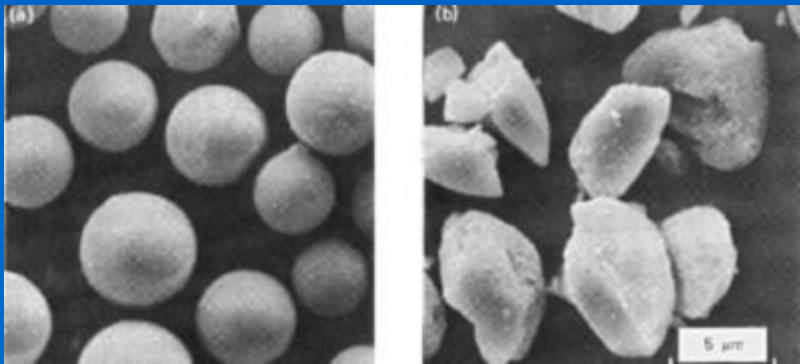
Μέσα περιορισμένης πρόσβασης και Υποστρώματα μεγάλων σωματιδίων

Κατακράτηση αναλυτών με ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις -
απομάκρυνση των μακρομορίων που δεν είναι δυνατόν να κατακρατηθούν

Μέσα περιορισμένης πρόσβασης
Restricted Access Media (RAM)

Restricted Access Media (RAM)

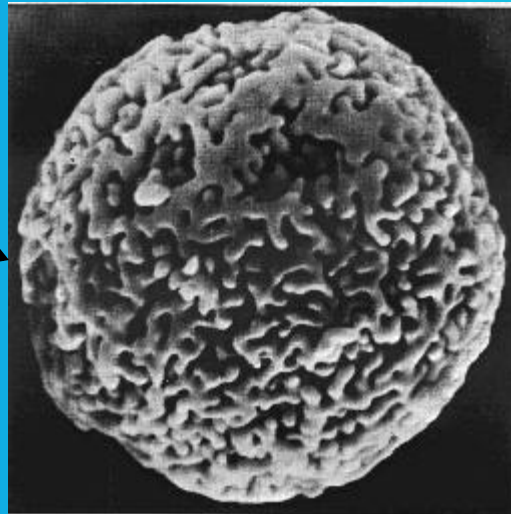
Μέσα περιορισμένης πρόσβασης



Σφαιρικά
σωματίδια
πυριτίας



Ακανόνιστα
σωματίδια
πυριτίας



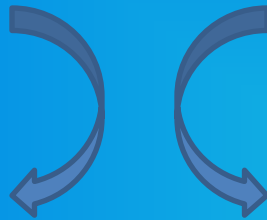
C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, J. Chromatogr. 544 (1991)

Άμεση ένεση βιολογικού υποστρώματος



Μικρά μόρια (φάρμακα) → αλληλεπίδραση με το πληρωτικό υλικό
Μεγαλομόρια → αποκλεισμός λόγω μεγέθους (και χημικής σύστασης) και αλληλεπίδραση μόνο με την εξωτερική επιφάνεια του πληρωτικού υλικού

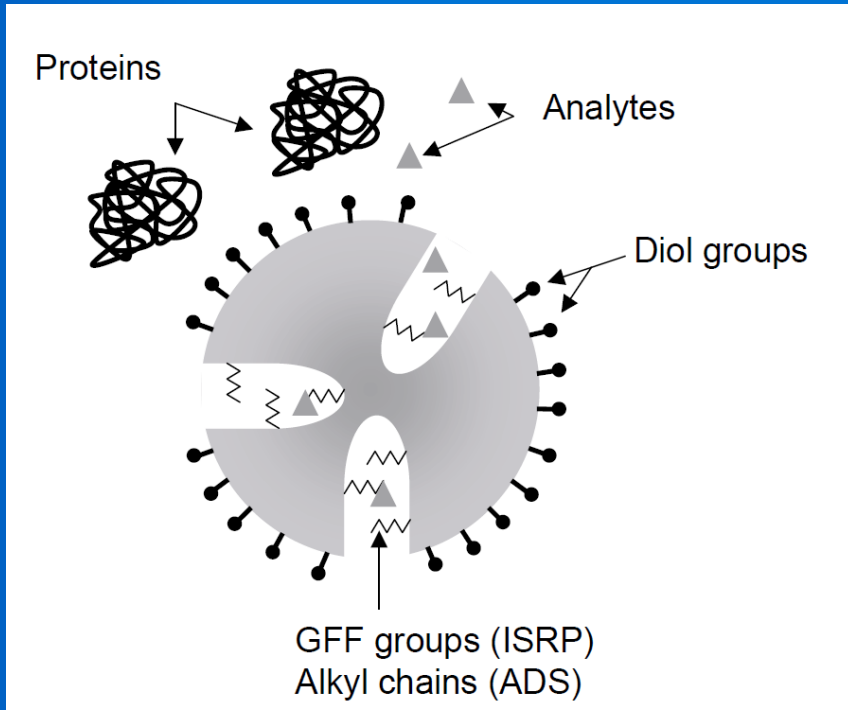
Φυσικός αποκλεισμός
(λόγω μεγέθους)



Χημικός αποκλεισμός

Πληρωτικά υλικά φυσικού αποκλεισμού
Physical barrier

Σωματίδια πορώδους πυριτίας (porous silica particles)



Εσωτερική επιφάνεια (πόροι):
επικάλυψη με υδρόφοβες
ομάδες (τριπεπτίδιο glycine-I-
phenylalanine-I-phenylalanine or
GFF)

Εσωτερική επιφάνεια αντίστροφης φάσης *Internal surface reversed-phase (ISRP)*

H. Hagestam, T.C. Pinkerton, Anal. Chem. 57 (1985) 1757

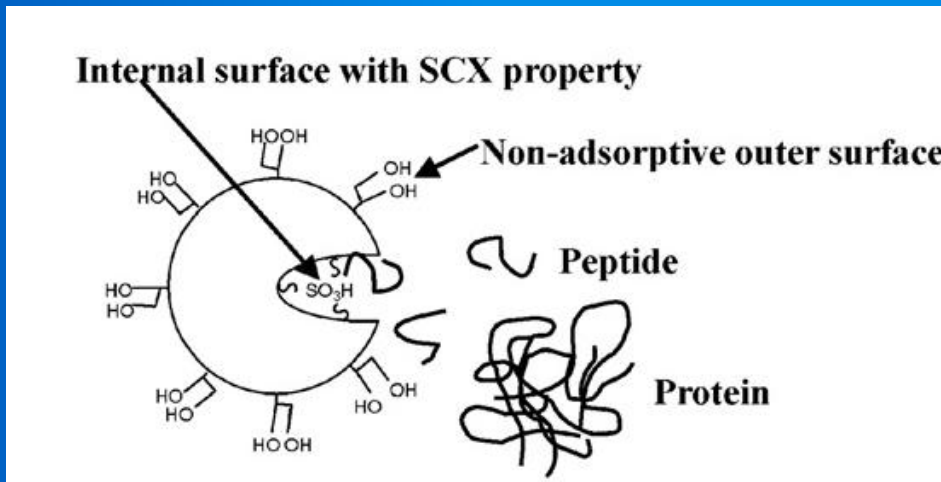
Εξωτερική επιφάνεια : επικάλυψη με
υδρόφιλες ομάδες (diol-glycine groups) –
απωθούν την προσκόληση των πρωτεϊνών

Η είσοδος μεγαλομορίων στους πόρους
παρεμποδίζεται λόγω μεγέθους (μέγεθος
πόρων 8nm) → αποκλεισμός πρωτεϊνών με
MB>22000 Da (αλβουμίνη ~ 65000 Da)

Διαχωρισμός → αλληλεπίδραση GFF με τον
αναλύτη

Δυνατότητα ένεσης 6-7 mL πλάσματος

Εσωτερική επιφάνεια αντίστροφης φάσης
Internal surface reversed-phase (ISRP)

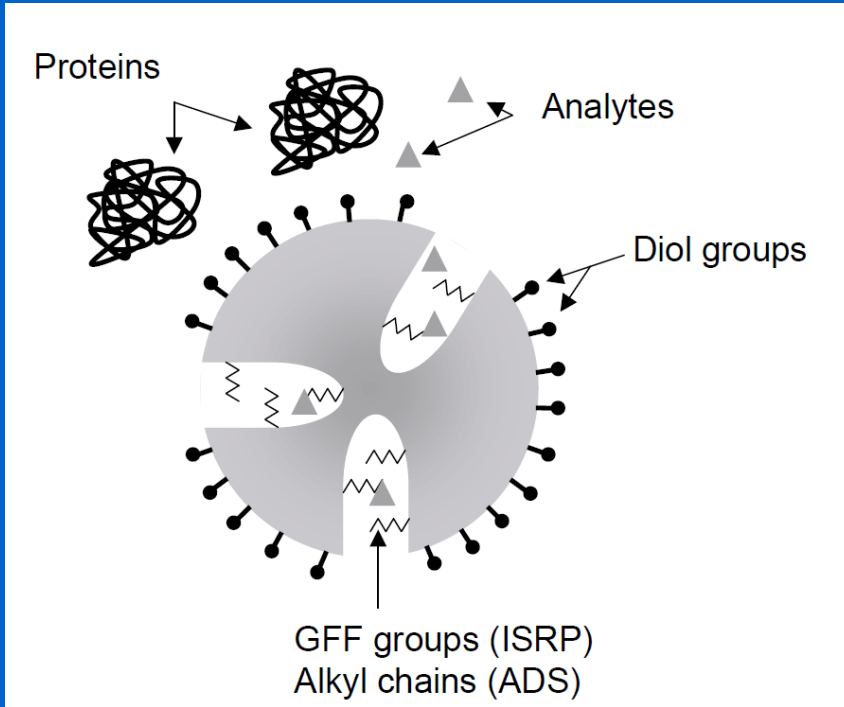


Εναλλακτικά υλικά με ενσωμάτωση
ισχυρού κατιοναταλλάκτη στην επιφάνεια
των πόρων

Πυριτία με επικάλυψη αλκυλο-διόλης *Alkyl-diol-silica material (ADS)*

K.S. Boos, A. Rudolphi, S. Vielhauer, A. Walfort, D. Lubda, F. Eisenbeiss, Fresenius J. Anal. Chem. 352 (1995) 684

Εξωτερική επιφάνεια → επικάλυψη με υδρόφιλες ομάδες (γλυκεροπροπυλο, διολη κτλ) → παρεμπόδιση πρόσδεσης πρωτεϊνών



Εσωτερική επιφάνεια → διάμετρος πόρων 6 nm → παρεμπόδιση εισόδου πρωτεϊνών → είσοδος μικρών μορίων

Διαχωρισμός → πληρωτικά υλικά αντίτροφης φάσης (C4, C8 or C18)

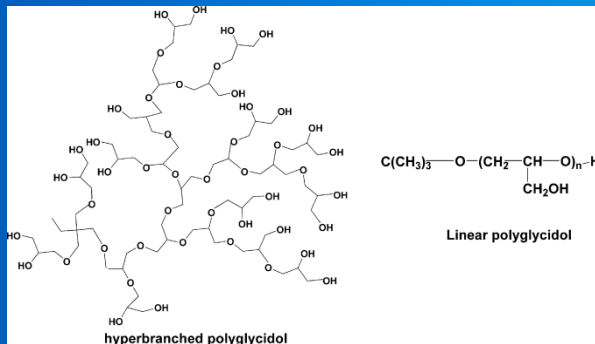
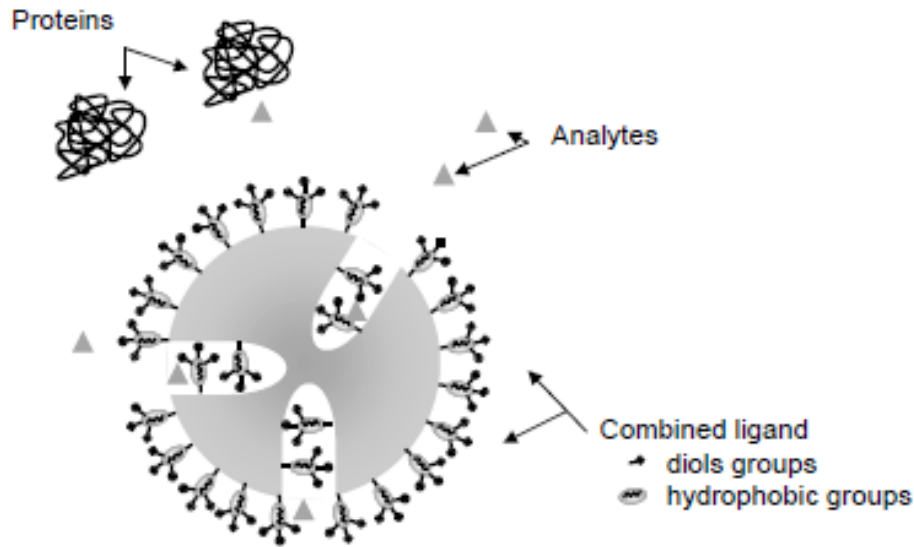
Δυνατότητα ένεσης 80–100 mL πλάσματος

