Хроматофокусирование: новые подходы в концентрировании и разделении

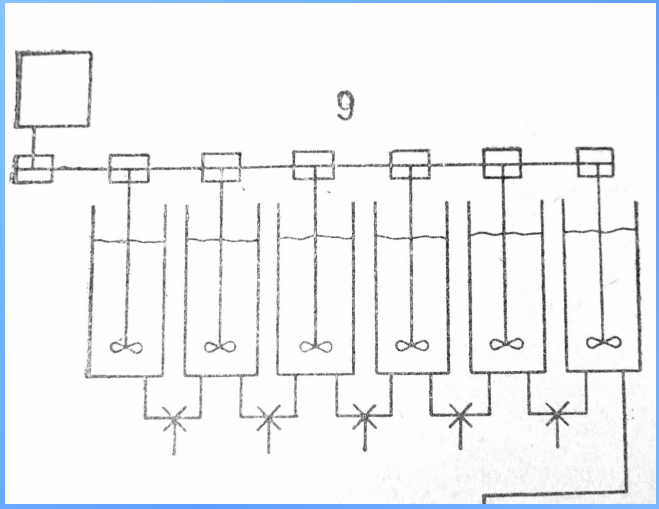
А.В.Иванов

Градиенты pH

<u>Доколоночные (внешние)</u>

- Только подвижные фазы
- Необходимы смесители и т.д.

[пример узла установки “Waters ALC-100”, 1978 г.]



<u>Внутриколоночные (внутренние)</u>

- Подвижные полибуферные фазы + сорбент
- Оборудование для изократического элюирования

Хроматофокусирование (ХФ)

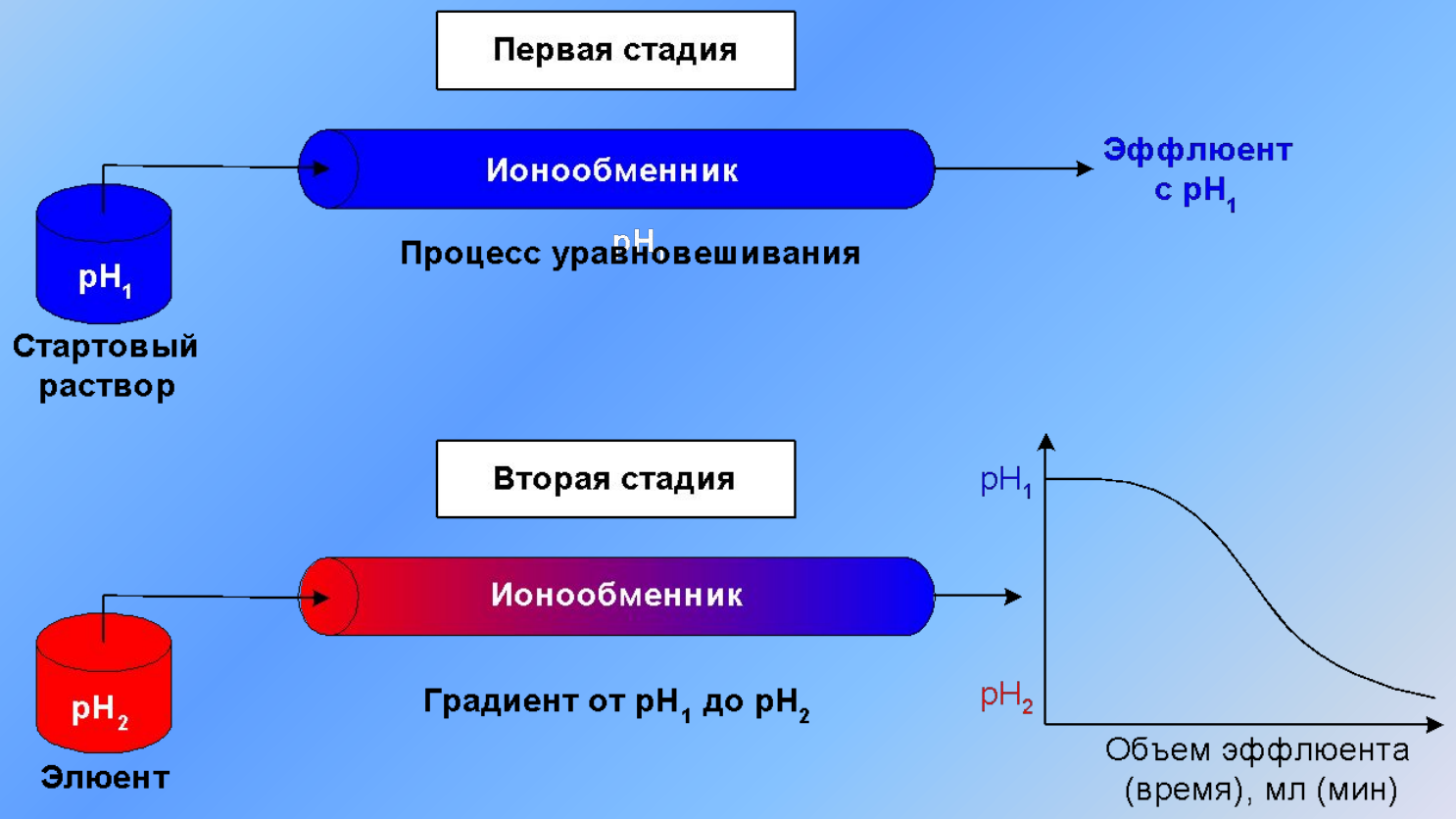
- **Метод** ионообменной хроматографии, основанный на формировании линейного градиента pH внутри колонки (**L.Sluyterman**; Uppsala, 1979-81)

объекты: биологические биполярные соединения (белки, ферменты, и т.д.)

- **Техника** получения градиента pH в уравновешенной стартовым раствором **СР** колонке (pH_1) при пропускании буферного элюента **Э** (pH_2)
- Слабоосновный **анионообменник** ($-NR_2$) – **нисходящий** градиент;

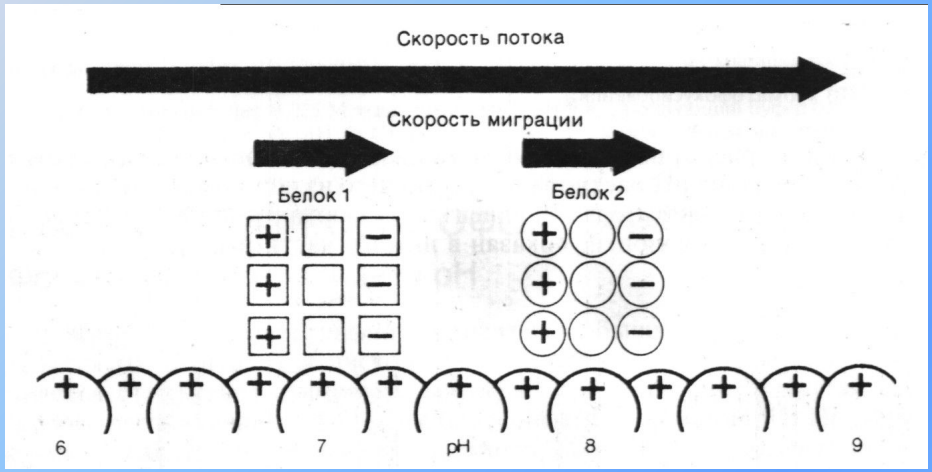
  Слабокислотный **катионообменник** (-COOH)- **восходящий** градиент

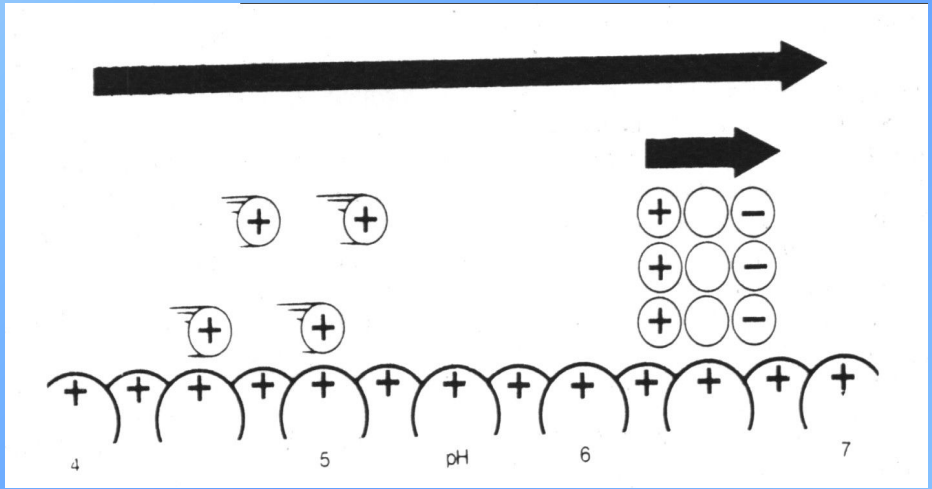
Техника хроматофокусирования (ХФ)

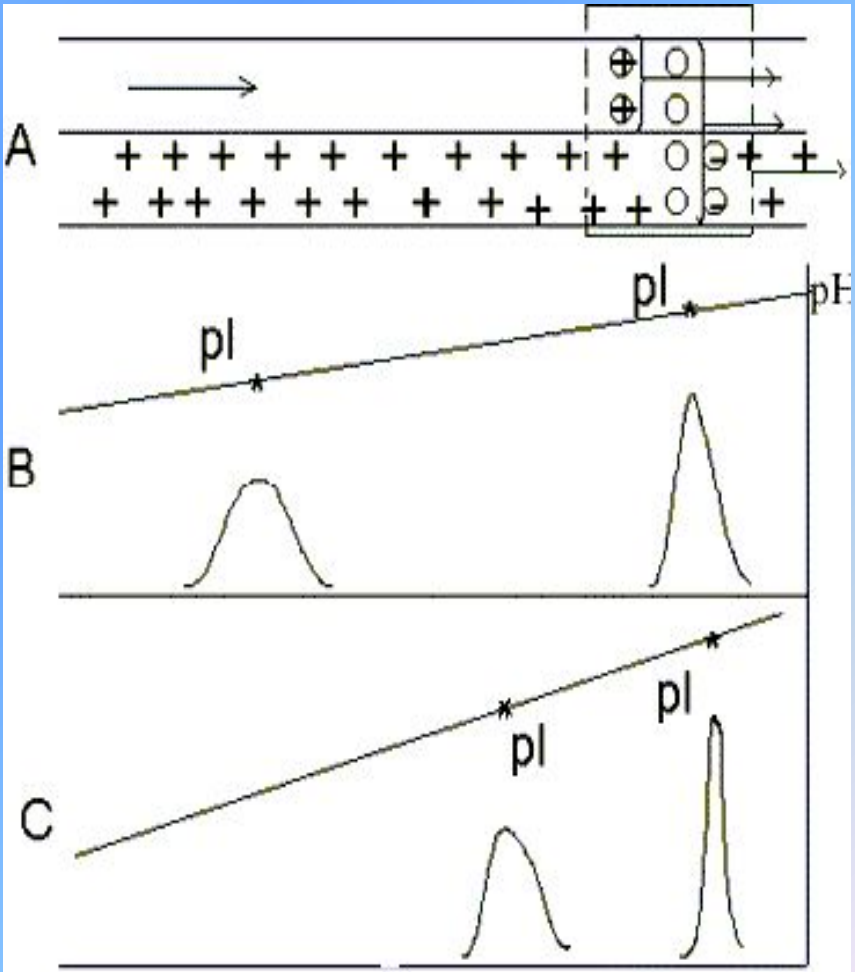


Фокусирующий эффект при разделении биполярных соединений

(из книги “Хроматофокусирование полибуфером на ПБИ”, Stockholm-Uppsala, 1982)







Преимущества хроматофокусирования

- **не требуется** дополнительное оборудование (градиентный насос, система смесителей);
- **высокая** нагрузочная **емкость** колонок, **концентрирование** и **разделение** на одной колонке;
- высокая **воспроизводимость** градиентов (**s_r**≤0,02), **широкий** рабочий **интервал pH** (до 4-5 ед.);
- **фокусирующий** эффект (для биполярных соединений)

НО:

<u>основное ограничение</u> – полиамфолитные элюенты

Новые направления ХФ

1. Техника ХФ для концентрирования и разделения переходных металлов

3. ХФ пептидов на сульфокатионитах (не имеют буф. емкости)

2. Поиск простых подвижных фаз для ХФ (одно-, двухкомпонентные

1. Хроматофокусирование ионов переходных металлов

- **Анионообменные** сорбенты: PBE-94 (Pharmacia); кремнеземы (Силохром, Силасорб) с привитыми олигоэтиленаминами – En-, Dien-, Tetren-; AP- (аминопропил-)
- **Катионообменные** сорбенты: полимеры (МГЦ, ССПС и ПММА) с привитыми карбоксильными группами -COOH, $-CH_2COOH$

- **Удерживание** ионов металлов за счет комплексообразования при более высоких pH и элюирование при плавном снижении pH в слое сорбента (концентрирование и разделение)

Комплексообразующие сорбенты

для ХФ ионов металлов

(**впервые** – **нисходящие** градиенты pH на карбоксильных сорбентах)

[12 сорбентов]

