

**Pražské analytické centrum inovací**

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

# **Separace peptidů vysokoúčinnými separačními technikami**

**Jana Suchánková**

PřF UK Praha



# Analýza peptidů a proteinů

- rychlý vývoj, nárůst zájmu o tuto oblast
- důležitá role ve fyziologii zdravých i nemocných buněk
- funkce metabolické, strukturální, transportní a obranné
- významná skupina léčiv (od cukrovky k rakovině)
  
- chromatografické techniky
- elektromigrační techniky
- multidimensionální techniky
- miniaturizované separační techniky

# Peptidy a proteiny

- řetězec tvořený aminokyselinami - 20 základních
- AMK se liší vlastnostmi postranního řetězce (struktura, velikost, elektr. náboj, rozpustnost ve vodě)
- AMK sekvence ⇒ charakteristické fyzikálně chemické vlastnosti a funkce peptidů a proteinů
- **primární sekvence určuje metody analýzy peptidů a proteinů**
- konformace, sekundární struktura
- stabilizace hydrofobních peptidů ve vodném prostředí
- cyklická struktura

# HPLC peptidů a proteinů

- Vylučovací (gelová) chromatografie
- Iontově výměnná chromatografie
- Hydrofobní interakční chromatografie
- Afinitní chromatografie
- Reverzní HPLC
  - silikagelové kolony
  - zirkoniové kolony
  - kolony s částicemi menšími než 5  $\mu\text{m}$
  - porézní kolony
  - monolitické kolony
  - kapilární kolony

# Elektromigrační separace peptidů a proteinů

- gelová elektroforéza (plošná i kapilární)
- kapilární zónová elektroforéza
- micelární elektrokinetická chromatografie
- kapilární izoelektrické zaostřování
- kapilární elektrochromatografie

# Vylučovací chromatografie SEC (GPC)

## ↗ Mechanismus

- ↗ dělení podle velikosti/molekulové hmotnosti a tvaru hydratovaných molekul
- ↗ **nedochází k interakcím**
  
- ↗ vliv terciální struktury peptidů a proteinů
- ↗ vliv denaturace na velikost peptidů a proteinů
- ↗ vliv chem. prostředí na tvar peptidů a proteinů
  
- ↗ **jednoduchá, rychlá, univerzální**
- ↗ nedochází k inaktivaci bioaktivních analytů -např. hormonů, enzymů

## ➤ Aplikace

- separace a čištění analytů o různé velikosti
- změna prostředí vzorku (odsolování)
- určení molekulové hmotnosti a tvaru proteinů

➤ 1959: Sephadex - rozšíření gelové chromatogr.

➤ HPLC mód: semirigidní (PS) a rigidní (silikagel) porézní částice s jednotnou velikostí pórů

- SILIKAGEL: aniontová povaha, hydrofobní interakce → endcapping, přídavek soli do MF, práce při  $\text{pH} < 7$ , jiné kolony

- Moderní SF: modifik. povrch = biokompatibilita
  - polymerní nosiče
  - na bázi Zr modifikovaného diolovými skupin.
  - silikagel potažený vrstvou hydrofilního polymeru

### ➤ Parametry SF

- rozměr pórů: *vylučovací limit*
- uniformní distribuce velikosti pórů: *rozmývání píků*
- jednotná velikost (5-10  $\mu\text{m}$ ) a tvar částic (sférický): *účinnost kolony*



## ~ Limitace/Omezení SEC

- ~ plynou z mechanismu separace - nejsou specifické interakce
- ~ malá kapacita objemová i hmotnostní (objem vzorku max. 5 % objemu SF v koloně)
- ~ dlouhá doba analýzy
- ~ zředění vzorku
- ~ malé rozlišení - dlouhé kolony, nízký průtok, spojení kolon o různé porozitě nebo vylučovacím limitu

## ~ Typické podmínky separace

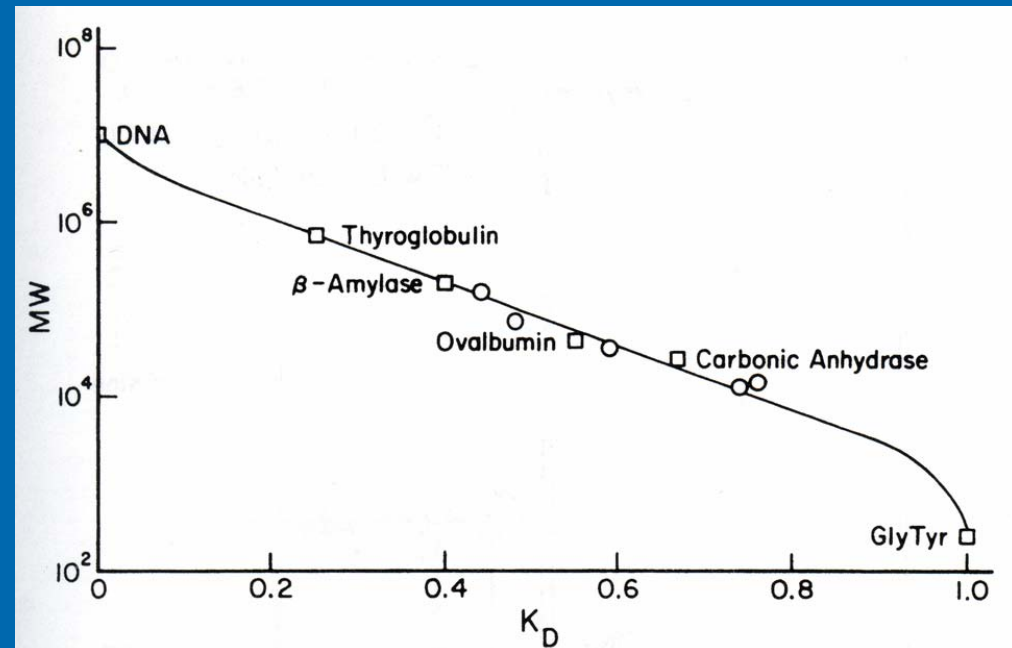
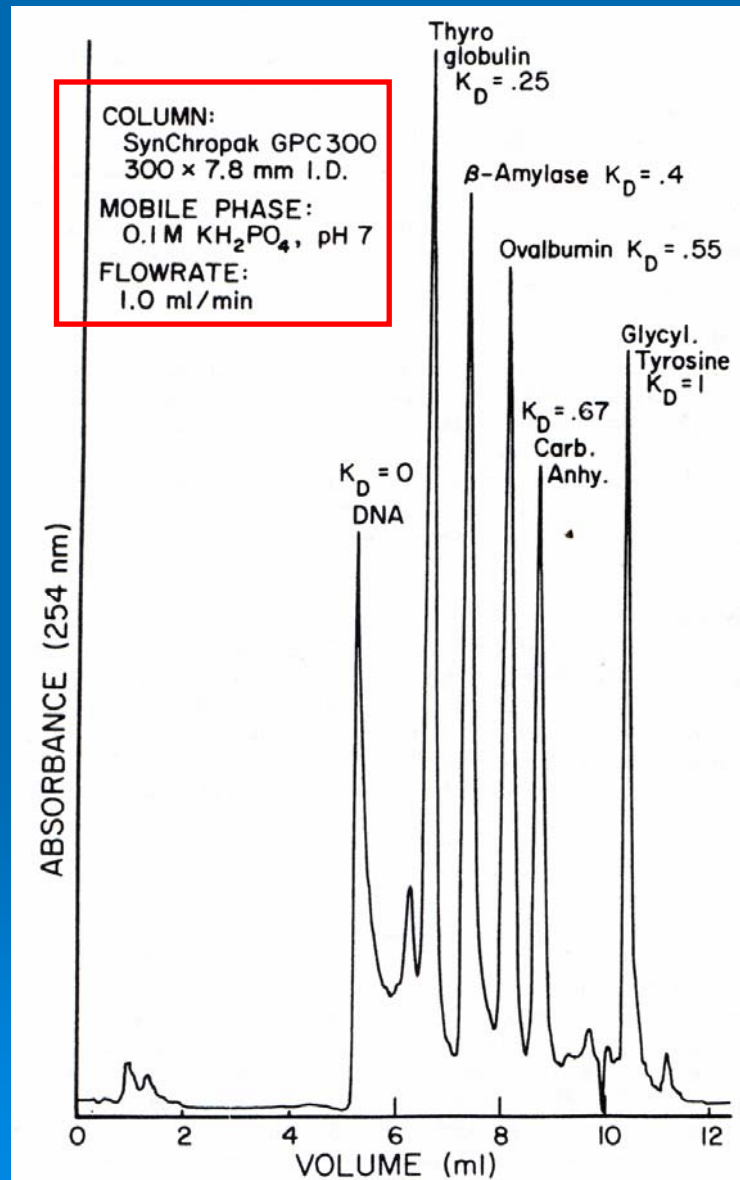
~ teplota: 4 - 37 °C

~ mobilní fáze: pufrý o nízké iontové síle a  
blízko fyziologického pH

- 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) + 100 mM KCl

~ průtok MF: 0,5 - 1,0 ml

# HPSEC separace vybraných proteinů



kalibrační křivka pro kolonu  
SynChropak GPC 300

## ↗ Regenerace a skladování SEC kolon

- ↗ promývání 0,1 M fosforeč. pufrém (pH 3,0)
- ↗ hydrofobně zachycené analyty: gradient ACN
- ↗ razantní vymytí: 0,5 % SDS
- ↗ polymerní kolony: 0,2 M NaOH
- ↗ promývání v opačném směru polovičním průtokem
  
- ↗ dlouhodobé skladování: antimikrobiální činidlo (azid sodný, MeOH)

# Iontově výměnná chromatografie IEC

- první typ chromatografie ve vysokotlakém módu
- 70. léta minulého stol.: silikagelové ionexové pryskyřice

## ➤ Mechanismus

- ~ reverzibilní, elektrostatická (nebo iontová) interakce mezi nabitými analyty (a solemi) v mobilní fázi a nabitými iontově výměnnými skupinami SF
- ~ **dělení peptidů/proteinů podle náboje: pI,** katexy ( $\text{pH} < \text{pI}$ ), anexy ( $\text{pH} > \text{pI}$ )

- ↪ lze separovat všechny makromolekuly nesoucí náboj - adsorpce na SF
  - ↪ často zachována biologická aktivita
  - ↪ snadné zakoncentrování zředěných vzorků
- ↪ Dělení v IEC
  - ↪ umožněno různou silou interakce analytu se SF
  - ↪ slabá interakce = rychlá eluce, silná interakce = silné zadržení
- ↪ Aplikace
  - ↪ purifikace peptidů a proteinů (biochemické laboratoře)
  - ↪ analýza peptidů: preference RP HPLC

## ➤ HPIEC stacionární fáze

- původně na bázi silikagelu
- nové materiály: PS-DVB, alumina, PES-PA, pelikulární hydrofilní polymery
  
- odolnost vůči vysokému tlaku
- analytické kolony: částice 5-10  $\mu\text{m}$ , preparativní kolony: až 25  $\mu\text{m}$
- dostatečná velikost pórů - vylučovací limit
- porézní částice: velká sorpční kapacita (až 40 % hmotnosti SF v hydratovaném stavu), analytické účely 10 -20 %

