

# **Fehérjék, peptidek és aminosavak 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, peptidek és aminosavak  
folyadékkromatográfiája

Elektroforézis és elektrokromatográfia

(Lab on a chip HPLC)

# Fehérjék, peptidek és aminosavak folyadékkromatográfiás módszerei

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

Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (**HIC**)

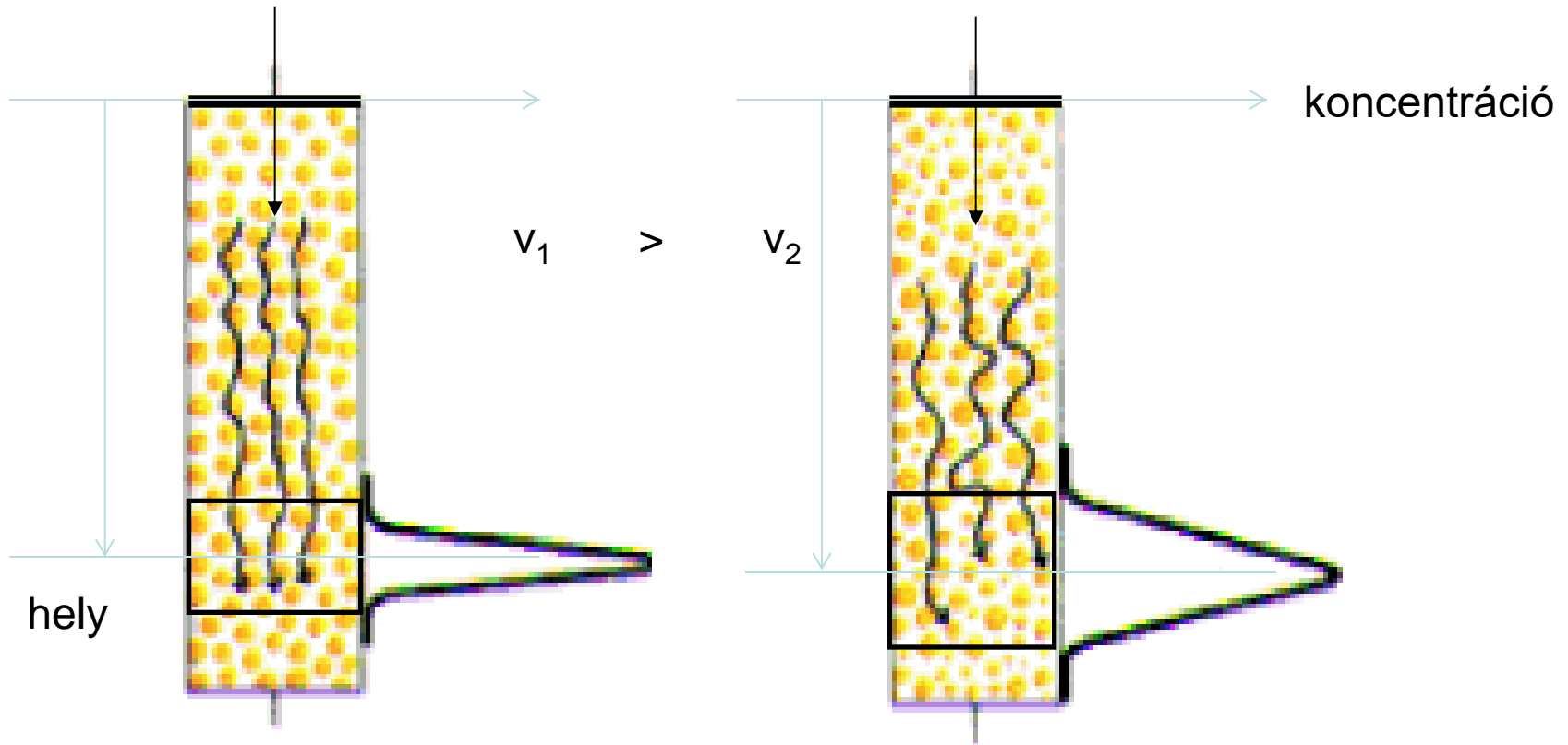
Ioncserés protein/peptid-kromatográfia (**IEX-PC**)

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

Affinitás kromatográfia (**AC**)

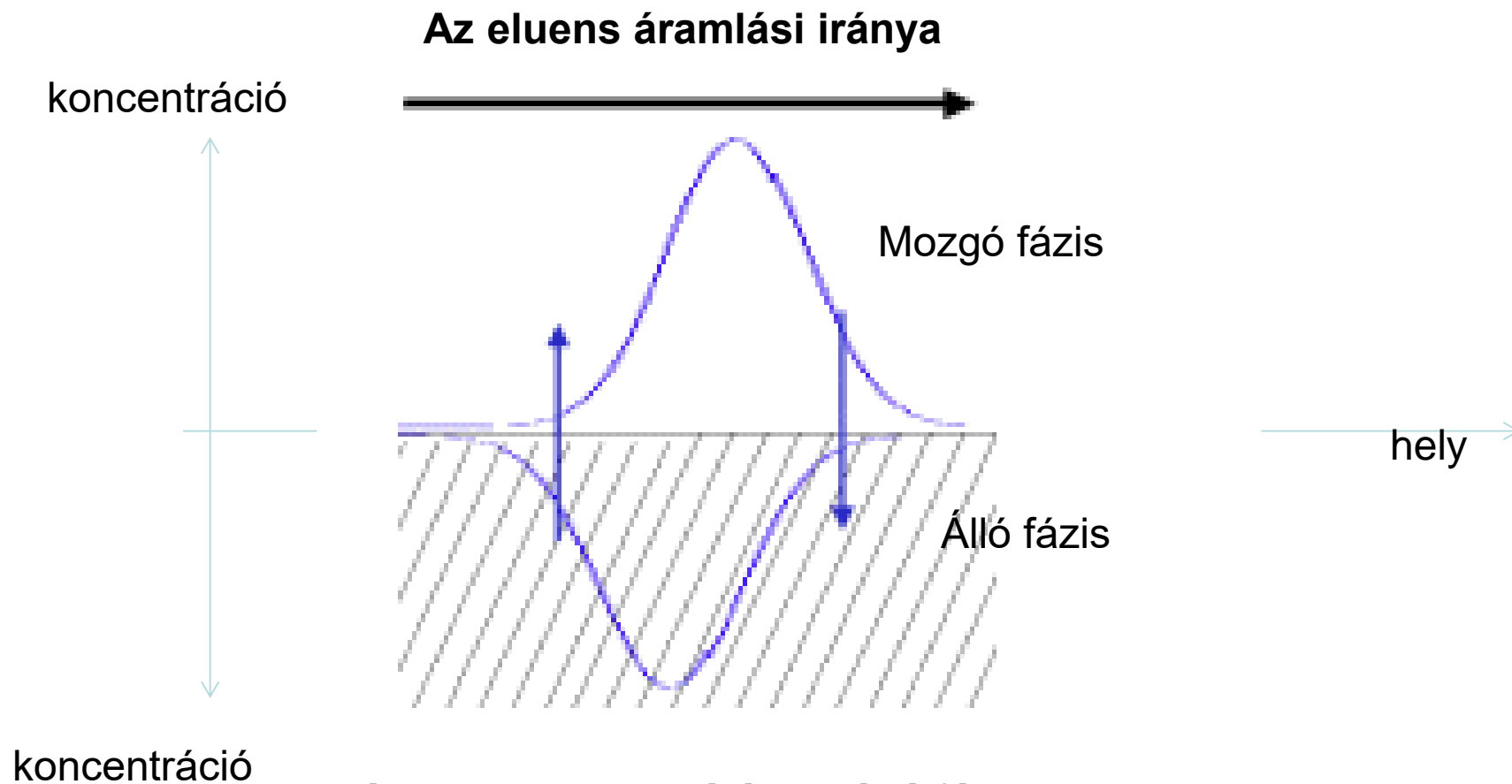
# Elúciós kromatográfiák. ZÓNASZÉLESÍTŐ hatások –

0. Holtterek, örvénylés, visszakeveredés, turbulencia miatt
1. A töltetágyban fellépő **axiális**, tengelyirányú/ Taylor-**diffúzió** miatti dugó/zónaszélesedés (megkötődés/szorpció nélkül is)



Egy adott **keskeny dugószerűen injektált**, az eluensben dugószerűen vándorló anyagkomponens koncentrációprofilja, eltérő eluens lineáris áramlási sebességek mellett, eltérő mértékben szélesedik a **koncentrációgradiens** miatt.

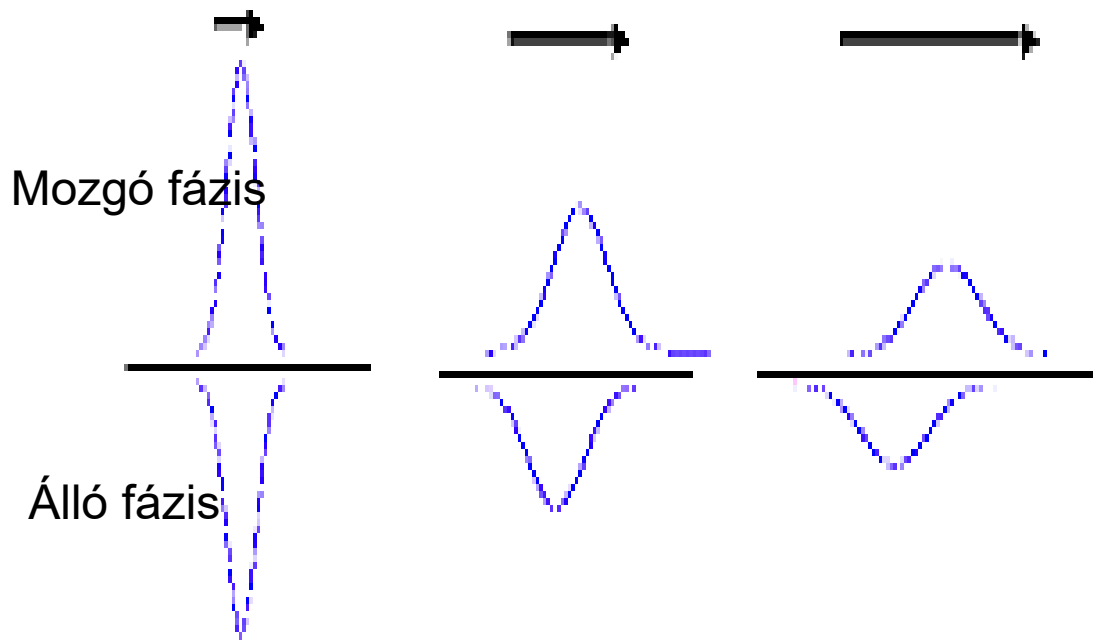
2. Az anyagátadási diffúzió miatt az áramlási irányra merőlegesen, az eluált mintakomponens-dugó(k) vándorlása során



koncentráció

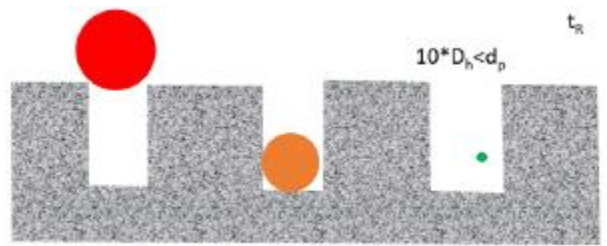
**A kék nyilak a mozgó és az álló fázis közötti komponens-anyagátmenetek eredő irányait jelölik**

A nyilak hossza a lineáris áramlási sebesség nagyságát ( $u$ ) is mutatja:

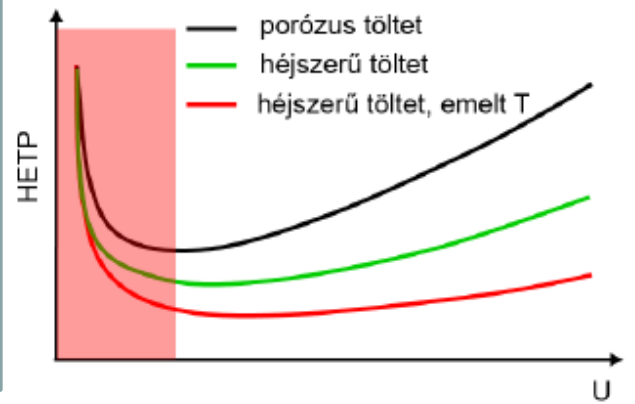


Az áramlási irányra merőleges anyagátadás a lineáris áramlási sebességgel ( $u$ ) arányos zónaszélesedést okoz.

A **pórusosság** szerepe: a hidrodinamikai molekulaméret és a **pórusátmérő** viszonya:  $10 \cdot D_h < d_{\text{pórus}}$

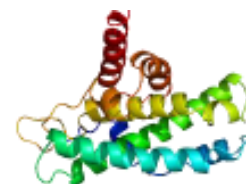
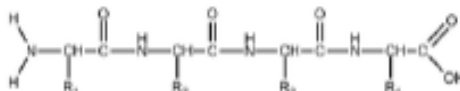
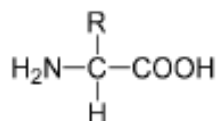


**Pórusmélység, Hőmérséklet**



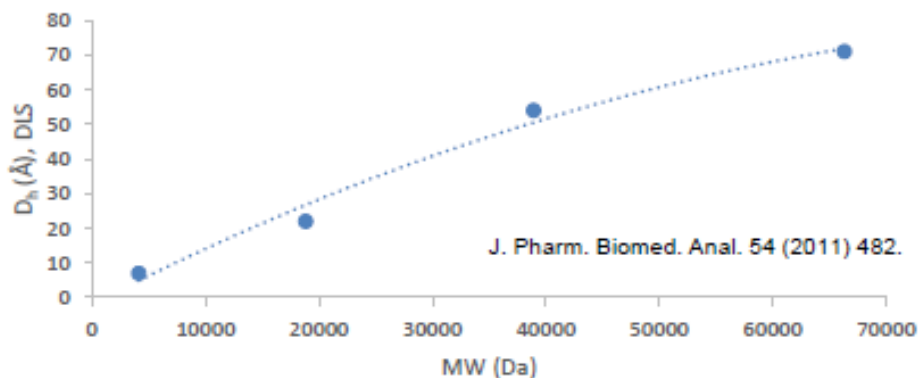
*Az áramlási sebességet az anyagátadási sebességekhez viszonyítva kell optimalni, hogy ne okozzon túlzott zónaszélesedést.*

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

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

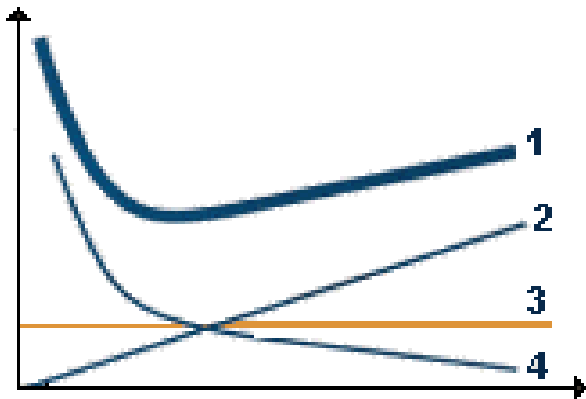
( $w_a$ , az alapvonalon mért csúcshélesség,  $t_R$  retenciós idő)

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

ahol  $v$  a lineáris áramlási sebesség

H, **kis molekulák** esetén

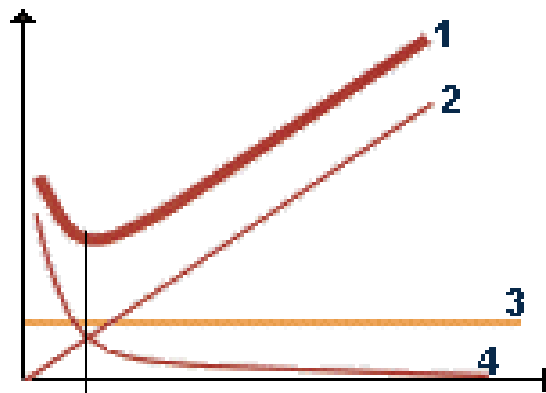
(D, diffúziós állandó nagyobb!)



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

H, **nagy molekulák** esetén

(D, diffúziós állandó a molekulamérettel csökken!)

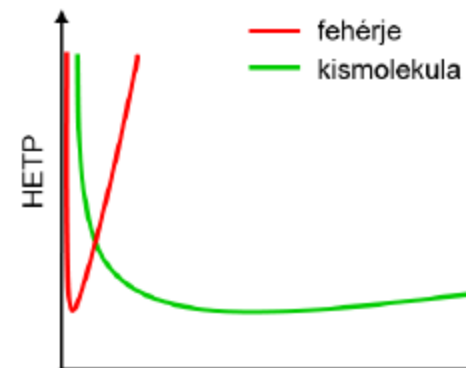


Eredő H (1)

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

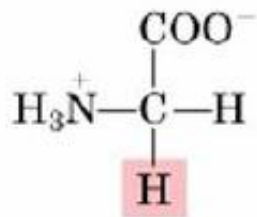
Treonin: Thr; T

Triptofán: Trp; W

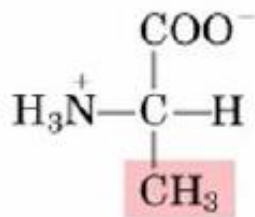
Tirozin: Tyr; Y

Valin: Val; V

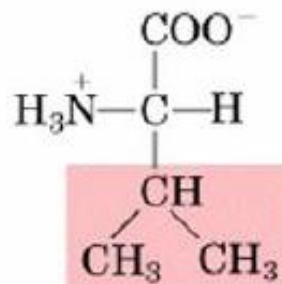
# Apoláris, hidrofób oldalláncú aminosavak



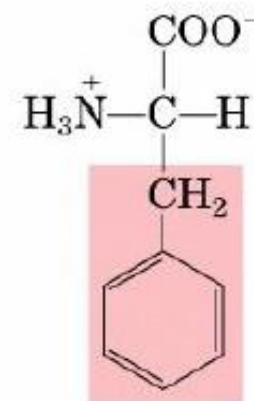
Glycine



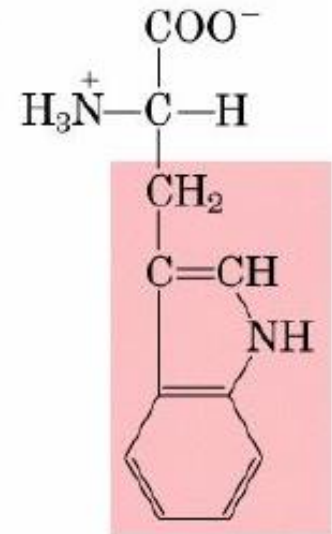
Alanine



Valine

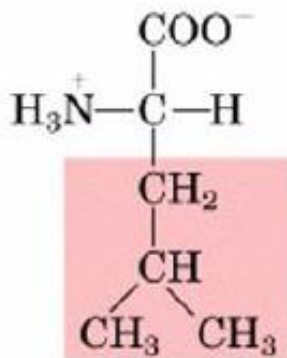


(F)  
Phenylalanine

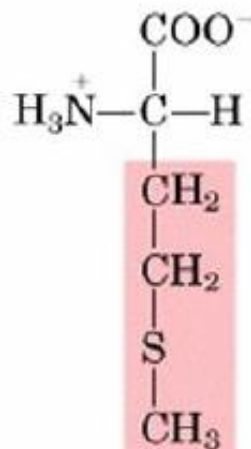


Tryptophan

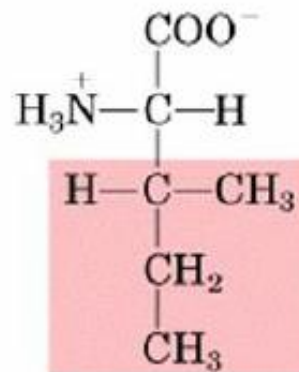
(W)



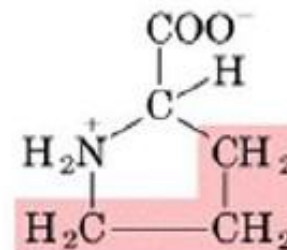
Leucine



Methionine

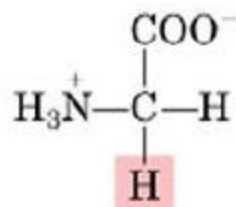


Isoleucine

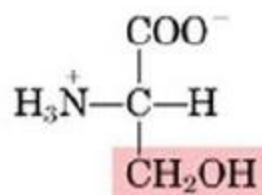


Proline

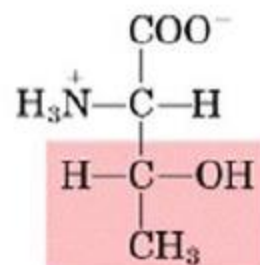
## Poláris oldalláncú, töltéssel nem rendelkező aminosavak



