

# Fehérjék elválasztástechnikái

Horvai György, Fekete Szabolcs és Bobály Balázs  
előadásai nyomán

Az ábrák több, részben szerzői jogokkal védett műből, oktatási célra lettek kivéve. Csak az intranetre tehetők, továbbmásolásuk, terjesztésük nem megengedett.

# TÉMÁK

Fehérjék és peptidek kromatográfiája

Elektroforézis és elektrokromatográfia

(Lab on a chip HPLC)

# Fehérjék és peptidek kromatográfiás módszerei

Gél- (v. méretkizárásos) kromatográfia (**SEC**, GF, GPC,)

Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (**HIC**)

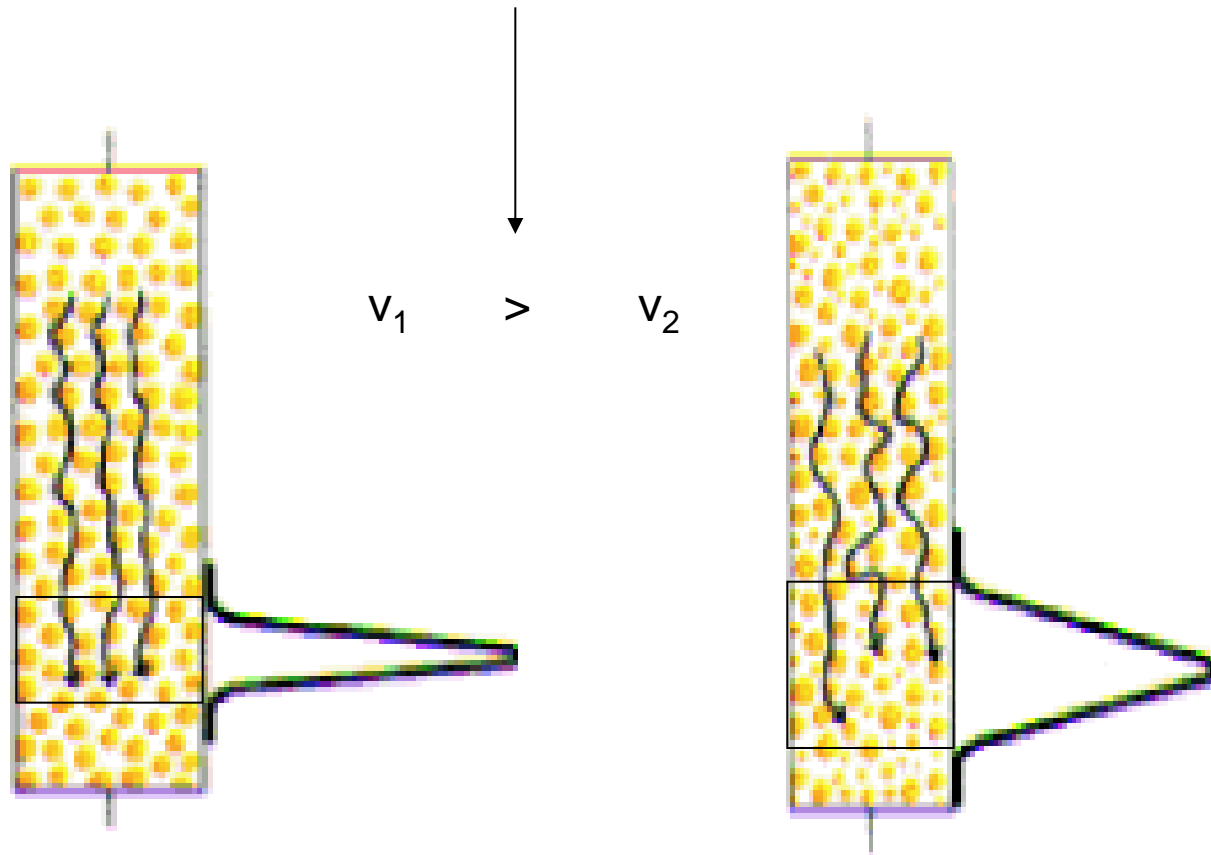
Ioncserés protein/peptid-kromatográfia (**IEX-PC**)

Fordított fázisú kromatográfia (**RP-HPLC**)

Affinitás kromatográfia (**AC**)

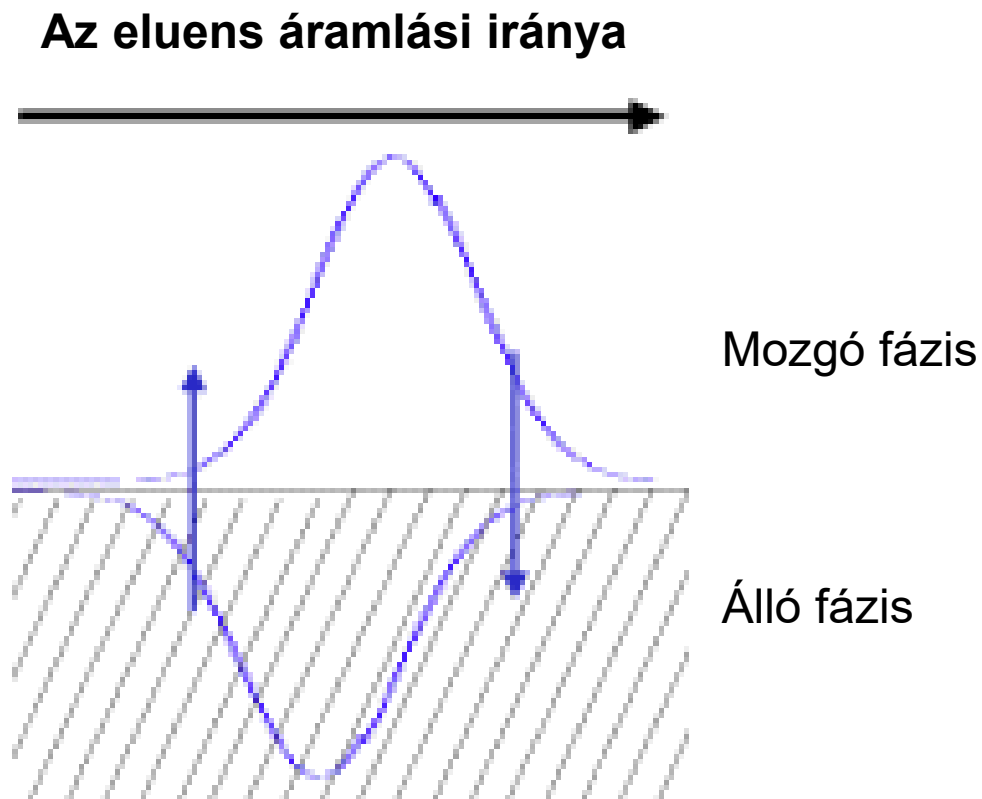
## Eluciós kromatográfiák. Zónaszélesítő hatások –

1. A töltetágyban fellépő axiális diszperzió/ Taylor-diffúzió miatti dugó/zónaszélesedés (megkötődés/szorpció nélkül)



Egy adott dugószerűen injektált, az eluensben dugószerűen vándorló komponens koncentrációprofilja, eltérő eluens áramlási sebességek mellett

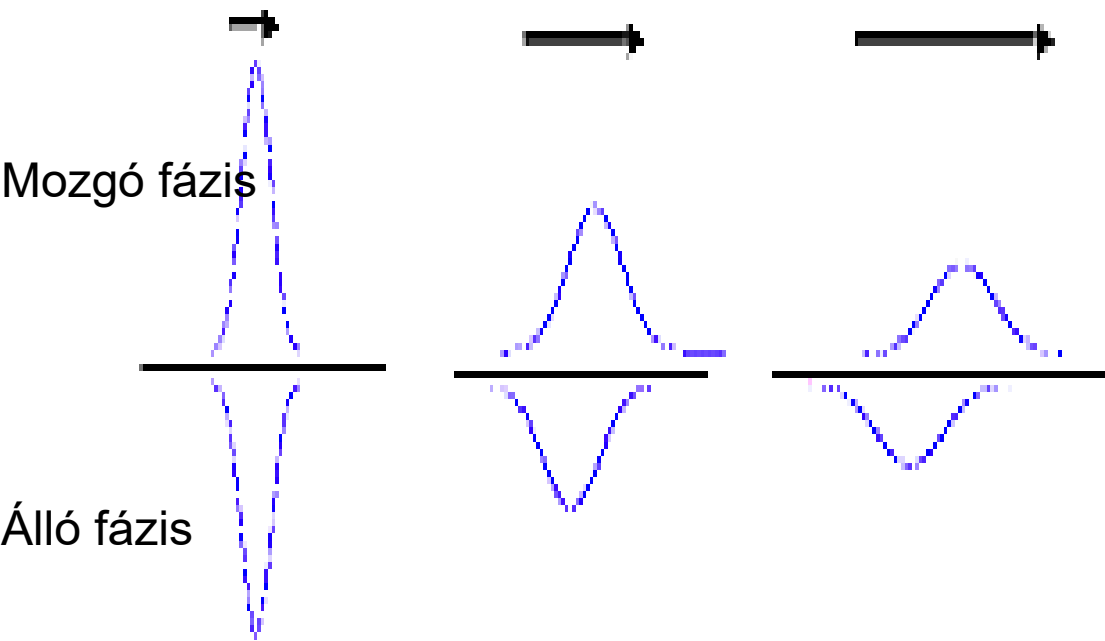
2. Az anyagátadás az áramlási irányra merőlegesen, az eluált mintakomponens-dugó(k) vándorlása során



**A kék nyilak a mozgó és az álló fázis közötti anyagátmenetek eredő irányait jelölik**

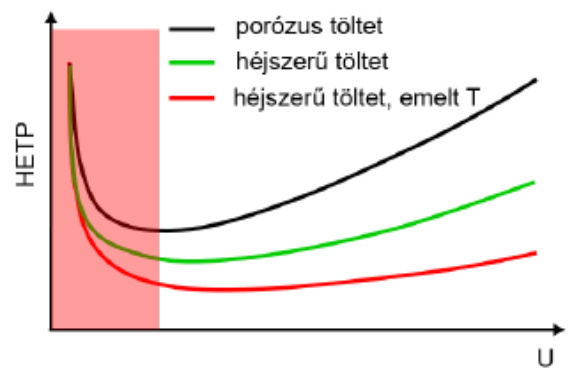
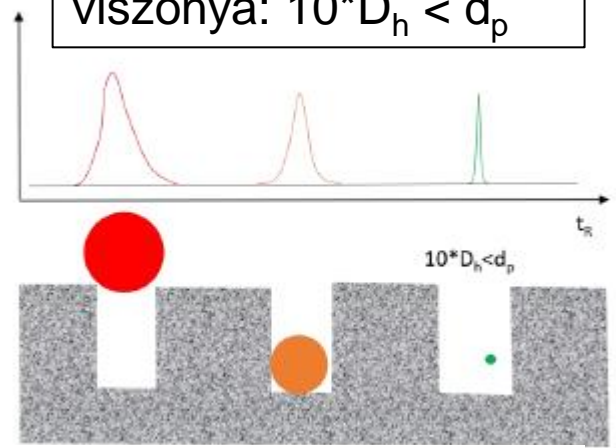
*Az áramlási sebességet az anyagátadási sebességekhez viszonyítva kell optimalni, hogy ne okozzon túlzott zónaszélesedést.*

A nyilak hossza az áramlási sebesség nagyságát is mutatja:

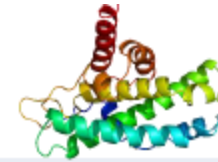
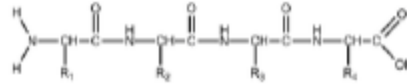
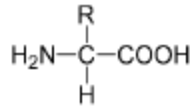


Az áramlási irányra merőleges anyagátadás az áramlási sebességgel arányos zónaszélesedést okoz.

A pórusosság szerepe:  
a hidrodinamikai molekulaméret és a pórusátmérő viszonya:  $10 \cdot D_h < d_p$

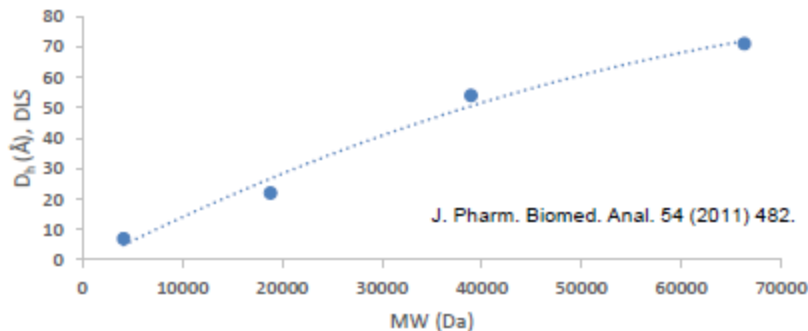


## Anyagátadási sebesség függ:



	kismolekula	közepes méretű molekula (peptid)	makromolekula (fehérje)
MW [Da]	<1000	1000-5000	>5000
D <sub>h</sub> (Å)	5-10	10-15	>10-15
D <sub>m</sub> [cm <sup>2</sup> /s]	10 <sup>-5</sup>	5*10 <sup>-6</sup>	5*10 <sup>-7</sup>
konformáció	jól definiált	„rugalmas” molekula	statisztikus eloszlású (környezet)

Molekulaméret növekedése a molekulatömeggel



$$D_m = 8.34 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{T}{\eta M^{1/3}}$$

**A diffúziós állandó csökken a molekulamérettel:  
Meghatározza a mérés sebességét az anyagátadási ellenállás növekedése miatt**

**A hidrodinamikai átmérő nő a molekulasúllyal:  
Meghatározza a töltet pórusméretét**

# Relatív zónaszélesedés (H), van Deemter-egyenlet

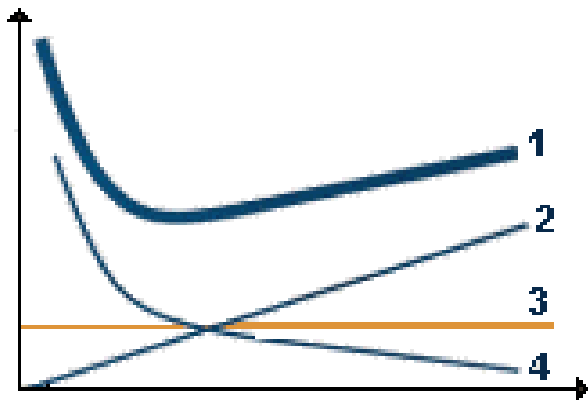
$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left( \frac{w_a}{t_R} \right)^2 \text{ relatív zónaszélesedés, ahol } N = 16 \left( \frac{t_R}{w_a} \right)^2 \text{ kolonnahatékonyság}$$

( $w_a$ , az alapvonalon mért csúcshélesség,  $t_R$  retenciós idő)

$$H = A + Bv + \frac{C}{v}, \quad (1) = (3) + (2) + (4), \quad \left( \frac{dH}{dv} = 0 \rightarrow v = \sqrt{\frac{C}{B}} \right)$$

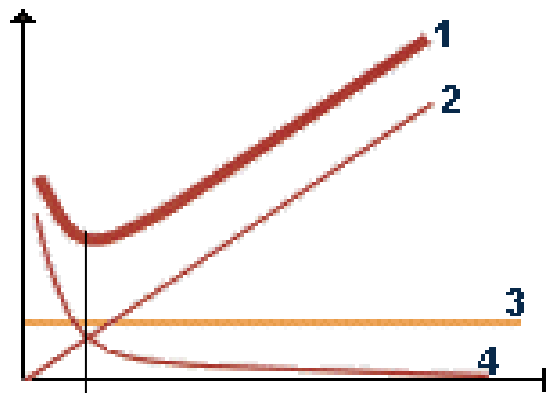
ahol  $v$  a lineáris áramlási sebesség

H, **kis molekulák** esetén  
(D, diffúziós állandó nagyobb!)



Optimálendő lineáris áramlási sebesség,  $v$  (cm/min)

H, **nagy molekulák** esetén  
(D, diffúziós állandó a molekulamérettel csökken!)

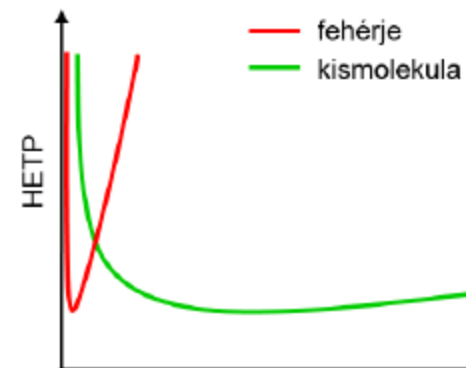


Eredő H (1)

Anyagátadás miatti  
diszperzió (2)

Visszakeveredés (3)

Axiális diszperzió (4)







# Fehérjék felépítése, aminosavak

Alanin: Ala; A

Arginin: Arg; R

Aszparagin: Asn; N

Aszparaginsav (aszpartát): Asp; D

Cisztein: Cys; C

Fenilalanin: Phe; F

Glutamin: Gln; Q

Glutaminsav (glutamát): Glu; E

Glicin: Gly; G

Hisztidin: His; H

Izoleucin: Ile; I

Leucin: Leu; L

Lizin: Lys; K

Metionin: Met; M

Prolin: Pro; P

Szerin: Ser; S

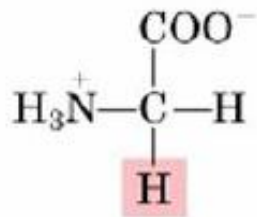
Treonin: Thr; T

Triptofán: Trp; W

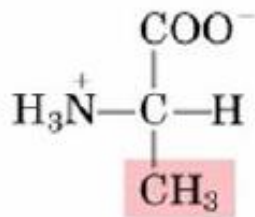
Tirozin: Tyr; Y

Valin: Val; V

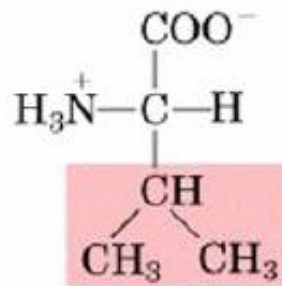
# Apoláris, hidrofób oldalláncú aminosavak



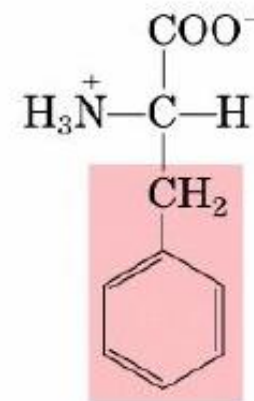
Glycine



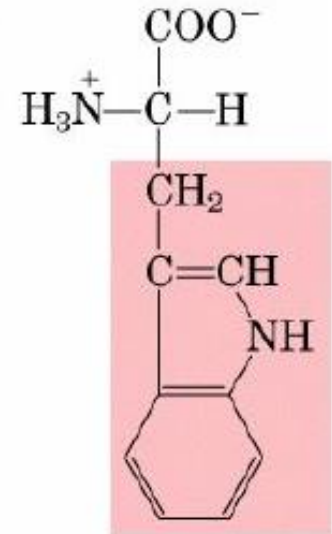
Alanine



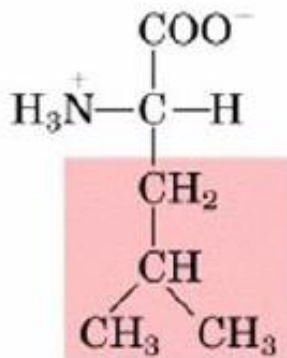
Valine



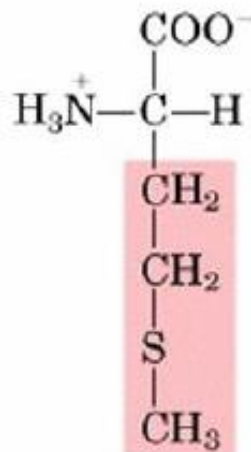
(F)  
Phenylalanine



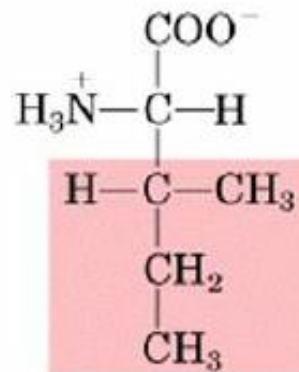
Tryptophan



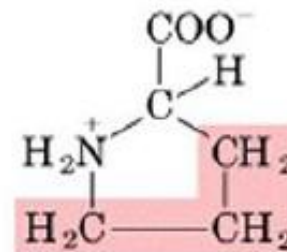
Leucine



Methionine



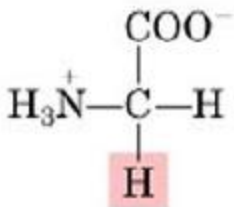
Isoleucine



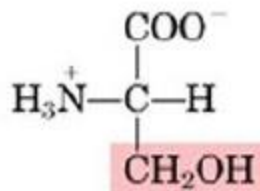
Proline

(W)

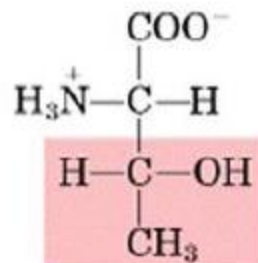
## Poláris oldalláncú, töltéssel nem rendelkező aminosavak



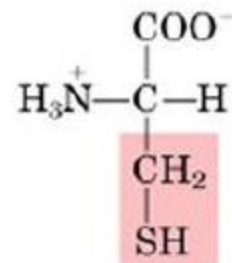
Glycine



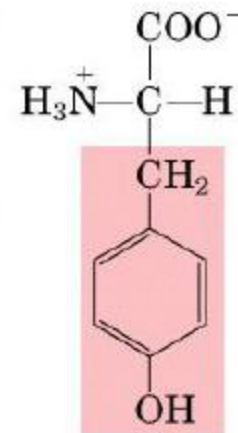
Serine



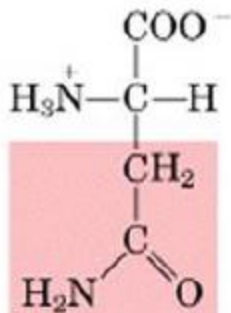
Threonine



Cysteine

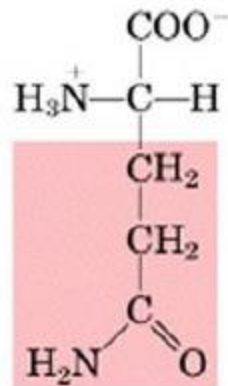


Tyrosine (Y)



Asparagine

(N)



Glutamine

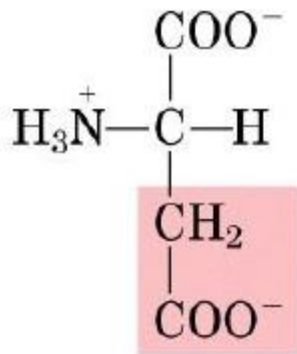
(Q)

(A glicin itt csak szerkezetszármaztató, magyarázó ábraként szerepel)

## Elektrolitikus disszociációra képes (gyengén savas, ill. bázikus) oldalláncú aminosavak:

Savas oldalláncú, negatív töltésű aminosavak

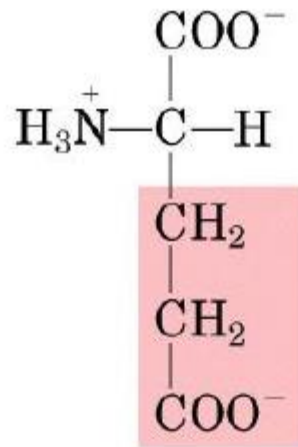
(Aspartic acid, Glutamic acid)



