

MSc elvázastástechnika előadás

Horvai György

Az ábrák több, részben szerzői jogokkal védett műből, oktatási célra lettek kivéve. Csak az intranetre tehetők, továbbmásolásuk, terjesztésük nem megengedett.

TÉMÁK

Fehérjék és peptidek kromatográfiái

UPLC-HPLC

Kapilláris elektrokromatográfia

Kapilláris elektroforetikus módszerek

Új állófázisok: Monolit oszlopok

Új módszerek: HILIC (embedded polar, APN)

Lab-on-a-chip HPLC (és CZE)

Kétdimenziós kromatográfia

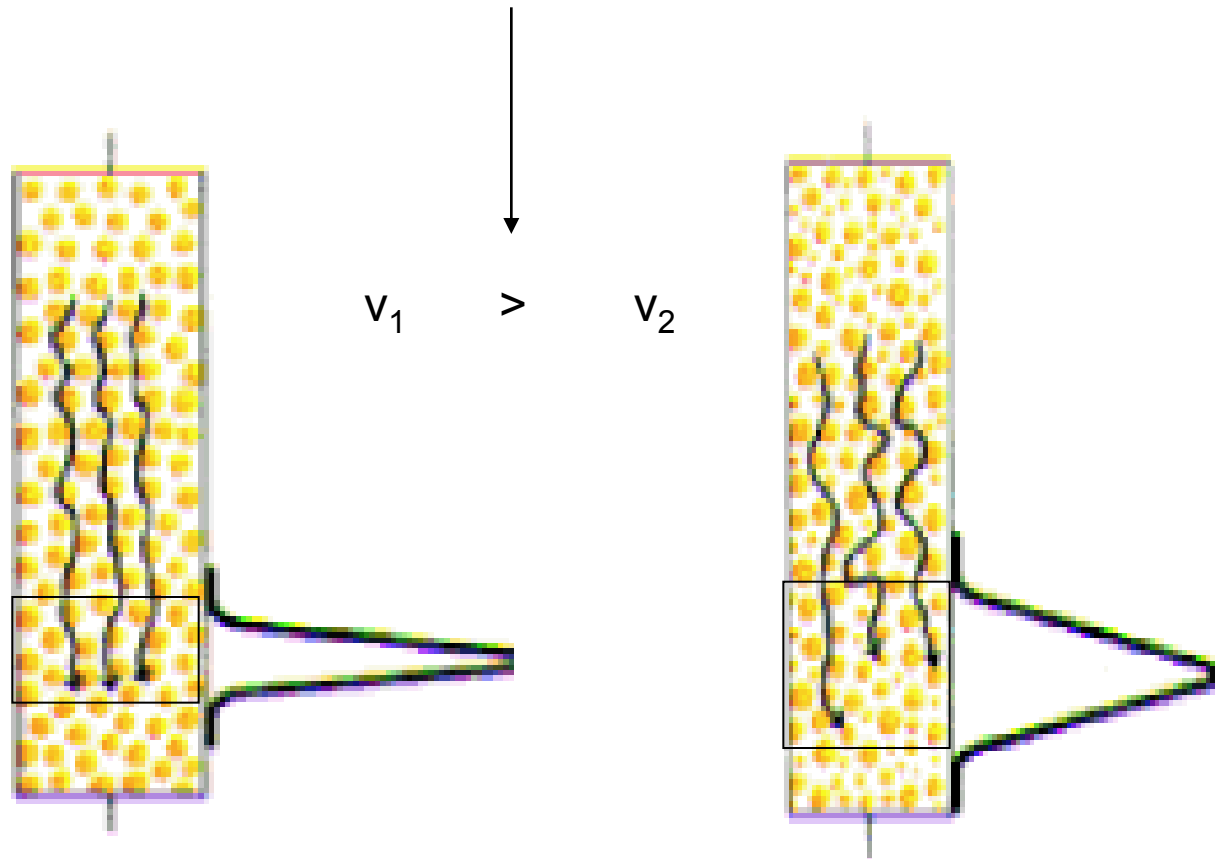
Nemlineáris kromatográfia

Fehérjék és peptidek kromatográfiai módszerei

- Gél (v. méretkizárásos) kromatográfia (GPC, SEC)
- Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC)
- Ioncserés proteinkromatográfia (IEX-PC)
- Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)
- Affinitás kromatográfia