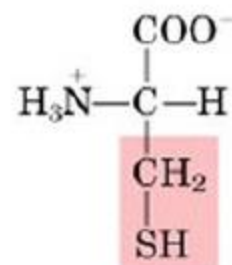
Glycine



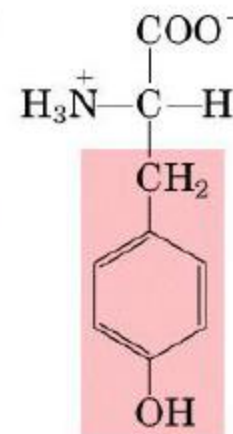
Serine



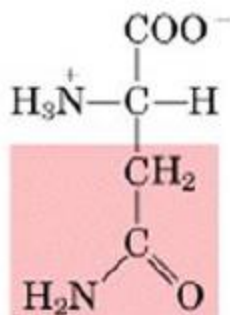
Threonine



Cysteine

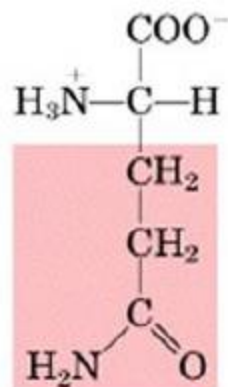


Tyrosine (Y)



Asparagine

(N)



Glutamine

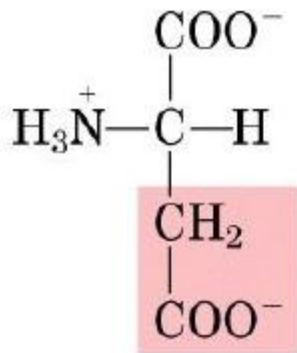
(Q)

(A glicin itt csak szerkezetszármaztató, magyarázó ábraként szerepel)

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

Savas oldalláncú, negatív töltésű aminosavak

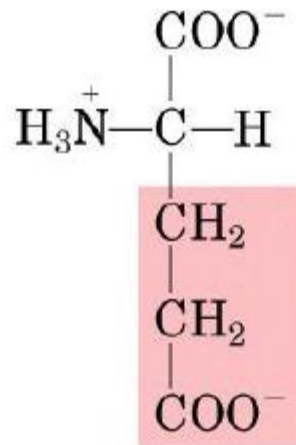
(Aspartic acid, Glutamic acid)



Aspartate

(deprotonálódva anionná)

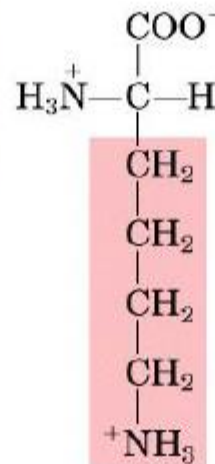
(D)



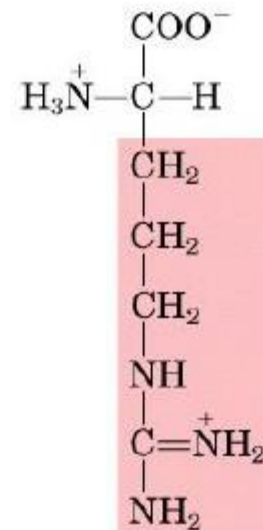
Glutamate

(E)

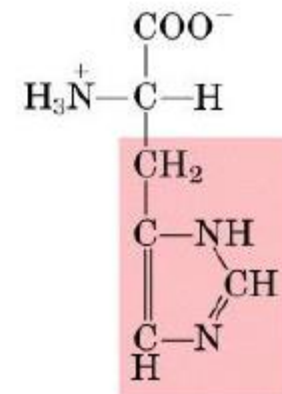
Bázikus oldalláncú, pozitív töltésű aminosavak



Lysine (K)

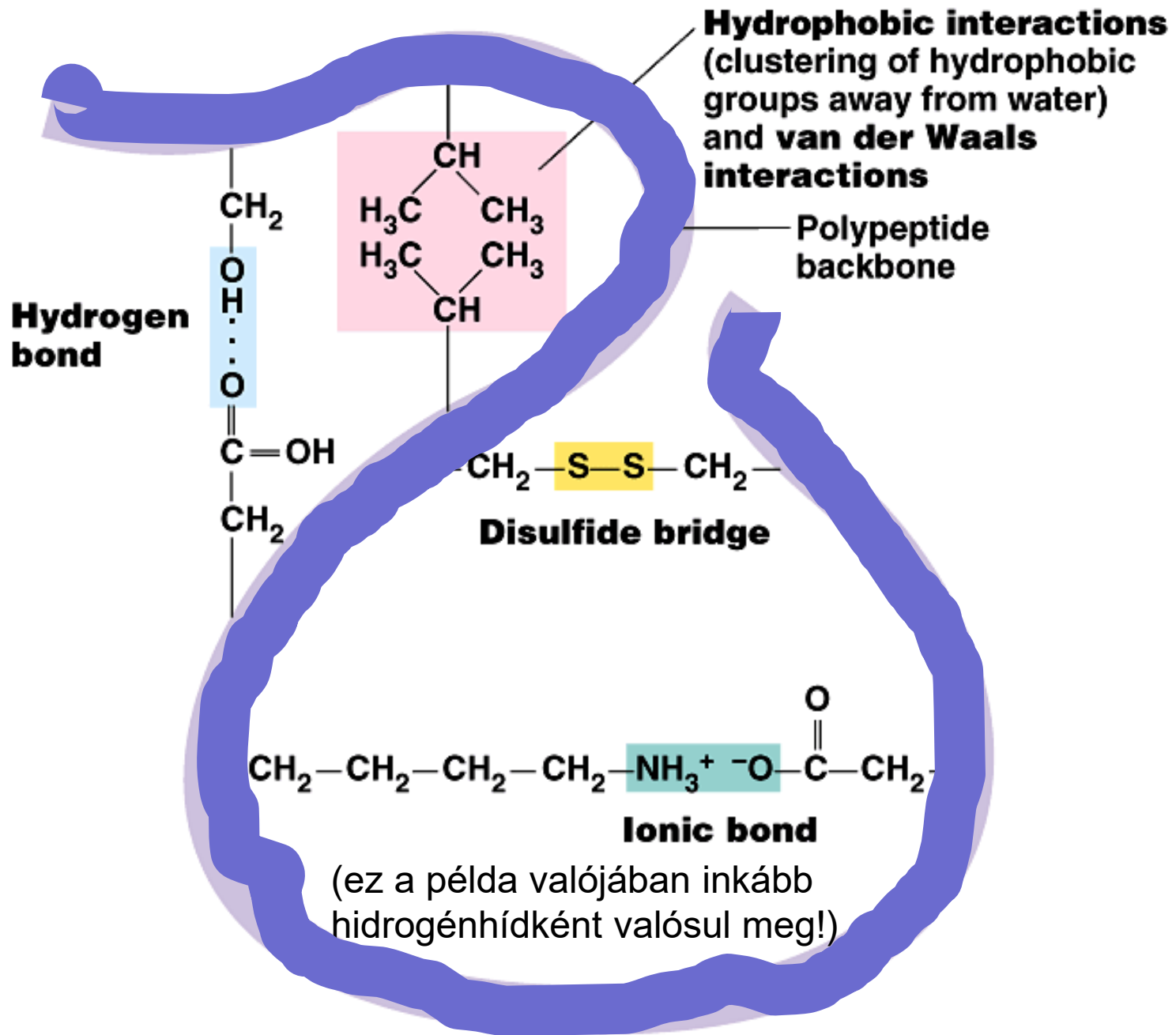


Arginine (R)

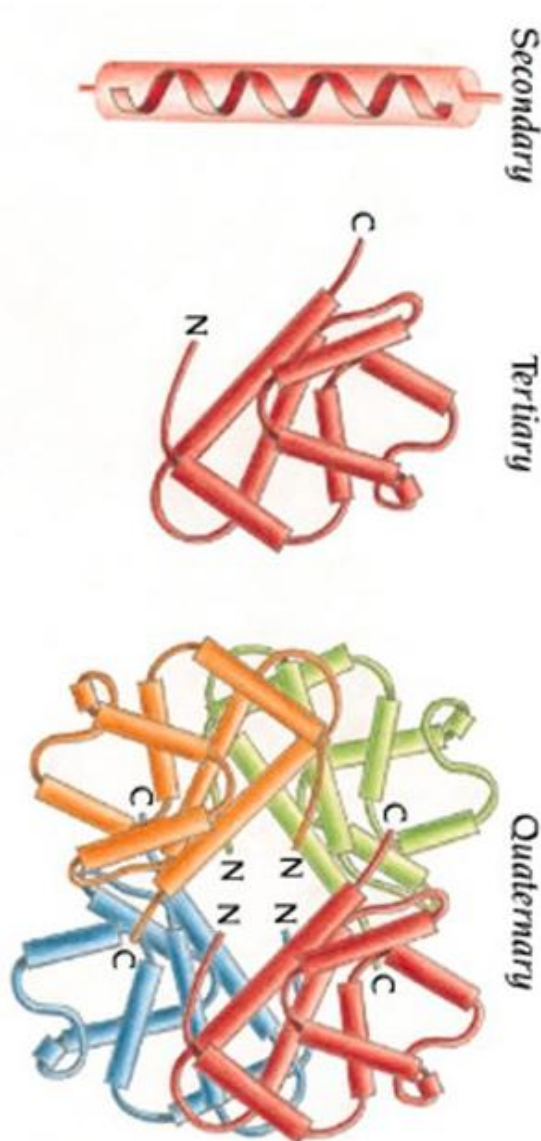


Histidine

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



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



## Másodlagos alszerkezetek

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

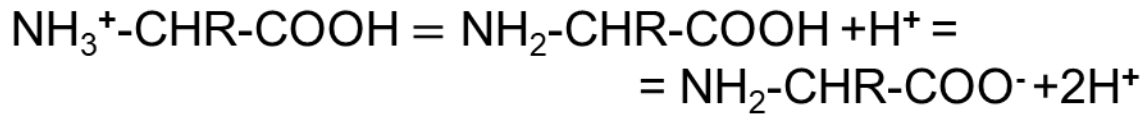
## Poszt-transzlációs módosulások:

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

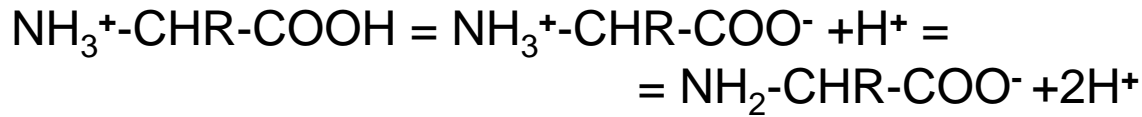
## Átalakulások, bomlások:

- 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):



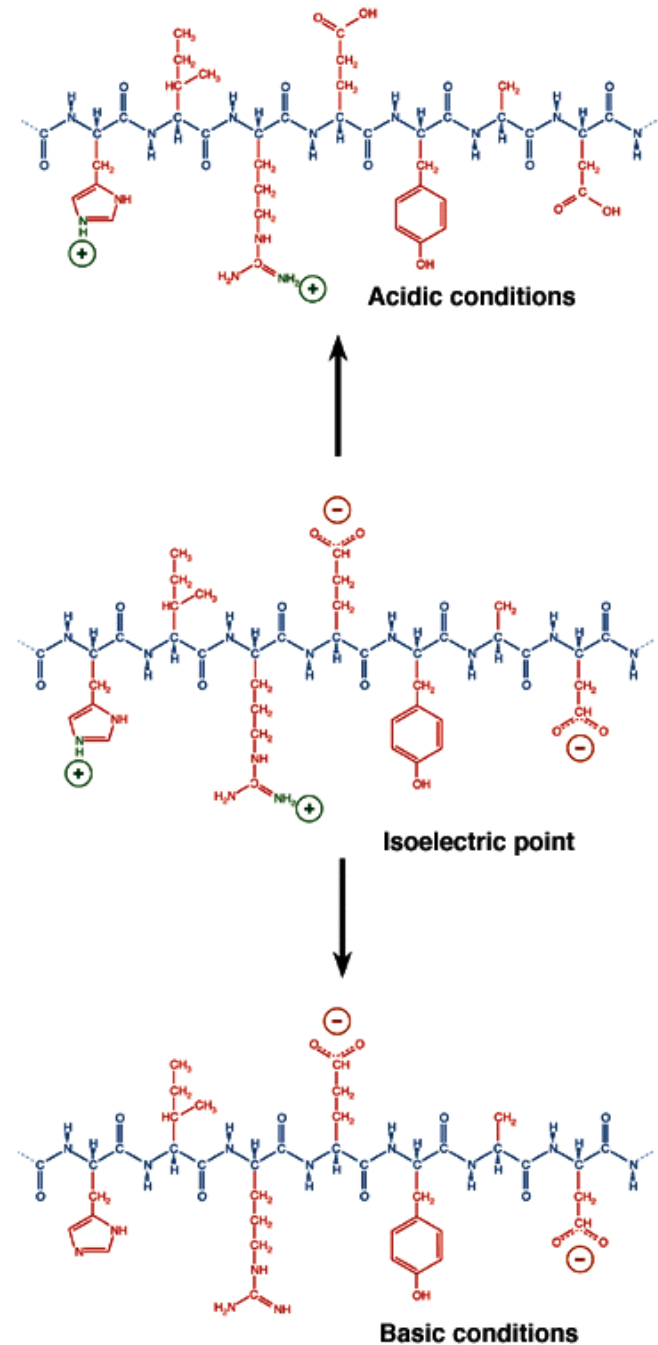
, avagy



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

$$pK_s^2 = pK_{\text{NH}_3^+} = \text{pH} + \log \left[ \frac{\text{ikerion}}{\text{anion}} \right]$$

$$IP = \frac{pK_{\text{COOH}} + pK_{\text{NH}_3^+}}{2}$$





# 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,)

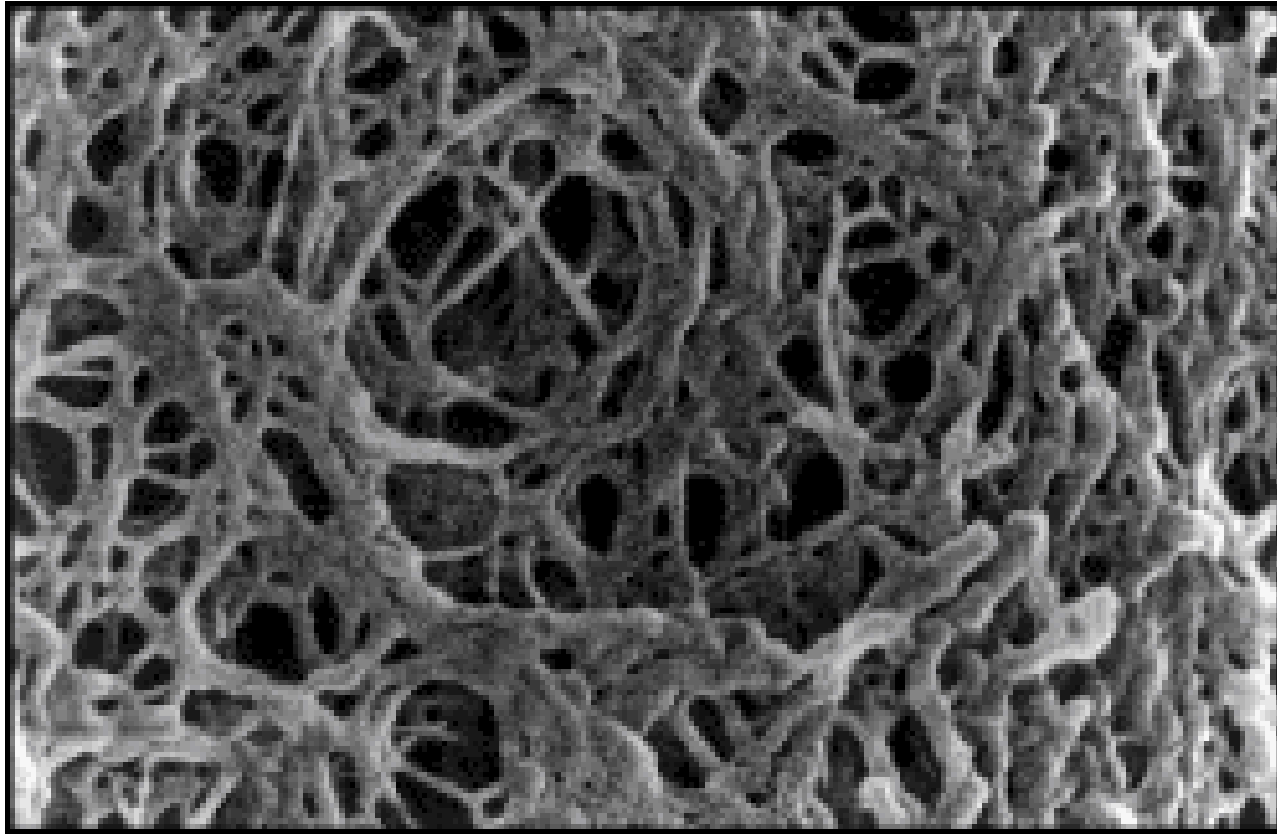
Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (**HIC**)

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.*)

# Gélkromatográfiás térfogatok nevezéktana

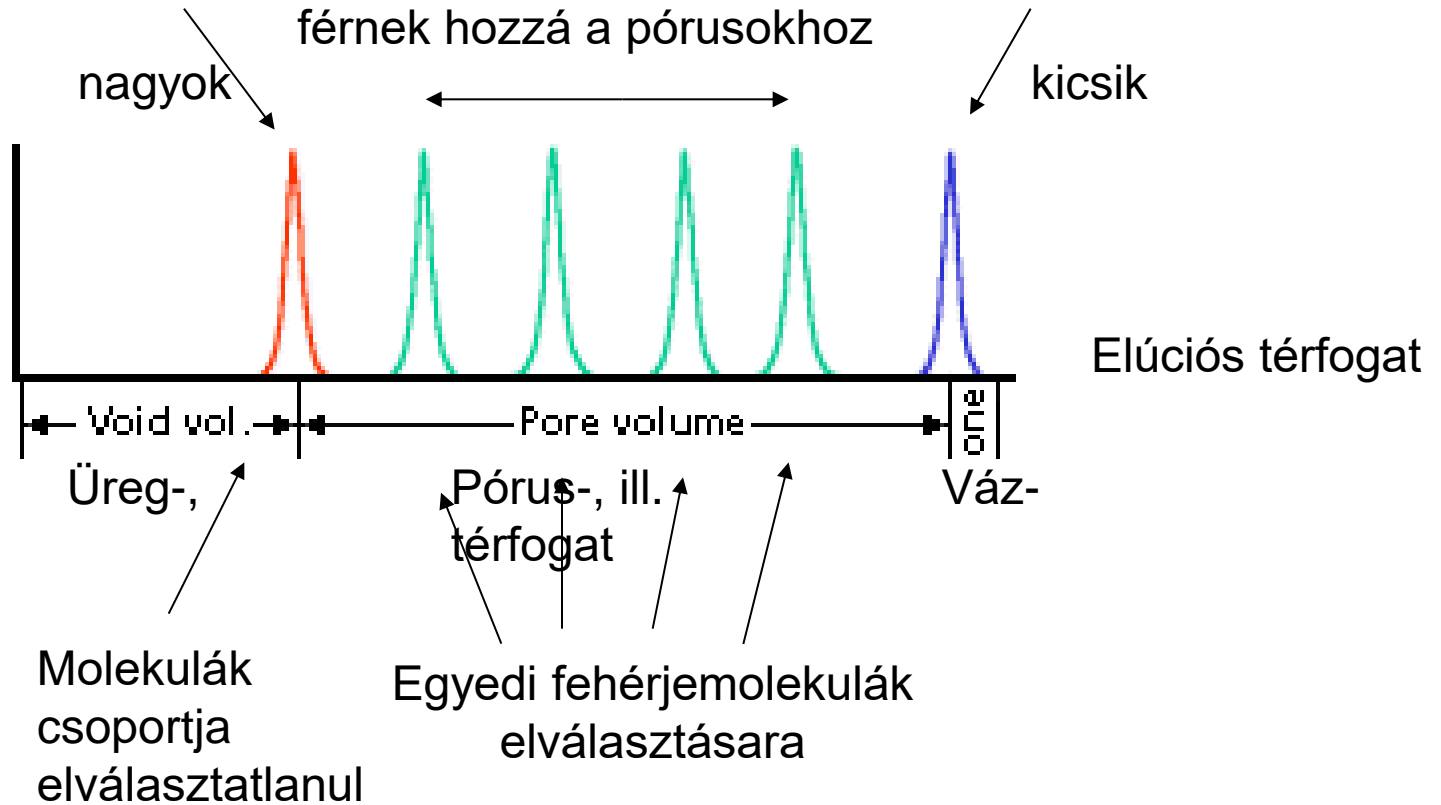
A gélkromatográfiás oszlopban az összes mintamolekula számára hozzáférhető a **gyöngyök közötti** folyadék. Ezt a folyadékrészt a gélszűrésben **üregtérfogatnak** nevezik, ez általában az oszlop teljes térfogatának kb. a 30%-át teszik ki.