Aspartate

(deprotonálódva anionná)

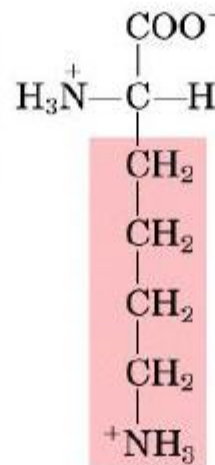
(D)



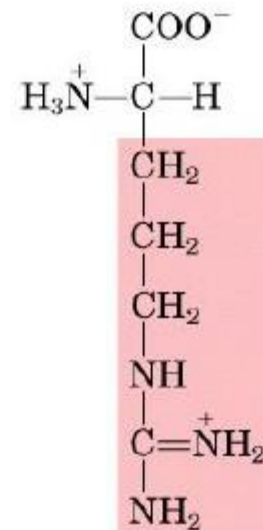
Glutamate

(E)

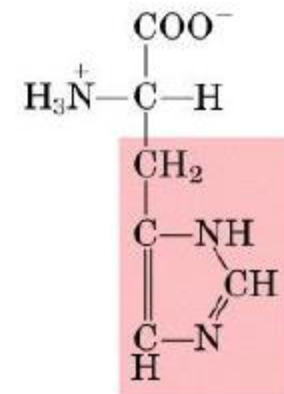
Bázikus oldalláncú, pozitív töltésű aminosavak



Lysine (K)

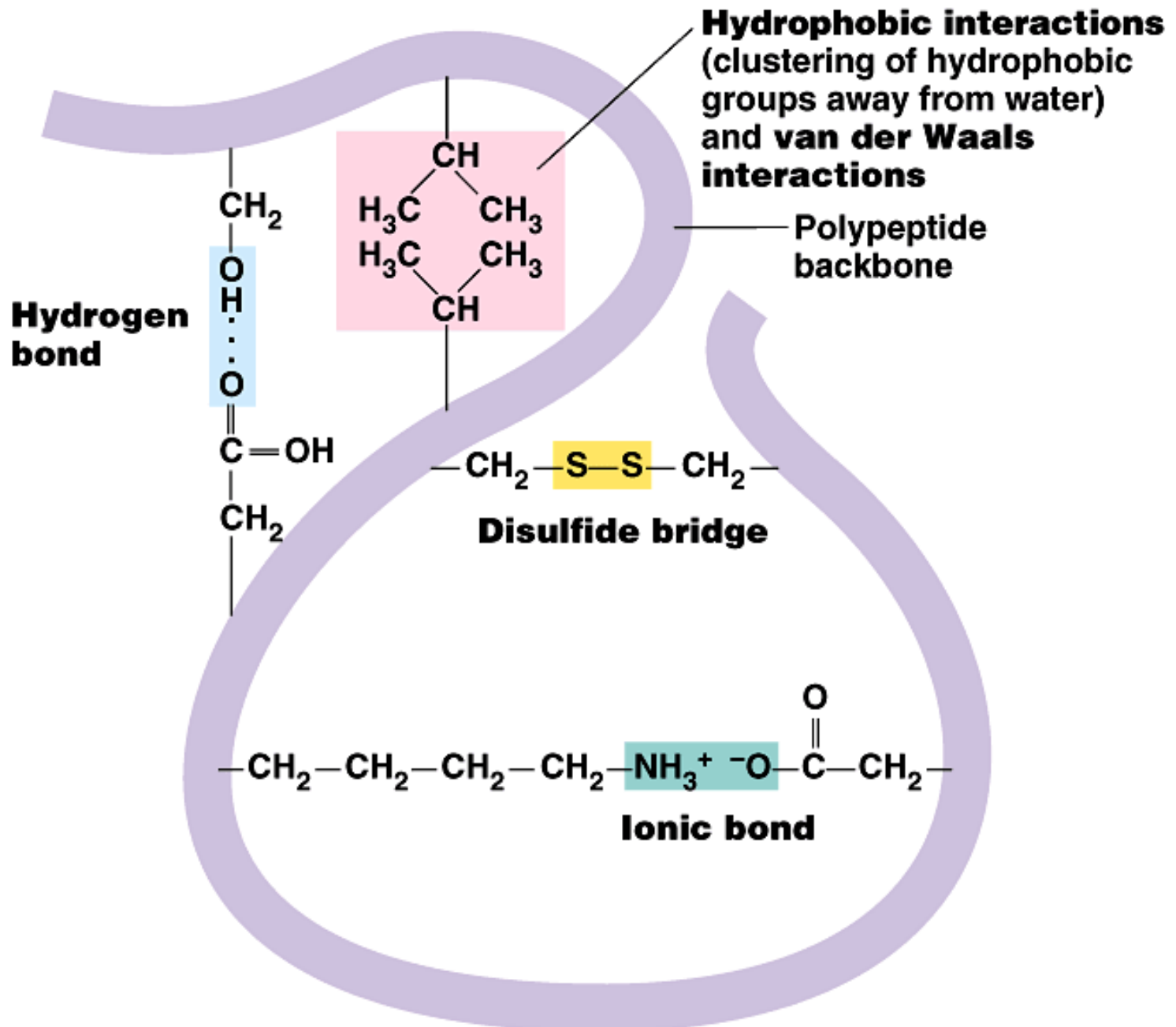


Arginine (R)

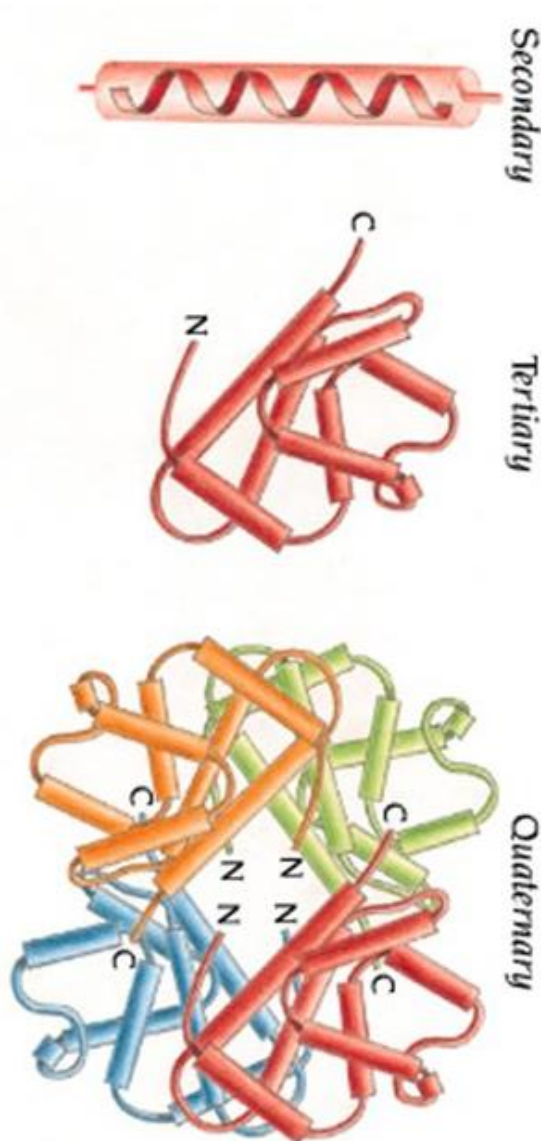


Histidine

(kationná protonálódva) ----- (protonátlanul)



# Másodlagos, harmadlagos, negyedleges (ötödleges) szerkezet és egyéb szerkezeti módosulások



## Másodlagos alszerkezetek

( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, random coils, loops);  
Harmadlagos szerkezet (előzőek elrendeződése)  
Negyedleges (asszociátumok, aggregátumok)

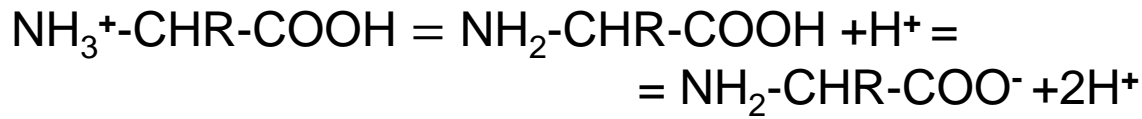
## Poszt-transzlációs módosulások:

- N-glikozilációk (Asn-X- Ser/Thr/Cys)
- O-glikozilációk, (Ser, Thr)
- Diszulfidhidak kialakulása

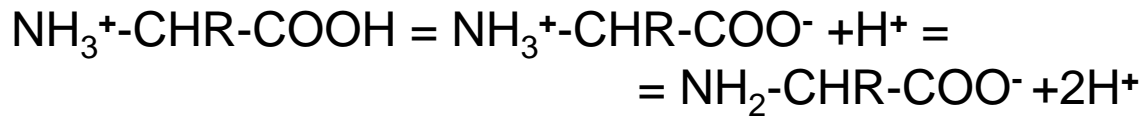
## Átalakulások, bomlások:

- Redukció (diszulfidhidak felbomlása);
- Oxidáció (Met, szulfoxidja, szulfonja)
- Deamidáció (Asn, Gln)

Az aminosavak pH-függő töltöttségi (protonált, ikerionos állapot, deprotonált) állapotai, jellegzetes izoelektromos pontja (pH-ja) fogalmilag „átörökítődik” az oligopeptidekre és a fehérjékre is (N-terminális C-terminális láncvégek, a [de]protonálható savas és bázikus oldalláncok jelenléte miatt):



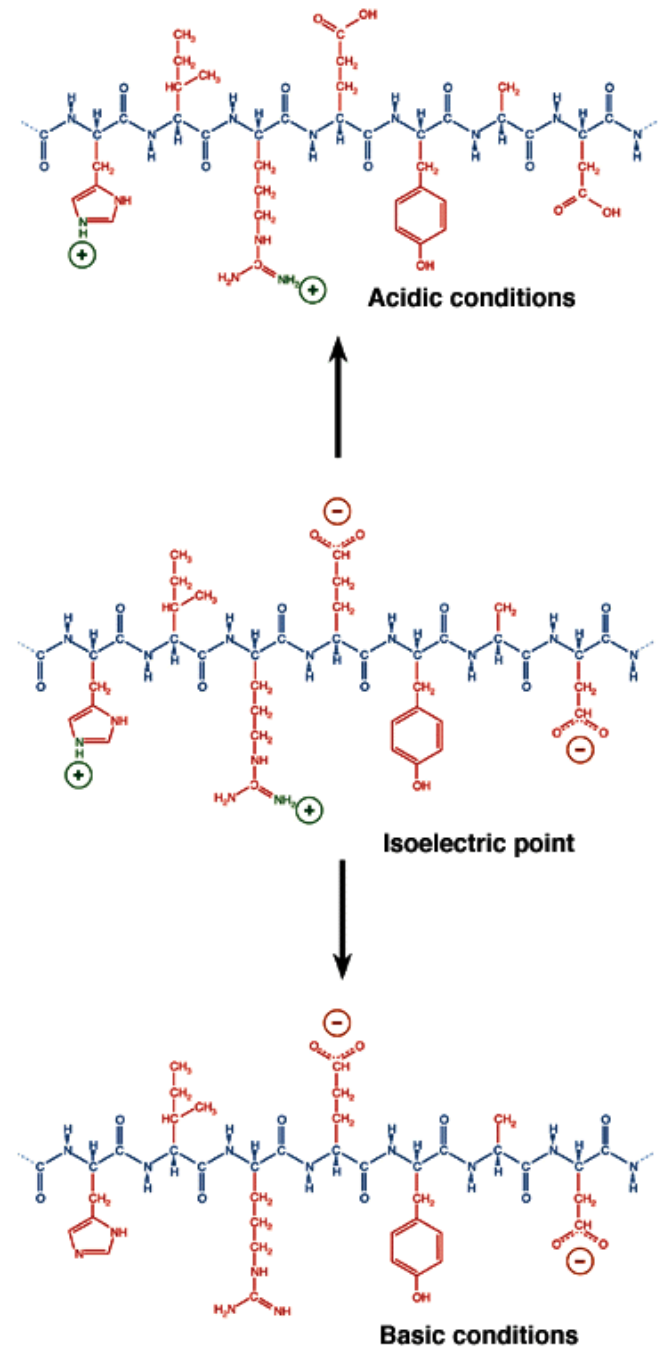
,avagy



$$pK_s^1 = pK_{\text{NH}_2} = \text{pH} + \log \left[ \frac{\text{kation}}{\text{ikerion}} \right]$$

$$pK_s^2 = pK_{\text{COOH}} = \text{pH} + \log \left[ \frac{\text{ikerion}}{\text{anion}} \right]$$

$$IP = \frac{pK_{\text{COOH}} + pK_{\text{NH}_2}}{2}$$





# Fehérjék felépítése, aminosavak

Röv.	Teljes név	Oldallánc típusa	Tömeg	pI	
A	Ala	Alanin	hidrofób	89,09	6,11
C	Cys	Cisztein	hidrofób (Nagano, 1999)	121,16	5,05
D	Asp	Aszparaginsav	savas	133,10	2,85
E	Glu	Glutaminsav	savas	147,13	3,15
F	Phe	Fenil-alanin	hidrofób	165,19	5,49
G	Gly	Glicin	hidrofil	75,07	6,06
H	His	Hisztidin	bázikus	155,16	7,60
I	Ile	Izoleucin	hidrofób	131,17	6,05
K	Lys	Lizin	bázikus	146,19	9,60
L	Leu	Leucin	hidrofób	131,17	6,01
M	Met	Metionin	hidrofób	149,21	5,74
N	Asn	Aszparagin	hidrofil	132,12	5,41
P	Pro	Prolin	hidrofób	115,13	6,30
Q	Gln	Glutamin	hidrofil	146,15	5,65
R	Arg	Arginin	bázikus	174,20	10,76
S	Ser	Szerin	hidrofil	105,09	5,68
T	Thr	Treonin	hidrofil	119,12	5,60
V	Val	Valin	hidrofób	117,15	6,00
W	Trp	Triptofán	hidrofób	204,23	5,89
Y	Tyr	Tirozin	hidrofób	181,19	5,64

# Fehérjék és peptidek kromatográfiás módszerei

Gél- (v. méretkizárásos) kromatográfia (**SEC**, GF, GPC,)

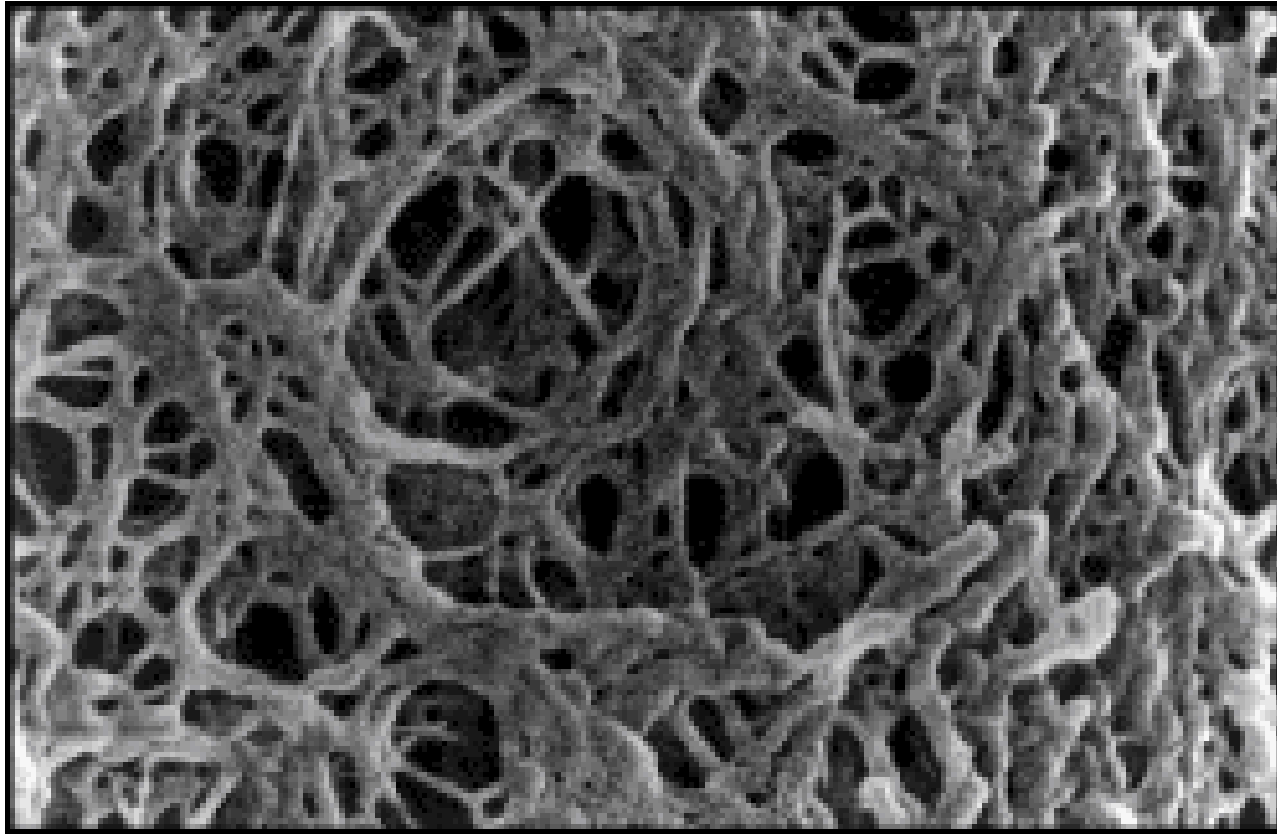
Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (**HIC**)

Ioncserés protein/peptid-kromatográfia (**IEX-PC**)

Fordított fázisú kromatográfia (**RP-HPLC**)

Affinitás kromatográfia (**AC**)

Gél-(permeációs, GPC), gélszűrős (GF), ill. más néven **méretkizárásos (SEC)** kromatográfiás xerogél-töltetek



Agarózgél (gyöngy) pásztázó elektronmikroszkópos képe  
(M=50.000, *Anders S. Medin, PhD Thesis, Uppsala University 1995.*)

## Gélkromatográfias térfogatok nevezéktana

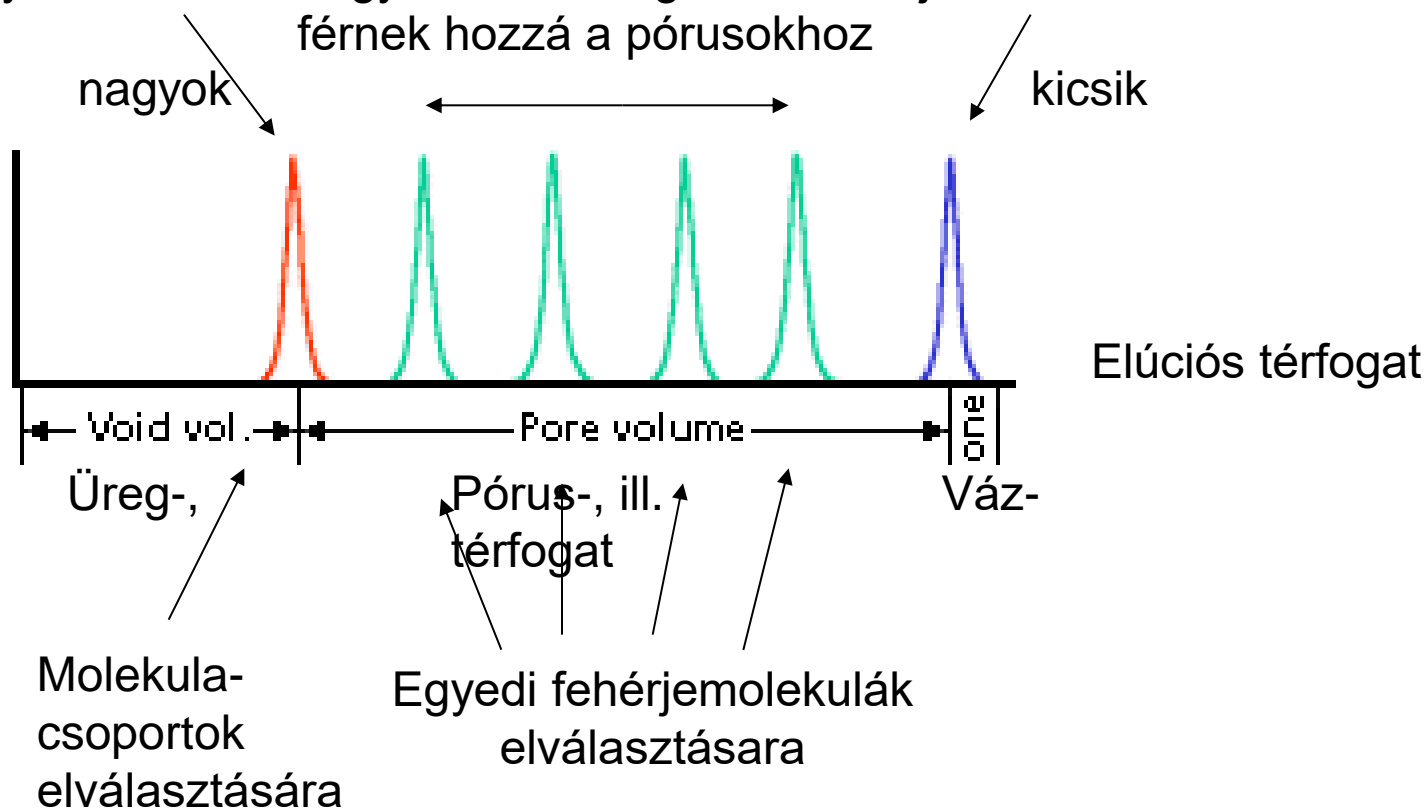
A gélkromatográfias oszlopban az összes mintamolekula számára hozzáférhető a gyöngyök közötti folyadék. Ezt a folyadékrészt a gélszűrésben *üregtérfogatnak* nevezik, ez általában az oszlop teljes térfogatának kb. a 30%-át teszik ki.

A gélszűrő közeg olyan méretű pórusokat tartalmaz, amely megengedi, hogy a minta molekulái behatoljanak a gél gyöngyeibe, de csak a méretüktől függő mértékben. A pórusosnak a teljes térfogatát együtt nevezik *pórustérfogatnak*.

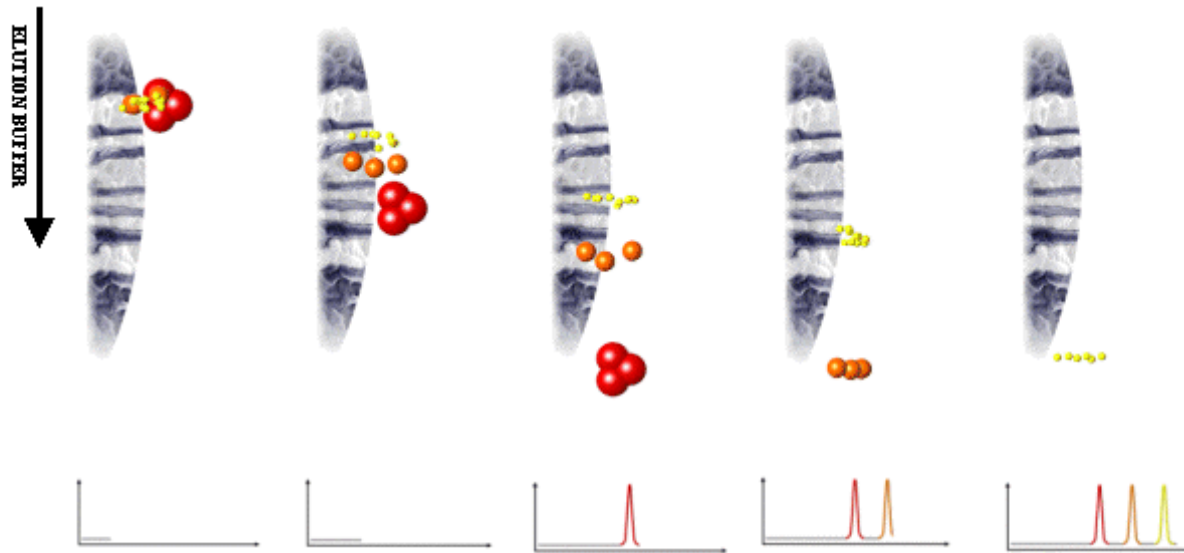
A gélgyöngyök nem-pórusos részét *vázrésznek* nevezik, ebbe nyilván nem juthatnak bele a minta molekulái. Egy megfelelő gélszűrő vázrésztérfogata kb. 3-5 %-a egy jól megtöltött oszlopnak.

