

УДК: 543.544

А.В.Иванов<sup>1</sup>, М.С.Вакштейн<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет; 119992, г. Москва, ГСП-2, Ленинские горы; [sandro@analyt.chem.msu.ru](mailto:sandro@analyt.chem.msu.ru)  
<sup>2</sup>ФГУП "Научно-исследовательский институт прикладной акустики", Центр высоких технологий; г. Дубна, Московская область

## ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЕ БИПОЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА КАТИОНООБМЕННЫХ КОЛОНКАХ С ПОМОЩЬЮ ПРОСТЫХ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ

Получена 8 октября 2007 года

Опубликована 18 октября 2007 года

03.00.23 – Биотехнологии

Изучено формирование восходящих градиентов pH внутри колонок, заполненных катионообменниками с привитыми карбоксильными или сульфогруппами, при использовании элюентов простого состава (1 - 2 компонента). Оптимальные подвижные фазы для карбоксильных колонок содержат лимонную кислоту (2 – 5 мМ) и Трис (1,5 – 20 мМ), для сульфокатионообменной колонки -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (3 – 10 мМ) и Трис (до 6 мМ) в качестве активных компонентов. Наиболее плавные, практически линейные градиенты pH в карбоксильных колонках формируются при создании ионной силы 0,05 - 0,5 в одной или обеих подвижных фазах – стартовом растворе и элюенте. В случае сульфокатионита предпочтительнее создавать в подвижных фазах ионную силу 0,1 - 0,3. Полученные градиенты сравнимы с градиентами pH, сформированными при использовании синтетического полиамфолитного элюента "Полибуфер-96". Возможности аналитического применения простых элюентов в хроматофокусировании показаны на примерах разделения модельной смеси белков, изоформ формиатдегидрогеназы и трипсинового гидролизата белка.

Ключевые слова: хроматофокусирование, простые элюенты, линейные градиенты pH, карбоксильные и сульфокатионообменные колонки

### ВВЕДЕНИЕ

Хроматофокусирование (ХФ) - вариант ионообменной хроматографии в сочетании с градиентом pH, создаваемым внутри колонки - был предложен Слайтерманом в 1978 - 79 гг. [1-3] и теперь широко применяется для разделения биологических биполярных макромолекул (белков, ферментов, пептидов), препаративного выделения отдельных фракций в

биотехнологических процессах и для целей биохимического анализа [3-5]. Для создания внутреннего градиента рН хроматографическую колонку предварительно уравнивают стартовым буферным раствором до рН, соответствующего начальной точке градиента, а затем пропускают буферный элюент (как правило, раствор высокомолекулярного амфолита) при резко отличающемся рН. Слайтерман, разработавший метод, предполагал, что градиент рН формируется, за счет постепенного титрования ионообменного сорбента буферным элюентом, и чем выше буферная емкость системы в целом, тем более плавный и линейный градиент рН формируется внутри колонки [1, 2]. Таким образом, традиционно считается, что сорбент для ХФ должен быть слабоосновным или слабокислотным, чтобы обладать буферирующей способностью [2, 4]. Как правило, нисходящие градиенты рН формируют в колонках, заполненных слабоосновными анионообменниками с привитыми первичными и вторичными аминогруппами. Для формирования восходящих градиентов рН в качестве сорбентов используют слабокислотные катионообменники с карбоксильными группами [3-5]. Внутренние градиенты хорошо воспроизводимы и могут быть линейными в интервале до 4 - 5 ед. рН [1, 4]. Биполярные вещества разделяются в условиях градиента рН в соответствии с их изоэлектрическими точками (рI). Так, достигнуто разделение белков, у которых рI отличаются на 0,05 ед. рН [3, 6].

Основные направления развития ХФ связаны с поиском новых подвижных фаз (в первую очередь элюентов) и сорбентов. Рассмотрим последовательно эти направления. Синтетические полиамфолитные элюенты - "Polybuffer", "Buffalyte", "Pharmalyte" и др., традиционно используемые в ХФ, - легко подвергаются биodeградации под действием бактерий; из-за высокого собственного светопоглощения затрудняют УФ-детектирование некоторых ферментов и неароматических пептидов ниже 254 нм. Синтез

полиамфолитов достаточно сложен и дорог. В ряде случаев при препаративном разделении белков требуется последующая очистка компонента от полибуферного элюента [6]. Эти недостатки приводят к ограничению возможностей метода ХФ. При замене синтетических полиамфолитных элюентов многокомпонентными (до 20 - 30 простых компонентов) буферными смесями слабых кислот, оснований и амфолитов можно получить плавные линейные градиенты в широком диапазоне рН [7, 8]. Однако распространения этот подход не получил - выбор и составление подобных смесей очень трудоемко, а стоимость многокомпонентного элюента в результате может превышать стоимость коммерческого "Полибуфера" [8]. Фрею и сотр. удалось сформировать плавные внутренние градиенты в ограниченном диапазоне рН с использованием элюентов, состоящих из 3 - 5 компонентов [8, 9]. В наших предыдущих работах мы показали, что для создания плавных нисходящих градиентов можно успешно применять однокомпонентные элюенты в сочетании с добавками сильного электролита [10 - 12]. Однако для формирования восходящих градиентов рН по-прежнему актуален поиск более простых элюентов.

Расширение круга ионообменных сорбентов для ХФ также представляет интересную задачу. Так, еще в 1986 г. появилась работа [13], в которой были предприняты попытки сформировать нисходящий градиент рН внутри сильноосновной анионообменной колонки. В 2004 - 2005 гг. предложен вариант ХФ на сильнокислотных катионообменниках с восходящим градиентом рН для разделения смесей белков и трипсиновых олигопептидов [14, 15]. В качестве элюента использовали полиамфолитный "Полибуфер-96", что осложнило детектирование неароматических олигопептидов ниже 254 нм. Таким образом, выбор компонентов для простых подвижных фаз актуален и для сильнокислотных катионообменных

систем. Можно предположить, что добавки сильного электролита в подвижные фазы будут способствовать формированию градиентов рН, не уступающих полученным с помощью полиамфолитов. Наряду со снижением стоимости метода можно ожидать, что применение простых элюентов облегчит детектирование в области 200 нм, где поглощает пептидная связь.

