

УДК 543.544

ИОННАЯ СИЛА СТАРТОВОГО РАСТВОРА КАК ЭФФЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО ОПТИМИЗАЦИИ В ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИИ

А. В. Иванов, А. Б. Тессман, П. Н. Нестеренко, М. С. Вакштейн, А. В. Матвеев

(кафедра аналитической химии)

Оптимизация профиля градиента рН в хроматофокусировании возможна за счет правильного выбора ионной силы стартового раствора и элюента. Впервые показана применимость простых однокомпонентных элюентов в сочетании с высокой ионной силой стартового раствора для формирования квазилинейных градиентов в хроматофокусировании аминокислот и белков.

В настоящее время хроматофокусирование – хорошо разработанный вариант ионообменной хроматографии с внутриколоночным градиентом рН. Градиент рН внутри анионообменной хроматографической колонки формируется за счет ее предварительного уравнивания стартовым раствором, содержащим слабое основание, при высоком значении рН и в последующем пропуске буферного полиамфолитного элюента при более низком значении рН [1, 2]. Метод успешно применяют для разделения цвиттер-ионных соединений согласно их изоэлектрическим точкам; характеристикой разделения служит величина ΔpH для двух соседних пиков. В последние годы достигнуто разделение белков, изоэлектрические точки которых отличаются менее чем на 0,1 ед. рН, при этом ширина хроматографических пиков составляет 0,02–0,04 ед. рН [3–5]. Наилучшее разделение достигается при плавном линейном градиенте в широком диапазоне рН (т.е. при максимально протяженном в интервале рН и объемах эфлюента), для чего в качестве элюентов используют синтетические полиамфолиты или буферные смеси, составленные из слабых органических протолитов (до 20–30 компонентов) [2]. Однако если изоэлектрические точки белков лежат в пределах 1–2 ед. рН, то для их разделения достаточно сформировать градиент рН, линейный только в соответствующем диапазоне. Сейчас намечается тенденция к использованию более простых (трех-пятикомпонентных) элюентов для получения квазилинейных градиентов рН (линейных не на всем протяжении диапазона, а на отдельных участках), причем выбор компонентов элюента и оптимизацию их концентраций проводят как эмпирически, так и на основе модельных представлений [3–6]. Так, Фреем и сотр. на основе моделирования системы выбраны компоненты простого элюента (до 3 компонентов) и их концентрации для получения квазилинейных градиентов рН в диапазоне 9,5–7,0 [5–7]. Однако и при моделировании, и при эмпирическом подходе большинство исследователей не уделяют внимания составу стартового раствора и не рассматривают его параметры при оптимизации условий формирования градиента рН.

Разработанная нами ионообменная динамическая модель формирования градиента рН учитывает состав стартового раствора и элюента [8–10]. На основе этой модели впервые было показано и экспериментально подтверждено влияние ионной силы подвижных фаз на профиль внутреннего градиента рН [9, 10]. Показано,

что правильный выбор ионной силы подвижных фаз позволяет получить линейный градиент рН даже при использовании однокомпонентного элюента [10].

В данной статье продемонстрированы возможности оптимизации градиента рН в хроматофокусировании за счет ионной силы стартового раствора.

Экспериментальная часть

Аппаратура и реагенты. Использовали хроматографическую систему, состоящую из изократического насоса высокого давления «Beckman-114M» (США), инжектора «Rheodyne-7125» (США) с объемом петли 25 мкл, колонки из нержавеющей стали (250×4,6 мм), пластмассовой колонки (50×4,6 мм), стеклянной микроколонки (30×2 мм) в металлическом картридже, заполненных сорбентом Tetren-SiO₂ (7,5 мкм) на основе кремнезема Силасорб Si-600 с привитыми группами тетраэтиленпентамина [11, 12], УФ-детектора «Uvicord-2238» («LKB-Bromma», Швеция), самодельной проточной ячейки для измерения рН [13], цифрового рН-метра «TOA Electronics-НМ-20S» (Япония) с комбинированным электродом GST-5211С, перистальтического насоса низкого давления «Varioprep-2120» («LKB-Bromma», Швеция) и двухканального самописца «LKB-Bromma» (Швеция).