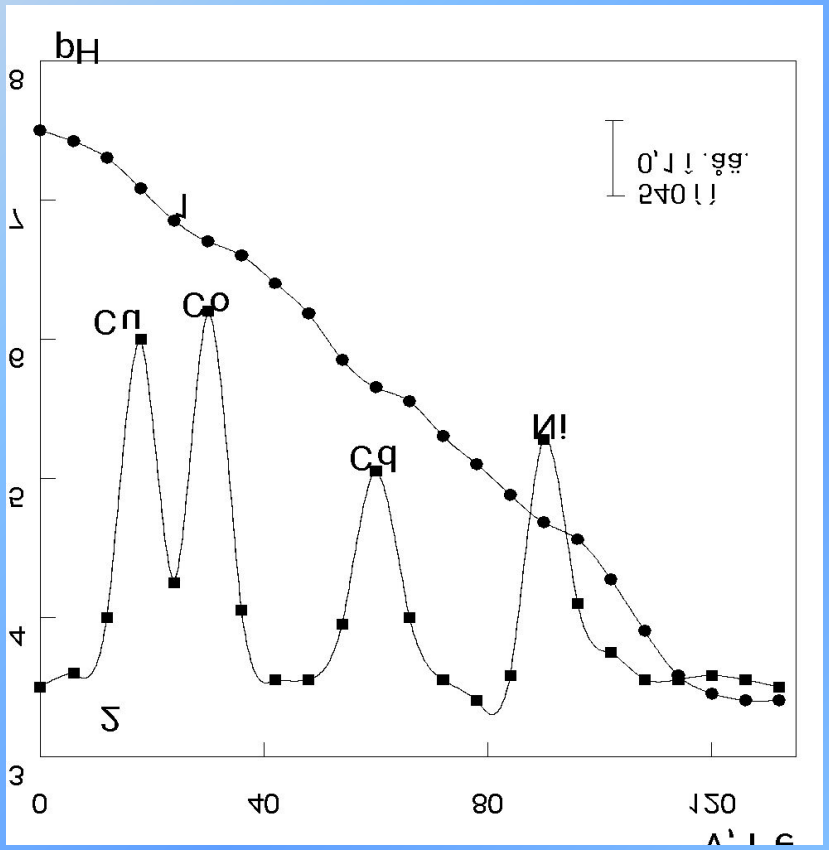
Сорбент	Матрица	Функц. группы	Размер частиц (мкм)	pH-диапазон гидрол. стаб-ти	Ионообм. емкость
PBE-94 (Pharmacia)	полисаха-рид	$-NR_2$ (не указаны)	100-200	2 - 12	0,32 ммоль/мл геля
Tetren-SiO_2	Силохром С-120	тетраэтилен-пентамин	100-160	1 - 8	0,35 ммоль/г
MacroPrep 50 CM (*) (Biorad)	ПММА	$-CH_2COOH$	50	3 - 13	0,21 ± 0,04 ммоль/мл геля

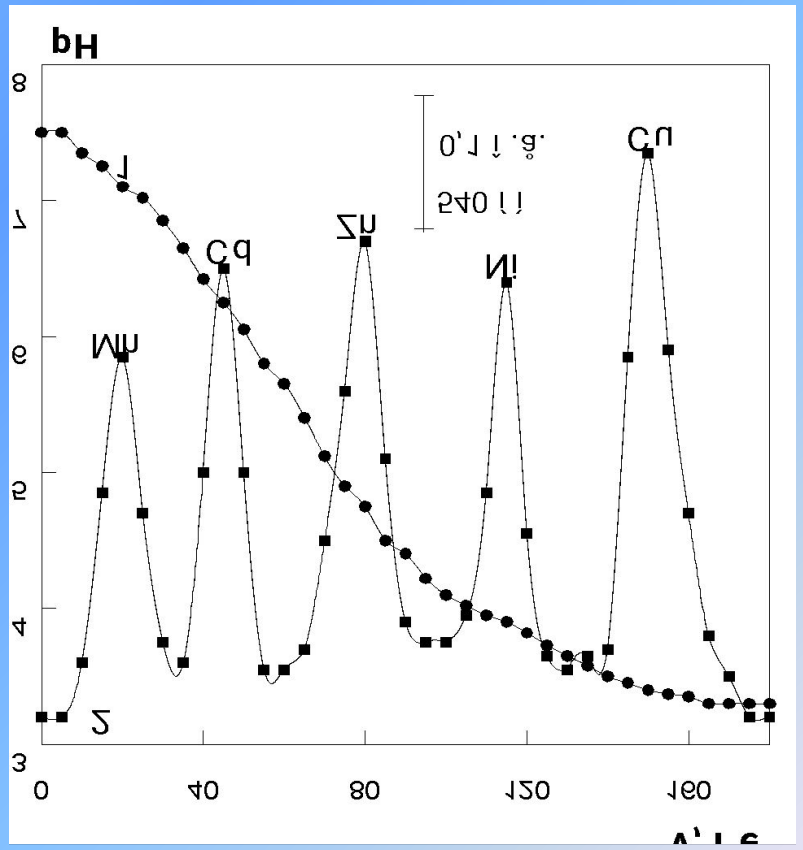
Хроматофокусирование (ХФ) ионов металлов на анионообменных сорбентах

сорбент - **а)** PBE-94; **б)** Tetren-SiO_2 (колонка 300x9 мм)

СР - 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), **Э** - 1:8 Полибуфер-74 (pH 3,3), 1 мл/мин

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)





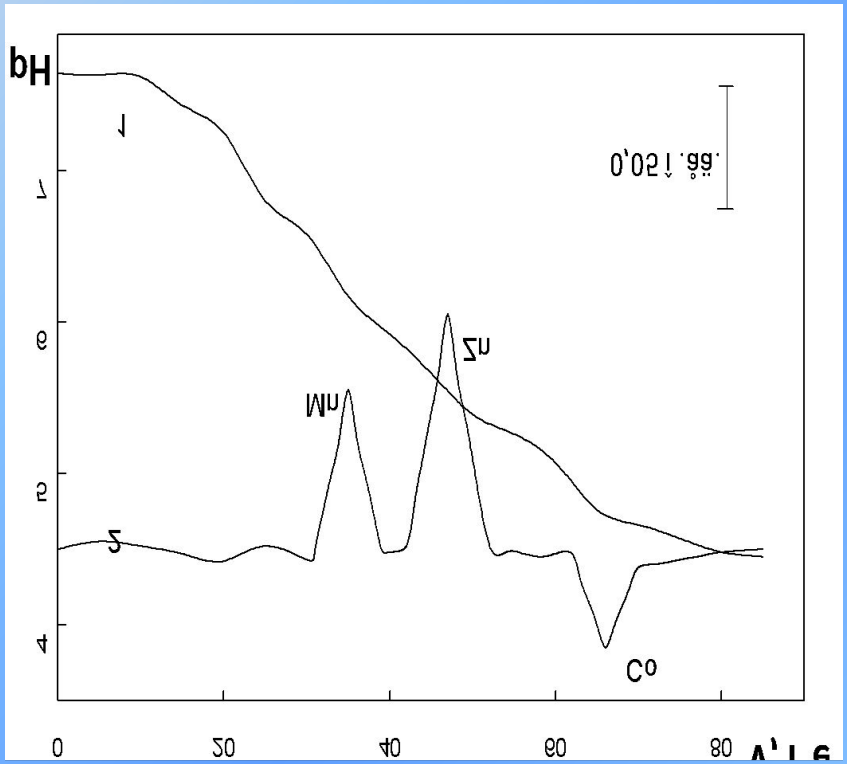
Разделение и концентрирование ионов металлов

сорбент MacroPrep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), $I_{СР}$: 0,1 (NaCl)

Э: 0,5 мМ лимонная к-та (pH 3,4), $I_{Э}$: 0,1 (NaCl); 1 мл/мин

Детектирование: УФ (254 нм)



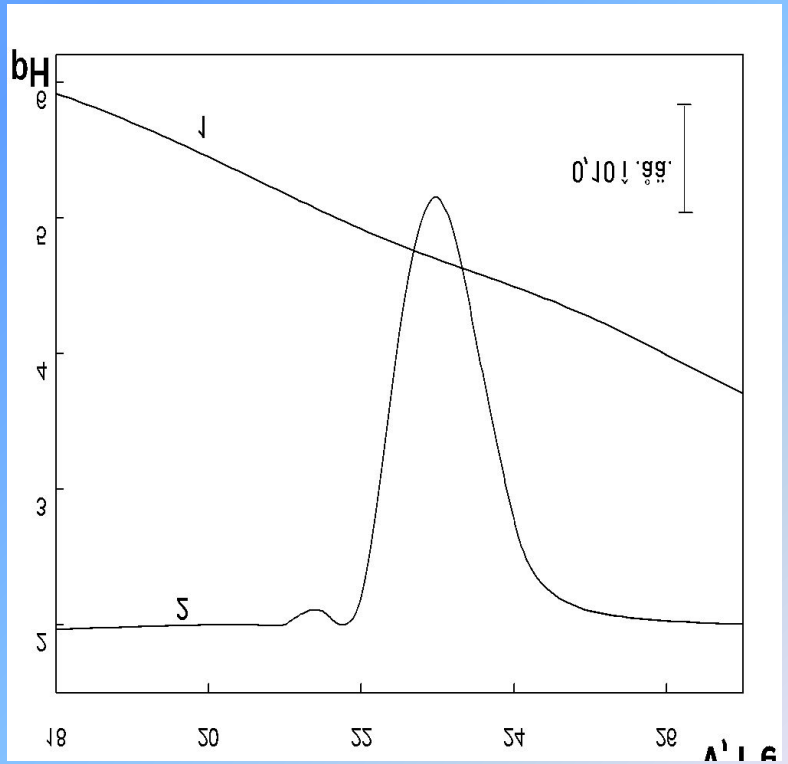
сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,1), $I_{СР}$: 0,05

Э: 1 мМ лимонная к-та (pH 3,3), $I_{Э}$: 0,05; 1 мл/мин

Проба: 2 x 10^{-5} M Cu^{2+}, 30 мл

Детектирование: УФ (254 нм)



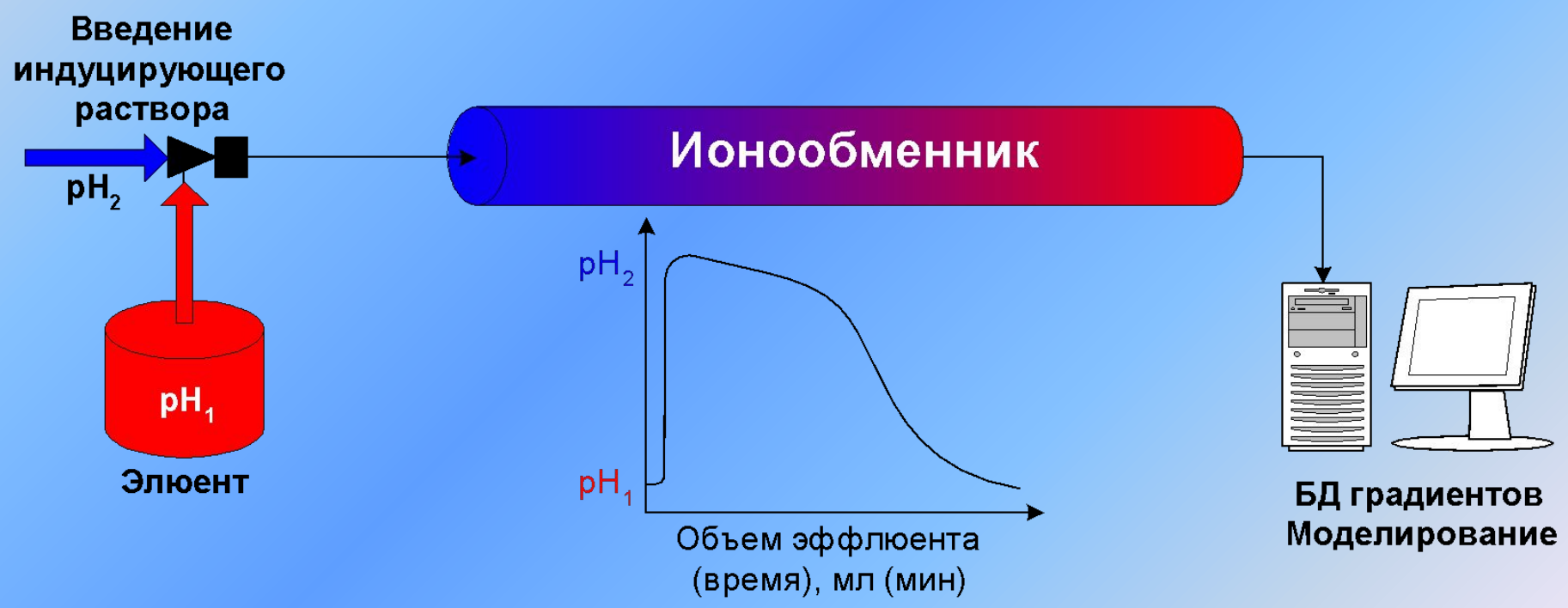
Концентрирование ионов переходных металлов

$$K = \frac{m_{сорб.в\text{-}ва} V_{ПФ}}{m_{несорб.в\text{-}ва} m_{НФ}}$$

Сорбент	Co^{2+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}
РВЕ-94	127	121	113	105	93	63	47	--
СМ-52	150	84	>500	70	98	83	80	>600

Техника индуцирования:

введение конц. индуцирующего раствора **ИР** (**pH_2**)
в поток разбавленного буферного элюента **Э** (**pH_1**)
(**K.Slais**; Brno, 1992-94; **А.Иванов**, 1994-95)
→ **<u>сокращение</u> времени в 3-4 раза**



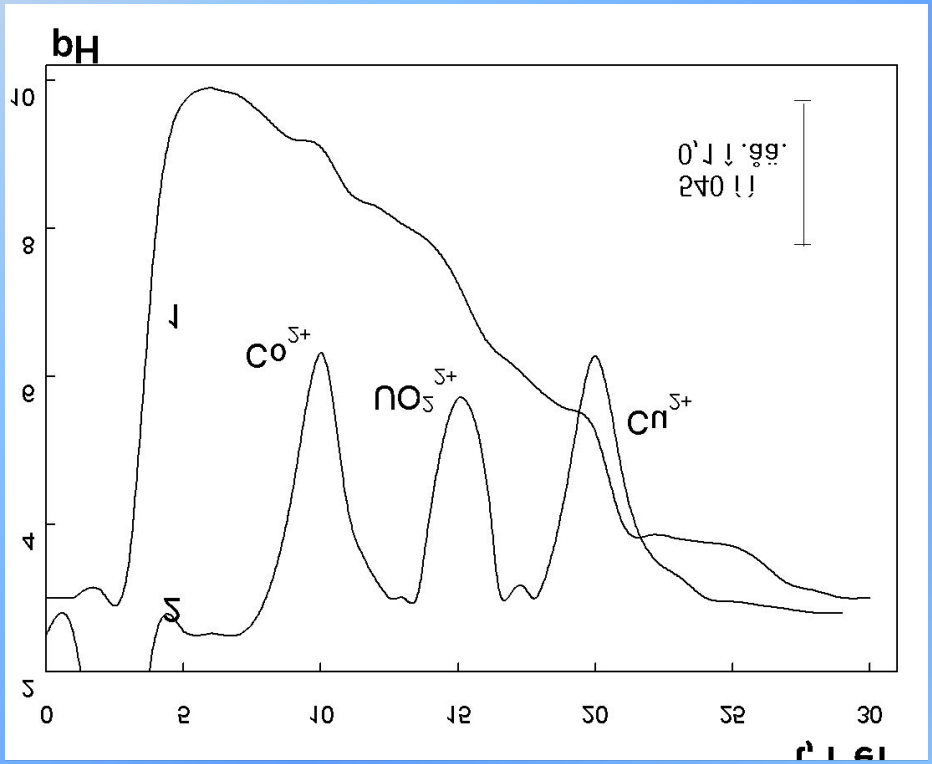
Разделение ионов металлов с индуцированным градиентом pH