# Az üreg-, ill. pórustérfogatok gélkromatográfiás felhasználása különböző célokra

Az egyre csökkenő méretű mintamolekulák, amelyek egyáltalán nem, vagy csak részlegesen, ill. teljes mértékben férnek hozzá a pórusokhoz



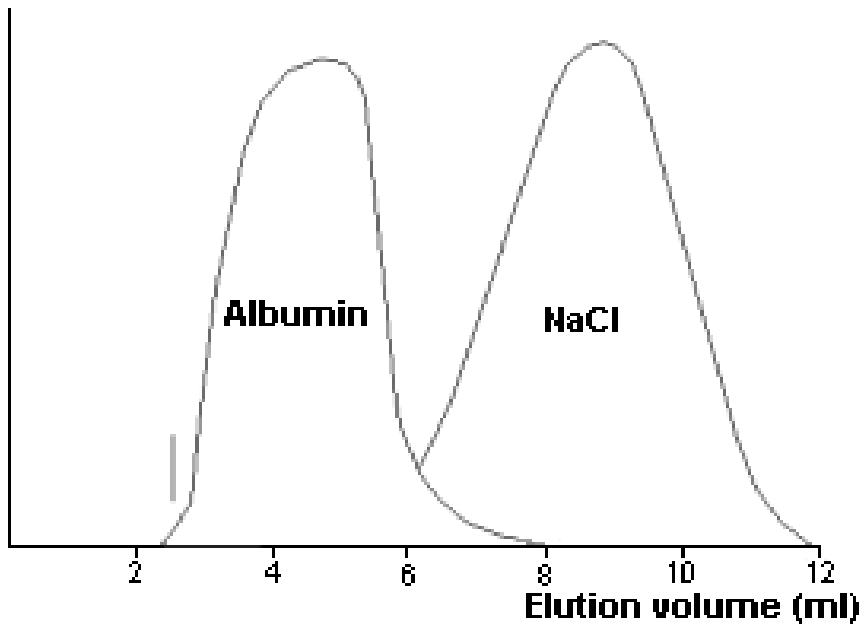
Pufferolt eluensáram



Valójában szakaszos és preparatív (frakcionálósos) jellegű kromatográfia

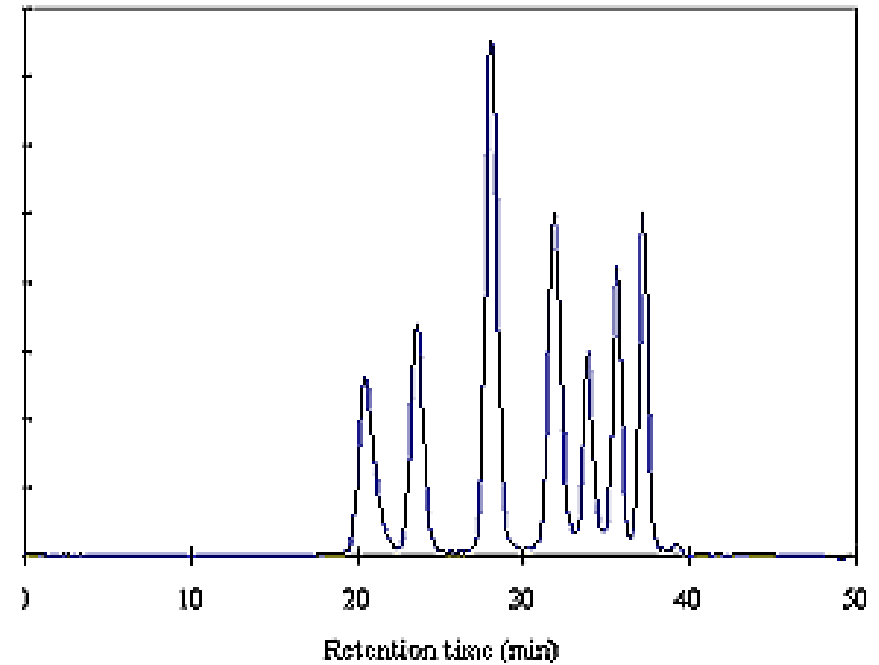
Csoportelválasztási mód -

Albumin sóalanítása  
PD-10 oszlopon.



Nagyfelbontású mód -

Peptidek elválasztása  
'Superdex Peptide' oszlopon.



## Egy céges „oszloptöltet” ismertető:

... packings are based on a **10 µm diol-bonded silica** and are available in a variety of pore sizes and column configurations.

The ... SEC Columns:

Resolve proteins that differ in molecular weight by a factor of two

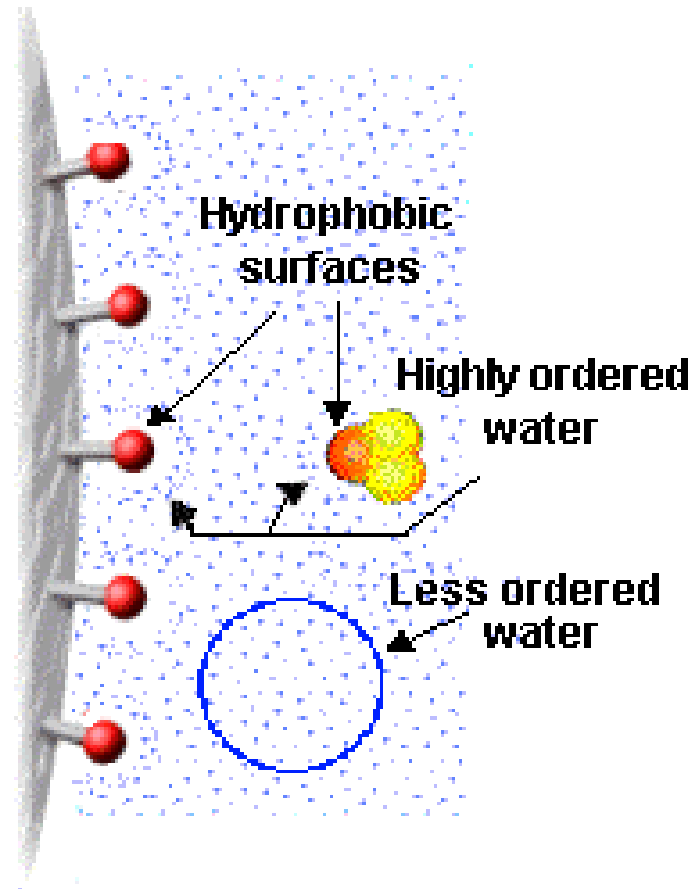
Distinguish proteins differing by as little as 15% in molecular weight

Ideally, there should be no interaction between the stationary phase and the sample molecules. Potential interactions are reduced by adding salts in the 0.1–0.3 M concentration range.



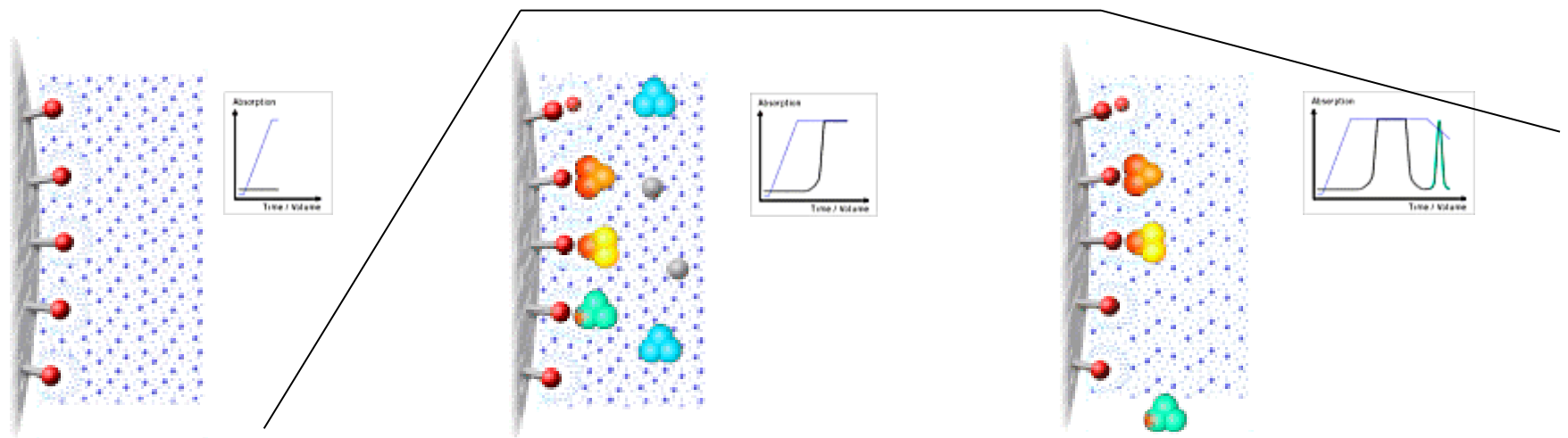
# Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)

azzal foglalkozik, hogy a megváltoztatja a fehérjék és a töltetek hidrofób részeinek kölcsönhatását a sókoncentráció (ionerősség) változtatásával (kezdeti ideigleges, részleges „kisózás” keresztül, majd fokozatos csökkentésével, negatív gradiens szerint!)

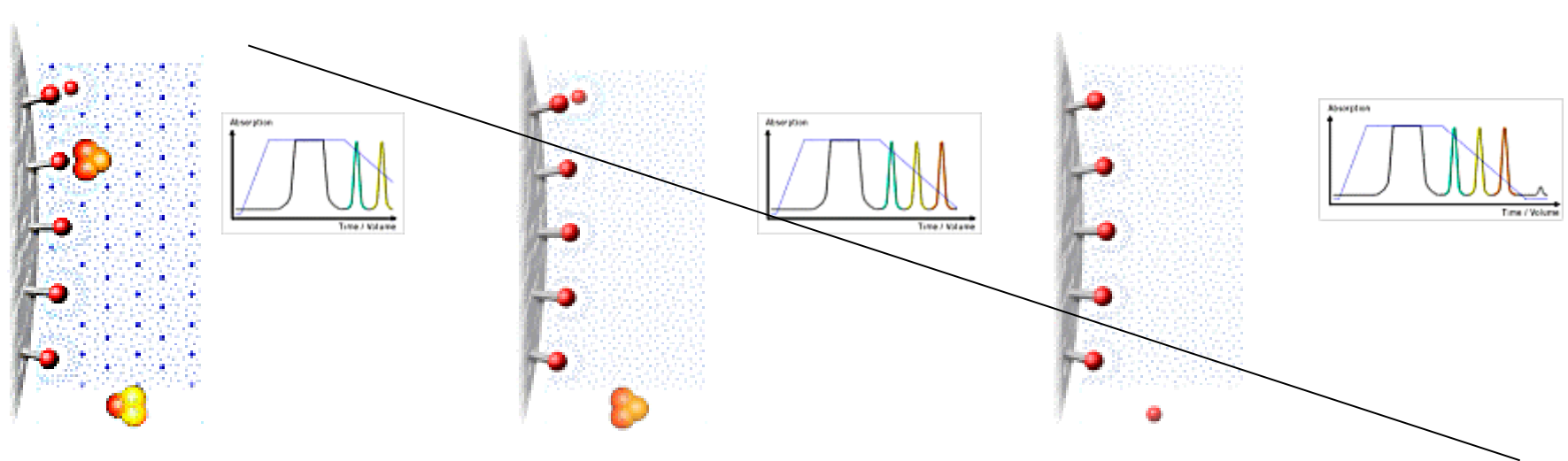


$C_{\text{só}}$ 

## 0.) Tömény, nagy sókoncentrációjú eluens

 $C_{\text{só}}$ 

## 1.) Apoláris(sá váló) proteinek megkötődése

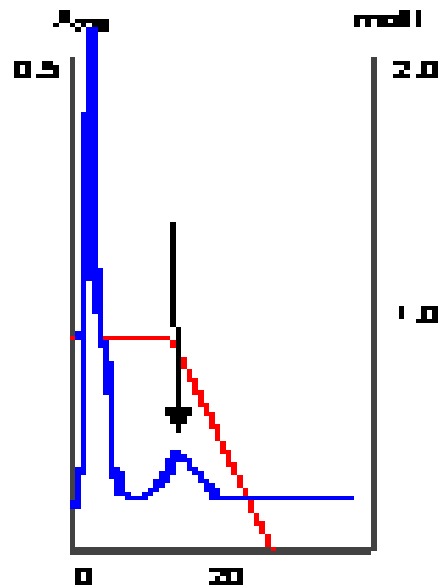


2.) Csökkenő sókoncentrációjú (negatív gradiensű) eluensáramban differenciált fehérje-lemosódás (kevésbé hidrofóbok, majd a jobban hidrofóbok)

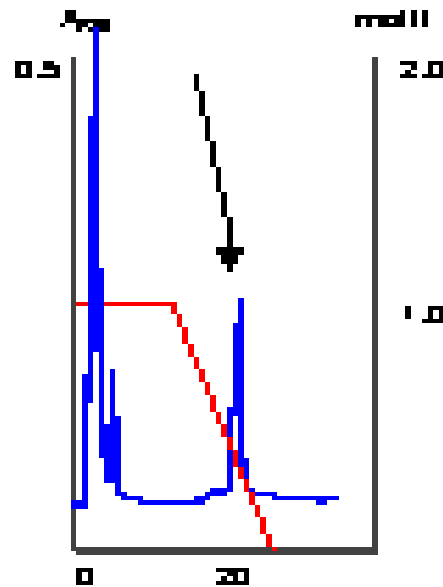
0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

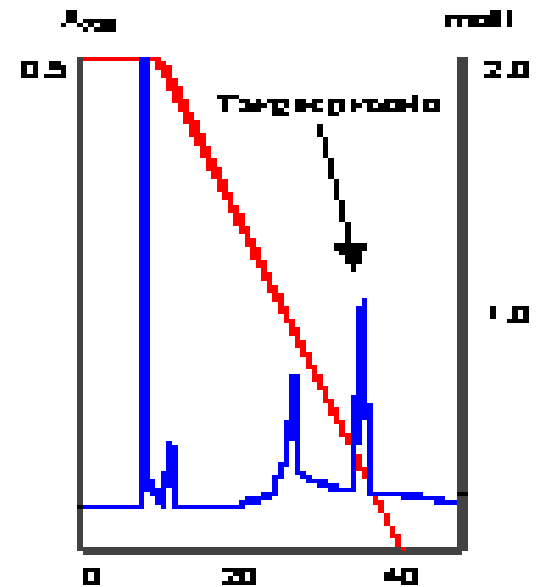
2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



$C_{\text{só}}^0$  - túl alacsony



- optimális



- túl magas

A sógradiens kezdeti koncentrációjának optimális beállítása nagyon fontos a fehérjék HIC-módszerű elválasztásának, tisztításának elérhető hatékonyságában:

A baloldali kromatogramon a sókoncentráció nem elégséges a kívánt (nyíllal jelzett) fehérje teljes mértékű megkötéséhez.

A középső kromatogramon a kívánt fehérje éles csúcsban eluálódik a csökkenő gradiens hatására.

Tisztítási szempontból a még nagyobb kezdeti koncentrációjú sógradiens sem előnyösebb a jobb oldali kromatogramon, mivel a minta más szennyeződései is megkötődnek és eluálódnak a sógradiens csökkentése során.

A HIC-es proteintisztítások során az eluens pH-ját általában nem tekintik optimalizálendő paraméternek.

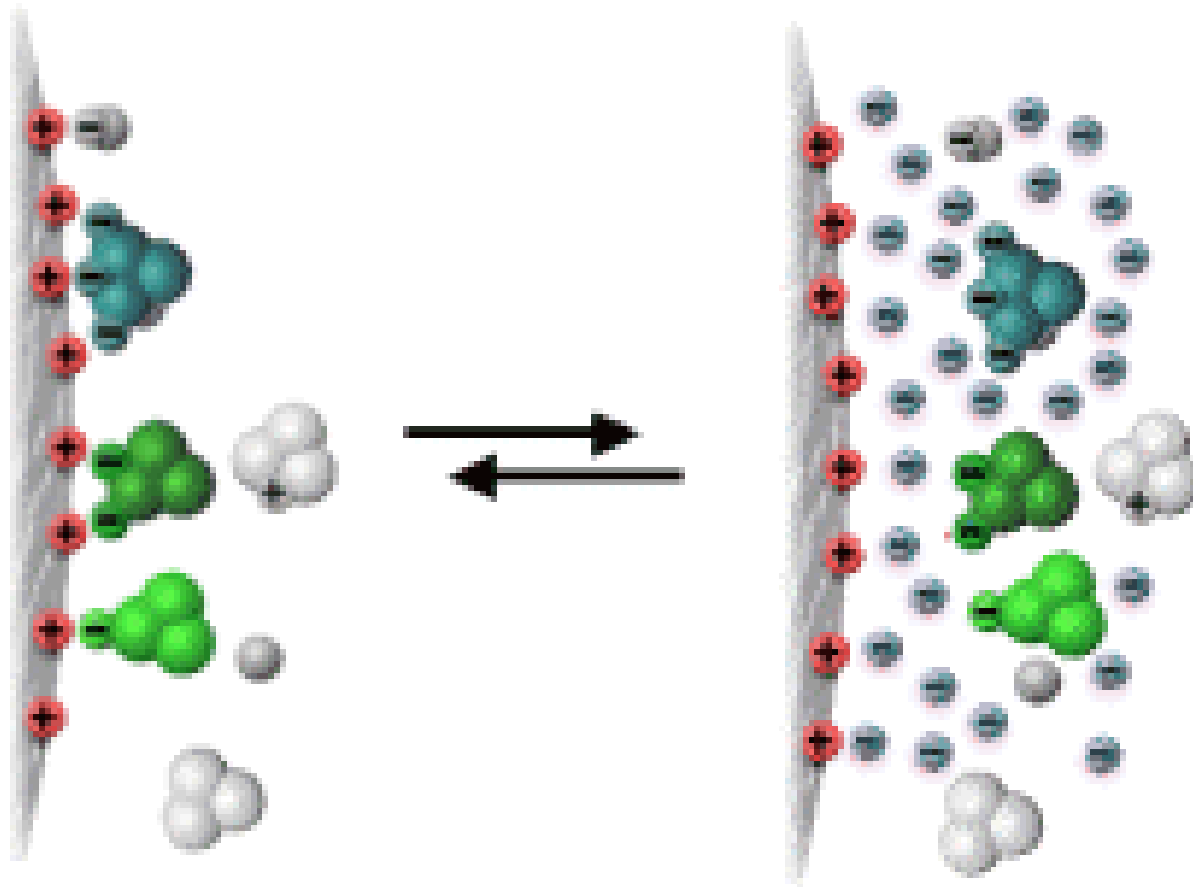
## Egy céges „oszloptöltet” ismertető:

... HIC Columns contain **non-porous, polymethacrylate-based particles (2.5  $\mu\text{m}$ ) functionalized with a butyl ligand coating**

Ideally suited for hydrophobic-based separations for protein characterization using non-denaturing conditions.

Help deliver fast, efficient separations using non-porous particles to address high-throughput needs.

## Ioncserés fehérje/peptidkromatográfia (IEX-PC)



A töltésekkel rendelkező molekulák az ellentétes előjelű töltéssel rendelkező ioncserélőn adszorbeálódhatnak. A dinamikus egyensúlyt a **pH és a sókoncentráció** befolyásolja. Lehetőség a lemosásra növekvő sógradienssel.

A pH változtatása egy igen hatékony módja a fehérje molekulák eredő töltésének befolyásolására, és ezért általánosan használatos a szelektivitás (pl. elúciós sorrend) ill. felbontás (elúciós távolságok) szabályozására.

Az eluensbe adagolt sóban található versenyző ionok nem befolyásolják a szelektivitást, de elősegítik a fehérjemolekulák deszorpcióját a kiszorító ion növekvő ionos töltöttsége függvényében.

Az ioncserés protein/peptidkromatográfiában általában egyvegyértékű semleges sókat használnak (pl. NaCl-ot) deszorbeáltató ágensként, főleg azért mert a NaCl nem befolyásolja az aktuálisan beállított pH-t.

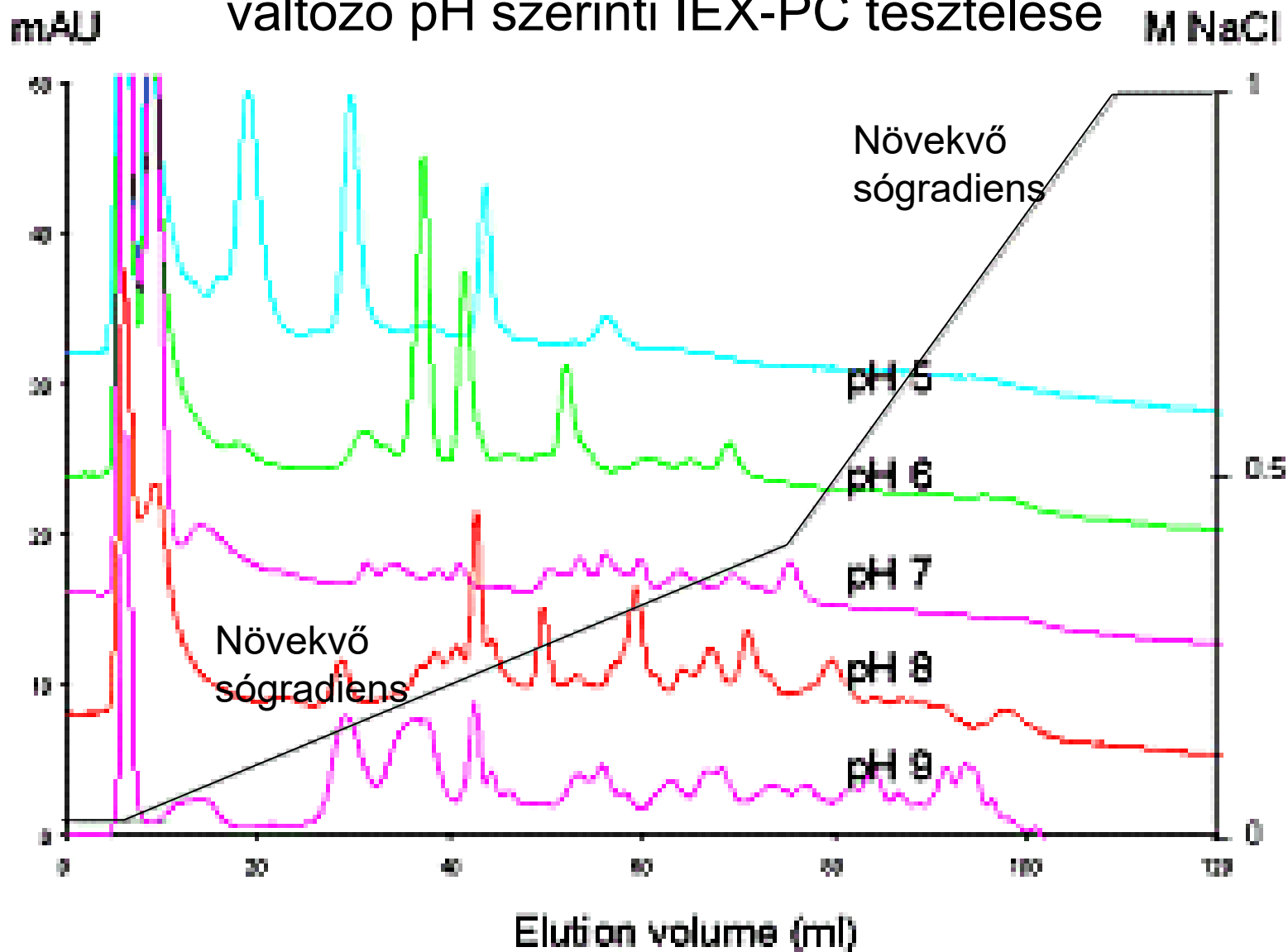
Minél nagyobb a fehérje/peptid eredő töltése, annál erősebben fog abszorbeálódni, és annál magasabb sókoncentráció szükséges a minta deszorbeáltatására.