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**.

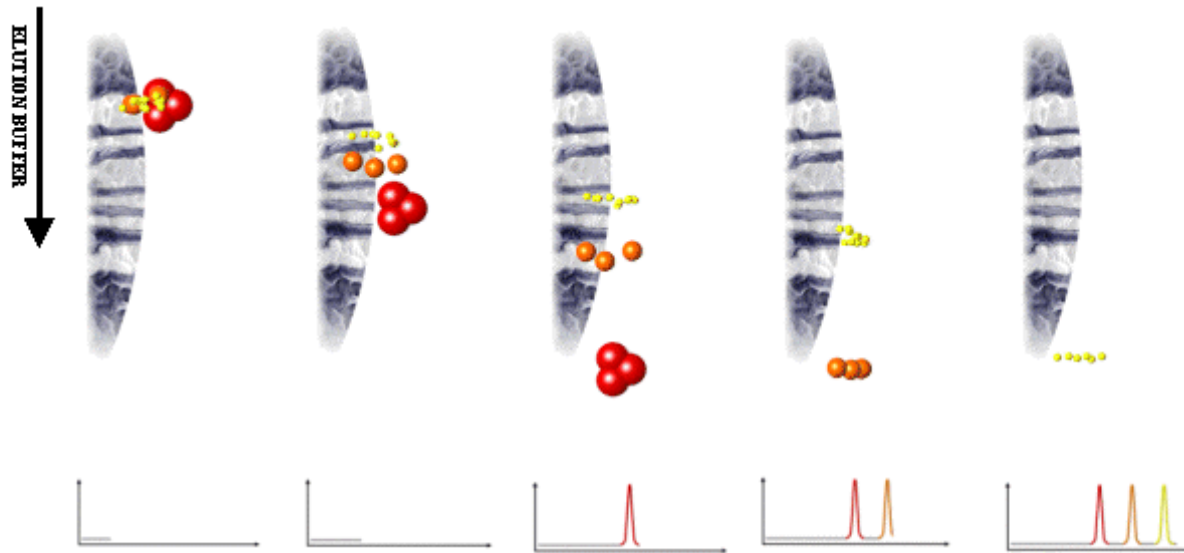
A gélgyöngyök **nem-pórusos** részét **vázrésznek** nevezik, ebbe nyilván nem juthatnak bele a minta molekulái. Egy megfelelő gélszűrő vázrésztérfogata kb. 3-5 %-a egy jól megtöltött oszlopnak.

# 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



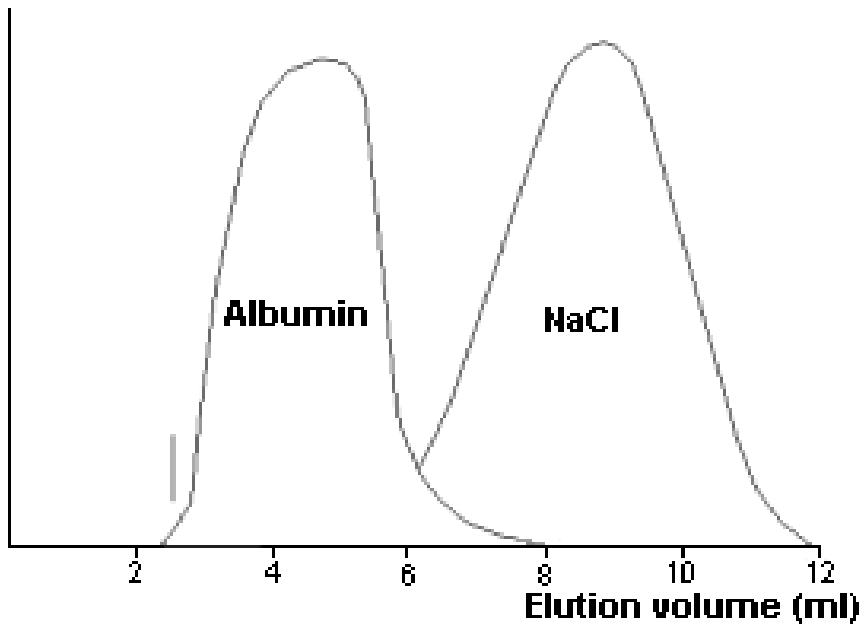
Pufferolt eluensáram



Valójában szakaszos és preparatív (frakcionálósos) jellegű kromatográfia

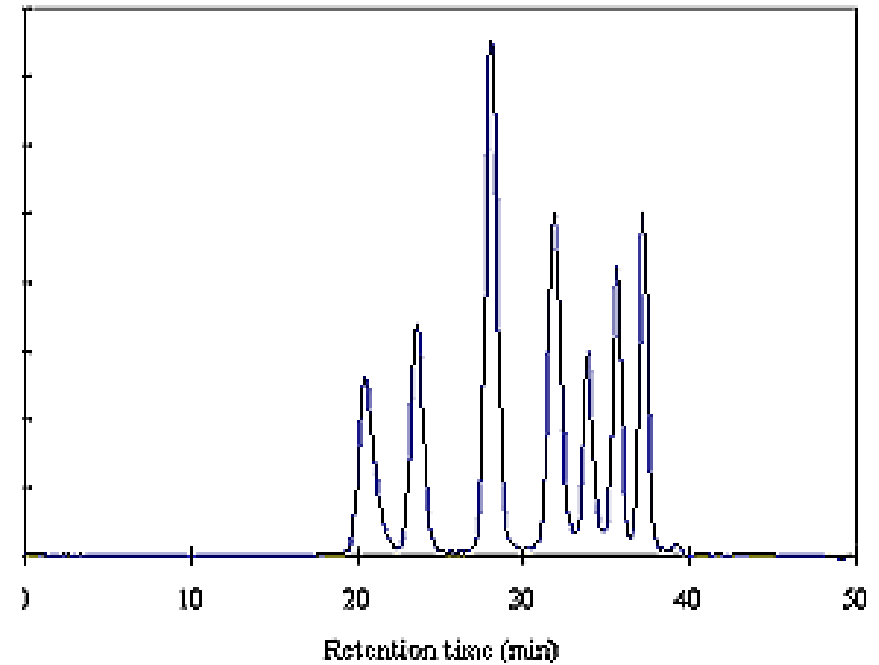
Csoportelválasztási mód -

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

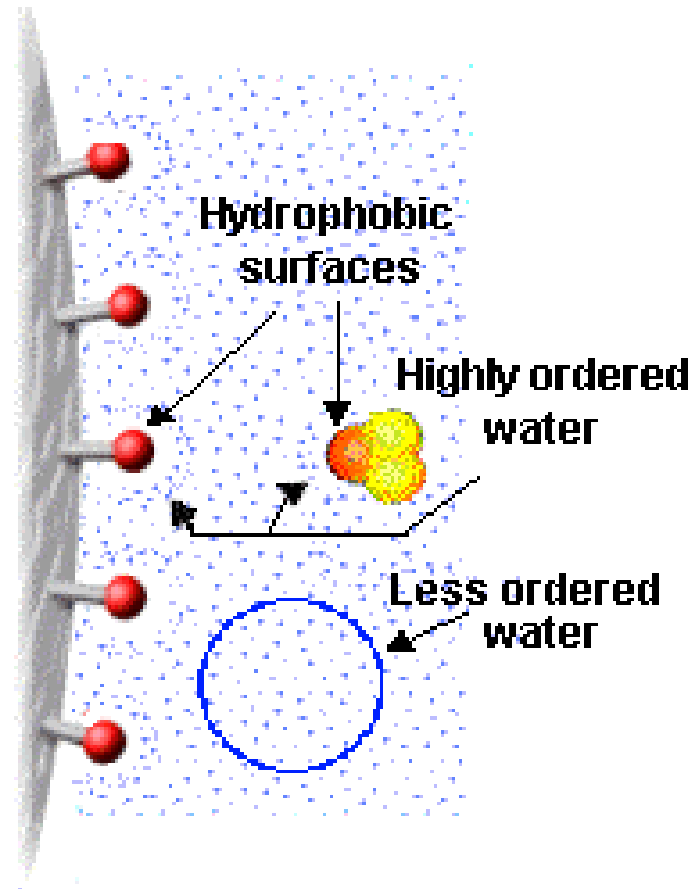
Distinguish proteins differing by as little as 15% in molecular weight

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.



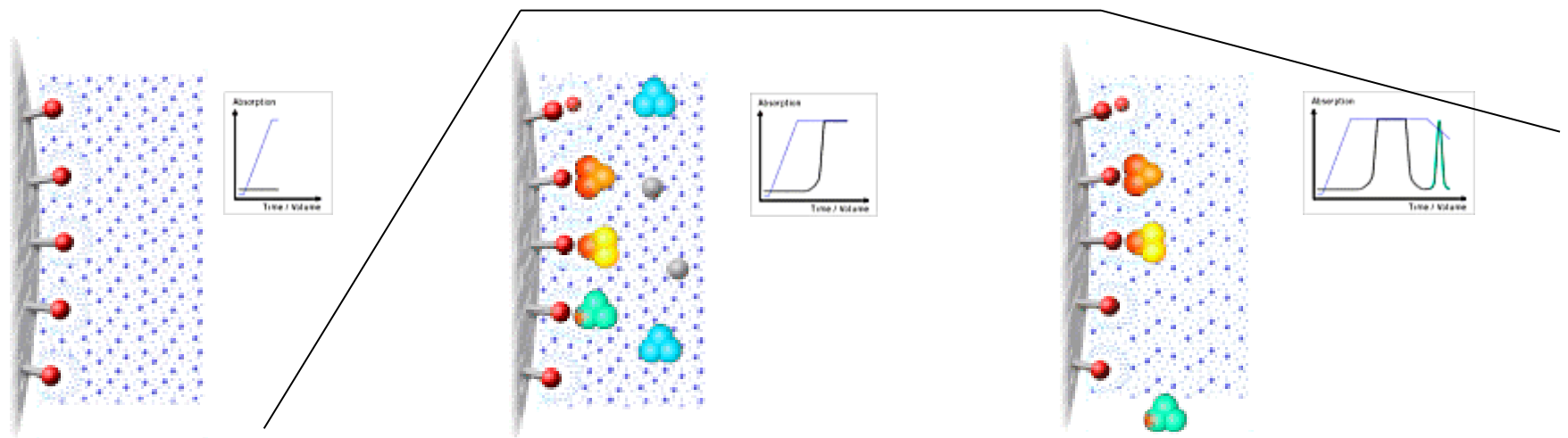
# Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)

azzal foglalkozik, hogy a megnövelje a fehérjék és a töltetek hidrofób részeinek kölcsönhatását a **sókoncentráció (ionerősség) változtatásával** (kezdeti ideigleges, részleges „kisózáson” keresztül, majd a sótartalom fokozatos csökkentésével, negatív sógradiens szerint!

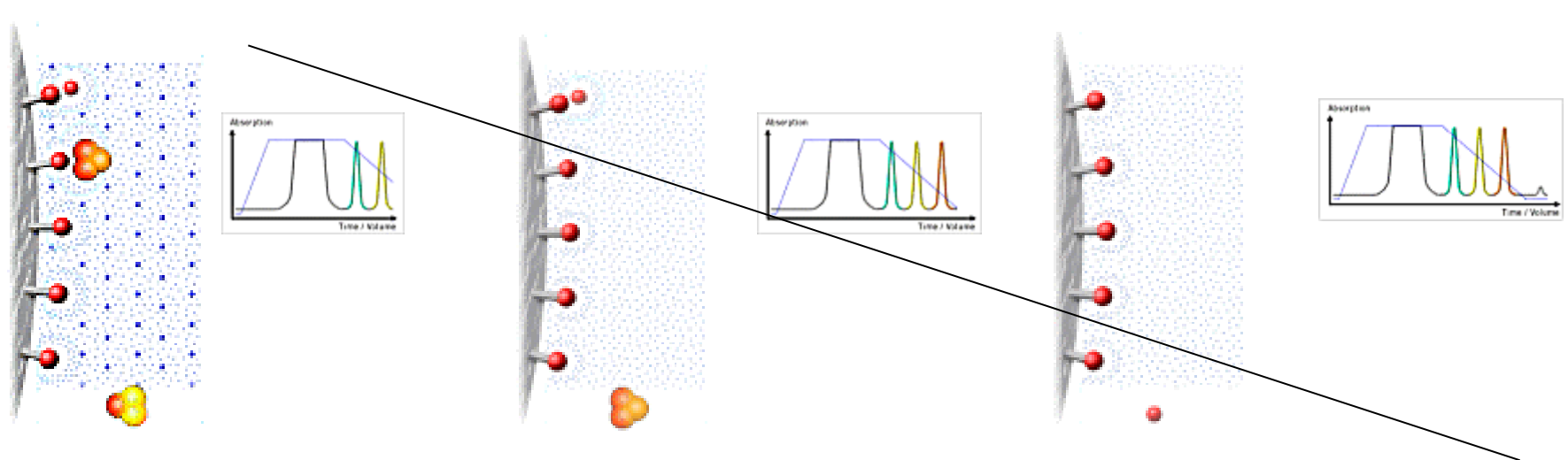


$C_{\text{só}}$ 

## 0.) Tömény, nagy sókoncentrációjú eluens

 $C_{\text{só}}$ 

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

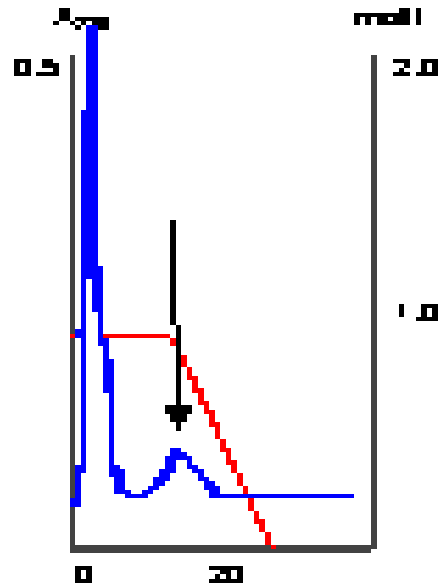


2.) Csökkenő sókoncentrációjú (negatív gradiensű) eluensáramban differenciált fehérje-lemosódás (kevésbé hidrofóbok, majd a jobban hidrofóbok)

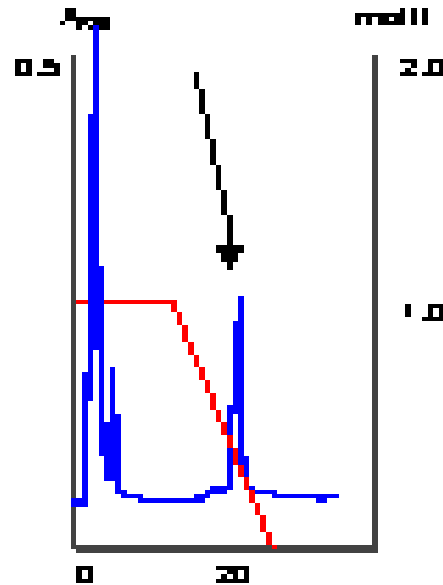
0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

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

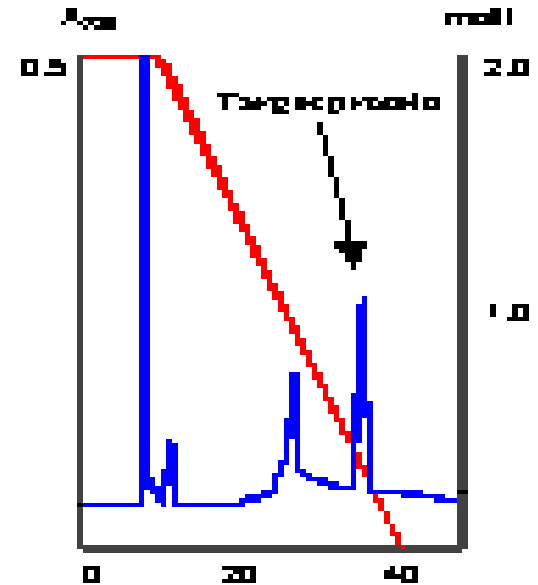
2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



$C_{\text{só}}^0$  - 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 fehérje teljes mértékű megkötéséhez. (nyíllal jelzett)

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.

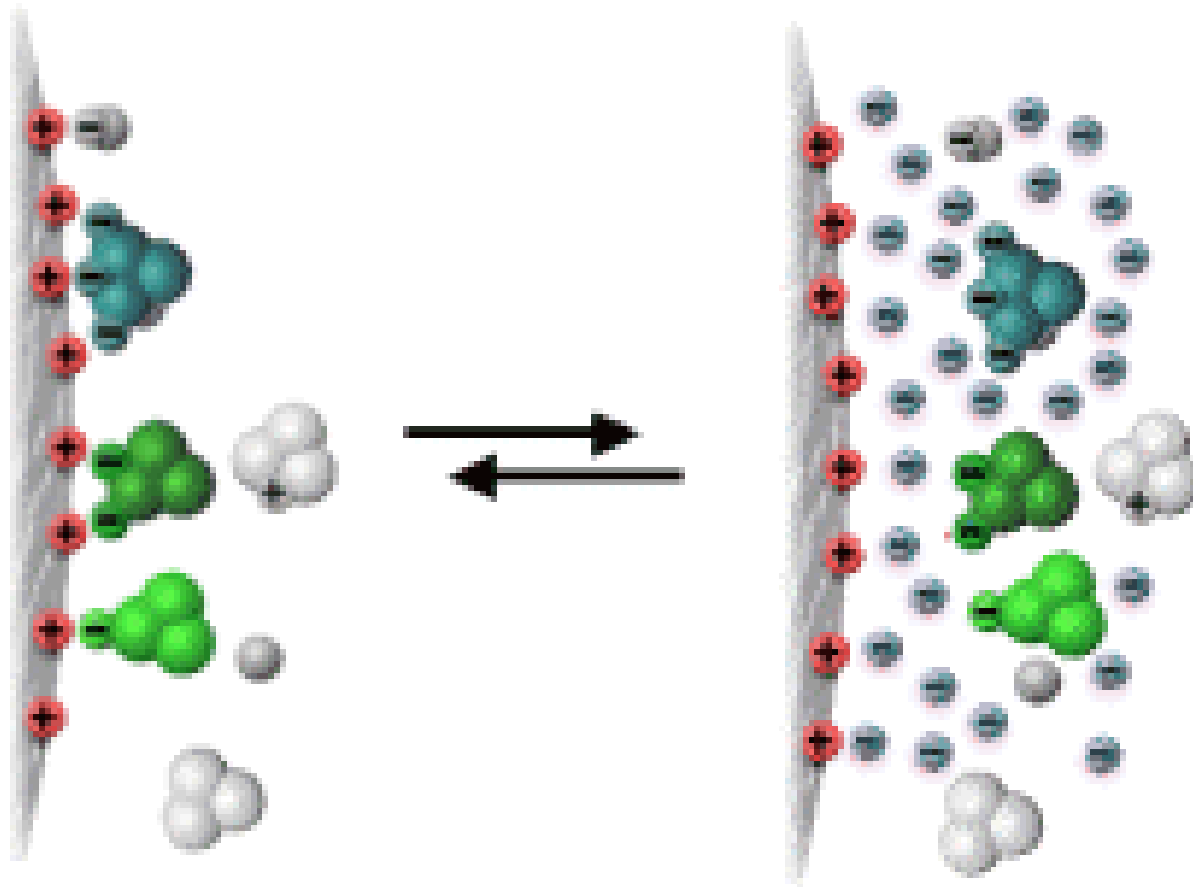
## Egy céges „oszloptöltet” ismertető:

... 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.

