

**Daniel JASTRZĘBSKI^{1,2}, Grażyna ROMANIK¹, Marcin M. KAMIŃSKI³,
Maciej TRZNADEL¹, Anita SKRZYPCZAK¹, Aleksandra KRÓLICKA⁴,
Marian KAMIŃSKI¹**

¹⁾ Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Katedra Chemii Analitycznej, 80-954 Gdańsk

²⁾ Zakłady Farmaceutyczne „POLPHARMA” S.A., Kontrola Jakości JB Pharma,
83-200 Starogard Gdański

³⁾ Tumor Immunology Program, German Cancer Research Center (DKFZ), Immunogenetics
Division (D030), Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany

⁴⁾ Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University
of Gdańsk, Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Poland

KOLUMNOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA W ROZDZIELANIU I ANALIZIE PEPTYDÓW I BIAŁEK

Szybka ekspansja zastosowań peptydów i białek w biochemii i w medycynie, stymuluje ogromny wzrost zainteresowania metodami rozdzielania peptydów. Elektroforeza żelowa i kapilarna to najczęściej dotychczas wykorzystywane metody rozdzielania peptydów i białek, w celach identyfikacyjnych i analitycznych. Metody te nie są jednak przydatne do otrzymywania użytkowych ilości tych substancji. Obecnie HPLC jest najistotniejszą metodą oczyszczania i otrzymywania peptydów i białek. Ponadto techniki HPLC znajdują coraz większe zastosowanie w rozwijającej się proteomice. W pracy dokonano przeglądu najważniejszych technik chromatografii cieczowej, metod oraz procedur stosowanych do rozdzielania peptydów i białek jak również obecnych trendów w tym obszarze

Słowa kluczowe

Peptydy, białka, proteomika, chromatografia cieczowa, rozdzielanie

WPROWADZENIE

Peptydy i białka mają ogromne znaczenie w organizmach żywych jako enzymy, hormony, przeciwciała i inne składniki komórek, tkanek i płynów fizjologicznych. Niektóre peptydy wykazują także aktywność antybiotyczną oraz jako źródło antybiotyków peptydowych znajdują się w obszarze zainteresowań badaczy w ostatnich latach [1-4].

Potrzeba uzupełniania braków określonych peptydów i białek w organizmie, albo stosowania antybiotyków lub innych leków peptydowych, pociąga za sobą konieczność otrzymywania tych substancji w formie biologicznie aktywnej. Najczęściej, wymagana jest równocześnie, bardzo wysoka czy-

stość izolowanych substancji. Peptydy i białka można otrzymać w sposób tradycyjny, wyodrębniając je z tkanek zwierzęcych (w tym ludzkich), a niekiedy z roślin. W ostatnich latach rośnie znaczenie chemicznych, a szczególnie biotechnologicznych metod syntezy peptydów i białek.

Dobór metody rozdzielania peptydów i białek od zanieczyszczeń, a następnie takich warunków wyodrębniania, które zapewniają otrzymanie produktu o najwyższej aktywności biologicznej, stanowi z reguły trudny problem rozdzielczy i technologiczny. Najczęściej łatwiejsze jest opracowanie metodyki oznaczania zawartości izolowanych substancji w poszczególnych etapach syntezy, czy biosyntezy. Jednak, rozwiązanie każdego z tych problemów wymaga z reguły znacznego nakładu pracy eksperymentalnej.

Wśród różnych metod rozdzielania peptydów i białek, dominujące znaczenie identyfikacyjne oraz analityczne posiadają metody elektroforetyczne [5]. Ważne i rosnące znaczenie posiada też wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Dla przykładu kolumnowa chromatografia cieczowa bardzo często stosowana jest w przemyśle farmaceutycznym do izolowania peptydów i białek na dużą skalę.

Obecnie, do rozdzielania białek i peptydów metodami chromatografii cieczowej wykorzystywane są praktycznie wszystkie układy chromatograficzne. Stosowana jest chromatografia żelowa (GPC - gel permeation chromatography, albo SEC – size exclusion chromatography) [6,7], chromatografia jonowymienna (IEC – ion exchange chromatography) [8,9], z chromatografią wykluczania jonowego (ion exclusion chromatography), włącznie. Chromatografia w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) jak i chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) są bardzo często stosowane do rozdzielania białek o wysokiej masie molekularnej. Nawet chromatografia adsorpcyjna w układzie faz normalnych (NP-HPLC – normal phase high performance chromatography), szczególnie, z chemicznie związaną fazą stacjonarną w układzie oddziaływań hydrofilowych (HILIC). W dodatku, szerokie zastosowanie znajdują metody chromatografii powinowactwa (Affinity Chromatography – AC), jako odrębna grupa metod separacyjnych o szczególnie wysokiej selektywności i specyficzności [10,11].

W literaturze można znaleźć wiele procedur dotyczących rozdzielania konkretnych peptydów, białek i innych substancji, stanowiących zanieczyszczenia. Nie opracowano, jednak, dotąd takich uogólnionych reguł, które umożliwiłyby dobór optymalnych warunków rozdzielania zależnie od pierwszo- i wyżej - rzędowej struktury peptydów i białek. Analiza literatury, prezentującej procedury rozdzielania peptydów i białek z zastosowaniem chromatografii cieczowej, pozwala zauważyć pewne dominujące kierunki postępowania i uogólnione zasady doboru najkorzystniejszych warunków rozdzielania tych substancji.

W pracy przedstawiono najczęściej stosowane sposoby wpływania na selektywność i sprawność układu w przypadku najważniejszych metod rozdzielania peptydów i białek z wykorzystaniem elucyjnej chromatografii cieczowej.

Publikacja opisuje zjawiska, efekty oraz oddziaływania towarzyszące procesom chromatografii cieczowej oraz możliwości wpływania na retencje peptydów i białek, jak również na selektywność rozdzielania. Przedstawiono również odpowiednie przykłady procedur rozdzielania.

Peptydy i białka są, jak wiadomo, kwasami i zasadami. W strukturze cząsteczki złożonej z 'n' aminokwasów występuje n-1 wiązań peptydowych. Często w cząsteczkach tych substancji występują też często tzw. mostki disiarczkowe oraz wewnętrzne wiązania wodorowe, determinujących drugo- i trzecio- rzędową strukturę molekuly. Obecność aminokwasów zawierających hydrofobowe fragmenty wpływa na wzrost ogólnej hydrofobowości cząsteczki peptydu lub białka. W zależności od pH rozpuszczalnika cząsteczki peptydów i białek mogą ulegać kilku ważnym procesom. W pH wyższym od punktu izoelektrycznego może mieć miejsce dysocjacja protonu od zewnętrznej grupy karboksylowej. Co więcej, w pH poniżej punktu izoelektrycznego może mieć miejsce protonowanie n-terminalnej grupy aminowej. Przy pH bliskim punktowi izoelektrycznemu następuje szczególnie silne obniżenie rozpuszczalności peptydu.

W zależności od pH eluentu i jego kompozycji (np. modyfikatory eluentu powodujące powstanie par jonowych, sole, modyfikatory) peptydy i białka podlegają następującym procesom:

- dysocjacji elektrolitycznej,
- tworzeniu par jonowych z innymi peptydami oraz z jonowymi dodatkami do eluentu,
- pozornemu spadkowi hydrofobowości peptydów i białek na części powierzchni przy stężeniu soli bliskiemu „punktu wysolenia”,
- solwatacji przez akceptory protonów lub kwasy,
- formowaniu się agregatów białek (dimerów i trimerów).

Wszystkie te zjawiska mają wpływ na zachowanie się cząsteczek peptydów i białek w roztworach oraz na ich oddziaływania z fazą stacjonarną w różnych układach chromatograficznych.

Na retencję i stopień rozdzielania peptydów i białek ma wpływ szereg parametrów układu chromatograficznego, takich, jak: typ powierzchni sorpcyjnej i uboczne oddziaływania na powierzchni sorbentu, rodzaj ligandu związanego z sorbentem, powierzchnia właściwa fazy stacjonarnej, wielkość i porowatość ziaren wypełnienia kolumny, a także, skład, pH, temperatura, prędkość przepływu eluentu, oddziaływania dodatkowych składników eluentu np. stężenie soli w eluencie, przebieg programu elucji i inne parametry, w tym nawet ciśnienie podczas rozdzielania [12].

W tabeli 1 przedstawiono przykłady często wykorzystywanych warunków stosowania chromatografii cieczowej do rozdzielania peptydów / białek w różnych układach chromatograficznych. Dane te mogą być przydatne dla wstępnego doboru warunków przy rozwiązywaniu problemów rozdzielczych, dotyczących peptydów i białek.

Najczęściej stosowane są układy faz odwróconych oraz chromatografia jonowymienna. Jednakże, wstępna separacja wykonywana jest z wykorzystaniem chromatografii żelowej (GPC) lub chromatografia wykluczania

(SEC). Ostatnio, do tego celu wykorzystuje się „twarde” sorbenty typu DIOL, szczególnie te, których struktura porowata bazuje ma „matrycę” z porowatego di-tlenku cyrkonu, albo di-tlenku tytanu. Ponadto, HIC a w szczególności AC stosowane są do rozdzielania i izolowania peptydów i białek.