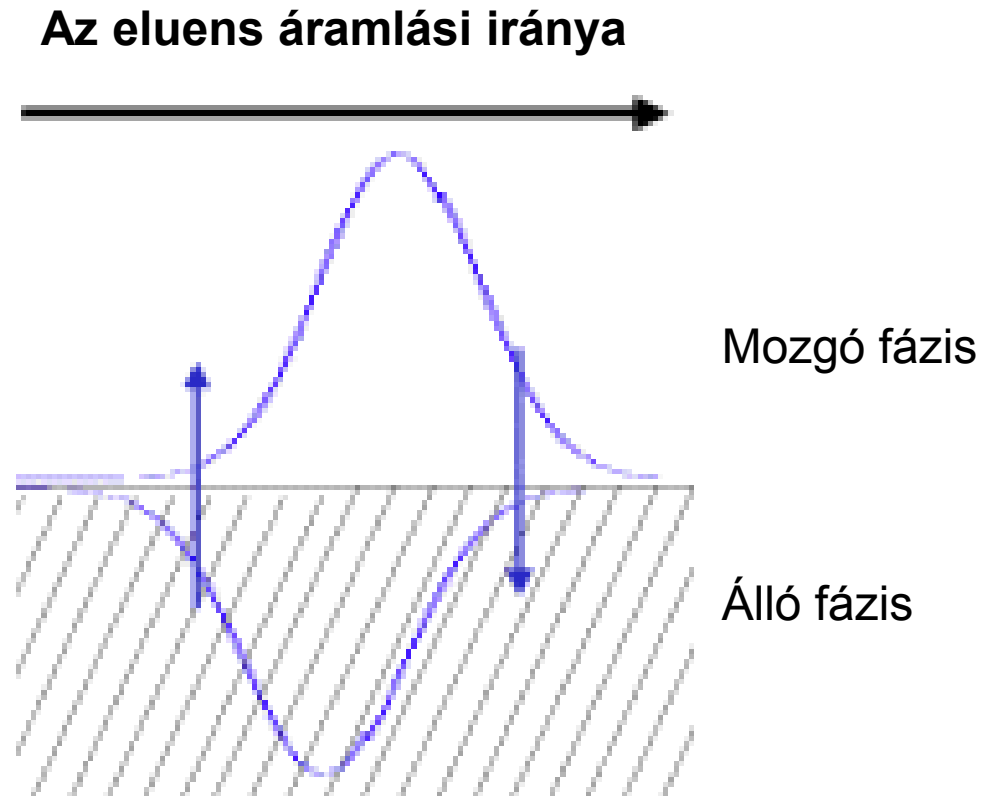
Eluciós kromatográfiák. Zónaszélesítő hatások –

1. A töltetágyban fellépő axiális diszperzió/ Taylor-diffúzió miatti dugó/zónaszélesedés (megkötődés/szorpció nélkül)



Egy adott dugószerűen injektált, az eluensben dugószerűen vándorló komponens koncentráció profilja, eltérő eluens áramlási sebességek mellett

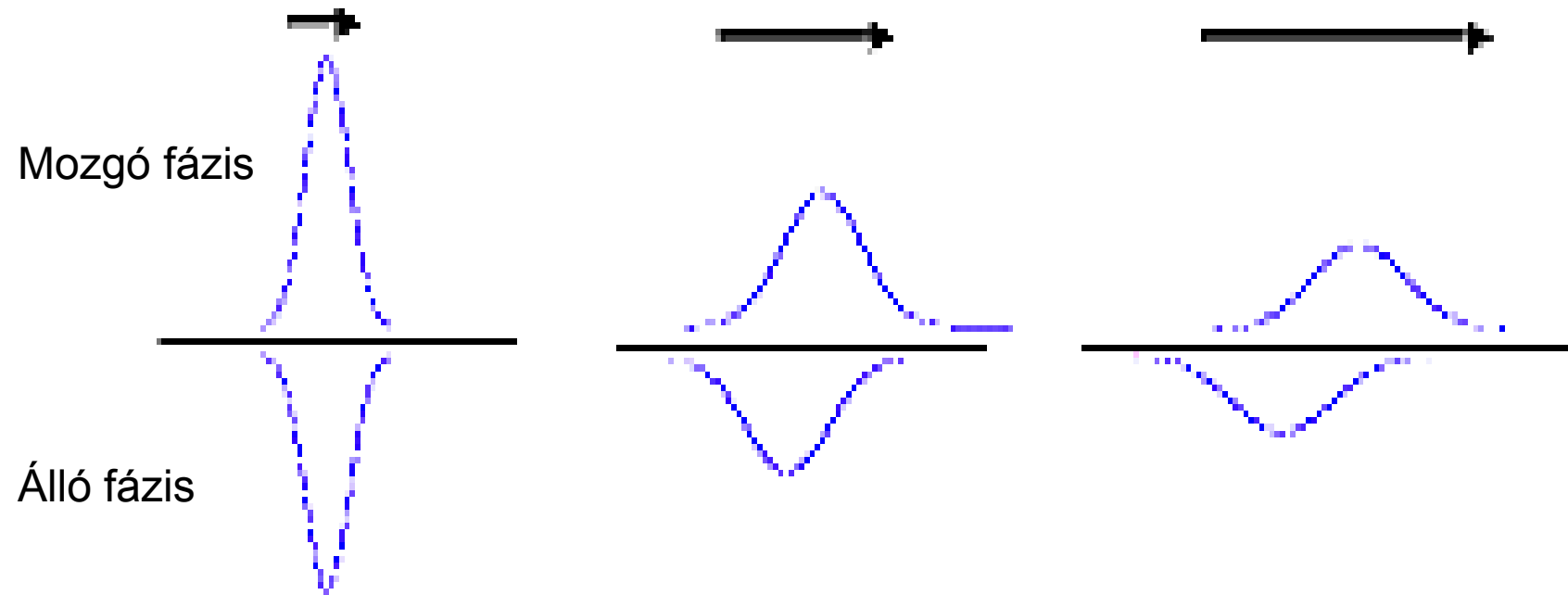
2. Az anyagátadás az áramlási irányra merőlegesen az eluált mintakomponens-dugó(k) vándorlása során



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

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

A nyilak hossza az áramlási sebesség nagyságát is mutatják



Az áramlási irányra merőleges anyagátadás az áramlási sebességgel arányos zónaszélesedést okoz