<i>anex</i>	typická funkční skupina	<i>katex</i>	typická funkční skupina	smíšený ionex
<i>slabý</i>	polyamin	<i>slabý</i>	karboxy-methyl	amin-karboxy
<i>střední</i>	diethyl-aminoethyl	<i>střední</i>	fosfo	karboxy-sulfo
<i>silný</i>	kvartévní amin	<i>silný</i>	sulfo	kvartévní amin-sulfo

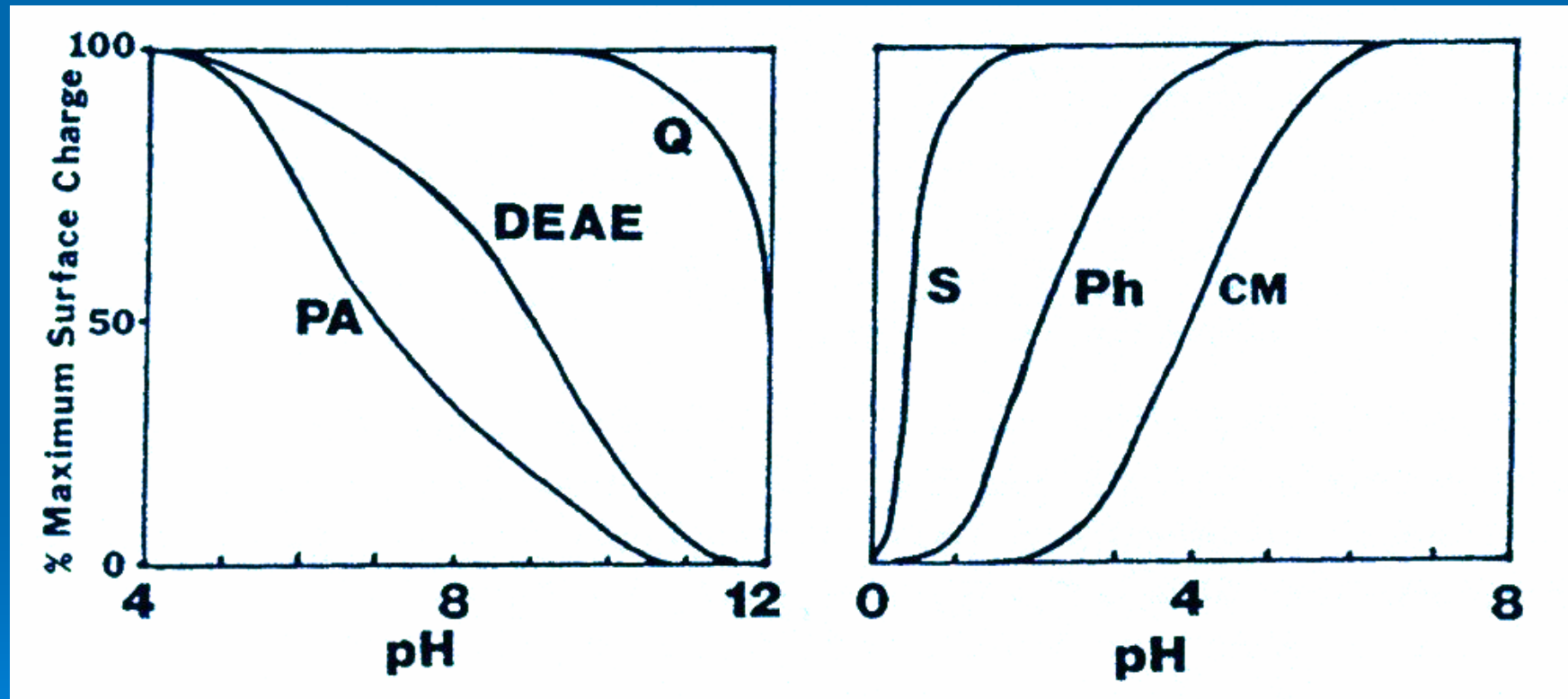
označení „slabý, střední, silný“ souvisí s hodnotou  $pK_a$  funkčních skupin



# Vliv pH mobilní fáze na stupeň ionizace funkčních skupin ionexu

**ANEXY**

**KATEXY**



## ➤ Volba podmínek IEC separace

- snaha maximalizovat vazbu mezi opačně nabitým analytem a ionexem → silné ionexy
  - kyselé peptidy/proteiny ( $pI < 6$ ): analyzovány jako anionty na anexu ( $pH$  mobilní fáze  $> pI$ )
  - bazické peptidy/proteiny ( $pI > 8$ ): analyzovány jako kationty na katexu ( $pH$  mobilní fáze  $< pI$ )
  - $pH$  mobilní fáze minim. o jednotku odlišné od  $pK_a$  funkčních skupin ionexu → ionizace minim. 90 %
- **klíčové parametry:  $pH$  a iontová síla MF**

Pufř	pK	rozsah pH
fosforečnanový	2,1 / 7,2 / 12,3	1,5 - 2,7 / 6,6 - 7,8 / 11,7 - 12,9
citrátový	3,1 / 4,7 / 5,4	2,5 - 3,7 / 4,1 - 5,3 / 4,8 - 6,0
mravenčanový	3,8	3,2 - 4,4
octanový	4,8	4,2 - 5,4
piperazinový	5,7	5,0 - 6,0
MES 2-[N-morfolino] ethansulfonová kyselina	6,1	5,5 - 6,7
<i>bis</i> -TRIS bis[2- hydroxyethyl]iminotris [hydroxymethyl]methan	6,5	5,8 - 7,2
HEPES N-[2- hydroxyethyl]piperazin-N'- ethansulfonová kyselina	7,5	6,8 - 8,2
TRIS tris[hydroxymethyl]- aminomethan	8,3	7,7 - 8,9
borátový	9,2	8,6 - 9,8
diethylaminový	10,5	9,9 - 11,1

↗ eluce změnou iontové síly

↗ katexy:  $\text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$

↗ anexy:  $\text{NO}_3^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CN}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$

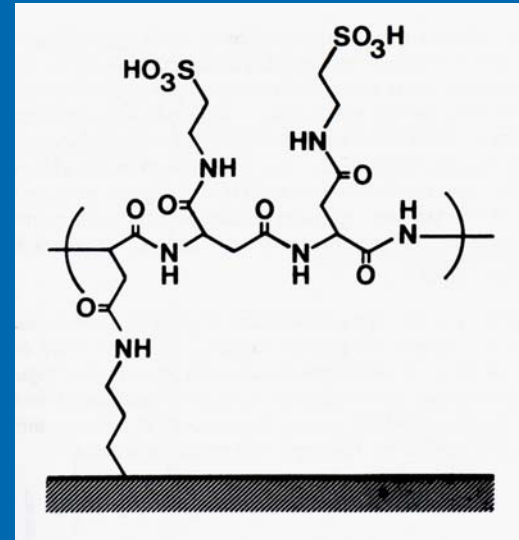
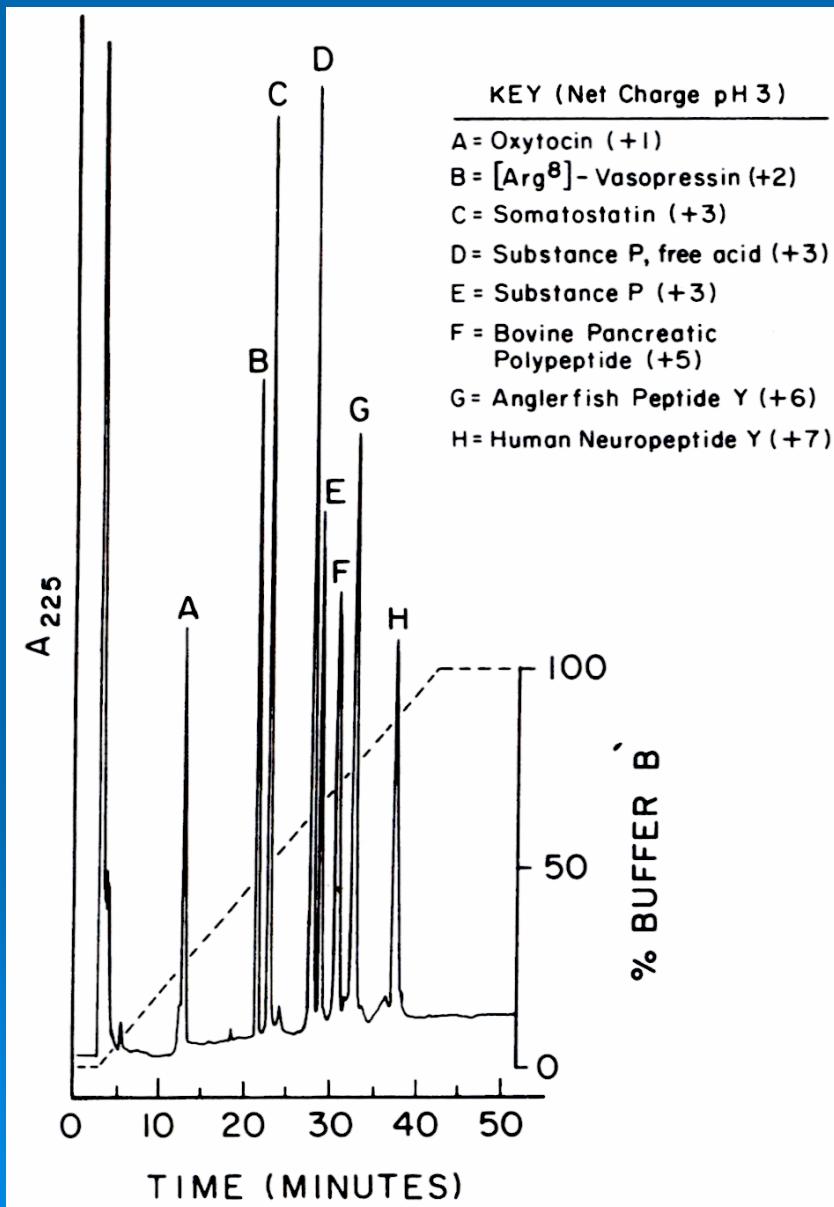
↗ Typické podmínky separace

↗ vzorek rozpuštěný v MF nebo ve velmi podobném rozpouštědle

↗ nutné vymytí nezachycených částic

↗ gradientová či skoková eluce pufrem o vhodném pH a iontové síle

# HPCExC separace peptidových standardů



- kolona: PolySULFOETHYL Aspartamid (200x4,6 mm)
- MF: A-5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,0 +25 % ACN; B-5 mM KCl+25 % ACN; gradient 2,5 % B/min
- průtok MF: 0,7 ml/min

## ↷ Regenerace a skladování IEC kolon

- ↷ důležitý krok pro zachování reprodukovatelného chování
- ↷ probíhá déle než u jiného typu kolon
- ↷ skladování v pufru s přísávkem antimikrobiálního činidla