Dodatkowo, w przypadku rozdzielania białek o dużej masie molekularnej Janzen *et al.* [13] wprowadzili do użytku sorbenty typu tentacle. Takie sorbenty chronią przed zbytnim zaburzeniem struktury rozdzielanych białek i obniżeniem aktywności (trwała, nieodwracalna denaturacja)

Tabela 1. Przykłady praktycznego zastosowania HPLC do rozdzielania peptydów i białek wraz z warunkami chromatograficznymi

Lp.	Układ chromatograficzny	Warunki rozdzielania	Substancje rozdzielane	Uwagi	Literatura
1	Układ faz odwróconych (RP); Wykorzystanie oddziaływań hydrofobowych (HIC)	Kolumna C-18 300Å 250x4,6 mm (1,6 µm), T=20°C, v=0,6 ml/min, Eluenty: A – 0,1% TFA w H ₂ O, B – 0,1% TFA w AcCN, Program elucji: 0-48 min – 39-45% B, Detekcja UV 220-280 nm;	interferon γ IFN γ i jego analog All	-----	[14]
		Kolumna C-4 300Å (15µm), T=36°C, v=2 ml/min, Eluenty: A – bufor fosforanowy pH 7 + odpowiednia sól, B – 30% iPr w A, Program elucji: 0-40 min – 0-100% B, Detekcja UV 280 nm;	bovine pancreatic trypsin inhibitor BPTI w grupie modelowych peptydów	Warunki oddziaływań hydrofobowych (HIC) - dodatek różnych soli do eluentu A (NaCl, NaAc, (NH ₄) ₂ SO ₄)	[15]
		Kolumny C-8 150x4,6 mm (5µm) + C-18 250x4,6 mm (5µm), T=21°C, v=1 ml/min, Eluenty: A – 9% MeOH + 70 mM AcNa, pH 5,75, B – 90% MeOH, 8,2% H ₂ O, 1,8% iPr, Program elucji: 0-15 min 10-40% B, 15-35 min 40-80% B, Detekcja FLD, wzb. 330 nm, em. 450 nm;	F- β -Ala i β -Ala	Dual column RP HPLC	[16]
		Kolumna C-18 300Å 150x4,6 mm (5µm), T=40°C, v=1,0 ml/min, Eluenty: A – 0,1% TFA w H ₂ O, B – 0,085% TFA w AcCN, Program elucji: start od 5% B, prędkość przystępu stężenia od 1% do 3%/min, Detekcja UV 280 nm;	Rozdzielanie peptydów zawierających tryptofan lub tyrozynę od peptydów nie zawierających aminokwasów	W celu dokonywania oznaczeń ilościowych dodatek trypsyny (Trp), jako standardu wewnętrznego (internal standard)	[17]
2	Chromatografia jonowymienna	Kolumna C-4 300Å 150x2,1 mm (5µm), T=40°C, v=0,25 ml/min, Eluenty: A – 10% AcCN + 0,1% TFA w H ₂ O, B – 10% H ₂ O + 0,1% TFA w AcCN Program elucji: 0-7 min – 26,5-28,6% B, 7-17 min – 28,6-30,6% B, 17-28 min – 30,6-36,1% B, 28-46 min – 36,1-43,3% B, Detekcja UV 214 nm;	Oznaczenie jakościowe i ilościowe białek w mleku	-----	[18]
		Kolumny EMD SO ₂ , EMD COO ⁻ , Spherodex, Spharose, 60x10 mm, T=5°C, v=2 ml/min, Eluent: 0,3M NaCl w 10 mM Na ₃ PO ₄ pH 7, Detekcja UV 280 nm;	lysozyme, α -chymotrypsinogen A, cytochrome C,	Chromatografia kationowymienna – porównanie selektywności różnych kationitów wobec białek	[19]
3	Chromatografia żelowa	Kolumna DEAE 60x7,5 mm, v=1 ml/min, Eluenty: A – 0,05 M Tris HCl w H ₂ O, pH 8, B – 0,05 M Tris HCl + 0,5 M NaCl w H ₂ O, pH 8, Program elucji: 0-60 min – 0-100% B, Detekcja UV 260 nm;	peptydowe kwasy nukleinowe – PNAs	Chromatografia anionowymienna	[20]
		Kolumna: Superose 6, 300x10 mm, temperatura pokojowa, v=0,5 ml/min, Eluent: 200 mM NaCl + 15 mM Tris HCl w H ₂ O, pH 7,4, Detekcja UV 280 nm;	Thyroglobin, immunoglobulin G, ovalbumin, myoglobin	Białka o wysokich masach cząsteczkowych	[21]
5	Układy faz normalnych	Kolumna Superdex 200, 61,5x7,5 cm, Temperatura pokojowa, v=44 ml/min, Eluent: 40 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ + 0,2M NaCl w H ₂ O	Rozdzielanie polimerów immunoglobulin od monomerów	Ciągła chromatografia	[22]
		Kolumna TSK gel Amide-80 250x4,6 mm, T=40°C, v=1 ml/min, Eluenty: A – AcCN-H ₂ O 97:3 + 0,1% TFA, B – AcCN-H ₂ O 55:45 + 0,1% TFA, Program elucji: 0-70 min – 0-100% B, Detekcja UV 215 nm;	FY, FGGF, FLEEI, DYMGMWDP, NH ₂ , NFTYGGF, AGSE, WAGGDASGE, YGFGFMTSQKSTPLVT, ASTTTNYT	Badanie wpływu dodatków na retencję (0,1% TFA, 0,1%TFA+0,1%TEA, 0,2%TFA+0,2%TEA)	[23]

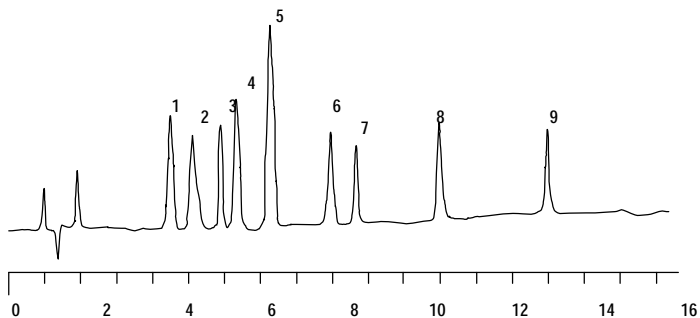
ROZDZIELANIE PEPTYDÓW I BIAŁEK W UKŁADACH FAZ ODWRÓCONYCH

Metody RP-HPLC są powszechnie stosowane do rozdzielania peptydów i białek w szczególności do celów analitycznych, a także w proteomice. Rozdzielanie peptydów i białek w układach faz odwróconych odbywa się na powierzchni fazy stacjonarnej o określonym stopniu hydrofobowości [18], z zastosowaniem sorbentów typu C18, C8, C4 (C5, C6), C2, fenyl, alkilofenyl, alkilonitryl i inne. Z reguły rozdzielanie peptydów i białek przeprowadza się w warunkach elucji gradientowej. Faza ruchoma bardzo często zawiera wodę i acetonitryl z dodatkiem kwasu trifluorooctowego (TFA), zarówno w eluencie A (niższe stężenie acetonitrylu 5 – 25%) jak i w eluencie B (wyższe stężenie acetonitrylu 75 – 95%).

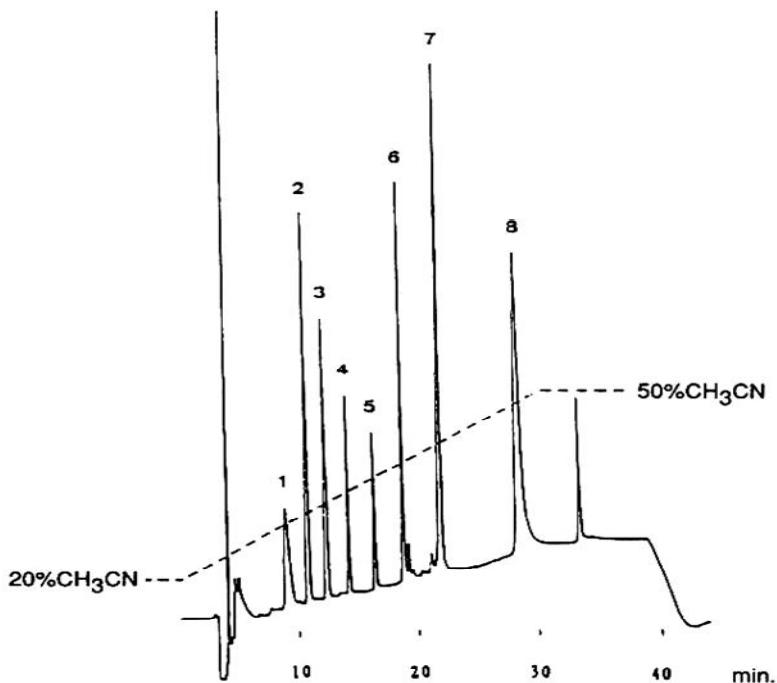
Rozdzielane cząsteczki peptydów i białek są złożone z różnych aminokwasów (hydrofobowych lub hydrofilowych), ułożonych w zróżnicowanej kombinacji. Retencja zależy od wynikowej hydrofobowości rozdzielanych cząsteczek, albo ich solwatów, tzn. zarówno od struktury i rozkładu hydrofobowości w cząsteczkach, jak i od hydrofobowości solwatów istniejących w równowadze ze składnikami eluentu.

Podczas rozdzielania dużych cząsteczek polipeptydów i białek w układach faz odwróconych dość często obserwowane są niekorzystne przypadki zmian konformacyjnych łańcucha aminokwasowego [24] i w konsekwencji denaturacja produktu [25]. Nie polarna faza stacjonarna, organiczna faza ruchoma i kwaśne, albo alkaliczne dodatki do fazy ruchomej (kwas trifluorooctowy (TFA) lub inny, albo amina) – to czynniki mające potencjalne działanie denaturujące, a nawet hydrolityczne. Denaturacja objawia się najczęściej zmianą, retencji substancji, a hydroliza - zwiększeniem ilości pików. Aby uniknąć hydrolizy trzeba kontrolować pH i temperaturę rozdzielania [26]. Denaturacji można, także uniknąć przez dodatek do eluentu soli stabilizujących strukturę białka (np. NaCl, AcNa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Trzeba się, jednak, liczyć się z tym, że taki dodatek często modyfikuje retencję substancji [15].