В качестве стартовых растворов использовали 25 мМ раствор Трис-НСl или 25 мМ Трис-Н₂С₂О₄ (рН 7,5); в качестве элюентов – 0,5–2 мМ растворы Н₂С₂О₄. Ионную силу стартового раствора и элюента создавали добавлением рассчитанного количества 4 М раствора NaCl. Все растворы готовили из препаратов фирмы «Merck» (Германия) или «Reanal» (Венгрия) квалификации «ч.д.а.». Лиофилизованная смесь изоформ плазминогена, полученная вытяжкой из плазмы крови, предоставлена сотрудником НИИ медицинской экологии (МНИИМЭ) С.М. Киселевым.

Методика эксперимента. Хроматографическую колонку уравнивали стартовым раствором до рН 7,5 (начальная точка градиента), затем пропускали элюент при рН 2,9–3,5 (конечная точка градиента). Кислотность эфлюента контролировали в проточной микроячейке и регистрировали сигнал цифрового рН-метра с помощью самописца. При разделении изоформ плазминогена и модельных смесей аминокислот в начальной точке градиента вводили пробу объемом 20 мкл и регистрировали сигналы рН-метра и УФ-детектора (280 нм) с помощью двухканального самописца.

Обсуждение результатов

Рекомендации по формированию квазилинейных градиентов рН. Ранее на примере модельных градиентов нами было показано и затем экспериментально подтверждено, что для получения линейных внутренних градиентов рН в широком диапазоне, а также квазилинейных внутренних градиентов рН с помощью простых элюентов, состоящих из 2–3 компонентов, предпочтительнее использовать полифункциональные сорбенты [9, 10, 14]. К таким сорбентам относятся кремнеземы, модифицированные группами диэтилентриамина или тетраэтиленпентамина (Dien-SiO_2 и Tetren-SiO_2), поскольку их протолитические свойства практически не меняются даже при заметном повышении ионной силы подвижных фаз. При создании ионной силы в элюенте, конечно, следует избегать ионной силы выше 0,01 не только из-за возможного свертывания разделяемых белков, но и из-за ухудшения профиля градиента рН (появления участка градиента с аномально высоким значением рН с последующим резким его снижением, как показано на рис. 1, кривая 1), что ускоряет элюирование разделяемых веществ из колонки вплоть до полного перекрытия их хроматографических зон. В случае, когда ионная сила элюента в 5–10 раз ниже ионной силы стартового раствора, градиент становится линейным в широком диапазоне рН (до 2–2,5 единиц) даже при использовании однокомпонентного элюента, а участки с аномальным увеличением рН исчезают (рис. 1, кривая 2). Нами получен градиент рН, линейный в диапазоне рН от 7,4 до 5,5, при использовании однокомпонентного элюента на основе щавелевой кислоты (ионная сила элюента $\sim 0,002$) и стартового раствора Трис-НС1 с ионной силой 0,03 (рис. 1, кривая 2). Дальнейшее повышение ионной силы стартового раствора до 0,1 уже практически не изменяет форму градиента. Невысокая ионная сила (концентрация $\text{NaCl} \sim 10^{-3}$ М) в элюенте за счет конкурирующих ионообменных процессов улучшает форму внутреннего градиента рН. Таким образом, ионная сила стартового раствора является эффективным средством оптимизации градиента рН. Заметим, что изменение ионной силы подвижных фаз для оптимизации профиля градиента рН в хроматофокусировании применено впервые нами в данной работе.

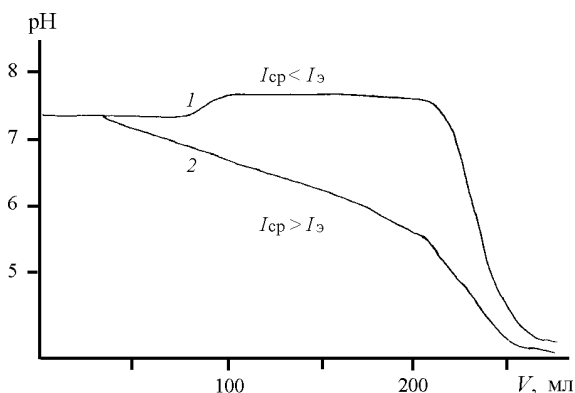


Рис. 1. Влияние ионной силы стартового раствора на профиль внутреннего градиента рН (колонка $250 \times 4,6$ мм, Tetren-SiO_2 , $7,5$ мкм; стартовый раствор — 25 мМ Трис-НС1 (рН $7,5$, $I_{\text{NaCl}} = 0,02$ М); элюент — 2 мМ $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (рН $2,95$, I_{NaCl} (М): 1 — $0,5$; 2 — $0,002$), 1 мл/мин