# Hydrofobní interakční chromatografie HIC

- separace peptidů a proteinů bez nebezpečí denaturace

- obdobný mechanismus jako u RP HPLC

- **KOLONA**

- méně hydrofobní ligandy

- menší stupeň pokrytí povrchu

- nosič se účastní separačního procesu

- **MOBILNÍ FÁZE**

- vodné roztoky pufrů o vysoké iontové síle a neutrálním pH

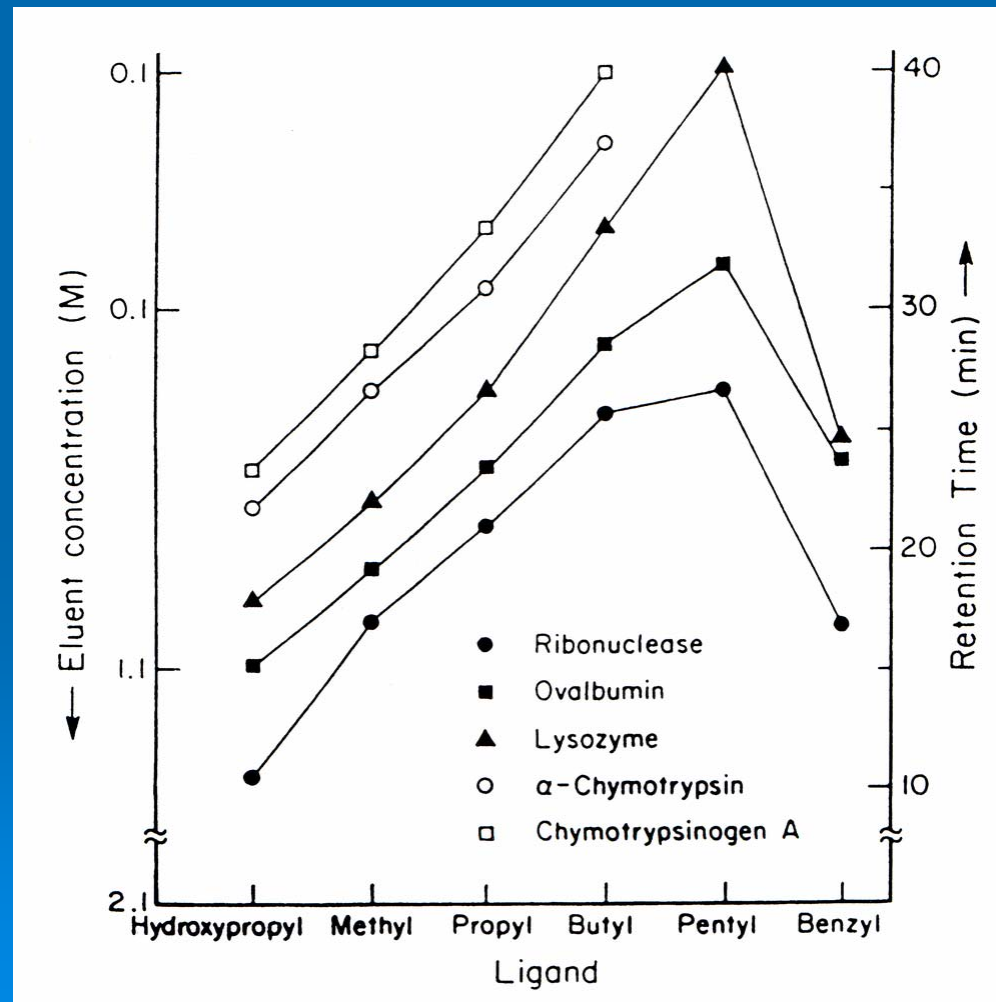
## ➤ Mechanismus

- slabá hydrofobní interakce mezi analytem a ligandem SF za použití MF o vysoké iontové síle
- 2 teorie vysvětlující vznik vazby analytu a SF
  - přeskupení molekul vody okolo hydrofobní části molekuly
  - vysolení analytu do SF v důsledku velkého povrchového napětí MF
  - ve skutečnosti kombinace obou efektů
- retence v HIC závisí na hydrofobní části molekuly přístupné pro interakce



## ➤ HIC stacionární fáze

- silikagel modifikovaný arylovými, diolovými či krátkými alkylovými řetězci



## ↗ Mobilní fáze

- ↗ vodný roztok soli o vysoké iontové síle
- ↗ neutrální pH
- ↗ eluce klesajícím gradientem iontové síly (např.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ )

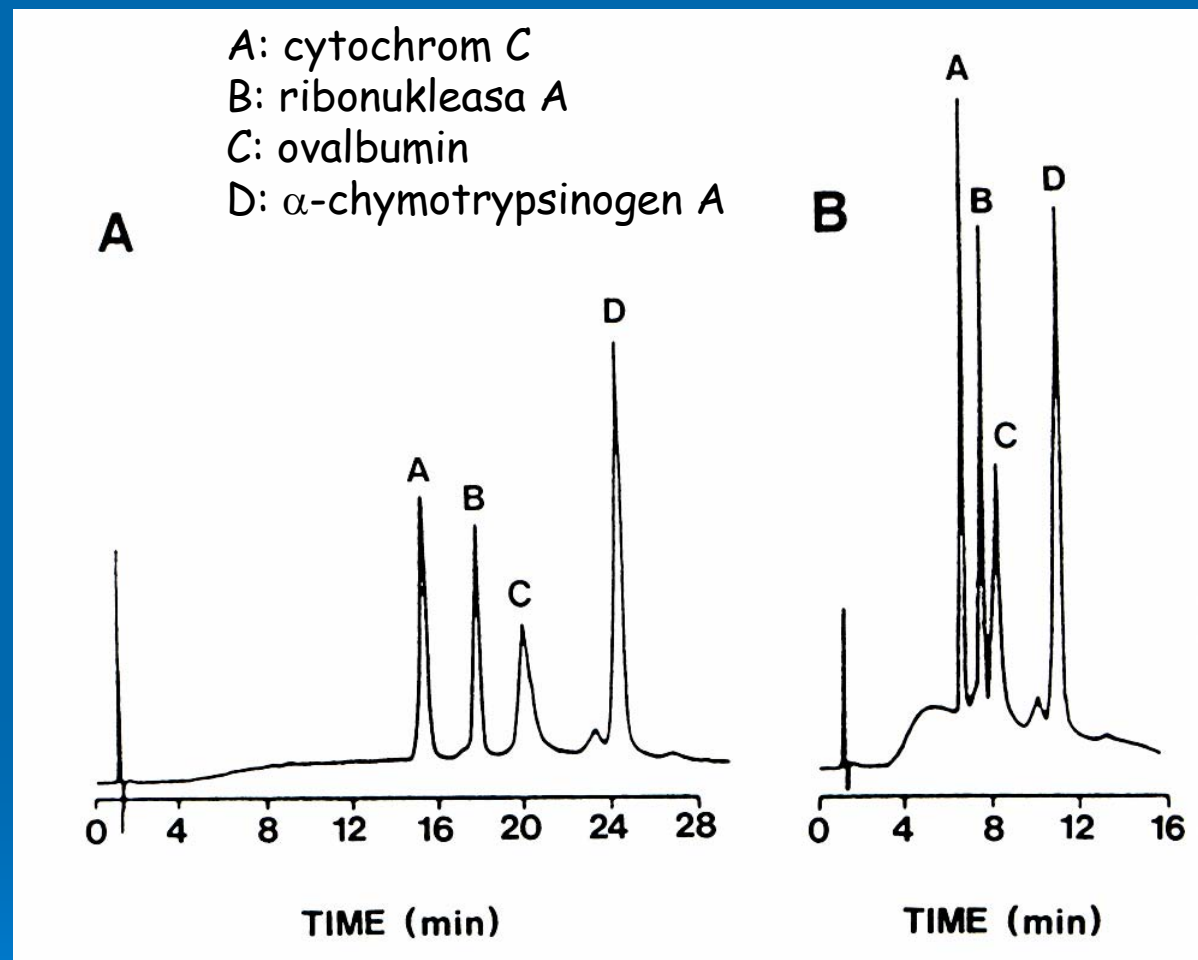
## ↗ Faktory ovlivňující retenci v HIC

- ↗ typ a koncentrace soli
- ↗ pH mobilní fáze
- ↗ teplota

## ~ Typické podmínky separace

- ~ C4 silikagelová SF (100 x 4,6 mm)
- ~ teplota 40 °C
- ~ MF: eluent A-0,1 M  $K_2HPO_4$ , pH 7,4 + 1,5 M  $(NH_4)_2SO_4$   
eluent B-0,1 M  $K_2HPO_4$ , pH 7,4
- ~ klesající gradient  $(NH_4)_2SO_4$  (100 % až 0 % eluentu A za 20 min)
- ~ průtok MF: 1 ml/min
- ~ výhody  $(NH_4)_2SO_4$ : velká rozpustnost, nízká UV absorbance, zpomalení mikrob. růstu

# HPHIC separace proteinových standardů



kolona: Supelcosil  
LC-HINT diol  
100x4,6 mm; 5  $\mu$ m

eluent A: 3 M  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v 0,5 M  
NH<sub>4</sub>Ac o pH 6,0

eluent B: 0,5 M  
NH<sub>4</sub>Ac o pH 6,0

průtok MF: 1 ml/min

detekce: 280 nm

PANEL A: grad. 100-0% A/20 min; 10 min 0% A; 0-100% A/5 min  
PANEL B: grad. 100-0% A/0,5 min; 10 min 0% A; 0-100% A/5 min

## ↗ Regenerace a skladování HIC kolon

- ↗ promývání deionizovanou vodou
- ↗ 70% ethanol nebo 30% isopropanol, poté deionizovaná voda
- ↗ polymerní kolony: 0,5 M NaOH pro odstranění silně sorbovaných látek
- ↗ dlouhodobé skladování: antimikrobiální činidlo

# (Bio)Afinní chromatografie AC

## ➤ Mechanismus

- ~ pevné, reverzibilní a specifické interakce mezi analytem a ligandem (afinantem) tj. komplementárními látkami
- ~ interakce hydrofobní, iontové, vodíkové můstky

## ➤ Aplikace

- ~ izolace a čištění biomolekul
- ~ studium interakcí protein-protein, protein-peptid

## Affinity Column



## Chromatography Steps

1. Sample Loading

2. Complementary Binding Begins

3. Column Wash to Remove Contaminants

4. Elution

5. Regeneration

## ➤ Afinitní stacionární fáze

➤ na bázi silikagelu nebo syntetických hydrofilních gelů

➤ nosič inertní vůči analytu

➤ aktivní místa pro navázání ligandu

➤ vazba ligandu na nosič dostatečně pevná

➤ vhodná afinita ligandu a proteinu (příliš silná = ztráta aktivity při eluci)

➤ minimální nežádoucí nespecifické interakce



## ↪ Důležité parametry

- ↪ výběr nosiče, chemické vlastnosti nosiče
- ↪ výběr ligandu
- ↪ způsob vazby ligandu na nosič, délka spaceru, vazebné místo