Relatív zónaszélesedés (H), van Deemter-egyenlet

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

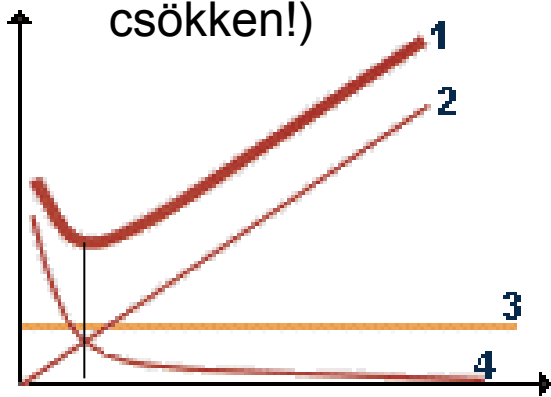
(w_a , az alapvonalon mért csúcshélesség, t_R retenciós idő)

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

ahol v a lineáris áramlási sebesség

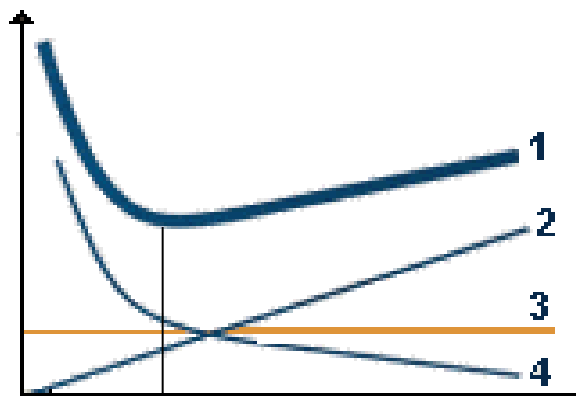
H, nagy molekulák esetén

(D, diffúziós állandó mérettel csökken!)



H, kis molekulák esetén

(D, diffúziós állandó nagyobb!)



Eredő H (1)

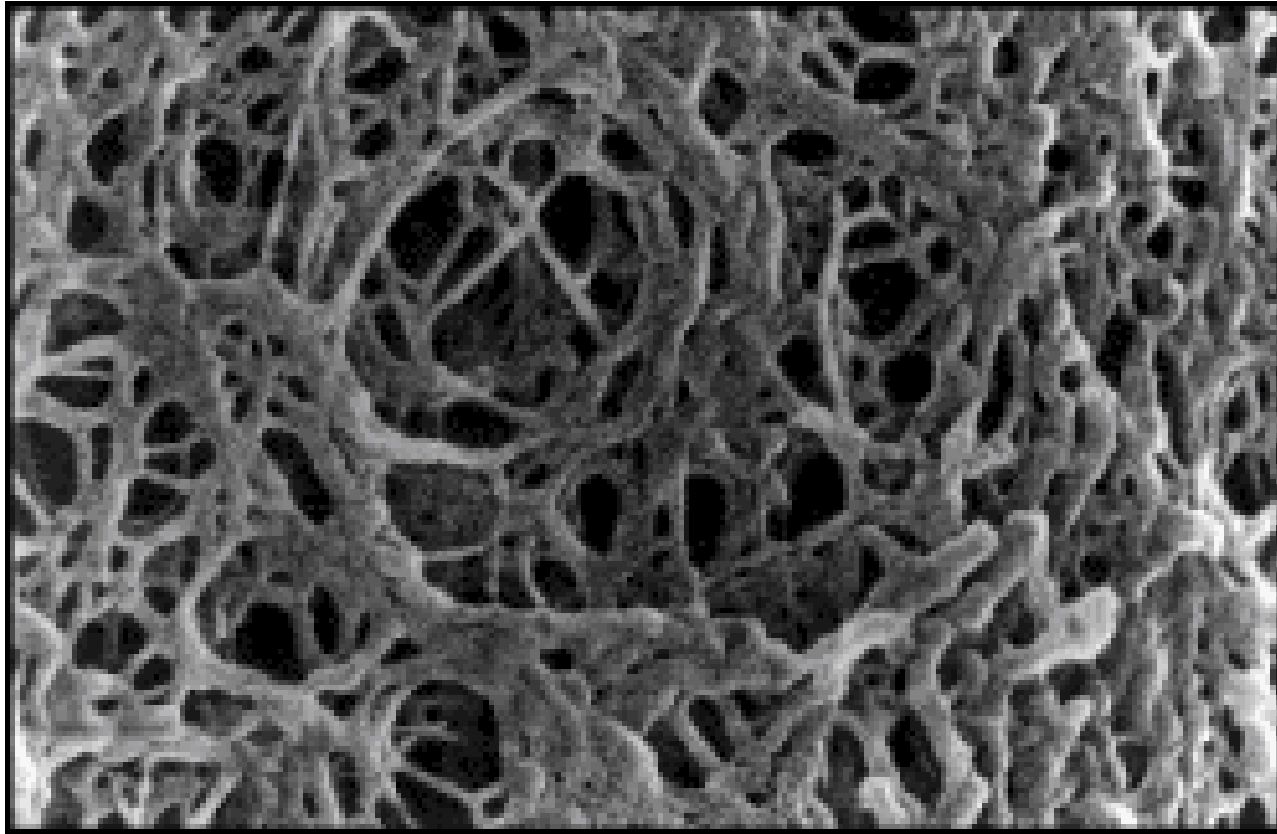
Anyagátadás miatti diszperzió (2)