Выбору простых элюентов для формирования градиентов рН в слабо- и сильнокислотных системах и их возможному применению в ХФ и посвящена данная статья.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Аппаратура.** Использовали хроматографическую систему, включающую насос высокого давления К-120 (Кнауер, Германия) или LC-10 АТ (Shimadzu, Япония); инжектор (Кнауер, Германия) с объемом петли 20 - 100 мкл; хроматографическую колонку (50x4,6 мм), заполненную сорбентом MacroPrep 50 CM или MN, или стальную хроматографическую колонку PRP-X200 (250x4,1 мм), заполненную сульфокатионообменником; УФ детектор MicroUvis 20 (Carlo Erba Instruments, США); цифровой рН-метр НМ-20S (TOA Electronics, Япония) с комбинированным стеклянным электродом GST-5211С и проточной ячейкой. Сигналы детекторов регистрировали на персональном компьютере с АЦП и обрабатывали с помощью программы "Мультихром 1.52" (Амперсенд, Россия).

**Сорбенты.** Использовали: а) MacroPrep 50 CM (BioRad, США) на основе полиметилметакрилата с карбоксиметильными группами, размер частиц 50 мкм, ионообменная емкость (по данным производителя)  $0,21 \pm 0,04$  ммоль/мл геля; матрица гидролитически устойчива при рН от 2 - 3 до 13; б) MN (Purolite, Великобритания) на основе сверхсшитого полистирола с карбоксильными группами, размер частиц 5 мкм, матрица устойчива при рН 1 - 13, данные по ионообменной емкости отсутствуют; в) PRP-X200

(Hamilton, США) на основе полистиролдивинилбензола с привитыми сульфогруппами, размер частиц 10 мкм, матрица сорбента устойчива при pH 0-13, данные по ионообменной емкости отсутствуют. Сорбент предоставлен д.х.н. П.Н.Нестеренко.

**Реагенты и растворы.** В качестве компонентов стартовых растворов использовали уксусную, щавелевую, винную, лимонную кислоты,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Реахим, Россия) и Трис (Merck, Германия), в качестве элюентов - 1:10 - 1:25 растворы "Полибуфера-96" (Pharmacia, Швеция), растворы Трис,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и лимонной кислоты. Необходимую кислотность растворов создавали добавлением HCl. Для создания ионной силы в подвижных фазах добавляли рассчитанное количество 2 М раствора NaCl, приготовленного из фиксанала (Germed, ГДР). В ряде случаев в подвижные фазы добавляли до 10 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Химмед, Россия). Все используемые реактивы имели квалификацию ч.д.а. Препараты белков (овальбумина и бычьего сывороточного альбумина) для модельной смеси, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и трипсин предоставлены проф. А.П.Синицыным. Образец формиаатдегидрогеназы (ФДГ) с концентрацией 1 мг/мл предоставлен проф. В.И.Тишковым.

**Методика получения трипсинового гидролизата.** Навеску ЧСА растворяли в 50 мМ буферном растворе Трис - HCl (pH 8,5). Раствор трипсина (1 мг/мл) готовили растворением трипсина в 1 мМ HCl. Для получения гидролизата смешивали трипсин и субстратный белок (2 мг/мл ЧСА) в массовом соотношении 1:25, образовавшуюся смесь оставляли на 24 ч в термостате при 37°C [14, 15].

**Методика эксперимента.** Пропускали стартовый раствор (СР) при pH 2,7 - 3,3 до уравнивания колонки (т.е. до совпадения pH на входе и выходе колонки) и установления постоянной базовой линии УФ детектора, а

затем меняли стартовый раствор на элюент (Э) (рН 7,0 - 7,6) и регистрировали рН эффлюента в проточной ячейке. При разделении модельной смеси белков (по 0,02 мг) или ФДГ в колонку вводили 10 - 50 мкл пробы при рН стартового раствора и одновременно регистрировали сигналы рН-метра и УФ детектора (214-280 нм). Пробу трипсинового гидролизата (смесь пептидов) вводили либо во время пропускания стартового раствора, либо после замены стартового раствора на элюент. Объемная скорость подвижных фаз составляла 1 мл/мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Слабокислотные катионообменные колонки.** Для разделения биполярных соединений на катионообменных сорбентах необходимо использовать восходящие градиенты рН, так как биполярные соединения в кислой среде (при  $\text{pH} < \text{pI}$ ) заряжены положительно и могут сорбироваться на катионообменнике. С другой стороны, при  $\text{pH} < 3$  карбоксильные группы сорбента полностью переходят в протонированную форму и, следовательно, ионный обмен на них не идет. К тому же столь кислая среда может приводить к денатурации большинства белков, что неблагоприятно для выделения белков в нативной форме. Поэтому на слабых катионообменниках приходится формировать градиент от значений рН не ниже 2,5 – 3. Конечное значение градиента рН определяется максимальными значениями  $\text{pI}$  разделяемых веществ и обычно не превышает 7 - 8.

*Влияние состава и концентрации подвижных фаз.* В качестве стартовых растворов выбрали уксусную, щавелевую, винную, лимонную кислоты, обладающие буферной емкостью в кислой области. Исходя из систем, подобранных для формирования нисходящих градиентов [12], элюенты простого состава готовили из слабого основания (Трис) и

карбоновой кислоты. Градиент, полученный при использовании "Полибуфера-96", плавный и достаточно линейный в области рН 4 - 7, что оптимально для задач хроматофокусирования. Природа слабой кислоты в составе стартового раствора практически не сказывается на профиле градиента, за исключением начального участка (при рН < 4): наиболее плавным этот участок был для лимонной и винной кислот. Варьирование концентрации кислоты (1 - 6 мМ) не привело к изменению формы участка, поэтому в дальнейшем использовали стартовые растворы на основе 2 мМ лимонной кислоты. Элюент на основе одного буферного компонента (Трис) не позволяет сформировать градиент приемлемой формы: после рН > 4 наблюдается резкое повышение кислотности на 3,5 ед. Видимо, на начальном участке сказываются буферные свойства лимонной кислоты, а Трис при рН < 7 практически не обладает буферной емкостью. Кроме того, выход градиента занял около 2 час. При добавлении лимонной кислоты в элюент наблюдали типичный квази-линейный градиент [8, 9], т.е. состоящий из двух практически линейных участков, плавно переходящих из одного в другой при рН 5,5. Однако градиент выходит за продолжительное время. Повышение концентрации лимонной кислоты в элюенте до 6 мМ и одновременно - концентрации Трис до 25 мМ позволяет получить достаточно плавный градиент в области рН 4,5 - 6,1, вместе с тем сокращается и время выхода градиента (рис.1, кривая 1). Однако на профиле градиента еще наблюдается участок с резким подъемом рН в области 3 - 4,5, что может оказаться существенным при разделении белков, имеющих  $pI < 4,5$ . Этот участок можно сделать более плавным за счет добавления Трис в стартовый раствор, либо за счет выбора ионной силы подвижных фаз.