Najczęściej do rozdzielania peptydów i białek w układach faz odwróconych są stosowane sorbenty siloksanowe modyfikowane grupami alkilowymi, fenyłowymi i difenyłowymi. Wśród grup alkilowych najczęściej wykorzystuje się grupę butylową (C4), kolejno pentylową (C5) i oktylową (C8). Wiele jest też zastosowań oktadecylowych (C18) faz stacjonarnych. Rys. 1 przedstawia przykład rozdzielania 9 białek w kolumnie wypełnionej sorbentem typu C5, [27], a chromatogram na rys. 2 to przykład rozdzielania 8 peptydów i białek z wykorzystaniem kolumny C8.



Rys. 1. Rezultat rozdzielania mieszaniny peptydów z zastosowaniem kolumny C5 Discovery[®] BIO Wide Pore, 150x4,6 mm(5 μ m). Eluenty: A-H₂O :AcCN :PFPA (kwas penta fluoropropionowy) 81 :19 :0,1, B-H₂O :AcCN :PFPA 62 :38 :0,1. Program elucji: 0-19 min 0-100% B, $v=1,0$ ml/min, $T=30^{\circ}\text{C}$. Detekcja UV 215 nm; 1 - Arg8-Vassopressin, 2 - Bradykinin fragment 1-5, 3 - Oxytocin, 4 - Met-Enkephalin, 5 - Luteinizing Hormone, 6 - Leu-Enkephalin, 7 - Bradykinin, 8 - Bombesin, 9 - Substancja P [34]



Rys. 2. Przykład rozdzielania peptydów i białek z zastosowaniem kolumny C8. Kolumna: YMC8 Octyl S-5 120A column, 250x4,6 mm (5 μ m); Eluent: A-0,1% TFA, B-AcCN; Program elucji: 0-30 min 20-50% B, $v=1,0$ ml/min; Detekcja UV 200 nm; Rozdzielane substancje: 1 - Bradykinin, 2 - Met-Enkephalin, 3 - Angiotensin I, 4 - Leu-Enkephalin, 5 - Substance P, 6 - Insulin, 7 - Lysozyme, 8 - Myoglobin [35]

Głównym ograniczeniem stosowania kolumn z chemicznie modyfikowanym wypełnieniem siloksanowym jest ograniczone pH fazy ruchomej. Stosowane pH powinno być bezpieczne dla wiązań grup funkcyjnych z żel krzemionkowym i nie powodować ich hydrolizy (typowo 2 - 8,5, a skrajnie 1,5-10, w przypadku specjalnie opracowanych faz stacjonarnych [28]).

Okazjonalnie stosowane są wypełnienia polimerowe oparte o kopolimer styrenu-diwinylobenzenu, albo poli-metakrylan alkilu. Do powierzchni sorpcyjnej najczęściej dodatkowo związane są cząsteczki oktadekanu (C18) [29, 30]. Ostatnio, mimo wysokiej ceny, rośnie znaczenie polimerowych sorbentów. Powodem jest ich trwałość w szerokim zakresie pH od 0,8 – 13,5. Brak wolnych grup siloksanowych poprawia symetrię pików i w konsekwencji sprawność rozdzielania [29, 30]. Wadą kolumn wypełnionych polimerowymi sorbentami są niskie prędkości przepływu, jakie powinno się stosować podczas rozdzielania substancji o wysokich masach cząsteczkowych. Zbyt duże prędkości przepływu prowadzą do otrzymywania nadmiernie poszerzonych pików, szczególnie, pików substancji silnie hydrofobowych i w szczególności o wysokiej masie molekularnej. Jest to wynikiem niekorzystnej kinetyki procesów sorpcji / desorpcji spowodowanej tendencją do rozpuszczania się cząsteczek rozdzielanych substancji w powierzchniowej warstwie niepolarnego sorbentu i bardzo małej dyfuzji dużych molekuł.

Sporadycznie stosowane są inne wypełnienia, np. sorbenty siloksanowe modyfikowane równocześnie grupami C8 i hydrofilowymi grupami – COOH, pochodzącymi z nienasyconych kwasów karboksylowych, albo specyficznie modyfikowane sorbenty siloksanowe o podwyższonej stabilności mechanicznej i chemicznej [31].

Długość łańcucha alkilowego ma istotny wpływ na selektywność rozdzielania peptydów i białek. Z jednej strony *River* i współpracownicy [32] stwierdzili, że krótkie kolumny wypełnione polisiloksanem modyfikowanym C4 sprawdzają się najlepiej w rozdzielaniu dużych peptydów i białek. Natomiast *Hartman* i współpracownicy [33] udowodnili przydatność kolumn siloksanowych modyfikowanych C8 do rozdzielania naturalnych i syntetycznych peptydów oraz niewielkich białek posiadających charakter hydrofilowy. W przypadku polipeptydów, szczególnie, jeśli zawierają w łańcuchu pierścienie aromatyczne, skuteczne okazują się kolumny siloksanowe modyfikowane grupami difenyłowymi [32].

Kolumny siloksanowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (C18), o małych średnicach porów, są najskuteczniejsze do rozdzielania małych, hydrofilowych peptydów i fragmentów białek złożonych z 2-10 aminokwasów [32]. Przy czym do rozdzielania peptydów w zastosowaniu do proteomiki stosuje się, coraz częściej, tzw. kolumny mikropakowane (o średnicy 1-1,5 mm) lub sorbent typu CSP (Core Surface Particles) jak również często stosowane są kolumny monolityczne. Kolumny te zapewniają bardzo wysoką sprawność i szybkość rozdzielania (do 350 tys. pól teoretycznych na metr długości wypełnienia kolumny).

Fazy stacjonarne, zawierające krótkie alifatyczne łańcuchy, umożliwiają skuteczne rozdzielanie silnie hydrofobowych peptydów i białek, a posiada-

jące długie łańcuchy alkilowe, są odpowiedniejsze do rozdzielania cząstek o charakterze mniej hydrofobowym [34].

Wskazane jest, aby sorbenty o modyfikowanej chemicznie powierzchni sorpcyjnej były zabezpieczone przed oddziaływaniem resztkowych grup hydroksylowych z fazą ruchomą, tzn. aby miały tzw. „end-capping” - zastąpienie wolnych grup OH grupami OCH_3 , albo poprzez silanizację. Polepsza to symetrię pików, a stąd stopień rozdzielania w przypadku mniejszych peptydów i umożliwia wysoki stopień odzysku w przypadku białek [35].

Szeroko badany był wpływ rozkładu wielkości ziaren i porowatości wypełnienia kolumny na rozdzielanie peptydów i białek [36]. Stwierdzono wpływ takich parametrów jak rozmiar i kształt ziaren, średnica i kształt porów oraz powierzchnia wymiany masy. W zależności od wielkości rozdzielanych peptydów i białek, dobiera się złożę o odpowiednich średnicach porów. I tak, dla małych peptydów (do 10 aminokwasów) *Krstulovic* i *Brown* [37] zalecają kolumny z wypełnieniem o średnicy porów do 60Å. Dla średnich peptydów (10-30 aminokwasów) i małych białek najskuteczniejsze są kolumny o średnicy porów 100Å, 120Å i 150Å. Natomiast dla większych peptydów (ponad 30 aminokwasów) i dla białek polecają sorbenty o porach 300Å i większych.

Tweeten i *Tweeten* [29] stwierdzili w przypadku kolumn wypełnionych makroporowatym poli-styrenem-diwinylbenzenem, że dalszy wzrost wielkości porów (do 1000Å) nie wpływa na polepszenie retencji białek o dużej masie cząsteczkowej (do 335 kD). W celu maksymalizacji sprawności kolumny do zastosowań analitycznych wykorzystuje się sorbenty o małych ziarnach (o średnicy 5 i 3 μm), a nawet coraz częściej, wspomniane wyżej, nieporowate sorbenty o średnicy ziarna 1 μm . Wtedy stosowane kolumny mogą mieć nawet tylko 10 mm długości [21]. Jednakże, najczęściej stosuje się kolumny o długościach 125, 150 i 250 mm. Przy czym, im mniejsza wielkość ziaren sorbentu, tym krótsza może być kolumna. Obecnie duże zainteresowanie budzą tzw. monolityczne kolumny o porowatym wypełnieniu zajmujących całą objętość kolumny. Charakteryzują się one szczególnie niskimi wartościami tzw. impedancji rozdzielania [38]. Bez wątpienia w najbliższym czasie kolumny monolityczne będą powszechnie stosowane.

ELUENTY, MODYFIKATORY ELUENTU I PROGRAMY ELUCJI STOSOWANE W UKŁADACH FAZ ODWRÓCONYCH

W układach faz odwróconych głównym czynnikiem wpływającym na retencję jest zawartość organicznych składników w eluencie, takich jak acetonitryl (AcCN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), izopropanol (iPrOH), tetrahydrofuran (THF), czy dioxan (DX) [39]. Dodatkowo, w celu optymalizacji warunków rozdzielania należy wpływać na retencję substancji o charakterze zarówno kwaśnym jak i zasadowym, do których należą peptydy i białka, poprzez dodatek kwaśnego lub zasadowego modyfikatora do eluentu.

Rozdzielanie peptydów i białek najczęściej przeprowadza się w warunkach elucji gradientowej. Program zmian stężenia organicznego składni-

ka eluentu (AcCN, MeOH) ustala się w zakresie od 10-25% v/v do 75-90% v/v, dodając do eluentu A i B modyfikatora zmieniającego pH eluentu i cofającego dysocjację kwasowo-zasadową, w konsekwencji modyfikującego hydrofobowość i polarność cząsteczek peptydów / białek.

Najczęściej wykorzystywanym organicznym składnikiem eluentu jest acetonitryl. Powodem tego jest jego wysoka transparentność przy niskich długościach fali w zakresie UV. Ponadto jego niska lepkość oraz wysoka lotność, która ułatwia dalszą izolację produktu [40]. Rozpuszczalność peptydów i białek jest, także lepsza w acetonitrylu niż w innych organicznych składnikach eluentu, stosowanych w RP-HPLC.