Visszakeveredés (3)

Axiális diszperzió (4)

Optimálendő lineáris áramlási sebesség, v (cm/min)

Gél-(permeációs, **GPC**), gélszűrős, ill. más néven méretkizárásos (**SEC**), kromatográfiás xerogél-töltetek



Agarózgél (gyöngy) pásztázó elektronmikroszkópos képe
(M=50.000, *Anders S. Medin, PhD Thesis, Uppsala University 1995.*)

Gélkromatográfiás térfogatok nevezéktana

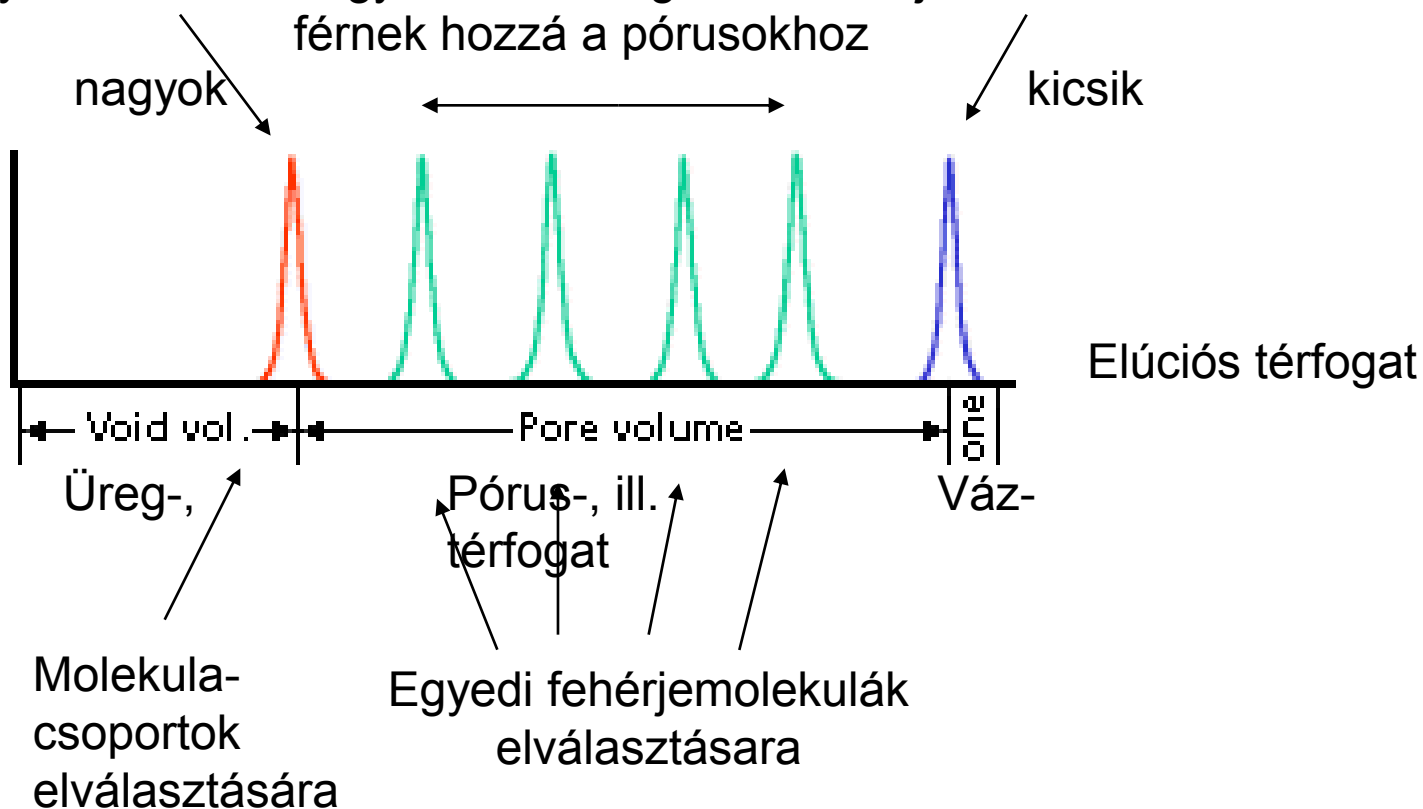
A gélkromatográfiás oszlopban az összes mintamolekula számára hozzáférhető a gyöngyök közötti folyadék. Ezt a folyadékrészt a gélszűrésben *üregtérfogatnak* nevezik, ez általában az oszlop teljes térfogatának kb. a 30%-át teszik ki.

A gélszűrő közeg olyan méretű pórusokat tartalmaz, amely megengedi, hogy a minta molekulái behatoljanak a gél gyöngyeibe, de csak a méretüktől függő mértékben. A pórusosnak a teljes térfogatát együtt nevezik *pórustérfogatnak*.