Πλάσμα, ορός, ούρα, υγρά μικροδιάλυσης, σίελος, ομογενοποίηση ήπατος, βρογχικές εκκρίσεις, γαστρικές εκκρίσεις, κυταροκαλλιέργειες, γάλα, ιστοί

Πορώδης πυριτία επικαλυμμένη με συνδέτη *Porous silica covered by a combined ligand*

ChrompSher 5 BioMatrix. Direct HPLC Injection of Protein-Rich Samples, VARIAN, Harbor City, CA, USA

Πορώδης πυριτία (διάμετρος πόρων 13 nm) επικαλυμμένη με συνδέτη (ligand) που διαθέτει και υδρόφοβες και υδρόφιλες ιδιότητες



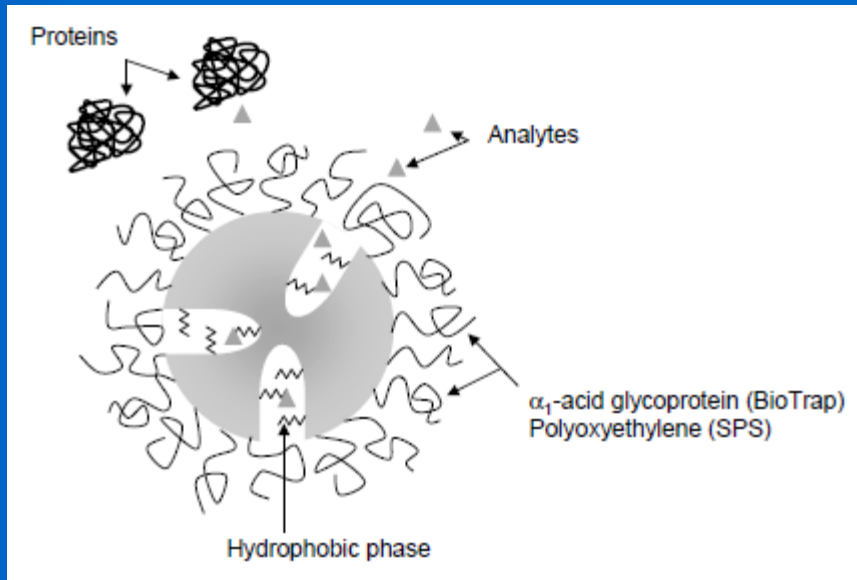
Η εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια (πολυγλυκιδόλη) αποτρέπει την προσρόφηση του πρωτεϊνικού υποστρώματος

Η εσωτερική επιφάνεια (φαίνυλ-) → προκαλεί τον διαχωρισμό των μικρών μορίων

Πληρωτικά υλικά χημικού αποκλεισμού
Chemical barrier

Πληρωτικά υλικά ημιπερατής επιφάνειας (Semi-permeable surface SPS)

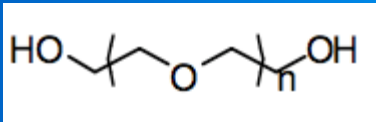
C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 25.



Ενσωμάτωση πολυοξαιθυλενίου στην επιφάνεια στήλης αντίστροφης φάσης (C_8 , C_{18} , φαινυλ, κυανο) \rightarrow δημιουργία χημικού φραγμού (υδρόφιλης ημιπερατής επιφάνειας) \rightarrow περιορισμός πρόσβασης πρωτεϊνών στο υποκείμενο υδρόφοβο πληρωτικό υλικό

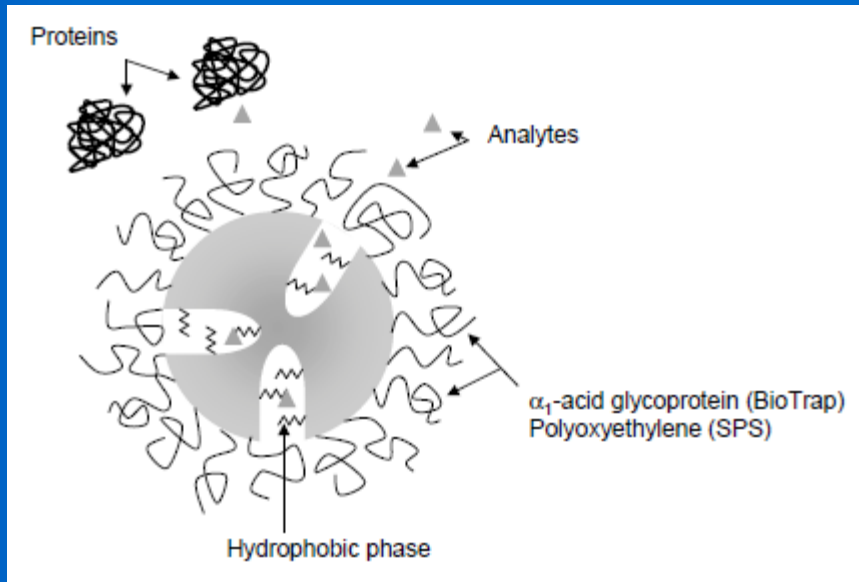
Εξωτερική επιφάνεια \rightarrow παρεμποδίζει την είσοδο πρωτεϊνών προς τη επιφάνεια του σωματιδίου – επιτρέπει την διόδο μικρών μορίων

Εσωτερική επιφάνεια \rightarrow C_8 , C_{18} φαινυλ, κυανο \rightarrow αλληλεπίδραση και διαχωρισμός μικρών μορίων



Πολυοξαιθυλένιο

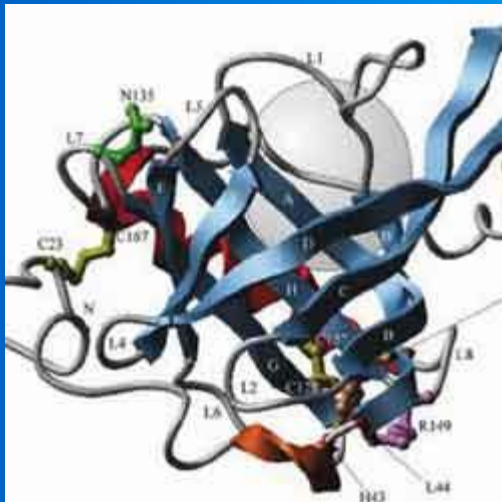
Δυνατότητα ένεσης ~ 50 mL πλάσματος (ισοδύναμη με τις στήλες ADS)



Επικαλυμένη με πρωτεΐνες πυριτία (Protein-coated silica, BioTrap)

J. Hermansson, A. Grahn, J. Chromatogr. A 660 (1994) 119

Ενσωμάτωση πρωτεϊνικού δικτύου στην επιφάνεια στήλης αντίστροφης φάσης (C₈, C₁₈, φαινυλ, κυανο) → δημιουργία χημικού φραγμού (υδρόφιλης ημιπερατής επιφάνειας) → περιορισμός πρόσβασης πρωτεϊνών στο υποκείμενο υδρόφοβο πληρωτικό υλικό



Πρωτεϊνικό δίκτυο → ανθρώπινη α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α1-acid glycoprotein AGP)



Εξωτερική επιφάνεια σωματιδίων → συμβατότητα με πρωτεϊνικά δείγματα → δημιουργία πόρων ~10nm → αδυναμία διείσδυσης μεγαλομορίων

BioTrapMS → pH 2-10

Διαχωρισμός → πληρωτικά υλικά αντίστροφης φάσης (C₈, C₁₈)

Δυνατότητα ένεσης 30 mL πλάσματος

Πληρωτικά υλικά μικτής δράσης (Mixed-functional material - Carcell Pak MF)

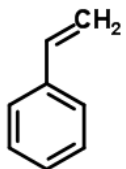
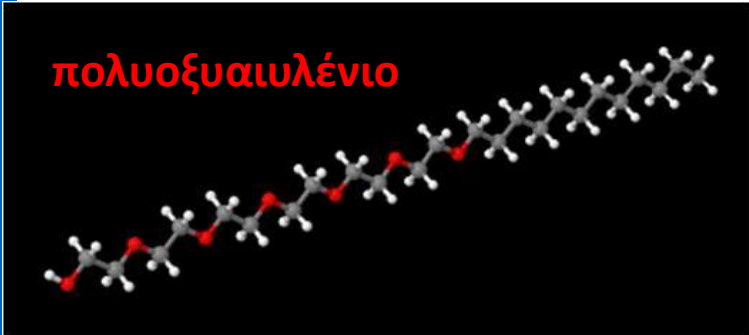
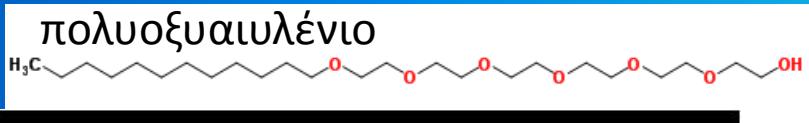
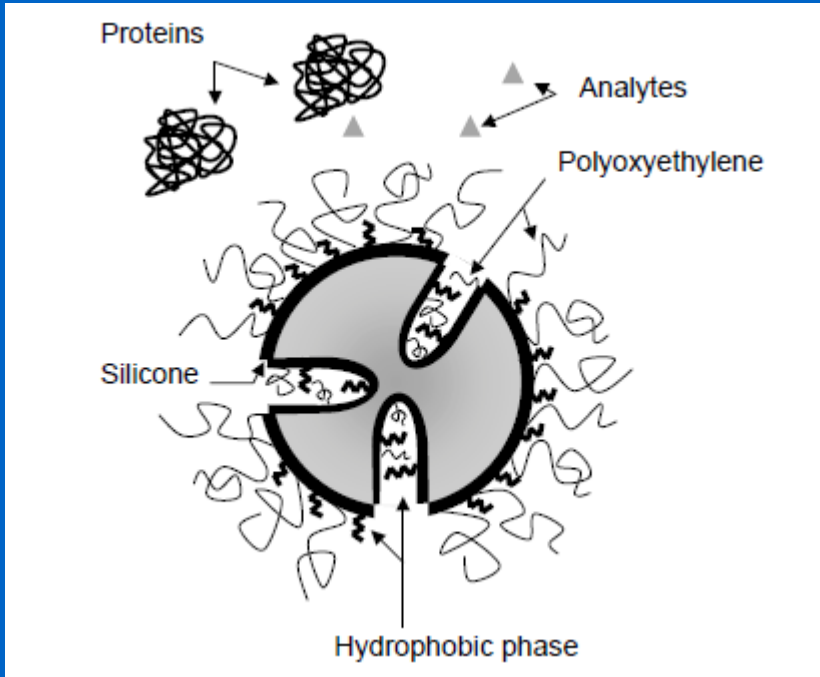
T. Kanda, H. Kutsuna, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. A, 672 (1994) 51.