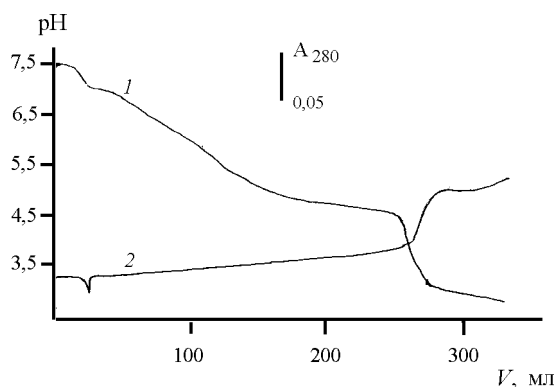


Рис. 2. Профиль внутреннего градиента рН (1) и базовая линия при УФ-детектировании (2) (условия см. в подписи к рис. 1)

Введение слабоосновного компонента (например, Трис или гексамина) в состав элюента для создания рН вызывает появление на профиле градиента либо участков с аномальным увеличением рН, либо делает профиль ступенчатым [10, 14]. Таким образом, для получения более плавного, линейного градиента рН предпочтительно использовать:

- 1) полифункциональные сорбенты;
- 2) элюенты с минимальным содержанием слабоосновного компонента при невысокой ионной силе ($\sim 0,001$);
- 3) стартовые растворы с ионной силой в 5–10 раз выше, чем у элюента.

Если требуется сформировать протяженный градиент рН, то ионную силу элюента следует понижать, если более резкий градиент (например, для уменьшения времени элюирования в хроматофокусировании неорганических ионов), то повышать до значения ионной силы стартового раствора.

Примеры использования квазилинейных градиентов рН, полученных при высокой ионной силе стартового раствора. Модельная смесь аминокислот. Квазилинейные градиенты рН, сформированные при использовании однокомпонентного элюента на основе растворов $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ переменной концентрации, применяли для разделения модельной смеси аминокислот, чтобы показать возможности подобных элюентов в сочетании с правильным выбором ионной силы подвижных фаз при аналитическом и препаративном хроматофокусировании. Для наблюдения за всеми эффектами при формировании градиента использовали колонку размером $250 \times 4,6$ мм. Состав эффлюента контролировали фотометрически при 280 нм, поскольку большинство аминокислот имеют максимумы поглощения в УФ-области спектра; рН эффлюента непрерывно измеряли в проточной ячейке (рис. 2). При использовании 2 мМ раствора $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ в качестве элюента оптическая плотность эффлюента меняется незначительно; базовая линия при фотометрическом детектировании достаточно ровная и линейная (рис. 2, кривая 2). На базовой линии наблюдается один отрицательный пик, связанный с полным элюированием стартового раствора из колонки. Подъем на базовой линии соответствует понижению рН после протяженного линейного участка градиента (рН $7,5$ – $5,0$), но это не должно мешать детектированию аминокислот, изоэлектрические точки которых лежат выше

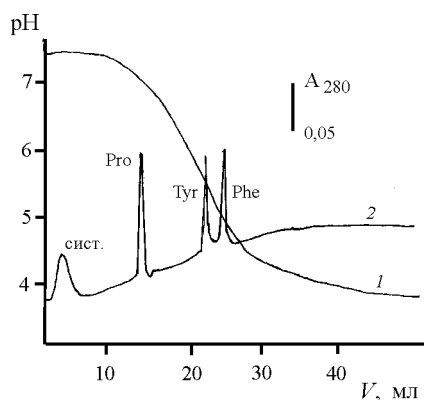


Рис. 3. Разделение модельной смеси аминокислот: 1 – профиль внутреннего градиента pH, 2 – хроматограмма смеси (колонка 50×4,6 мм, Tetren-SiO₂, 7,5 мкм; стартовый раствор – 25 мМ Н₂С₂О₄ или Трис-НСl (pH 7,5, I_{NaCl} = 0,02 М); элюент – 2 мМ Н₂С₂О₄ (pH 2,95, I_{NaCl} (М): 1 – 0,5; 2 – 0,002), 1 мл/мин. УФ-детектирование при 280 нм)