Az IEX-PC nagyfelbontású módszerénél leggyakrabban **növekvő sókoncentrációjú gradiens-elúciót** alkalmaznak.

**Az elúciós sorrend ilyenkor:**



# Nyers pancreatin minták (2 mg) változó pH szerinti IEX-PC tesztelése



(készülék: ÄKTAexplorer 100.  
oszlop: RESOURCE Q; 6 ml)

## Egy céges „oszloptöltet” ismertető:

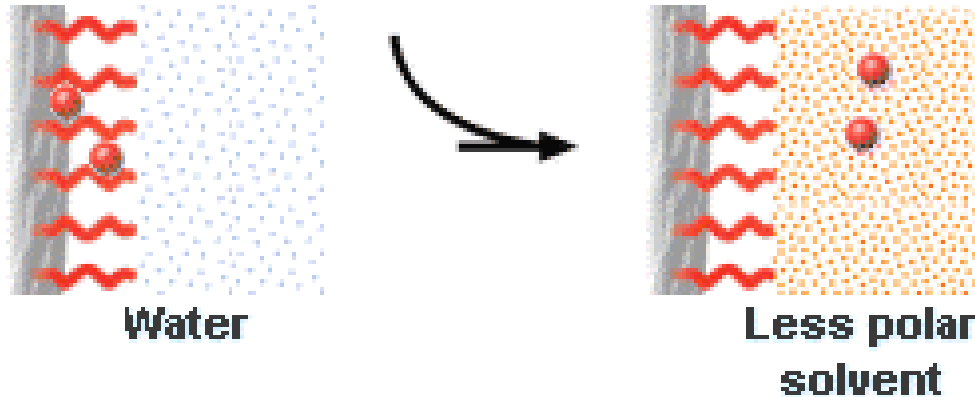
... packing materials are based **on rigid, hydrophilic, polymethacrylate particles with large 1000 Å pores.** The naturally hydrophilic polymer reduces non-specific adsorption, resulting in quantitative recovery of protein mass and bioactivity. These packings are compatible with buffers in the pH range 2-12, and will withstand exposure to caustic solutions.

... ion exchangers are available with a:  
strong anion exchanger or  
weak anion exchanger or  
strong cation exchanger or  
weak cation exchanger  
functional group



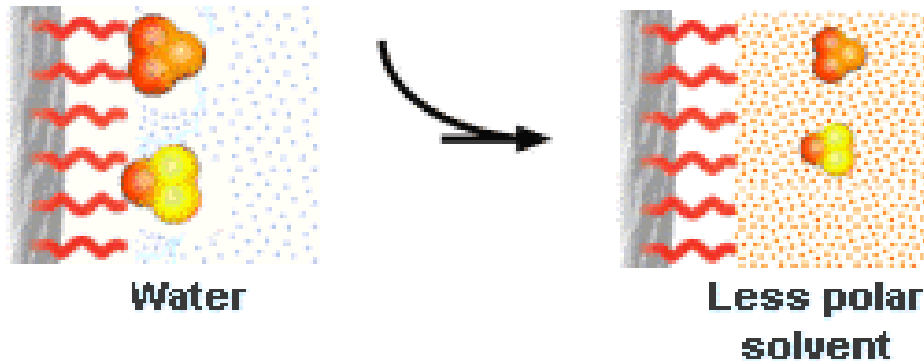
# RP-HPLC (fordított fázisú-HPLC) **gradiens elúcióval** (csökkenő polaritással, oldószererősség-változtatással)

Decrease polar  
properties of eluent

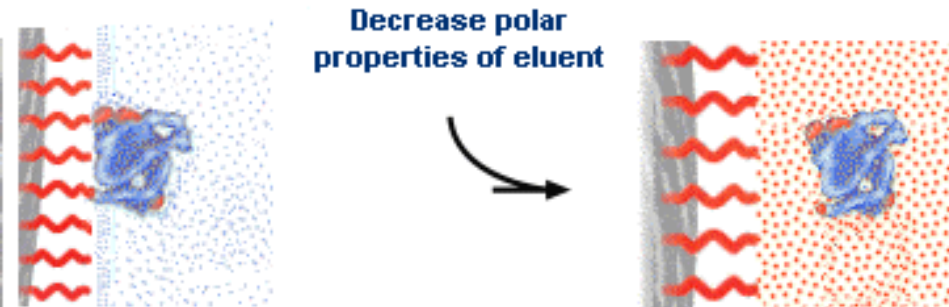


A szerves molekulák általában bekötődnek pl. a C<sub>18</sub>-módosított szilikagél állófázis szénláncai közé.

Decrease polar  
properties of eluent



Ezzel ellentétben a peptidek és fehérjék többpontos kötődéssel is adszorbeálódhatnak az állófázison



A mozgó fázis polaritásának csökkentése csökkentheti a hidrofób kölcsönhatások erősségét/ azok kialakulásának lehetőségét is.

A fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete nagyobb mértékben függ a külső hidrofób kölcsönhatásokon, mint a szerkezetet stabilizáló erőkön. A fordított fázisú gradiens elúciós elegyeket így a hidrofób kölcsönhatások gyengítésére tervezik, tehát a potenciális denaturálószerrek közül kerülnek ki.

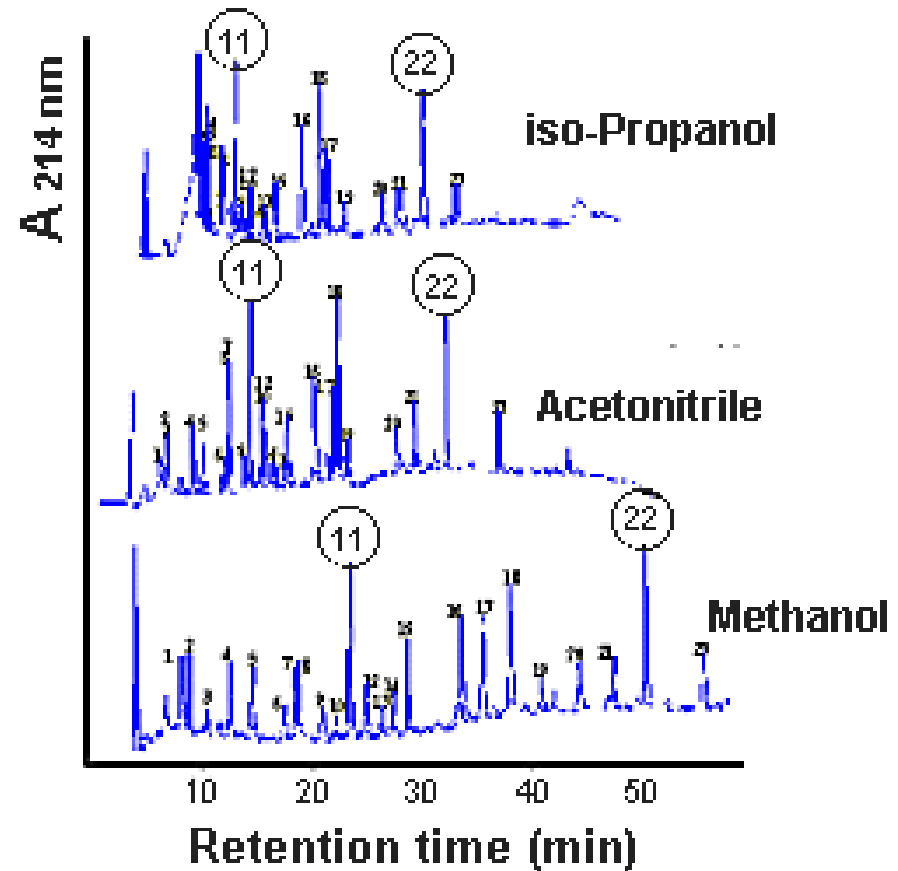


**Ezért a fehérjék RP-kromatográfiája egy precíz egyensúlyozást kíván a deszorpció és a denaturálás között, ami külön odafigyelést igényel az egyensúly beállításához, nehogy a fehérjék irreverzibilisen megváltozzanak.** ((Oligo)Peptideknél, amelyekben általában nincsenek hidrofób kölcsönhatások, ez nem igen léphet fel.)

# RP-HPLC gyakorlati vonatkozásai a peptidek és fehérjék esetén

Peptidek és fehérjék esetén **gradiens elúció** alkalmazása a megszokott (a nemvízes komponenst növekvő arányban adagolva).

Amint az ábrán is látható, az ott szereplő eluensek inkább csak az **eluenserősségükben** különböznek, mintsem hogy befolyásolnák az oszlop szelektivitását (kb. azonos elúciós sorrend marad).



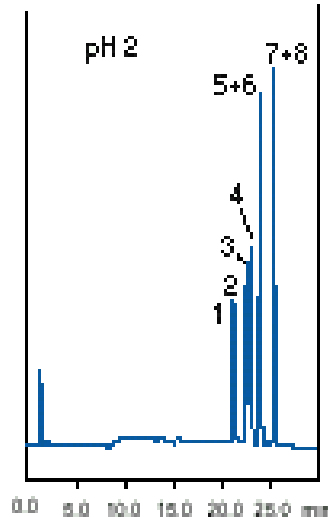
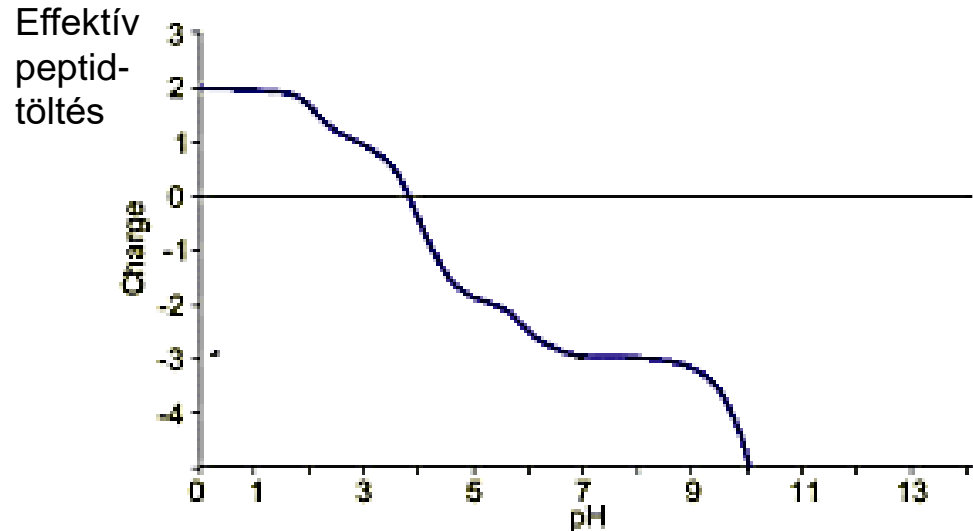
Ref. Aguilar, M-I. and Hearn, M. Meth. Enzymol. vol.270;3-26; 1995

Az **acetonitril** alkalmazása előnyös a nagyon jó UV-eresztőképessége következtében, ill. hogy alig növeli meg az eluens viszkozitását és így a szükséges oszlopnymórást. Így a peptidek és fehérjék elválasztása terén messze a leggyakrabban alkalmazott szerves eluens-módosító komponens, így izopropanolra csak akkor kerül sor, amikor azt a minta stabilitása megköveteli.

# A pH szerepe

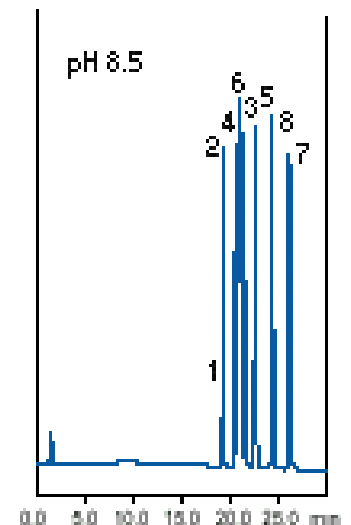
A fehérjék és peptidok eredő töltése természetesen megváltozik az oldat pH-jával, ami persze erősen befolyásolja a hidrofóbicitás jellegét és ezzel a a kromatográfiás viselkedést a RP-HPLC alkalmazásakor.

Mivel a peptidok hidrofóbicitását erősen befolyásolja a pH, ezért amikor különböző pH értékeken történik az elválasztás, a peptidok eluciósi ideje számottevően megváltozhat. Pl. a pH értékének a megváltoztatásakor 2-ről 8.5-re ténylegesen átrendeződik az angiotenzin-származékok eluciósi sorrendje, amint az alsó ábra is mutatja.

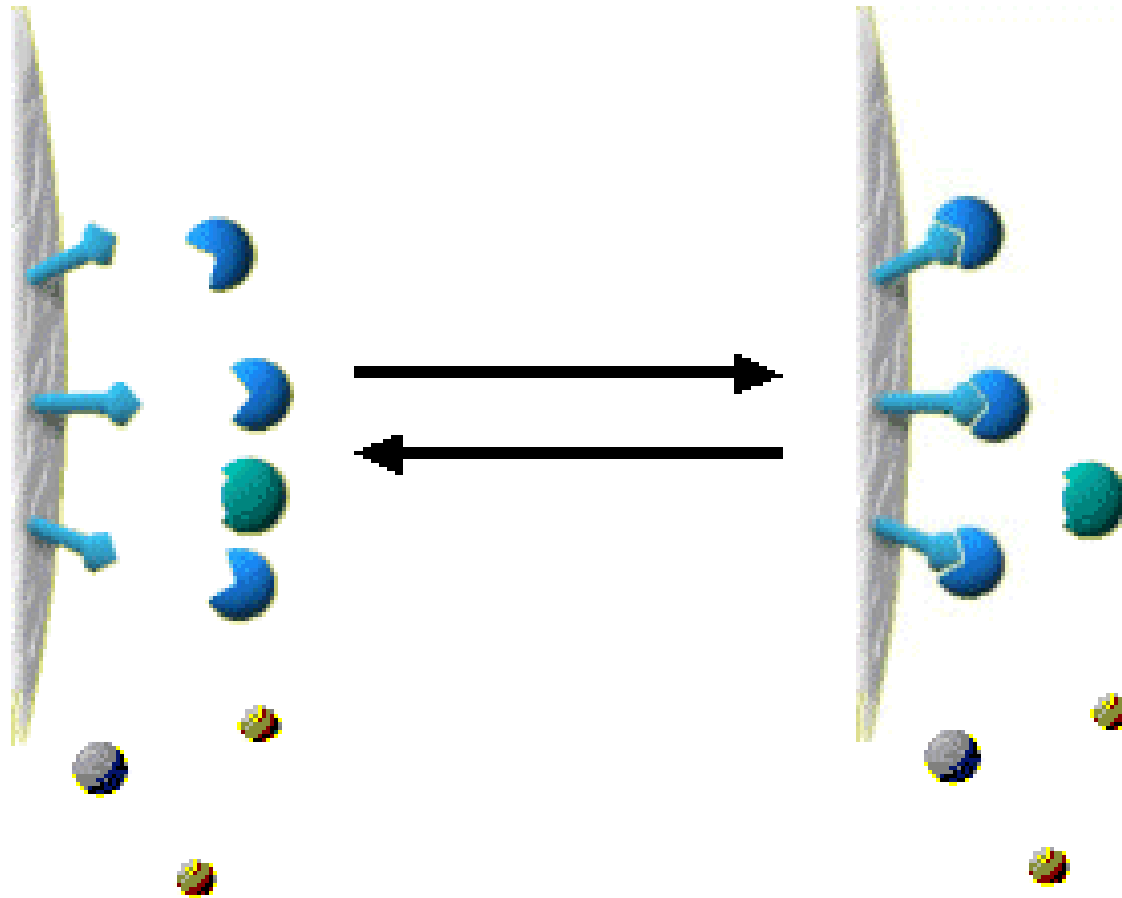


## Sephasil C18 peptide

- Sample:
1. Val4-Ile7-AT III
  2. Ile7-AT III
  3. Val4-AT III
  4. Sar1-Leu8-AT II
  5. AT III
  6. AT II
  7. des-Asp1-AT I
  8. AT I



## Affinitás kromatográfia



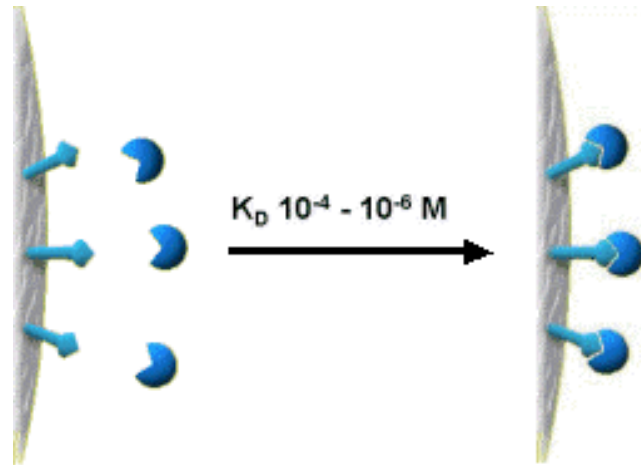
Az affinitás kromatográfia erősen specifikus, de ennek ellenére reverzibilis kötődést mutató kölcsönhatásokon alapszik. Specifikus elválasztásra, preparatív célra, tisztításra alkalmazható módszer.

## Csoportspecifikus ligandumokkal működő affinkromatográfiának széles alkalmazási köre és tere van, mivel ma már ilyen célra számos kereskedelmileg is elérhető kötőanyag áll rendelkezésre.

Az alábbi táblázat számos példát sorol fel a leggyakrabban használt ilyen típusú hordozóhoz immobilizált ligandumokról.

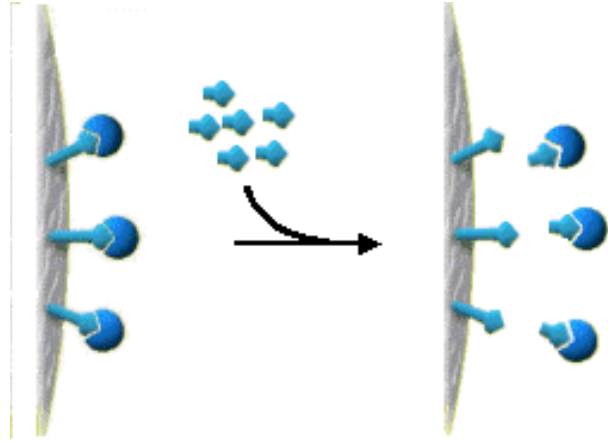
Group-specific ligand	Specificity
Protein A	Fc region of IgG
Protein G	Fc region of IgG
Concanavalin A	Glucopyranosyl and Mannopyranosyl groups
Cibacron Blue	Broad range of enzymes, serum albumin
Procion Red	NADP+ dependent enzymes
Lysine	Plasminogen, ribosomal RNA
Arginine	Serine proteases
Benzamidine	Serine proteases
Calmodulin	Proteins regulated by calmodulin
Heparin	Coagulation factors, lipoproteins, lipases, hormones, steroid receptors, protein synthesis factors, Nucleic acid-binding enzymes
Transition metal ions	Proteins and peptides which contain accessible Histidine

A jó kötődésnél a komplexstabilitási állandó értékei tipikusan  $10^4 - 10^6$  M tartományba esnek.

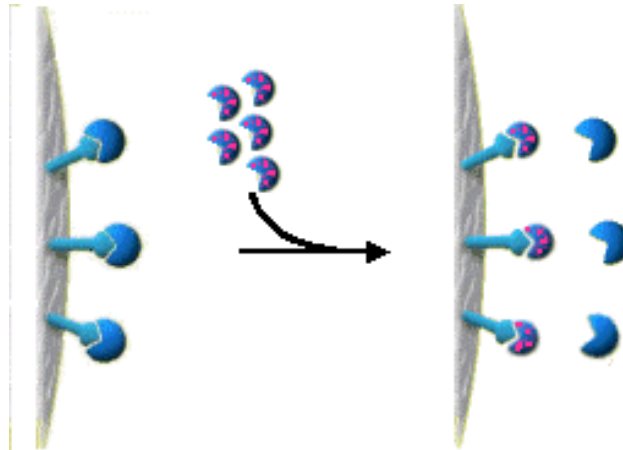


Az eluáló/kiszorítószere vonatkozóan a komplexstabilitási állandó értékek ennél vagy kissé nagyobb vagy csak kicsit kisebb tartományba kell, hogy legalább essenek, utóbbi esetben viszont nagy koncentrációban kell alkalmazni őket a lemosáshoz)

## Elúciós lehetőségek



Elúció a célvegyület elvonásával: Szabad ligandumot adagolnak, hogy elvonja a mátrixhoz kötött célvegyületet a mátrixtól.

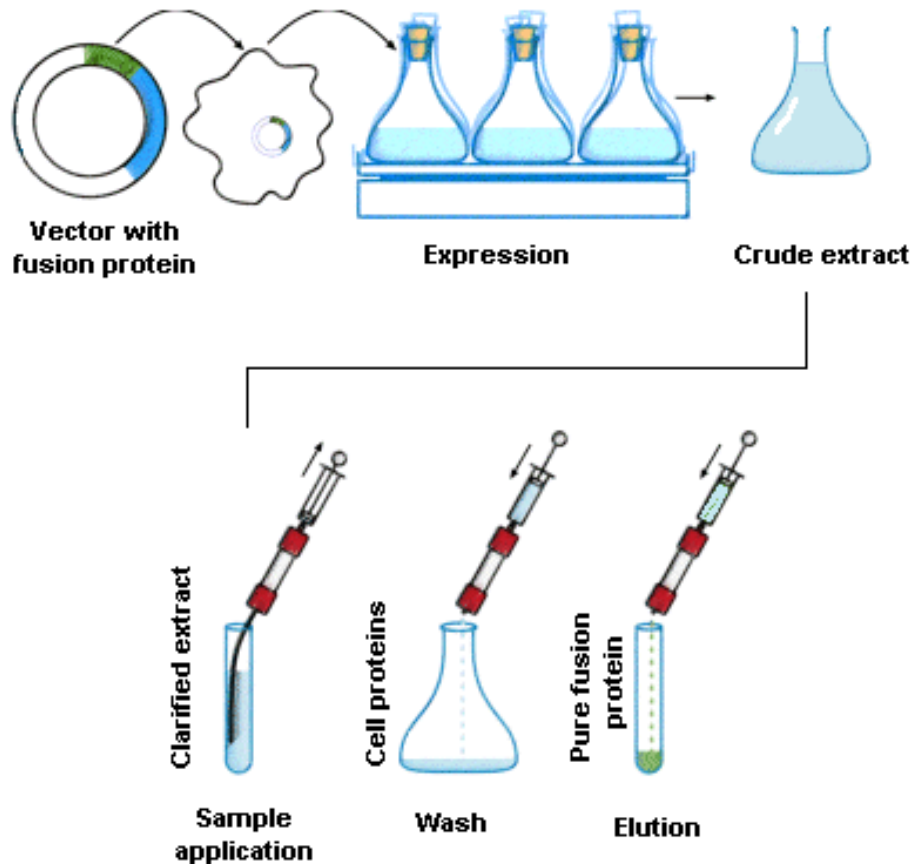


Elúció a célvegyület kiszorításával: szabad célvegyület-analógot adagolnak, amely erősebben kötődik a mátrixhoz.