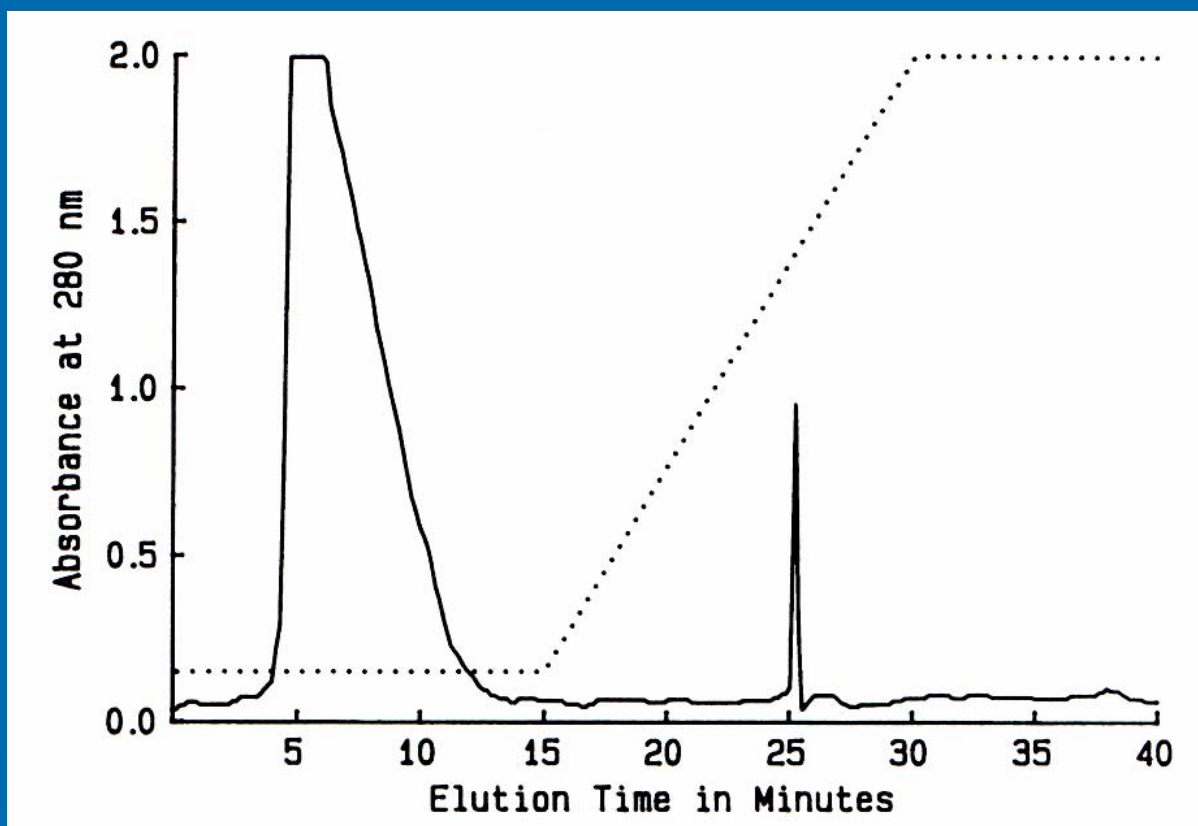
## ↪ Ligandy

- ↪ specifické (antigen/protilátka, substrát/inhibitor)
- ↪ multifunkční (konkanavalin A/glykoprotein)

## ➤ Typické podmínky separace

- velmi individuální, v závislosti na analytu
  - pH, iontová síla, teplota
  - průtok MF a gradientový profil
- 
- eluce kompetitivní (soutěžící ligand v MF) či nespecifická (změna pH, iontové síly)

# HPAC separace lidského transferinu



průtok MF:  
1 ml/min

teplota kolony  
4 °C

Kolona: skleněné částice s navázanou protilátkou (150x4,6 mm)

Mobilní fáze: 0,01 M fosforečnanový pufr, pH 7,2; lineární gradient pH - isokraticky/0-15 min; pH 7,2 až 1,5/15-30 min; dále isokraticky

# Reverzní chromatografie RP HPLC

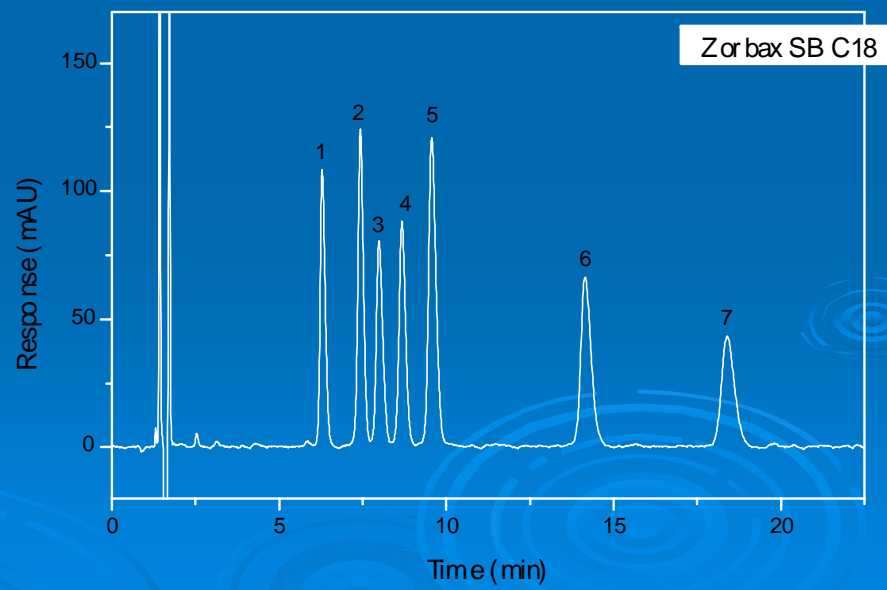
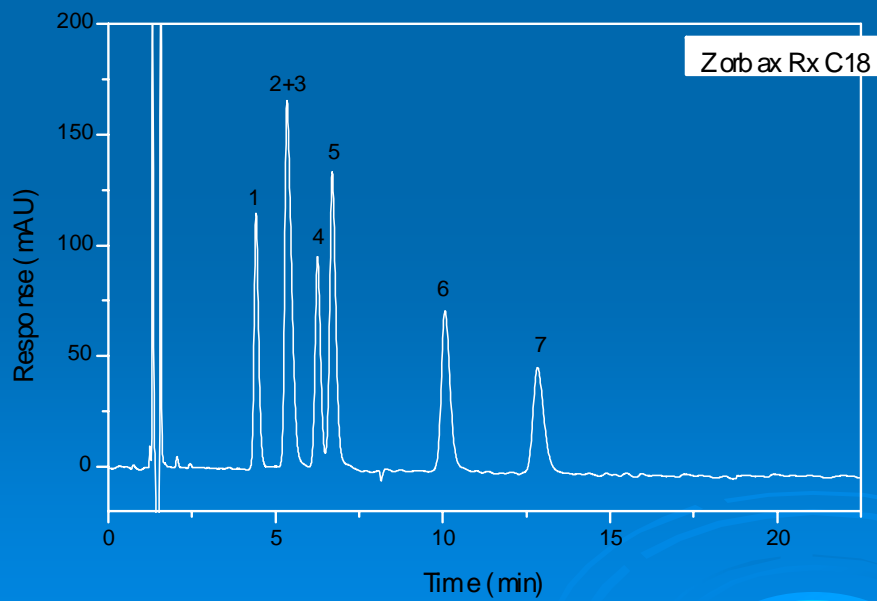
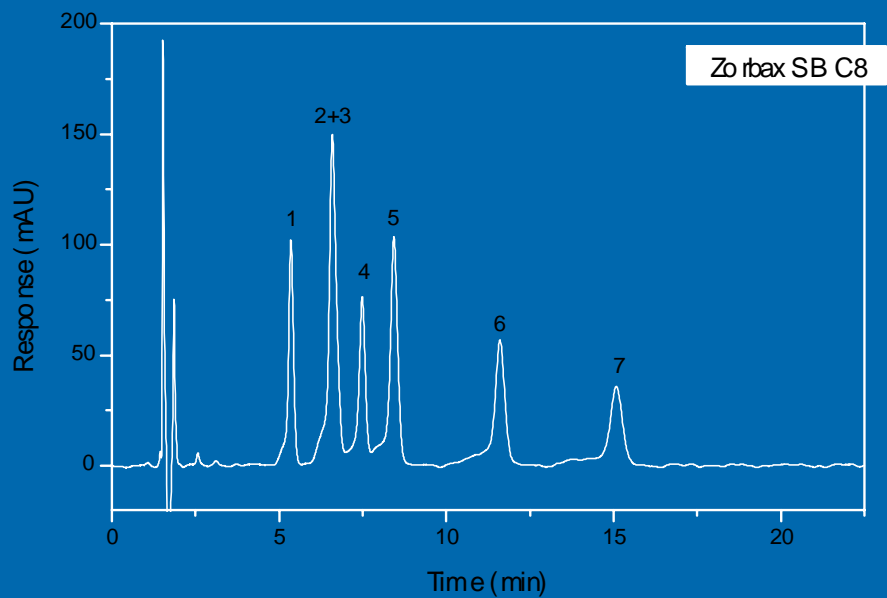
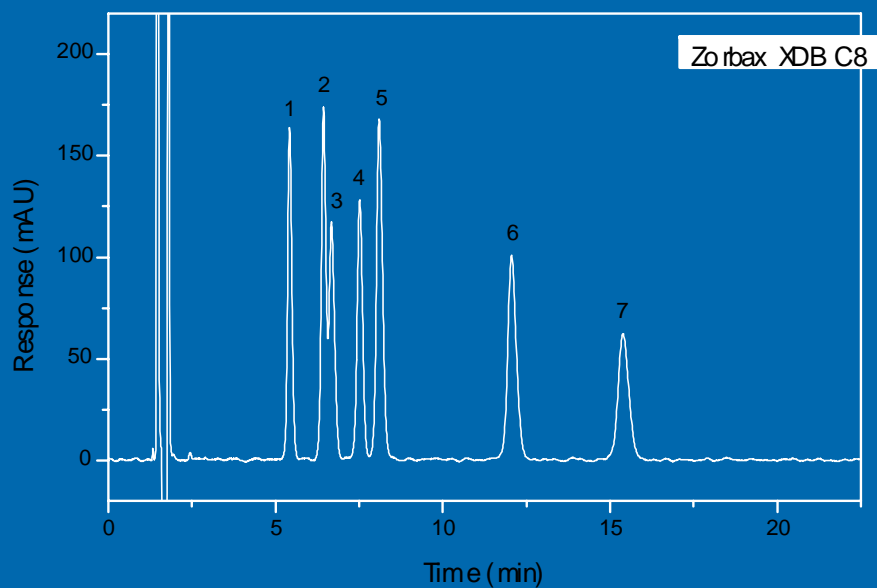
- ↪ nejčastěji používaná technika pro separaci, čištění a studium peptidů a proteinů
- ↪ metoda rychlá a účinná
- ↪ lze najít podmínky, kdy nedochází k denaturaci

## ↪ Mechanismus

- ↪ **adsorpce** analytu na SF a/nebo **rozdělení** (rozpouštění) analytu mezi SF a MF
- ↪ závislost retence peptidů na malé změně obsahu organ. modifikátoru podporuje adsorpční mechanismus
- ↪ pravděpodobně kombinace obou modelů