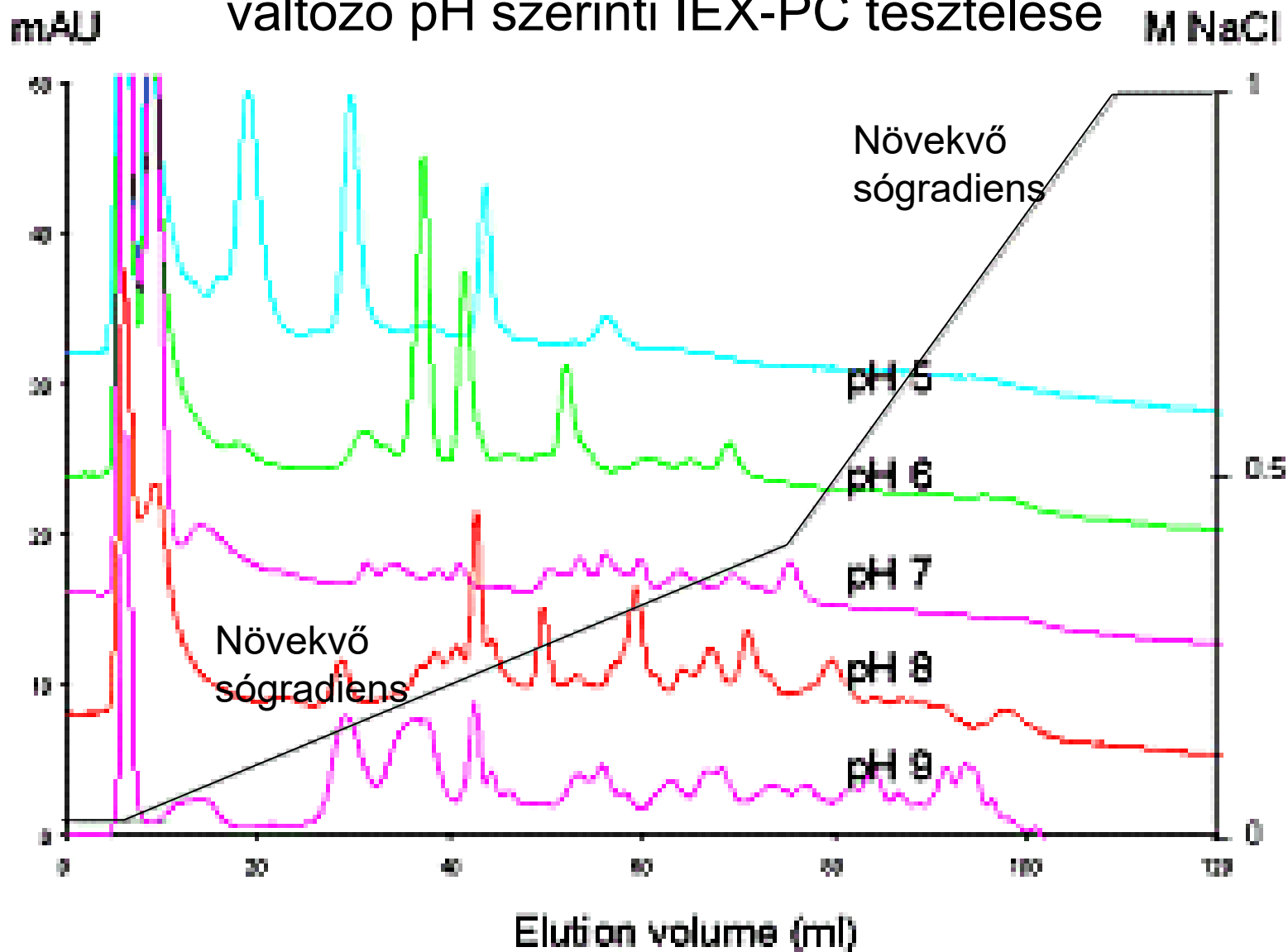
Minél nagyobb a fehérje/peptid eredő töltése, annál erősebben fog abszorbeálódni, és annál magasabb sókoncentráció szükséges a minta deszorbeáltatására.

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:

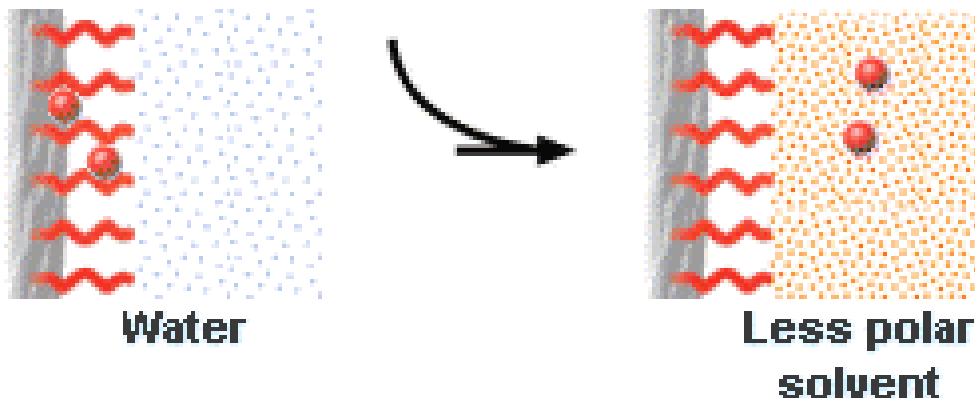
... packing materials are based **on rigid, hydrophilic, polymethacrylate particles with large 1000 Å pores.** The naturally hydrophilic polymer reduces non-specific adsorption, resulting in quantitative recovery of protein mass and bioactivity. These packings are compatible with buffers in the pH range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



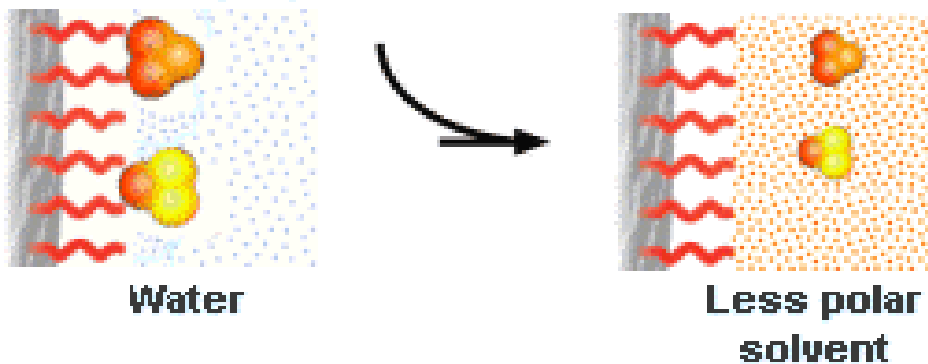
# RP-HPLC (fordított fázisú-HPLC) **szerves-gradiens elúcióval** (csökkenő polaritással, oldószererősség-változtatással)

Decrease polar  
properties of eluent

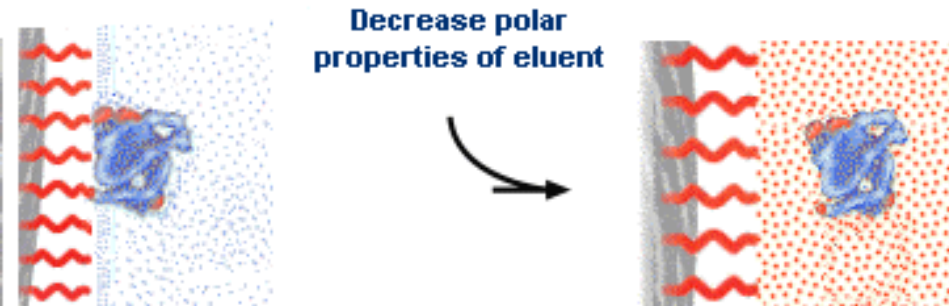


A kisebb szerves molekulák általában bekötődnek pl. a C<sub>18</sub>-módosított szilikagél-állófázis szénláncai közé.

Decrease polar  
properties of eluent

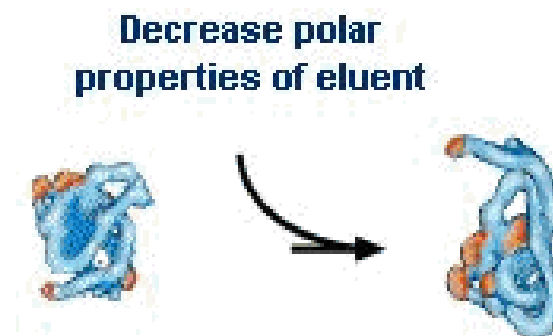


Ezzel ellentétben a peptidek és fehérjék többpontos kötődéssel is adszorbeálódhatnak az állófázison



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 erőkn. A fordított fázisú gradiens elució elegyeket így a hidrofób kölcsönhatások gyengítésére tervezik, tehát a potenciális denaturálószeretek közül kerülnek ki.

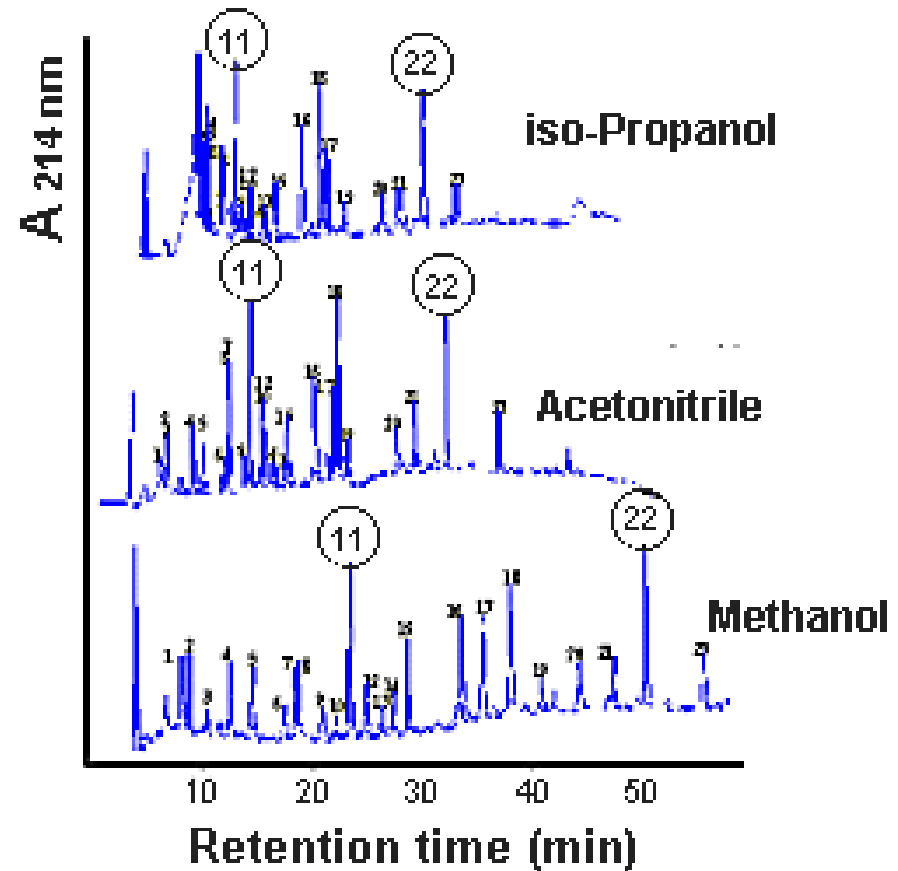


**Ezért a fehérjék RP-kromatográfiája egy precíz egyensúlyozást kíván a deszorpció és a denaturálás között, ami külön odafigyelést igényel az egyensúly beállításához, nehogy a fehérjék irreverzibilisen megváltozzanak.** ((Oligo)Peptideknél, amelyekben általában nincsenek hidrofób kölcsönhatások, így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

# RP-HPLC gyakorlati vonatkozásai a peptidek és fehérjék esetén

Peptidek és fehérjék esetén **gradienselúció** 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).



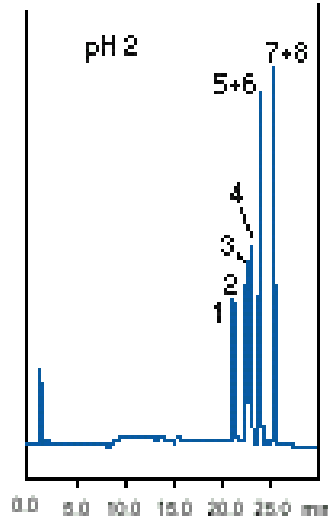
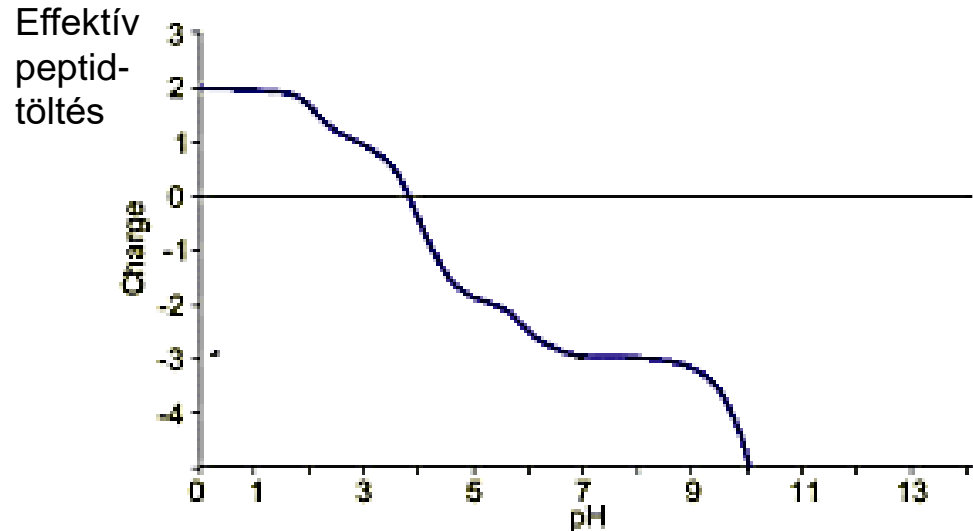
Ref. Aguilar, M-I. and Hearn, M. Meth. Enzymol. vol.270;3-26; 1995

Az **acetonitril** alkalmazása itt is 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

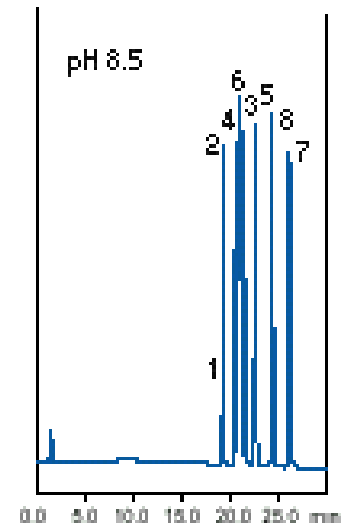
A fehérjék és peptidok eredő töltése természetesen megváltozik az oldat pH-jával, ami persze erősen befolyásolja a hidrofóbicitás jellegét és ezzel a a kromatográfiás viselkedést a RP-HPLC alkalmazásakor.

Mivel **az oligopeptidok** hidrofóbicitását is 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.

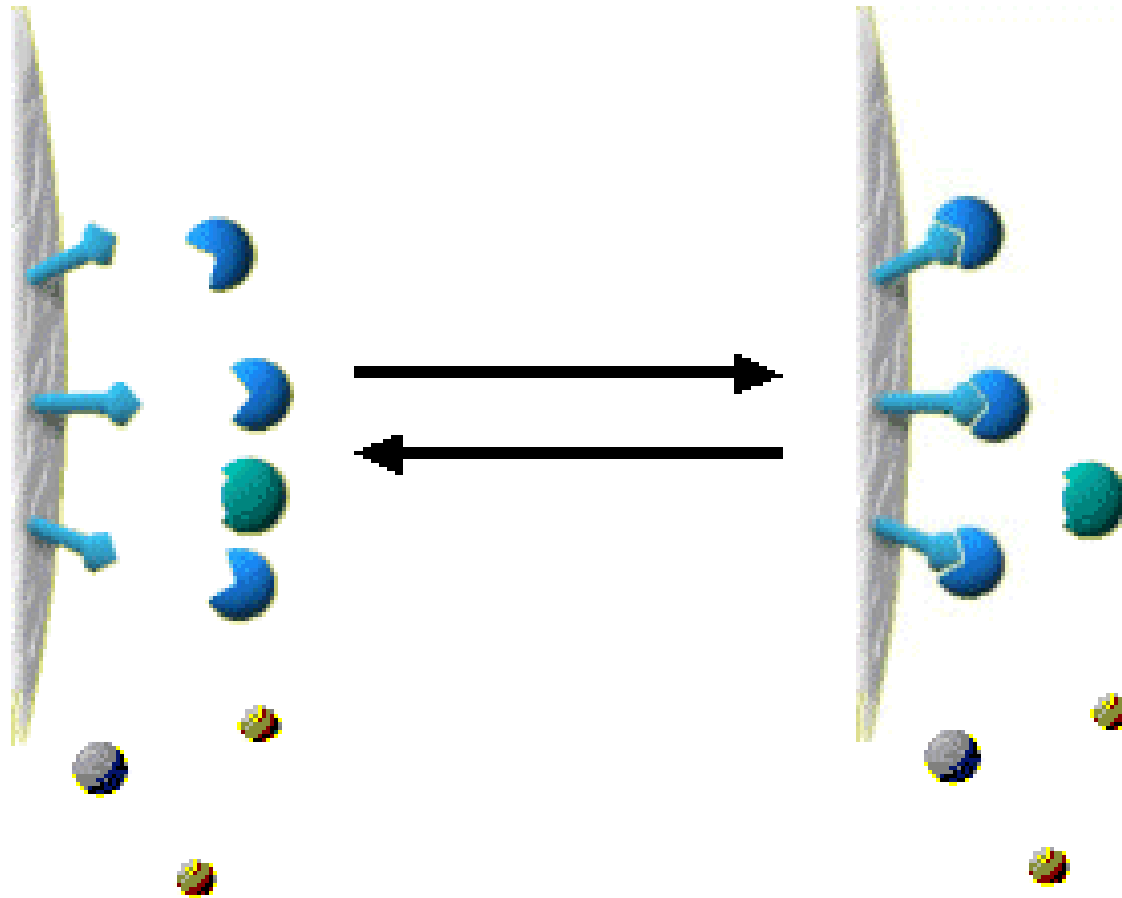


## Sephasil C18 peptide

- 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



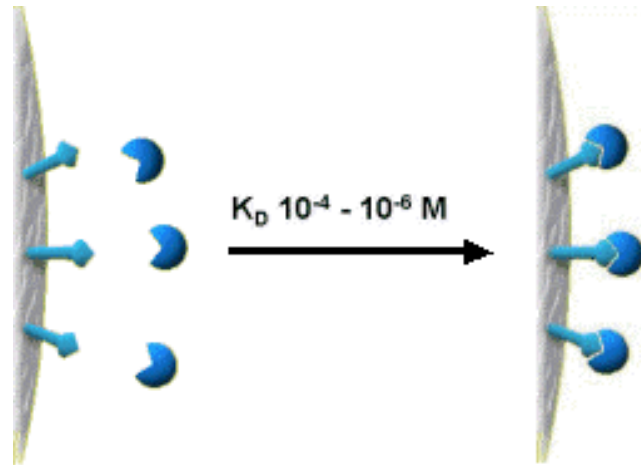
Az affinitás kromatográfia erősen specifikus, de ennek ellenére reverzibilis kötődést mutató kölcsönhatásokon alapszik. Specifikus elválasztásra, preparatív célra, tisztításra alkalmazható módszer.

## 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 hordozómátrixhoz immobilizált ligandumokról.

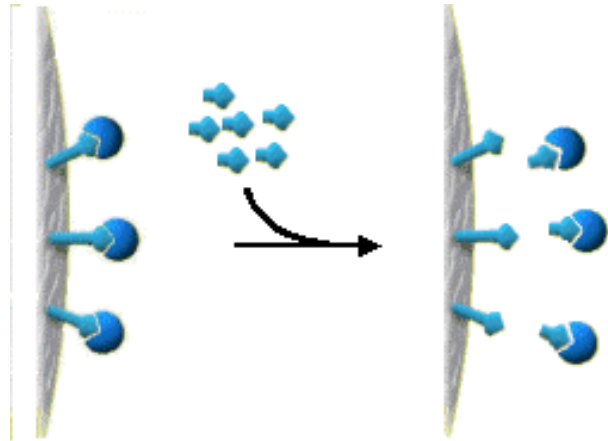
Group-specific ligand	Specificity
Protein A	Fc region of IgG
Protein G	Fc region of IgG
Concanavalin A	Glucopyranosyl and Mannopyranosyl groups
Cibacron Blue	Broad range of enzymes, serum albumin
Procion Red	NADP+ dependent enzymes
Lysine	Plasminogen, ribosomal RNA
Arginine	Serine proteases
Benzamidine	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.