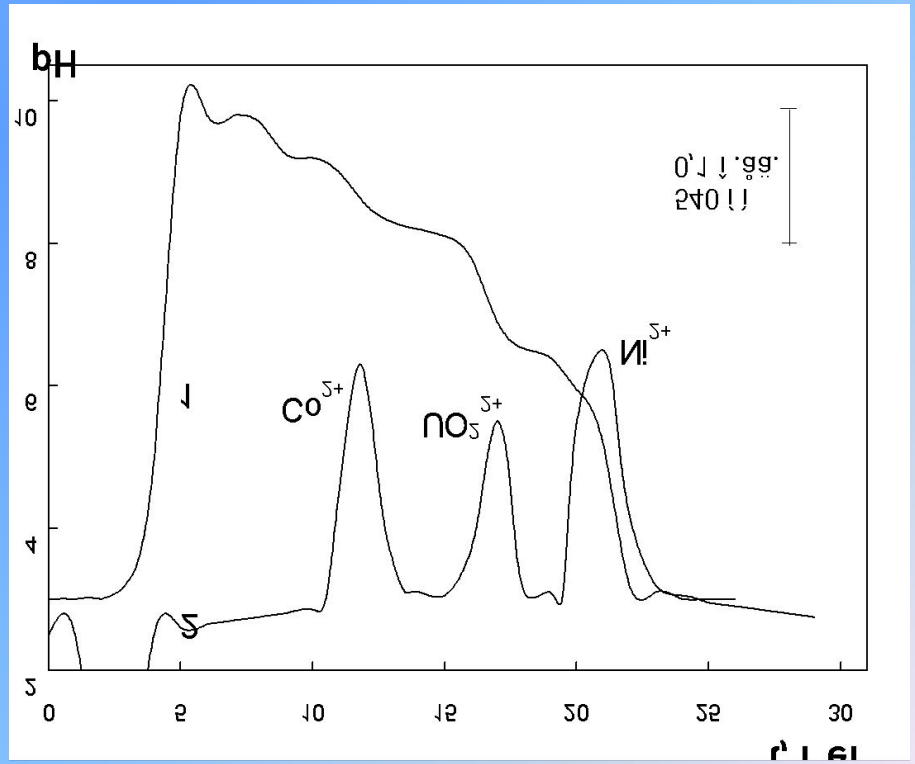
сорбент - **а)** Dien-SiO_2 (100-120 мкм, 150x2 мм); **б)** Tetren-SiO_2

ИР – 1 мл 100 мМ $Na_2B_4O_7$,

Э – **а)** 10 мМ (6-аминогексановая к-та + гистидин); 0,2 мл/мин; **б)** 20 мМ,

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)





2. Новые простые подвижные фазы для хроматофокусирования

Традиционно – полиамфолитные элюенты (“полибуферы”)

Преимущества: **постоянная** буферная емкость в широком диапазоне pH → широкий рабочий интервал pH

Но:

сложный синтез, **высокая** стоимость,
низкая устойчивость к биодеградации;
трудно отделять от белков и пептидов;
высокий УФ-сигнал

Подходы к поиску подвижных фаз – стартовых растворов и <u>элюентов</u>

- **<u>эмпирический</u>** - экспериментальная проверка смесей кислот, оснований и амфолитов – до **20 - 25** компонентов (Hutchens, 1985-86)

- **<u>на основе моделирования</u>** (учет свойств сорбентов, активных компонентов подвижных фаз, **наличие сильного электролита**):

  сорбент – полифункциональный, полиэлектролитный

  СР – слабое основание + электролит (NaCl)

  Э – слабая кислота + основание + электролит (NaCl)

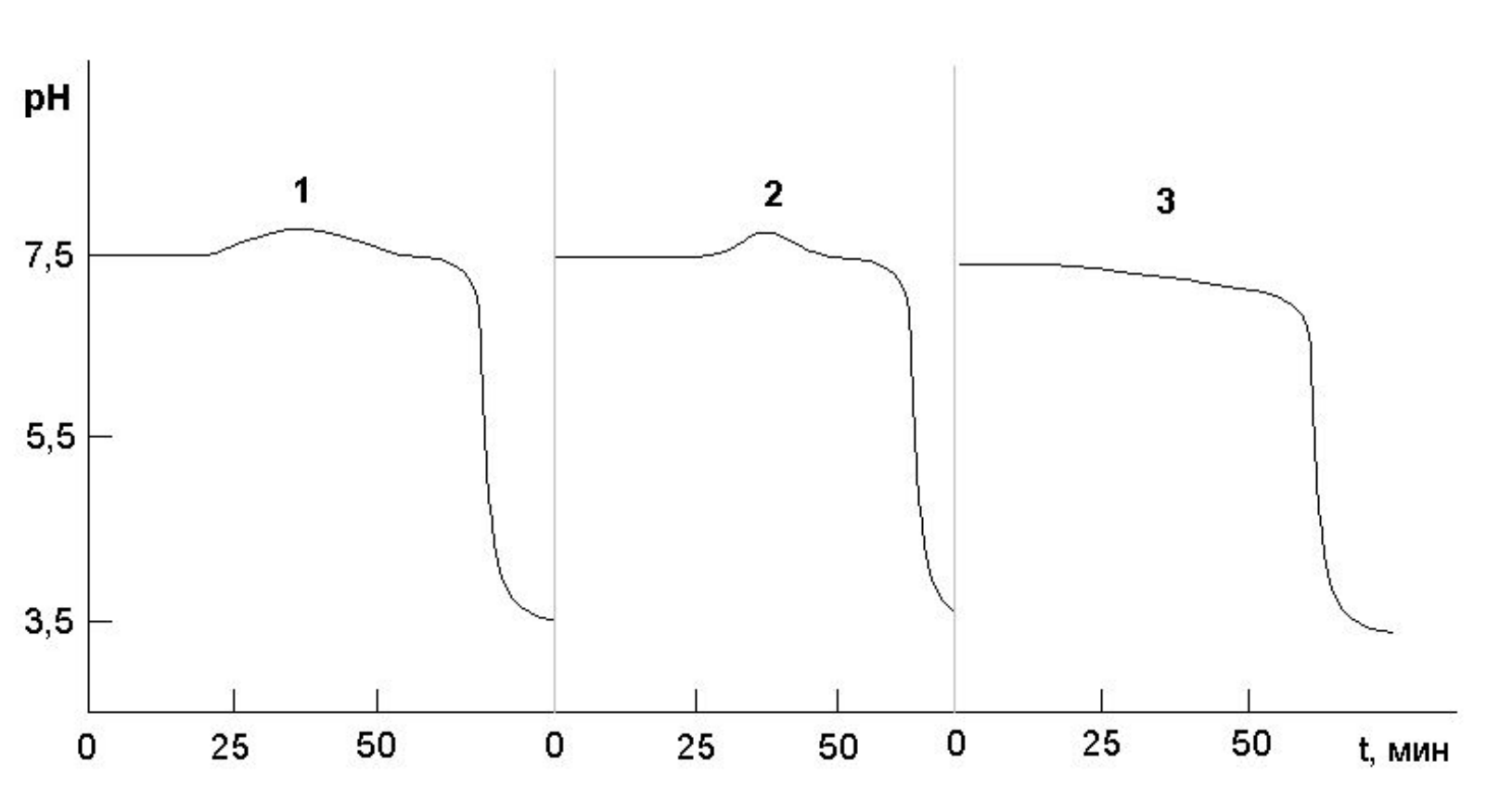
2.1. Как избавиться от подъема pH на нисходящем градиенте?

$I_Э < I_{СР}$

сорбент Tetren-SiO_2 (7,5 мкм, 1 мМ/г, 250x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-10 мМ $H_2C_2O_4$ (pH 7,5), $I_{СР}$: *1* - ~0; *2* - 0,1; *3* - 1

Э: 20 мМ $H_2C_2O_4$ -22 мМ Трис (pH 3,5), $I_Э$: ~0,05



Нисходящие градиенты pH в анионообменных колонках

- **полифункциональные** сорбенты с полиэлектролитными свойствами;

- элюенты с **минимальным** содержанием слабых оснований;

- $I_Э < I_{СР}$

  для формирования **плавного** градиента ионную силу элюента следует **понижать**,

  для более **резкого** градиента - **повышать**

Разделение изоформ плазминогенов

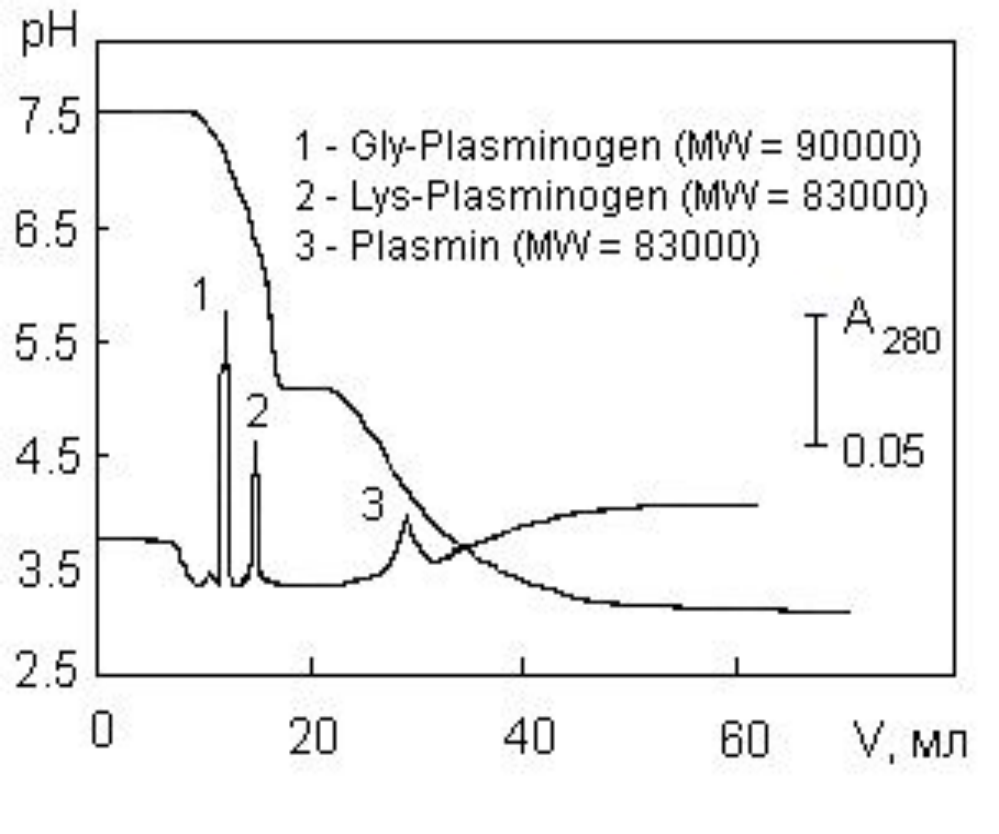
сорбент Tetren-SiO_2 (7,5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), $I_{СР}$**:** 0,02

Э: 2 мМ $H_2C_2O_4$ (pH 2,9), $I_Э$**:** ~0; 1 мл/мин

Проба: 20 мкл лиофилизов. смеси **Glu-** и **Lys-**плазминогенов (pI 5,82 и 5,66), активность 1 мг/мл

Детектирование - УФ (280 нм)



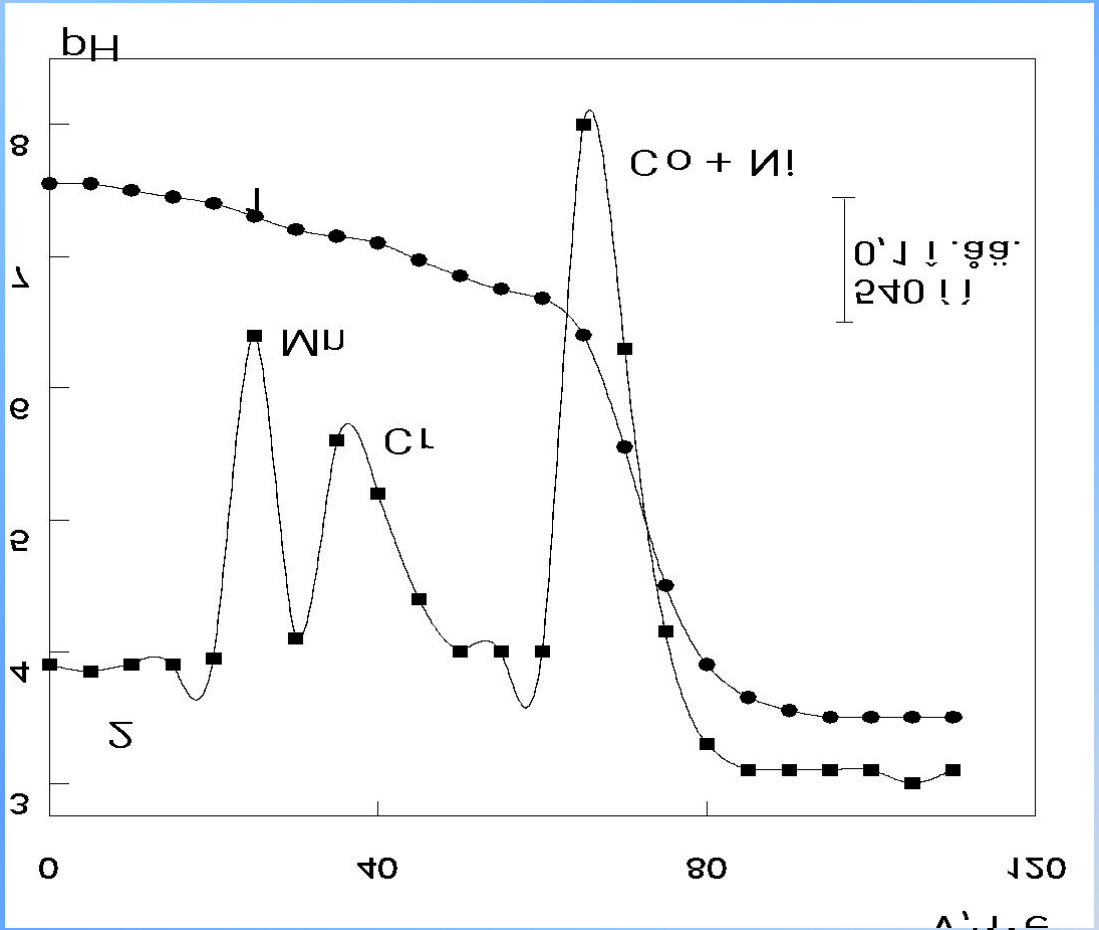
Разделение смеси металлов

сорбент PBE-94 (>100 мкм, 300x9 мм)