Znacznie rzadziej wykorzystywane są alkohole. Niekiedy stosuje się izopropanol, aby zwiększyć rozpuszczalność w fazie ruchomej solwatów dużych peptydów i białek [41]. Użycie izopropanolu lub jego mieszaniny z acetonitrylem (w proporcji od 1:2 do 2:1) jest uzasadnione w przypadku rozdzielania peptydów i białek stosunkowo bardzo hydrofobowych. Izopropanol, jako rozpuszczalnik o wyższej sile elucyjnej w układach faz odwróconych od AcCN, silniej oddziałuje z centrami alkilo - siloksanowymi sorbentu [42] niż np. metanol.

Najczęściej stosowaną szybkością narostu objętościowego udziału składnika organicznego do rozdzielania peptydów i białek jest 2-5%/min. Zbyt wolny narost stężenia hydrofobowego składnika eluentu może powodować zbytne rozcieńczenie otrzymywanych frakcji eluatu [43]. Końcowe stężenie rozpuszczalnika organicznego w programie elucji nie powinno prowadzić do całkowitego usunięcia wody z kolumny. Utrudniałoby to doprowadzanie fazy stacjonarnej do równowagi z początkowym eluentem. To może prowadzić do braku powtarzalności retencji peptydów i białek, szczególnie wcześniej eluowanych substancji. Najczęściej nie przekracza się 95% substancji organicznej w eluencie.

Natężenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę klasycznie pakowaną o średnicy 4-4,6 mm jest rzędu 0,8-2,0 ml/min oraz dla kolumny monolitycznej aż do 5 ml/min. Od natężenia przepływu zależy sprawność rozdzielania oraz ciśnienie na wlocie do kolumny. *Bylina* i współpracownicy zauważyli wpływ ciśnienia panującego w kolumnie na retencję podczas rozdzielania insuliny w warunkach izokratycznych [12]. Wzrost ciśnienia w kolumnie o 1 bar powodował wzrost czasu retencji białka o 1-5 s. Ostatnio *Guiochon* i współpracownicy [44] potwierdzili występowanie tych efektów i podjęli próby ich wyjaśnienia. Najważniejsze modyfikatory fazy ruchomej, stosowane w układach faz odwróconych, zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Modyfikatory fazy ruchomej najczęściej stosowane w układach faz odwróconych

Modyfikator	Działanie (korzystne i niekorzystne)	Literatura
Kwaśne		
Kwas trójchloro- octowy (TFA)	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminuje jonizację ewentualnych wolnych grup siloksano- wych; - Cofa dysocjację grupy karboksylowej na „C-końcu” amino- kwasu, co zwiększa hydrofobowość tej części peptydu; - Powoduje wzrost polarności cząsteczki przez tworzenie kationu R-NH₃⁺ na „N-końcu” peptydu [52]; - Dostarcza anionów CF₃COO⁻, które stanowią przeciwjon dla „N-końcowego” kationu amoniowego tworząc z nim parę jonową; - Powoduje solwatację wiązań peptydowych, co ma zna- czenie szczególnie przy dużych peptydach i białkach; - Podwyższa absorpcję światła przez eluent przy niskich długościach fali światła w przypadku detekcji UV [53] - po- garsza granicę oznaczalności związku; - Najczęściej stosowane stężenie 0,05 - 0,13% (v/v), stęże- nie poniżej 0,075% może prowadzić do poszerzenia pików i obniżonej retencji peptydów, a powyżej 0,1% do hydrolizy wiązań fazy stacjonarnej z powierzchnią żelu krzemionko- wego; 	[44-46]
H ₃ PO ₄ i jego so- le (np. (NH ₄) ₃ PO ₄)	- Obniżenie retencji peptydów (w porównaniu do dodatku TFA, czy do braku H ₃ PO ₄ lub jego soli);	[40]
HFBA (kwas heksa fluoro bu- tyrowy)	- Działanie podobne do TFA, jednak mniej selektywne;	[41], [47]
HCOOH, CH ₃ COOH, HCl	<ul style="list-style-type: none"> - Działanie podobne do TFA, jednak mniej selektywne; - Kwas solny powoduje jedynie protonowanie grupy karbok- sylowej „C-końca” peptydu bez tworzenia pary jonowej na „N-końcu” związku; - Pewne podwyższenie retencji, ale wpływ na retencję mniejszy niż H₃PO₄; 	[46]
Zasadowe		
NH ₄ HCO ₃	- Podwyższa pH i zmienia nieco hydrofobowość peptydu / białka;	[41]
CH ₃ COONH ₄	- Działanie podobne do NH ₄ HCO ₃	[50, 51]
Trójetyloamina (TEA)	<ul style="list-style-type: none"> - Dodawana jednocześnie z H₃PO₄ lub HCOOH w celu zmiany pH; - Blokuję wolne grupy hydroksylowe sorbentu, co może przyczynić się do polepszenia kształtu pików; 	[52, 53]

Wszystkie modyfikatory wymienione w tabeli 2 zmieniają pH eluentu i hydrofobowość cząsteczek rozdzielanych substancji przez solwatację i tworzenie par jonowych. Modyfikatory kwaśne mają na celu zmniejszenie stopnia kwaśnej dysocjacji peptydu, a dodatki zasadowe eliminują protonowanie terminalnych grup NH₂ i powodują dysocjację grupy karboksylowej.

ROZDZIELANIE PEPTYDÓW I BIAŁEK W UKŁADACH JONOWYMIENNYCH

W chromatografii jonowymiennej jest zasadą, że substancje posiadające ładunek elektryczny są rozdzielane na kolumnie, która ma na powierzchni sorpcyjnej odwrotny ładunek elektryczny do substancji rozdzielanych. Grupy jonowe wymiennicza jonowego są kowalencyjnie związane z powierzchnią sorbentu i ich ładunki elektryczne są kompensowane przez jony obecne w eluencie (buforze). Po wprowadzeniu próbki do kolumny centra jonowe słabo związane z eluentem, ulegają wymianie na jony substancji rozdzielanych. Wykorzystuje się okoliczność, że peptydy i białka mogą posiadać zarówno ładunek dodatni, jak ujemny w zależności od pH buforu. Podczas stosowania buforów o charakterze kwaśnym, peptydy występują w postaci kationów (zahamowanie dysocjacji grup karboksylowych i sprotonowanie grup aminowych oraz najbardziej polarnych grup NH_2 w połączeniach peptydowych). W przypadku stosowania buforów zasadowych, peptydy i białka występują w postaci anionów (sprotonowane grupy aminowe są zasadami wiążącymi grupy hydroksylowe, a grupy karboksylowe są zdysocjowane, albo tworzą pary jonowe ze sprotonowanymi kationami zasadowych dodatków). Netto dodatni lub ujemny elektryczny ładunek peptydu / białka umożliwia jego związanie z odpowiednimi centrami fazy stacjonarnej. Z zastosowaniem gradientu soli lub niekiedy, dodatkowo zmiany pH buforu, powoduje się stopniową elucję substancji związanych z powierzchnią wymiennicza jonowego.

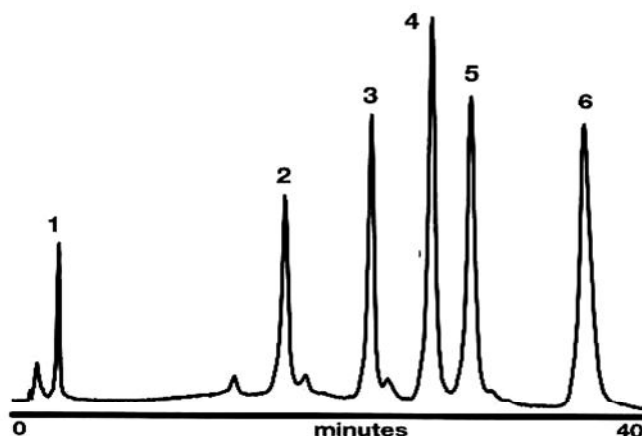
Na retencję peptydów i białek w warunkach chromatografii jonowymiennej wpływają głównie cztery czynniki: siła jonowa eluentu, jego pH i powierzchnia właściwa wymiennicza jonowego (gęstość obsadzenia molekułami wymiennicza jonowego), a także rozkład wielkości porów adsorbentu. Zwiększając siłę jonową eluentu obniżamy retencję peptydów i białek w przypadku obu wymienniczy, kationowych i anionowych. Zwiększając pH buforu obniżamy retencję na kationitach, a podwyższamy na anionitach i odwrotnie - zmniejszając pH buforu podwyższamy retencje na kationitach, a obniżamy na anionitach. Poszerzenie zakresu średnic porów w stosunku do hydrodynamicznej średnicy cząsteczek rozdzielanych białek przyczynia się do podwyższenia retencji w przypadku stosowania kationitów [19] i prawdopodobnie także w przypadku anionitów.

Wzrost stopnia obsadzenia powierzchni jonitu grupami jonowymiennymi wpływa, oczywiście, na wzrost retencji w konkretnych warunkach rozdzielania. Jednak, do rozdzielania peptydów i białek w warunkach chromatografii elucyjnej nie są zalecane wymiennicze jonowe o bardzo wysokim stopniu nasycenia powierzchni sorpcyjnej grupami jonowymiennymi, w przeciwieństwie do chromatografii jonowymiennej w warunkach selektywnej sorpcji – desorpcji jonowymiennej, gdy pojemność jonowa wymiennicza jonowego powinna być możliwie jak najwyższa.