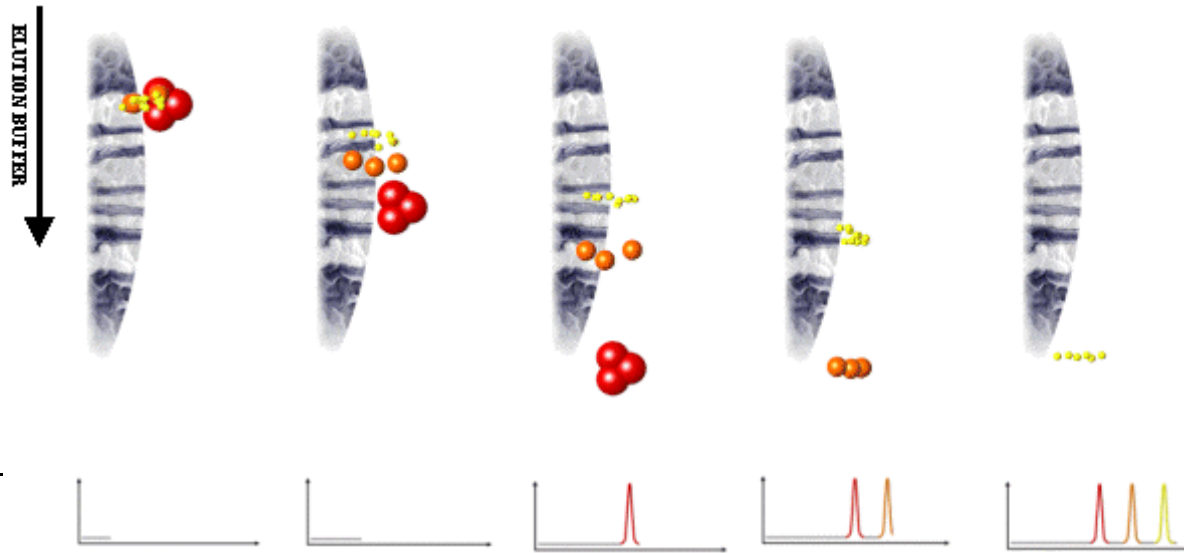
A gélgyöngyök nem-pórusos részét *vázrésznek* nevezik, ebbe nyilván nem juthatnak bele a minta molekulái. Egy megfelelő gélszűrő vázrésztérfogata kb. 3-5 %-a egy jól megtöltött oszlopnak.

Az üreg-, ill. pórustérfogatok gélkromatográfiás felhasználása különböző célokra

Az egyre csökkenő méretű mintamolekulák, amelyek egyáltalán nem, vagy csak részlegesen, ill. teljes mértékben férnek hozzá a pórusokhoz



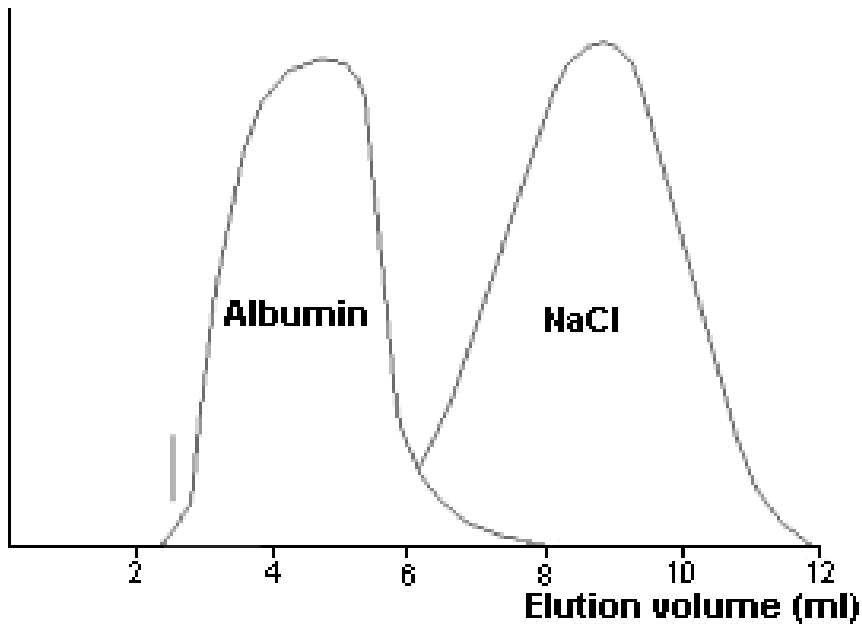
Pufferolt eluensáram



Valójában szakaszos és preparatív (frakcionálósos) jellegű kromatográfia

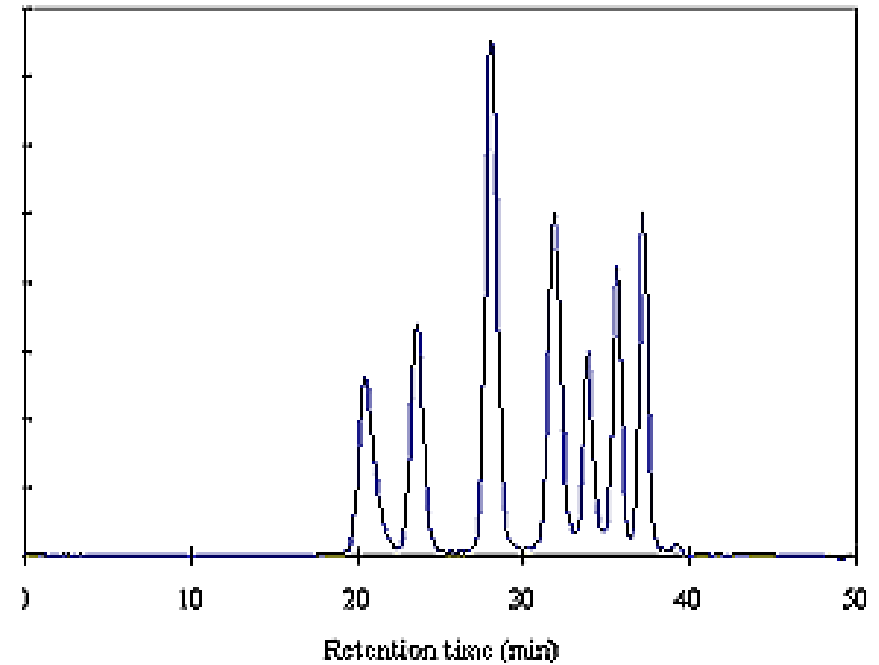
Csoportelválasztási mód -

Albumin sóalanítása
PD-10 oszlopon.