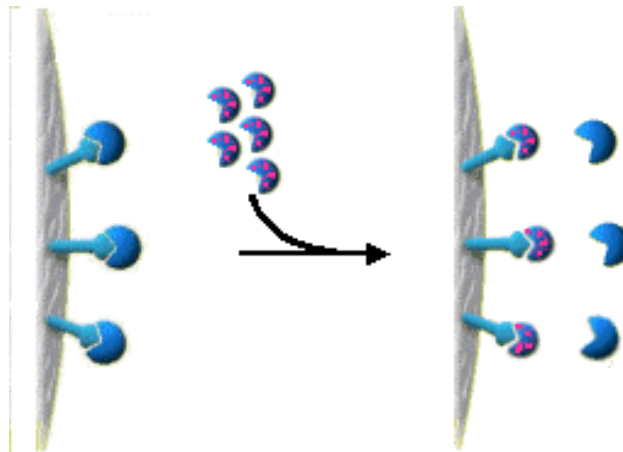


Az eluáló/kiszorítószere vonatkozóan a komplexstabilitási állandó értékek ennél vagy kissé nagyobb vagy csak kicsit kisebb tartományba kell, hogy legalább essenek, utóbbi esetben viszont nagy koncentrációban kell alkalmazni őket a lemosáshoz)

## Elúciós lehetőségek



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

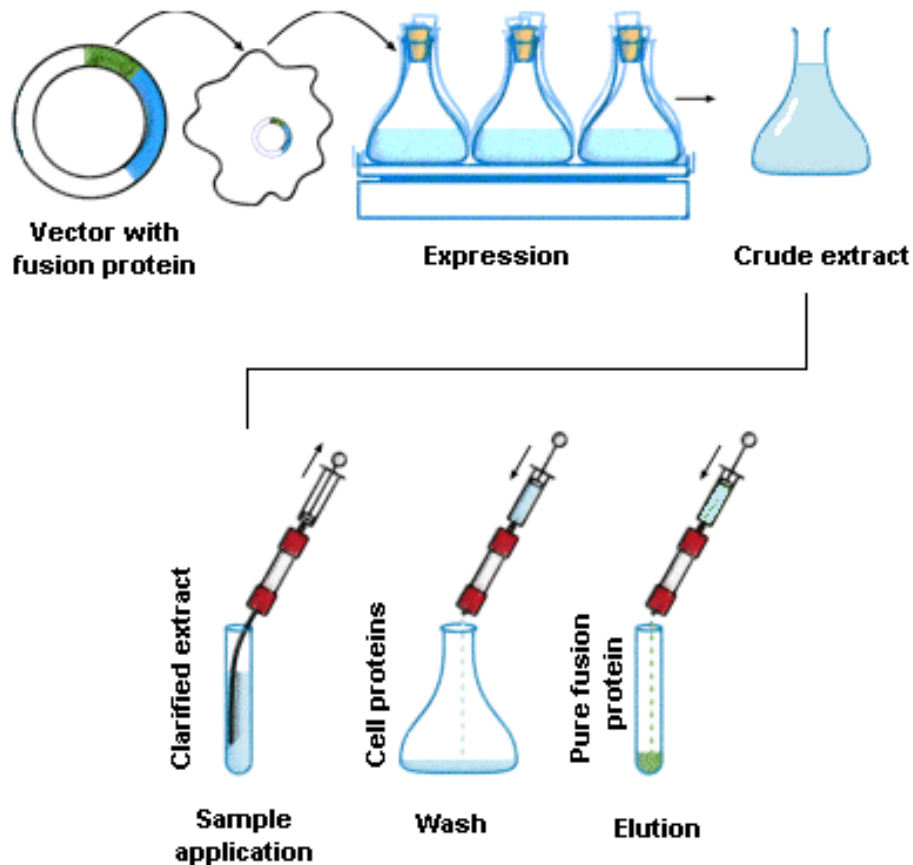


Elúció a célvegyület kiszorításával: **szabad célvegyület-analógot** adagolnak, amely erősebben kötődik a mátrixhoz.



# Rekombináns proteinek affín-kromatográfiája

A rekombináns fehérjéket számottevően egyszerűsített módon tisztíthatják, ha az affín-rész génjét egyesítik a rekombináns fehérje génjével. A gazdavektor (plazmid) kifejleszti a rekombináns proteint a hozzácsatolt affínrésszel együtt és affín-kromatográfiás technikát lehet alkalmazni az ún. *fúziós fehérje* izolálásához és tisztításához. Bár nem mindig szükséges, az affínrészt 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.

# 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

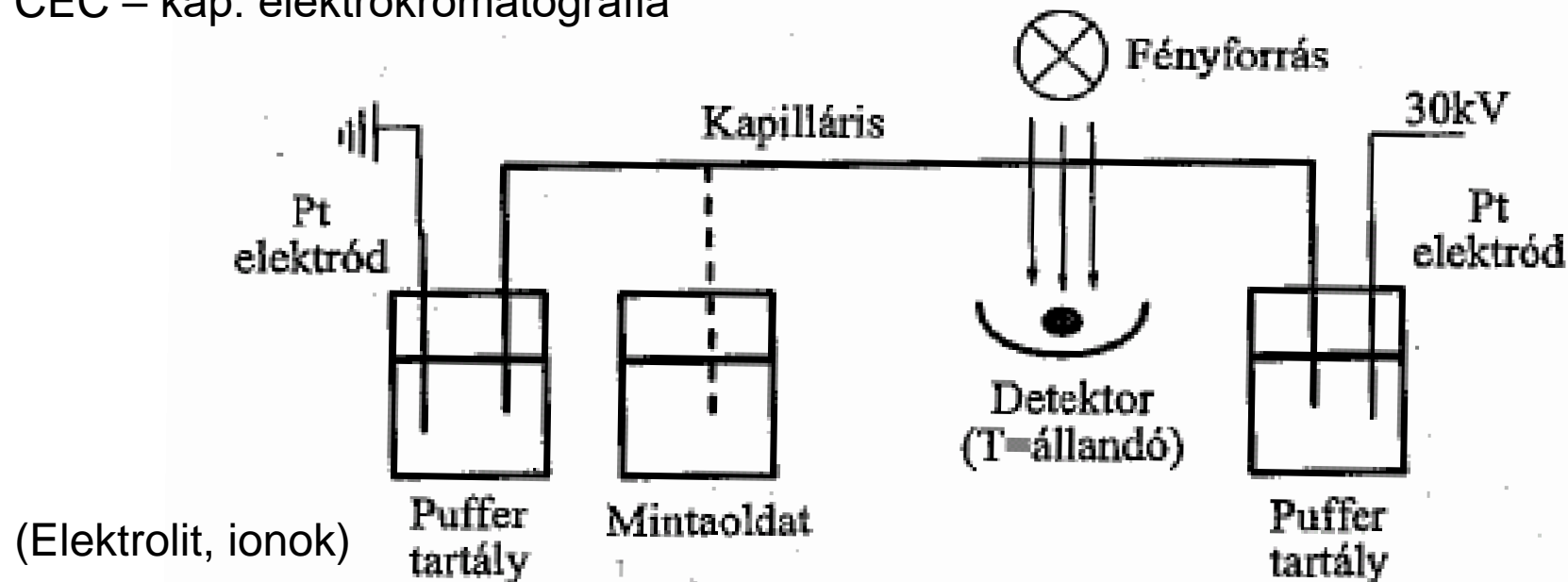
CITP – kap. izotachoforézis

MECC – micelláris elektrokinetikus krom. (SDS);

CGE – kap. gélelektroforézis

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

CEC – kap. elektrokratográfia

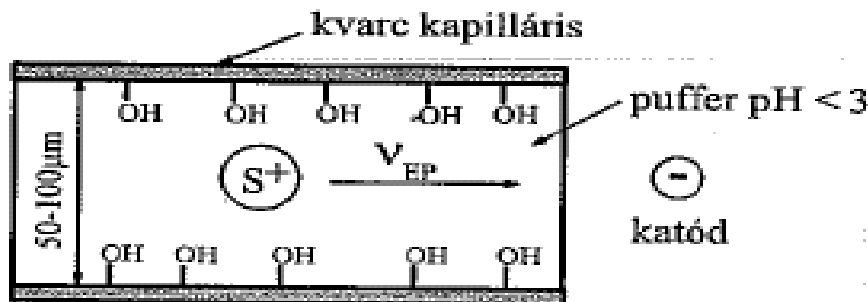


18.8. ábra A kapilláris elektroforézis készülék elemei

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

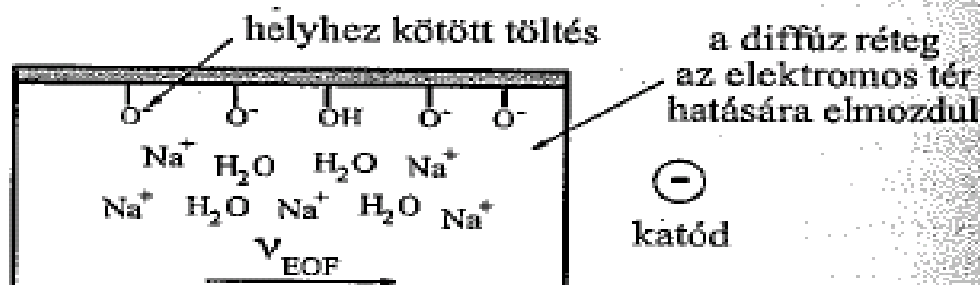
A.: pH < 3, nincs EOF

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



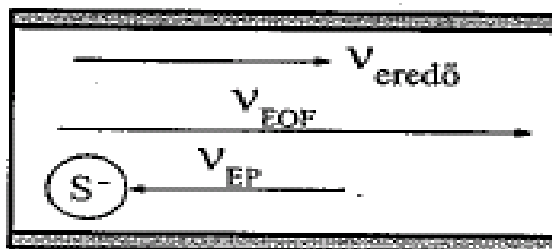
B.: EOF létrejötte

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



C.: negatív töltéssel rendelkező anyag átlagos vándorlási sebességének bemutatása

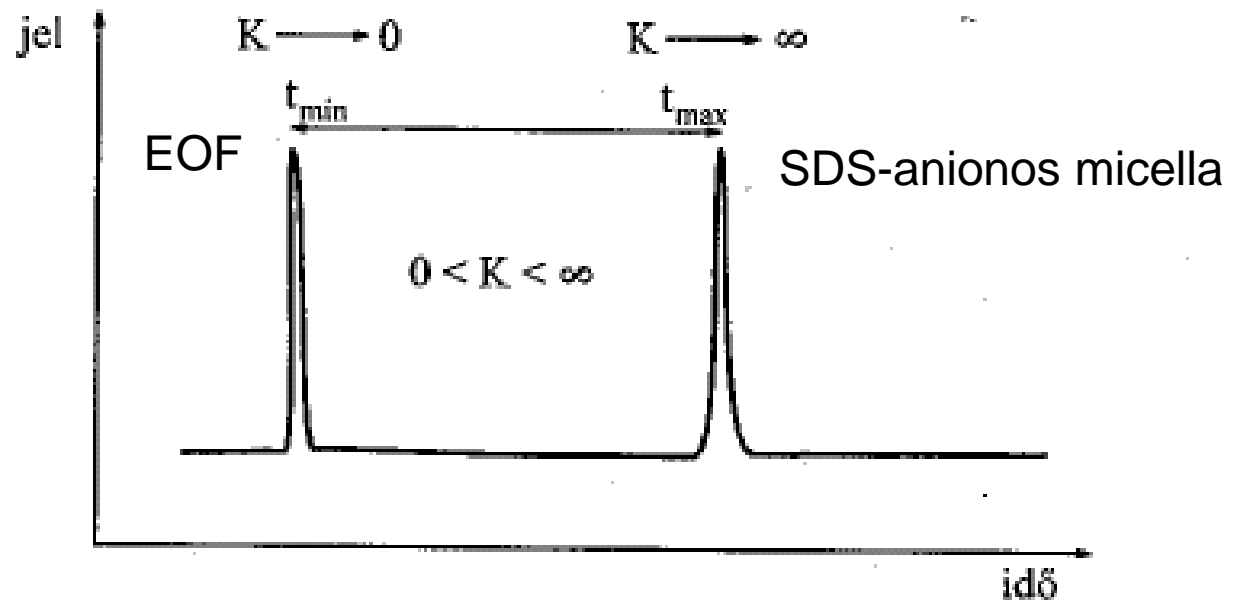
Eredő hatás (sebességre): Ad absurdum, még az anionok is a katód felé vándorolhatnak!



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

## EOF elektrooszmózisos áramlás hatása

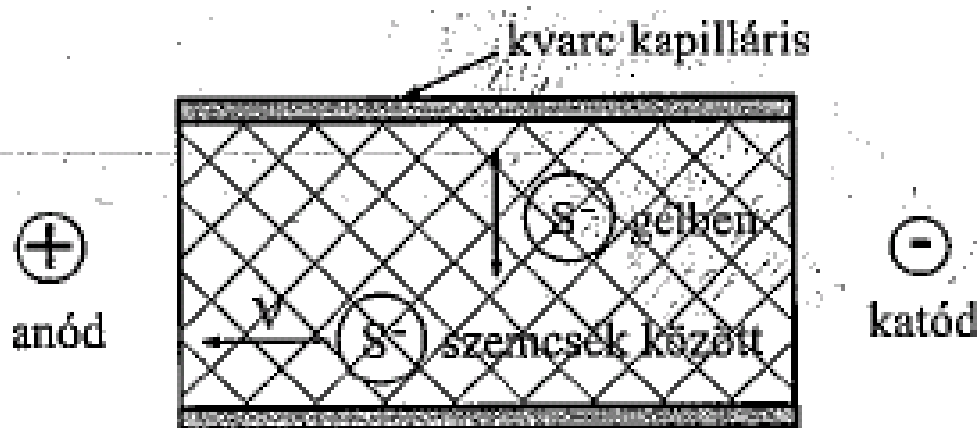
- **Semleges** részecskék is vándorolnak vele! ( $v = \text{közös} = v_{\text{EOF}}$ )
- Nátrium-dodecilszulfát (SDS) micellákat is adagolva, melyhez a semleges hidrofób anyagok molekulái eltérő mértékben társulhatnak, visszatartódhatnak, esetleges szétválások léphetnek fel:



**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

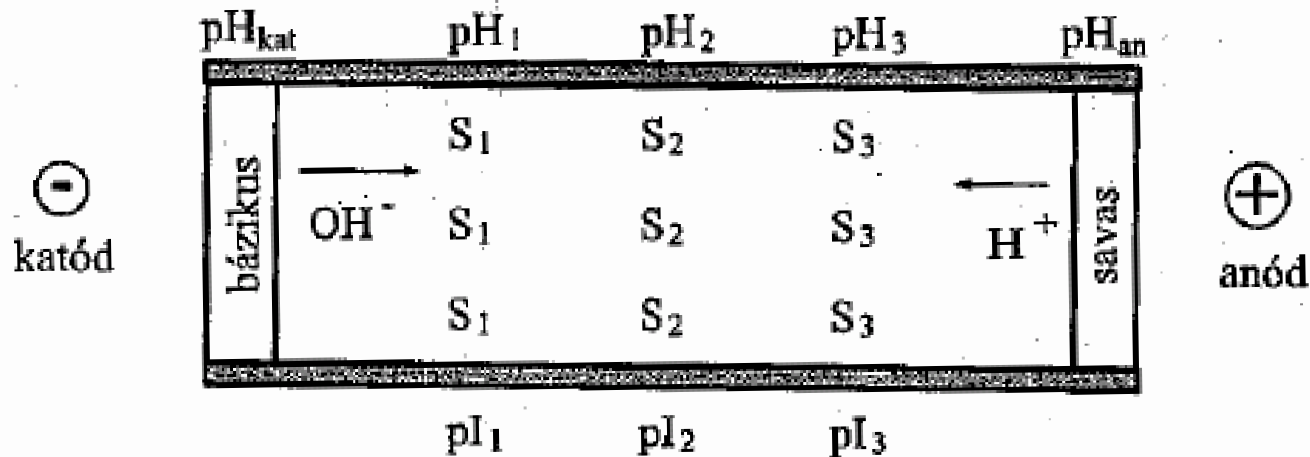
- Poliakrilamid-gél (PAAG, puffer helyetti) használatával (→ CGE) küszöböljük ki, csak az egyedi ionmozgékonyság fog számítani (pl. nagymolekulájú anyagok pl. fehérjék esetén megnő az elválasztás szelektivitása)



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 ( $v > 0$ )

# Kapilláris 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

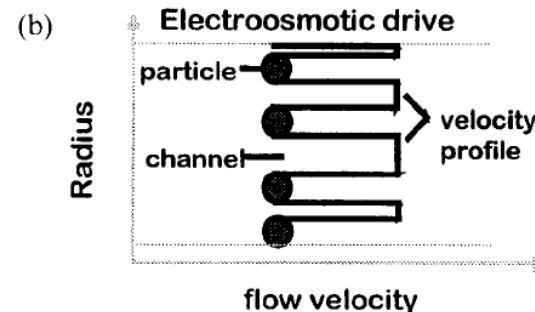
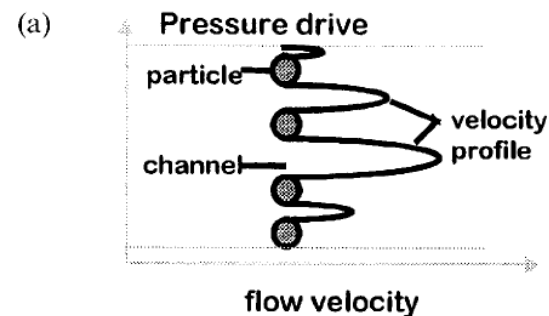
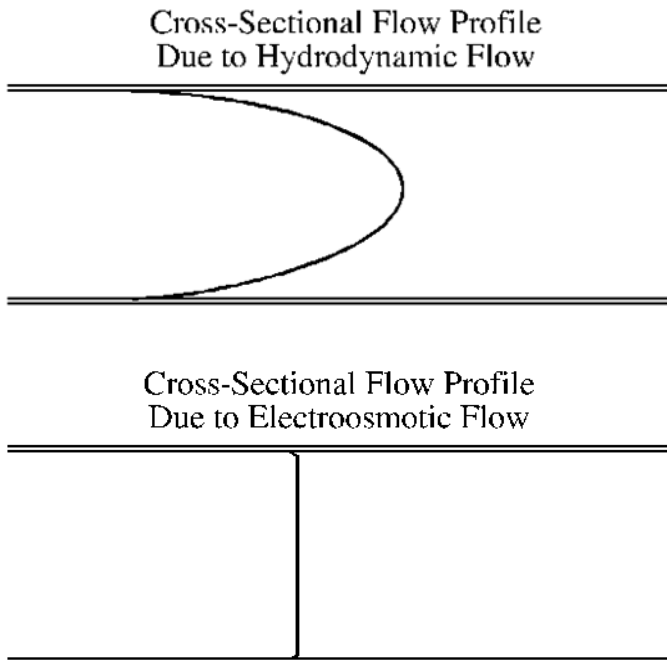


18.5. ábra A kapilláris izoelektromos fókuszálás elve. A kettősionos (zwitter-ionos) jellegű komponensek a kapillárisban addig a pontig mozognak, ahol a  $pH = pI$  értékükkel



# 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 jóval kisebb relatív 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**

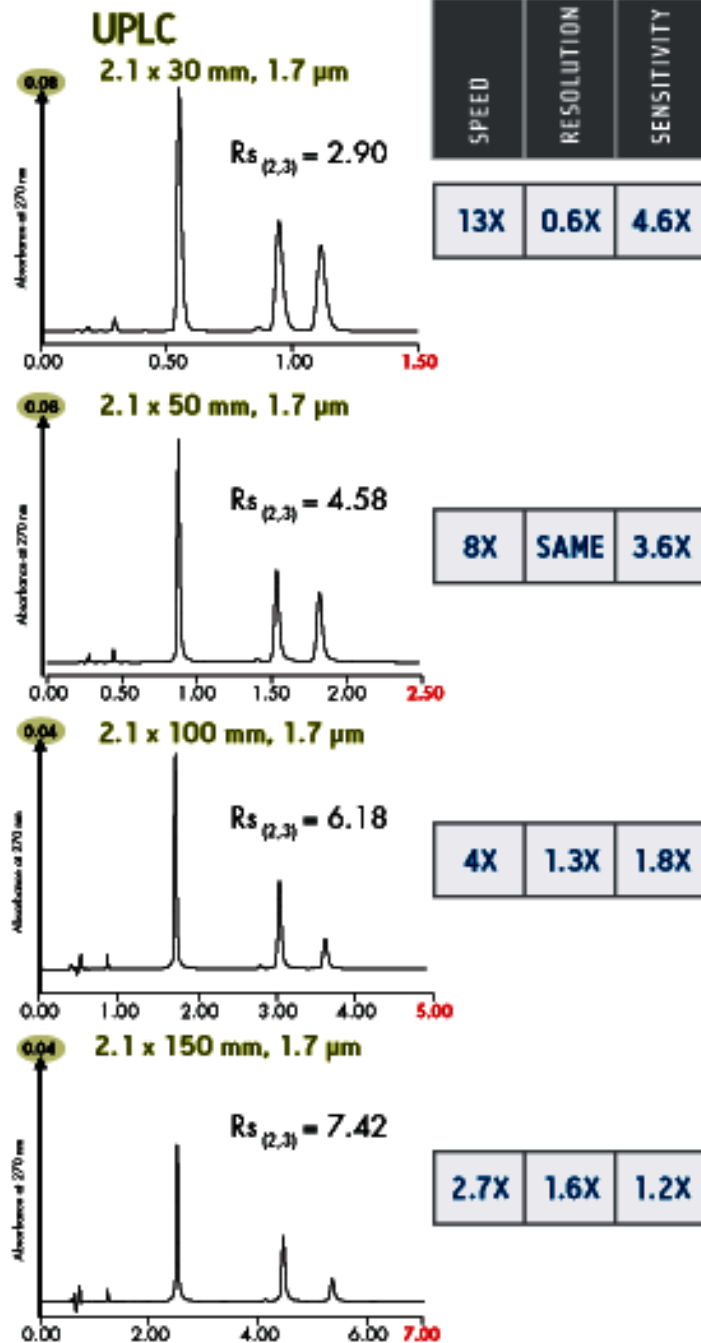
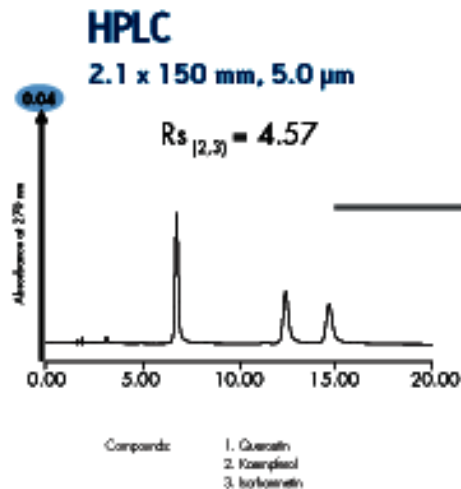
- 1) SDS-PAGE redukáló és nem redukáló:** tömeg, aggregátumok, diszulfid hidak megléte (mass heterogeneity)
- 2) RP-HPLC, natív fehérje:** fehérje eredetű bomlástermékek? Oxidáció, aggregáció, dimerek (related proteins)
- 3) RP-HPLC, emésztett fehérje:** fehérje elsődleges szerkezete (peptide mapping)
- 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