W zależności od właściwości rozdzielanych peptydów / białek, dobiera się odpowiedni wymienniczą jonową. Stosuje się wiele rodzajów kolumn jo-

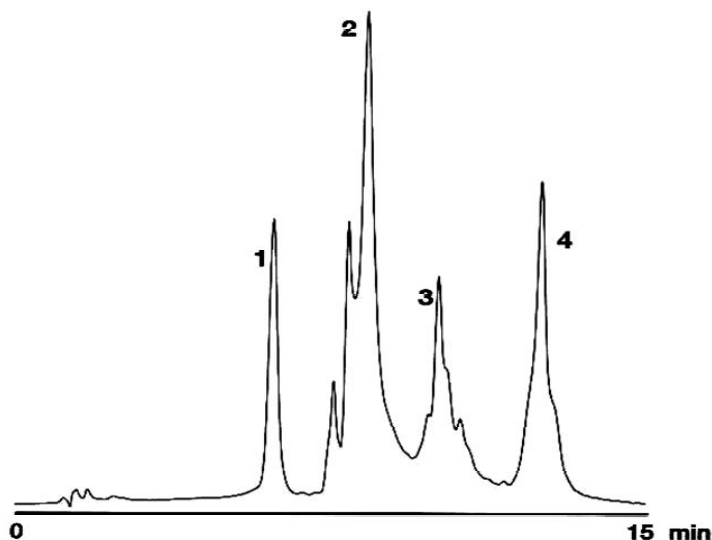
nowymiennych, równorzędnie kationowymiennymi i anionowymiennymi. Oba wymienniki jonowe mogą być stosowane w wariantach słabym i mocnym. W przypadku mocnych wymienników jonowych wszystkie grupy funkcyjne są w szerokim zakresie pH w postaci zjonizowanej i powinowactwo jonowe kolumny jest mało zależne od pH eluentu, ale retencja peptydów od pH eluentu zależy silnie, ponieważ w zależności od pH ich cząsteczki są w różnym stopniu zjonizowane.

Jako kationity stosowane są kolumny ze związanymi na powierzchni sorpcyjnej ligandami alkilo-, albo arylo- sulfonowymi: $R-SO_3^-$ (mocne wymienniki, np. Fractogel SO_3 , Cellufine sulfate, SP), karboksylowymi $R-COO^-$ (słabe wymienniki, np. Fractogel COO, Toyopearl), a także inne polimery o słabo kwaśnych grupach funkcyjnych, takie, jak Sepharoza czy SpheroDEX [19,55,56]. Na rys. 3 przedstawiono przykład rozdzielania 6 peptydów z zastosowaniem kolumny kationowej.



Rys. 3. Przykład rozdzielania małych peptydów z zastosowaniem chromatografii jonowymiennych. Kolumna: Vydac 400VHP5410, 100x4,6 mm (5 μ m); Eluenty: A – 20 mM TEAP in 50% AcCN, pH 2; B - 100 mM $NaClO_4$ in A; Program elucji: 0 - 50 min, 0 - 100% B, $v=1,0$ ml/min, Detekcja: UV 220 nm; 1 - Oxytocin, 2 - Eledoisin related peptide, 3 - Neurotensin, 4 - Angiotensin II, 5 - Bradykinin, 6 - Angiotensin I [56]

Jako anionity stosowane są kolumny o ligandach w postaci grup alkilo-, albo arylo- amoniowych, np. mocny wymiennik z grupami trimetyloaminoetylowymi (TMAE), średnio mocny wymiennik z grupami dietyloaminoetylowymi (DEAE), oraz słaby wymiennik z grupami dimetyloaminoetylowymi (DMAE) [55,57]. Ligandy jonowymiennymi najczęściej osadzone są na matrycy, którą może być kopolimer styrenu-divinylobenzenu, żywica syntetyczna, poliwęglowodany, poliamidy, a niekiedy polimery nieorganiczne. Na rys. 4 zamieszczono przykład wyników rozdzielania czterech białek w kolumnie anionowej.



Rys. 4. Przykład rozdzielania białek za pomocą chromatografii anionowymiennej Kolumna: Vydac 300VHP575, 50x7,5 mm (5 μ m); Eluenty: A- 10 mM kwas CHES-2-(-cykloheksyloamino) etanosulfonowy / TEA, pH 9,53; B- 0,5 M NaCl w A; Program elucji: 0 - 20 min, 0 - 100% B, 1 - Bovine carbonic anhydrase (pI 7,3), 2 - Conalbumin (pI 6; 6,3; 6,6), 3 - Ovalbumin (pI 4,7), 4 - Soybean trypsin inhibitor (pI 4,5) [56]

W przypadku większości komercyjnie stosowanych kolumn jonowymiennych, stosunkowo małe grupy jonowymienne znajdują się na powierzchni sorbentu. W takim przypadku tylko pojedyncze, ewentualnie kilka jonowych grup peptydu / białka zostaje związane ze złożem, z powodu ograniczeń przestrzennych. W wymienniczych jonowych o ruchomych ligandach (tzw. „tentacle”), łańcuchy cząsteczek wymienniczych jonowego są kowalencyjnie związane z matrycą. Są to liniowe łańcuchy polimerowe z rozłożonymi wzdłuż łańcucha grupami jonowymiennymi. Ilość grup jonowymiennych jest znacznie większa niż na powierzchni „klasycznego” wymienniczych i w konsekwencji znacząco wzrasta pojemność takich wymienniczych wobec peptydów i białek. Elastyczność ruchomych ligandów wymienniczych powoduje dodatkowo, że mogą się one wiązać do cząsteczek białek bez odkształcenia cząsteczek tych ostatnich. Ma to szczególne znaczenie dla uniknięcia denaturacji w trakcie rozdzielania białek o dużych masach molekularnych.

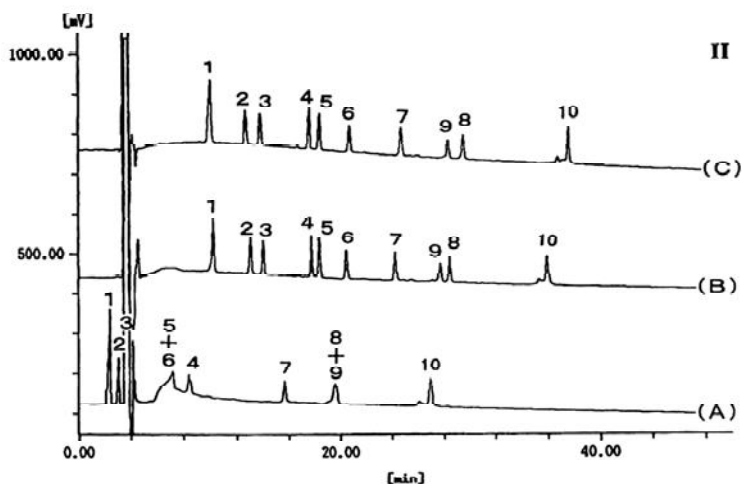
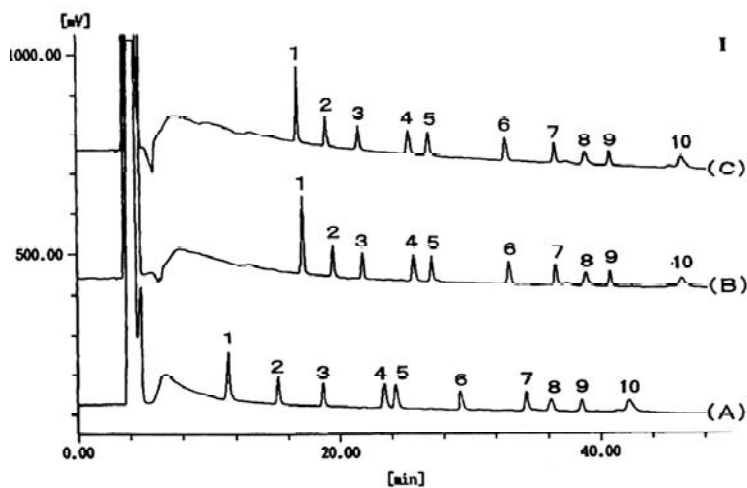
Podczas rozdzielania peptydów i białek z użyciem chromatografii jonowymiennych regułą jest stosowanie krótkich kolumn o dużych średnicach. Zalecane są kolumny o długościach od 5 cm (szczególnie w metodach sorpcyjno - desorpcyjnych) do 25 cm (dla warunków jonowymiennych chromatografii elucyjnej) i o średnicach 5-26 mm lub wyższych.

UKŁADY ADSORPCYJNE I ADSORPCYJNO-JONOWYMIENNE FAZ NORMALNYCH

Układy chromatograficzne faz normalnych nie znajdują tak szerokiego zastosowania do rozdzielania peptydów i białek jak układy faz odwróconych i jonowymiennie. *Yoshida* i *Okada* [23] wykonali badania przydatności do rozdzielania peptydów kilku różnych wypełnień w układach faz normalnych. Stwierdzili przydatność kolumn wypełnionych związanym z żelom krzemionkowym sorbentem amidowym i diolem w warunkach elucji gradientowej AcCN – H₂O, z rosnącym udziałem wody w trakcie programu elucji i z zastosowaniem kwaśnych modyfikatorów fazy ruchomej (TFA albo TFA+TEA), zwiększających retencję peptydów (rys. 5 – porównanie rozdzielania 10 peptydów na kolumnie amidowej i diolowej z różnymi dodatkami do eluentu) [23]. Odrzucili kolumny napełnione sorbentem aminowym (NH₂) i nitrylowym (CN) jako nieprzydatne do rozdzielania peptydów oraz kolumny z żelom krzemionkowym jako powodujące obniżenie stopnia odzysku peptydów [23].

Jednakże, należy zaznaczyć, że zastosowane warunki rozdzielania w wyżej wymienionych badaniach uniemożliwiają przeważanie efektu adsorpcyjnego mechanizmu charakterystycznego dla NP-HPLC. Zastosowanie bardzo polarnego eluentu prowadzi do mechanizmu rozdzielania charakterystycznego dla Chromatografii Oddziaływań Hydrofilowych (HILIC).

Do rozdzielania białek i peptydów zastosowano też z powodzeniem kolumny wypełnione hydroksypatytem, wykorzystując jednocześnie adsorpcyjne i słabe jonowymiennie oddziaływania.