Σωματίδια πυριτίας επικαλυμένα με πολυμερές σιλκόνης

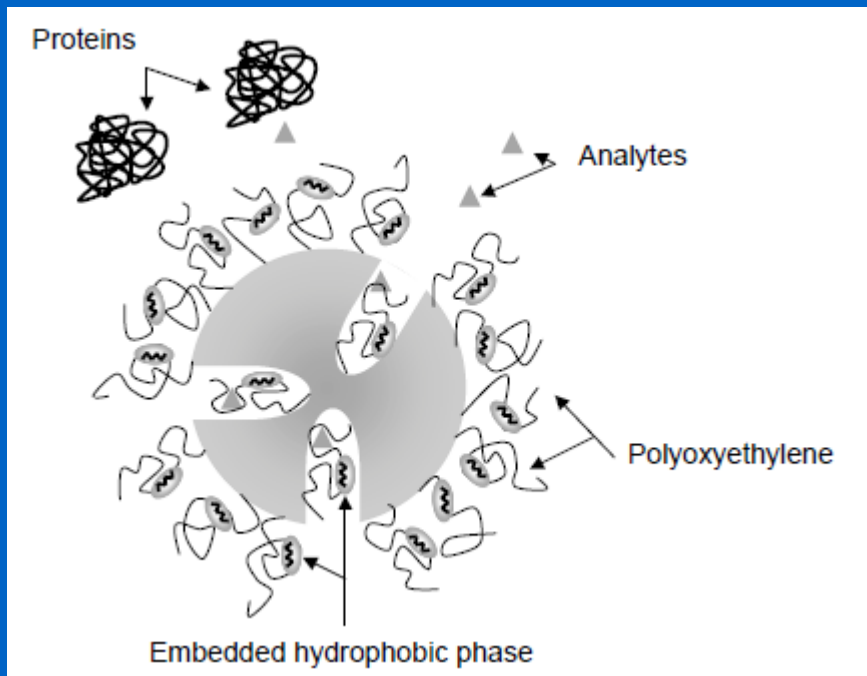
Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια → μίγμα πολυοξαιυλενίου (υδρόφιλη φάση) και στυρενίου (υδρόφοβη φάση) αλλά και C8, C18 κατιονταλλάκτες (SCX) και

Αλυσίδες πολυοξαιυλενίου (μη προσροφητικές για τα μεγαλομόρια) → παρεμποδίζουν την πρόσβαση των πρωτεϊνών η οποίες εκλύονται στον νεκρό όγκο

Ο διαχωρισμός γίνεται στην εσωτερική υδρόφοβη φάση

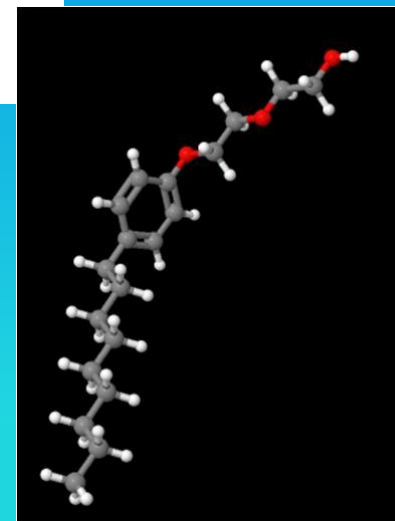
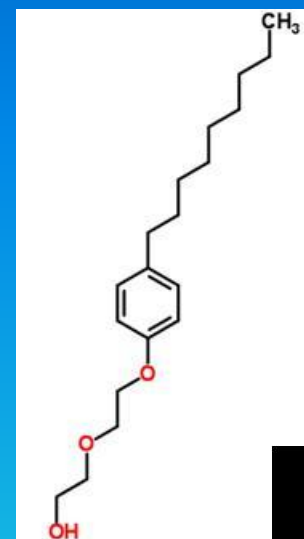


στυρένιο



Θωρακισμένες υδρόφοβες φάσεις *Shielded hydrophobic phases (SHP) - HISEP*

D.J. Gisch, B.T. Hunter, B. Feibush, J. Chromatogr. 433 (1988) 264



Σωματίδια πυριτίας επικαλυμένα με δίκτυο πολυαιθυλενοξειδίου με ενσωματωμένες φαίνυλ ομάδες .

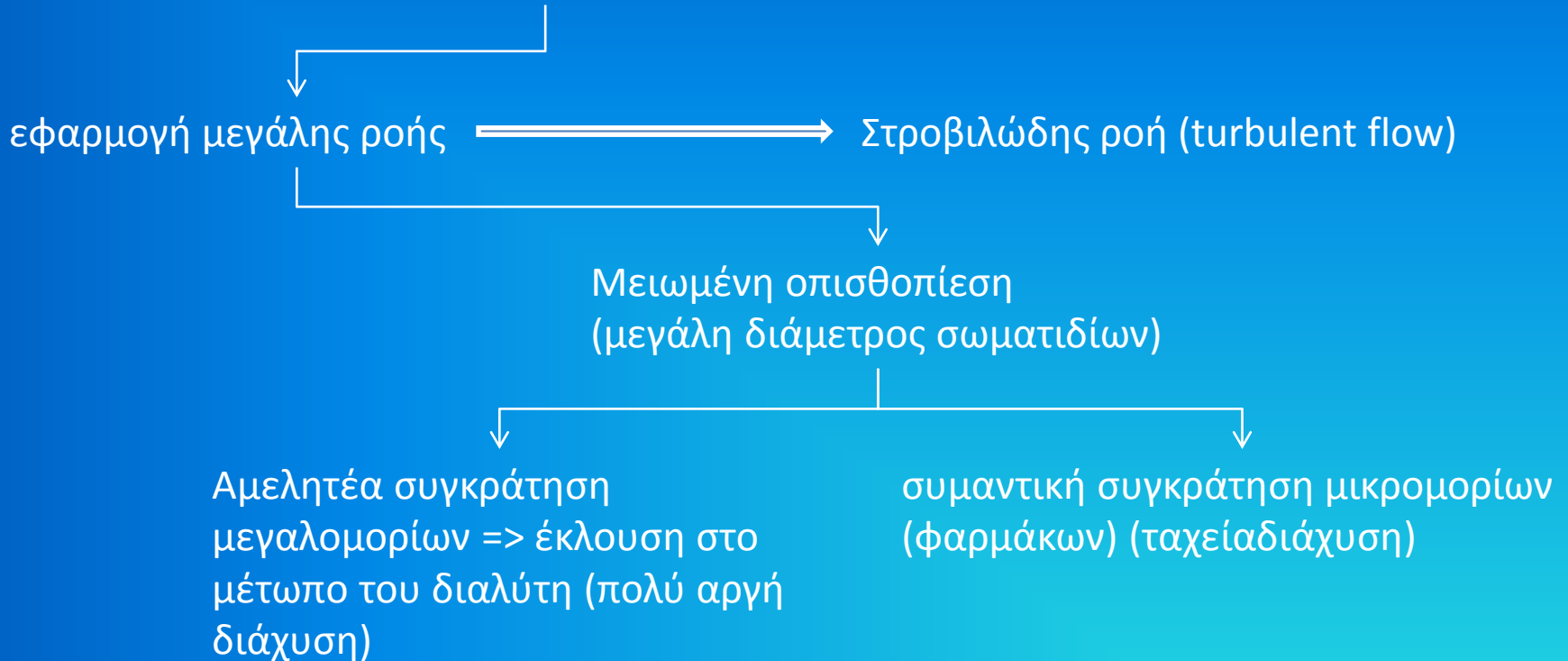
- Οι πρωτεΐνες παρεμποδίζονται από τις εξωτερικές υδρόφιλες ομάδες.
- Τα φαρμακευτικά μόρια διέρχονται από την υδροφιλική θωράκιση και αλληλεπιδρούν με το υδρόφοβο τμήμα της αλυσίδας

Δυνατότητα ένεσης 30 mL πλάσματος

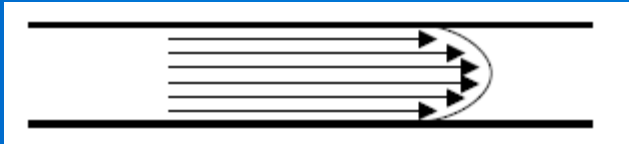
Υποστρώματα μεγάλων σωματιδίων

Large particle supports (LPS)

Πληρωτικά υλικά με μεγάλη διάμετρο σωματιδίων 30-50 μ m



Χρωματογραφική ροή



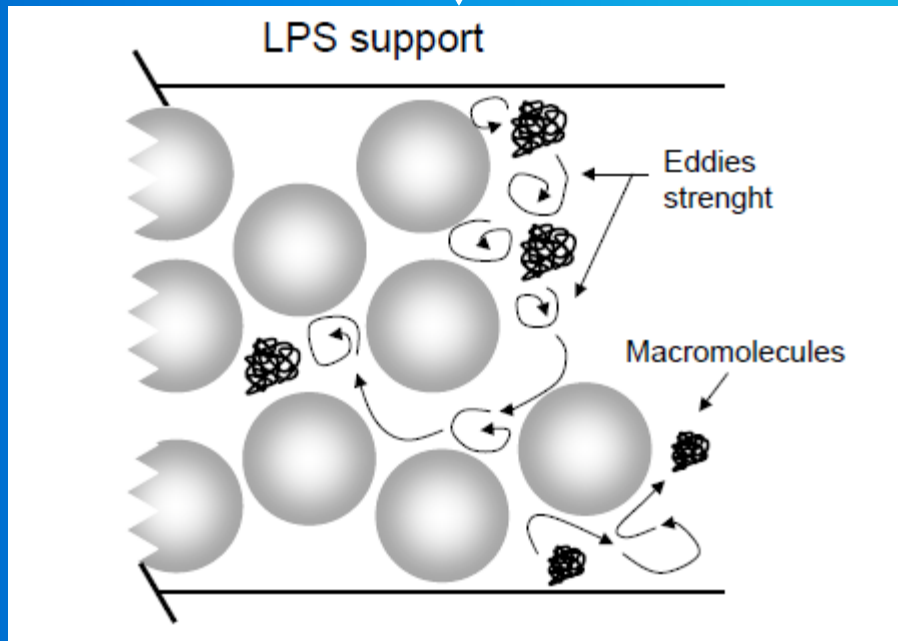
γραμμική ροή

απευθείας ένεση → ταχεία
καταστροφή του πληρωτικού
υλικού



στροβιλώδης ροή

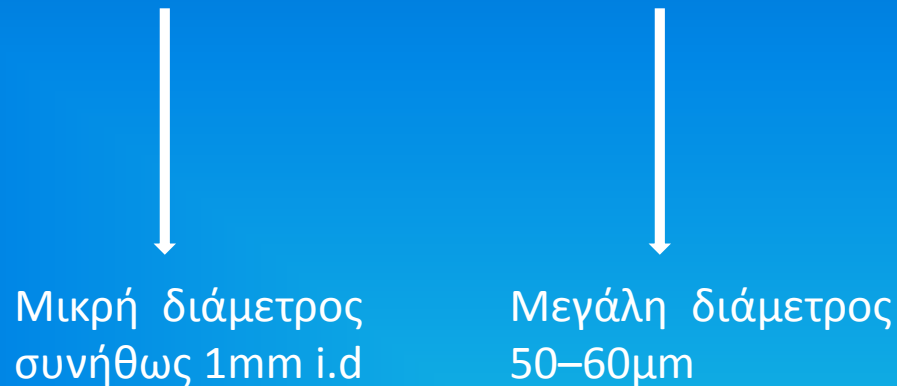
απευθείας ένεση → δεν
επηρεάζει το πληρωτικό υλικό




Η στροβιλώδης ροή αναγκάζει τα μεγαλομόρια να κινηθούν μεταξύ των μεγάλων διαύλων που σχηματίζονται μεταξύ των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού → τα μεγαλομόρια δεν κατακρατούνται από το πληρωτικό υλικό και εκλούονται – τα μικρά μόρια αλληλεπιδρούν με το πληρωτικό υλικό και κατακρατούνται

Πληρωτικά υλικά LPS

Κύρια διαφορά → διάμετρος στήλης και διάμετρος σωματιδίων



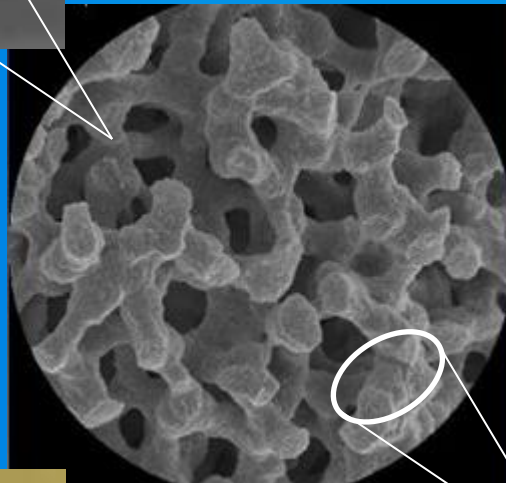
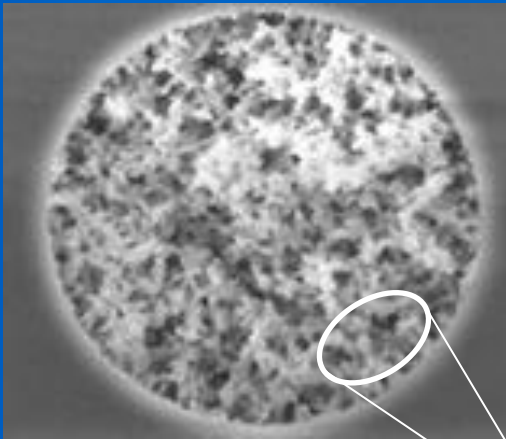
Ροή 3-5 mL min⁻¹  Στροβιλώδης ροή

- Σωματίδια πυριτίας (C2, C8 or C18, φαινυλ),
- Πολυμερικά σωματίδια (διασταυρωμένα διαπολυμερή στυρολίου-διβινυλβενζολίου.
- Πολυμερικά σωματίδια (διβινυλοβενζολίου-N-βινυλοπυρολιδόνης) - Oasis HLB