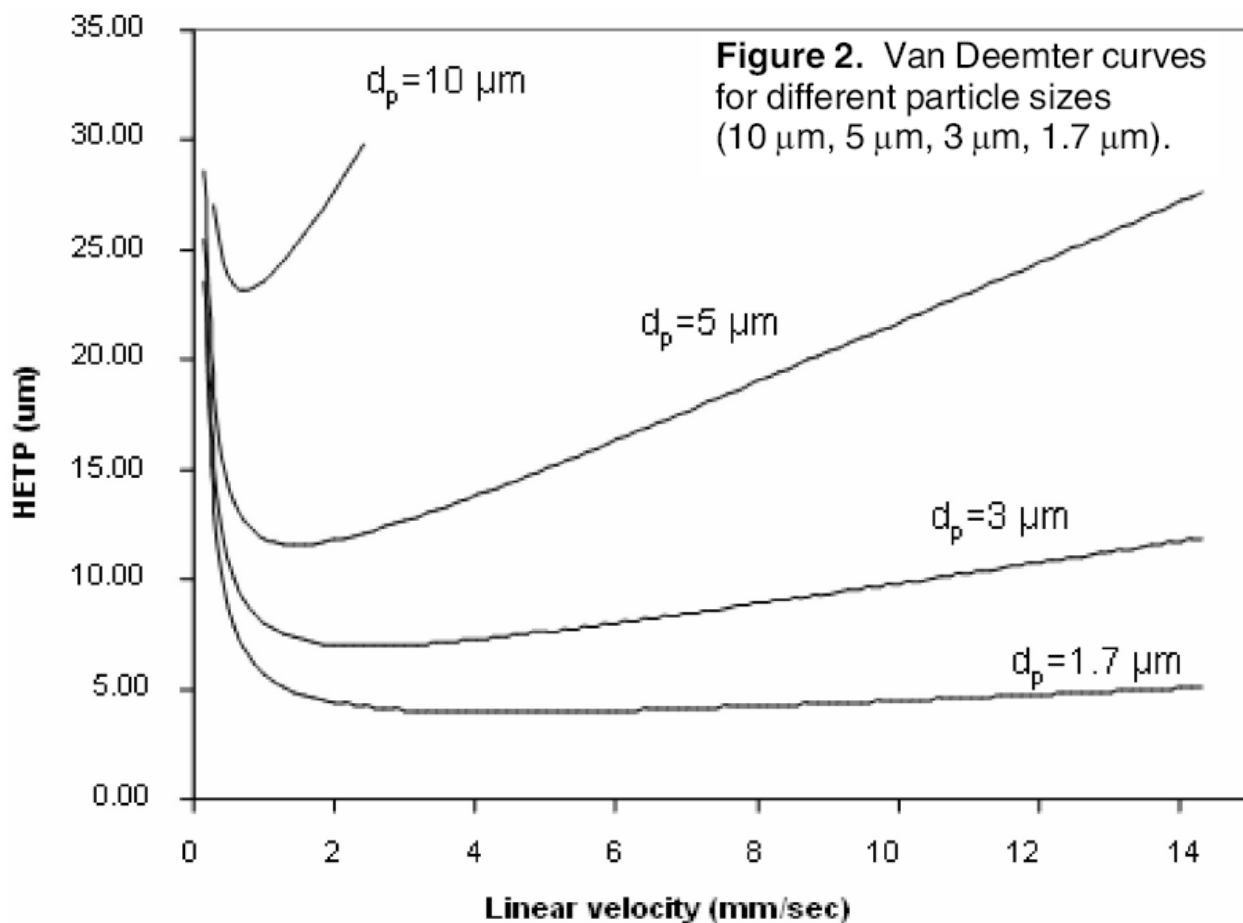
# HPLC -- UPLC összevetés

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 [ $u = 2 \text{ mm/sec}$ ]

Flow Rate [mL/min]:

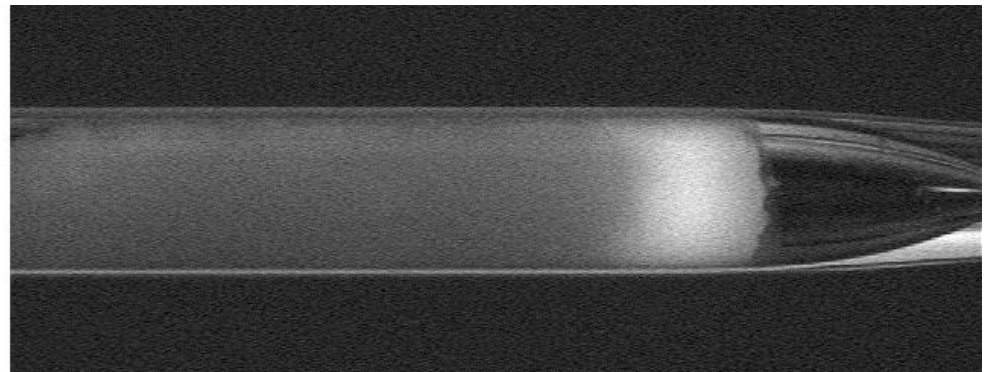
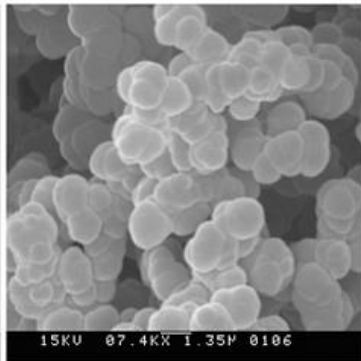
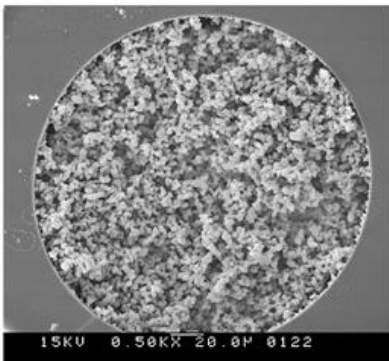
ID = 1.0 mm      0.07

ID = 2.1 mm      0.3

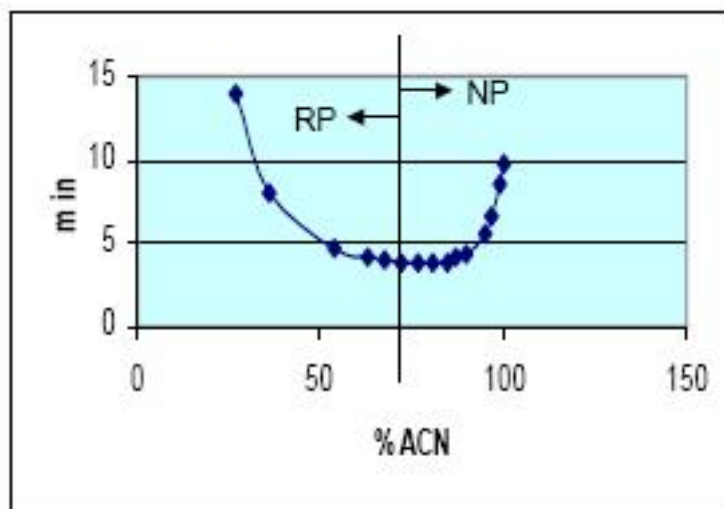
ID = 4.6 mm      1.4

## 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 nyomásvesztés)
  - jó kolonnahatékonyság (nagy fajlagos felület)
  - a rögzített ágyas álló fázis sokkal stabilabb lehet



## U-Shaped Retention



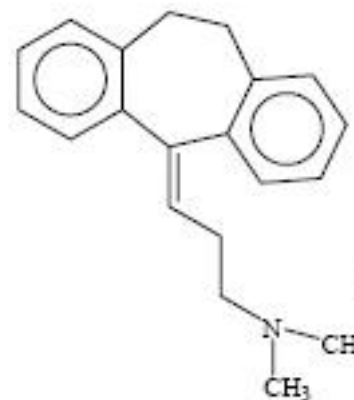
- Retention increases at high organic and high aqueous MP
- Strong solvent: Mixture of Aqueous:Organic

Discovery Cyano

Flow = 1mL/min

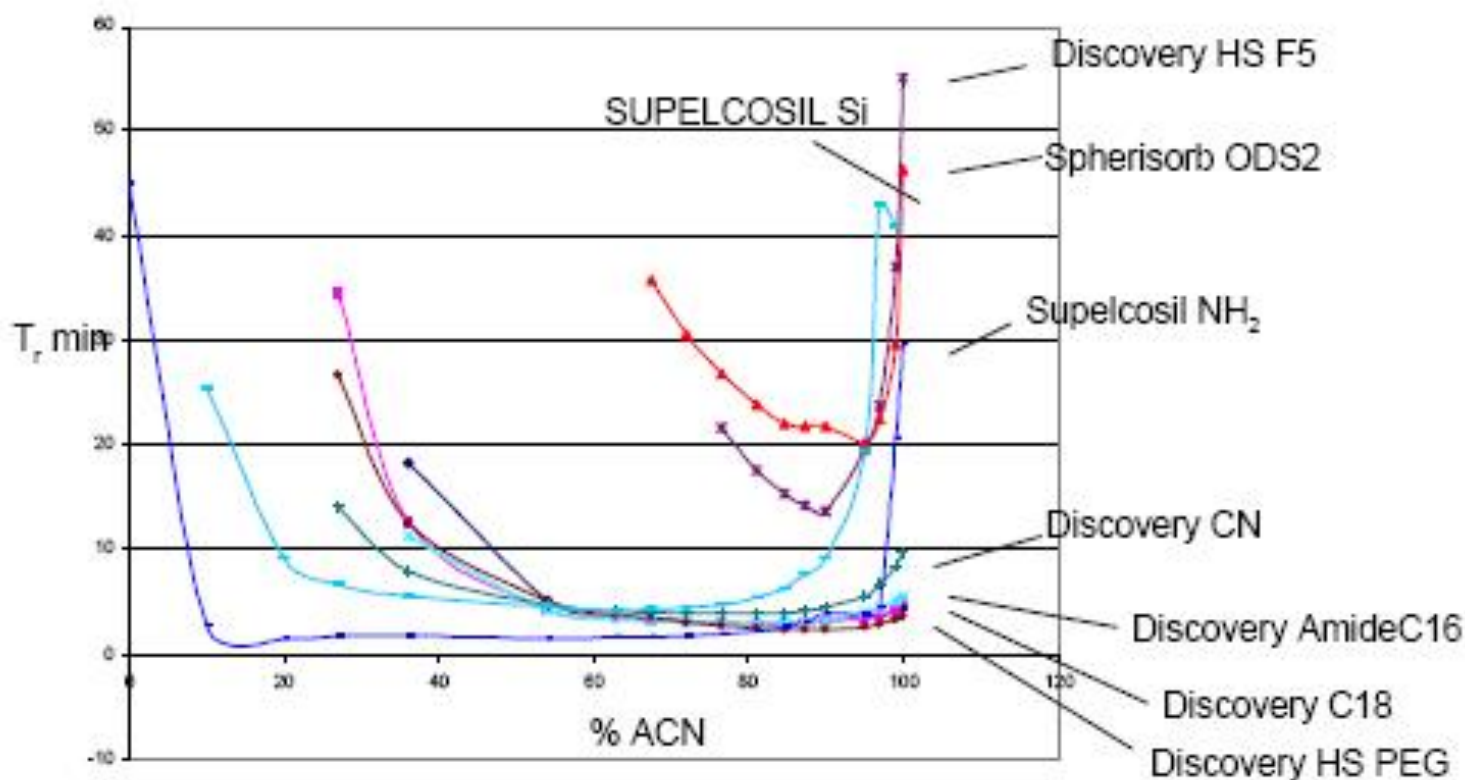
MP: A = ACN w/ 5mM Ammonium acetate

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

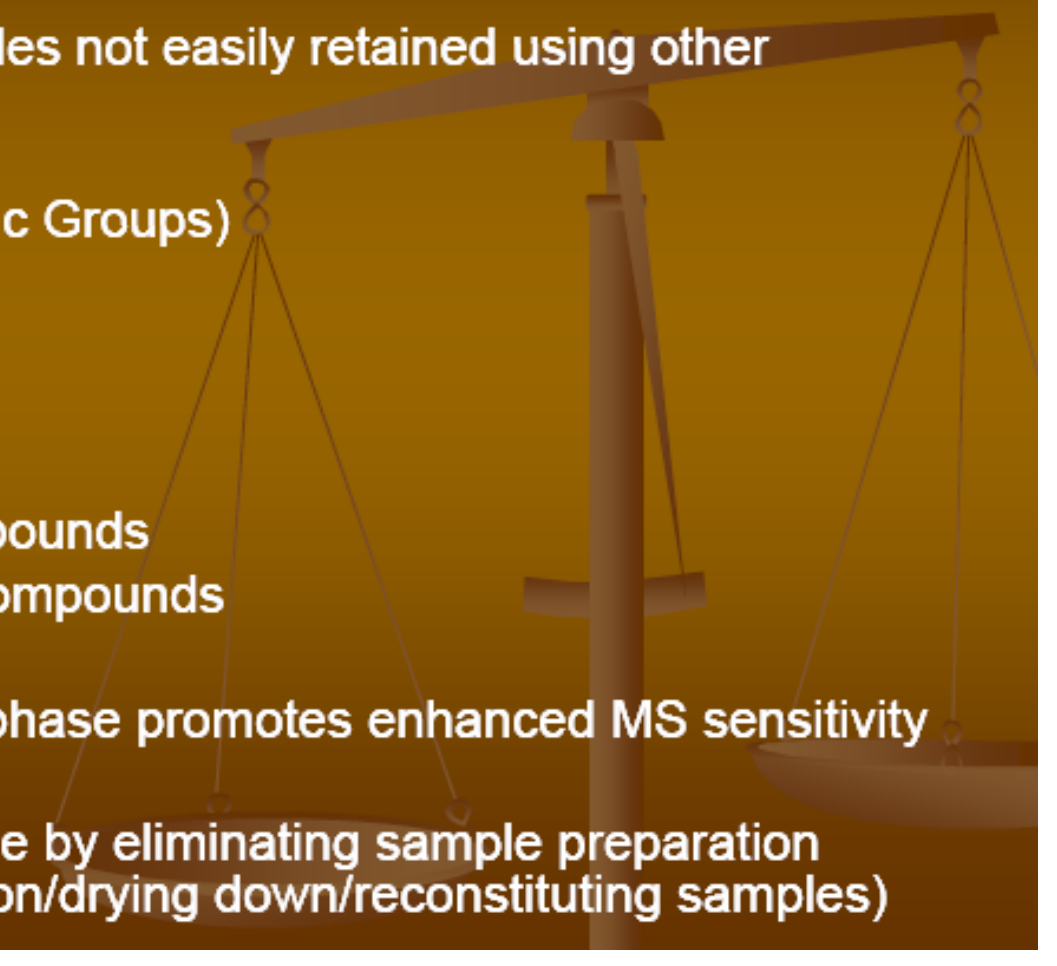


## Summary

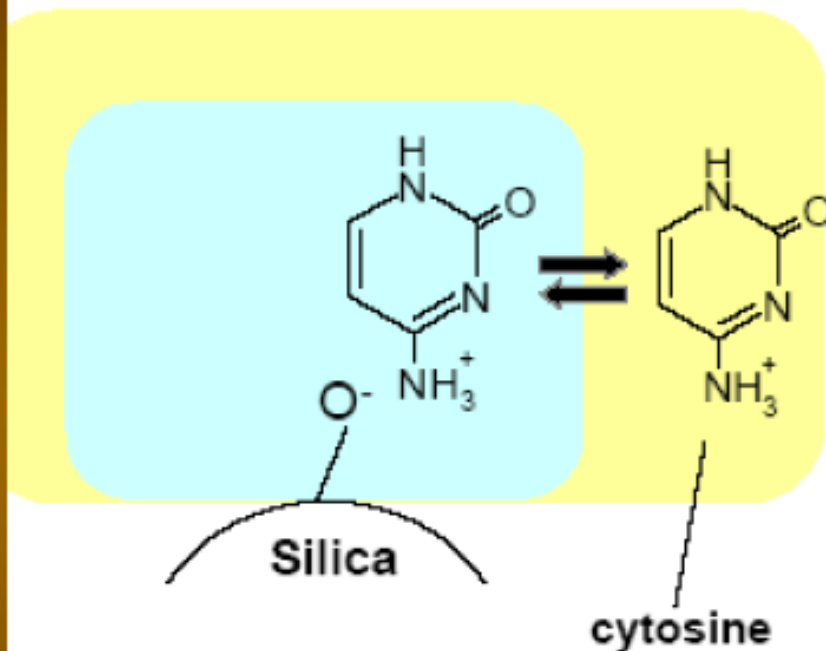
---

- 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.