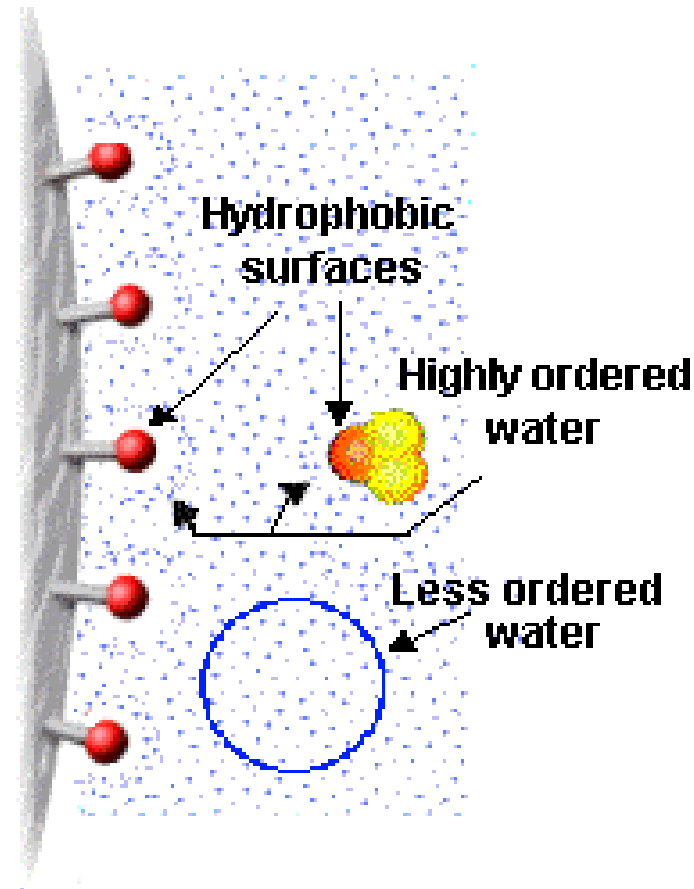
Nagyfelbontású mód -

Peptidek elválasztása
'Superdex Peptide' oszlopon.



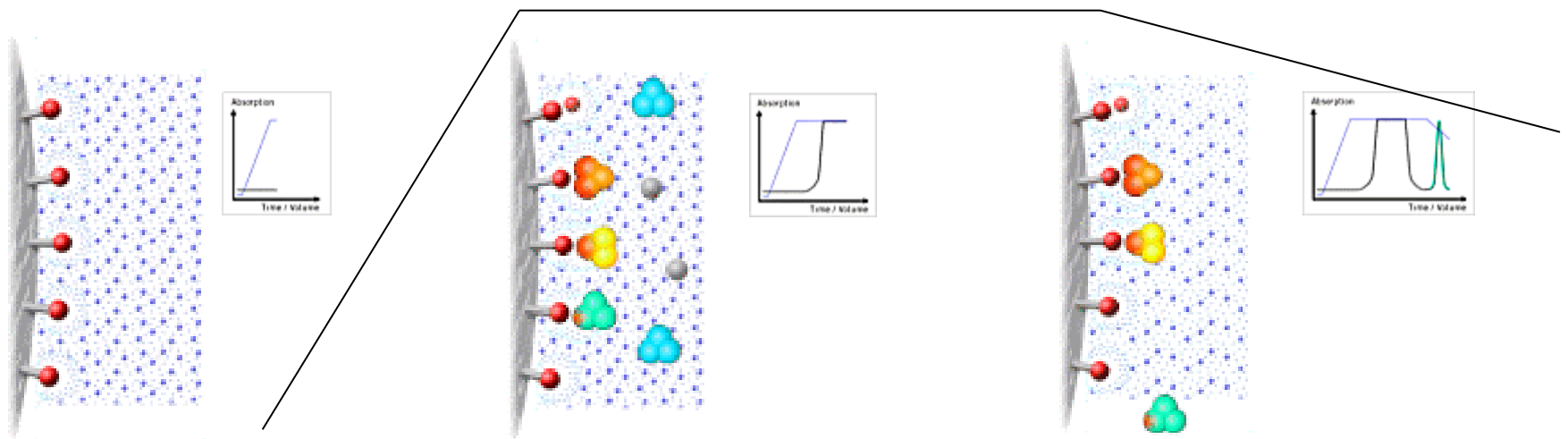
Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)

azzal foglalkozik, hogy a megnövelje a fehérjék és a töltetek hidrofób részeinek kölcsönhatását a sókoncentráció (ionerősség) fokozatos változtatásával (kezdeti ideiglenes, részleges „kisózás” keresztül)