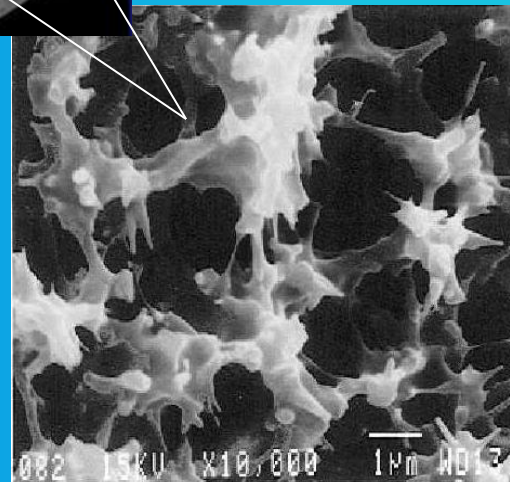
Μονολιθικές στήλες

Στήλες που αποτελούνται από ένα μόνο πολυμερισμένο τεμάχιο πυριτίας και όχι από σωματίδια → ράβδοι πληρωτικού υλικού (rods)

Πληρωτικό υλικό → πολυμερισμένο δίκτυο πυριτίας
Κατάλληλες για απευθείας έγχυση βιολογικών υποστρωμάτων



Μεγάλοι πόροι (μακρόποροι macropores, 2 μ m) → μειωμένη αντίσταση → υψηλή ροή



Μικροί πόροι (μεσοπόροι mesopores, 13 nm) → μεγάλη επιφάνεια → σημαντικός χρωματογραφικός διαχωρισμός

στροβιλώδης ροή

Μικρά μόρια (φάρμακα)



Κατανέμονται στους μικροπόρους
(ταχεία διάχυση)



Επαρκής διαχωρισμός

Μεγαλομόρια (πρωτεΐνες)



Διπερνούν τους μακροπόρους
(βραδεία διάχυση)



Έκλυση στο μέτωπο του διαλύτη

Ο διαχωρισμός είναι ανεξάρτητος της ροής → καλός διαχωρισμός και σε μεγάλες ταχύτητες ροής

Συνδεσμολογία για απευθείας προετοιμασία δείγματος
On-line sample preparation set-up

Δύο τύπων συνδεσμολογία

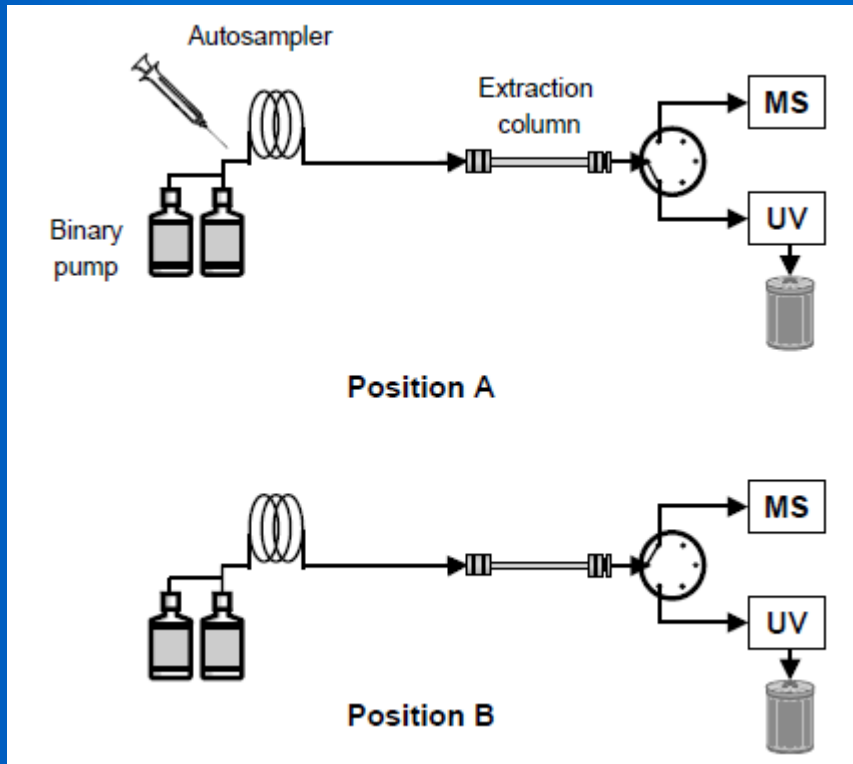
Απευθείας συνδεσμολογία (χρήση μιας στήλης)
single column or direct configuration

Συνδεσμολογία εναλλαγής στηλών
column-switching

Η εκχύλιση και ο διαχωρισμός
πραγματοποιούνται επί της ίδιας στήλης

Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε
διαφορετική στήλη από το διαχωρισμό

Απευθείας συνδεσμολογία



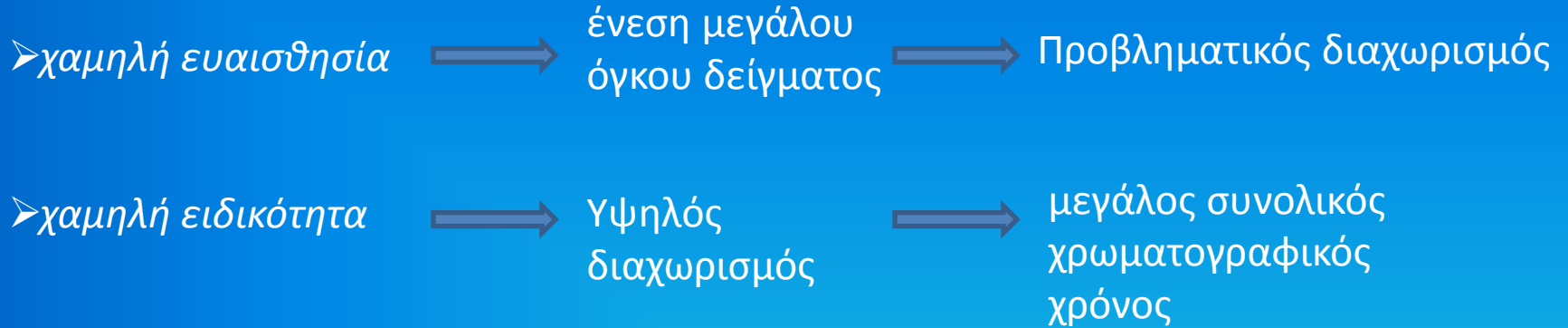
1. Εκχύλιση του δείγματος (εφαρμογή μίγματος διαλυτών υψηλού υδατικού περιεχομένου) – κατακράτηση του αναλύτη – έκλυση των μακρομορίων στο μέτωπο του διαλύτη
2. Έκλυση του αναλύτη (εφαρμογή μίγματος διαλυτών υψηλού οργανικού περιεχομένου)
3. Επανεξισορόπηση της στήλης (εφαρμογή μίγματος διαλυτών υψηλού υδατικού περιεχομένου)

Η ύπαρξη βαλβίδας εναλλαγής (switching valve) επιτρέπει την κατεύθυνση των ανεπιθύμητων μεγαλομορίων προς τα απόβλητα

Single column mode with UV detection

Ανίχνευση UV-Vis

Χαρακτηρίζεται από



δυσκολία σύζευξης απευθείας συνδεσμολογίας με ανίχνευση UV

Single column mode with MS detection

Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας

μεγάλη ειδικότητα

μεγάλη ευαισθησία (ng mL^{-1})

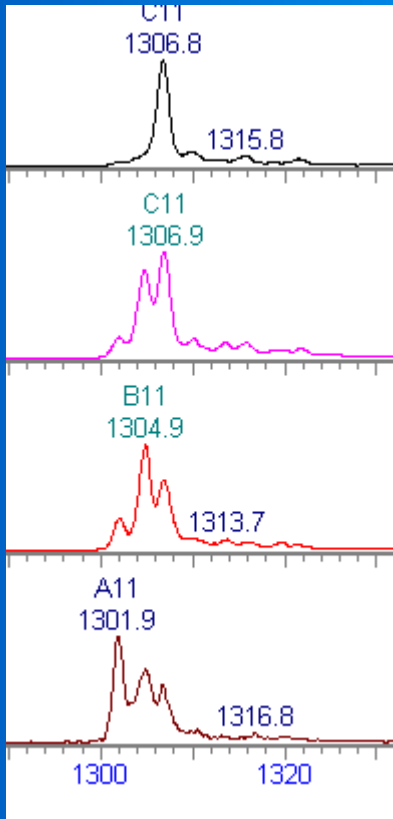
δεν απαιτείται πλήρης
διαχωρισμός

αύξηση ευαισθησίας με μείωση
της ροής ($\mu\text{L min}^{-1}$ - nL min^{-1})

χρήση μικρού μήκους
στηλών (π.χ. 50 mm)

αύξηση ευαισθησίας με χρήση
στηλών μικρής διαμέτρου
(1mm μbore -180 nm capillary)

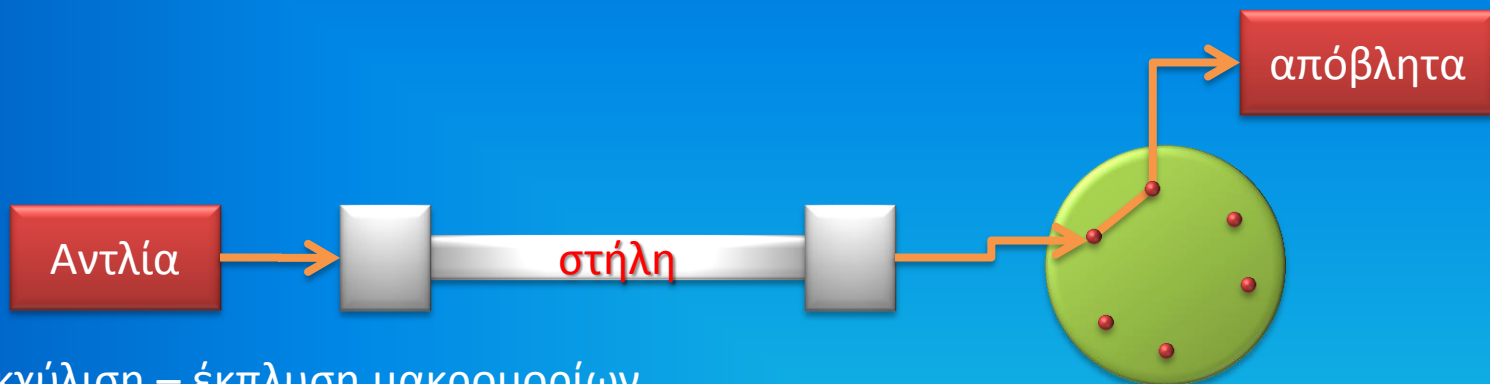
μείωση συνολικού χρόνου
ανάλυσης (<1 min)



Single column mode with MS detection

Απαιτήσεις συνδεσμολογίας

Χρήση βαλβίδας εναλλαγής (switching valve) μεταξύ στήλης και πηγής MS



Εκχύλιση – έκπλυση μακρομορίων
(υψηλό ποσοστό υδατικού διαλύτη – συγκράτηση
μικρών μορίων με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις)



έκπλυση μικρών μορίων
(υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη)

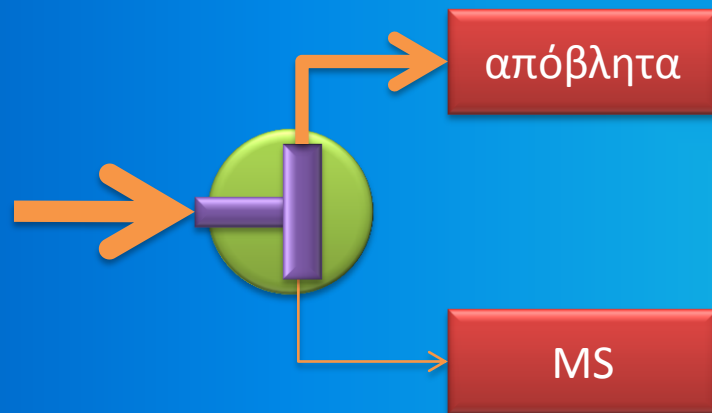
Επιλογή κινητής φάσης

- Χρήση πτητικών διαλυτών και αποφυγή μη πτητικών πρόσθετων (ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών και διαλυμάτων ζευγών ιόντων)

Επιλογή ροής

Συμβατότητα ανίχνευσης ροής με φασματομετρία μάζας
(5-10 $\mu\text{L min}^{-1}$ – ESI - 50-500 $\mu\text{L min}^{-1}$ - υποβοηθούμενος ESI - συμβατότητα με στροβιλώδη ροή \rightarrow 5-10 mL min^{-1})