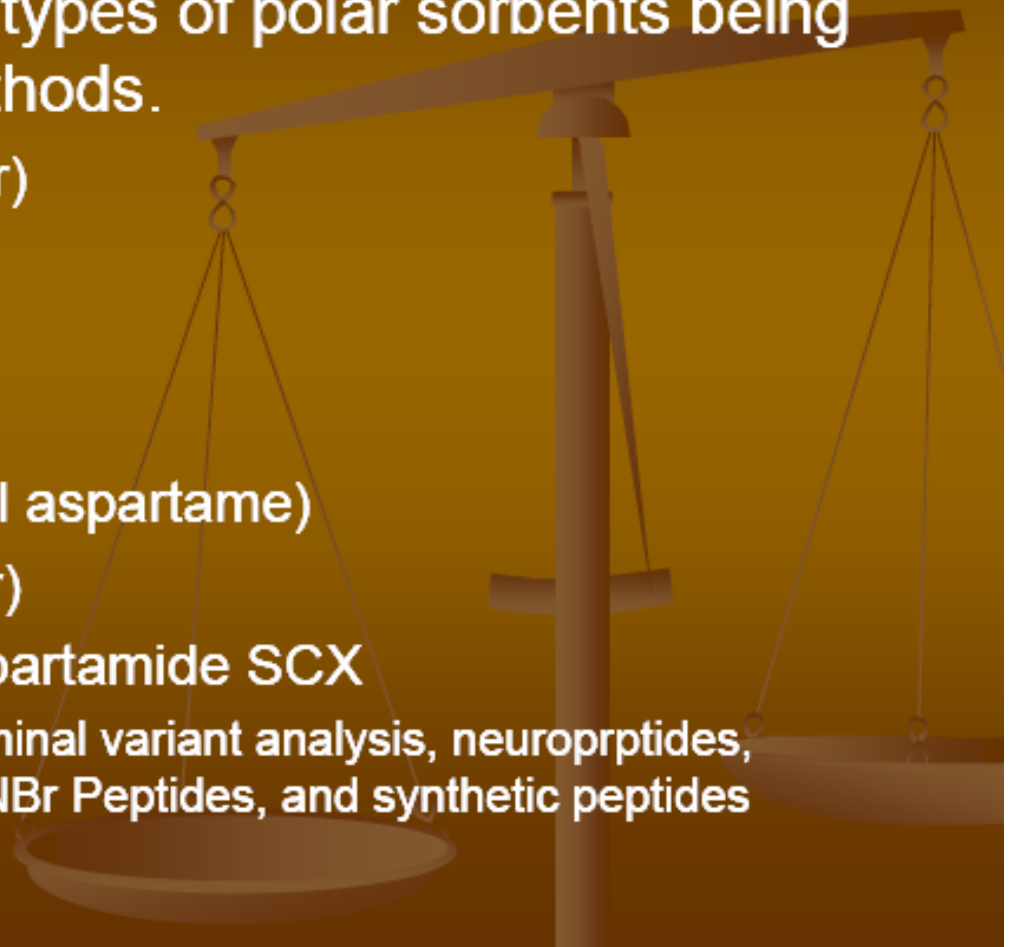
Ezt a HILIC-mechamizmus úgy írja le mint a poláris álló fázis kitűntetett hidratálódását a mozgó fázisból származó vizes komponensekkel és a mozgó fázis szükségszerű elszegényedését vízben. Így egy kétfázisú rendszer épül fel, ahol egy kvázi-immobilizált vizes réteg található a felület közelében és egy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

A poláris komponensek megoszlást mutathatnak a szervesanyagban gazdag mozgó fázis és a felületközeleli 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

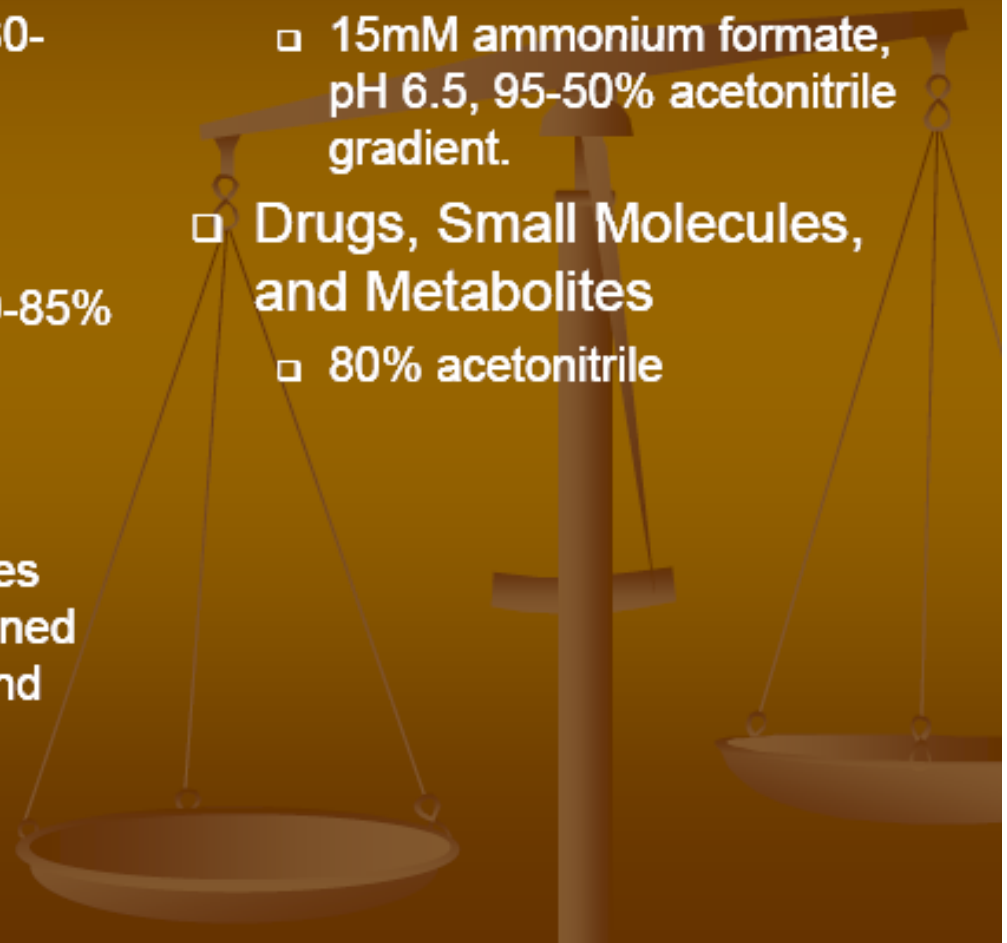
- Salt gradient in 75% acetonitrile. (Cysteines and glycines are retained more than alanines and threonines in these methods.)

- Phospholipids

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

- Drugs, Small Molecules, and Metabolites

- 80% acetonitrile



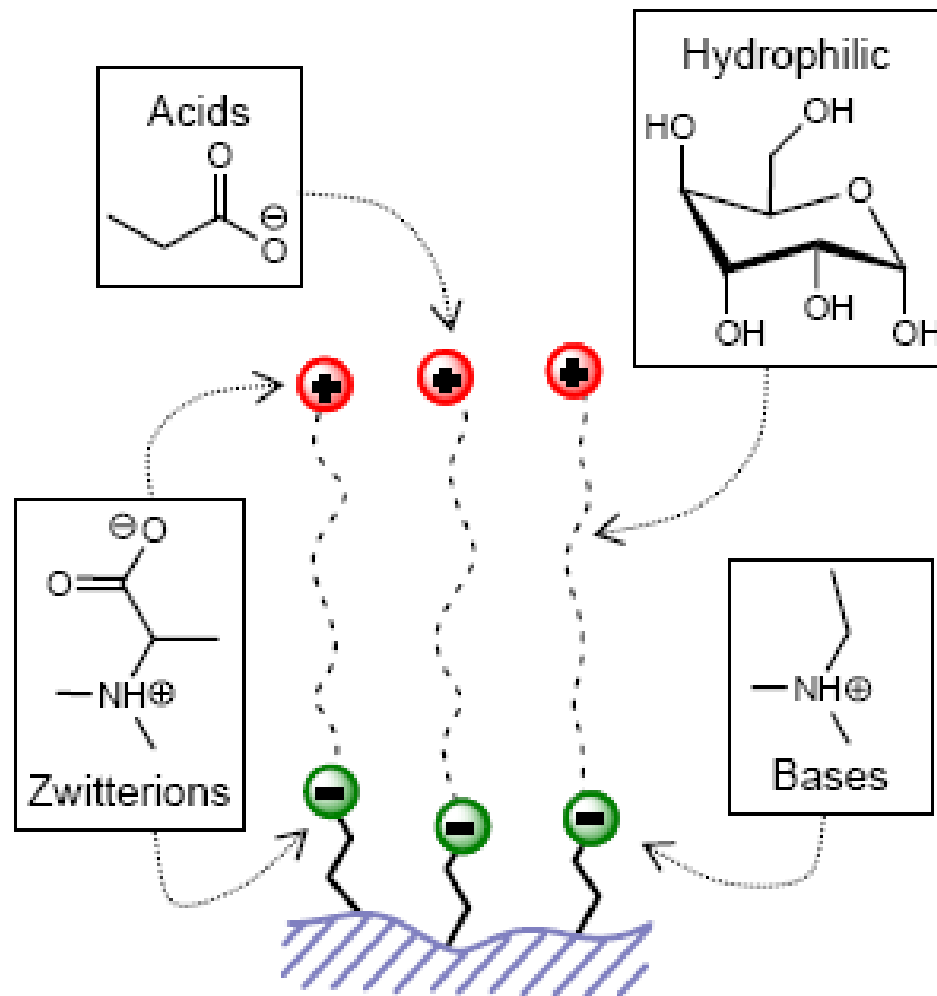
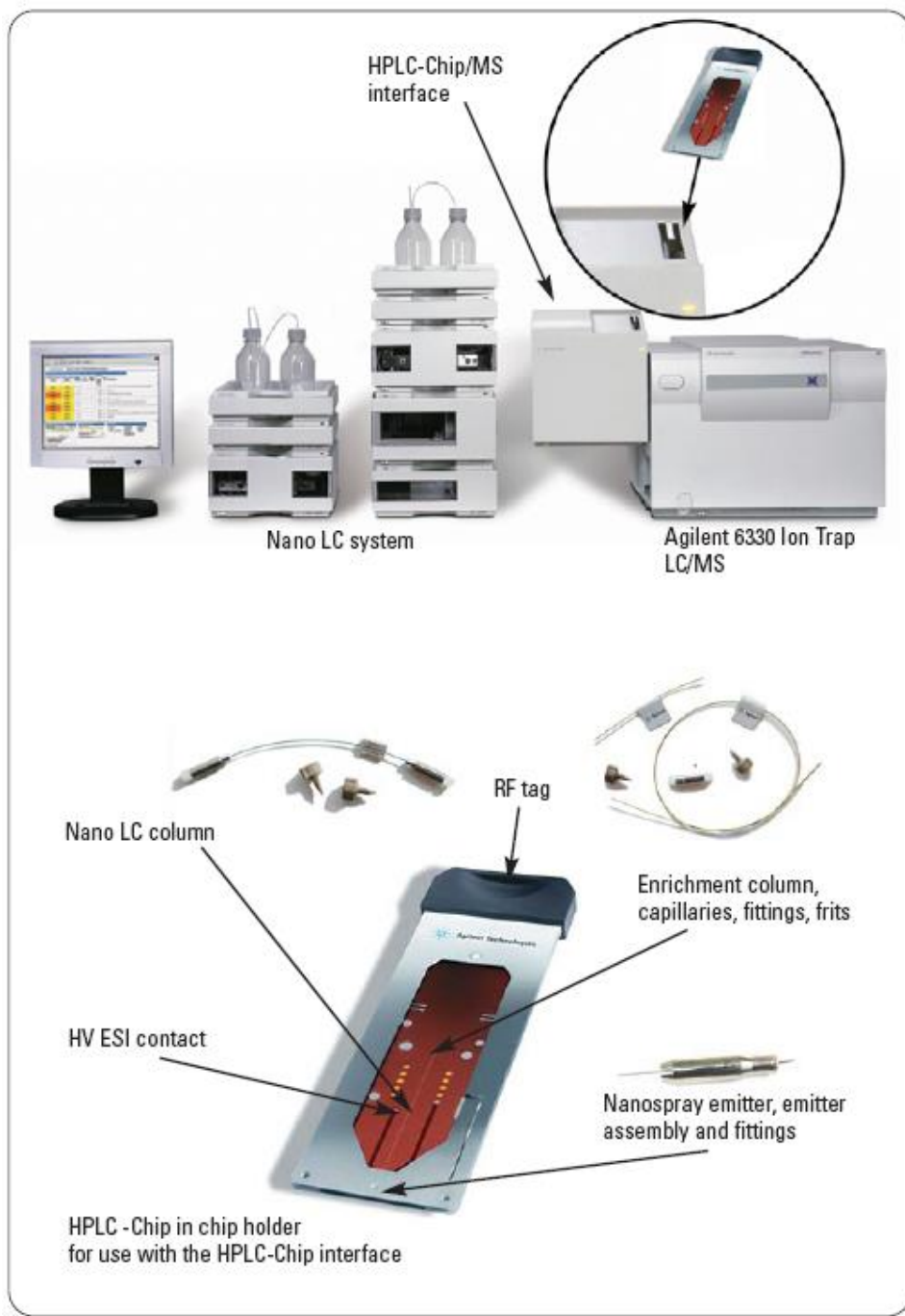


Figure 1. Different types of interactions of Obelisc N stationary phase with different analytes allow to retain many types of charged and hydrophilic compounds.



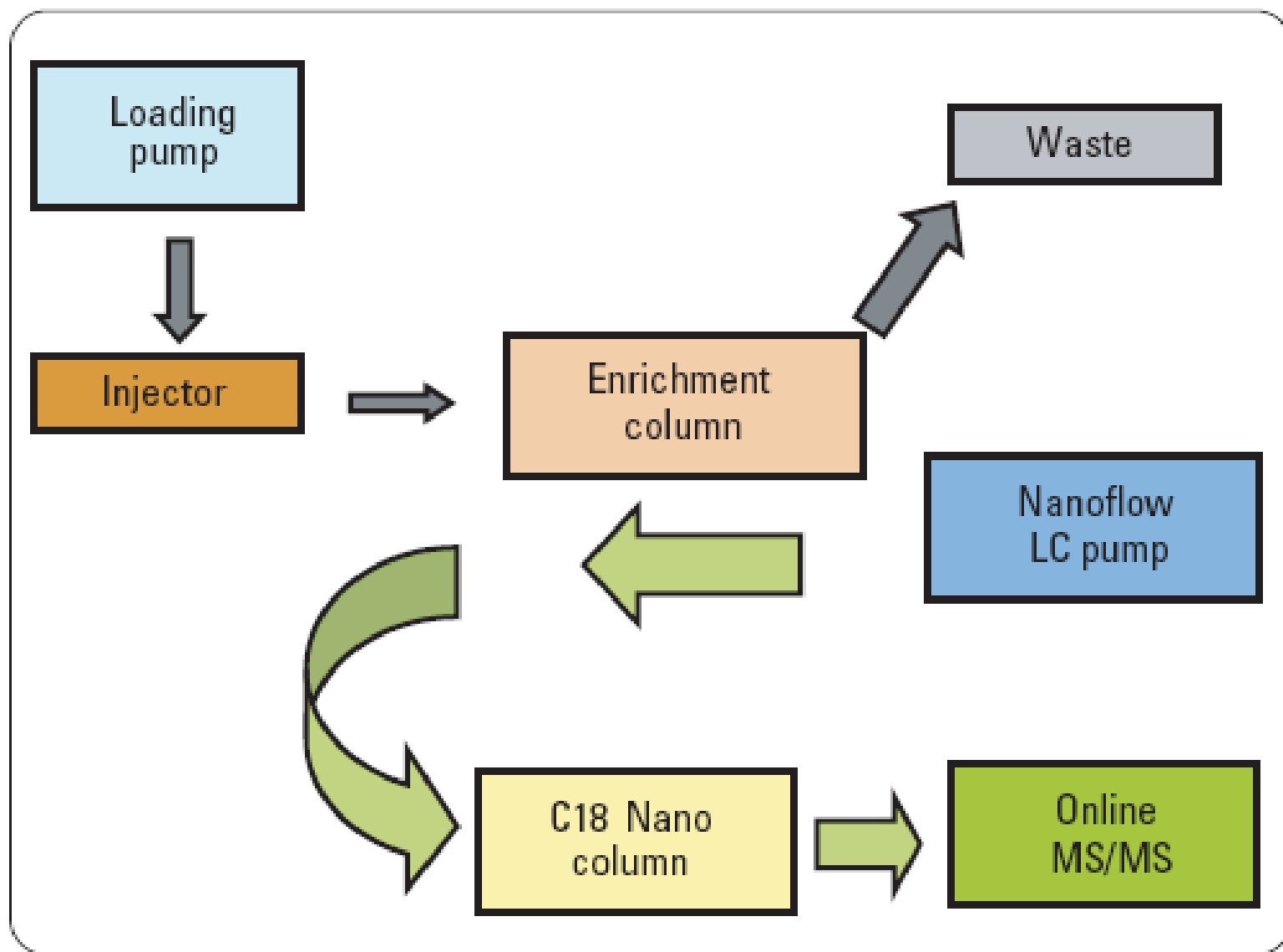
HPLC egy chip-en  
(HPLC-on-a-chip)



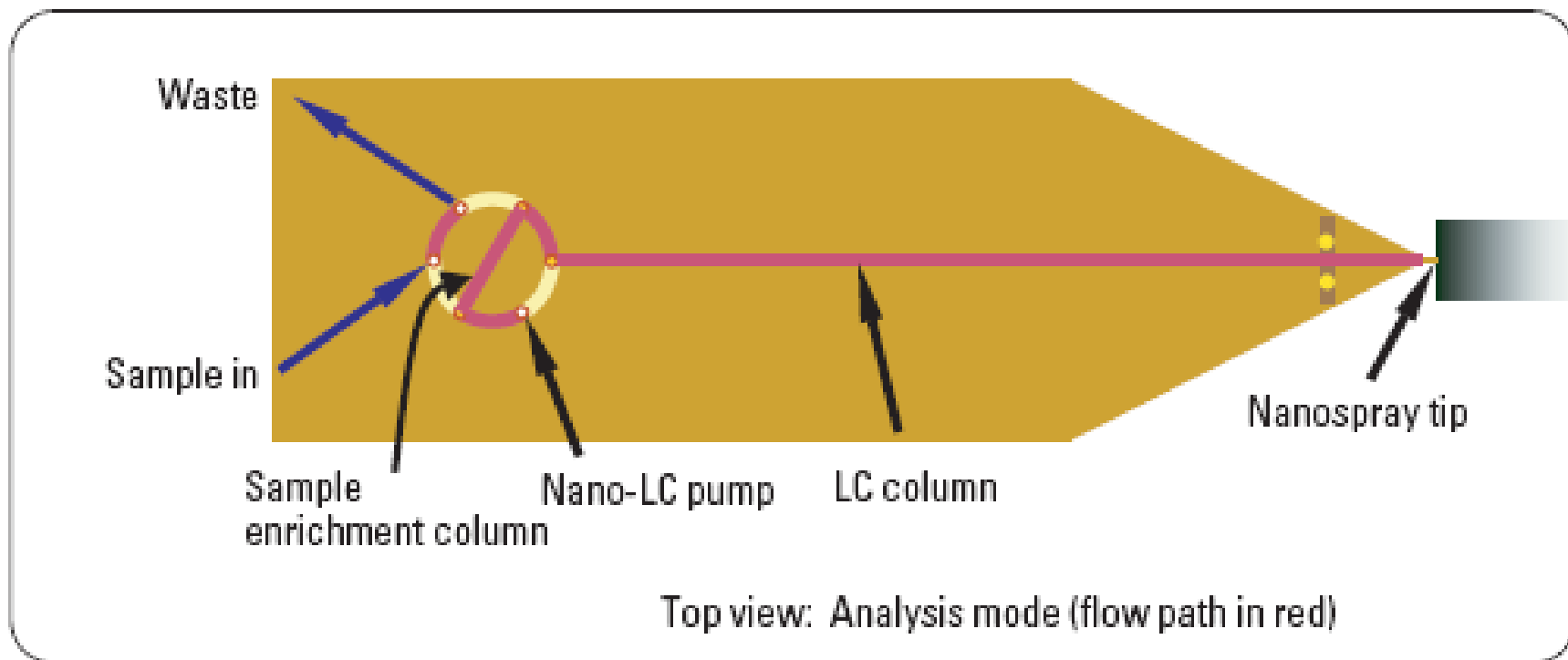
## HPLC-Chip (G4240-65001) összetevői:

- 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).

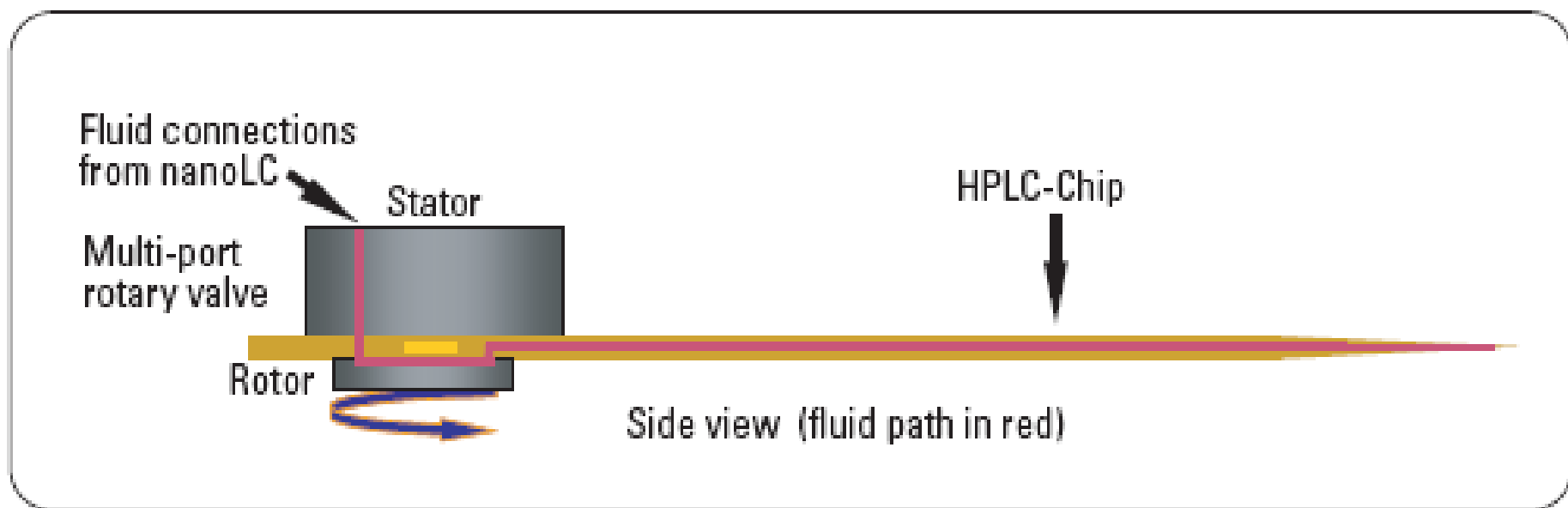
Maga a HPLC-Chip a HPLC-Chip/MS interfészbe helyezhető (HPLC-Chip cube). Ez az interfész biztosítja az összes folyadék-összeköttetést az Agilent 1200 Series nanoáramlású LC rendszerhez, és egyben hatékony kapcsolatot is biztosít az Agilent 6330 Ion trap LC/MS nanospray kibocsátóhoz.