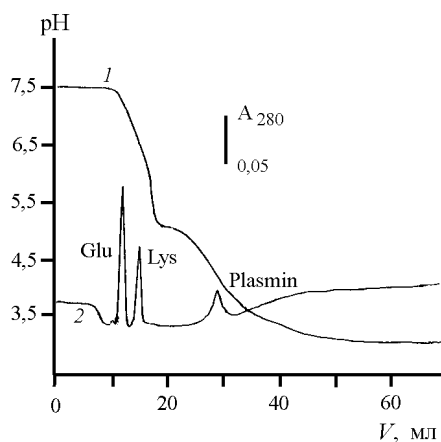


Рис. 4. Разделение изоформ плазминогена в лиофилизованном образце: 1 – профиль внутреннего градиента pH, 2 – хроматограмма (условия см. в подписи к рис. 3)

pH 5,0 (рис. 2). Однако формирование линейного участка градиента внутри колонки 250×4,6 мм занимает более 3 ч, в связи с чем мы перешли к более короткой хроматографической колонке (50×4,6 мм). Формирование квази-линейного градиента pH в аналогичных условиях занимает около 40 мин, при этом подъем базовой линии частично сглаживается. На рис. 3 показано разделение модельной смеси пролина (Pro), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe), изоэлектрические точки которых равны 6,30, 5,66 и 5,48 соответственно [15]. Хроматографические пики аминокислот достаточно узкие и симметричные по форме, что говорит о наличии фокусирующего эффекта [1]. Порядок элюирования аминокислот и их положение на хроматограмме относительно градиента pH согласуются со значениями их изоэлектрических точек. Первый (неидентифицированный) пик на хроматограмме, возможно, связан с незначительной перегрузкой ионообменной колонки аминокислотами.

Разделение изоформ плазминогена. Изоформы плазминогена (неактивный белок Glu-плазминоген и активный белок Lys-плазминоген) имеют очень близкие значения изоэлектрических точек (5,82 и 5,66 соответственно) [16], и их практически невозможно разделить методом ионообменной хроматографии при изократическом

элюировании. Задача разделения активной и неактивной форм плазминогена актуальна для биохимиков и медиков. Мы проверили возможность разделения изоформ плазминогена методом хроматофокусирования при использовании простого однокомпонентного элюента. Хроматограмма лиофилизованного образца смеси изоформ плазминогена представлена на рис. 4. Лиофилизованный образец смеси растворяли в дистиллированной воде непосредственно перед хроматографированием. Несмотря на достаточно резкое снижение pH (от 7,5 до 5,4), Glu- и Lys-изоформы плазминогена удалось разделить в соответствии с их изоэлектрическими точками. Ступень на профиле градиента, вероятно, объясняется некоторым буферным действием белков как полиамфолитов. Пики изоформ симметричны и имеют практически одинаковую ширину, что объясняется фокусирующим эффектом. Наличие на хроматограмме третьего пика объясняется присутствием в образце остатков после лиофилизации плазмы крови, а также частичным переходом активного Lys-плазминогена в плазмин. Разделение Glu- и Lys-плазминогена на колонке 50×4,6 мм происходит за 20 мин, для полного элюирования образца требуется около 40 мин; на колонке 30×2 мм при использовании 0,5 мМ Н₂С₂О₄ в качестве элюента разделение происходит за ~15 мин, при этом градиент становится более линейным.

Таким образом, показана применимость простых однокомпонентных элюентов в сочетании с высокой ионной силой стартового раствора для формирования квазилинейных градиентов pH в хроматофокусировании аминокислот и белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хроматофокусирование Полибуфером на ПБИ (russian translation). Stockholm-Uppsala, 1981.
2. Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K. // J.Chromatogr. 1986. **359**. P. 157.
3. Liu Y., Anderson D.J. // J.Chromatogr. 1997. **762**. P. 207.
4. Janacek M., Salamoun J., Slais K. // Chromatographia. 1991. **32**. P. 61.
5. Bates R.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. 1998. **814**. P. 43.
6. Narahari C.R., Strong J.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. 1998. **825**. P. 115.
7. Kang X., Bates R.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. 2000. **890**. P. 37.
8. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. С. 1683.
9. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. С. 2054.
10. Тессман А.Б., Иванов А.В., Вахштейн М.С., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 2001. **75**. С. 284.
11. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии / Под ред. Г.В.Лисичкина. М., 1986.
12. Нестеренко П.Н., Иванов А.В., Галева Н.А., Сеневиратне Дж.Б.Ч. // ЖАХ. 1997. **52**. С. 814.
13. Иванов А.В., Тессман А.Б. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия. 1999. **40**. С. 241.
14. Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н., Рунов В.К. // ЖФХ. 2000. **74**. С. 1103.
15. Snow J.T. Peptides. Derivatized amino acids. California, 1988.
16. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М., 1987.