*Влияние слабого основания в стартовом растворе.* Добавление в стартовый раствор компонентов иной природы (например, слабой кислоты –

к слабому основанию и наоборот) позволяет изменять начальные участки градиента, что ранее было проверено для анионообменных систем [10]. В присутствии 1 - 2 мМ Трис в стартовом растворе несколько сглаживается начальный участок градиента, при этом в целом сохраняется общий вид градиента, время достижения конечного рН практически не увеличивается. Как показывают эксперименты с нисходящими градиентами рН на слабых анионо- и катионообменных сорбентах, на форму градиента существенно влияет ионная сила подвижных фаз.

*Влияние ионной силы элюента.* При изменении ионной силы подвижной фазы изменяются и условные константы протонирования (или диссоциации) функциональных групп сорбента; в результате сорбент проявляет буферные свойства в более широком диапазоне рН, чем при отсутствии сильного электролита. Такие сорбенты называют полиэлектролитными [4, 10, 11]. Слабые катионообменники на поверхности имеют примерно одинаковый набор функциональных групп (карбокислых или карбоксиметильных), и для них полиэлектролитные свойства менее выражены [4]. Однако присутствие сильного электролита в элюенте и стартовом растворе проявляется и в этом случае. На рис.1 показаны градиенты, полученные при повышении концентрации сильного электролита (NaCl) в элюенте на основе растворов Трис и лимонной кислоты.

Профили полученных градиентов можно разделить на три характерных участка: 1 – начальный участок с понижением рН ниже рН стартового раствора, 2 – продолжительный (до 50 – 60 мин) линейный участок с плавным повышением рН, 3 – участок с более резким возрастанием рН до значения кислотности элюента. Следует отметить, что в первых порциях эффлюента рН примерно совпадает со значением рН стартового раствора, что обусловлено вытеснением стартового раствора из пор и пустот между



частицами сорбента. При создании в стартовом растворе ионной силы 0,01 - 0,1 на 3-ем участке градиента происходит более резкое изменение рН, на начальном участке не наблюдается уменьшения рН ниже значения кислотности стартового раствора, а время выхода градиента сокращается на 10 - 15 мин. Более быстрый выход градиента можно связать с тем, что карбоксильные группы сорбента при рН 7,5 находятся в состоянии, близком к равновесному, так как уравнивание данной системы стартовым раствором с высокой ионной силой приводит к увеличению условных констант диссоциации. Резкое повышение рН в области 6,5 - 7,5 ограничивает применение такого градиента при разделении биполярных соединений, значения  $pI$  которых попадают в данный диапазон. Однако такой градиент можно применять в хроматофокусировании соединений с  $pI$  3 - 6.

Градиент, полученный с помощью простого двухкомпонентного элюента в присутствии NaCl (рис.1, кривая 3), имеет такой же наклон, что и у градиента, сформированного при использовании "Полибуфера". Продолжительность выхода градиентов также соизмерима. Таким образом, удалось получить градиент рН, по качеству не уступающий формируемым коммерческими полиамфолитами, который можно применять для разделения и очистки биологических макромолекул (например, белков и ферментов).

*Разделение модельной смеси белков.* Для оценки возможного применения полученных градиентов в хроматофокусировании разделили модельную смесь (по 0,5 мг) двух белков с близкими значениями изоэлектрических точек: овальбумин ( $pI$  4,7) и бычий сывороточный альбумин (БСА) ( $pI$  4,9). Объем пробы составлял 20 мкл. Присутствие сильного электролита в элюенте привело к элюированию белков при рН ниже их изоэлектрических точек (при рН 3,8 и 3,9 соответственно). Подобный

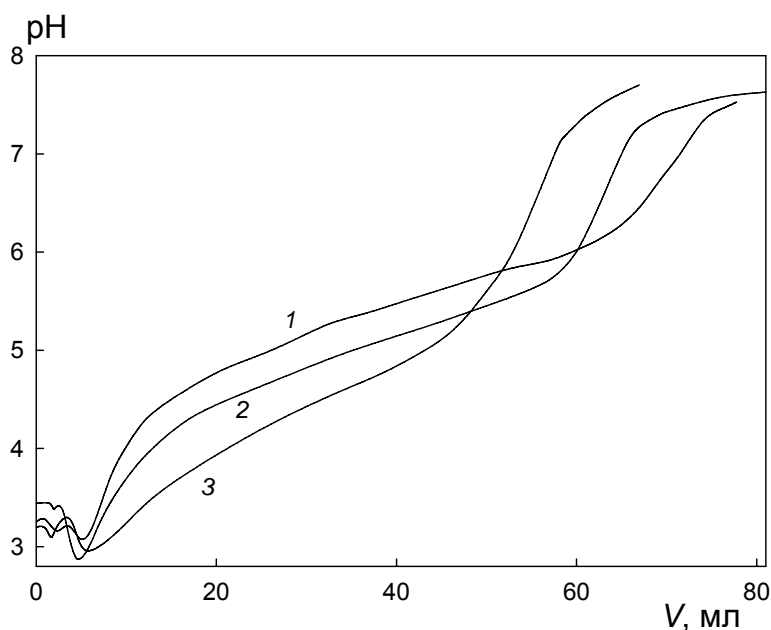


Рис. 1. Влияние ионной силы элюента на профиль градиента pH. Сорбент: МаслоPrep 50 CM. CP: 2 мМ лимонная кислота + 1,5 мМ Трис (pH 3,3); Э: 20 мМ Трис + 5 мМ лимонная кислота (pH 7,6), ионная сила (NaCl): 0 (1), 0,01 (2), 0,5 (3).

эффект отмечали еще Слайтерман [1] и Фрей [5] при разделении БСА и лактоглобулинов. Причина изменения значений изоэлектрических точек белков заключается в изменении доннановского потенциала при повышении ионной силы раствора, причем данное изменение для разных белков происходит на разные величины ед. pH. На кажущиеся  $pI$  белков может влиять и взаимодействие разделяемых белков с полибуферным элюентом [5].