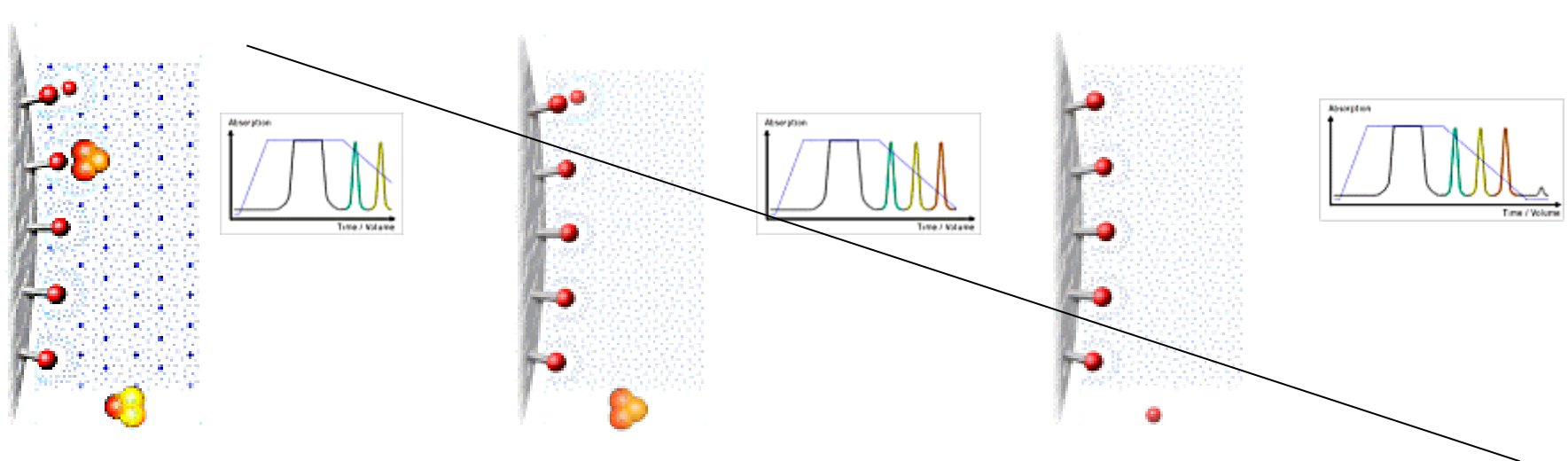


$C_{\text{só}}$

0.) Tömény, nagy sókoncentrációjú eluens

 $C_{\text{só}}$

1.) Apoláris(sá váló) proteinek megkötődése

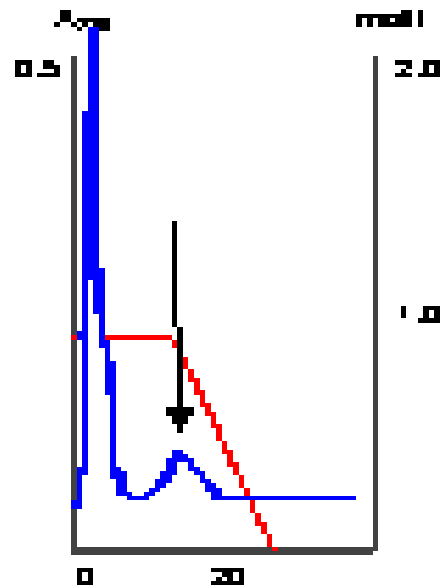


2.) Csökkenő sókoncentrációjú (negatív gradiensű) eluensáramban differenciált fehérje-lemosódás (kevésbé hidrofóbok, majd a jobban hidrofóbok)

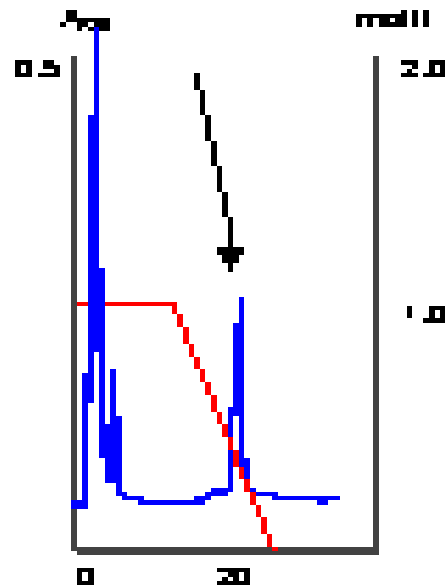
0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

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

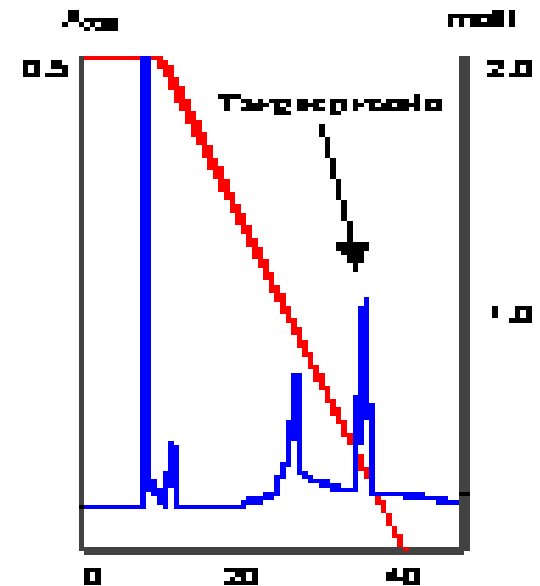
2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