# Rekombináns proteinek affin-kromatográfiája

A rekombináns fehérjéket számottevően egyszerűsített módon tisztíthatják, ha az affinrész génjét egyesítik a rekombináns fehérje génjével. A gazdavektor (plazmid) kifejleszti a rekombináns proteint a hozzácsatolt affinrészsel együtt és affin-kromatográfiás technikát lehet alkalmazni az ún. *fúziós fehérje* izolálásához és tisztításához. Bár nem mindig szükséges, az affinrészt speciális hasító enzimekkel el lehet távolítani a tisztítás után.



Egy céges „oszloptöltet” ismertető:

... affinity epoxy-activated packing consists of 40  $\mu\text{m}$ , 500Å pore size particles that have a hydrophilic bonding layer with a glycidoxypropyl functionality, resulting in a seven atom spacer arm.

The epoxy-activated surface can immobilize a wide range of ligands via a covalent linkage with amino, hydroxyl or sulfhydryl groups using simple coupling procedures.

## Mit hoznak a konyhára az egyes LC módszerek?

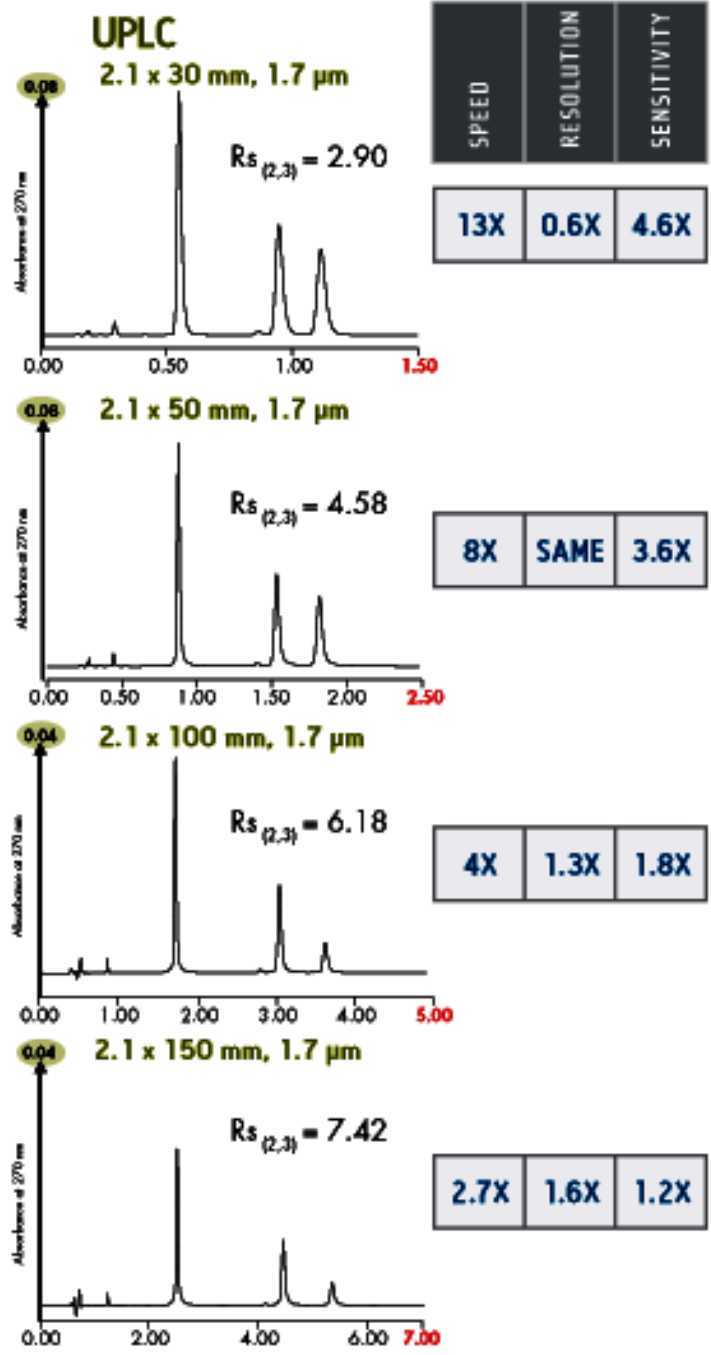
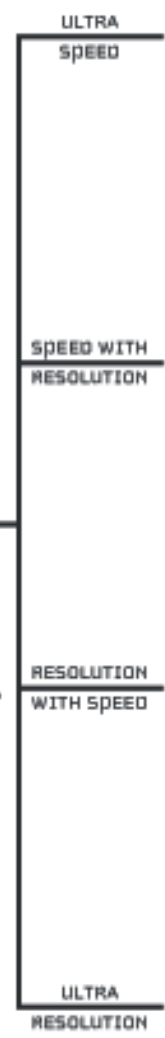
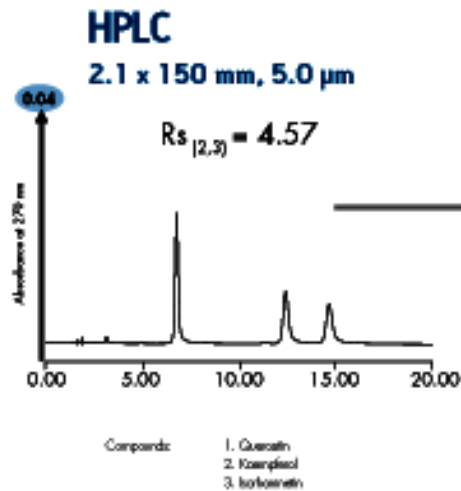
- Méretkizárásos kromatográfia (SEC):  
aggregátumok, fragmensek és kismolekulák elválasztása a natív fehérjétől
- Ioncserés kromatográfia (IEC):  
anion és kation töltésvariánsok elválasztása
- Fordított fázisú kromatográfia (RP):  
oxidált/redukált variánsok, valamint fragmensek elválasztása
- Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HILIC):  
RP-re nagyjából ortogonális, főleg peptidek esetén használható
- Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)  
alternatív RP, főleg tisztításra használják

Gyógyszeripari környezetben a megfelelő jellemzéshez különböző módszerek együttes alkalmazása szükséges.

A feladat komplexitása miatt nem elvárás az exakt jellemzés, de az elérhető legrészletesebb, koherens információval kell rendelkezni.

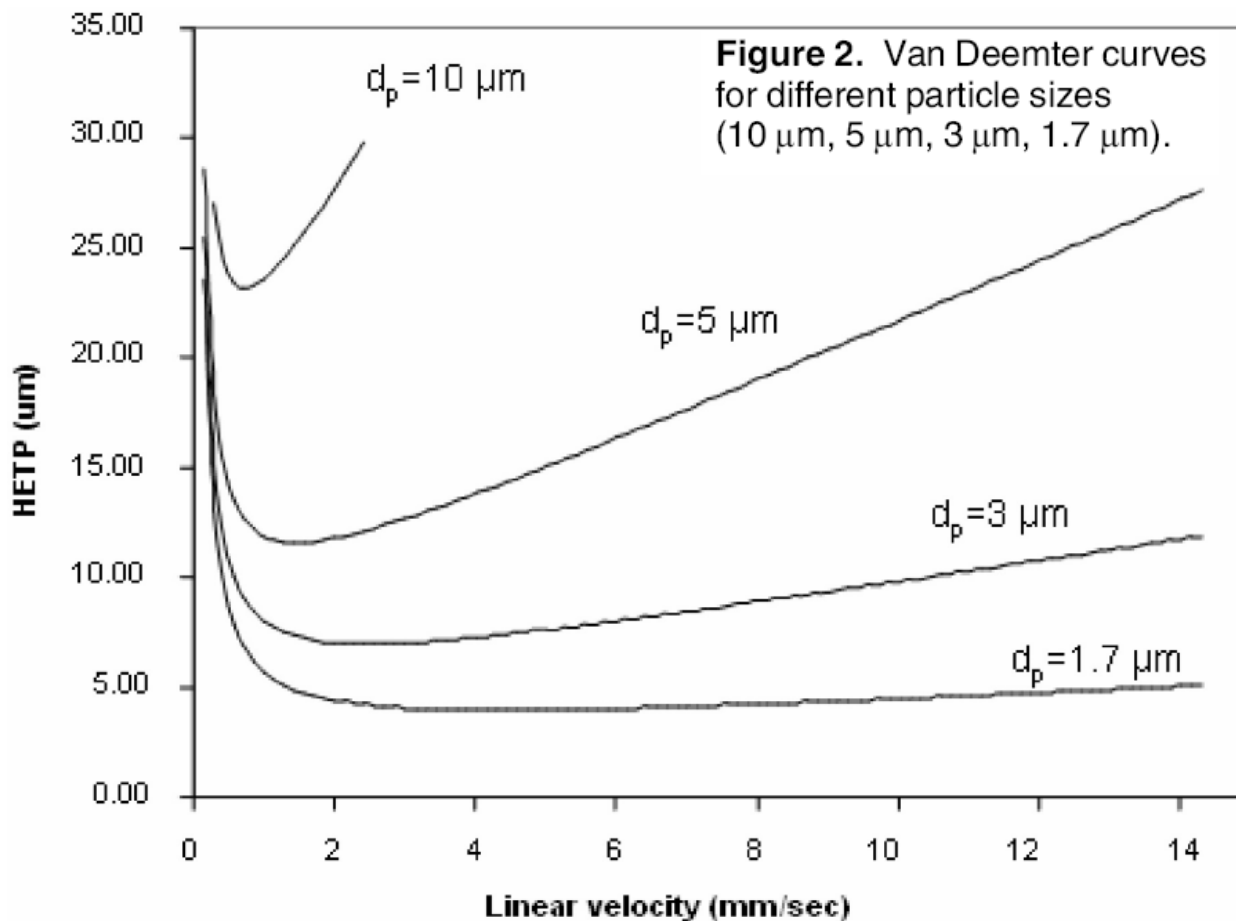
# HPLC -- UPLC összevetés

Elúciós idő/felbontás kompromisszumok



# HPLC vs UPLC: van Deemter diagram

- Az összehasonlítás alapja a klasszikus Van Deemter diagram.
- Apróbb töltetreszecskek: kisebb relatív zónaszélesedés (HETP) még viszonylag nagyobb lineáris áramlási sebességeknél is → lehetőség a rövidebb elemzési időkre (magnövelt lineáris áramlási sebességnél mérve)



Linear Velocity [ $u = 2$  mm/sec]

Flow Rate [mL/min]:

ID = 1.0 mm      0.07

ID = 2.1 mm      0.3

ID = 4.6 mm      1.4

# Kapilláris elektroforetikus módszerek

**Kapilláris:**  $d = 50-100\mu\text{m}$ , általában kvarcüveg, néha teflon (PTFE)

**Nagyfeszültség:**  $\approx 10-30\text{ kV}$ , ionokat, ionizálódó, v. ionizált része(cské)ket biztosan mozgatja  $\rightarrow$  elektroforézis (eltérő ionmozgékonyosság, eltérő **állandó** vándorlási sebesség)  
 $\rightarrow$  komponensek szétválása, szétválasztása

A **kapillárisban** kondenzált fázis(ok): pufferoldat(ok), micellás oldat, gél, kromatográfiás töltet lehet  $\rightarrow$  egyedi módszerek:

CZE – kap. zónaelektroforézis

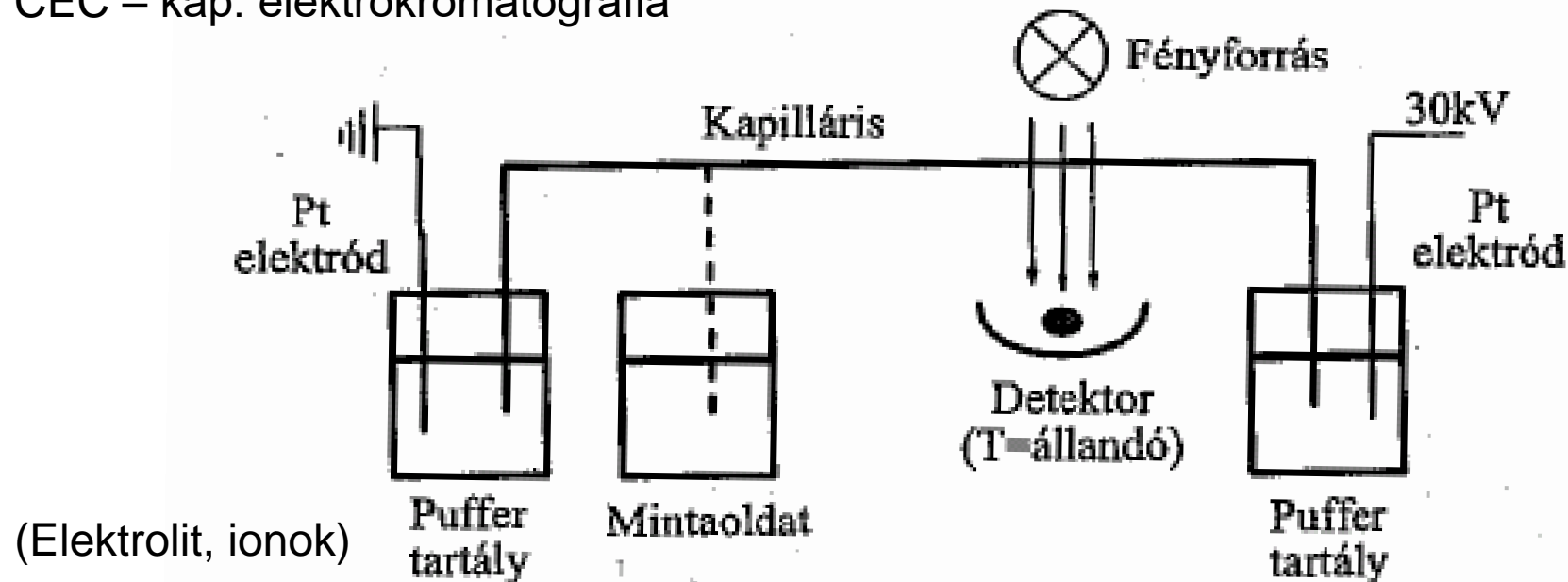
CITP – kap. izotachoforézis

MECC – micelláris elektrokinetikus krom. (SDS);

CGE – kap. gélelektroforézis

CIEF – kap. izoelektromos fókuszálás (PAAGE) (+SDS)

CEC – kap. elektrokratográfia

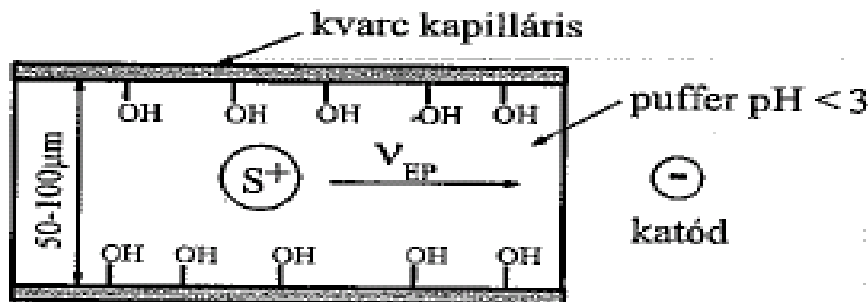


18.8. ábra A kapilláris elektroforézis készülék elemei

# Elektroforetikus ionvándorlás és az elektrooszmózis (elektrooszmotikus) áramlás (EOF, kvarcüvegkapillárisban)

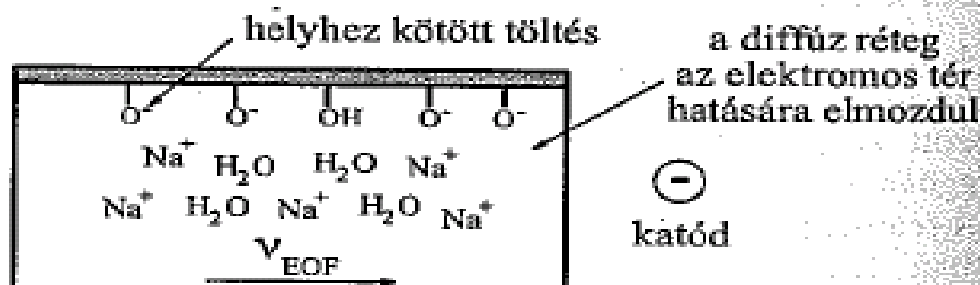
A.: pH < 3, nincs EOF

$v_{EF}$  elektroforetikus vándorlási sebesség: kationok a katód felé, anionok az anód felé.



B.: EOF létrejötte

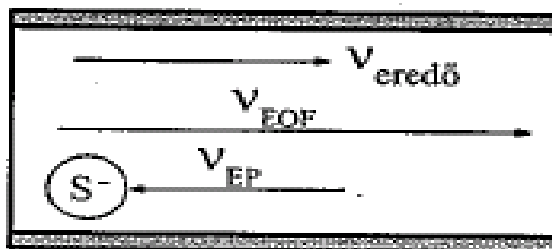
pH > 3 közegben: elektrooszmotikus ( $v_{EOF}$ ) áramlás is a katódfelé (hidratált kationok + oldószer (víz) együtt)!



C.: negatív töltéssel rendelkező anyag átlagos vándorlási sebességének bemutatása

Eredő hatás (sebességre):

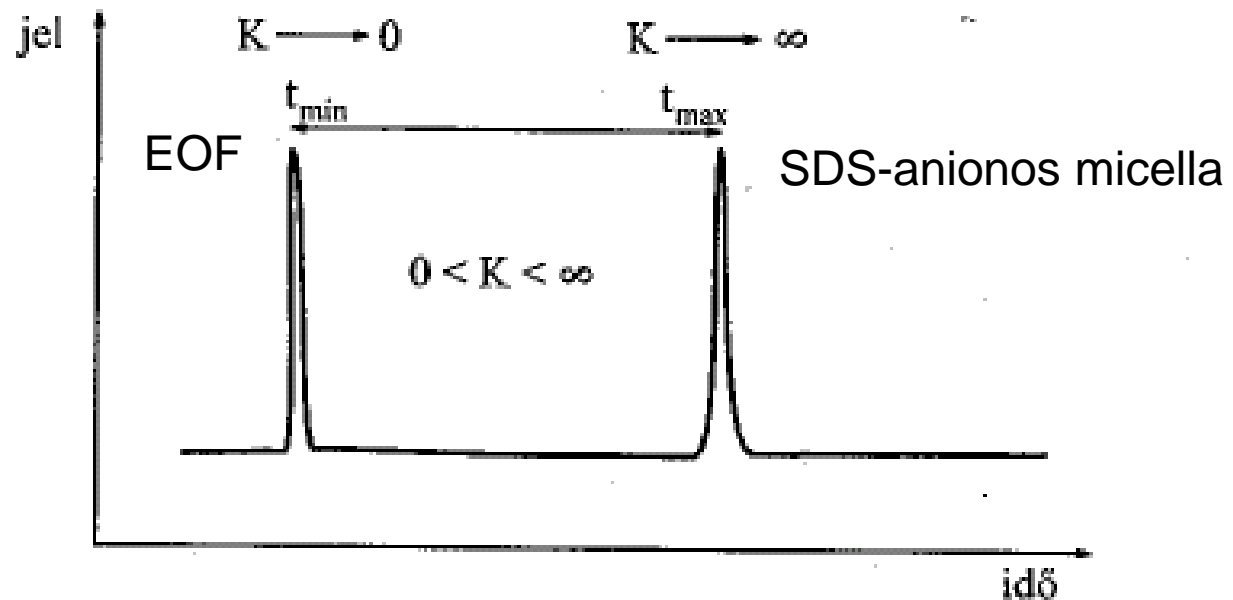
Ad absurdum, még az anionok is a katód felé vándorolhatnak!