- Χρήση διαμοιραστή ροής



- Χρήση στηλών μικρής διαμέτρου

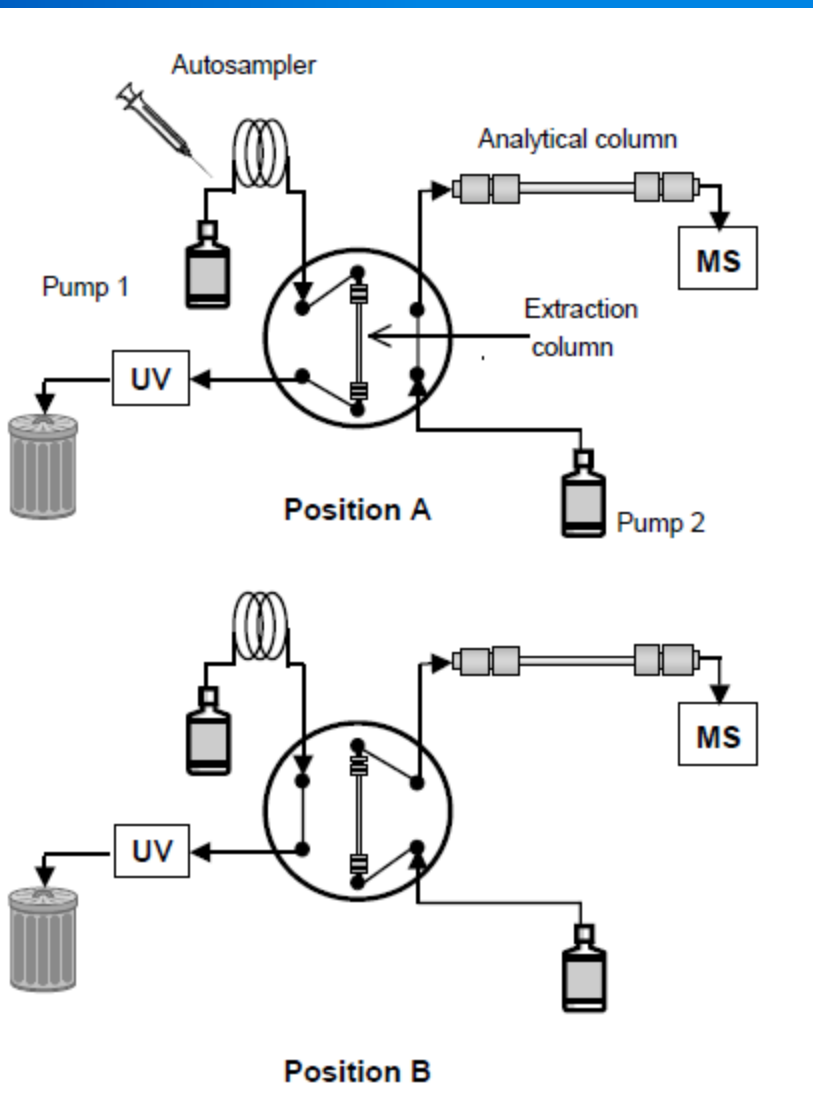
Εκλεκτικότητα

Φασματομετρία μάζας \rightarrow εγγενής εκλεκτικότητα \rightarrow ΠΡΟΒΛΗΜΑ \rightarrow φαινόμενο υποστρώματος (matrix effect): η συνέκλουση ουσιών περιορίζει την δημιουργία ιόντων \rightarrow μικρότερο αναλυτικό σήμα

ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ προσεκτική μελέτη για την αποφυγή του φαινομένου υποστρώματος

Συνδεσμολογία εναλλαγής στηλών column-switching

Η εκχύλιση (και προσυγκέντρωση) του δείγματος γίνεται σε **διαφορετική** στήλη από την χρωματογραφική ανάλυση



Χρήση βαλβίδας εναλλαγής και δεύτερης αντλίας

Βαλβίδα εναλλαγής στη θέση A και αντλία 1 → το δείγμα περνάει από τη στήλη εκχύλισης → απομακρύνονται τα μακρομόρια → τα μικρά μόρια συγκρατούνται στη στήλη εκχύλισης με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Βαλβίδα εναλλαγής στη θέση B και αντλία 2 → το δείγμα περνάει από την στήλη έκλουσης (αντίστροφη ροή) → ενίεται στην αναλυτική στήλη → τα μικρά μόρια χρωματογραφούνται στην αναλυτική στήλη
Ταυτόχρονα εκπλένεται και στη συνέχεια εξισορροπείται η στήλη έκλουσης

Συνήθως RAM και LPS

Συνδεσμολογία εναλλαγής στηλών
column-switching

Εκλεκτικότητα

- Χρήση διαφόρων συνδυασμών αναλυτικής και στήλης εκχύλισης → αύξηση της εκλεκτικότητας
- Στήλη εκχύλισης → μικρότερη κατακράτηση από την αναλυτική στήλη

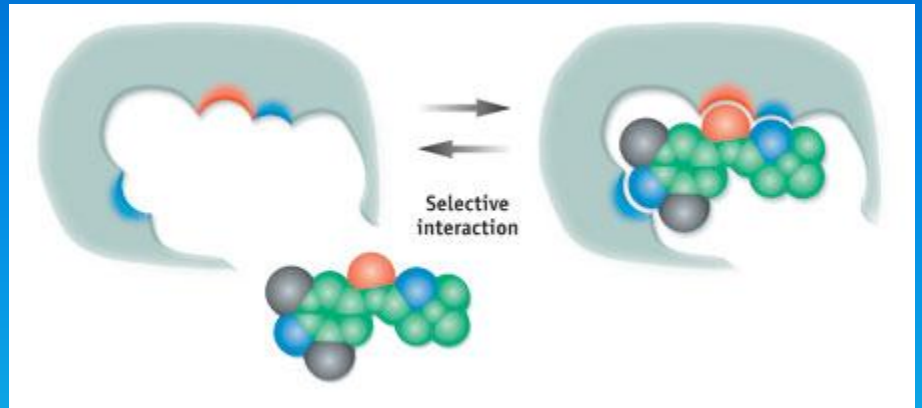
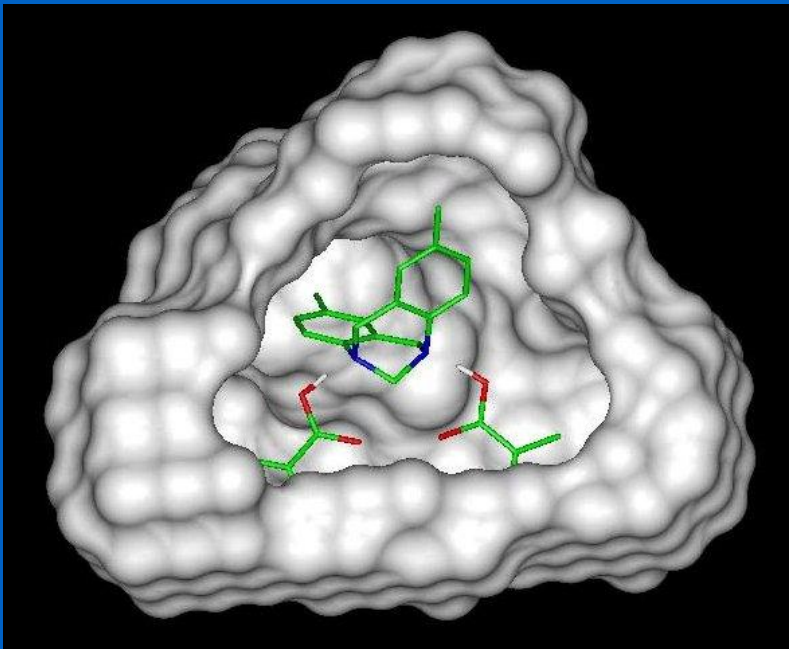
Ευαισθησία

- Αύξηση ευαισθησίας λόγω της προσυγκέντρωσης του δείγματος

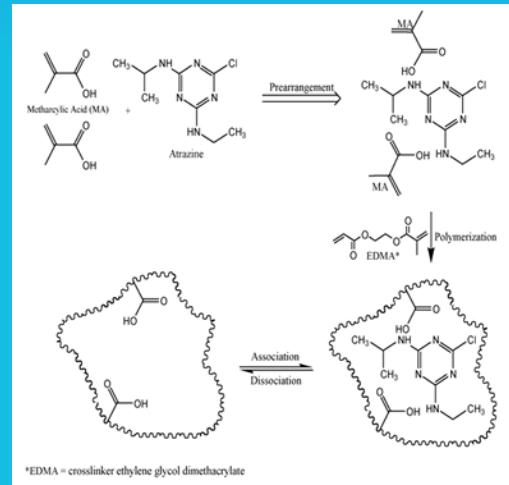
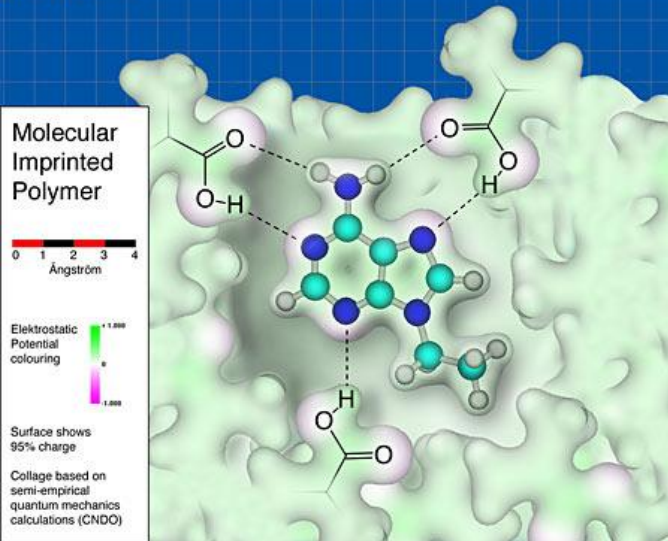
Χρόνος ανάλυσης

- Χρήση μικρού μήκους αναλυτικών στηλών → μείωση του χρόνου ανάλυσης
- Συνδυασμός περισσότερων συσκευών (10-port or 6-port switching-valves)
→ παράλληλη επεξεργασία → μείωση του χρόνου ανάλυσης (π.χ. κατά την ανάλυση με δείγματος σε 2^η στήλη εκχύλισης η 1^η εξισσοροπείται)

Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή
Molecularly Imprinted Polymers MIPS



© 2004 Weisch & Partner, Tübingen
scientific multimedia

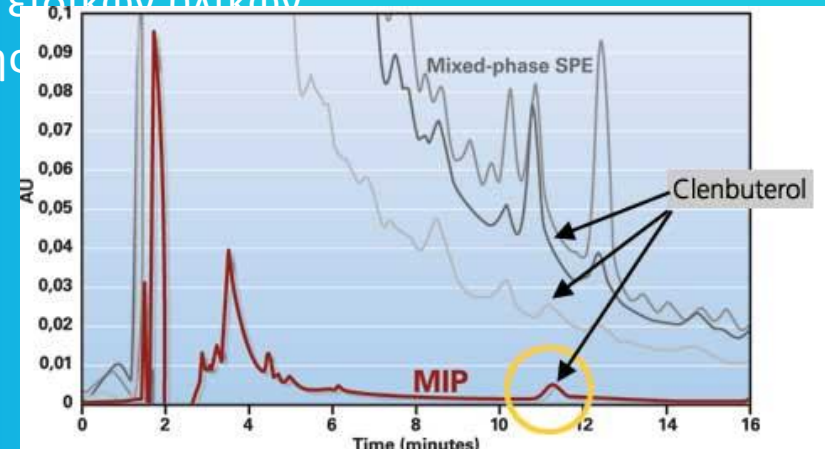
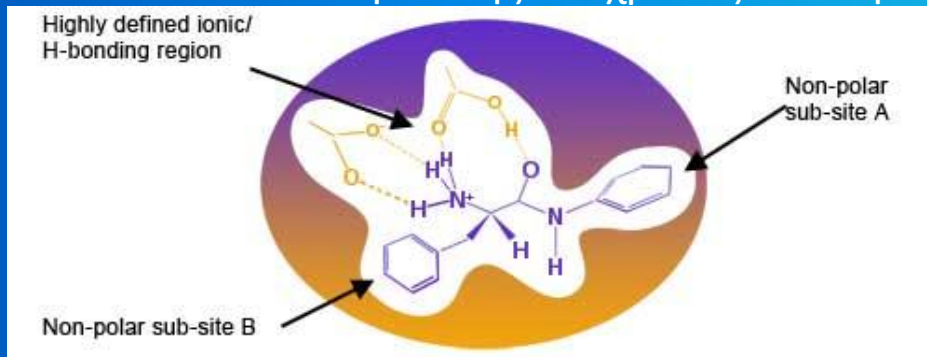


Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (ΜΑΠ): συνθετικά πολυμερή που χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα αναγνώρισης «πρότυπων» μορίων

Διαθέτουν πολύ υψηλή ειδικότητα – παρομοιάζουν με αντισώματα και ένζυμα

Πλεονεκτήματα (σύγκριση με ανοσοχημικές μεθόδους)

- υψηλότερη δυνατότητα φόρτωσης
- ανθεκτικότητα σε διάφορες συνθήκες
 - ακραίες τιμές pH (95% ικανότητας δέσμευσης μετά από 24ωρη έκθεση σε αυτόκλειστο, 10M HCl, 25% NH₃).
 - ακραίες τιμές θερμοκρασίας 150°C (σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αποκαρβοξυλίωση)
 - ουδετερότητα σε οξέα βάσεις αλλά και οργανικούς διαλύτες
- χαμηλό κόστος κατασκευής
- ευκολία κατασκευής
- δυνατότητα κατασκευής μεγάλης σειράς πολύ ειδικών υλικών
- ευκολία αποθήκευσης και χρόνος αποθήκευσης



Τρόπος κατασκευής MIPS

Πρότυπο μόριο
(template molecule)

Μονομερές

κατάλληλος
διαλύτης

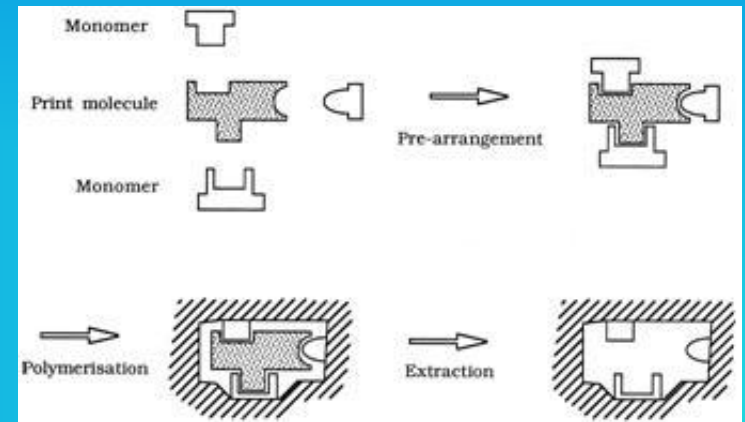
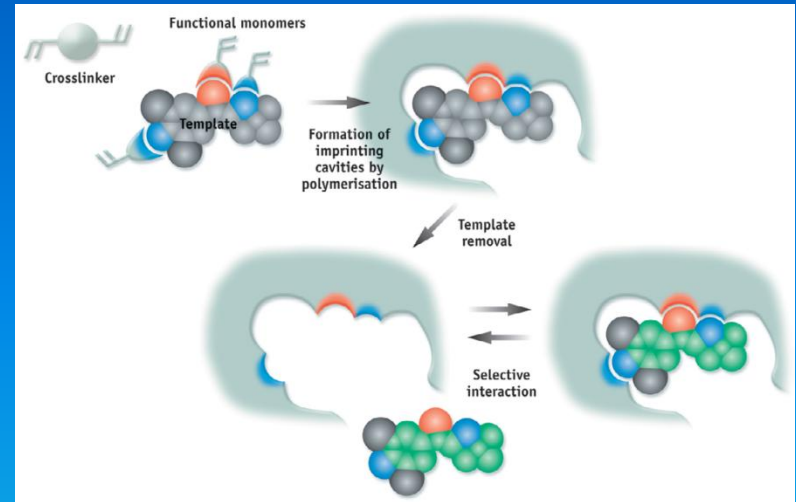
Σχηματισμός συμπλόκων

Προσθήκη
μονομερών
πολυμερισμού

Σχηματισμός ενεργοποιημένου πολυμερούς
-πρότυπης ουσίας

Έκπλυση
πρότυπου
μορίου

Σχηματισμός ενεργοποιημένου πολυμερούς (MIP)



- Χρήση του αναλύτη ως προτύπου ΜΟΝΟ όταν δεν υπάρχει άλλη επιλογή (bleeding)
- Επιλογή των κατάλληλων χαρακτηριστικών ομάδων και της στερεοδιαταξής τους (ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη εκλεκτικότητα)
- Επιλογή κατάλληλων μονομερών που δημιουργούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις στον επιλεγμένο διαλύτη (αύξηση του αριθμού και του βαθμού ομοιογένειας των θέσεων σύνδεσης)
- Επιλογή προτύπων και μονομερών καλά διαλυτών στον διαλύτη σχηματισμού πόρων (porogenic solvent)
- Το μίγμα πολυμερισμού (πρότυπο – μονομερή) είναι σταθερό – δεν προκαλεί παράλληλες αντιδράσεις πολυμερισμού
- Επιλογή του τύπου πολυμερισμού (και των μονομερών di- or tri-unsaturated crosslinking monomers (e.g., vinylic, acrylic, methacrylic, acrylamide, etc.)) ανάλογα με το υπόστρωμα της ανάλυσης (πλάσμα ούρα αλλά και οργανικός διαλύτης κ.α)

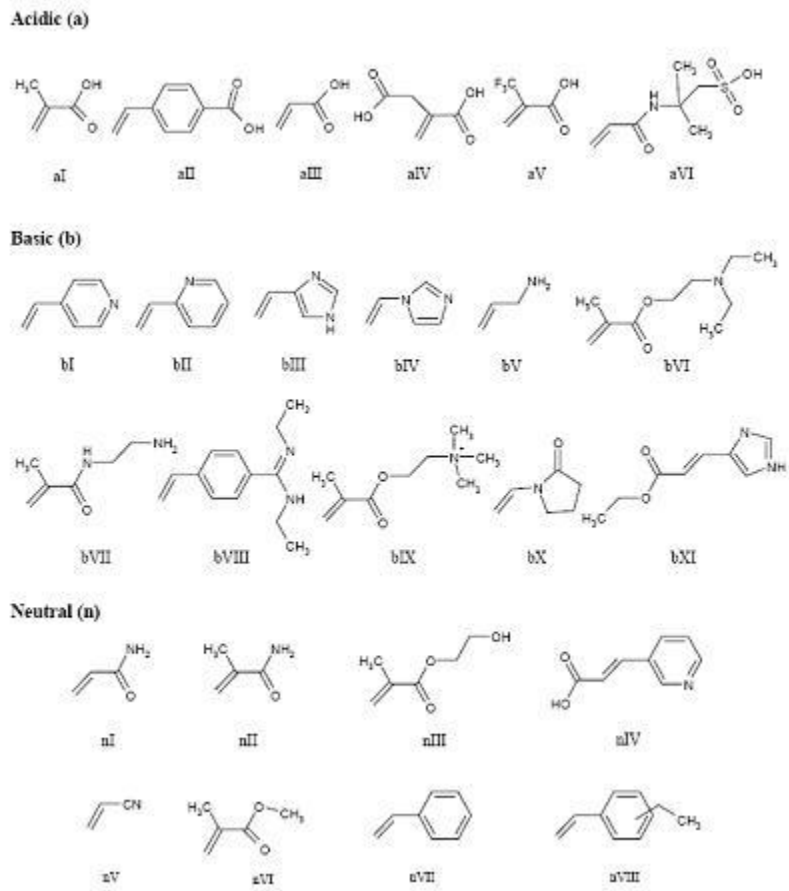
Πρότυπα μόρια

Κύριος παράγοντας (καθοδηγεί τη διαδικασία σχηματισμού MIPS).

Αδρανές κατά τη διαδικασία πολυμερισμού

1. Δεν περιέχει ομάδες ικανές να πολυμερισθούν
2. Δεν περιέχει ομάδες που αναστέλλουν ή παρεμποδίζουν τη διαδικασία πολυμερισμού (θειόλες, υδροκινόνες κ.α.)
3. Ανθεκτικό σε ελαφρά αυξημένες οερμοκρασίες ή κατά την έκθεση σε ακτινοβολία UV (π.χ. AIBN → έναρξη διαδικασίας πολυμερισμού 60°C ή ακτινοβολία UV)

Δομικά μονομερή



- Υπεύθυνα για τον σχηματισμό της θέσης πρόσδεσης.

- Χρησιμοποιούνται σε περίσσεια ως προς το πρότυπο μόριο (>1:4 → συνηθισμένη αναλογία μη ομοιοπολικής μεθόδου).

- Η αρχή της μεθόδου χρησιμοποιεί την μέγιστη δυνατή αλληλεπίδραση των δομικών μονομερών με τα πρότυπα μόρια (δεσμοί H, Van der Waals κλπ) μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών τους για τον σχηματισμό των συμπλόκων.

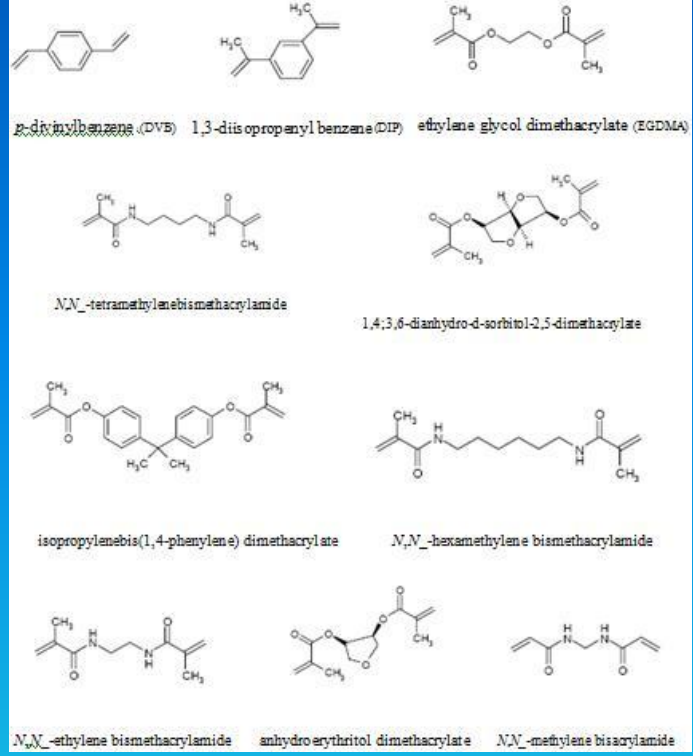
- Κατά τον σχηματισμό συμπολυμερών είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη οι «ενεργές αναλογίες» των συμπολυμερών προκειμένου να διασφαλιστεί η δυνατότητα συμπολυμερισμού.

Παράγοντες διασταύρωσης

- Ελέγχουν την μορφολογία του
- Σταθεροποιούν την θέση πρόσδεσης
- Επηρεάζουν την μηχανική σταθερότητα

Γενικά χρησιμοποιούνται διαδικασίες υψηλού βαθμού διασταύρωσης >80% (high cross-link ratios) για την δημιουργία μακροπόρων και την αυξημένη μηχανική σταθερότητα.

Μικρός αριθμός παραγόντων διασταύρωσης μπορούν να δράσουν και ως δομικά πολυμερή.