СР: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), $\mathbf{I_{CP}}$**:** 0,05

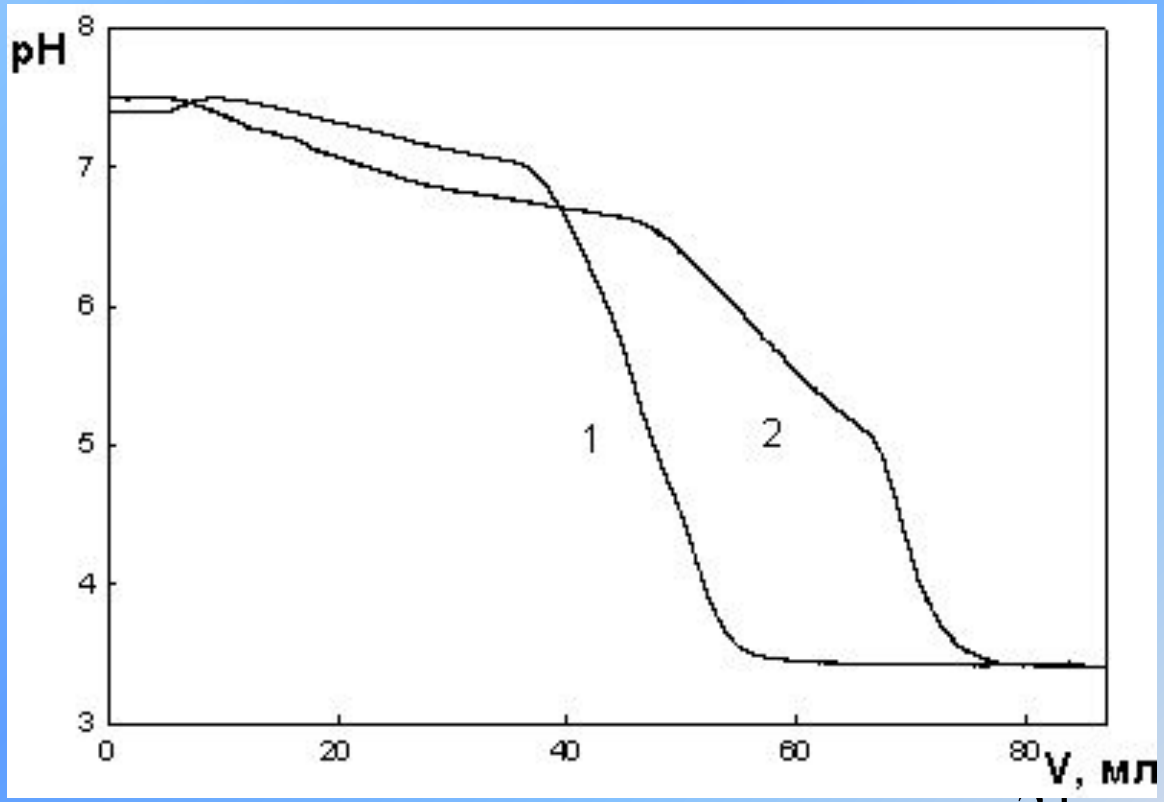
Э: 20 мМ глутаминовая к-та (pH 3,3), 1 мл/мин

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)



Эффект ионной силы подвижных фаз для карбоксильных колонок

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)
СР: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5),
Э: 1 мМ (*1*) и 0,5 мМ (*2*) лимонная кислота (pH 3,3 - 3,5); 1 мл/мин,
ионная сила подвижных фаз: *1* - 0,01; *2* - 0,1



Квази-линейные нисходящие градиенты pH в катионообменных колонках

- сорбенты с **полиэлектролитными** свойствами;
- **слабое основание** в элюенте не влияет на профиль градиента, а лишь на конечное значение pH;
- $I_Э \approx I_{СР}$ (~0,05 – 0,2)

для получения **плавного** градиента можно использовать однокомпонентные **Э** с **высокой** ионной силой (как в **СР**)

2.2. Восходящие градиенты pH

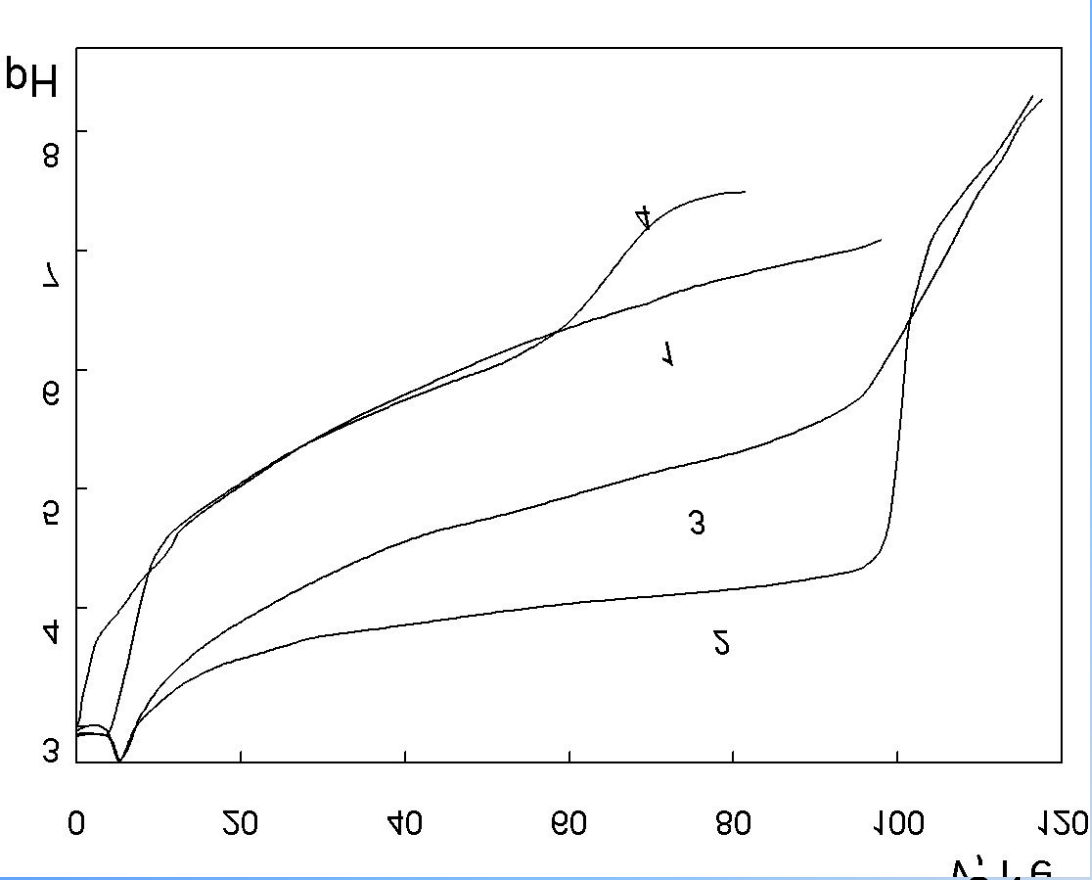
- Мало изучены для применения в ХФ
- Подвижные фазы - полиамфолиты
- Эффект ионной силы не исследован
- Перспективны для разделения белков, пептидов и др. биполярных макромолекул

Выбор элюента для восходящих градиентов pH

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

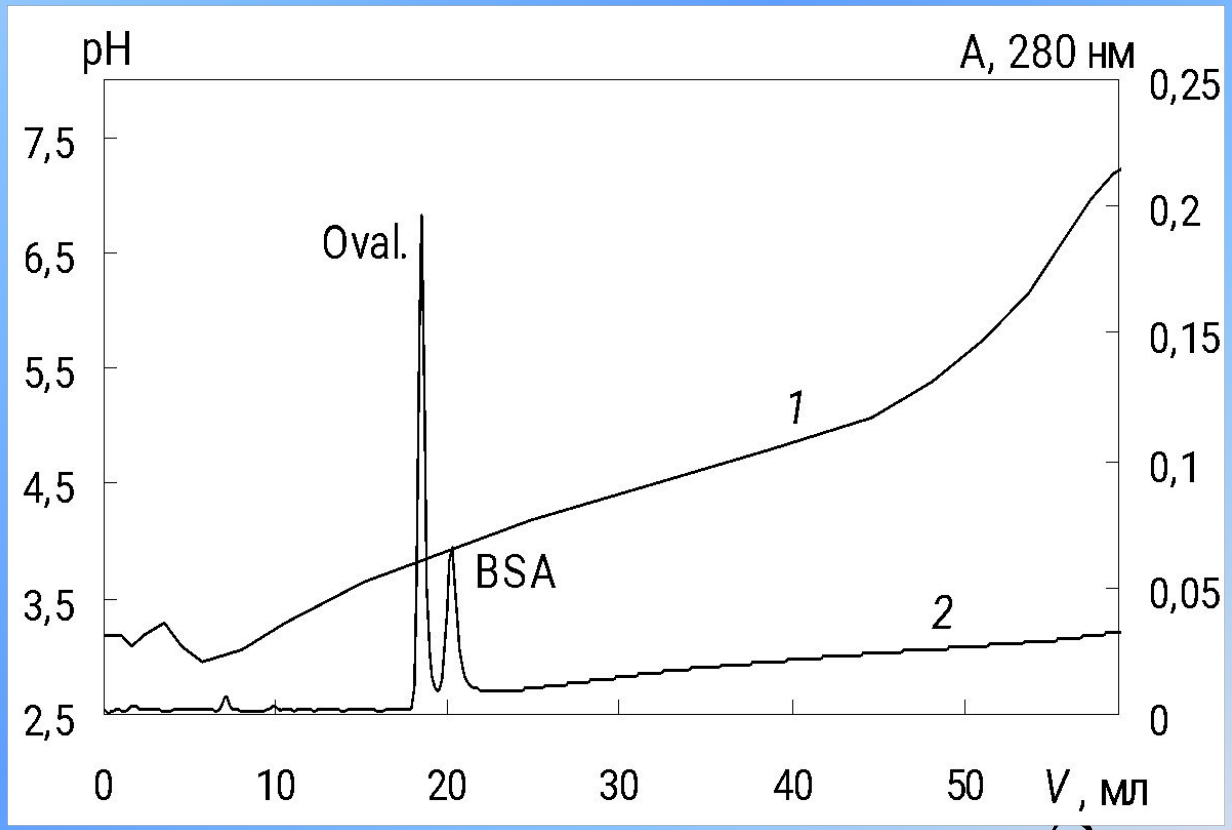
СР: 2 мМ лимонная к-та (pH 3,3),

Э (pH 7,5): 1:25 “Полибуфер” (***1***); 12,5 мМ Трис-HCl (***2***);
12,5 мМ Трис-HCl + 1 мМ лимонная к-та (***3***);
12,5 мМ Трис-HCl + 6 мМ лимонная к-та (***4***); 1 мл/мин



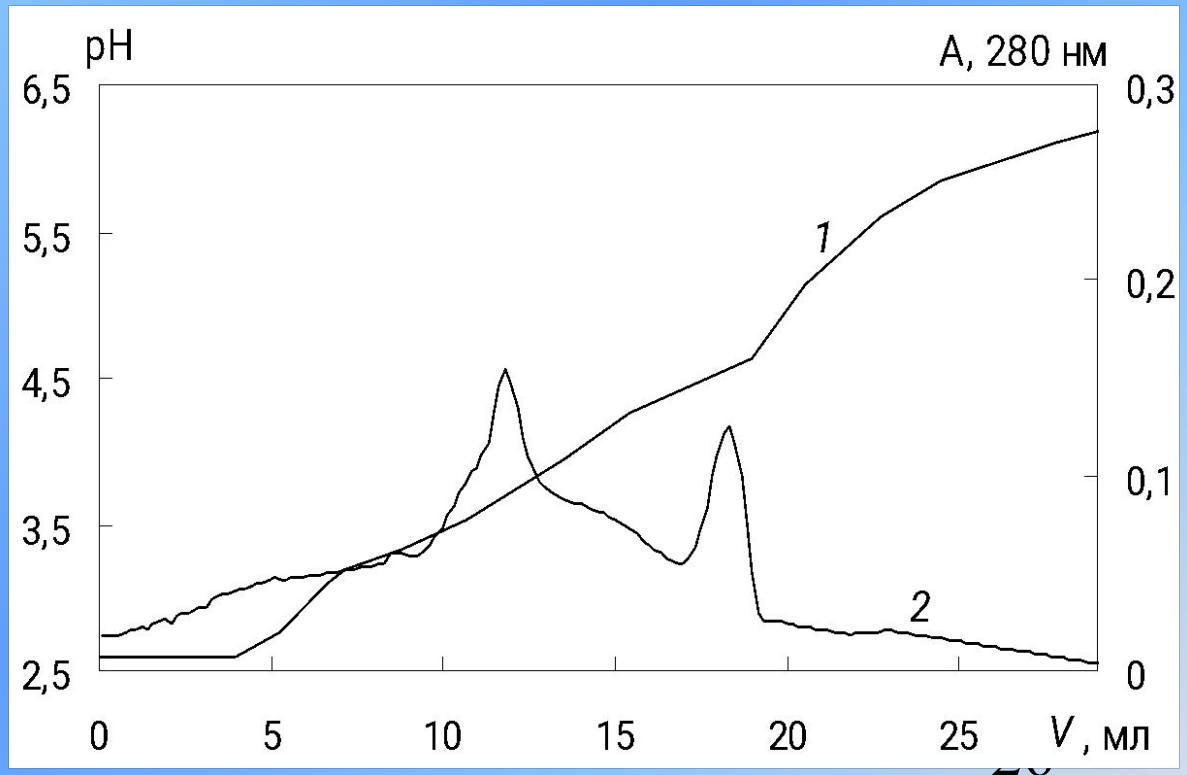
ХФ альбуминов с восходящим градиентом

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)
СР: 2 мМ лимонная к-та + 1,5 мМ Трис (pH 3,3), $\mathbf{I_{СР}}$**:** ~0
Э: 20 мМ Трис-HCl + 5 мМ лимонная к-та (pH 7,6); 1 мл/мин; $\mathbf{I_{Э}}$**:** 0,5
Проба: овальбумин (*Oval.*) и бычий альбумин (*BSA*), 0,5 мг/мл
Детектирование: УФ (280 нм)