На полученной хроматограмме (рис.2) пики узкие и симметричные и близкие по ширине, что в целом говорит о наличии фокусирующего эффекта [1, 3]; разделение происходит до базовой линии. Разница в pH, при которых элюируются белки, составляет 0,1 ед., в то время как при хроматофокусировании белков с "Полибуфером-96" или "Полибуфером-74" минимально достигнутая разница – 0,05 ед. pH [3]. Вероятно, здесь имеют место сразу два механизма разделения: по изоэлектрическим точкам

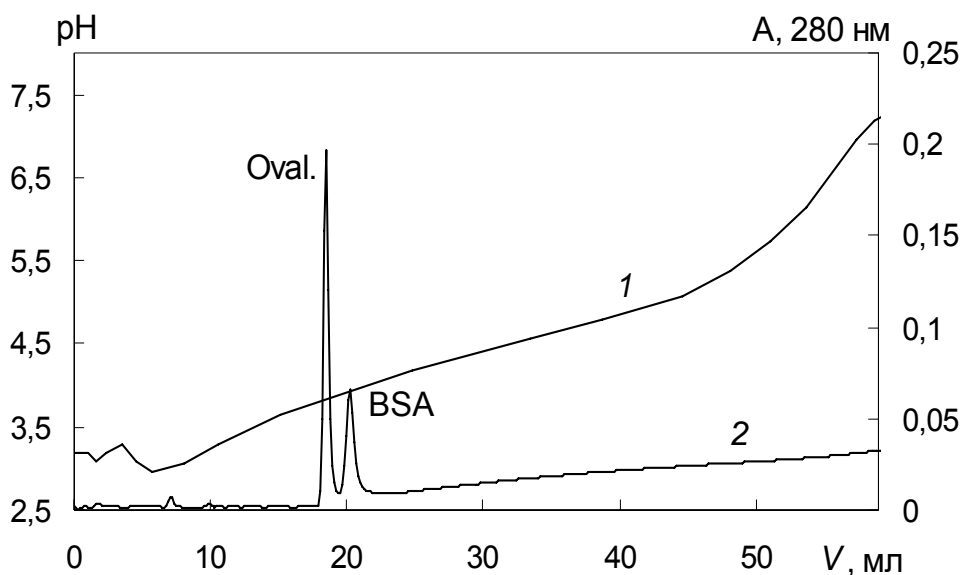


Рис. 2. Хроматофокусирование модельной смеси овальбумина (Oval) и бычьего сывороточного альбумина (BSA). СР: 2 мМ лимонная кислота + 1,5 мМ Трис (pH 3,3); Э: 20 мМ Трис + 5 мМ лимонная кислота, ионная сила (NaCl): 0,5 (pH 7,6). 1 - градиент pH, 2 - хроматограмма смеси.

(хроматофокусирование) и по общему заряду на поверхности белков (ионообменная хроматография с солевым градиентом). Достаточно крупный размер частиц сорбента (50 мкм) не оказал отрицательного влияния на форму хроматографических пиков в условиях фокусирования. Полученные пики занимают лишь малую часть градиента pH, что говорит о возможностях применения выбранных условий для разделения сложных смесей биполярных соединений методом хроматофокусирования.

*Восходящие градиенты pH на сорбенте низкой емкости.* Изучили влияние ионной силы подвижных фаз на профиль градиентов pH, полученных на карбоксильном сорбенте с низкой ионообменной емкостью, где вклад функциональных групп сорбента в процесс формирования градиента снижается. В качестве такого сорбента выбрали MN на основе сверхсшитого полистирола. По нашим оценкам, ионообменная емкость MN примерно в 3 - 4 раза ниже, чем емкость сорбента MacroPrep 50 CM [16].

Можно ожидать сокращения времени формирования градиента, что важно при решении аналитических задач. Компоненты для стартового раствора и элюента выбрали на основе экспериментальных данных по формированию восходящих градиентов рН на сорбенте MacroPrep 50 CM: в качестве стартового раствора использовали 2 мМ лимонную кислоту, а элюентом служила буферная смесь Трис и лимонной кислоты.

При отсутствии сильного электролита в подвижных фазах форма градиента аналогична полученной на колонке MacroPrep 50 CM в подобных условиях, однако время достижения конечного значения рН заметно сокращается за счет меньшей ионообменной емкости сорбента (рис.3, кривая 1). Создание ионной силы в элюенте (до 0,05 - 0,1) способствует сглаживанию отдельных участков градиента, диапазон линейного участка увеличивается до 2,5 ед. рН, но вместе с тем увеличивается до 50 - 60 мин общее время выхода градиента. Добавление сильного электролита в стартовый раствор незначительно увеличивает время выхода градиента рН, но при этом градиент становится практически линейным. В этом случае в системе формируется и практически линейный градиент ионной силы, выходящий за время, соизмеримое с формированием градиента рН внутри колонки [16]. Концентрация сильного электролита изменяется внутри колонки плавно, что приводит к постепенному изменению констант диссоциации функциональных групп сорбента и, соответственно, к расширению интервала буферной емкости данного сорбента. Добавление одинакового количества NaCl как в стартовый раствор, так и в элюент не приводит к заметному изменению формы градиента по сравнению с добавлением сильного электролита только в элюент. В данном случае градиент ионной силы отсутствует, и через 7 - 8 мин после начала пропускания элюента обе системы становятся одинаковыми - из-за быстрого

переуравновешивания колонки до значения ионной силы элюента (0,05). Для всех приведенных градиентов наблюдали начальный участок (~8 мин) без изменения рН: видимо, здесь происходит вытеснение стартового раствора из пор сорбента и межчастичного пространства, а для системы с высокой ионной силой в элюенте за это время успевает произойти и насыщение сорбента сильным электролитом. Таким образом, наиболее линейный градиент рН, полученный при создании ионной силы в стартовом растворе, представляется оптимальным для использования в хроматофокусировании.

*Разделение изоформ ФДГ.* В качестве объекта исследований выбрали образец рекомбинантной формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий (концентрация препарата 1 мг/мл), выделенной из клеток *E.coli*. Предварительная очистка фермента, проведенная на кафедре химической энзимологии МГУ, обеспечивает чистоту образца не менее 90% по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Структура ФДГ содержит несколько дисульфидных мостиков, которые при хранении фермента в растворе способны окисляться до сульфогрупп, образуя изоформы ФДГ с различным количеством заряженных групп на поверхности. Провели хроматофокусирование образца с использованием градиента рН, полученного при создании высокой ионной силы в стартовом растворе (рис.3). Объем пробы составлял 20 мкл.