Διαλύτες (πορογενικοί παράγοντες)

- Διαλύουν όλους παράγοντες πολυμερισμού
- Δημιουργούν τους μακροπόρους (πορογενικοί παράγοντες) → ελέγχουν το μέγεθος των πόρων και την ειδική επιφάνεια → κατάλληλοι θερμοδυναμικά διαλύτες οδηγούν σε κατάλληλους μορφολογικά πόρους και υψηλή ειδική επιφάνεια. Μπορεί να οδηγήσουν σε μεγιστοποίηση της αλληλεπίδρασης δομικών μονομερών και προτύπου μορίου (π.χ. Μη πολικοί διαλύτες π.χ. τολουόλιο οδηγούν σε σχηματισμό δεσμών H)

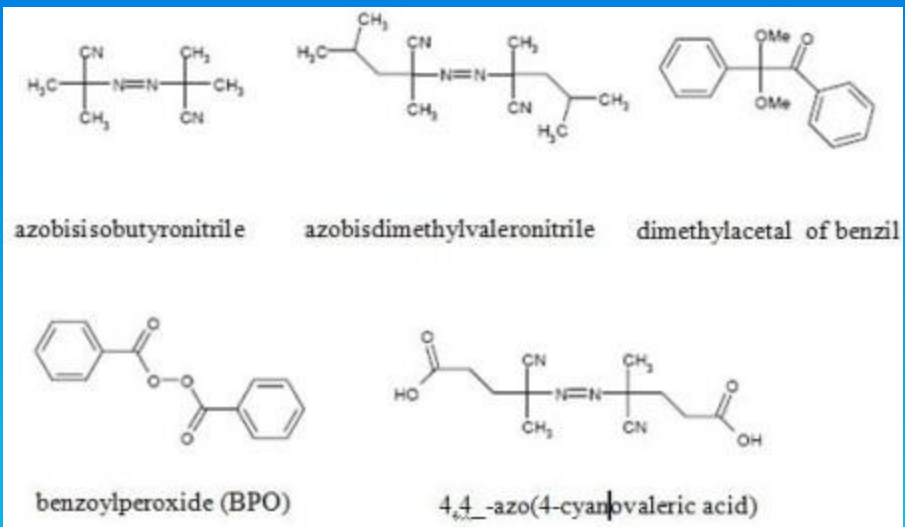
Παράγοντες έναρξης πολυμερισμού (initiators)

Επάγουν την έναρξη του πολυμερισμού (δημιουργία ελευθέρων ριζών)

Ελέγχουν την διαδικασία πολυμερισμού π.χ. φωτοασταθείς → οδηγούν σε διαδικασίες έναρξης μέσω ακτινοβολήσης

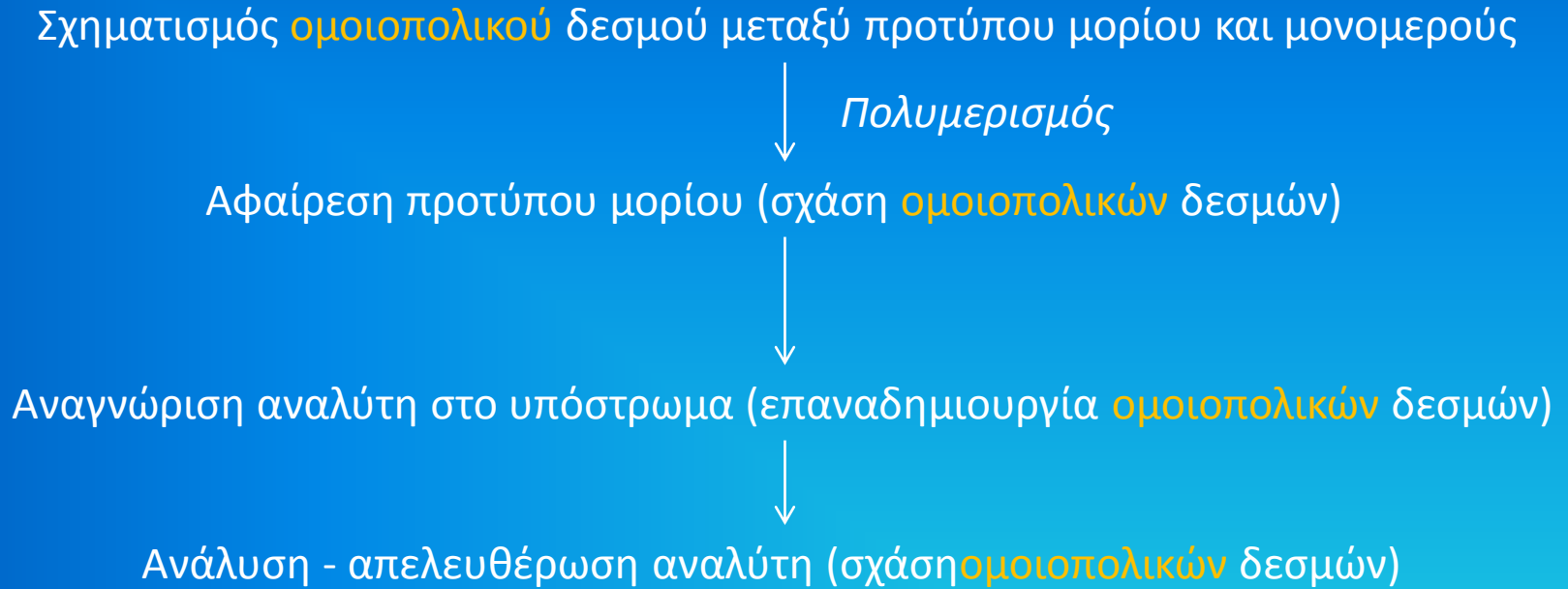
Θερμοασταθείς → οδηγούν σε διαδικασίες έναρξης μέσω αύξησης θερμοκρασίας

Όταν π.χ. Το πρότυπο μόριο είναι θερμοευαίσθητο χρησιμοποιούνται φωτοασταθείς παράγοντες έναρξης πολυμερισμού



Μέθοδοι κατασκευής MIPS

Ομοιοπολική μέθοδος



Πλεονέκτημα: δημιουργία ομοιογενούς πληθυσμού θέσεων σύνδεσης (λόγω σταθερότητας του συμπλόκου κατά την διαδικασία του πολυμερισμού)

Μειονέκτημα: απαιτούνται έντονες συνθήκες για την απελευθέρωση του αναλύτη

Μη-ομοιοπολική

Σχηματισμός **μη-ομοιοπολικού** δεσμού μεταξύ προτύπου μορίου και μονομερούς



Πολυμερισμός

Αφαίρεση προτύπου μορίου (σχάση **μη-ομοιοπολικών** δεσμών)



Αναγνώριση αναλύτη στο υπόστρωμα (μέσω **μη-ομοιοπολικών** δεσμών)



Ανάλυση - απελευθέρωση αναλύτη (σχάση **μη-ομοιοπολικών** δεσμών)

Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος

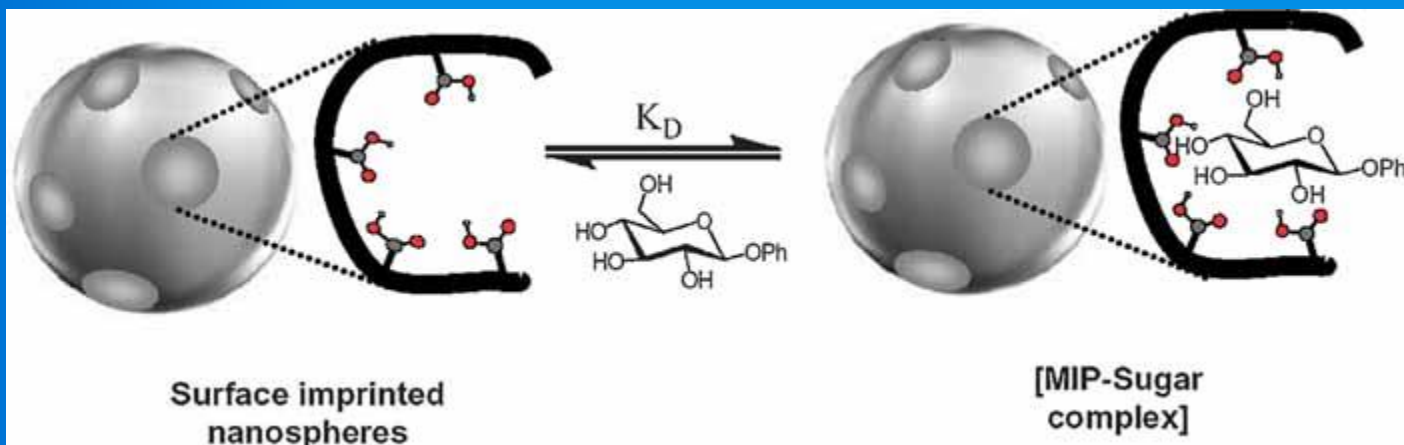
Σχηματισμός συμπλόκου → οφείλεται σε μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί H, Van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου)

Πλεονέκτημα: Απλή. Μεγάλη δυνατότητα επιλογής διαθέσιμων μονομερών. Η αφαίρεση του προτύπου είναι δυνατή μέσω απλής εκχύλισης. Προσομοιάζει φυσικές διαδικασίες.

Μειονέκτημα: Η κινητική της δέσμευσης εξαρτάται από την ισοροπία σχηματισμού του συμπλόκου μονομερους – προτύπου (απαιτείται μεγάλη ποσότητα συμπλόκου προκειμένου να ωθήσει την αντίδραση σχηματισμού προς τα δεξιά)

πρότυπο + μονομερές → πρότυπο-μονομερές

Ενσωμάτωση περίσσειας προτύπου → μη ειδική δέσμευση (συχνό πρόβλημα)



Ημι-ομοιοπολική

Σχηματισμός **ομοιοπολικού** δεσμού μεταξύ προτύπου μορίου και μονομερούς



Πολυμερισμός

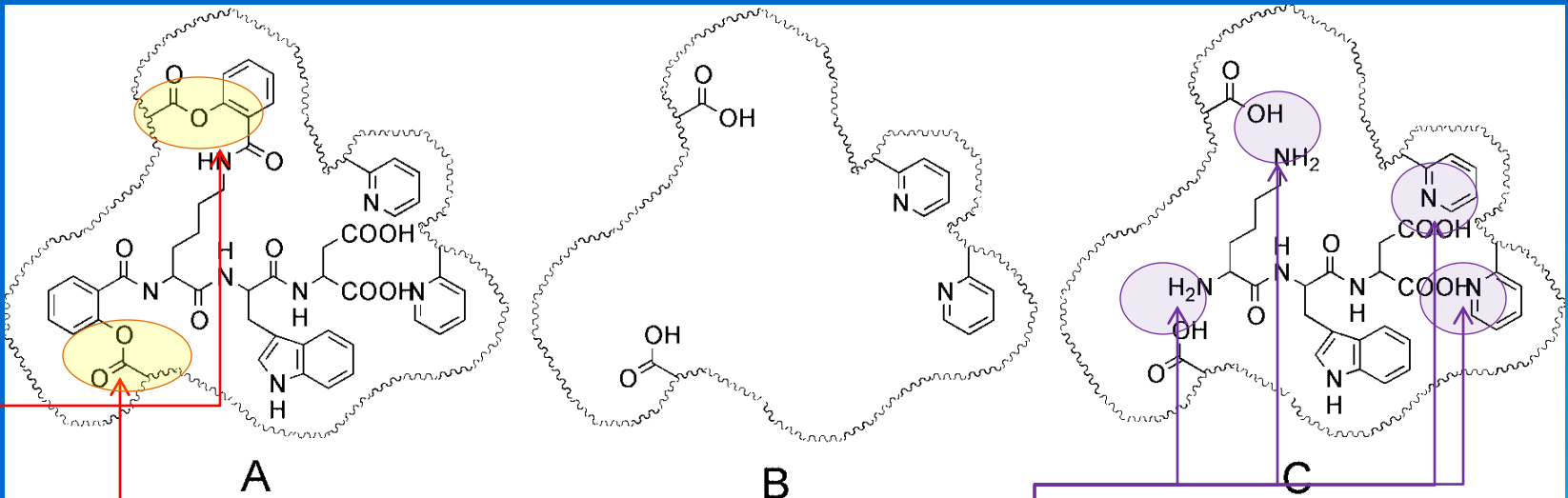
Αφαίρεση προτύπου μορίου (σχάση **ομοιοπολικών** δεσμών)



Αναγνώριση αναλύτη στο υπόστρωμα (μέσω **μη-ομοιοπολικών** δεσμών)

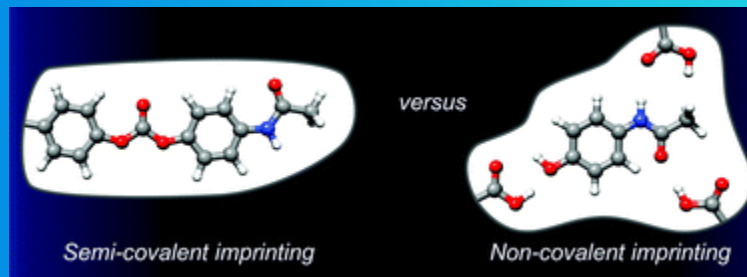


Ανάλυση - απελευθέρωση αναλύτη (σχάση **μη-ομοιοπολικών** δεσμών)



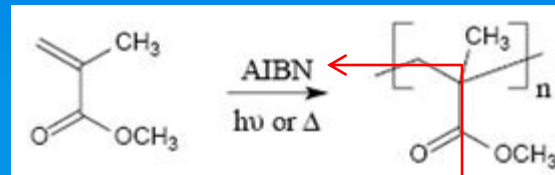
Διαδικασία ΜΑΠ για το τριπεπίδιο Lys-Trp-Asp

- Σχηματισμός πολυμερούς μέσω ομοιοπολικών δεσμών using both covalent and non-covalent interactions.
- Υδρόλυση και σχηματισμός κοιλότητας ΜΑΠ
- Αναγνώριση μόνο με μη – ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις



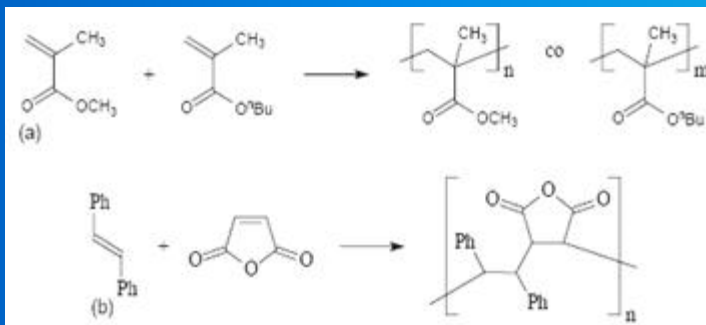
Διαδικασίες πολυμερισμού

Μέσω ελευθέρων ριζών: Εύκολη διαδικασία. Υψηλές αποδόσεις. Ήπιες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Πολυμερισμός σε στερεά κατάσταση (bulk) ή σε διάλυμα. Μικρό κόστος.