# STACIONÁRNÍ FÁZE a VÝBĚR KOLONY

- **silikagel** modifikovaný různě dlouhými alkylovými řetězci - endcapping, omezená chemická stabilita
- **polymerní** kolony - PS-DVB, pH 2 - 12, nižší účinnost
- **zirkoniové SF** - jiný mechanismus, výborná chemická a tepelná stabilita
- **monolitické** materiály
  
- typ navázaného ligandu
- délka a průměr kolony
- velikost pórů (90 Å, 300 Å, 4000 Å)
- velikost částic (5-8 μm, až 40 μm)



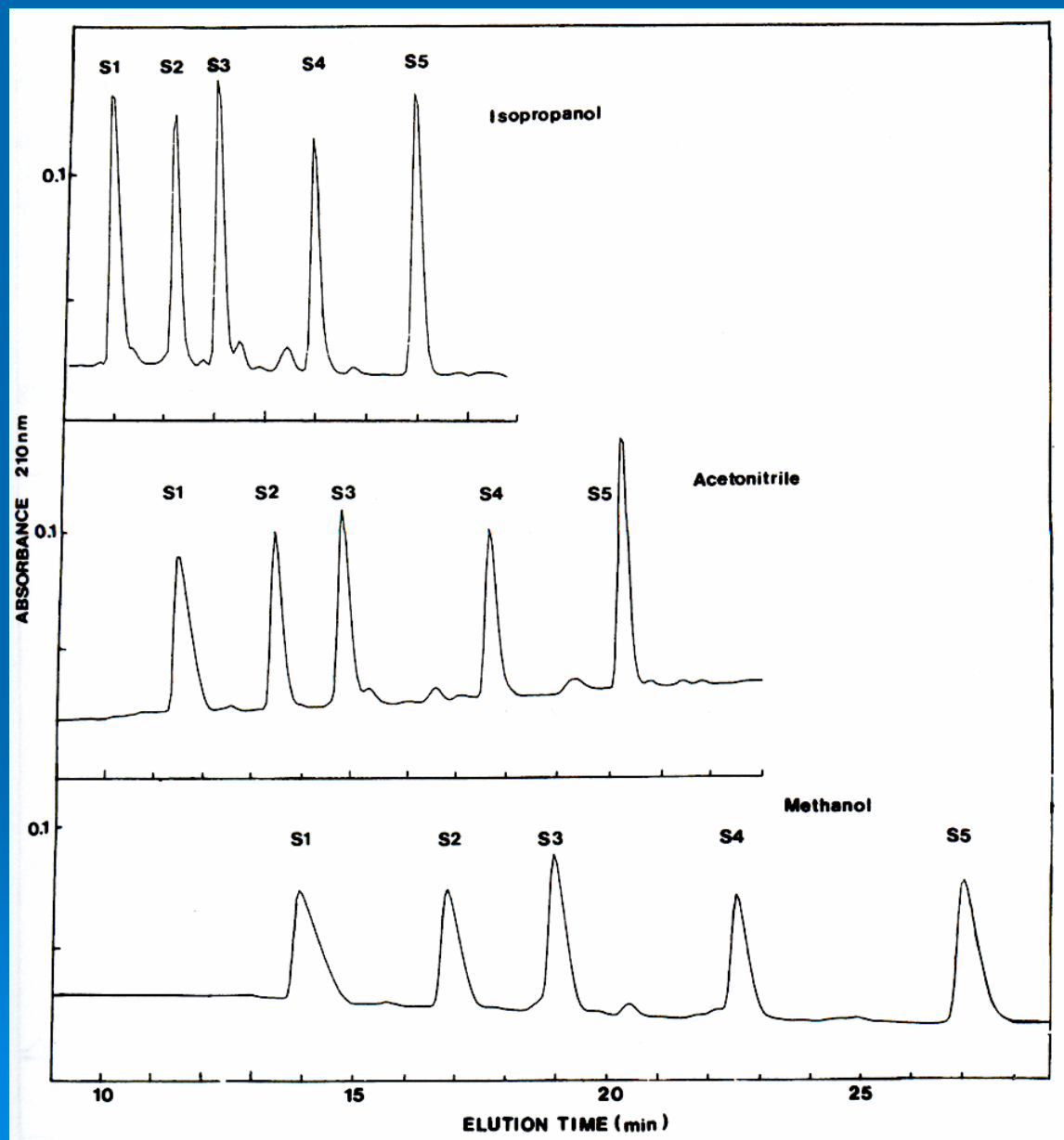
## ➤ Podmínky separace peptidů

- 20 % (0,1% TFA v ACN) a 80 % (0,1% TFA v H<sub>2</sub>O)
- průtok 1 mL/min
- detekce 205 nm
- teplota 37 °C

## VÝBĚR STACIONÁRNÍ FÁZE

- silně hydrofobní peptidy: C4, C5
- hydrofilní peptidy: C8, C18

# ORGANICKÝ MODIFIKÁTOR

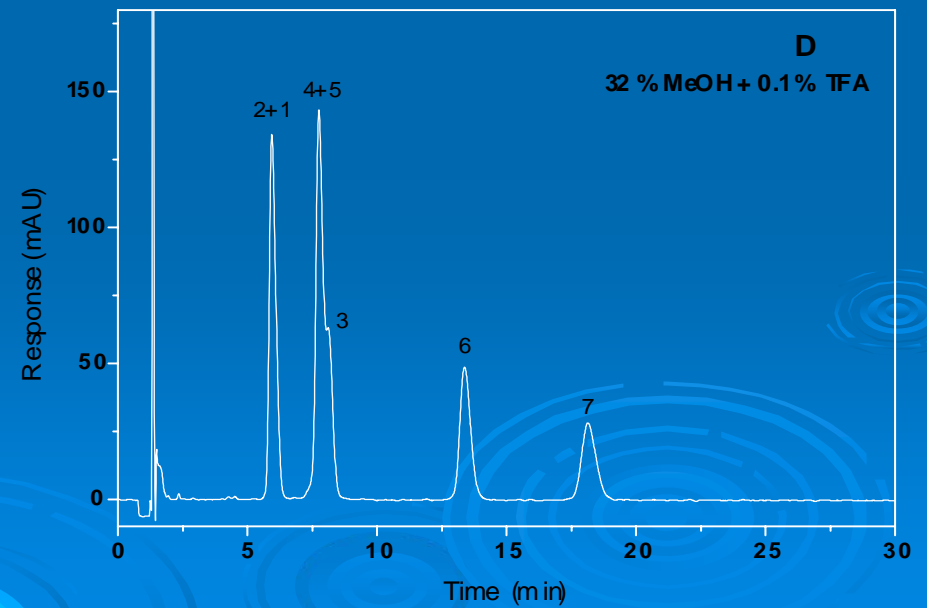
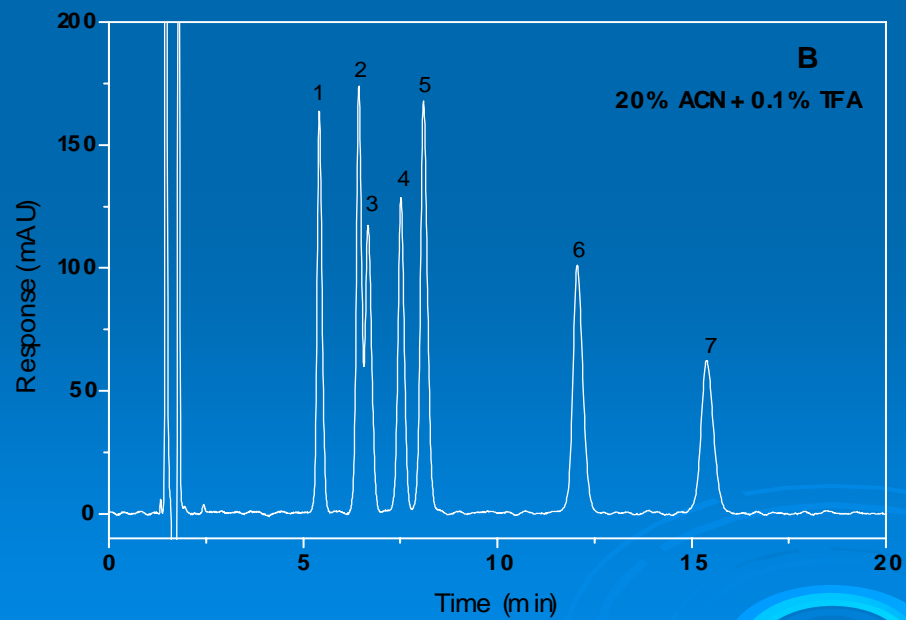
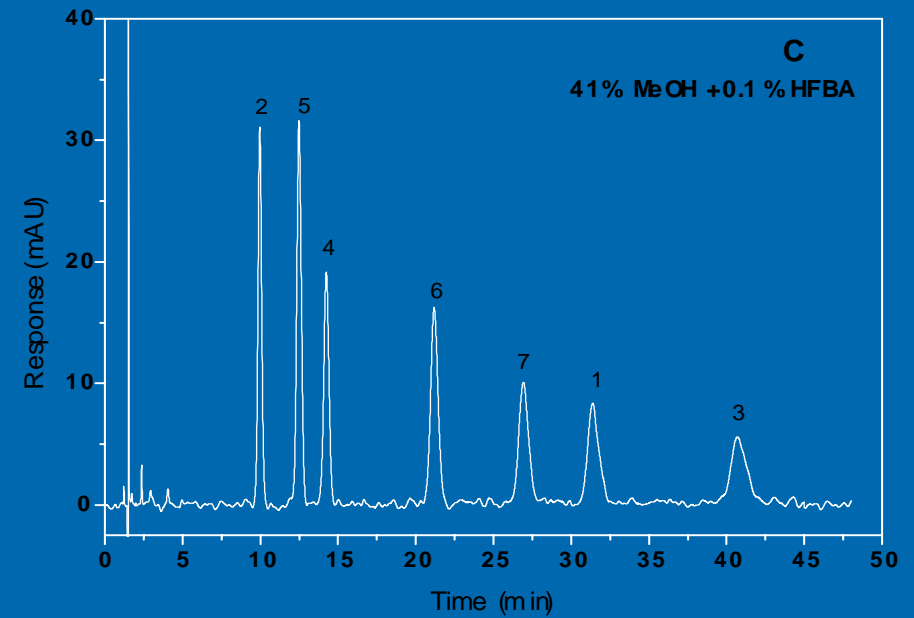
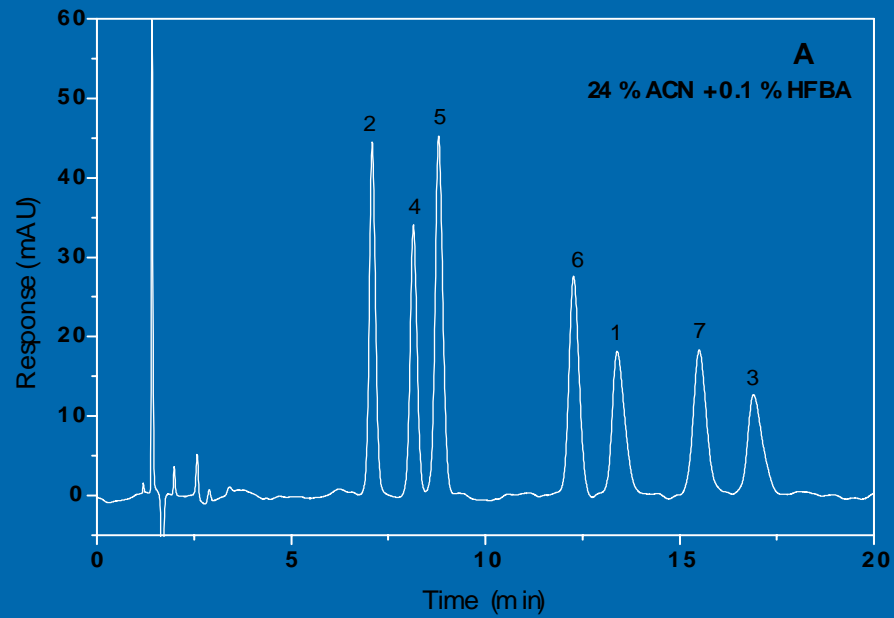