Наблюдаемые пики соответствуют двум изоформам формиатдегидрогеназы. Как видно из рис.3, они соизмеримы по площади, что косвенно свидетельствует об их происхождении за счет образования изоформ в сопоставимых количествах. На профиле базовой линии оптической плотности наблюдается дрейф, вызванный различием в оптической плотности стартового раствора и элюента, что подтвердили проведением контрольного опыта.

Таким образом, показана возможность формирования плавных, практически линейных градиентов рН в катионообменных системах простыми двухкомпонентными элюентами. Полученные градиенты можно применять для разделения белков методом хроматофокусирования.

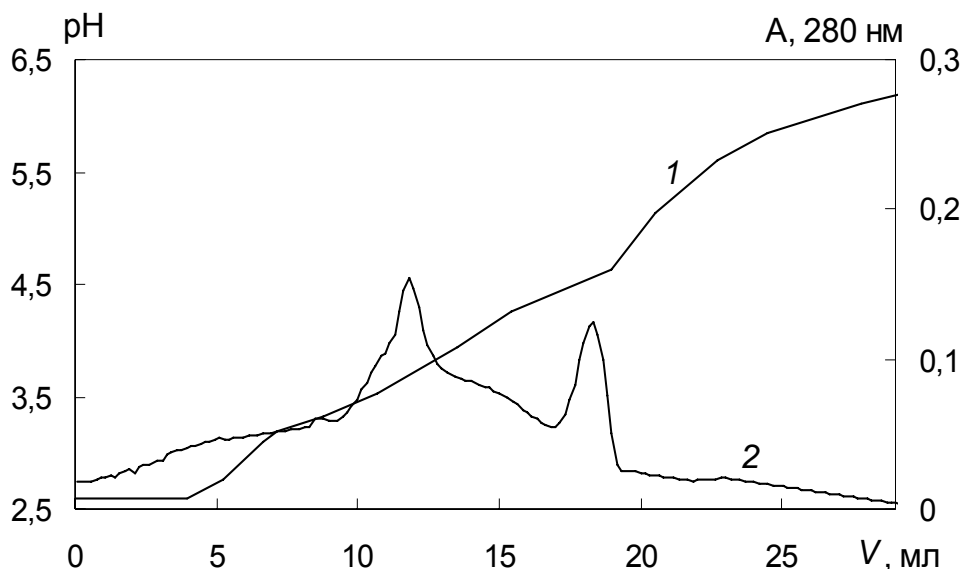


Рис. 3. Хроматофокусирование образца ФДГ. Сорбент: MN. СР: 2 мМ лимонная кислота (рН 3,0) ионная сила (NaCl) 0,05; Э: 10 мМ Трис + лимонная кислота (рН 7,5). 1 – градиент рН, 2 – хроматограмма.

## 2. Сильнокислотная катионообменная колонка.

*Подвижные фазы на основе лимонной кислоты и Трис.* Роль подвижных фаз - стартового раствора и буферного элюента – очень важна при создании градиентов рН в колонке с сульфокатионообменным сорбентом, не обладающем буферной емкостью. В качестве активных компонентов обеих подвижных фаз выбрали лимонную кислоту и Трис: лимонная кислота обеспечивает буферную емкость в области рН 3 - 6, а Трис – ближе к рН 7. Для упрощения системы создали равную концентрацию лимонной кислоты и Трис в стартовом растворе и в элюенте. В течение 6 - 7 мин после начала пропускания элюента рН на выходе из колонки оставался постоянным, затем начиналось увеличение рН. Полученный градиент линейен

в области рН 3,5 - 6,2, однако по времени линейный участок продолжался не более 3 мин, что недостаточно для задач разделения. Безусловно, на сильнокислотном катионообменнике невозможно создать достаточно протяженный по времени линейный градиент, так как сульфогруппы сорбента практически не участвуют в протолитических равновесиях в этой области рН и оказывают небольшое сопротивление при переуравновешивании сорбента до другого значения рН. Разбавление элюента в 2 раза при сохранении концентрации стартового раствора не привело к заметному изменению формы градиента рН. Однако при добавлении сильного электролита (NaCl) в элюент до концентрации 0,05 М форма градиента становится более плавной. Линейный участок градиента рН в интервале от 3 до 6,5 продолжается около 7 мин. Изученную систему (стартовый раствор – 10 мМ лимонная кислота + Трис; элюент - 5 мМ лимонная кислота + Трис + 0,05 М NaCl) попытались применить для разделения трипсинового гидролизата человеческого сывороточного альбумина. К сожалению, фоновый сигнал цитратного элюента при рекомендованной для пептидов длине волны 214 нм [14, 15] оказался еще достаточно высоким и осложнил детектирование пептидов. Поэтому далее выбирали компоненты для подвижных фаз, имеющие буферную емкость в требуемом интервале рН, с одной стороны, и низкое светопоглощение в УФ области, с другой.

*Фосфатные буферные подвижные фазы.* Переход к стартовому раствору и элюенту, содержащим буферный раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в качестве активного компонента, позволил решить проблему высокого уровня фонового поглощения, а вместе с тем - получить достаточно протяженный градиент рН. В элюент добавили Трис для расширения диапазона буферной емкости. При отсутствии ионной силы в обеих подвижных фазах емкости

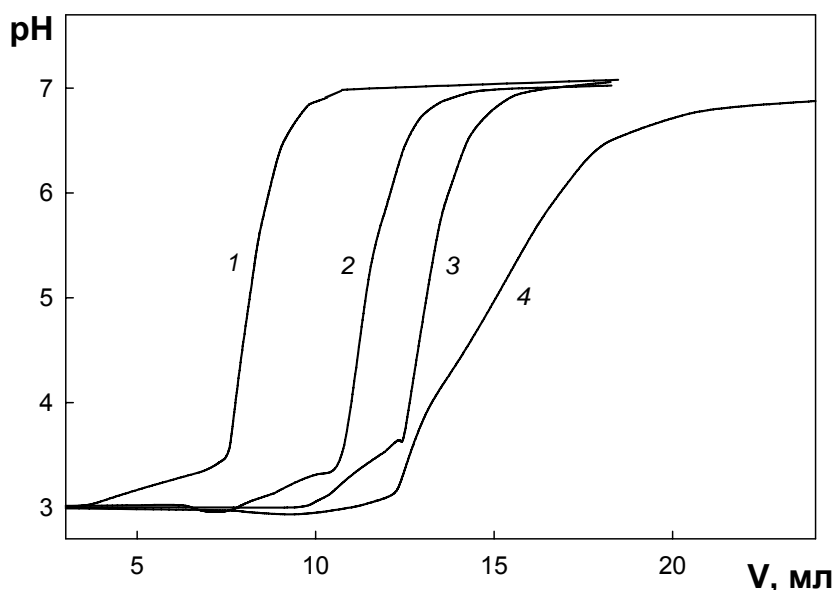


Рис. 4. Формирование градиентов pH на сульфокатионите PRP-X200.  
 СР: 5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0), ионная сила: 1, 2 - 0; 3 - 0,1; 4 - 0,5. Э: 10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 6 мМ Трис (pH 7,0), ионная сила: 1, 4 - 0; 2 и 3 - 0,3.