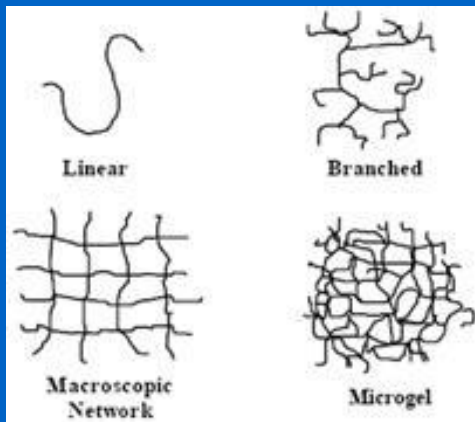
Αζωισοβουτυρονιτρίλιο
(radical chain initiator)

Διαδικασία συμπολυμερισμού



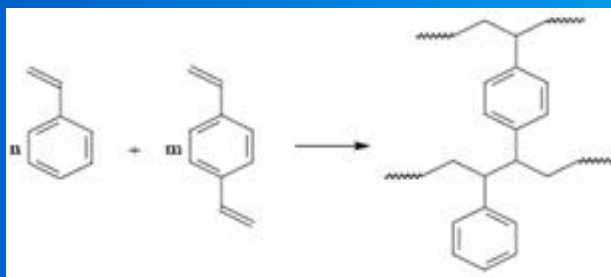
Ενσωμάτωση διαφορετικών πολυμερών \rightarrow εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του κάθε πολυμερούς στο αρχικό μίγμα μονομερών. Μπορεί να μεταβάλει τι φυσικές ιδιότητες των πολυμερών

Ενσωμάτωση διαφορετικών πολυμερών \rightarrow εξαρτάται από τον τύπο του πολυμερούς. Μαλεϊκός ανυδρίτης + στυλβένιο δίνουν μικτό πολυμερές 1:1



Μονομερή με μια δραστική ομάδα πολυμερισμού → γραμμικά πολυμερή

Πολυμερή με πολλές δραστικές ομάδες πολυμερισμού → διασταυρωμένα πολυμερή

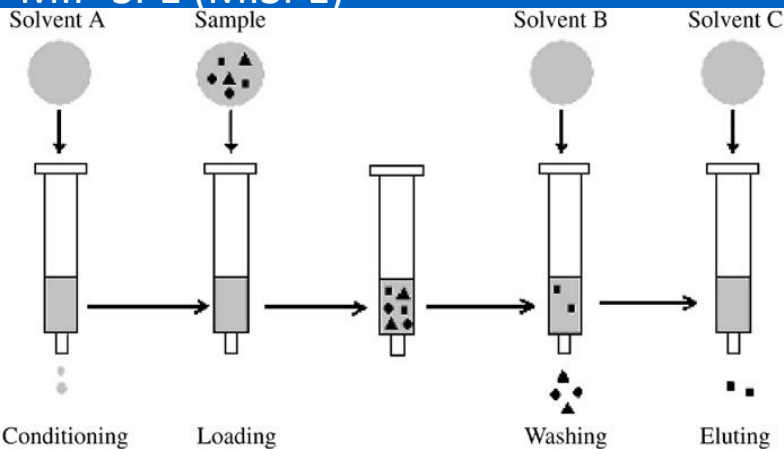


Πολυμερισμός στυρενίου με διβινυλοβενζόλιο → διακλαδισμένα πολυμερή



Τα MIPS είναι διακλαδισμένα πολυμερή (σπανίως γραμμικά πολυμερή)

MIP-SPE (MISPE)



Μη διαδοχική (off-line) διαδικασία

- παρόμοια με το SPE αντίστροφης φάσης
- 15–500 mg MISPE
- διαδικασία
 - Εξισορόπησης,
 - εφαρμογής,
 - έκπλυσης και
 - έκλουσης

Εξισορόπηση –

Προετοιμασία του πληρωτικού υλικού

1. με τον διαλύτη έκλουσης → έκπλυση υπολειματικών προσμίξεων
2. με τον διαλύτη εφαρμογής ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης έκλουσης του προηγούμενου σταδίου → ενεργοποίηση των θέσεων σύνδεσης

Εφαρμογή -

Σύνδεση του αναλύτη ποσοτικά και εκλεκτικά με το πληρωτικό υλικό. Εξαρτάται από το είδος του διαλύτη κατά τη διαδικασία πολυμερισμού. Συνήθως η σύνδεση οφείλεται σε ηλεκτροστατικές δυνάμεις π-π, δεσμούς Η και ιονικές αλληλεπιδράσεις → για να δημιουργηθούν οι ΕΙΔΙΚΟΙ δεσμοί αναγνώρισης ο διαλύτης δεν πρέπει να δημιουργεί τέτοιους δεσμούς (αλλιώς παρατηρούνται μη ειδικές αλληλεπιδράσεις) → χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας (ACN, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , τολουόλιο). Ιδανικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο διαλύτης πολυμερισμού (σε αυτόν δημιουργήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις). Χρήση διαλύτη έκπλυσης που επαναφέρει την ειδικότητα

Έκπλυση – Μεγιστοποίηση ΕΙΔΙΚΩΝ αλληλεπιδράσεων και έκλυση παρεμποδίσεων.

Χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας στους οποίους είναι διαλυτές οι παρεμποδίσεις - ο πορογενικός διαλύτης είναι συχνά ιδανική επιλογή (κυρίως για ιονικές αλληλεπιδράσεις).

Προσθήκη μικρού ποσοστού πολικού διαλύτη → μπορεί να αυξήσει την ειδικότητα

Σε περιπτώσεις χρήσης υδατικών διαλυμάτων → στέγνωμα MIP υπό κενό ή με εφαρμογή ρεύματος N_2 .

Έκλυση - Χρήση μεγάλης εκλυστικής ισχύος (πολικοί διαλύτες – ACN, πρωτικοί διαλύτες – MeOH)

Συχνά απαιτείται χρήση οργανικού τροποποιητή π.χ. ασθενούς οξέος AcOH ή ασθενούς βάσης NEt_3 , προκειμένου να διαταραχθούν οι ισχυροί δεσμοί αναλύτη – MIP.

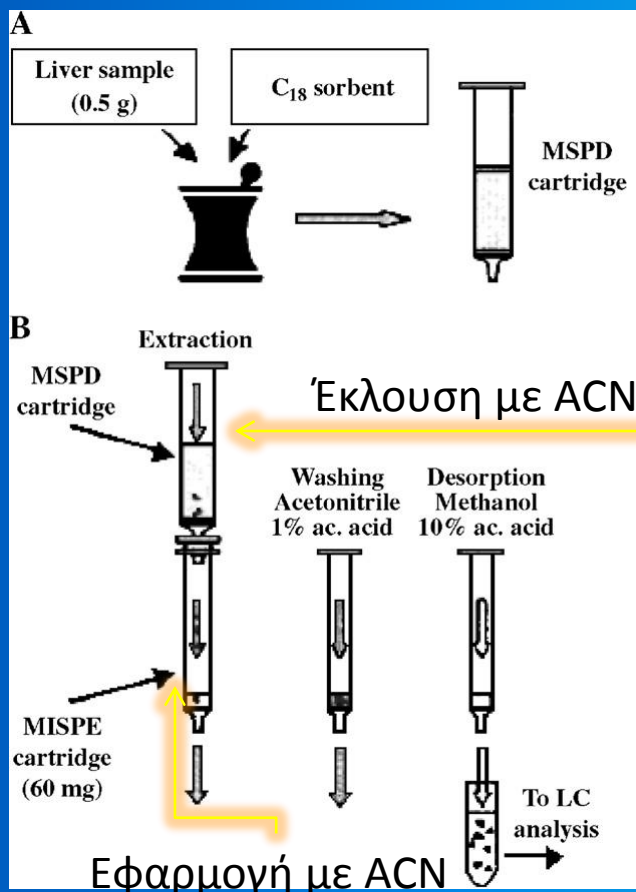


Συχνά → εξάτμιση διαλύτη → επανασύσταση (reconstitution) με συμβατό για τη μέθοδο διαχωρισμού διαλύτη

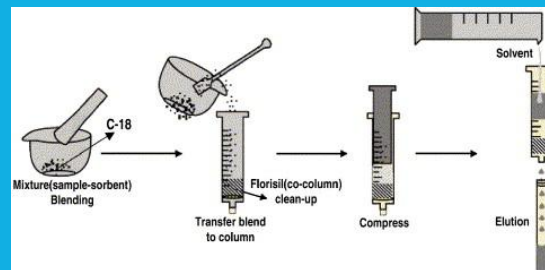
Εφαρμογή σε βιολογικά δείγματα

Βιολογικά υγρά (ούρα, ορός πλάσμα)
Ιστούς (ήπαρ, νεφροί, μυϊκός ιστός)
Φυτικά δείγματα

παράδειγμα → προσδιορισμός κλενβουτερόλης σε ηπατικό ιστό



matrix solid-phase dispersion εφαρμογή πληρωτικού υλικού C₁₈ στο ομογενοποίημα ηπατικού ιστού → συναρμογή σε φυσιγγίο εκχύλισης στερεάς φάσης

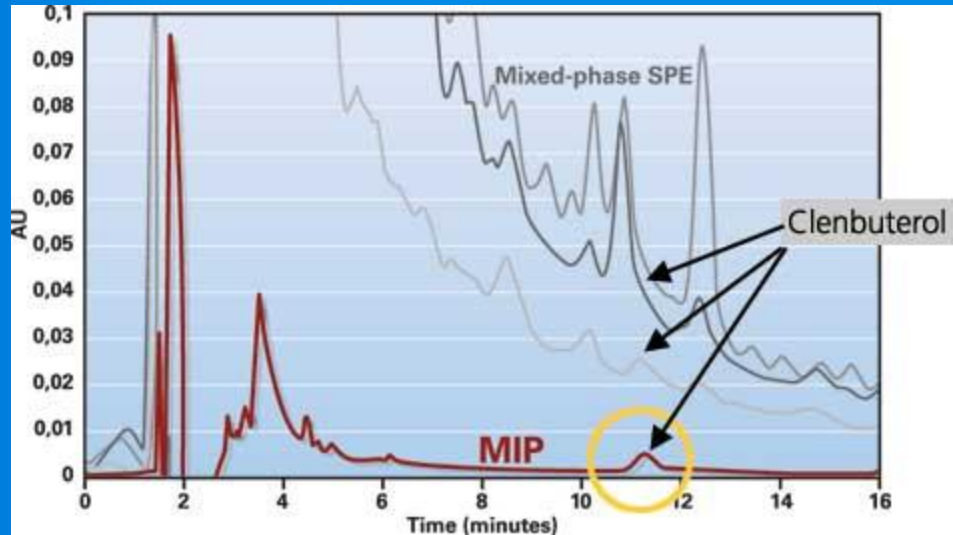


Προετοιμασία MIP με πρότυπο μόριο βρωμοκλενβουτερόλη (πορογενής διαλύτης ACN – εκλεκτική προσρόφηση κλενβουτερόλης)

Εφαρμογή δείγματος με ACN (εκχύλιση MSPD) – Έκλυση με ACN – 1% AcOH (απομάκρυνση παρεμποδισέων)

Έκλυση με MeOH – 10% AcOH (καταστροφή δεσμών H)

Υψηλή εκλεκτικότητα
Λιγότερες παρεμποδίσσεις (αύξηση χρόνου
ζωής της στήλης)
Μείωση του ορίου ανίχνευσης



Δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου με on-line
χρήση σε σύζευξη με αναλυτική στήλη