ХФ образца формиатдегидрогеназы на сорбенте низкой емкости

сорбент MN (5 мкм, 50х4,6 мм)
СР: 2 мМ лимонная к-та (pH 3,0), $I_{СР}$: 0,05 (NaCl)
Э: 10 мМ Трис-лимонная к-та (pH 7,5); 1 мл/мин; $I_{Э}$: ~0
Проба: *ФДГ* из клеточного лизата с активностью 1 мг/мл
Детектирование: УФ (280 нм)



Квази-линейные восходящие градиенты pH в карбоксильных колонках

1. сорбенты с **высокой** емкостью**:**

- **слабое основание** в стартовом растворе **влияет** на начальный участок градиента pH;
- **$I_Э > I_{СР}$ (от 0,1)**

2. сорбенты с **низкой** емкостью**:**

- **слабое основание** в стартовом растворе **не влияет** на начальный участок градиента pH;
- **$I_Э < I_{СР}$ либо $I_Э \approx I_{СР}$ (~0,05)**

3. Хроматофокусирование пептидов на сульфокатионитах

Возможность разделения пептидов

Проблема: **полиамфолитные** элюенты осложняют детектирование (λ < 220 нм) – только “ароматика”

- Отсутствие буферной емкости сорбента
- Исключительная роль элюента
- Сильно- и слабоудерживаемые пептиды

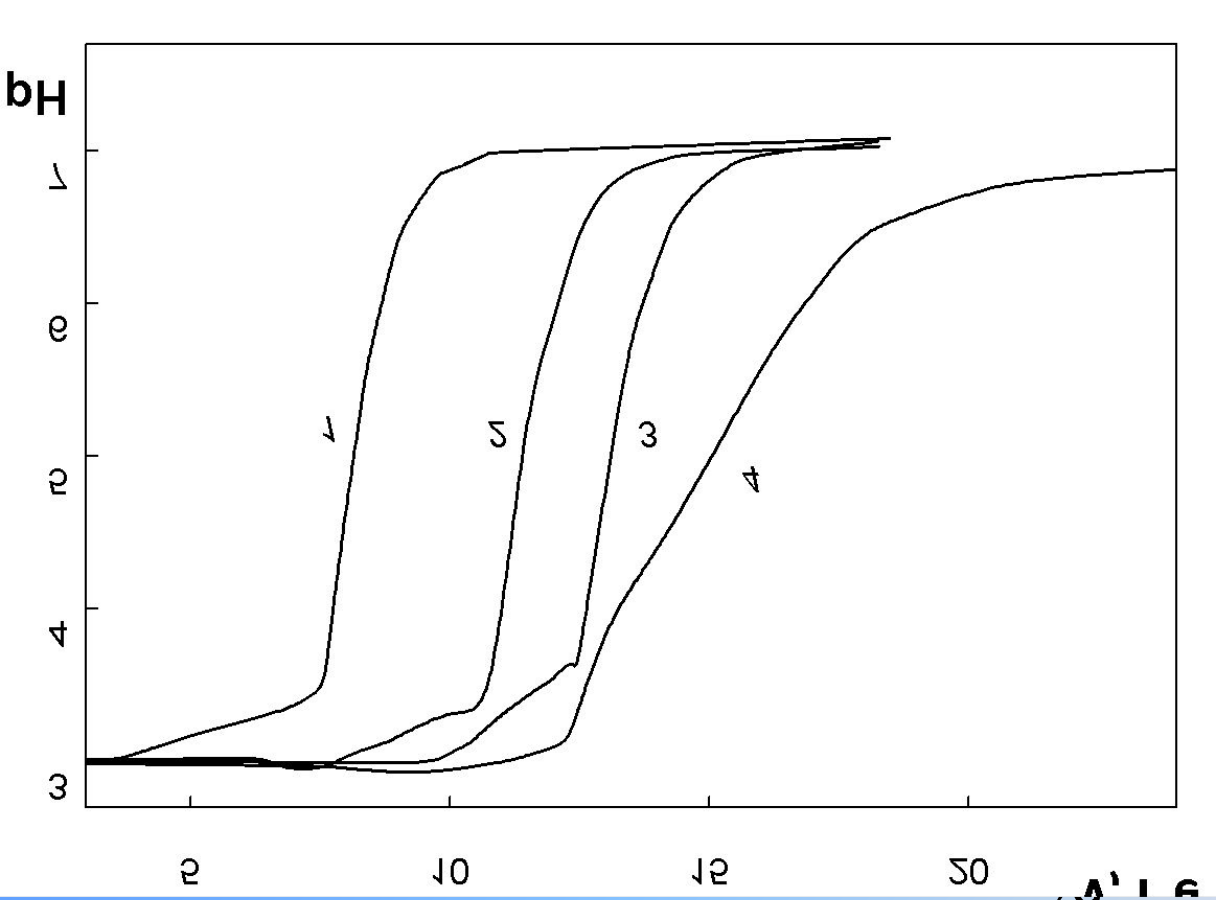
Сорбент	Матрица	Размер частиц	Функц. группы	pH-диапазон стаб-ти	Буферная емкость
Hamilton PRP-X200	ПММА	10 мкм	$-SO_3^-$	1 - 13	нет

Подвижные фазы для ХФ на сильно-кислотном сорбенте

сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

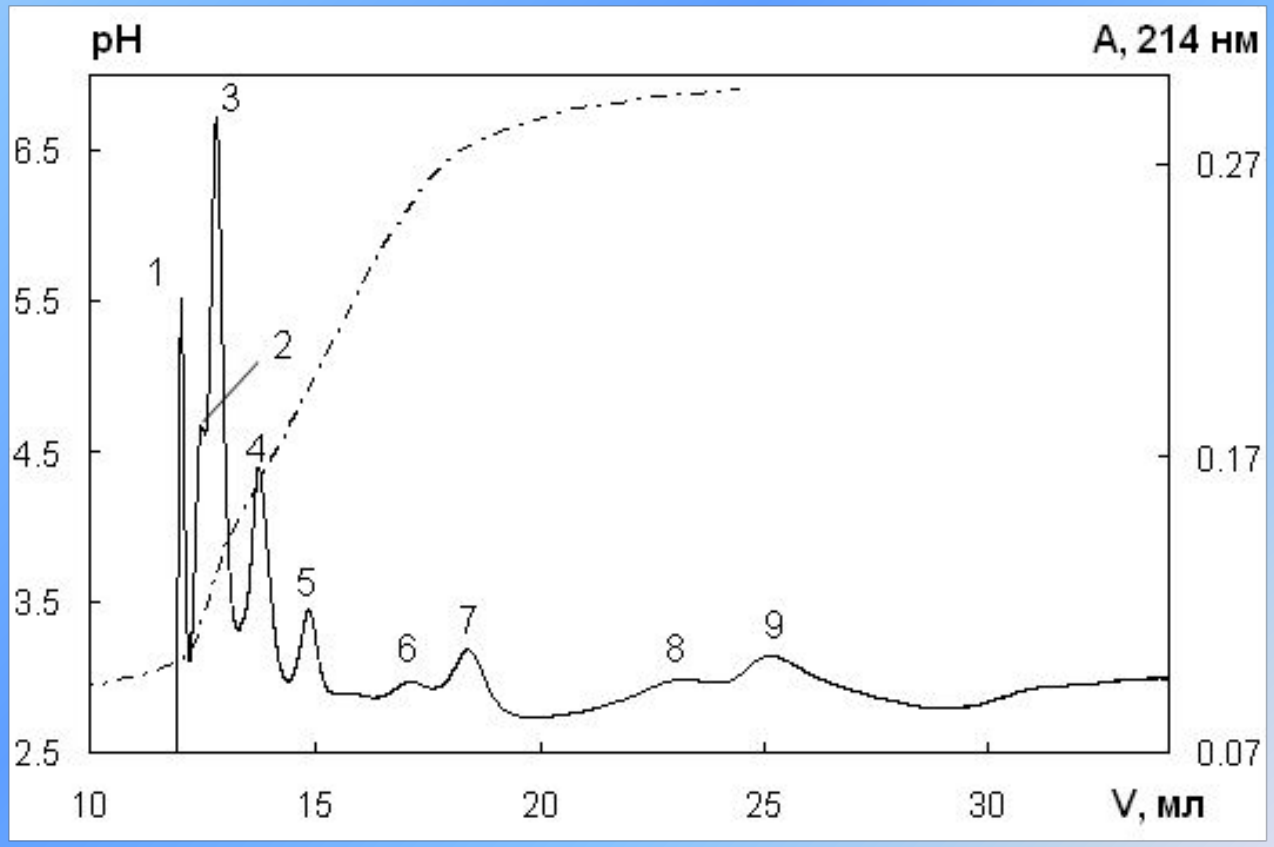
СР: 5 мМ NaH_2PO_4 (pH 3,0), $I_{СР}$: ~0 (*1 и 2*), **0,1** (***3***), **0,5** (***4***)

Э: 10 мМ NaH_2PO_4 + 6 мМ Трис (pH 7,0), $I_Э$: ~0 (*1 и **4***), **0,3** (*2 и **3***); 1 мл/мин



ХФ трипсинового гидролизата альбумина

сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)
СР: 5 мМ NaH_2PO_4 (pH 3,0), **$I_{СР}$:** 0,5 (NaCl)
Э: 10 мМ NaH_2PO_4 + 6 мМ Трис (pH 7,0), 1 мл/мин, **$I_Э$:** ~0
Проба: гидролизат человеческого альбумина (0,1 мг)
Детектирование: УФ (214 нм)



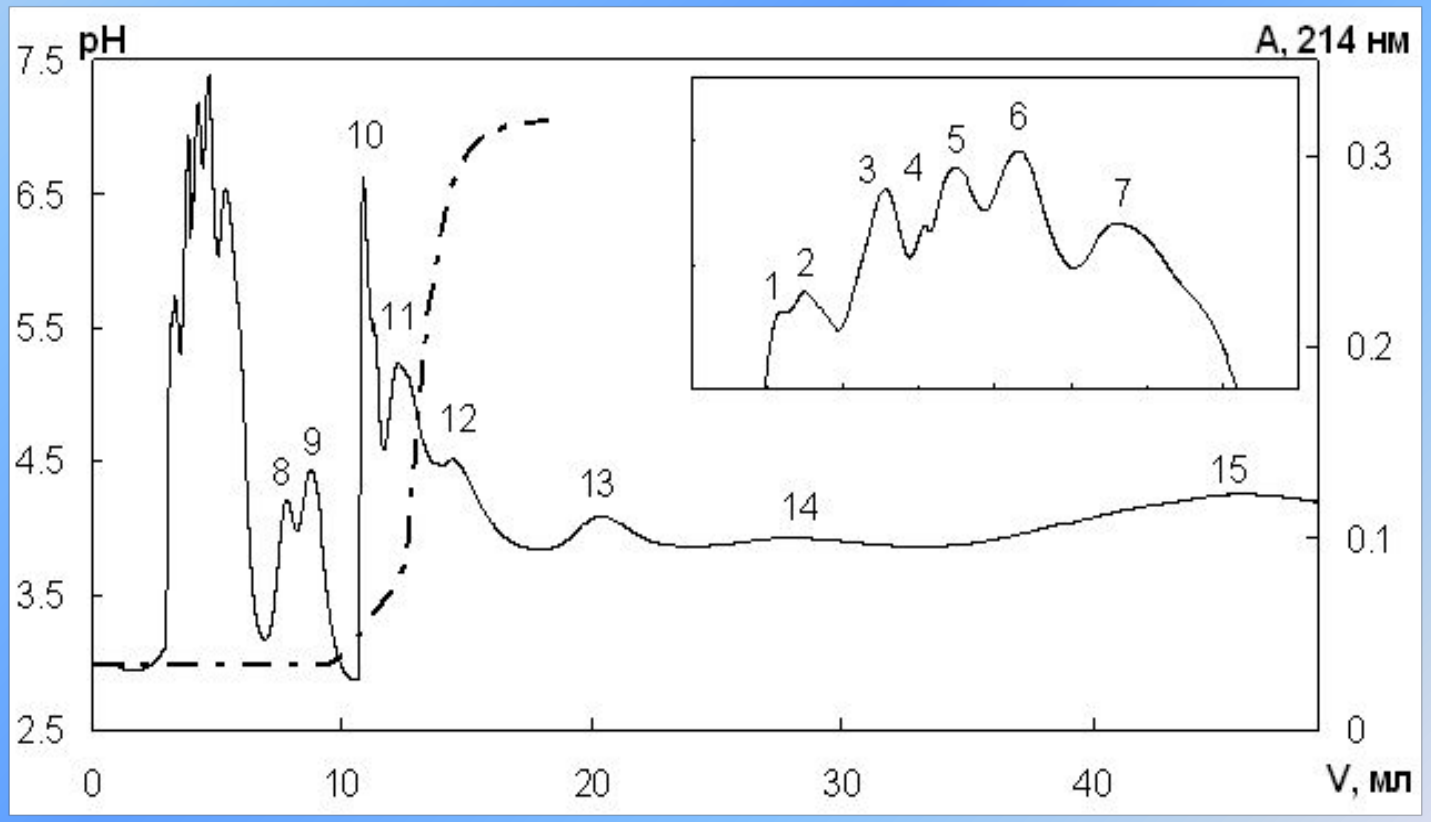
ХФ гидролизата альбумина при одновременном градиенте ионной силы

сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 3 мМ NaH_2PO_4 + 10% CH_3CN (pH 3,0), $I_{СР}$: **0,1** (NaCl)

Э: 10 мМ NaH_2PO_4 + 6 мМ Трис + 10% CH_3CN (pH 7,0), 1 мл/мин, $I_Э$: **0,3** (NaCl)

Детектирование: УФ (214 нм)



Линейные
восходящие градиенты pH
в сильно-кислотных колонках

- **активные** компоненты **стартового раствора и элюента** – одной природы;
- добавки CH_3CN (~10%) в обе фазы
- **$I_{СР}$ (~0,1) < $I_Э$ (~0,3)** (сочетание градиента pH с градиентом ионной силы)

Выводы

“Устоявшийся” метод **хроматофокусирования** может развиваться в следующих направлениях:

1. Предложено использовать технику **хроматофокусирования** и **индуцирования** для концентрирования и **pH-градиентного разделения** ионов металлов на комплексообразующих анионитах и катионитах.