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



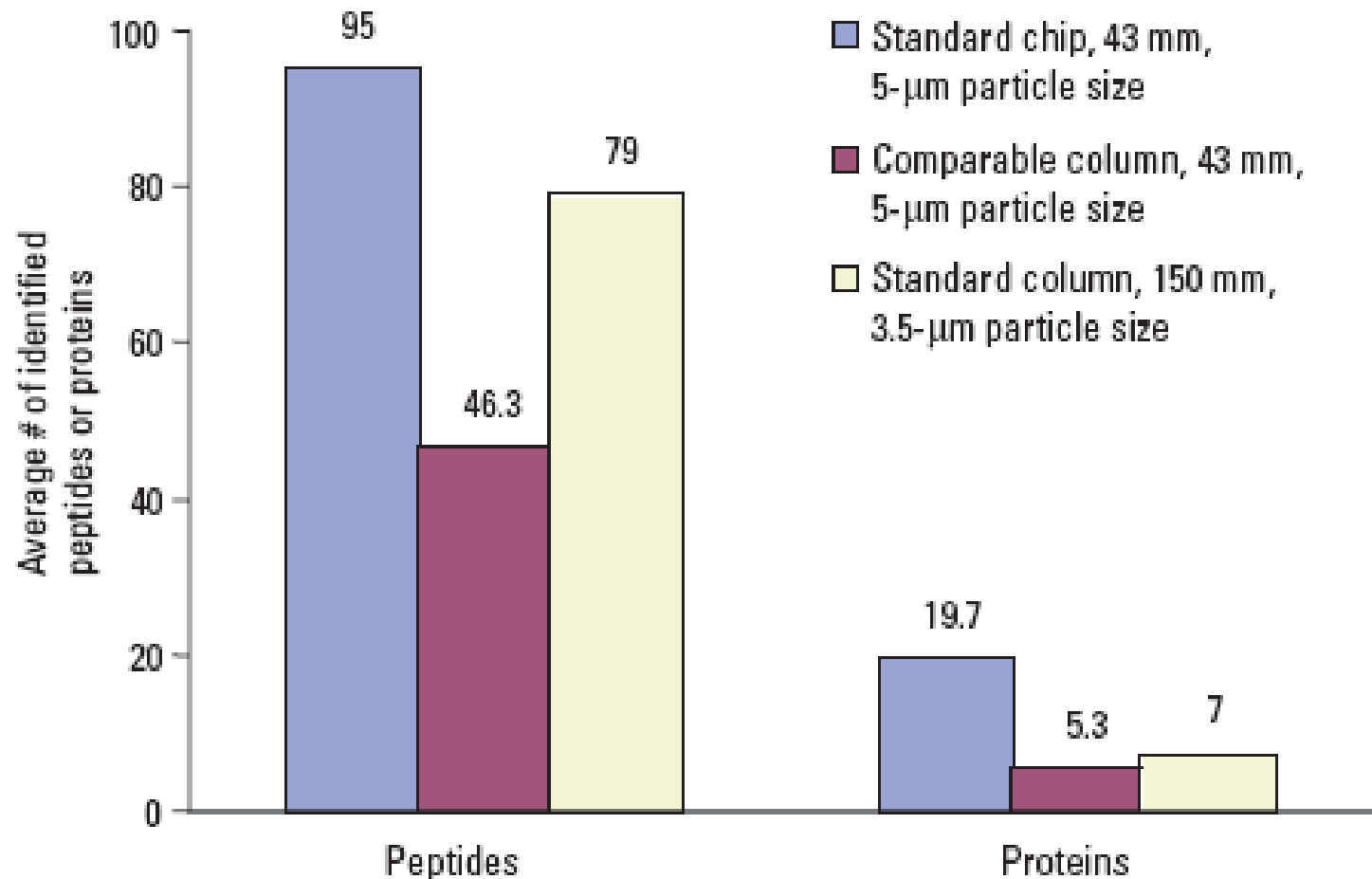
**Figure 2**  
**Diagram of the HPLC-Chip.**



**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 mintavesztést és csökkentette a holt-térfogatot.

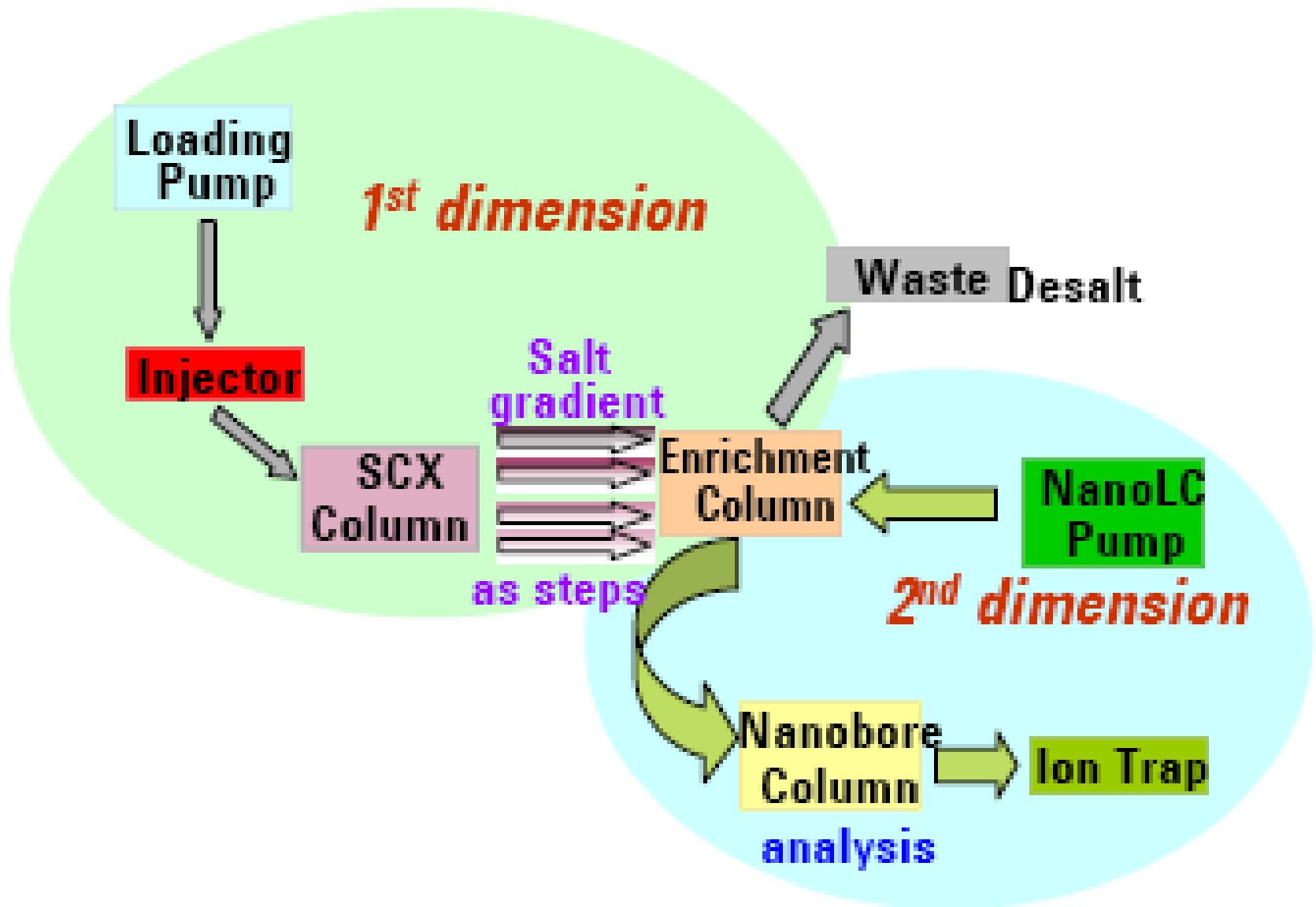
Ezek a fejlesztések jelentős mértékben megnövelték az azonosítható peptidek és fehérjék számát a HPLC-Chip kialakításán keresztül.

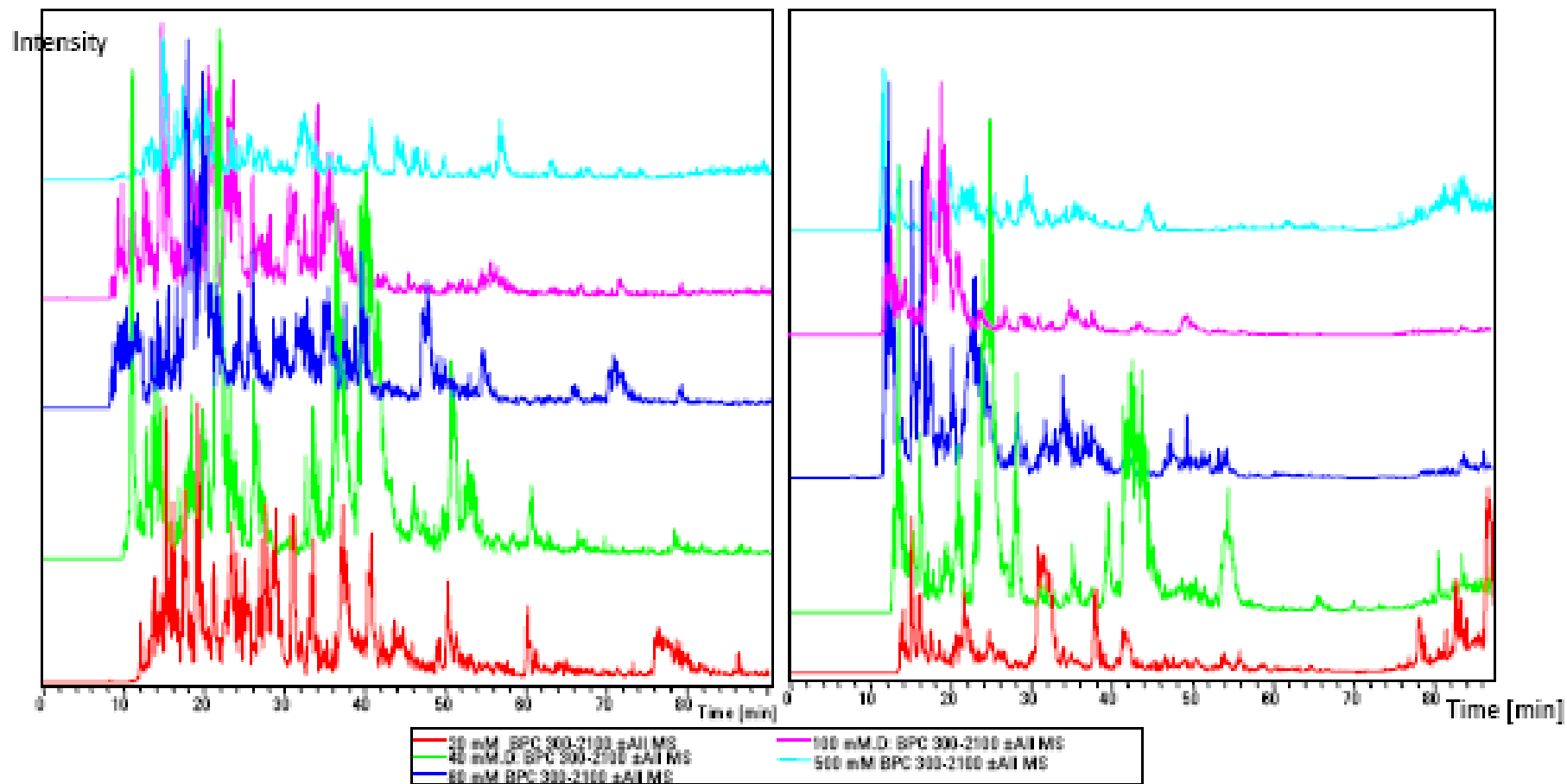
# Két-dimenziós kromatográfia

**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.**







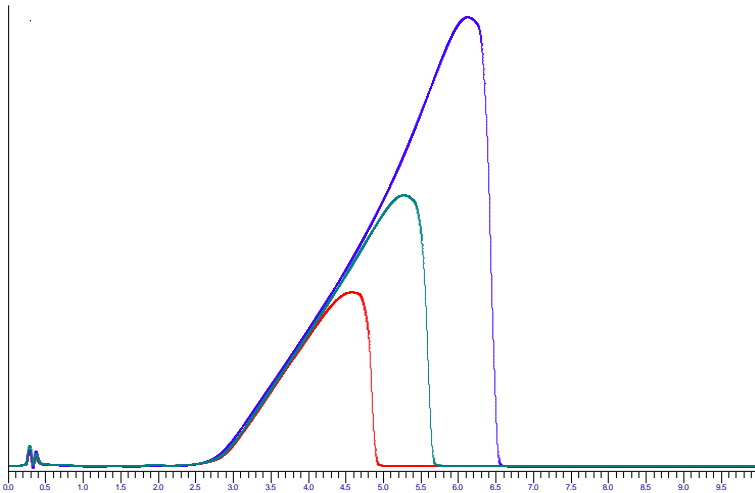
Base peak chromatograms from selected 2D-SCX-RP fractions (left lactose, right glucose culture)



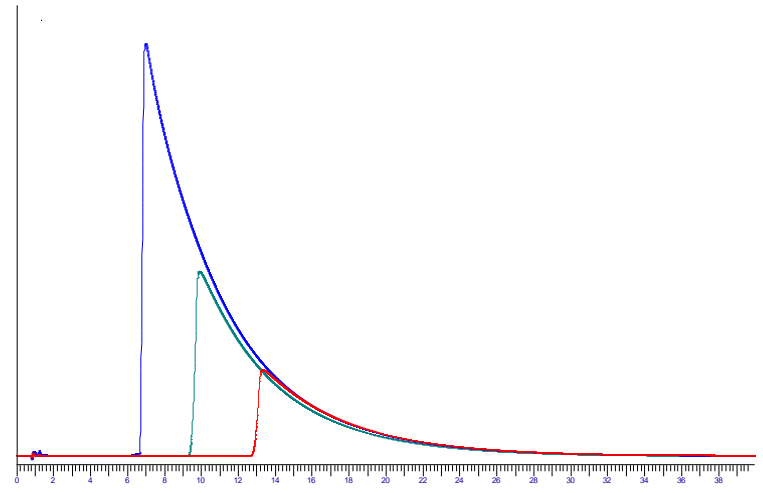
# Chromatography

## 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



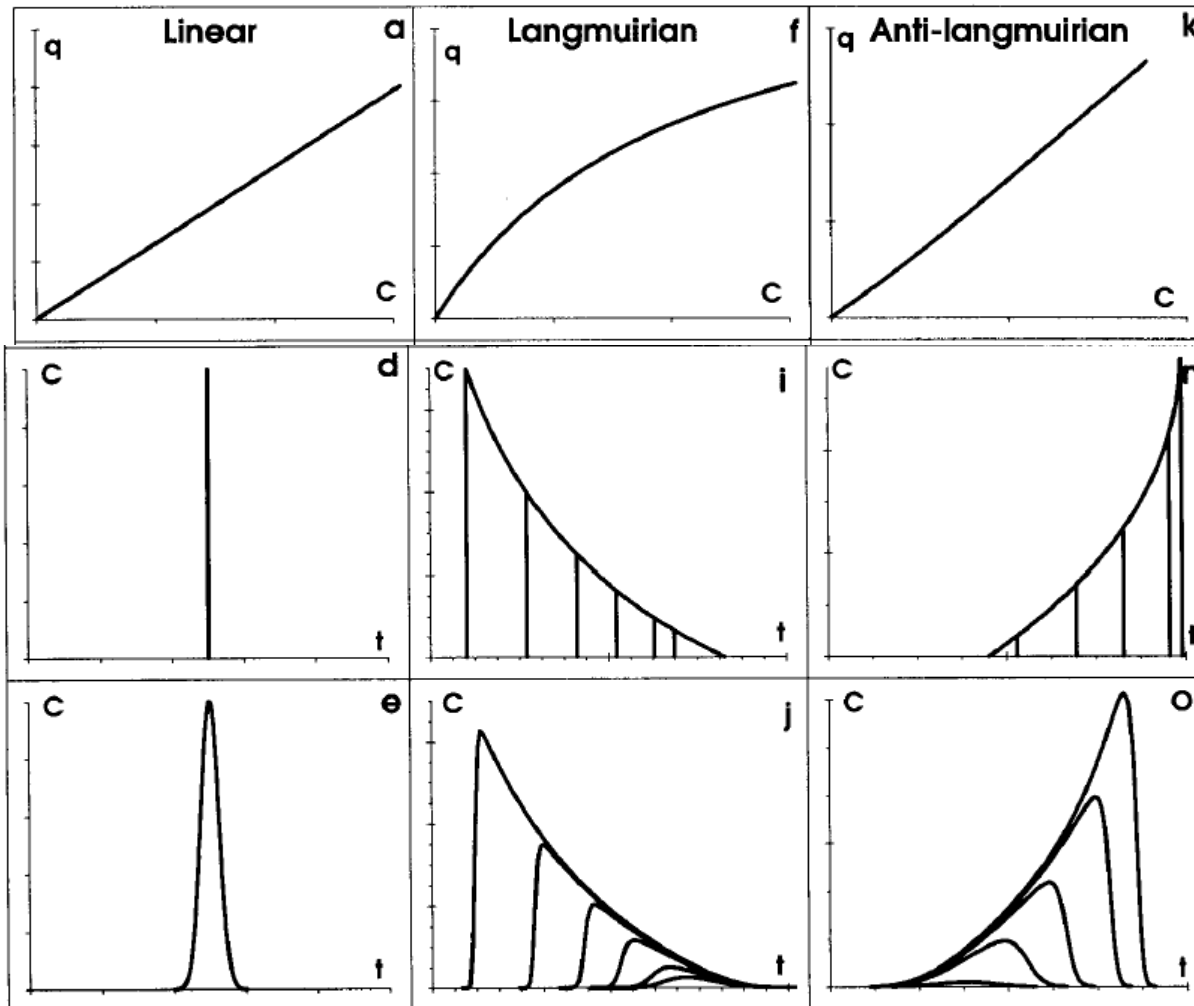
Purospher RP-18 column  
125x4 mm  
Particle size: 5 $\mu$ m  
Eluent: 30/70 AcN/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
buffer pH=4.4

# 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

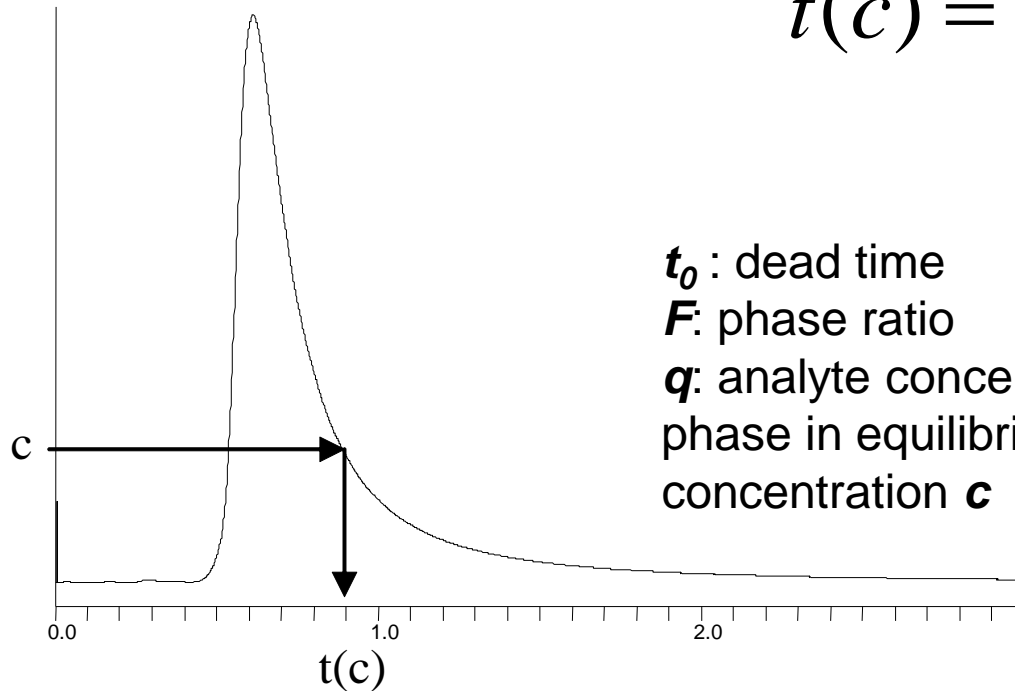
$q(z,t)$  concentration in the stationary phase

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  $c$