Rys. 5. Porównanie rozdzielania peptydów na kolumnie aminowej (I) i DIOL (II) z innymi dodatkami do eluentów [23] Kolumna I - TSK gel Amide-80 250x4,6 mm, Kolumna II - TSK gel OH-120 250x4,6 mm; Eluent: (A) A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,1% TFA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,1% TFA (B) A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,1% TFA+TEA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,1% TFA+TEA; (C) A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,2% TFA+TEA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,2% TFA+TEA; Program elucji: 70 min liniowo gradient H₂O od 3 to 45% (0,6% H₂O/min), T=40°C, v=1,0 ml/min. Detekcja UV 215 nm; 1 - FY, 2-FGGF, 3 - FLEEI, 4 - DYMGWMDP-NH₂, 5 - NFTYGGF, 6 - AGSE, 7 - WAGGDASGE, 8 - YGGFMTSQKSQTPLVT, 9 - ASTTTNYT, 10 - VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILI-RLFKSHPETLEKFDPRFKHLKTEAM¹) (M-homoserine)

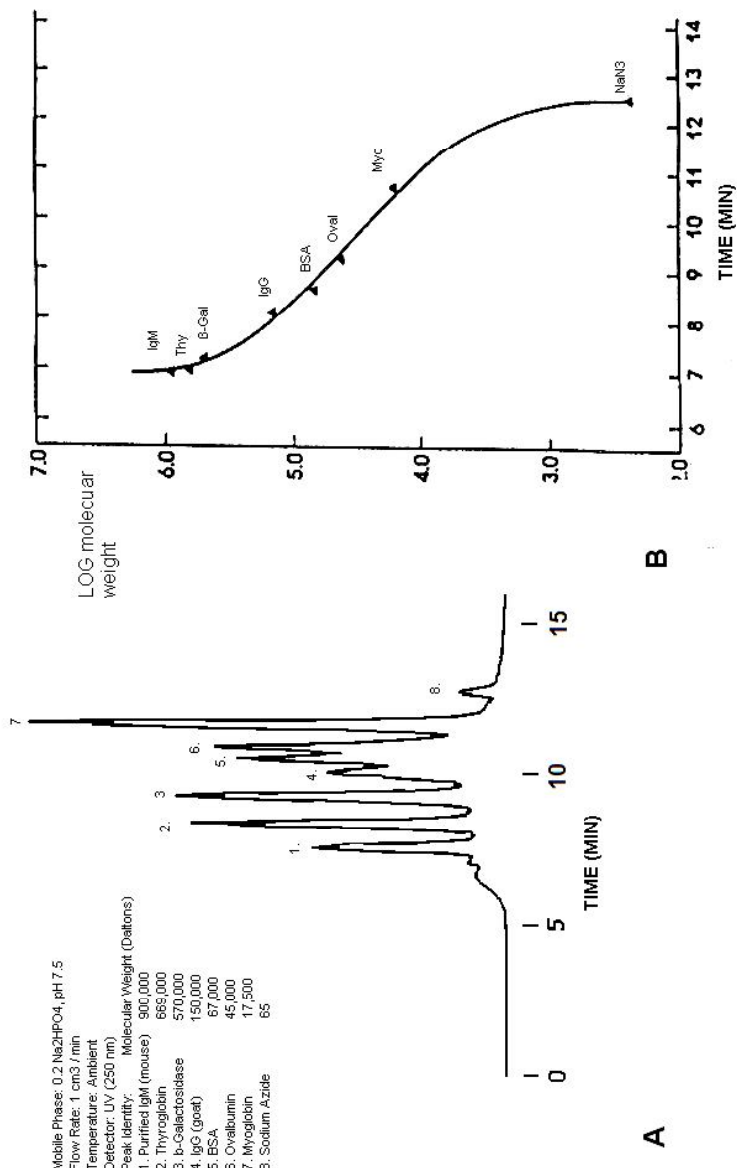
CHROMATOGRAFIA ŻELOWA

Chromatografia wykluczania (SEC), zwana również chromatografią żelową (GPC), znajduje ogromne zastosowanie w separacji peptydów i białek oraz do odsalania. Bazuje na wykorzystaniu różnicy wielkości i kształtu, a w konsekwencji różnic w wartości efektywnego promienia hydrodynamicznego rozdzielanych substancji. Molekuły o różnych rozmiarach w różnym stopniu penetrują pory sorbentu. Małe cząsteczki są w większym stopniu zatrzymywane w kolumnie, a duże są szybciej eluowane. SEC ma zastosowanie do rozdzielania peptydów i białek o masie molowej w zakresie 2 do 1000 kDa. Technika ta może być stosowana do wyznaczania masy molowej białek. Jednak nie tylko masa cząsteczkowa, ale również kształt cząsteczki białka oraz oddziaływania sorpcyjne, trudne do całkowitego wyeliminowania mają wpływ na retencję, dlatego też konieczna jest staranna kalibracja przy użyciu odpowiednich białek kalibracyjnych.

Dużego znaczenia nabierają, ostatnio, złoża SEC wykonane w technologii ruchomych ligandów, „tentacle” (podobnie jak w przypadku złożów jonowymiennych). Rozmiary porów i ich rozkład gwarantują rozdzielanie białek zgodnie z wielkością i kształtem cząsteczek. „Dynamiczne” ligandy uniemożliwiają małym cząsteczkom wniknięcie wewnątrz porów, a większe molekuły mają utrudnioną głębszą penetrację [57].

SEC jest szczególnie użyteczna jako początkowy etap frakcjonowania, do izolacji dużych ilości zanieczyszczeń, lub jako końcowy etap rozdzielania oczyszczonych białek, tzw. „polishing step”.

Należy też zwrócić uwagę na szczególną przydatność chromatografii żelowej do odsalania peptydów i białek. Do tego celu stosuje się często, ciągle jeszcze, tzw. miękkie sita molekularne. Coraz większe znaczenie mają „twarde” wypełnienia kolumn w tych zastosowaniach, takie jak DIOL [58], a także szkła porowate o zdezaktywowanej powierzchni (rys. 6 – przykład analizy mieszaniny białek z wykorzystaniem GPC-DIOL).



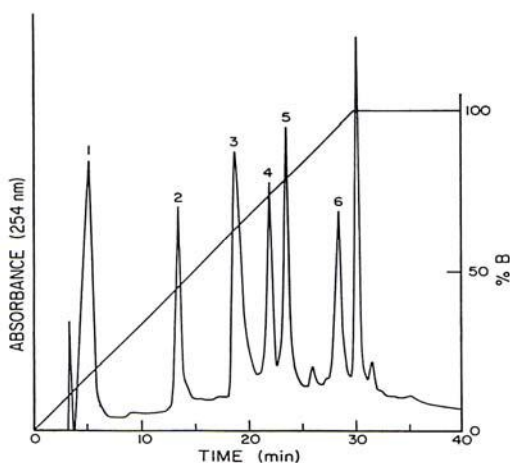
Rys 6. A. Przykład rozdzielania białek na kolumnie DIOL. Kolumna: BioGPC - DIOL 250, 300x10 mm (5µm); Eluent: 10 mM NaH₂PO₄ + 300 mM NaCl, pH 7,2; w=0,5 ml/min, Detekcja UV 280 nm. B. Krzywa kalibracyjna białek na kolumnie GF450 [56]

CHROMATOGRAFIA ODDZIAŁYWAŃ HYDROFOBOWYCH (HIC – HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY)

Należy zwrócić też uwagę na duże znaczenie chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC), zarówno do wstępnego monitorowania składu białkowego badanego materiału biologicznego, jak i do zastosowań preparatywnych [59,60]. Proces rozdzielania opiera się na hydrofobowych oddziaływaniach pomiędzy hydrofobowym ligandem związanym z fazą stacjonarną a niepolarnym regionem na powierzchni biomolekuły. Te hydrofobowe oddziaływania są zwiększane przez obecność soli w eluencie, powoduje ona odstonięcie hydrofobowej części białka przez zakłócenie ułożenia cząsteczek wody wokół białka [61].

Fazy stacjonarne stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofobowych to sorbenty typu C3-, C4-, C5-, albo C6- związane najczęściej z sieciowaną agarozą lub syntetycznym kopolimerem o odpowiednim zakresie wielkości porów (300 Å, albo większe). Proces rozdzielania wykonuje się przy malejącym gradiencie stężenia soli podczas elucji (rys. 7). Rodzaj soli i jej stężenie znacząco wpływa na oddziaływania hydrofobowe pomiędzy białkiem a hydrofobowym adsorbentem.

Jednakże, stężenie soli stosowane podczas rozdzielania powinno być nieznacznie niższe od „punktu wysalania” cząsteczki białka. Co więcej szereg Hofmeistera zestawia sole według zdolności wysalania białka: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{Na}_2\text{HPO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CH}_3\text{COOK} > \text{CH}_3\text{COONa} > \text{NaCl}$.



Rys. 7. Rozdzielenie 1. Cytochromu c, 2. Mioglobiny, 3. β -Laktoglobuliny, 4. Rybonukleazy A, 5. Lizozymu, 6. α -Chymotrypsyny, 7. Chymotrypsynogenu A; na kolumnie YMC-Pack HIC 4,6x250 mm; Eluent: A – 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.1 M KH_2PO_4 pH 6,8; B – 0.1 M KH_2PO_4 pH 6,8; Program elucji: 0-100% B w 30 min; $v=1.0$ ml/min. Detekcja UV 254 nm; [60]

Temperatura i pH buforu również wpływają na oddziaływania białek z fazą stacjonarną. Ze wzrostem temperatury wzrasta retencja białka [63], wpływ pH na białko jest bardziej złożony. Przypuszczalnie oddziaływania

hydrofobowe są silniejsze, gdy pH buforu znajduje się blisko punktu izoelektrycznego białka [64]. Główną zaletą chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC) do rozdzielania białek i peptydów jest zachowanie aktywności biologicznej cząsteczek przez co rozdzielanie jest mniej destrukcyjne niż w przypadku układu faz odwróconych (RP-HPLC). Jednakże, nie wszystkie białka obecne w badanej próbce zawsze zostają rozdzielone, zatem nie można metody HIC traktować jako „panaceum separacyjne”. Należy zawsze ją brać pod uwagę, gdy konieczne jest rozdzielanie białek i peptydów o wysokich masach molekularnych (powyżej 50 tys. Daltonów).