2. Коммерческие “Полибуферы” можно заменить **простыми одно-двухкомпонентными элюентами** при создании высокой **ионной силы** в одной или обеих подвижных фазах. Возможности **простых элюентов** показаны на примере разделения **металлов; аминокислот; белков; ферментов**. Фокусирующий эффект для биполярных молекул усиливается за счет градиента ионной силы.

3. Технику **хроматофокусирования** можно использовать в сочетании с **градиентом ионной силы** для разделения смесей **пептидов** на сульфокатионитах.

Публикации

Опубликовано 80 статей, из них по теме работы - 57:

- **2 обзора** (ЖАХ, 1999; Вестник МГУ, 2005)
- **55 статей:** ЖАХ – 9
  ЖФХ – 14
  Вестник МГУ – 24
  Сорбционные процессы – 3

Fresenius J., Mendeleev Comm., J. Liquid Chrom., J.Chromatogr., Известия ВУЗов, Молекулярные технологии

- **Тезисы докладов – 50:**

XVI, XVII, XVIII Менделеевские съезды; IICS-92, 93, 94, 2000, 2004; ICAS-97, 2006; SBS-03; Всеросс. симп. по хроматографии 1998-2008; “Разделение и концентрирование в аналитической химии”; “Ломоносовские чтения-2005”; “Аналитика России-2007” и др.

- **Диссертации:**

А.В. Иванов “Хроматофокусирование переходных металлов” (1997),

А.Б. Тессман “Формирование внутренних градиентов pH в ионообменной хроматографии: моделирование и экспериментальная проверка” (2000),

М.С. Вакштейн ”Новые подвижные фазы для хроматофокусирования в катионообменных системах” (2006).

Благодарность

- докт. хим. наук **П.Н.Нестеренко, О.А.Шпигуну;**
  канд. хим. наук **А.В. Гармашу;** аспирантам **А.Б. Тессману**, **М. С. Вакштейну, С.С. Кубышеву,** дипл. **Н.Ю. Смирновой;**
  проф. **К. Шлайсу** и дипл. **Т. Рейтару** (Чехия)
  за плодотворное сотрудничество

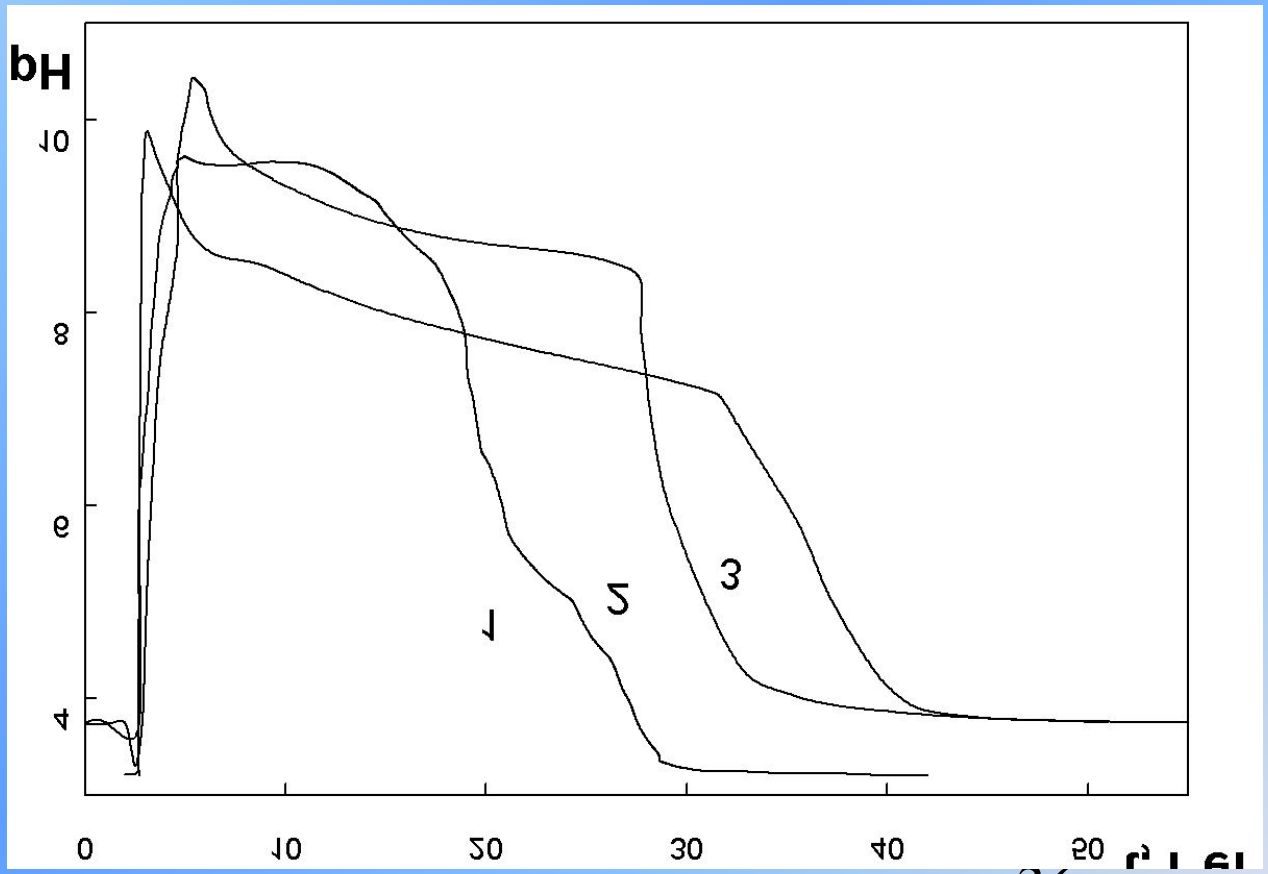
- **РФФИ** – за финансовую поддержку исследования (проекты № **02-03-33007 и 05-03-33096**)

Индуцированные градиенты в карбоксильных колонках

сорбент Macro-Prep 50 CM (50x4,6 мм)

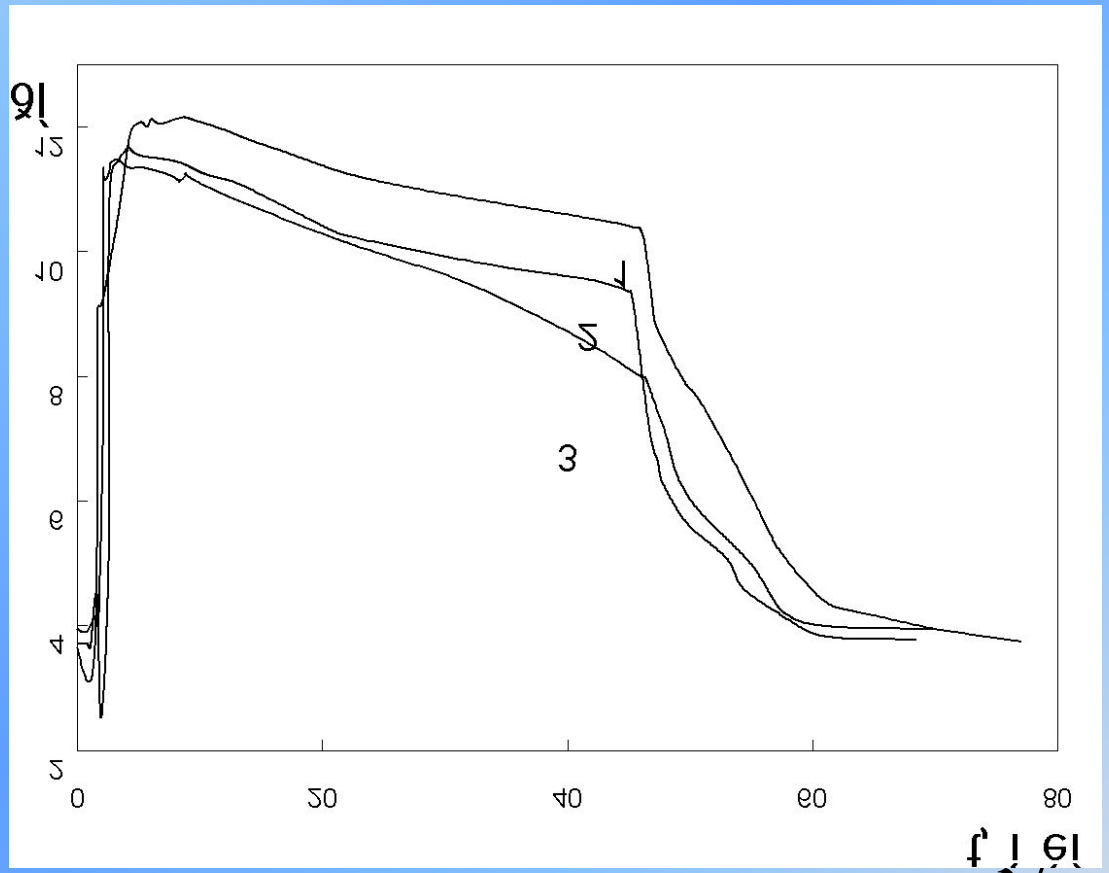
Э: 8 мМ CH_3COOH (pH 3,6), ионная сила: *1* и *3* - 0,1; *2* - ~0

ИР: 1 мл 3,25 М NH_3 (pH 11), ионная сила: *1* - 1; *2* и *3* - ~0



Индуцированные градиенты в карбоксильных колонках

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)
ИР: 1 мл [4 М CH_3COONa + 1 М NaCl (*1, 3*)] (pH 11,9)
Э: 5 мМ CH_3COOH (pH 3,6), ионная сила (NaCl): *1, 2* – 0, *3* – 0,1 М; 1 мл/мин



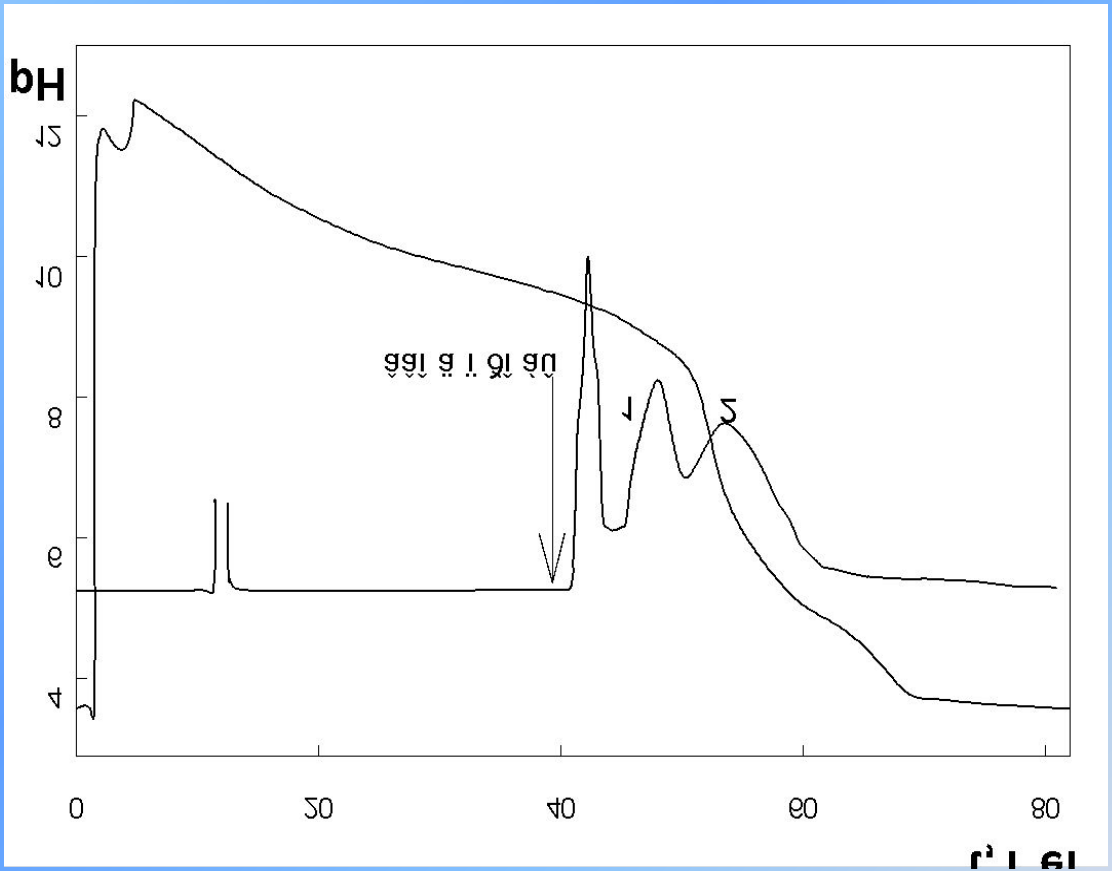
Разделение ионов металлов с индуцированным градиентом pH

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

ИР: 1 мл (4 M CH_3COONa + 1 M NaCl) (pH 11,9)