- ↗ eluční síla
- ↗ viskozita
- ↗ čistota

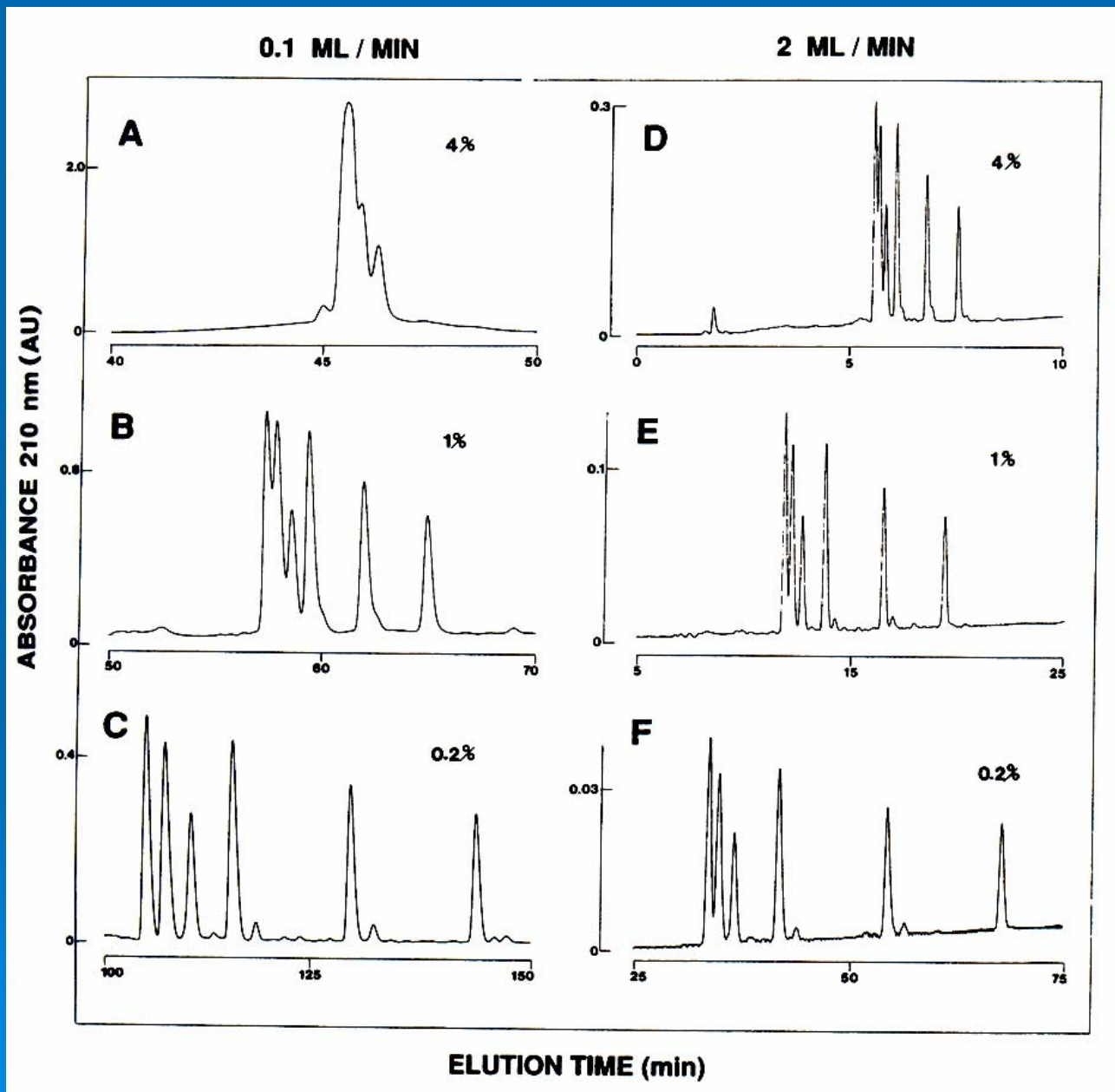


# IONTOVĚ PÁROVÉ ČINIDLO

- pH 2-7: zbytky bazických AMK pozitivně nabité  
→ komplexace s hydrofobními aniontově párovými činidly TFA, PFPA, HFBA
- pH > 5: zbytky kyselých AMK negativně nabité  
→ komplexace s hydrofobními kationtově párovými činidly TEAA (triethylaminacetát)
- pH ovlivňuje ionizaci analytu a chování nosiče/ligandu SF

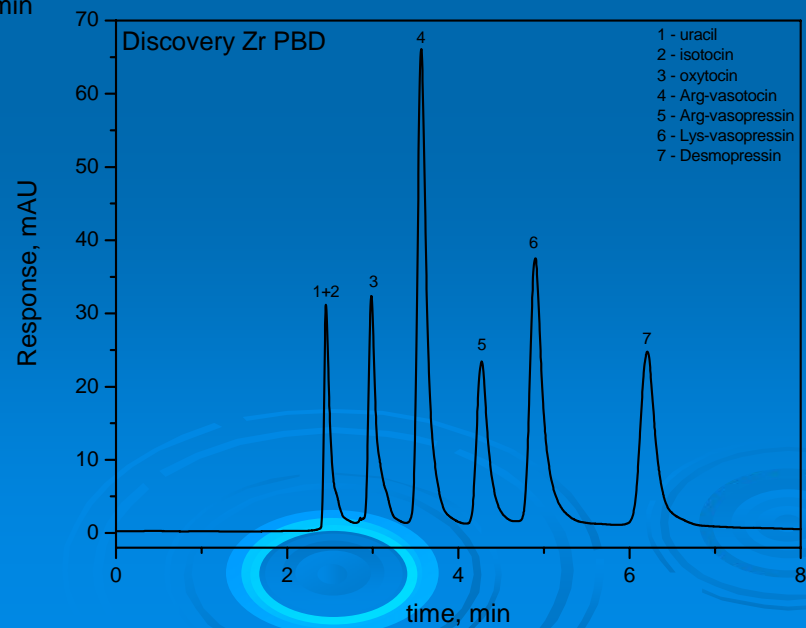
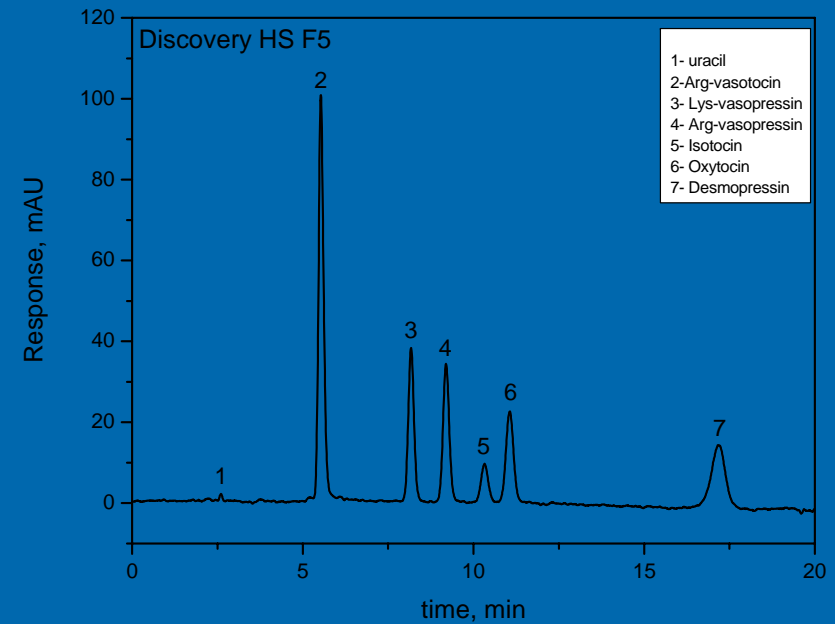
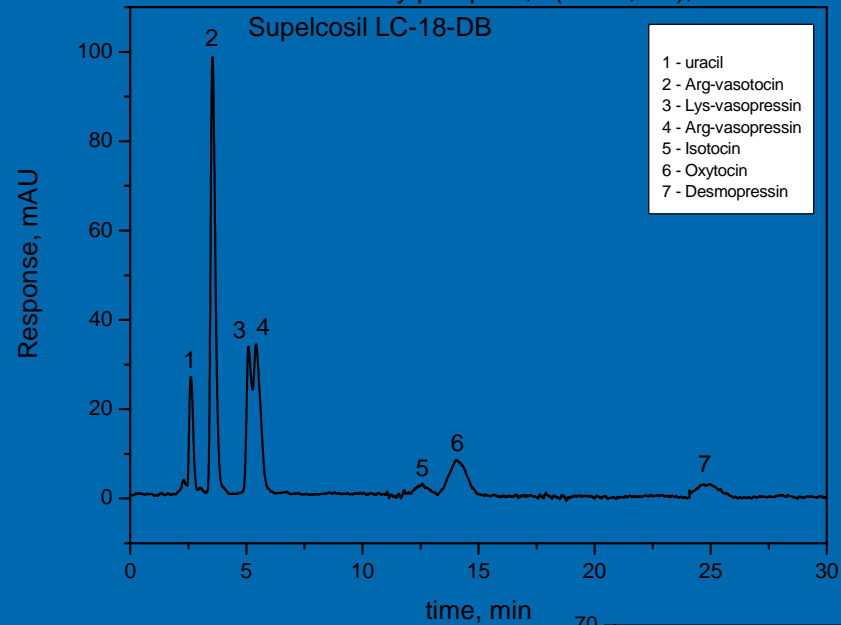