CHROMATOGRAFIA WIELOWYMIAROWA

Obecnie, identyfikacja i oznaczanie białek w złożonych mieszaninach białkowych jak w przypadku analizy proteomu komórkowego jest często osiągnięta poprzez połączenie różnych metod separacyjnych takich jak SEC, IEC, RP-HPLC lub innych technik chromatograficznych [65, 66]. Wykorzystanie jednego mechanizmu separacji jest bardzo często niewystarczające. Sprawność separacji może zostać polepszona poprzez połączenie różnych rodzajów kolumn chromatograficznych bądź poprzez wykorzystanie różnych konfiguracji analitycznych. Najczęściej wielowymiarowa separacja obejmuje dwie bądź więcej techniki rozdzielania podczas jednej analizy.

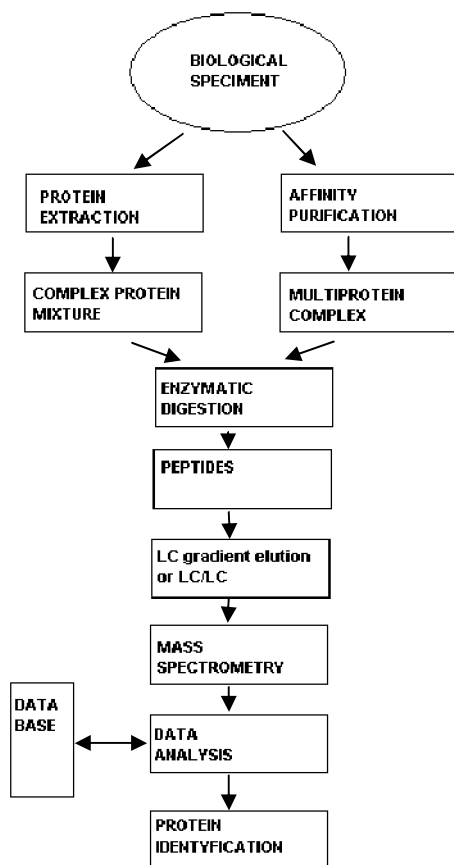
Podstawowe wymagania zostały początkowo zasugerowane w pracy Giddings'a na temat wielowymiarowej separacji białek [67]. Dla dwuwymiarowej separacji można zastosować chromatografię jonowymienną (zazwyczaj kationowymienną) [68, 69], SEC lub chromatografię powinowactwa [70, 71] w połączeniu z RP-HPLC. Opitck i inni [72,73] połączyli chromatografię z silnym wymienniczem kationowym lub SEC z RP-HPLC by frakcjonować całkowite lizaty bakterii *Escherichia coli*. W przybliżeniu wyizolowano 450 białek. Identyfikacja 14 z nich była przeprowadzona przy użyciu spektrometrii mas (MS) i sekwencjonowania Edmana.

PROTEOMIKA

Proteomika jest nowo powstającą dziedziną naukową. Jej celem są badania w dużej skali nad składem białek, ich charakterystyką (na przykład modyfikacje posttranslacyjne) i oddziaływania pomiędzy białkami (również z innymi biomolekułami takimi jak lipidy bądź kwasy nukleinowe) w żywych komórkach bądź całych organizmach. W proteomice podczas badań złożona mieszanina białkowa musi zostać rozdzielona na pojedyncze białka (lub określone grupy białek) zanim zostanie strawiona do formy peptydów w celu umożliwienia identyfikacji MS (ryc. 8).

W badaniach w proteomice często stosowana jest dwuwymiarowa elektroforeza żelowa jako wstępna technika do frakcjonowania, jak również do określania masy molekularnej i punktu izoelektrycznego rozdzielonych

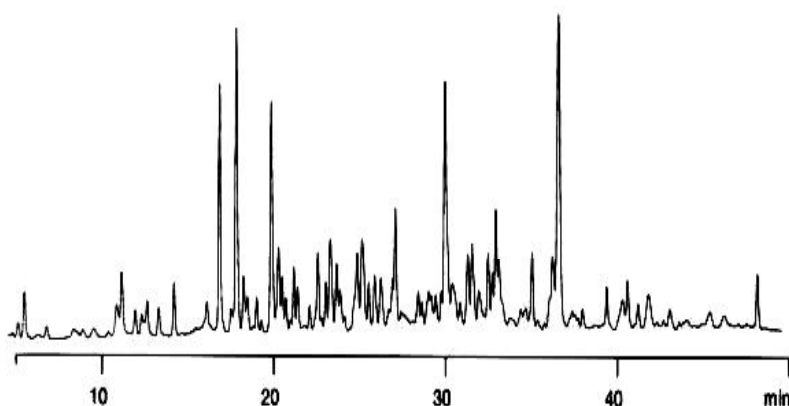
związków. Połączenie elektroforezy kapilarnej z chromatografią w układzie faz odwróconych jest również ważne. Chromatografia cieczowa jest używana głównie w celu identyfikacji i oznaczania peptydów o małej masie, które bardzo trudno rozdzielić za pomocą elektroforezy żelowej. Co więcej do rozdzielania peptydów i białek za pomocą HPLC często wykorzystuje się połączenie z spektrometrem mas (HPLC-MS) bądź z tandemowym spektrometrem mas (HPLC-MS/MS). Techniki te są wykorzystywane w proteomice do identyfikacji białek i oznaczania ich struktury. Określenie struktury bądź identyfikacja danego białka jest osiągana poprzez trawienie trypsyną w dokładnie kontrolowanych warunkach (tworzenie map peptydowych po trawieniu trypsyną), a następnie przez ustalanie rodzaju wygenerowanych w ten sposób peptydów i ich wzajemnych proporcji.



Rys. 8. Ogólny schemat przedstawiający przebieg procesu analizy w proteomice materiału biologicznego

Rozdzielanie chromatograficzne strawionych peptydów jest prowadzone z zastosowaniem kolumnowej chromatografii cieczowej w warunkach elucji gradientowej. Tak zwane wielowymiarowe układy chromatograficzne z systemem przełączania kolumn są często wykorzystywane. Na rysunku 9 chromatogram obrazuje przykład rozdzielania peptydów uzyskanych z kazeiny po trawieniu trypsyną [74]. Produkty strawienia służą jako „odcisk palca” analizowanego białka.

Poprzez połączenie stworzonych map peptydowych po trawieniu trypsyną z odpowiednimi bazami danych biolodzy i biotechnolodzy niedawno uzyskali bardzo skuteczne narzędzie identyfikacji oparte na technikach HPLC i MS.



Rys. 9. Przykład rozdzielania peptydów powstałych po trawieniu trypsyną kazeiny na kolumnie Jupiter proteo 90 Å column [72]

CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA (AFFINITY CHROMATOGRAPHY)

Bardzo szerokie zastosowanie do rozdzielania białek znajdują szczególnie selektywne metody chromatografii powinowactwa (Affinity Chromatography). Ta technika jest przede wszystkim wykorzystywana do specyficznych zastosowań i do białek o konkretnych właściwościach. Jedynie tzw. chromatografia metalopowinowactwa [10,75] ma dość ogólne zastosowanie do rozdzielania białek i peptydów posiadających atomy siarki w cząsteczce. W innych zastosowaniach chromatografii powinowactwa metody postępowania są często zależne od enzymatycznych lub koenzymatycznych właściwości wyodrębnianych białek. Mimo stosowania nazwy „chromatografia powinowactwa”, metody powinowactwa winny być raczej zaliczane do grupy metod selektywnej chemisorpcji niż do metod chromatograficznych. Chromatografia powinowactwa zostanie szerzej omówiona w następnej pracy.

METODY DETEKCJI W CHROMATOGRAFII PEPTYDÓW I BIAŁEK

Do oznaczania obecności i stężenia peptydów i białek w eluacie wypływającym z kolumny chromatograficznej wykorzystywane są najczęściej detektory spektrofotometryczne w zakresie nadfioletu UV, albo w zakresie widzialnym VIS. Oznaczenie białek i peptydów może zostać ułatwione po zastosowaniu tzw. derywatywacji postkolumnowej ninhydryną. Detektory UV stosuje się w zakresie 215 nm, gdy rozdzielane peptydy zawierają jedynie chromofory pochodzące od wiązań peptydowych. Gdy w cząsteczkach peptydów zwarte są struktury aromatyczne, albo mostki disiarczkowe, wykorzystuje się wyższe długości fali (260-280 nm).

Gdy rozdzielane peptydy / białka występują w śladowych stężeniach wykorzystuje się fluorescencję stosując detektor fluoroescencyjny FLD. Zjawisko fluorescencji może zostać wykorzystane do oznaczania i identyfikacji peptydów i białek dzięki postkolumnowemu, albo prekolumnowemu zastosowaniu odczynnika derywatyzującego). Jako odczynniki derywatyzujące stosuje się różne związki lub mieszaniny związków, np. kwas jodoctowy z aldehydem o-ftalowym i 2-merkptoetanolem [76], 6-aminoquinolyl-N-hydroksysuccinimidyl carbamate, czy dialdehyd o-ftalowy [16]. Detektory fluorescencyjne są bardzo specyficzne wiele razy czulsze od detektorów spektrofotometrycznych.

Coraz powszechniej wykorzystywane są spektrometry mas w połączeniu z kolumnową chromatografią ciecząwą (LC-MS lub przeważnie z tandemowym spektrometrem mas LC-MS-MS) szczególnie do detekcji i oznaczenia masy molekularnej małych peptydów i fragmentów białek o niskim stężeniu w badanej próbce [77], szczególnie w burzliwie rozwijającej się proteomice. Zastosowanie w analityce śladowych zawartości peptydów znajdują też detektory elektrochemiczne [78].