наблюдали линейное изменение pH от 3,5 до 6,8 в течение 2,5 - 3 мин, что непригодно для задач разделения (рис.4, кривая 1). При использовании элюента, содержащего 0,3 М сильного электролита, наблюдали аналогичный градиент pH, только со сдвигом по времени (рис.4, кривая 2). Создание высокой ионной силы (0,1 - в стартовом растворе и 0,3 - в элюенте) не привело к принципиальным изменениям профиля градиента, однако pH увеличивался еще позже (кривая 3). Вероятно, такой сдвиг градиента pH по времени объясняется неравновесным ионным обменом H<sup>+</sup> на Na<sup>+</sup> на сульфогруппах катионообменника при высокой концентрации Na<sup>+</sup>. Наиболее протяженный градиент, линейный при pH от 3,1 до 6,5, наблюдали в случае добавок сильного электролита (0,5 М) только в стартовый раствор. Время выхода градиента составило более 10 мин, что уже вполне пригодно для применения такого градиента в аналитических целях.



*Ионная сила стартового раствора.* Изучали удерживание пептидов в изократических условиях при использовании фосфатного элюента (5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 3,0) и одновременно - возможность детектирования пептидов при 214 нм. При введении 50 мкл полученного трипсинового гидролизата ЧСА наблюдали только 5 - 6 пиков слабоудерживаемых пептидов. УФ сигнал довольно слабый, что указывает на малый размер элюирующихся пептидов (чем больше пептидных связей, тем сильнее поглощает пептид в УФ области). Вероятно, эти пептиды также и неароматические, так как для ароматических пептидов следует ожидать сильного удерживания на колонке и более высокого сигнала [15]. Затем создали условия, при которых пептиды должны значительно слабее удерживаться на сорбенте (или совсем не удерживаться) - добавили в подвижную фазу сильный электролит – 0,5 М  $\text{NaCl}$ . На хроматограмме наблюдали шесть пиков с интенсивностью примерно в 10 раз выше, чем в первом случае. Вероятнее всего, это пики не индивидуальных пептидов, а сразу нескольких веществ. Увеличение УФ сигнала косвенно подтверждает, что в этих условиях элюируются даже сильно заряженные олигопептиды. Высокая ионная сила подвижной фазы способствует тому, что большая часть пептидов не удерживается на колонке и выходит практически сразу (~2 мин). В данных условиях невозможно разделить малые слабоудерживающиеся пептиды, как это удалось в отсутствие сильного электролита.

При повышении ионной силы стартового раствора увеличивается протяженность градиента рН, а, следовательно, и разрешение пиков, относящихся к пептидам с близкими изоэлектрическими точками – за счет фокусирующего эффекта. С другой стороны, при добавлении сильного электролита в стартовый раствор пептиды слабее удерживаются на колонке,

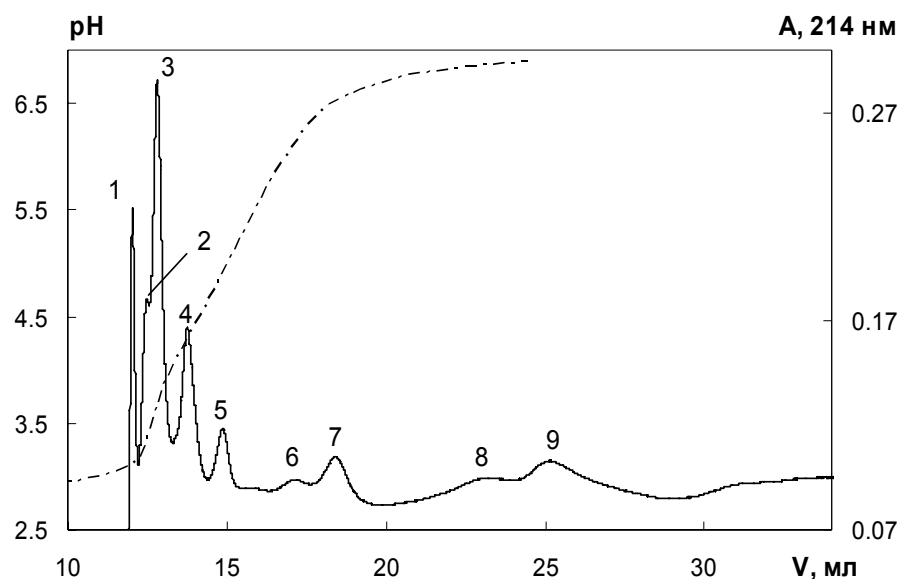


Рис. 5. Введение пробы трипсинового гидролизата ЧСА во время формирования градиента рН. СР: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 М  $\text{NaCl}$  (рН 3,0). Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис (рН 7,0).

что значительно сокращает возможное число разделяемых данным методом пептидов. Возможным решением может служить введение пробы трипсинового гидролизата уже во время формирования градиента рН, а не во время пропускания стартового раствора с высокой ионной силой. При введении пробы трипсинового гидролизата ЧСА (0,1 мг) после замены стартового раствора на элюент удается разделить до 9 пептидов (рис.5). Градиент рН показан пунктиром. Первые пики (1-5), относящиеся к слабоудерживающимся пептидам, выходят в течение 15 мин при рН от 3,2 до 5,5. Пики 8 и 9, относятся, видимо, к неразделенным пептидам, и выходят после завершения градиента. После 30 мин выходит смесь неразделенных веществ.