**18.1. ábra Töltéssel rendelkező komponens vándorlása elektromos erőterben kis átmérőjű (50-100 μm) kvarc üvegcsőben**

# EOF elektrooszmózisos áramlás hatása

- **Semleges** részecskék is vándorolnak vele! ( $v = \text{közös} = v_{\text{EOF}}$ )
- Nátrium-dodecilszulf(on)át (SDS) micellákat is adagolva, melyhez a semleges hidrofób anyagok molekulái eltérő mértékben társulhatnak, visszatartódhatnak, esetleges szétválások léphetnek fel:

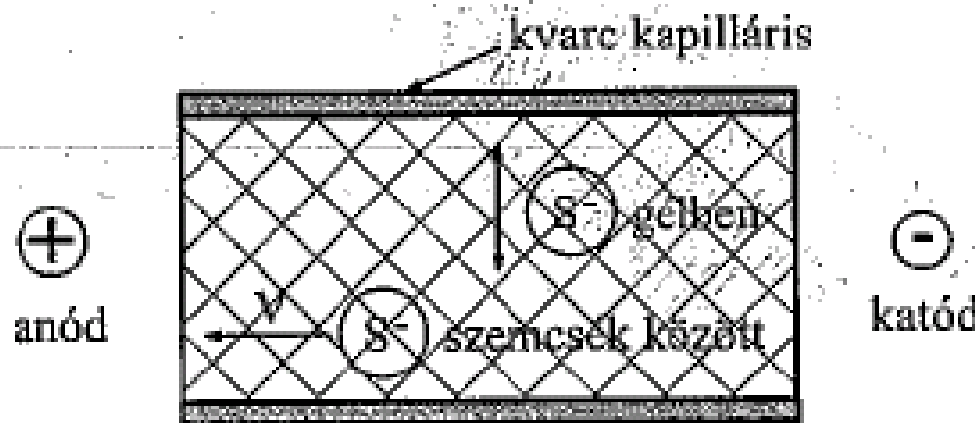


**18.4. ábra** A vándorlási időablak, ahol  $t_{\min}$  az SDS micellákkal kölcsönhatásba nem lépő, míg  $t_{\max}$  az SDS által teljes mértékben oldott molekula vándorlási ideje



## EOF elektrooszmózisos áramlás kiküszöbölése

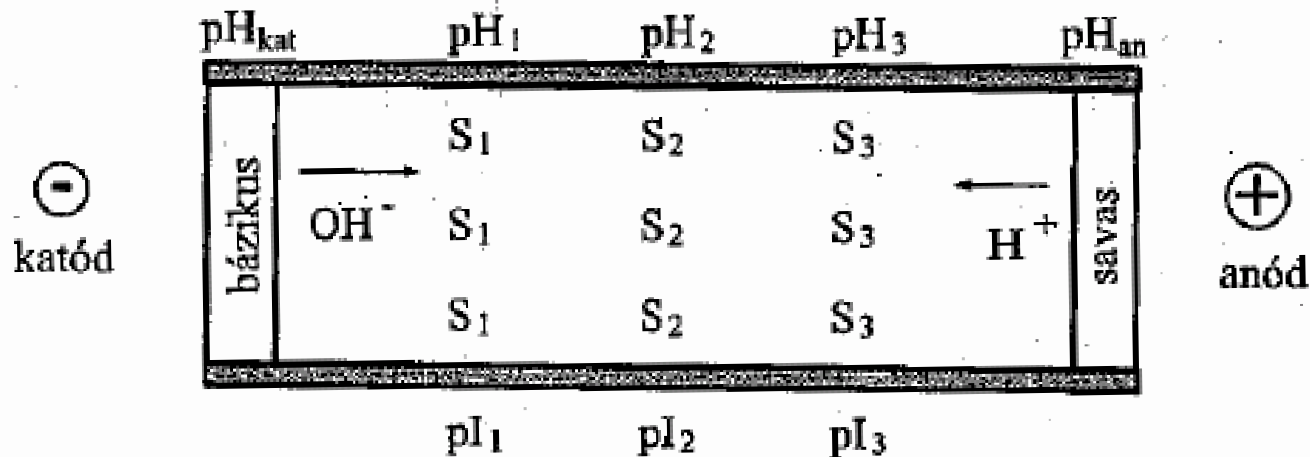
- Poliakrilamid-gél (puffer helyetti) használatával ( $\rightarrow$  CGE) kűszöböljük ki, csak az egyedi ionmozgékonyság fog számítani (pl. nagymolekulájú anyagok pl. fehérjék esetén megnő az elválasztás szelektivitása)



18.2. ábra A kapilláris gélelektroforézis (CGE) elve. Az  $S^-$  molekula vagy a gél pórusaiban van ( $v = 0$ ) vagy a gél szemcsék között, ekkor elektromos erőter hatására vándorol ( $v > 0$ )

# Izoelektromos fókuszálás (CIEF, pl. fehérjékre)

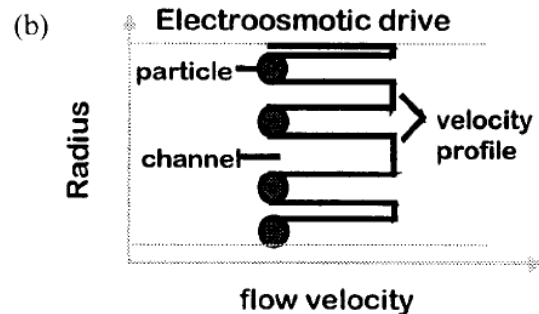
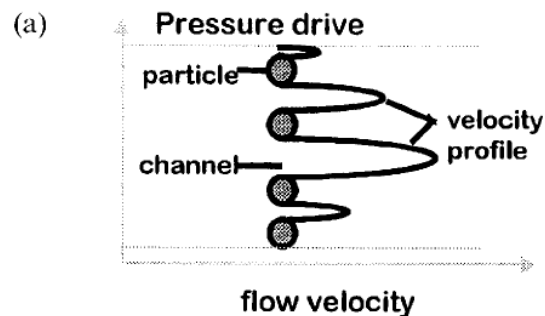
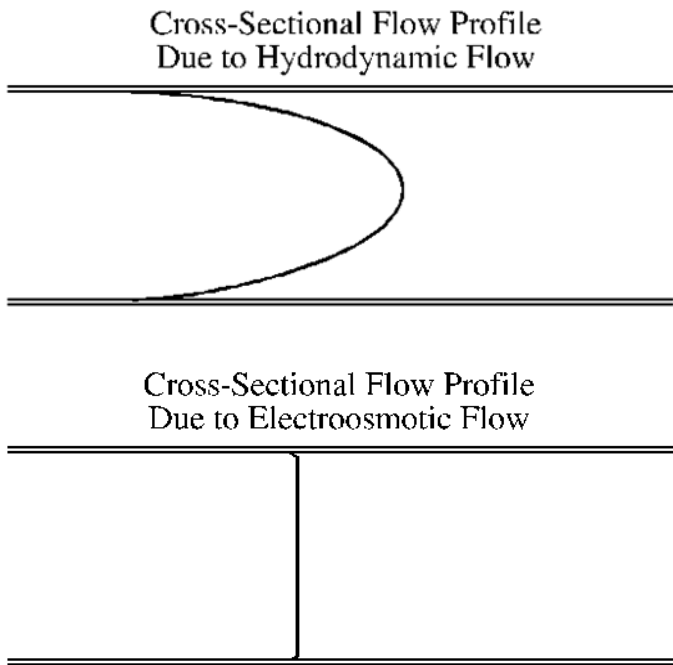
- Ikerionos fehérje/peptid/aminosav szerkezetek esetén: az izoelektromos ponton ( $pI$ -n) = izoelektromos  $pH$ -n, (kívülről semleges!)  $\rightarrow$  megáll az ikerion vándorlása



18.5. ábra A kapilláris izoelektromos fókuszálás elve. A kettősionos (zwitter-ionos) jellegű komponensek a kapillárisban addig a pontig mozognak, ahol a  $pH = pI$  értékükkel

# Kapilláris Elektrokromatográfia (Capillary ElectroChromatography, CEC)

- Nyomáskülönbség helyett az **elektroosmotikus áramoltatást** (EOF, Electroosmotic Flow) alkalmazva, azaz „elektro-pumpálva” a mozgó fázist **töltött mikro-oszlopban**
  - analizálhatók töltött és semleges komponensek a HPLC-hez hasonlóan;
  - az állófázisokat a HPLC, ill. UPLC innovációk szerint lehet választani.
- Az elektroosmotikus áramoltatás tökéletesebb áramlási profilt biztosít:
  - a szögletes áramlási profil kisebb zónaszéledést, nagyobb oszlophatékonyságot, jobb felbontást biztosít.



# Analitikai módszerek, technikák

**A módszerek kiegészítik egymást, együtt kell alkalmazni őket, hogy a fehérje minél több tulajdonságát megismerjük!**

**Példa: egy „minimum kör” fehérje analízis**

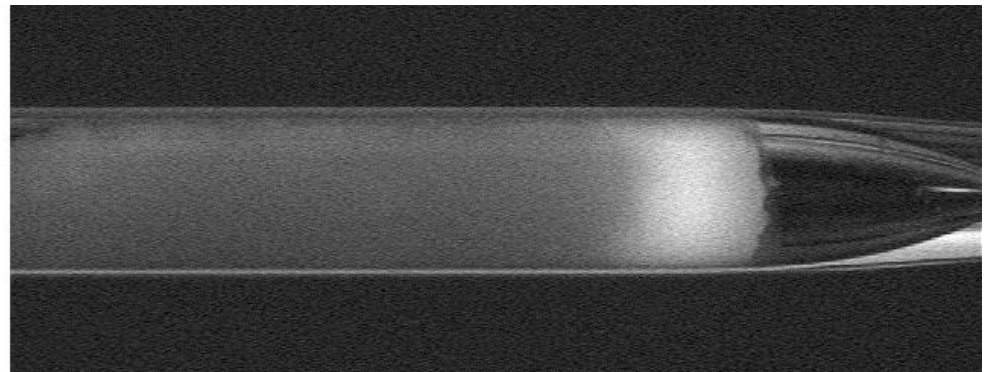
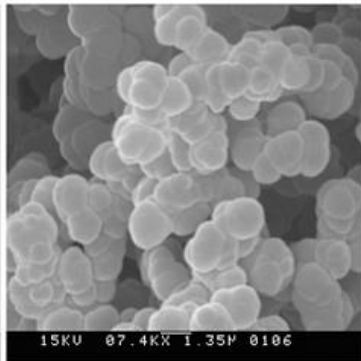
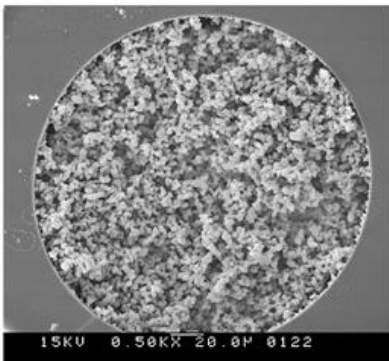
- 1) SDS-PAGE redukáló és nem redukáló:** tömeg, aggregátumok, diszulfid hidak megléte (mass heterogeneity)
- 2) RP-HPLC, natív fehérje:** fehérje eredetű bomlástermékek? Oxidáció, aggregáció, dimerek (related proteins)
- 3) RP-HPLC, emésztett fehérje:** fehérje elsődleges szerkezete (peptide mapping)
- 4) RP-HPLC, savasan hidrolizált fehérje:** aminosav összetétel (amino acid analysis)
- 5) IEX-LC:** deamidáció, töltés heterogenitás (charge heterogeneity)
- 6) SEC:** nagy méretű aggregátumok vizsgálata

# Újdonságok, modern irányzatok a kromatográfiában

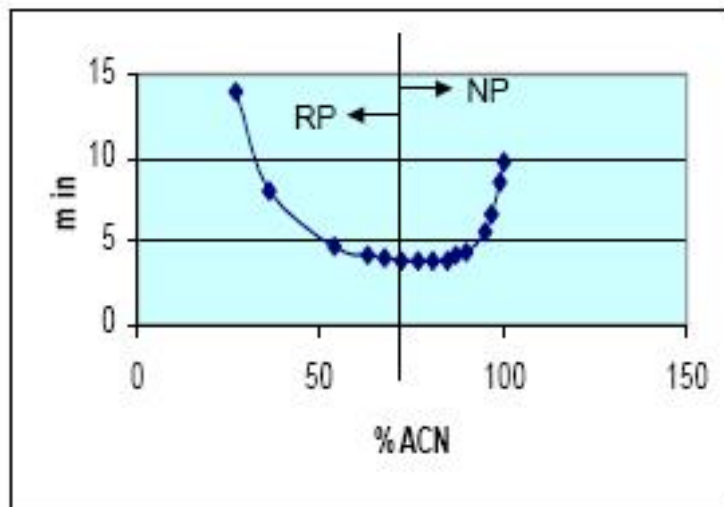
- Szemelvények fognak következni

## Pórusos monolitikus mikrooszlop-töltetek

- Monolit kolonnák: egybefüggő pórusos elválasztó közeg
  - könnyebb előállíthatóság
  - nincs szükség záró végtömítésekre
  - változatos felületi módosíthatóság
  - nincs részecskéközi tér/üreg (nincs visszakeveredés)
  - konvektív áramlás a mozgó fázisban (megnövekedő anyagátadás!)
  - nagyobb áteresztő képesség (kisebb áramlási nyomásveszteség)
  - jó kolonnahatékonyság (nagy fajlagos felület)
  - a rögzített ágyas álló fázis sokkal stabilabb lehet

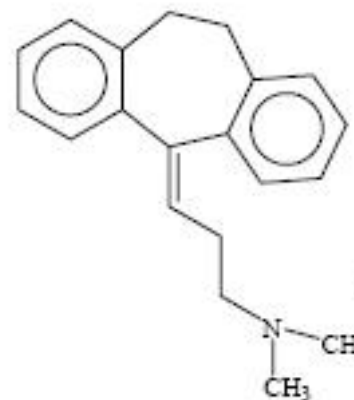


# U-Shaped Retention



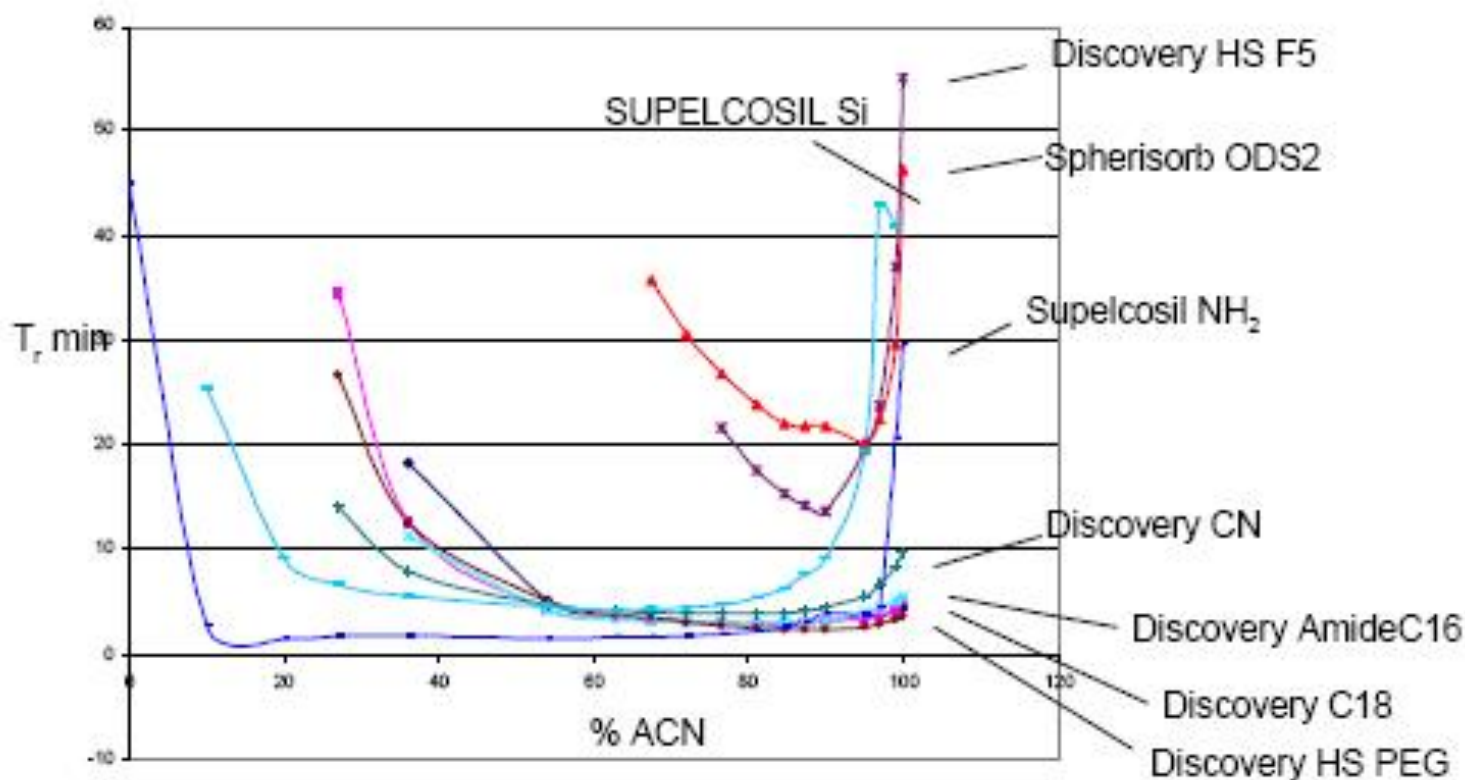
- Retention increases at high organic and high aqueous MP
- Strong solvent: Mixture of Aqueous:Organic

Discovery Cyano  
Flow = 1mL/min  
MP: A = ACN w/ 5mM Ammonium acetate  
B = Water w/ 5mM Ammonium acetate (pH 6.8)



Amitriptyline

# Other Phases Exhibiting HILIC Character




Amitriptyline; flow = 1mL/min; M.P. = 5mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 6.8; 35°C; 230nm



# Advantages of Using Phases Exhibiting U-Shaped Retention

- Provide unique selectivity vs. C18 phases
- Presents twice the opportunity for retention/resolution (high and low % organic)
- Can use simple water:organic MP's
- Often faster analysis
- Retain aqueous-soluble analytes
- Retain organic-soluble analytes
- Increase LC/MS sensitivity at high organic MP's
- Reduce sample pre-treatment requirements
- Do not collapse

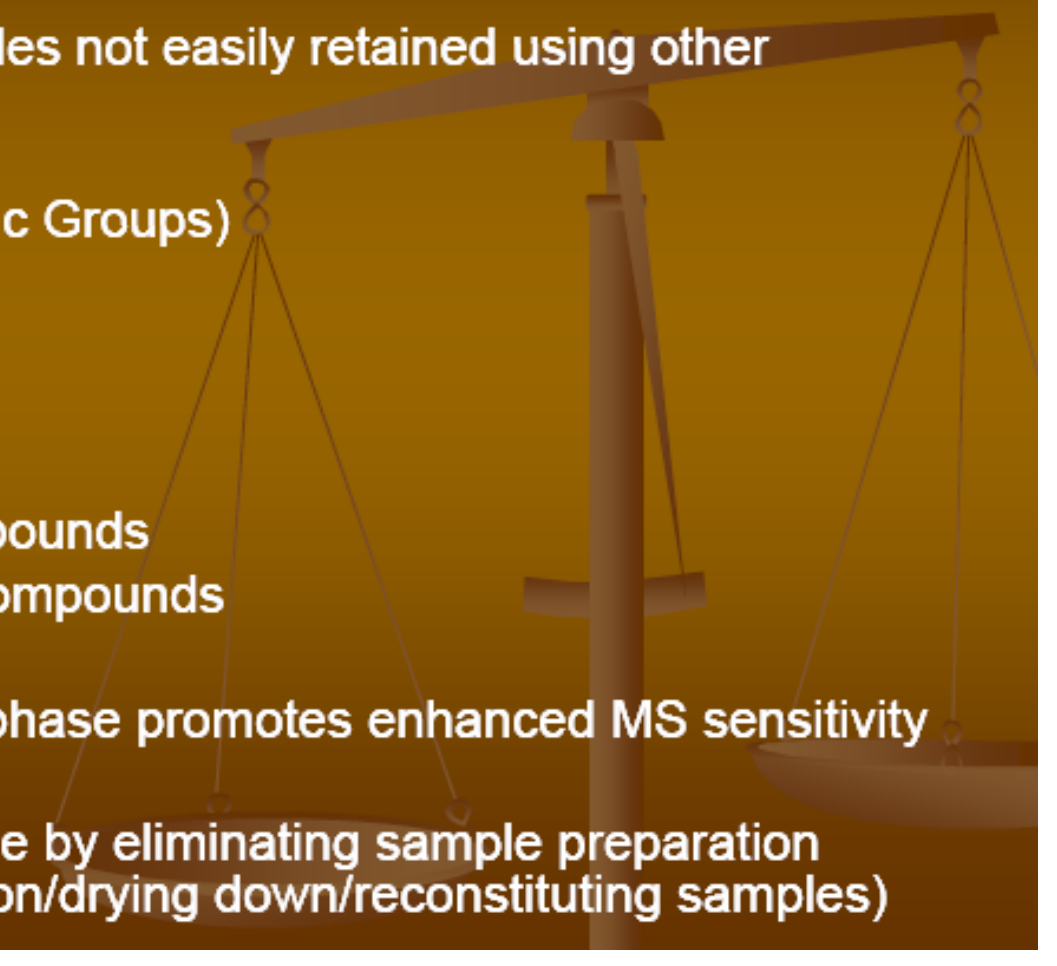


## Summary

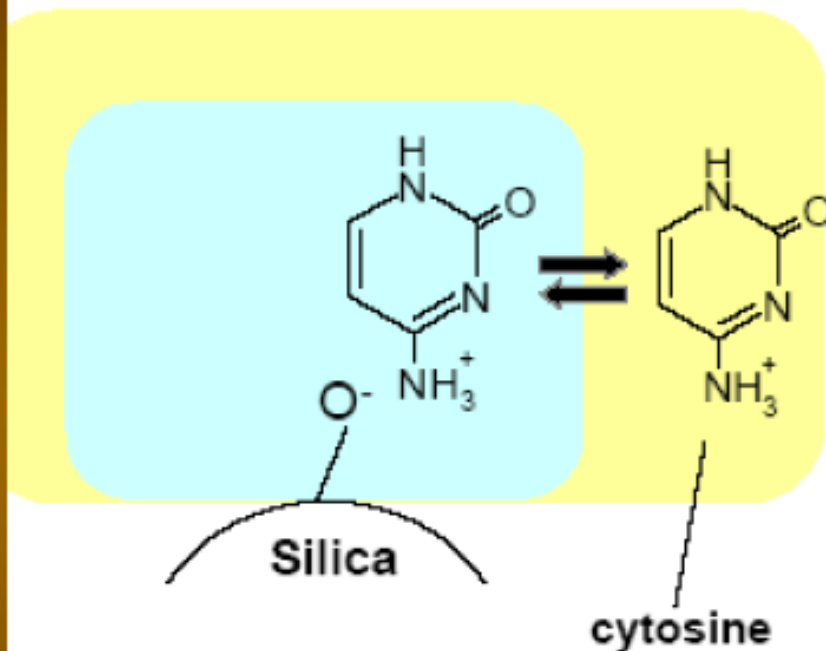
---

- HPLC phases can contain both RP and NP modes of retention
- For basic analytes on C18 phases, the mechanism in the HILIC region is not readily explained by siloxide anion electrostatic interactions as the major contributing factor
- Level of base deactivation of C18 phases can be approximated by their amount of HILIC character
- Several advantages exist for developing methods on phases that give U-shaped retention curves
- A wide variety of phases exist that do show U-shaped curves, including fluorinated, C18, silica, NH<sub>2</sub>, and CN

# Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

- **Complimentary selectivity to RP-HPLC**
  - Able to retain molecules not easily retained using other phases
    - Nucleotides
    - Amino Acids (Basic Groups)
    - Amines
    - Peptides
    - Phenols
    - Carbohydrates
    - Glycosylated compounds
    - Phosphorylated compounds
  - High organic mobile phase promotes enhanced MS sensitivity
  - Reduced analysis time by eliminating sample preparation steps (i.e., fractionation/drying down/reconstituting samples)
- 

# How does HILIC work?



80% acetonitrile

20% aqueous,  
e.g., pH 5

## HILIC Mechanisms on Silica

- Polar analyte **partitions** into and out of adsorbed water layer
- Charged polar analyte can undergo **cation exchange** with charged silanol groups
- **Combination** of these mechanisms results in **enhanced** polar retention
- **Lack** of **either** of these mechanisms results in **no** polar retention

<http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs/HILIC>

## **Vizes normál fázisú kromatográfia (Aqueous Normal Phase, ANP chromatography)**

A vizes normál fázisú kromatográfiában a poláris hidrofil analit(ikum) megoszlik a viszonylag poláris álló fázis és a viszonylag nem-poláris mozgófázis között. Az ANP-t gyakran HILIC-nek is nevezik, mely egyúttal csupán egy lehetséges mechanizmus, amely csak egyike azoknak a mechanizmusoknak, amelyek APN feltételek között lejátszódhatnak.