PODSUMOWANIE

Przez wiele lat wykorzystywania chromatografii cieczowej do rozdzielania peptydów i białek udało się opracować szereg metod rozdzielania tych substancji i różnych sposobów wpływania na ich retencję. Dotychczas nie sformułowano ogólnych reguł racjonalnego doboru warunków rozdzielania w zależności od struktury cząsteczek rozdzielanych peptydów i białek. Elektroforeza żelowa nie jest odpowiednią techniką do separacji peptydów o niskich masach molekularnych, a elektroforeza kapilarna nie jest do końca wdrożona do zastosowań dla peptydów i białek, a szczególnie nie jest przydatna do zastosowań preparatywnych.

W konsekwencji metody chromatografii cieczowej pozostają jedyną uniwersalną metodą rozdzielania wszystkich mieszanin peptydów i białek. Metody chromatografii cieczowej są szczególnie przydatnymi narzędziami do rozdzielania i oznaczania peptydów i białek, a szczególnie peptydów o niskich masach cząsteczkowych, co więcej są nieocenione w procesie roz-

dzielania tych substancji w skali preparatywnej i przy ich przemysłowej produkcji.

Jednakże z powodu skomplikowanej budowy białek, ich zachowanie podczas procesu rozdzielania bywa często dalekie od reguł i poglądów.

Próba opracowania ogólnych reguł zależności retencji tych substancji od warunków rozdzielania w wybranych układach chromatograficznych jest przedmiotem aktualnie prowadzonych badań autorów niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] M. Zasloff, *Nature*, 415 (2002) 389.
- [2] T. Ganz, R.I. Lehrer, *Curr Opin Hematol.*, 9 (2002) 18.
- [3] W. Kamysz, M. Okrój and J. Łukasiak, *Acta Biochim. Pol.*, 50 (2003) 461.
- [4] K. Conceicao, K. Konno, M. Richardson, M.M. Antoniazzi, C. Jared, S. Daffre, A.C.M. Camargo, D.C. Pimenta, *Peptides*, 27 (2006) 3092.
- [5] T.V. Popa, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 1111 (2006) 192.
- [6] J. Amiot, L. Germain, S. Turgeon, M. Lemay, C. Ory-Salam, F.A. Auger, *Int. Dairy J.*, 14 (2004) 619.
- [7] G.B. Irvine, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 56 (2003) 233.
- [8] W. Warren, N.E. Astephen, T.E. Wheat, *J. Chromatogr. A*, 512 (1990) 13.
- [9] X. Chen, L. Hu, X. Su, L. Kong, M. Ye, H. Zou, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 40 (2006) 559.
- [10] W.-C. Lee, K.H. Lee, *Anal. Biochem.*, 324 (2004) 1.
- [11] A. Cecilia A. Roque, C. R. Lowe, *Biotechnol. Adv.*, 24 (2006) 17.
- [12] A. Bylina, M. Ulanowicz, *Chem. Anal.-Warsaw*, 43 (1998) 955.
- [13] R. Janzen, K.K. Unger, W. Müller, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 522 (1990) 77.
- [14] B. De Collongue-Poyet, C. Vidal-Madjar, B. Seville, K.K. Unger, *J. Chromatogr. B*, 664 (1995) 155.
- [15] J.L.M. McNay, J.P. O'Connell, E.J. Fernandez, *Biotechnol. Bioeng.*, 76 (3) (2001) 233.
- [16] A.B.P. Van Kuilenburg, A.E.M. Stroomer, G.J. Peters, A.H. Van Gennip, *J. Chromatogr. B*, 759 (2001) 51.
- [17] F. Moffat, P. Senkans, D. Ricketts, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 235.
- [18] G. Bordin, F. Cordeiro Raposo, B. De la Calle, A.R. Rodriguez, *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 63.
- [19] P. DePhillips, A.M. Lenhoff, *J. Chromatogr. A*, 933 (2001) 57.
- [20] F. Lesignoli, A. Germini, R. Carradini, S. Sforza, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 177.
- [21] D. Josić, H. Horn, P. Schulz, H. Schwinn, L. Britsch, *J. Chromatogr. A*, 796 (1998) 289.
- [22] G. Iberer, H. Schwinn, D. Josić, A. Jungbauer, A. Buchacher, *J. Chromatogr. A*, 921 (2001) 15.
- [23] T. Yoshida, T. Okada, *J. Chromatogr. A*, 840 (1999) 1.
- [24] J.L.M. McNay, E.J. Fernandez, *Biotechnol. Bioeng.*, 76 (3) (2001) 224.

- [25] S.U. Sane, S.M. Cramer, T.M. Przybycien, *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 149.
- [26] V. Sanz-Nebot, I. Toro, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A*, 870 (2000) 335;
- [27] the Reporter – Discovery BIO.
- [28] YMC INC. – “Liquid Chromatography Product Guide”.
- [29] K.A. Tweeten, T.N. Tweeten, *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 111.
- [30] J.K. Swadesh, *J. Chromatogr.*, 512 (1990) 315.
- [31] Y. Shen, X. Shao, K. O’Neill, J.S. Bradshaw, M.L.Lee, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 1.
- [32] J. River, R. McClintock, R. Galyean, H. Anderson, *J. Chromatogr.*, 288 (1984) 303.
- [33] P.A. Hartman, J.D. Stodola, G.C. Harbour, J.G. Hoedegheide, *J. Chromatogr.*, 360 (1986) 385.
- [34] N.H.C. Cooke, B.G. Archer, M.J. O’Hare, E.C. Nice, M. Capp, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 115.
- [35] G.B. Cox, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 353.
- [36] W.S. Hancock (Editor), “Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins”, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- [37] A.M. Krstulovic, P.R. Brown, “RP HPLC. Theory, Practice and Biomedical Applications”, John Wiley and Sons, New York, 1982.
- [38] N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoia, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 960 (2002) 85.
- [39] J.P. Boissel, H. Wajcman, H. Fabritius, R. Cabanes, D. Labie, *Biochim. Biophys. Acta.*, 670 (1981) 203.
- [40] D. Corradini, *LC-GC int.*, 9 (1996) 732.
- [41] J. Sugihara, T. Imamura, T. Imoto, T.H.J. Huisman, *Biochim. Biophys. Acta.*, 669 (1981) 105.
- [42] N.H.C. Cooke, B.G. Archer, M.J. O’Hare, E.C. Nice, M. Capp, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 115.
- [43] C.A. Bishop, W.S. Hancock, S.O. Brennan, R.W. Carrel, M.T.W. Hearn, *J. Liq. Chromatogr.*, 599 (1981) 4.
- [44] P. Szabelski, A. Cavazzani, K. Kaczmarek, X. Liu, J. Van Horn, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 950 (2002) 41.
- [45] C.L. Stevenson, M.M. Tan, *J. Pept. Res.*, 55 (2000) 129.
- [46] Y. Chen, A.R. Mehok, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 1043 (2004) 9.
- [47] W.S. Hancock, C.A. Bishop, R.L. Prestidge, M.T. Hearn, *Anal. Biochem.*, 89 (1978) 203.
- [48] D.M. Abercrombie, *Anal. Biochem.*, 125 (1982) 395.
- [49] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, J. Kohler, *J. Chromatogr.*, 384 (1987) 81.
- [50] B. Grego, F. Lambrou, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 266 (1983) 89.
- [51] H. Ishikawa, H. Tamaoki, *J. Ferment. Bioeng.*, 82 (1996) 140.
- [52] K. Stachowiak, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 1758.
- [53] K. Larsson, W. Hermann, P. Moller, D. Sanchez, *J. Chromatogr.*, 450 (1988) 71.

- [54] W.S. Hancock, J.T. Sparrow, *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 71.
- [55] M.A. Stadalius, L.R. Snyder, J. Berus, *LC-GC*, 6(6) (1988) 494.
- [56] Vydac – “2000/2001 HPLC Columns and Bulk Media”.
- [57] S-I. Wu, J. Frenz, *LC GC*, 6 (11) (1993) 684.
- [58] Aglient – “ZORBAX BioSeries GF-450 column”.
- [59] M.E. Lienqueo, A. Mahn, J.C. Salgado, J.A. Asenjo, *J. Chromatogr. B*, 849 (2007) 53.
- [60] J.A. Queiroz , C.T. Tomaz, J.M.S. Cabral, *J. Biotechnol.*, 87 (2001) 143.
- [61] A. Mahn, J.A. Asenjo, *Biotechnol. Adv.*, 23 (2005) 359.
- [62] YMC INC. – “Pack HIC Columns”.
- [63] J.Chen, Y. Sun, *J. Chromatogr. A*, 992 (2003) 29.
- [64] S. Hjerten, J. Rosengren, S. Pahlman, *J. Chromatogr.*, 101 (1974) 281.
- [65] C.T. Tomaz, J.A. Queiroz, *Biotechnol. Lett.*, 26 (2004) 223.
- [66] I. Neverova, J.E. Van Eyk, *J. Chromatogr. B*, 815 (2005) 51.
- [67] A.J. Link, *Trends Biotechnol.*, 20 (2002) 12.
- [68] J.C. Giddings, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1258A.
- [69] D. Wall, M. Kachman, S. Gong, R. Hinderer, S. Pavus, D. Misek, S. Hauash, D. Lubman, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1099.
- [70] D. Wolter, M.P. Washburn, J.R. Yates III, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5683.
- [71] L. Giggs, C. Sioma, F.E. Reginier, *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 359.
- [72] G.J. Opiteck, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, R.J. Anderegg, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1518.
- [73] G.J. Opiteck, S.M. Ramirez, J.W. Jorgenson, M.A. Moseley III, *Anal. Biochem.*, 258 (1998) 349.
- [74] Jupiter – “HPLC columns for the proteomic era”.
- [75] C. Roesli, G. Elia, D. Neri, *Clin. Biochem.*, 37 (2004) 579.
- [76] N.E. Labrou, *J. Chromatogr. B*, 790 (2003) 67.
- [77] Y.V. Tcherkas, A.D. Denisenko, *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 309.
- [78] W.A. Kleinman, J.P. Richie Jr., *Biochem. Pharmacol.*, 60 (2000) 19.