# VLIV GRADIENTU A PRŮTOKOVÉ RYCHLOSTI

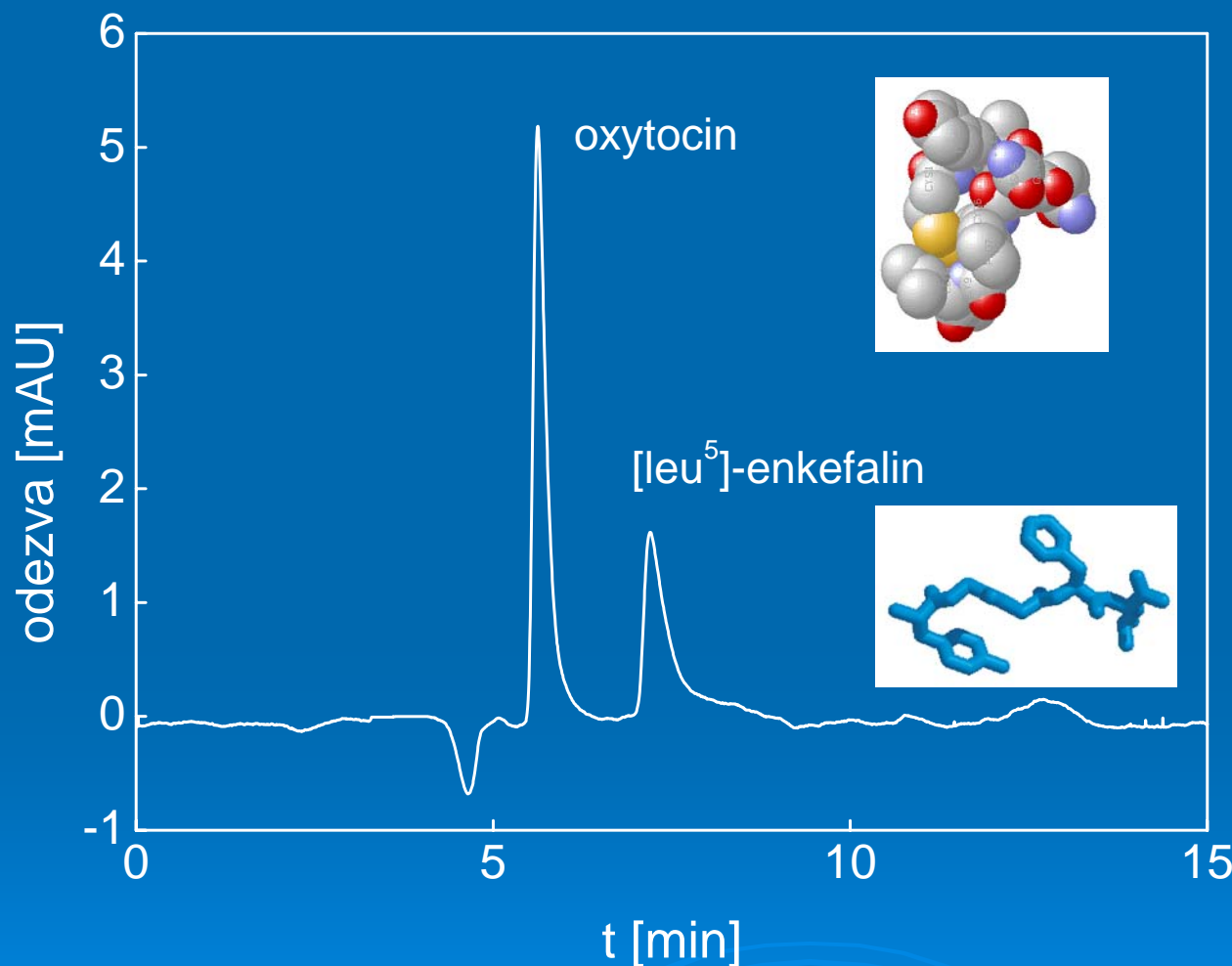


# Alternativní stacionární fáze

ACN - 10 mM fosfátový pufr pH 4,5 (18:22, v/v), 25 °C



# Monolitické kolony



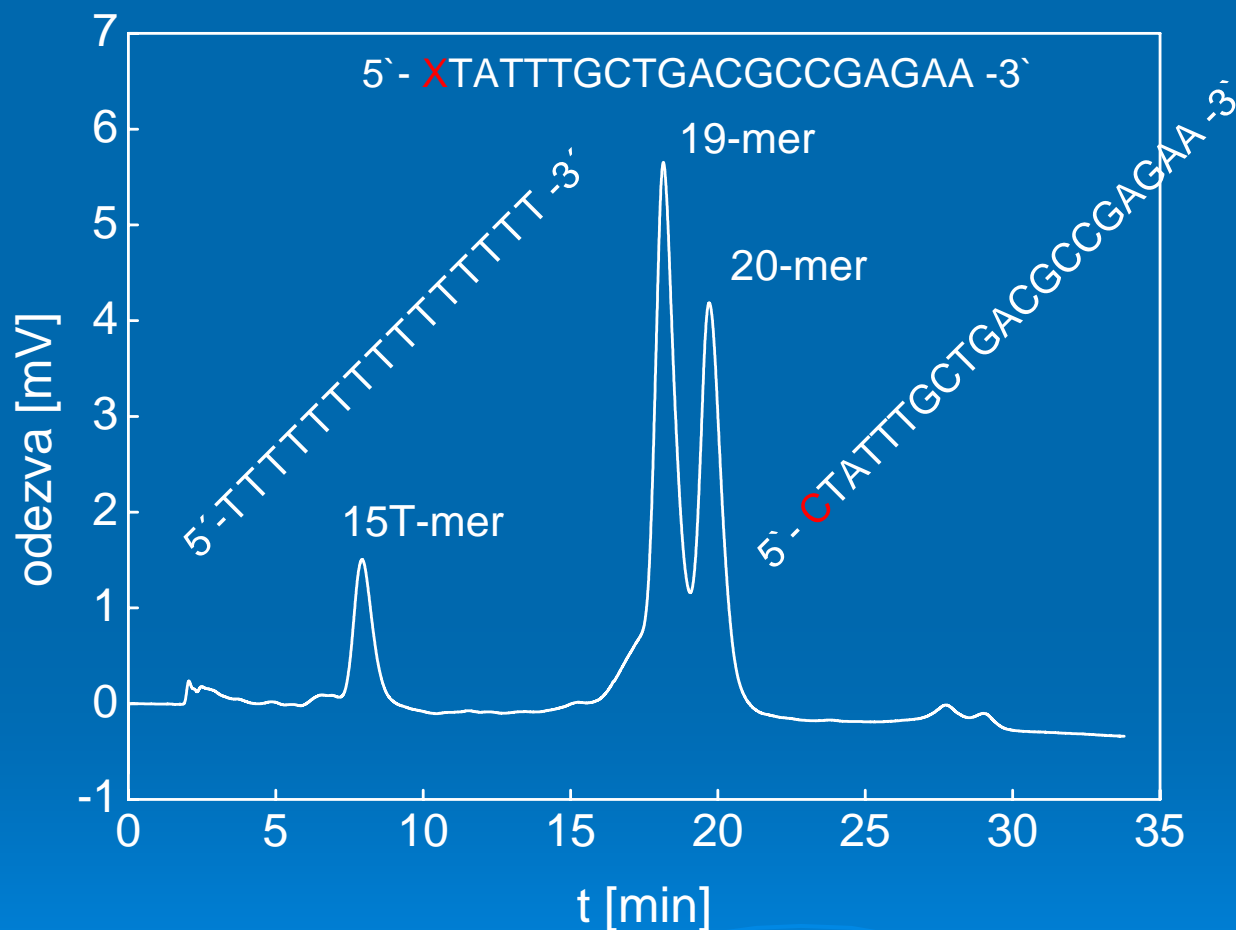
~ složení polymerizační směsi: 17,8 % BMA + 21,8 % EDMA + 0,4 % AIBN + 18,0 % butan-1,4-diol + 36,0 % propan-1-ol + 6,0 % deioniz. voda (hm. %)

~ délka kolony: 14 cm (i.d. 320  $\mu$ m)

~ mobilní fáze: 10:89,5:0,5 (v/v/v) ACN:H<sub>2</sub>O:TFA

~ průtok: 2  $\mu$ L/min

~ UV detekce: 214 nm



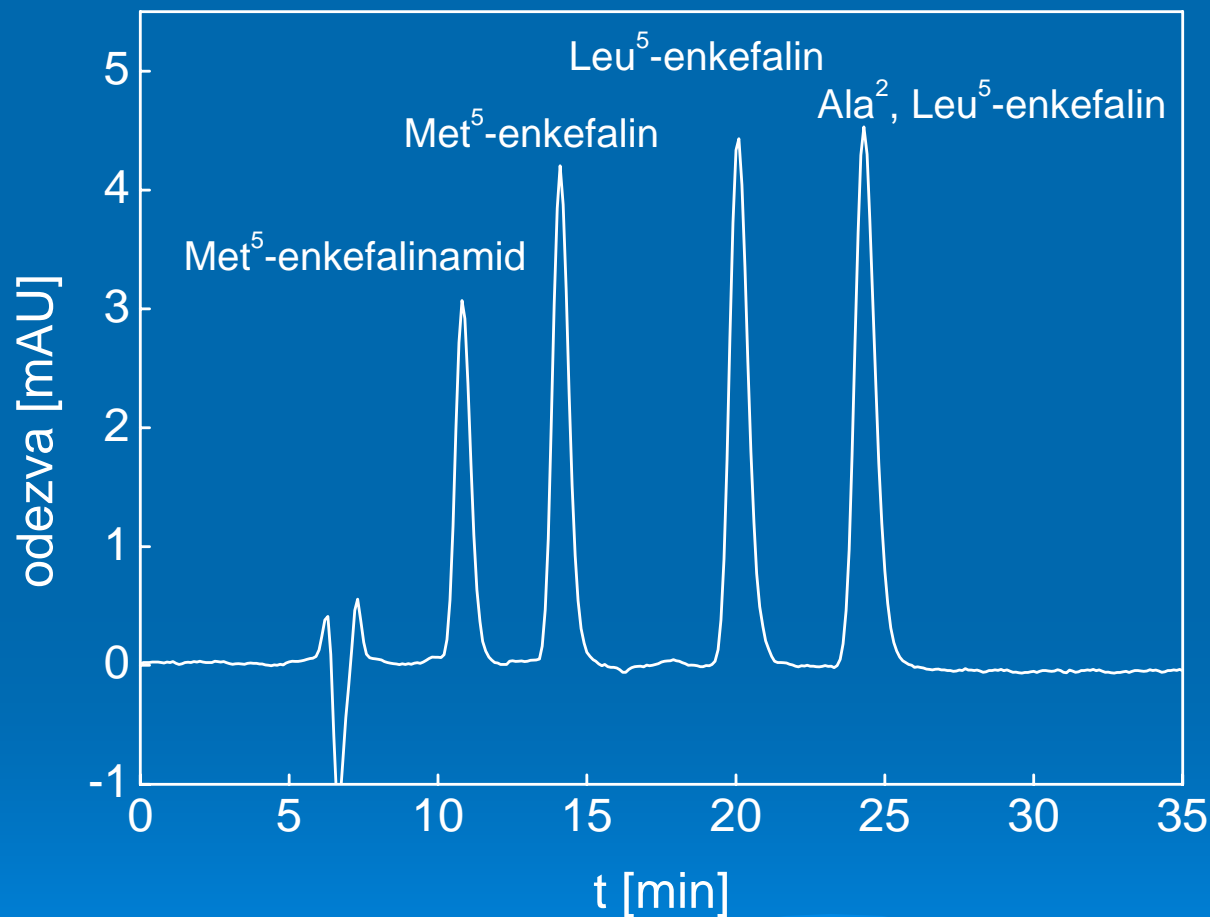
~ složení polymerizační směsi: 15,4 % HMMAA + 12,4 % EDMA + 0,3 % AIBN + 7,5 % butan-1,4-diol + 64,4 % propan-1-ol (hmotnostní %)