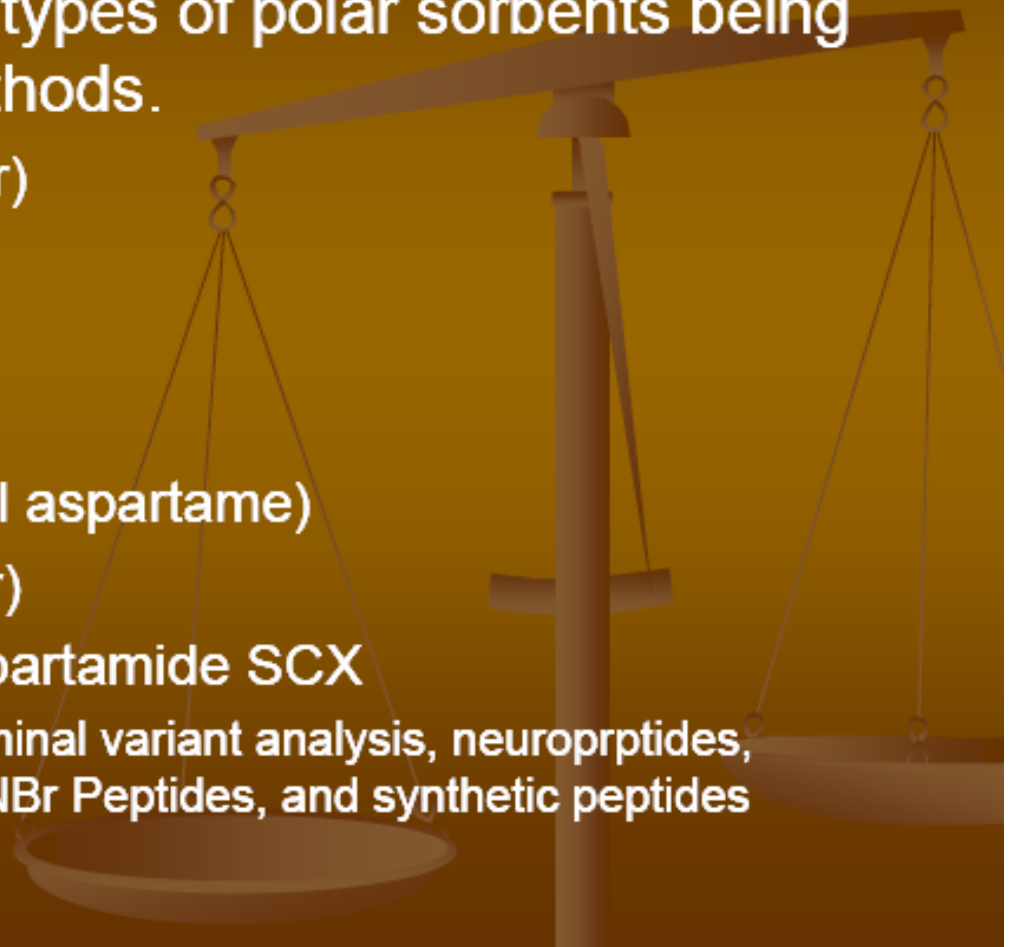
Ezt a HILIC-mechamizmus úgy írja le mint a poláris álló fázis kitűntetett hidratálódását a mozgó fázisból származó vizes komponensekkel és a mozgó fázis szükségszerű elszegényedését vízben. Így egy kétfázisú rendszer épül fel, ahol egy kvázi-immobilizált vizes réteg található a felület közelében és egy szerves anyagban gazdag mobil fázisréteg.

A poláris komponensek megoszlást mutathatnak a szervesanyagban gazdag mozgó fázis és a felületközeli álló vizes oldószer között.

# HILIC Stationary Phase Selection

There are several types of polar sorbents being used in HILIC methods.

- Cyano (most polar)
- Polymeric HILIC
- Silica
- Amide
- Poly (hydroxyethyl aspartame)
- Amino (least polar)
- Polysulfoethyl Aspartamide SCX
  - proteomics, n-terminal variant analysis, neuroprptides, growth factors, CNBr Peptides, and synthetic peptides



# Separation Methods for HILIC LC-MS

- Proteins and Peptides

- 10mM TEA, pH 2.8, 80-85% acetonitrile

- Sugars and Oligisaccharides

- No salt necessary, 80-85% acetonitrile

- Oligonucleotides

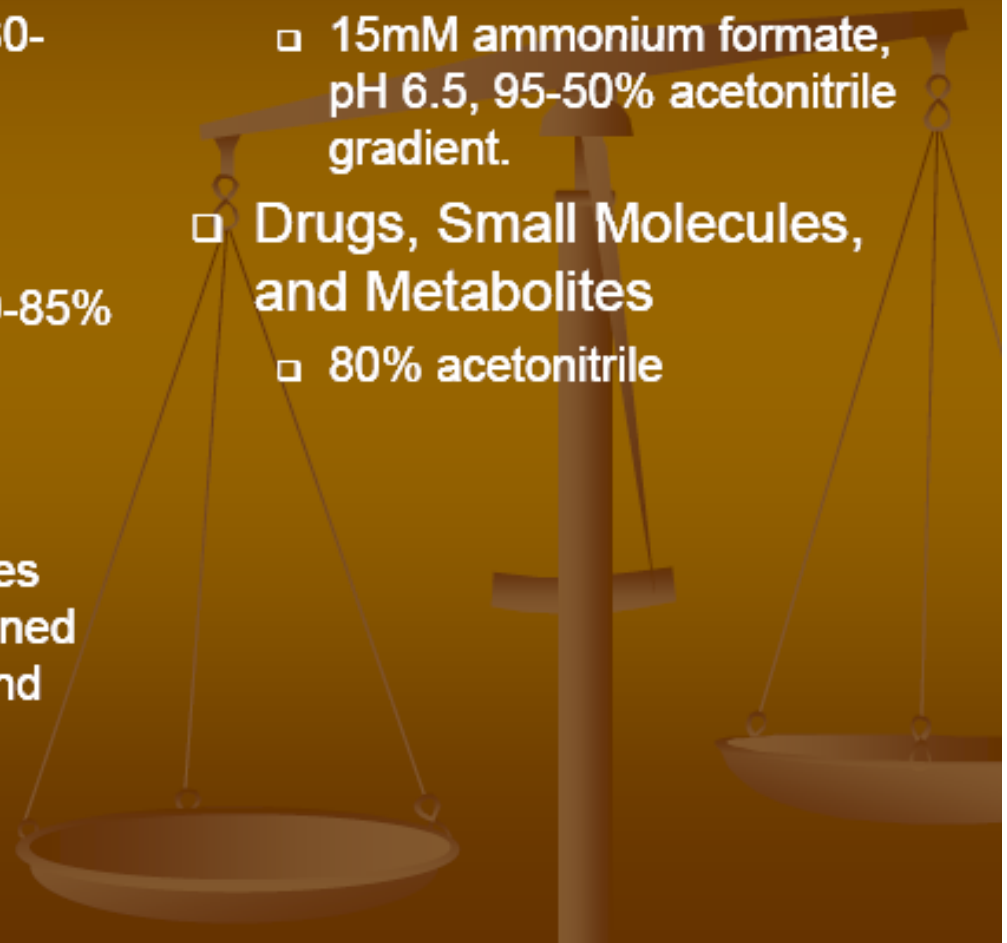
- Salt gradient in 75% acetonitrile. (Cysteines and glycines are retained more than alanines and threonines in these methods.)

- Phospholipids

- 15mM ammonium formate, pH 6.5, 95-50% acetonitrile gradient.

- Drugs, Small Molecules, and Metabolites

- 80% acetonitrile



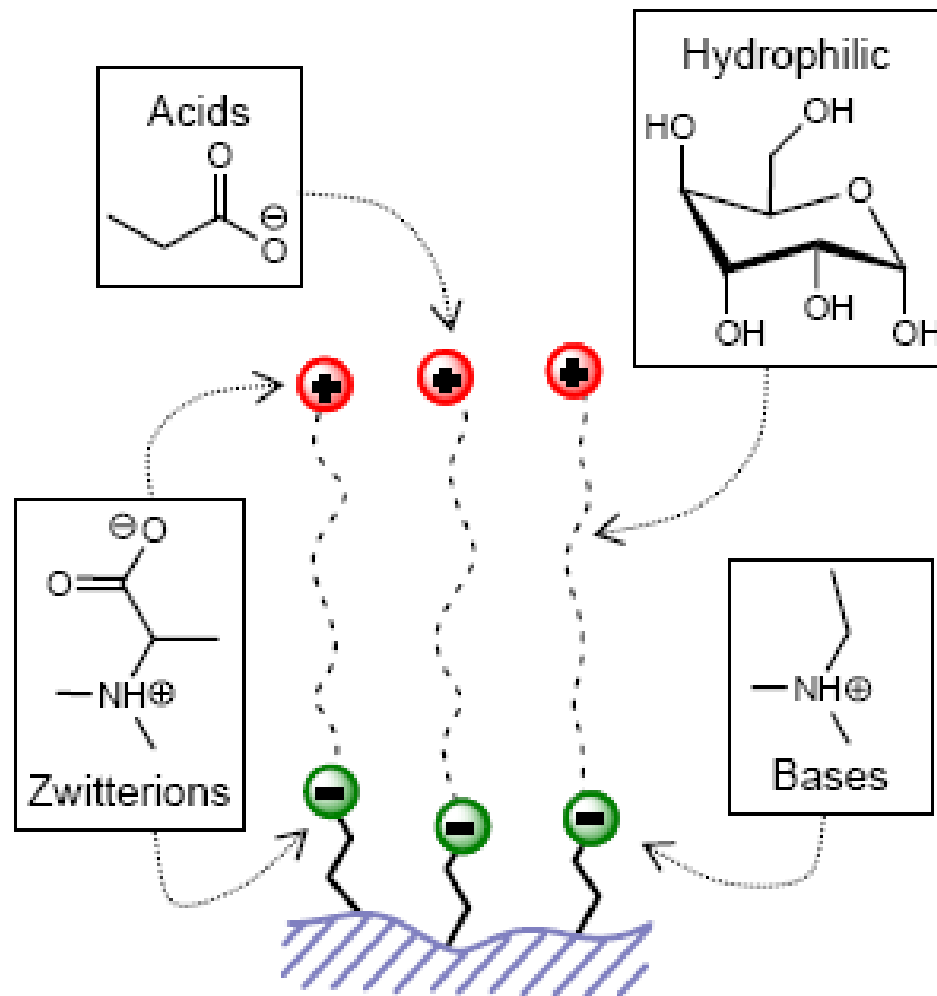
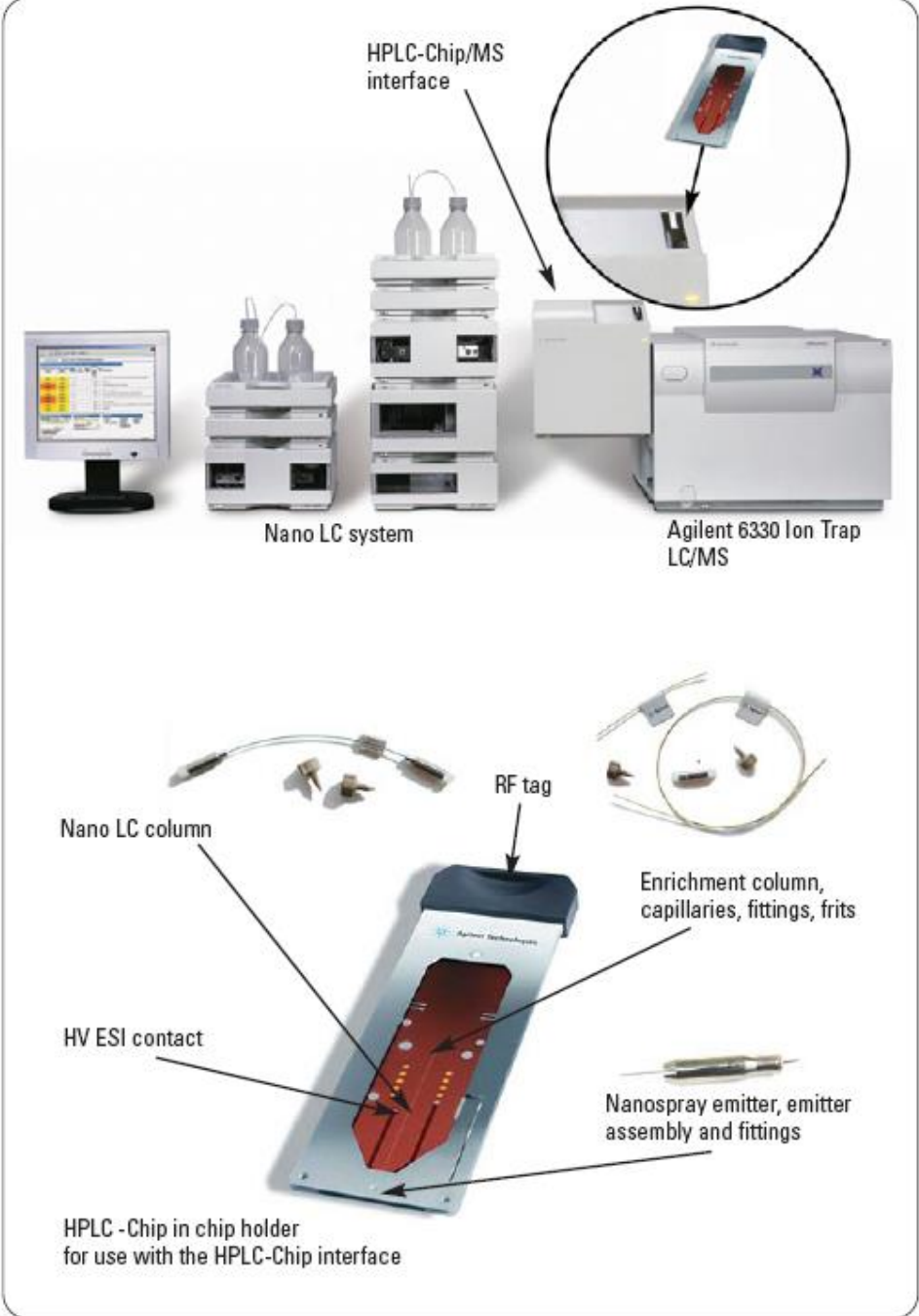


Figure 1. Different types of interactions of Obelisc N stationary phase with different analytes allow to retain many types of charged and hydrophilic compounds.



HPLC egy chip-en  
(HPLC-on-a-chip)

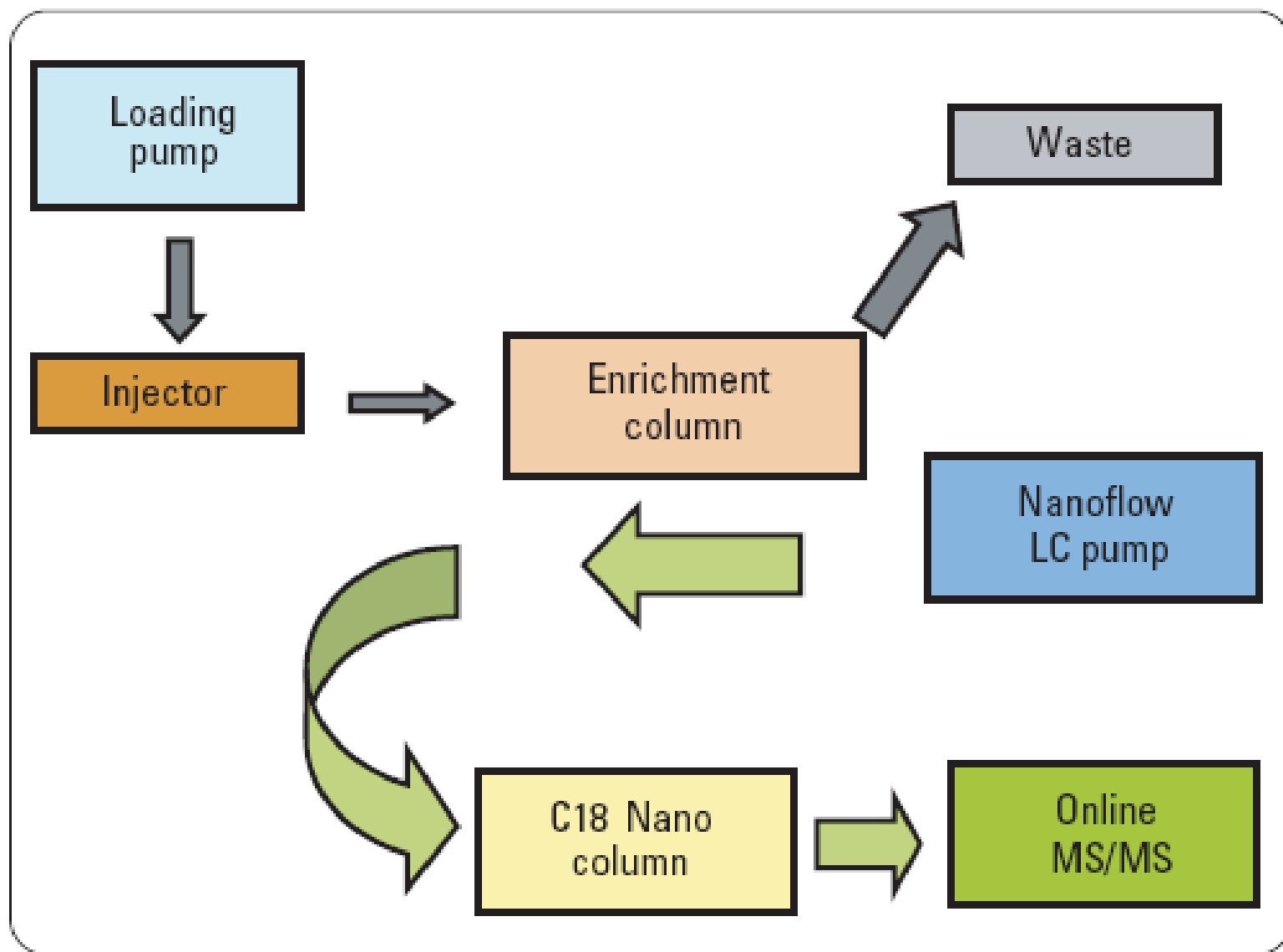


**Figure 1**  
**Agilent HPLC-Chip/MS system.**

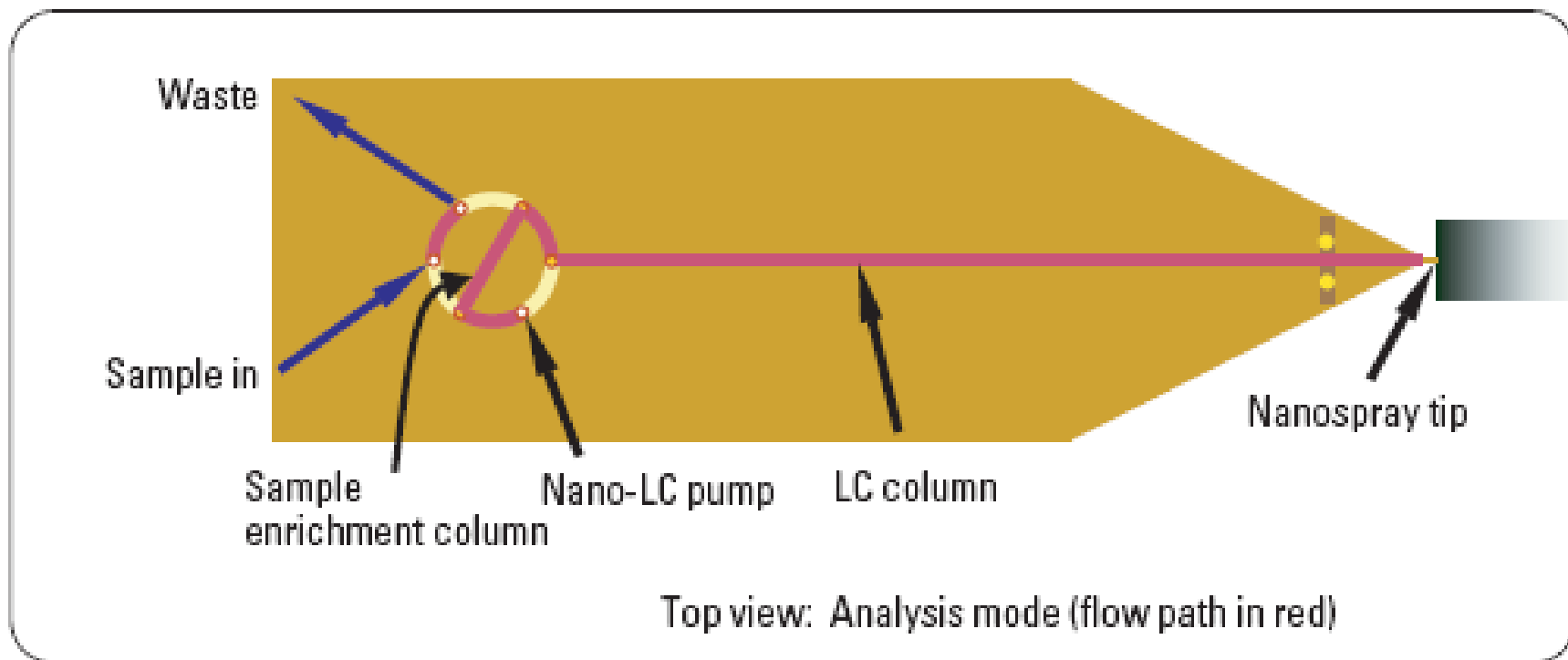
## HPLC-Chip (G4240-65001) összetevői:

- Egy 40-nL-es dúsító oszlop  
5- $\mu$ m-os részecske méretű  
ZORBAX 80 SBC18 töltettel;
- Egy 0.075 x 43 mm-es analízisoszlop  
5- $\mu$ m-os részecske méretű  
ZORBAX 80 SBC18 töltettel.
- Az összes összeköttetés a két oszlop, valamint az analízis oszlop és a nanospray kibocsátó között
- A nanospray kibocsátó (10- $\mu$ m ID).

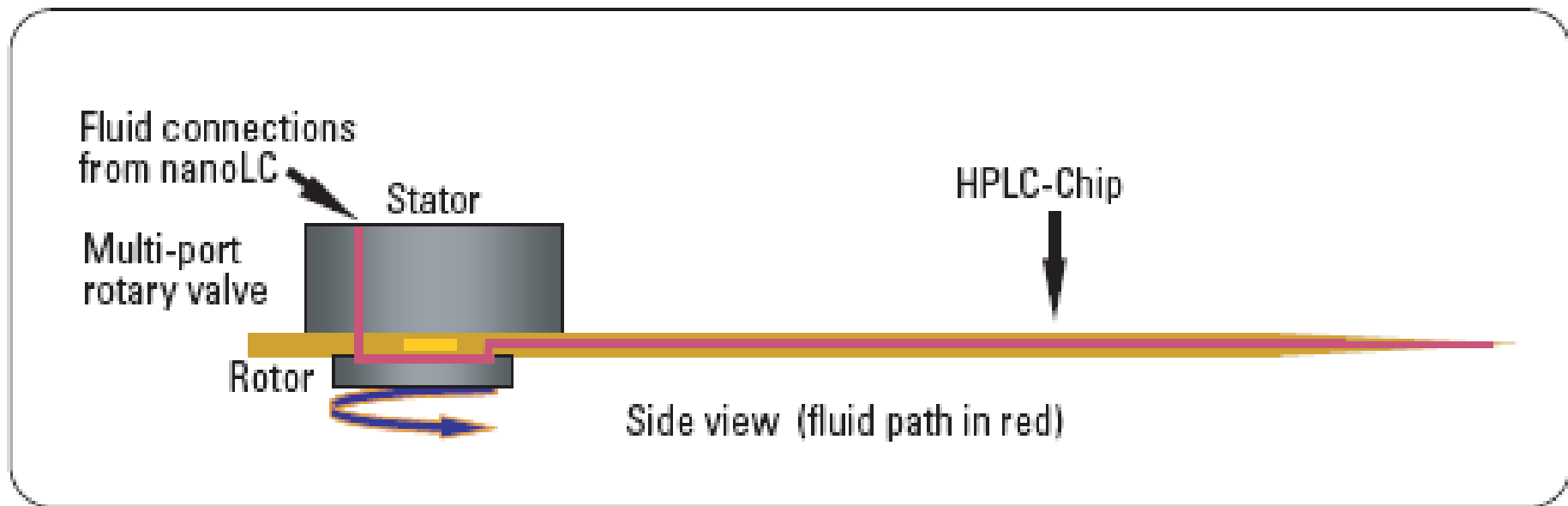
Maga a HPLC-Chip a HPLC-Chip/MS interfészbe helyezhető (HPLC-Chip cube). Ez az interfész biztosítja az összes folyadék-összeköttetést az Agilent 1200 Series nanoáramlású LC rendszerhez, és egyben hatékony kapcsolatot is biztosít az Agilent 6330 Ion trap LC/MS nanospray kibocsátóhoz.