Э: 5 мМ CH_3COOH + 0,1 M NaCl (pH 3,6), 1 мл/мин

Детектирование - УФ (254 нм): *1* - Pb^{2+}, *2* - Co^{2+}



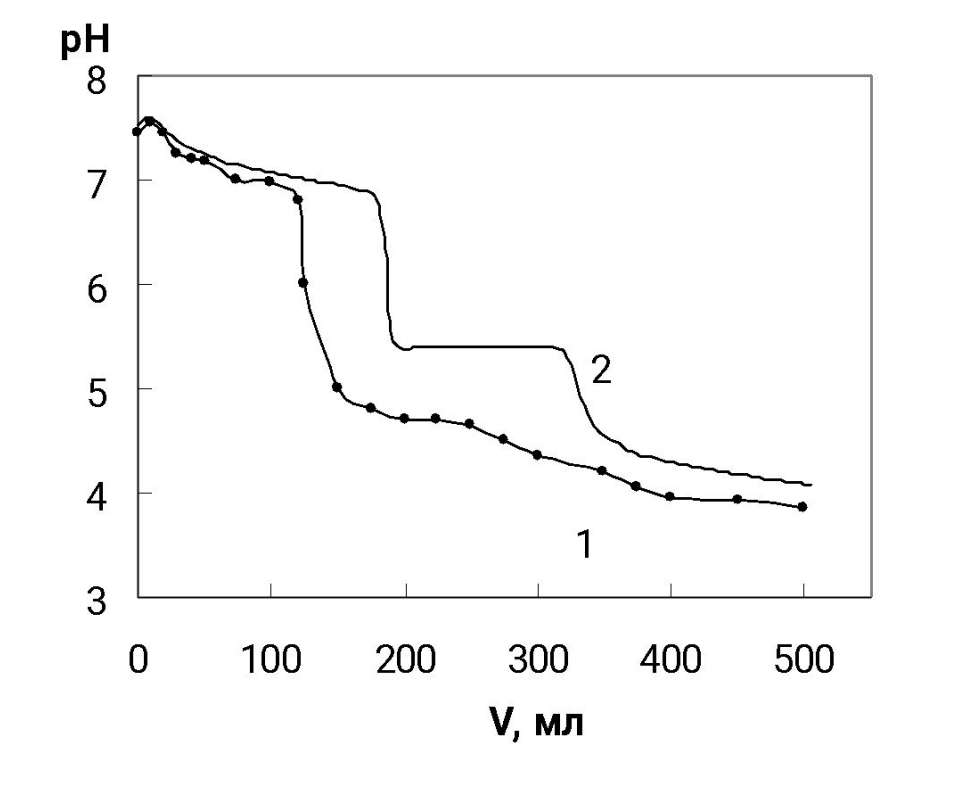
<u>Эксперимент и модель:</u> различие в ионной силе стартового раствора и элюента (анионообменная система)

$I_Э > I_{СР}$

1 - **сорбент** Dien-SiO_2 (100-160 мкм, 0,35 мМ/г)

2 - **модель** Tetren-SiO_2

СР -25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), **Э** - 5 мМ CH_3COOH + NaCl (pH 3,5)



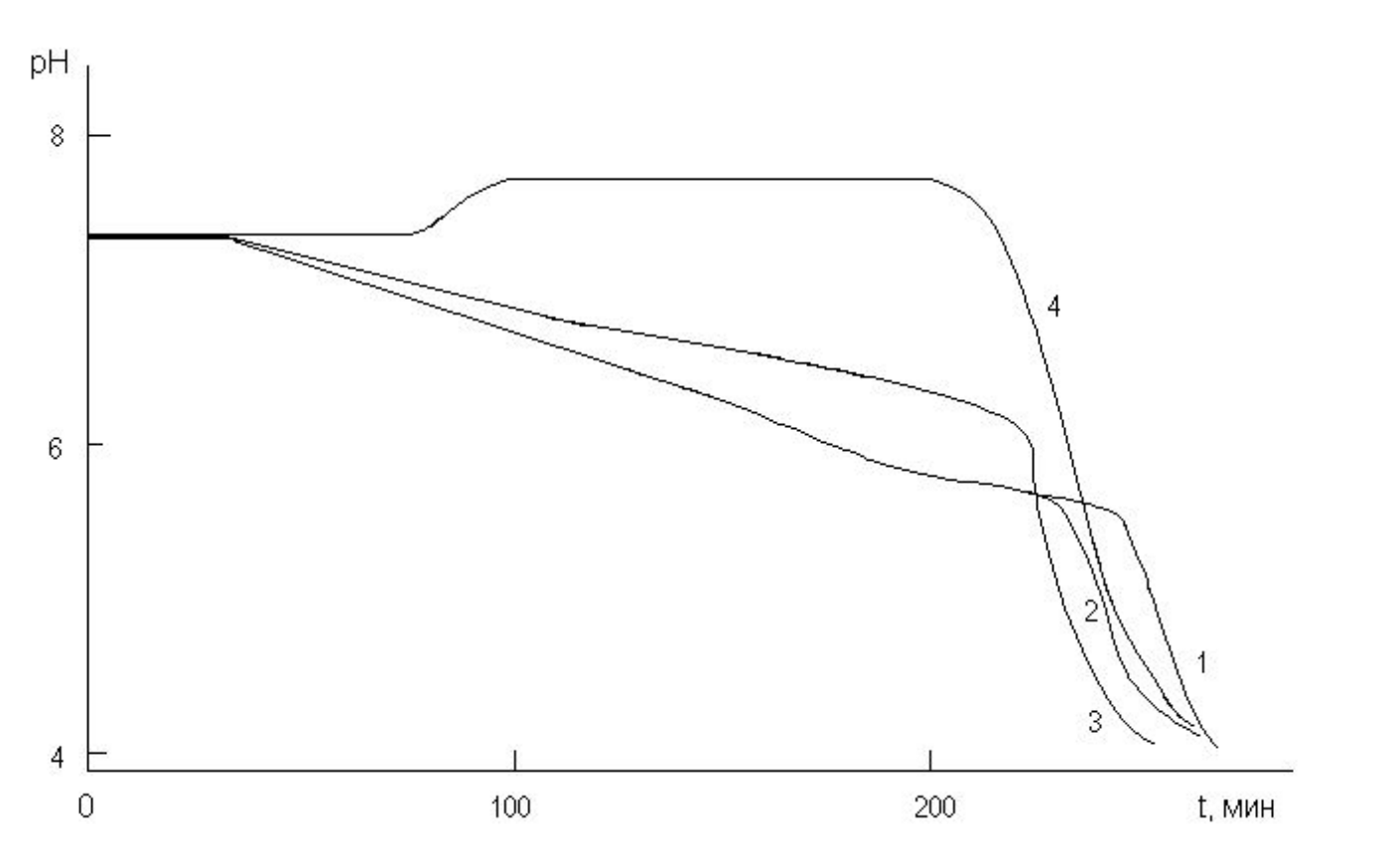
Различие в ионной силе стартового раствора и элюента

$I_Э < I_{СР}$

сорбент Tetren-SiO_2 (7,5 мкм, 1 мМ/г, 250x4,6 мм)

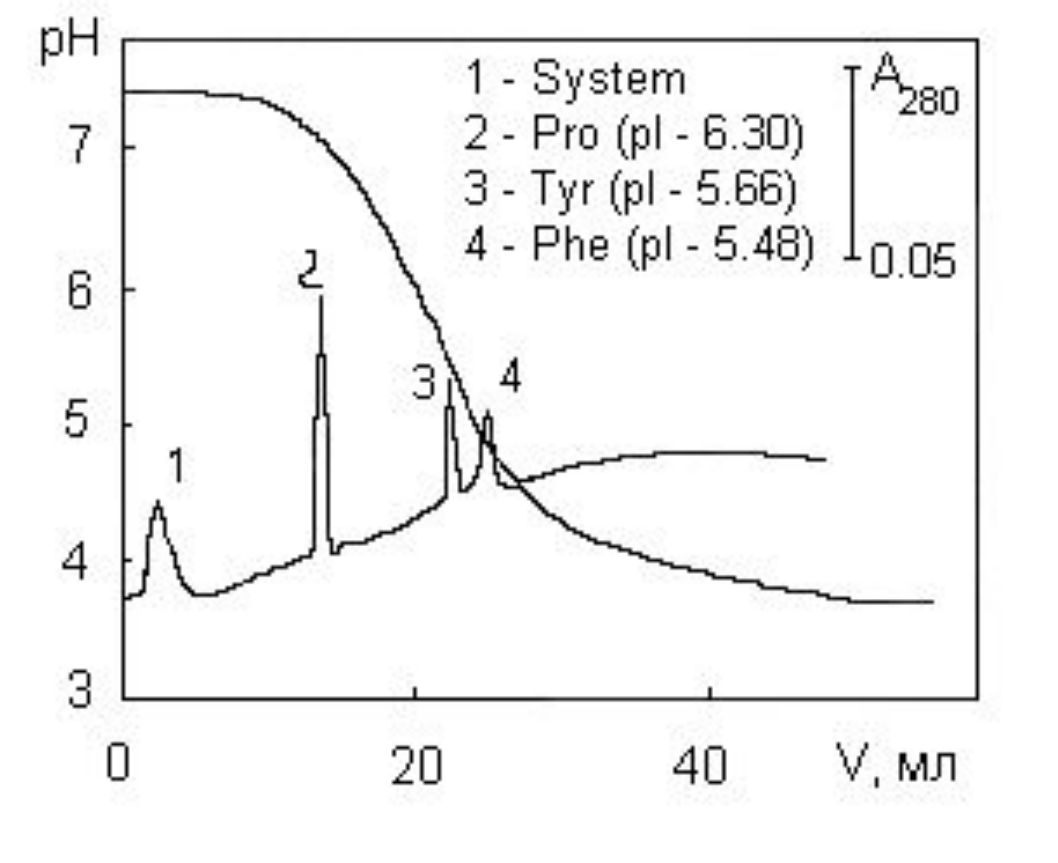
СР: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), **$I_{СР}$:** *1* - ~0,03; *2* - 0,1; *3* - 1; *4* - 0,02

Э: 2 мМ $H_2C_2O_4$ (pH 2,9), **$I_Э$:** *1, 2* и *3* - ~0; *4* - 0,5



Модельная смесь аминокислот

сорбент Tetren-SiO_2 (7,5 мкм, 50x4,6 мм)
СР: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), $\mathbf{I_{СР}}$**:** 0,02
Э: 2 мМ $H_2C_2O_4$ (pH 2,9), $\mathbf{I_Э}$**:** ~0; 1 мл/мин
Детектирование - УФ (280 нм)

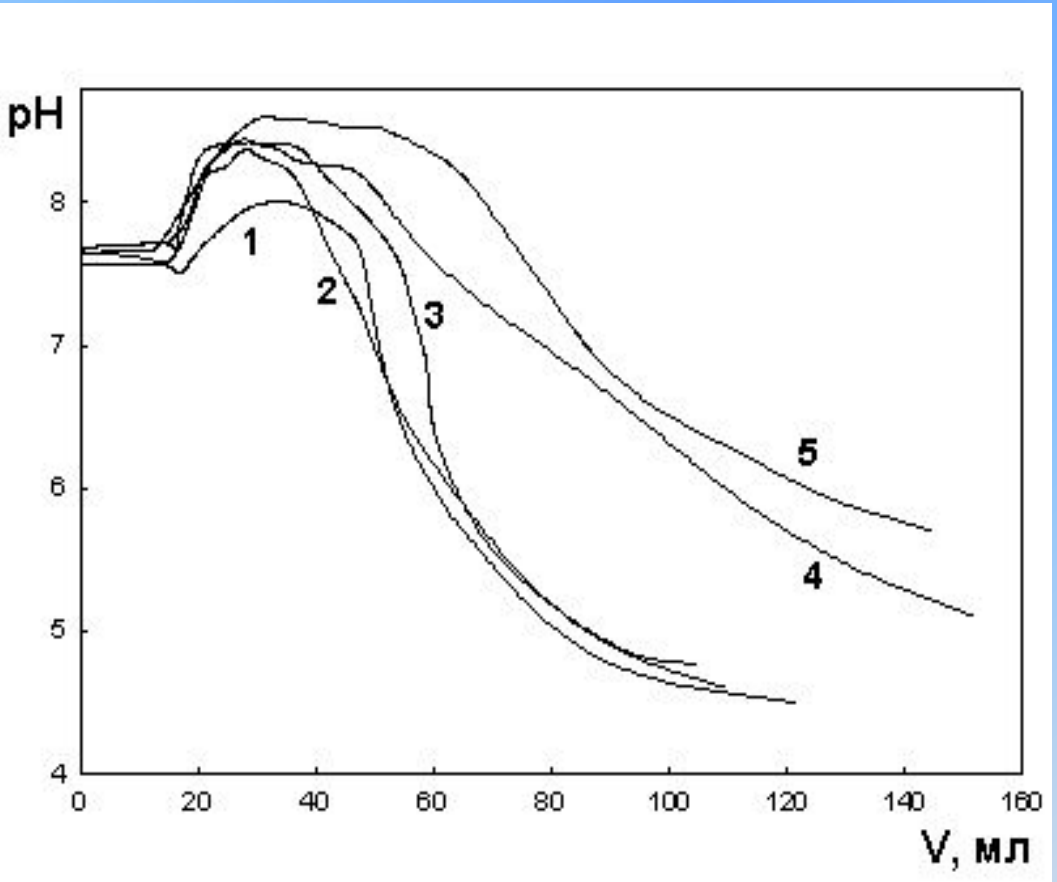


Формирование градиента pH однокомпонентными элюентами в катионообменной системе

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

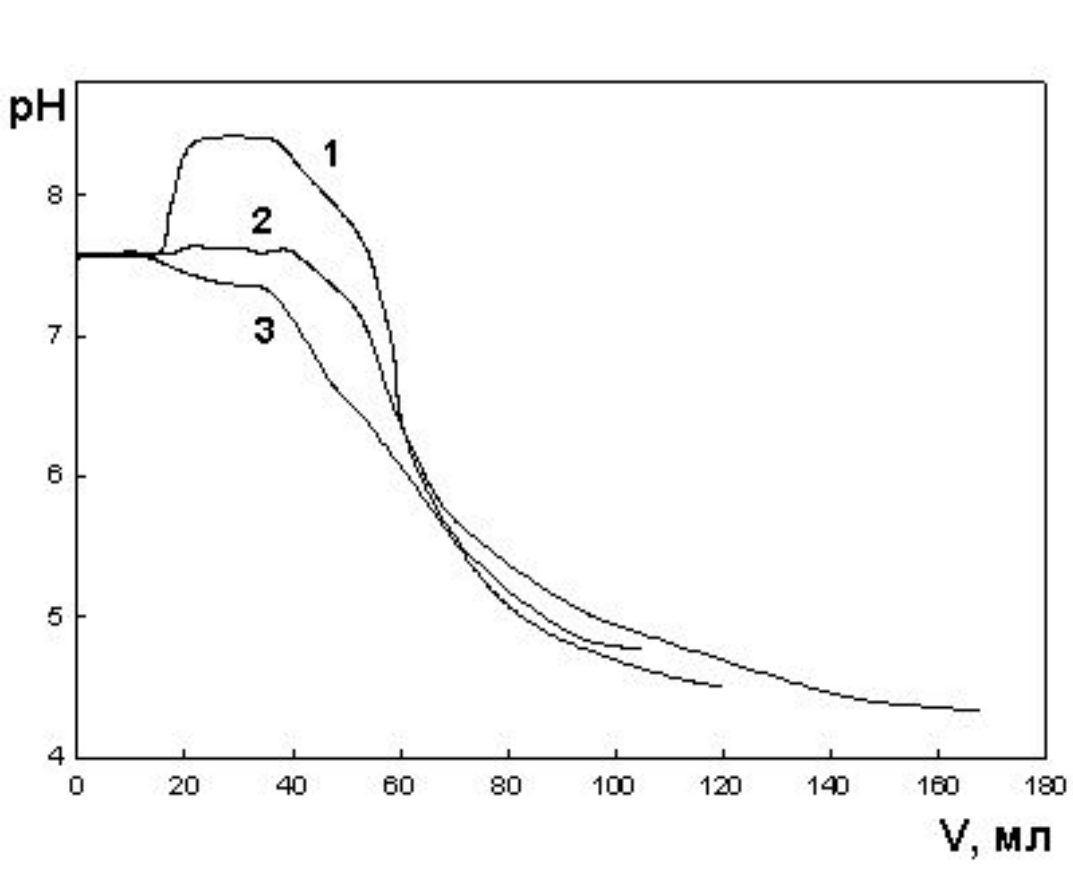
СР: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5)

Э: 1 мМ кислоты - *1* – щавелевая, *2* - винная, *3* – лимонная, *4* – глутаминовая, *5* – уксусная; 1 мл/мин



Как избавиться от подъема pH?