*Влияние добавок ацетонитрила в подвижные фазы.* Помимо ионной силы на разделение пептидов могут влиять добавки ацетонитрила в подвижные фазы. При этом снижается вклад гидрофобных взаимодействий ароматических пептидов с матрицей сорбента. Поэтому тот же образец ЧСА

вводили во время пропускания стартового раствора, а чтобы пептиды удерживались на колонке, в стартовый раствор сильный электролит не добавляли. Полученную хроматограмму (рис.6) можно разделить на три участка по принципу элюирования пептидов. В течение 5 мин элюируются малые слабоудерживаемые пептиды. Этот участок показан на рис.6 в увеличенном виде. Слабоудерживаемые пептиды характеризуются низким светопоглощением при 214 нм, что говорит о наличии в их составе 1 - 2 пептидных связей. На участке от 5 до 14 мин (в течение собственно градиента рН) элюируется до 8 пиков, обладающих более сильным светопоглощением, что может объясняться рядом причин. Во-первых, одному пику на хроматограмме может соответствовать несколько неразделенных соединений, во-вторых, это могут быть олигопептиды, состоящие из большого числа аминокислот и, в-третьих, в состав пептидов могут входить группы, помимо пептидных связей, существенно поглощающие при 214 нм, например, ароматические. На третьем участке хроматограммы (после 14 мин) при рН 7 элюируются сильноудерживаемые пептиды, имеющие достаточно высокие значения изоэлектрических точек; возможно также элюирование не полностью прореагировавшего белка. Таким образом, удастся зарегистрировать около 15 пиков, но недостаточно разделенных друг относительно друга.

*Ионная сила элюента.* Добавление сильного электролита в состав элюента должно приводить к уменьшению удерживания пептидов на сорбенте и, соответственно, к сужению пиков сильноудерживаемых веществ. На начальном участке хроматограммы, полученной при создании в элюенте ионной силы 0,1, наблюдали набор пиков, аналогичный представленному на рис. 6. Однако за счет присутствия сильного электролита в элюенте

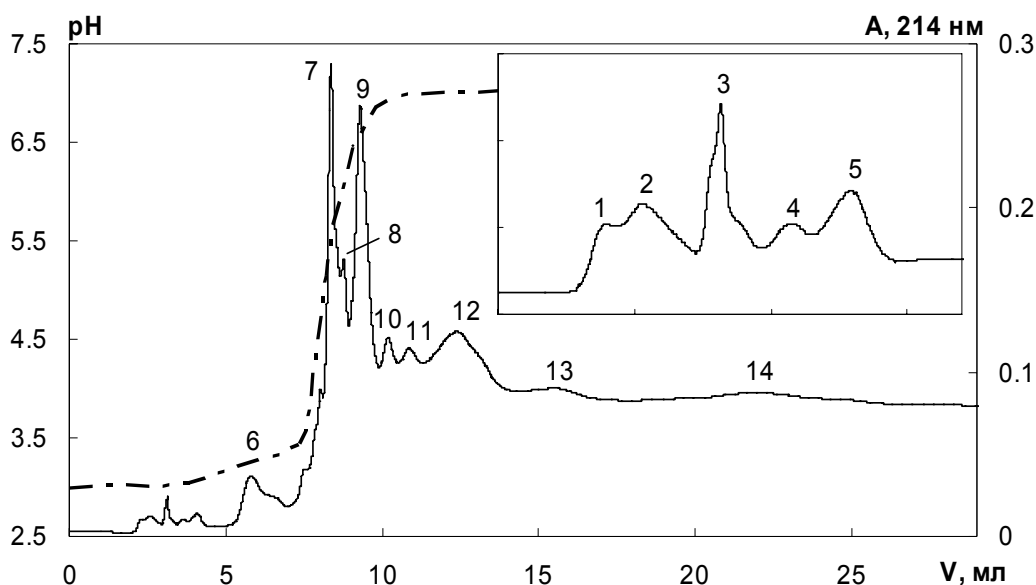


Рис. 6. Влияние добавок ацетонитрила на разделение пептидов в условиях градиента рН. СР: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 3,0). Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 7,0). Проба 0,1 мг ЧСА.

некоторые пики, которые ранее были разрешены, слились в один. Появился острый высокий пик в области 13 - 14 мин, соответствующий резкому изменению рН внутри колонки и завершению градиента, что подтвердилось проверкой базовой линии без ввода пробы. Таким образом, наблюдается увеличение эффективности разделения за счет высокой ионной силы в элюенте, но при этом ухудшается селективность.

Дальнейшее повышение концентрации сильного электролита (до 0,3 М) в элюенте еще снизило селективность разделения и значительно увеличило фон базовой линии. В области 5 - 14 мин наблюдали только 4 пика вместо 5, причем последний из них вызван изменением рН. Начиная с 14 мин, когда градиент рН уже достиг конечного значения, наблюдается еще 4 размытых, но достаточно симметричных пика. Отсутствуют разделенные пики слабоудерживаемых малых пептидов, элюировавшихся до 5 мин при добавлении ацетонитрила в подвижные фазы (рис.6).

В изократических условиях при пропускании элюента с pH 7,0 и ионной силой 0,3 многие компоненты трипсинового гидролизата удерживаются на колонке довольно сильно - до 20 мин. Помимо пика неудерживаемых соединений (около 2 мин) на хроматограмме наблюдали еще 5 более размытых пиков. Таким образом, необходимо подбирать условия разделения, при которых удастся разделить малые пептиды, а сильноудерживаемые пептиды с высокими значениями  $R_I$  будут выходить в виде более симметричных пиков.