~ délka kolony: 17 cm (i.d. 320  $\mu\text{m}$ ); teplota: 30  $^{\circ}\text{C}$

~ mobilní fáze: A - 100 mM TEAA ve vodě, B - 100 mM TEAA v ACN; gradient: 87 - 80 % B za 60 min; průtok: 6  $\mu\text{L}/\text{min}$

~ UV detekce: 260 nm

# Kapilární kolony



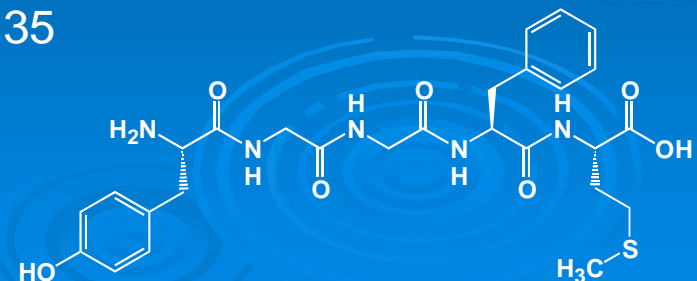
~ kolona: XTerra RP C18  
3,5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  0,32 mm)

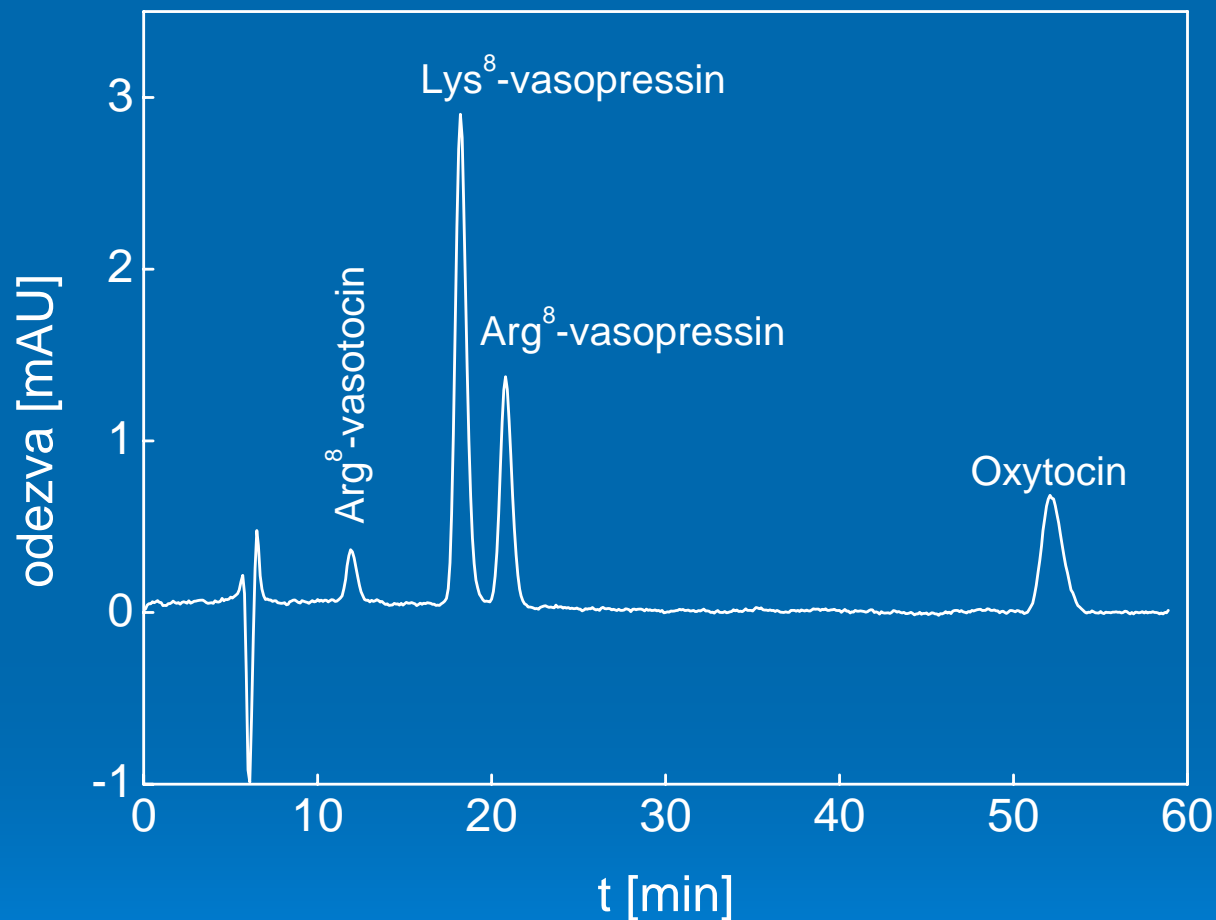
~ mobilní fáze: 75 %  
(0,1% TFA v H<sub>2</sub>O) + 25 %  
(0,1% TFA v ACN)

~ průtok: 3  $\mu\text{L}/\text{min}$

~ UV detekce: 212 nm

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met  
Met<sup>5</sup>-enkefalin





kolona: XTerra RP C18  
3,5  $\mu\text{m}$  (150 x 0,32 mm)

mobilní fáze: 85 % (0,1 % TFA v H<sub>2</sub>O) + 15 % (0,1 % TFA v ACN)

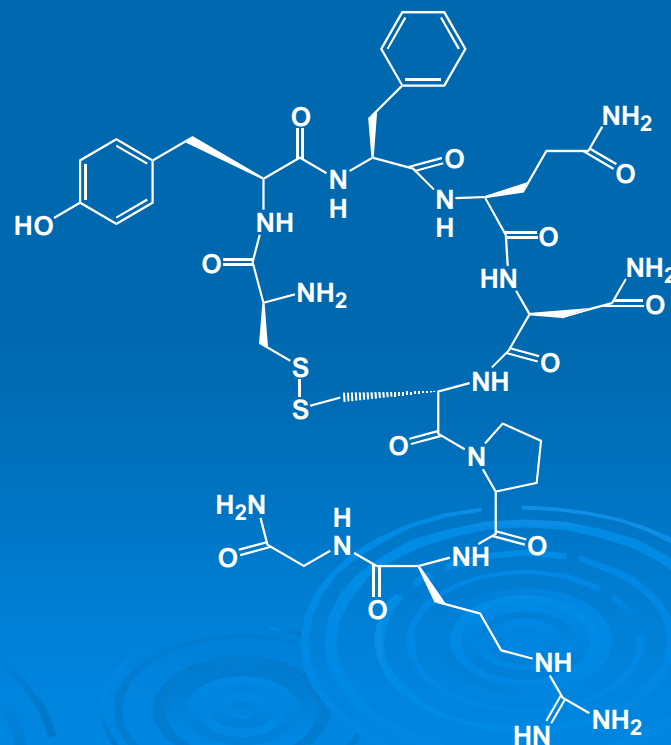
průtok: 3  $\mu\text{L}/\text{min}$

UV detekce: 212 nm

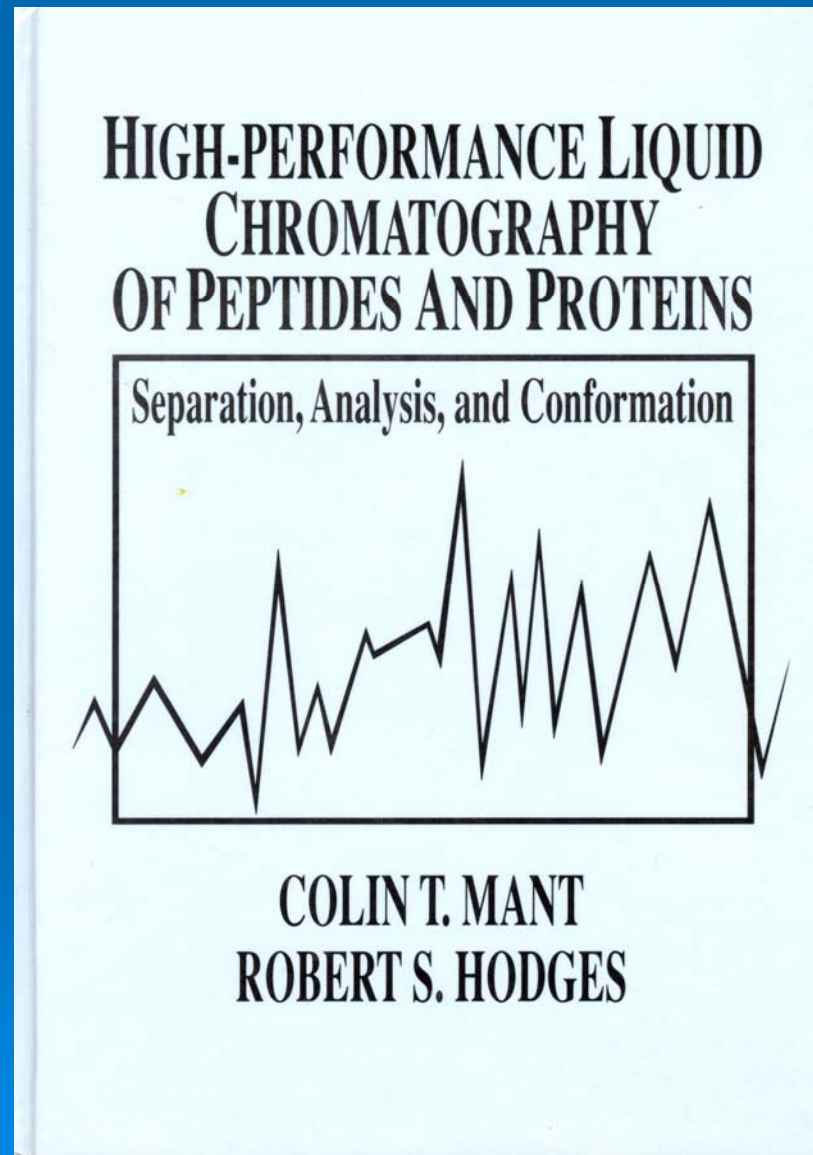


# Struktury studovaných nonapetidů

- ~ Arg<sup>8</sup>-vasotocin      Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly
- ~ Lys<sup>8</sup>-vasopresin    Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly
- ~ Arg<sup>8</sup>-vasopresin    Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly
- ~ Oxytocin              Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly  
disulfidický můstek mezi Cys1 a Cys6



# Doporučená literatura



# Děkuji za pozornost

- Poděkování za poskytnutí naměřených dat: Mgr. Klára Soukupová, Bc. Jan Kodeš, Bc. Lucie Janečková
- Grant: GA UK 335/2005/ B-CH/PřF