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)
СР: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5)
Э: 0,2 мМ лимонная кислота (pH 3,7-3,9); 1 мл/мин,
ионная сила подвижных фаз: *1* - ~0; *2* - 0,01, *3* - 0,1 (NaCl)



Анионообменные сорбенты
(для ХФ ионов металлов)

Сорбент	PBE-94 (Pharmacia)	En-SiO_2	Dien-SiO_2	Tetren-SiO_2	Tetren-SiO_2	AP-SiO_2
Матрица	полисахарид	Силохром С-120	Силохром С-120	Силохром С-120	Silasorb Si 600	Lichro-s orb
Функц. группы	-NR_2 (не указаны)	этилен-диамин	диэтилен-триамин	тетраэтилен-пентамин	тетраэтилен -пентамин	пропил-амин
Размер частиц (мкм)	100-200	100-160	100-160	100-160	7,5	100-120
pH-диапазон гидрол. стаб-ти	2 - 12	1 - 8	1 - 8	1 - 8	1 - 8	1 - 8
Ионообм. емкость	0,32 ммоль/мл геля	0,10 ммоль/г	0,12 ммоль/г	0,35 ммоль/г	~1,0 ммоль/г	0,10 ммоль/г

Карбоксильные сорбенты

(для ХФ ионов металлов)

<u>Впервые</u> – нисходящие градиенты pH

Сорбент	CM-52	Ольвагель-COOH	MN	MacroPrep 50 CM
Производитель	Whatman (UK)	НИИ химии (СССР)	Purolite (UK)	Biorad (USA)
Матрица	Микрогрануллир. целлюлоза	ПММА	ССПС	ПММА
Функц. группы	$-CH_2COOH$	-COOH	-COOH	$-CH_2COOH$
Размер частиц (мкм)	100-200	> 30	5	50
pH-диапазон стаб-ти	3 - 10	3 - 13	1 - 14	3 - 13
Ионообменная емкость	0,95 - 1,15 ммоль/г (сухого сорбента)	0,30 ммоль/мл геля	не выше 0,10 ммоль/г	0,21 ± 0,04 ммоль/мл геля

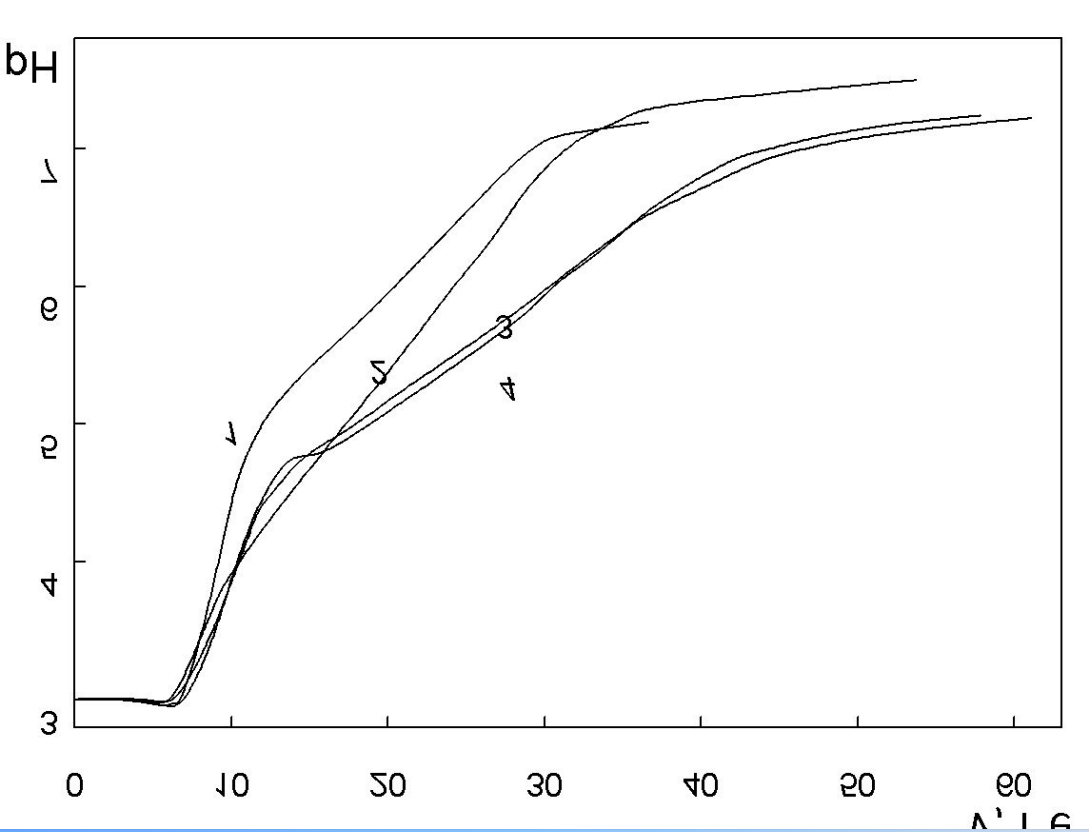
Квази-линейные градиенты pH на сорбенте с низкой емкостью

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та (pH 3,0), $I_{СР}$: ~0 (*1 и 2*), 0,05 (*3 и 4*)

Э: 10 мМ Трис-лимонная к-та (pH 7,0), $I_{Э}$: ~0 (*1 и 3*), 0,05 (*2 и 4*);

1 мл/мин



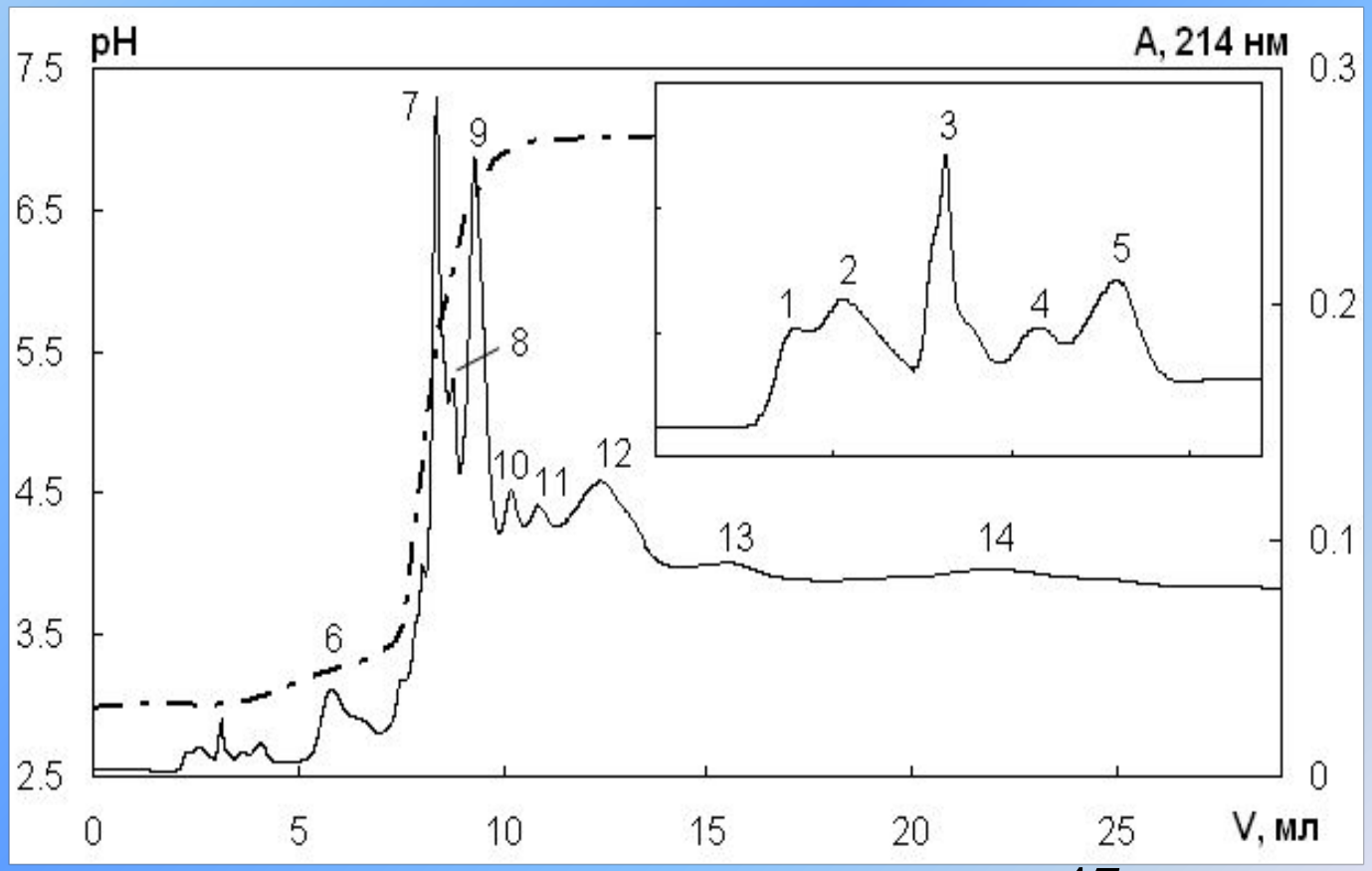
Влияние добавок ацетонитрила в условиях градиента pH

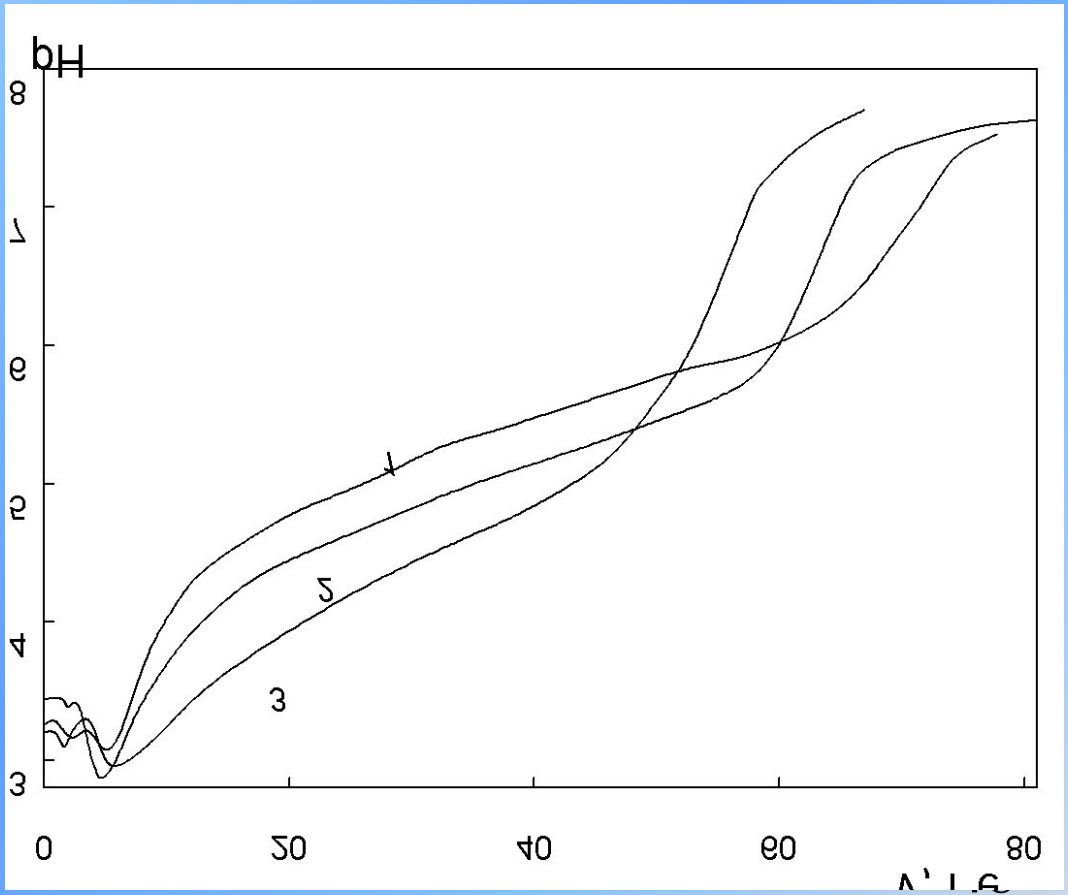
сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 5 мМ NaH_2PO_4 + 20% CH_3CN (pH 3,0)

Э: 10 мМ NaH_2PO_4 + 6 мМ Трис + 20% CH_3CN (pH 7,0), 1 мл/мин

Детектирование: УФ (214 нм)



Влияние ионной силы в карбоксильной колонке

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)
СР: 2 мМ лимонная к-та + 1,5 мМ Трис (pH 3,3),
Э (pH 7,6): 20 мМ Трис-HCl + 5 мМ лимонная к-та; 1 мл/мин;
ионная сила: 0 (*1*), 0,01 (*2*), 0,5 (*3*)