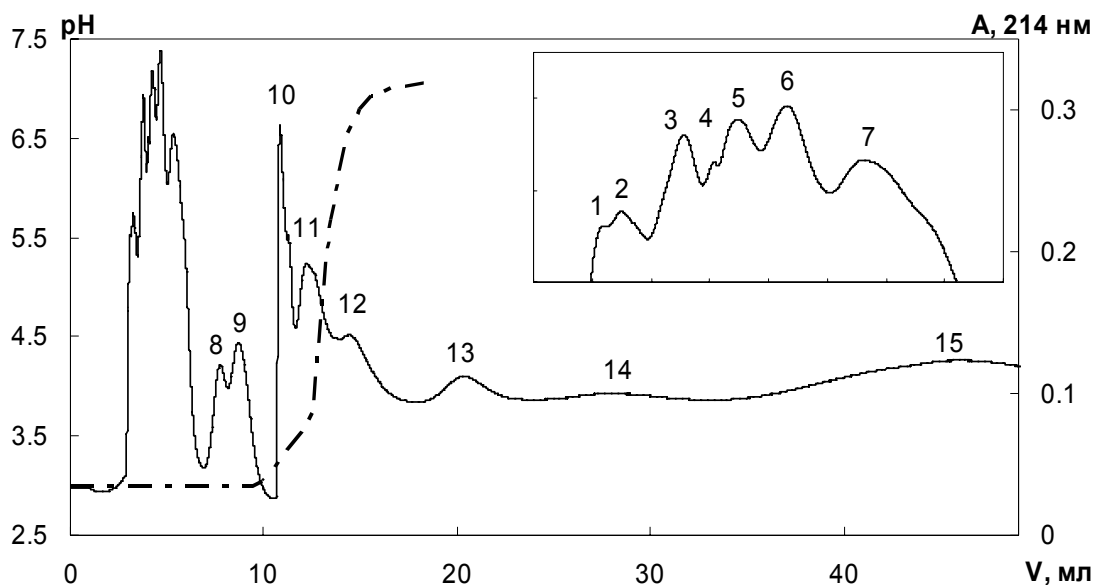


Рис. 7. Разделение гидролизата ЧСА (0,1 мг) при высокой ионной силе в обеих подвижных фазах. СР: 3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,1 М  $\text{NaCl}$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 3,0). Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 0,3 М  $\text{NaCl}$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 7,0).

*Одновременное влияние ионной силы и добавок ацетонитрила.* Селективность разделения можно увеличить при использовании более разбавленных стартовых растворов в сочетании с высокой ионной силой в обеих подвижных фазах и добавками ацетонитрила (10%). Как видно из рис.7, при создании умеренной ионной силы (до 0,1) в стартовом растворе и большей (до 0,3) в элюенте можно разделить слабоудерживаемые малые пептиды, элюирующиеся от 3 до 6 мин. Градиент pH показан пунктирной

линией. Увеличенная часть хроматограммы, относящаяся к разделению слабоудерживаемых пептидов, отдельно представлена на рис.7 (пики 1 - 7). В этих условиях удастся регистрировать сигнал и сильнозаряженных пептидов, удерживающихся более 15 мин (пики 12 - 15). При проведении контрольного опыта (в отсутствие пробы ЧСА) пиков на базовой линии не наблюдали. Добавление ацетонитрила препятствует размыванию пиков за счет уменьшения гидрофобных взаимодействий с матрицей сорбента, что также улучшает разрешение. Таким образом, в трипсиновом гидролизате ЧСА удастся детектировать до 15 пиков.

В качестве рекомендаций по хроматофокусированию пептидов на сульфокатионообменниках с простыми элюентами можно предложить использовать добавки ацетонитрила (до 10 %) и сильного электролита (до 0,1-0,3 М NaCl) в обе подвижные фазы (при этом ионная сила в элюенте должна быть выше, чем в стартовом растворе).

### ВЫВОДЫ

Показана возможность формирования плавных, практически линейных градиентов pH в карбоксильных и сульфокатионообменных колонках простыми одно-двухкомпонентными подвижными фазами. Впервые применен новый метод одновременного формирования градиентов pH и ионной силы внутри колонки. Полученные градиенты можно применять для разделения белков, ферментов или пептидов методом хроматофокусирования.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 05-03-33096).*

## ССЫЛКИ

1. *Sluyterman L.A., Kooistra C.* Ten years of chromatofocusing. // *J.Chromatogr.* – 1989, 470. - p.317-323.
2. Хроматофокусирование полибуфером на ПБИ (Russian translation). – Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals, 1981. - 40 p.
3. Amersham Biosciences BioDirectory (Catalogue). – Uppsala, 2003, p.521-525.
4. *Иванов А.В.* Внутренние градиенты pH в ионообменной хроматографии: моделирование и экспериментальная проверка. // *Вестн. Моск. ун-та. Химия.* – 2005, 46, №4. - с.203-219.
5. *Kang X., Frey D.D.* High-performance cation-exchange chromatofocusing of proteins. // *J. Chromatogr. A.* – 2003, 991. - p.117-128.
6. *Papst T., Carta C.* pH Transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups.// *J. Chromatogr. A.* – 2007, 1142. – p.19-31.
7. *Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K.* Development of focusing buffer systems for generation of wide-range pH gradients during high-performance chromatofocusing. // *J.Chromatogr.* – 1986, 359. - p.157-168.
8. *Bates R., Kang X., Frey D.D.* High performance chromatofocusing using linear and concave pH gradients formed with simple buffer mixtures: effect of buffer composition on the gradient shape. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V.890. p. 25-36.
9. *Kang X., Frey D.D.* Chromatofocusing using micropellicular column packings with computer-aided design of the elution buffer composition // *Anal. Chem.* – 2002, 74, №5. – P.1038-1045.
10. *Тессман А.В., Иванов А.В., Вакутейн М.С., Нестеренко П.Н.* Влияние ионной силы и слабого основания на профиль градиента pH в хроматофокусировании.// *Журн. физич. химии.* – 2001, 75, №2. – с.342-347.
11. *Иванов А.В., Вакутейн М.С., Хасанова Е.М.* Оптимизация профиля градиента pH внутри карбоксильных колонок за счет ионной силы подвижных фаз. // *Вестн. Моск. ун-та. Химия.* – 2003, 44, №5. – с.318-323.
12. *Vakstein M.S., Nesterenko P.N., Ivanov A.V., Tessman A.B.* Single-component eluents for quasi-linear pH gradients in weak cation exchange columns. // *J. Liquid Chromatogr.* – 2006, 29, №4. – p.485-496.
13. *Murel A., Vilde S., Pank M. et al.* Chromatophoresis: a new approach to the theory and practice of chromatofocusing. General principles. // *J.Chromatogr.* – 1985, 347. – P.325-324.

14. *Kang X., Frey D.D.* Chromatofocusing of peptides and proteins using linear pH gradients formed on strong ion-exchange adsorbents. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004, 87. – p.376-387.
15. *Frey D.D., Kang X.* New concepts in the chromatography of peptides and proteins. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2005, 16. – p.552-560.
16. *Иванов А.В., Курек Д.В., Вакиштейн М.С., Баюнов А.П.* Градиент ионной силы при хромотофокусировании в карбоксильных колонках. // *Вестн. Моск. ун-та. Химия.* – 2007, 48, №4. – с.250-256.