**Figure 1**  
Flow diagram for a conventional nanoflow LC/MS system with sample enrichment.



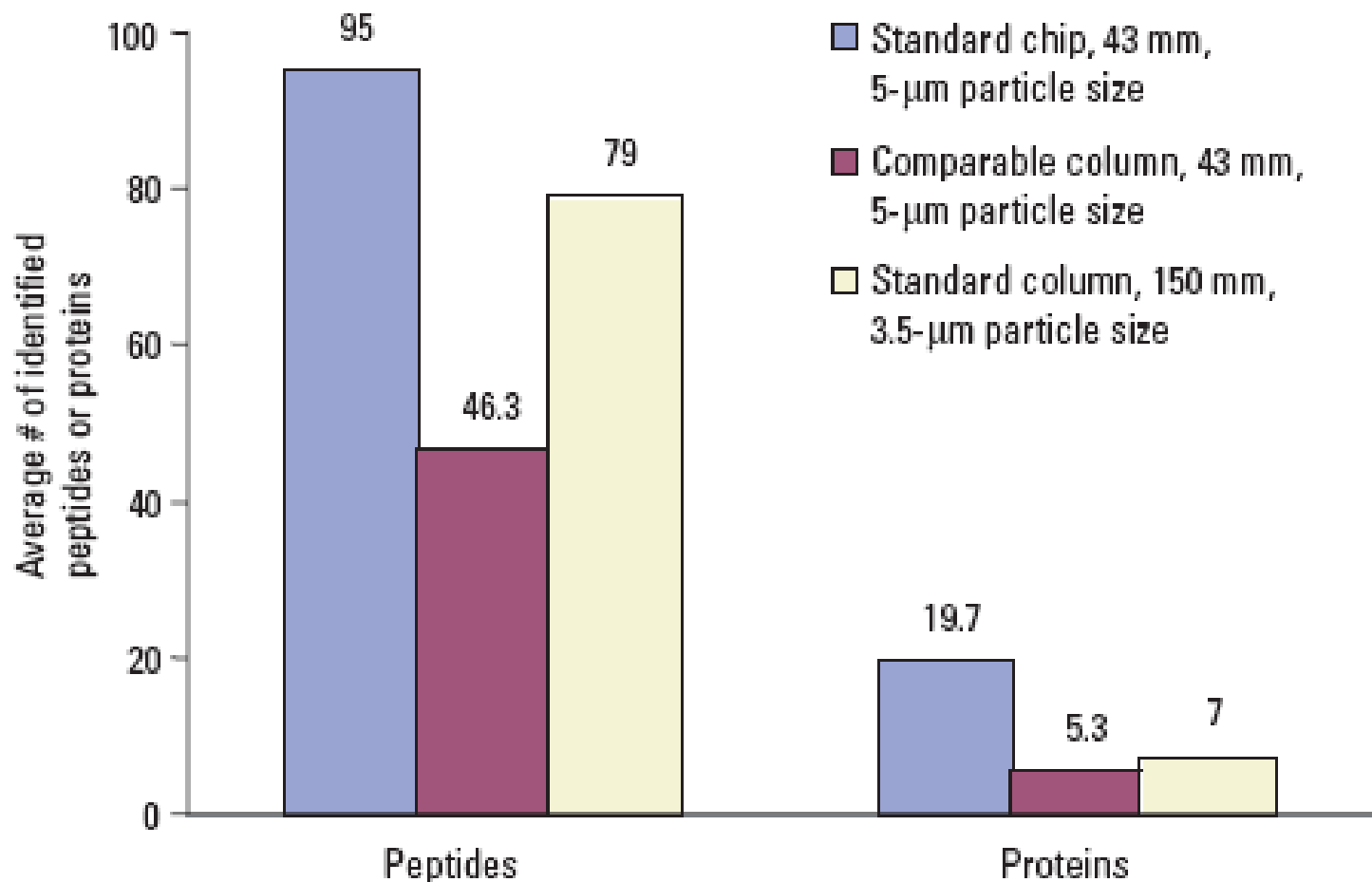
**Figure 2**  
**Diagram of the HPLC-Chip.**



**Figure 4**

**The microvalve in the HPLC-Chip/MS interface docks to an HPLC-Chip.**

### Comparison of HPLC-Chip/MS and conventional analysis with nanocolumns



**Figure 5**

Average number of identified peptides and proteins from yeast gel band using the HPLC-Chip/MS (43 mm) versus conventional LC/MS with nanocolumns (43 mm and 150 mm).

Először is, a HPLC-Chip összetevőinek integrálása eliminálta a legtöbb forrasztott összeköttetést, miáltal a holt térfogatok lecsökkentek.

Másodszor, a minta adszorpcióját ezeken a helyeken biokompatibilis poliimidbevonattal, és a mintaabszorpcióra hajlamos bonyolult összeköttetések elhagyásával minimalizálták.

Harmadszor, mivel az elektronspray emittert ráintegrálták a HPLC-Chip-re, a kolonna utáni diszperzió elhanyagolható mértékűre csökkent.

Végezetül, a minta útvonal optimalizált megtervezése minimalizálta a mintaveszteséget és csökkentette a holt-térfogatot.

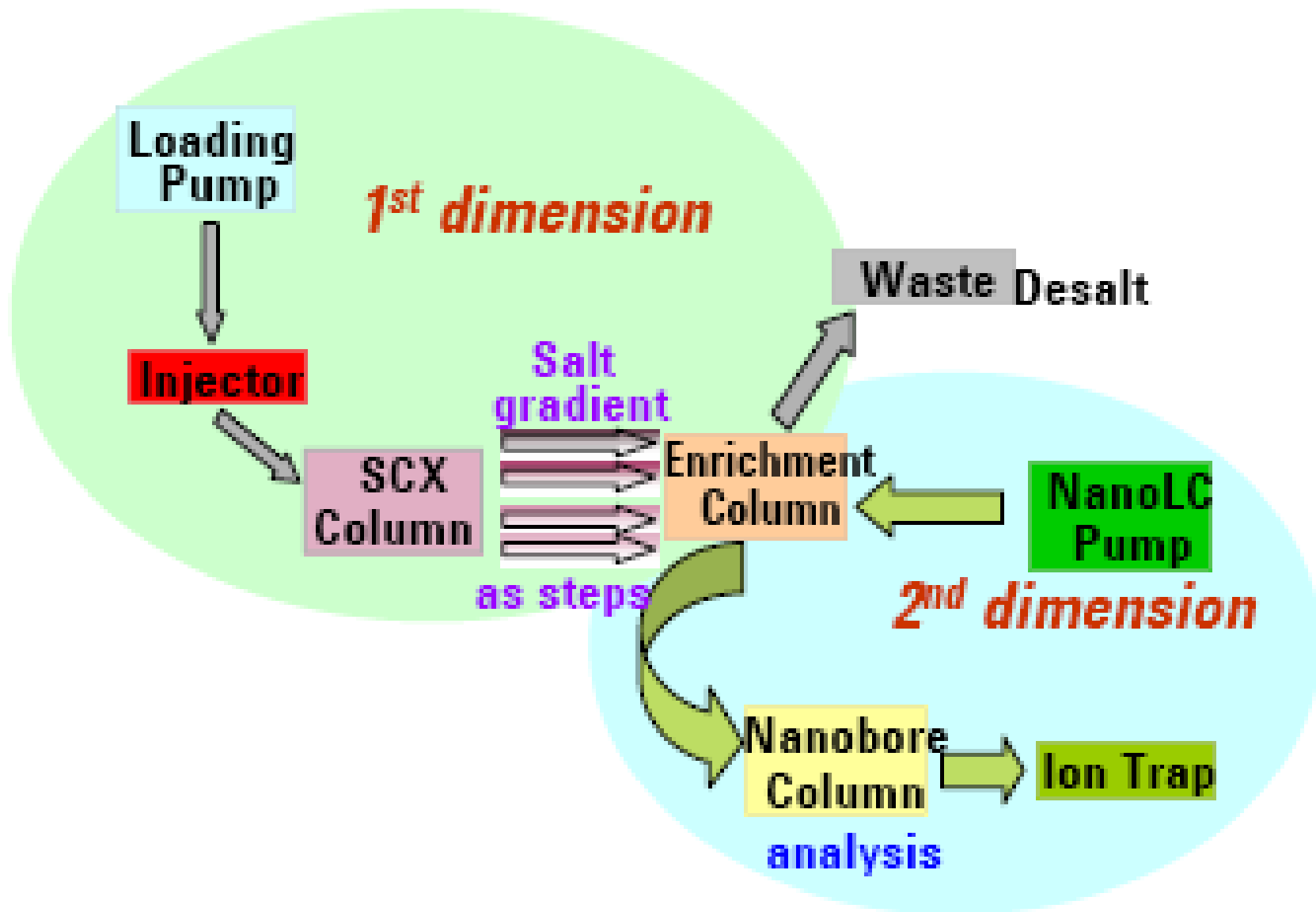
Ezek a fejlesztések jelentős mértékben megnövelték az azonosítható peptidek és fehérjék számát a HPLC-Chip kialakításán keresztül.

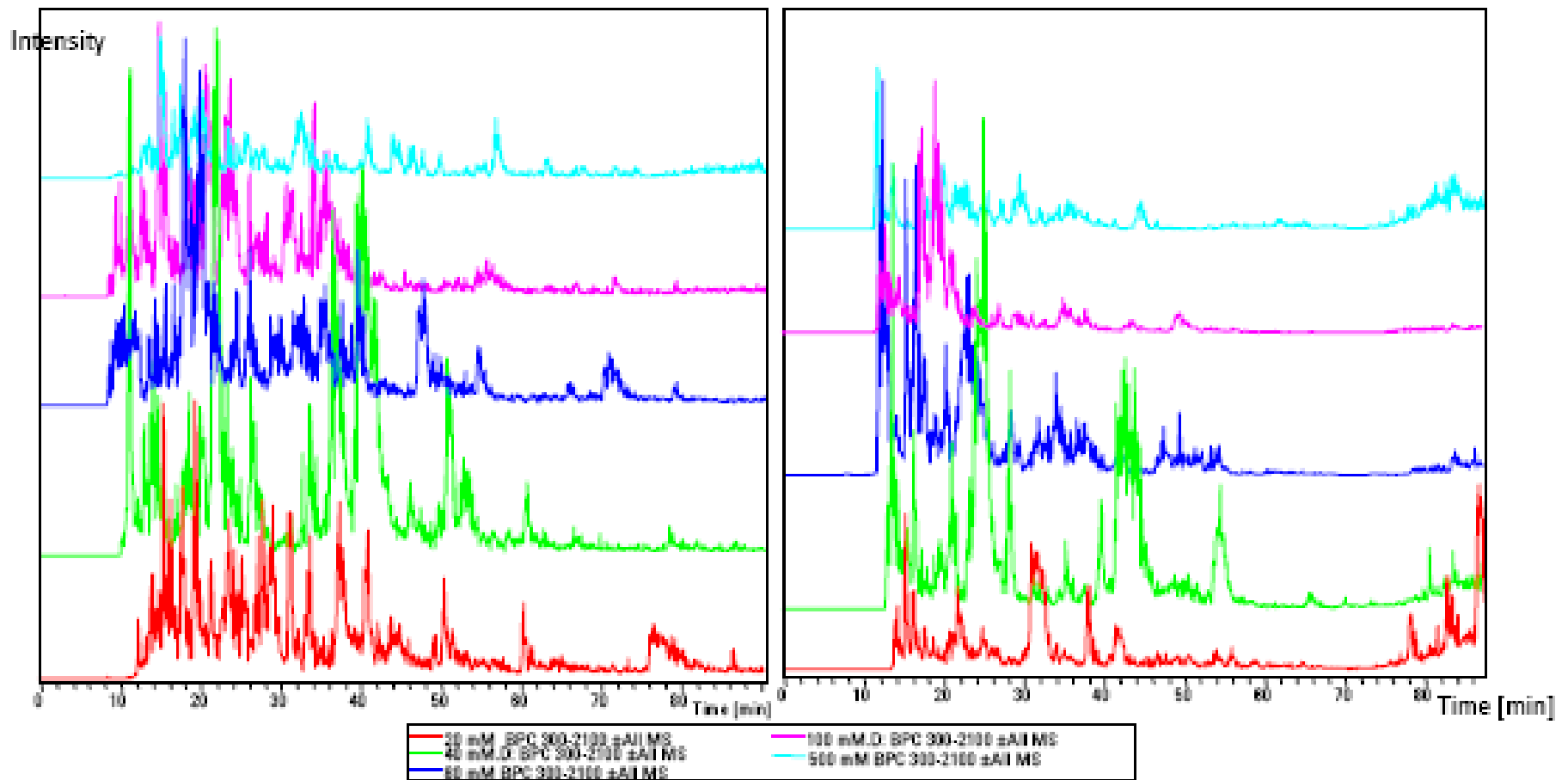
# Két-dimenziós kromatográfia

**Az SCX és RP kolonnák és a nanospray iontrap MS/MS kombinálásával széleskörű és érzékeny megkülönböztető képességű proteomikai analízis lehetőségét demonstrálták egy összetett biológiai minta segítségével.**

**Sikeresen demonstrálták pl. néhány protein protein-alegységének az érzékeny detektálását több ezer proteint tartalmazó háttérből.**







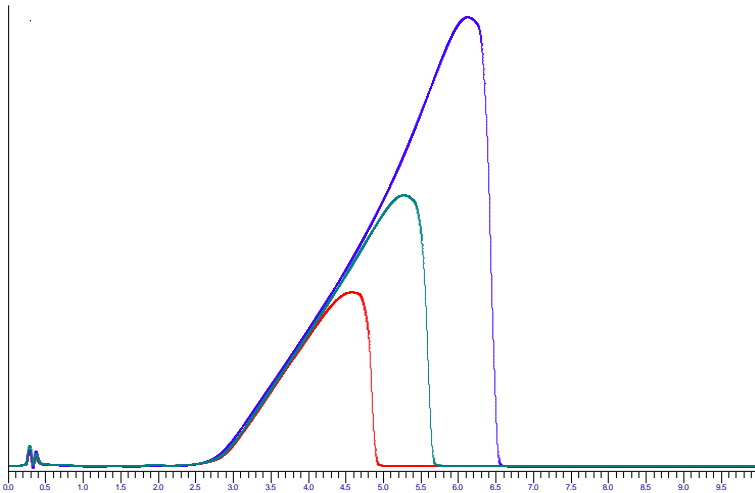
Base peak chromatograms from selected 2D-SCX-RP fractions (left lactose, right glucose culture)



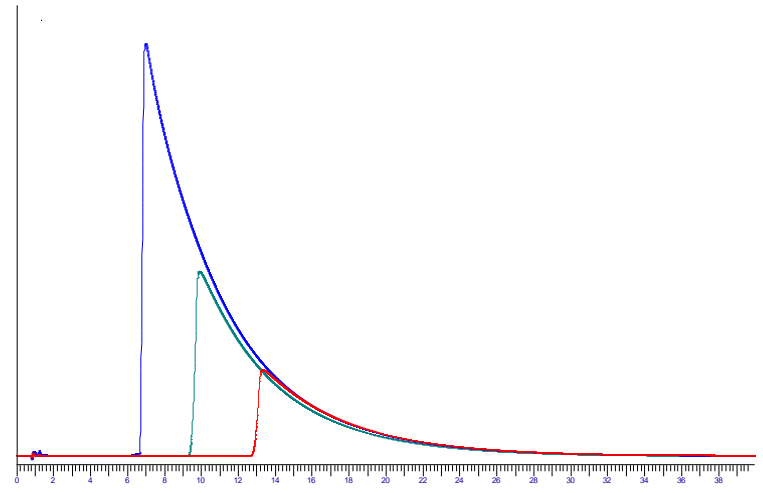
# Chromatography

## Experiments

Ibuprofen peaks at different concentrations



Kromasil C4 column  
50x3mm  
Particle size: 13 $\mu$ m  
Eluent: 80/20 AcN/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer  
pH=4.4



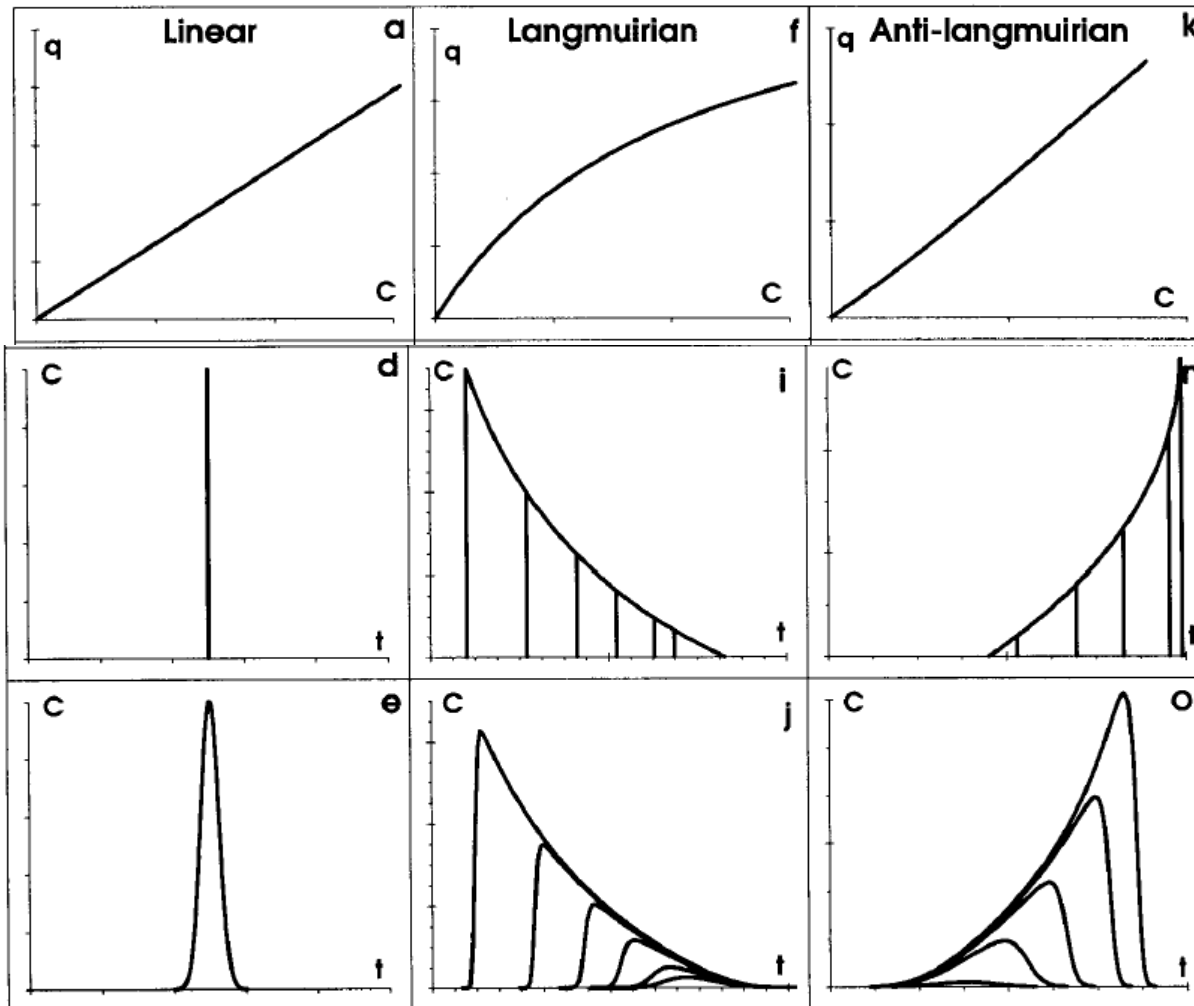
Purospher RP-18 column  
125x4 mm  
Particle size: 5 $\mu$ m  
Eluent: 30/70 AcN/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
buffer pH=4.4

# Chromatography

## Theory

$N = \infty$

$N < \infty$



# The differential equation of nonlinear chromatography for $N=\infty$

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{1 + F \frac{dq}{dC}} \frac{\partial C}{\partial z} = 0$$

$u$  linear velocity

$F$  phase ratio

$C(z,t)$  concentration in the mobile phase

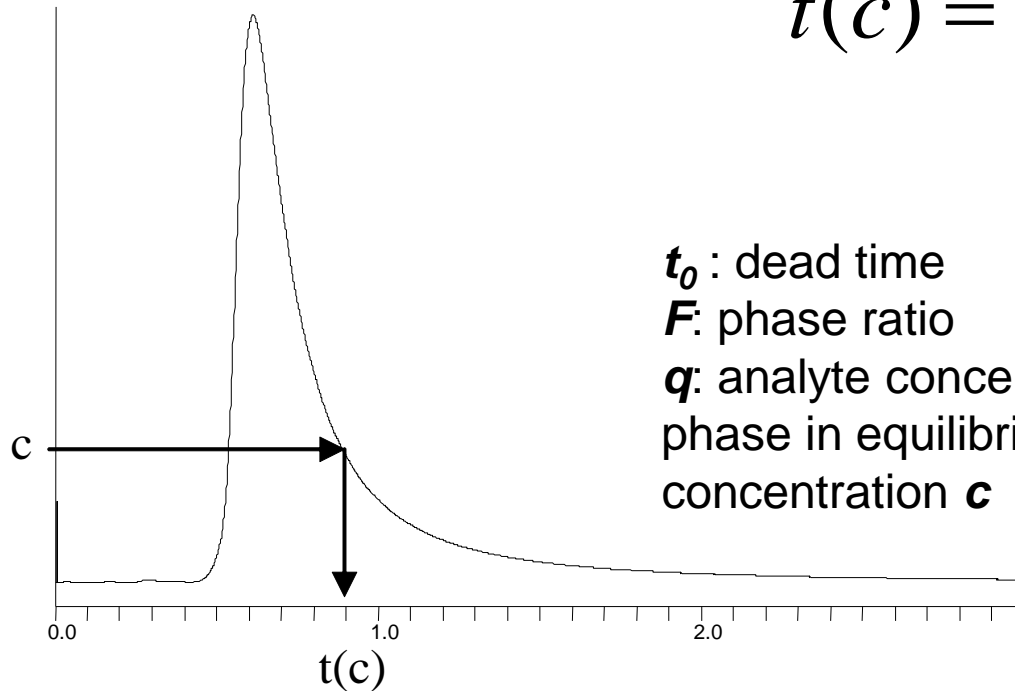
$q(z,t)$  concentration in the stationary phase

Note: the chromatogram can be calculated directly from the isotherm, without knowing the site distribution

# Theory of nonlinear chromatography

Equation of the tail:

$$t(c) = t_0 \left( 1 + F \frac{dq}{dc} \right)$$



$t_0$ : dead time

$F$ : phase ratio

$q$ : analyte concentration in stationary phase in equilibrium with mobile phase concentration  $c$