$C_{\text{só}}^0$ - túl alacsony



- optimális



- túl magas

A sógradiens kezdeti koncentrációjának optimális beállítása nagyon fontos a fehérjék HIC-módszerű elválasztásának, tisztításának elérhető hatékonyságában:

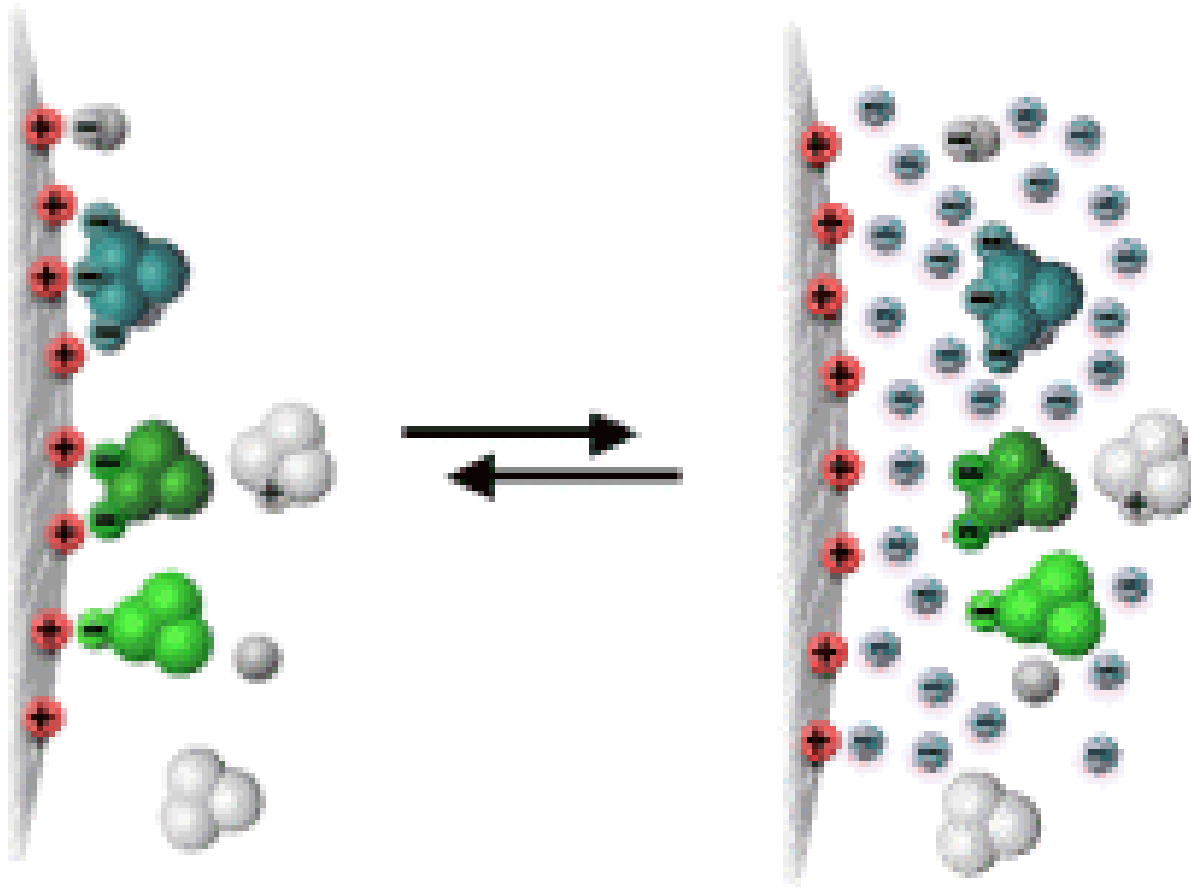
A baloldali kromatogramon a sókoncentráció nem elégséges a kívánt (nyíllal jelzett) fehérje teljes mértékű megkötéséhez.

A középső kromatogramon a kívánt fehérje éles csúcsban eluálódik a csökkenő gradiens hatására.

Tisztítási szempontból a nagyobb kezdeti koncentrációjú sógradiens sem előnyösebb a jobb oldali kromatogramon, mivel a minta más szennyeződései is megkötődnek és eluálódnak a sógradiens csökkentése során.

A HIC-es proteintisztítások során az eluens pH-ját általában nem tekintik optimalizálendő paraméternek.

Ioncserés fehérje/peptidkromatográfia (IEX-PC)



A töltésekkel rendelkező molekulák az ellentétes előjelű töltéssel rendelkező ioncserélőn adszorbeálódhatnak. A dinamikus egyensúlyt a **pH és a sókoncentráció** befolyásolja. Lehetőség a lemosásra növekvő sógradienssel.

A pH változtatása egy igen hatékony módja a fehérje molekulák eredő töltésének befolyásolására, és ezért általánosan használatos a szelektivitás (pl. elúciós sorrend) ill. felbontás (elúciós távolságok) szabályozására.

Az eluensbe adagolt sóban található versenyző ionok nem befolyásolják a szelektivitást, de elősegítik a fehérjemolekulák deszorpcióját a kiszorító ion növekvő ionos töltöttsége függvényében.

Az ioncserés protein/peptidkromatográfiában általában egyvegyértékű semleges sókat használnak (pl. NaCl-ot) deszorbeáltató ágensként, főleg azért mert a NaCl nem befolyásolja az aktuálisan beállított pH-t.

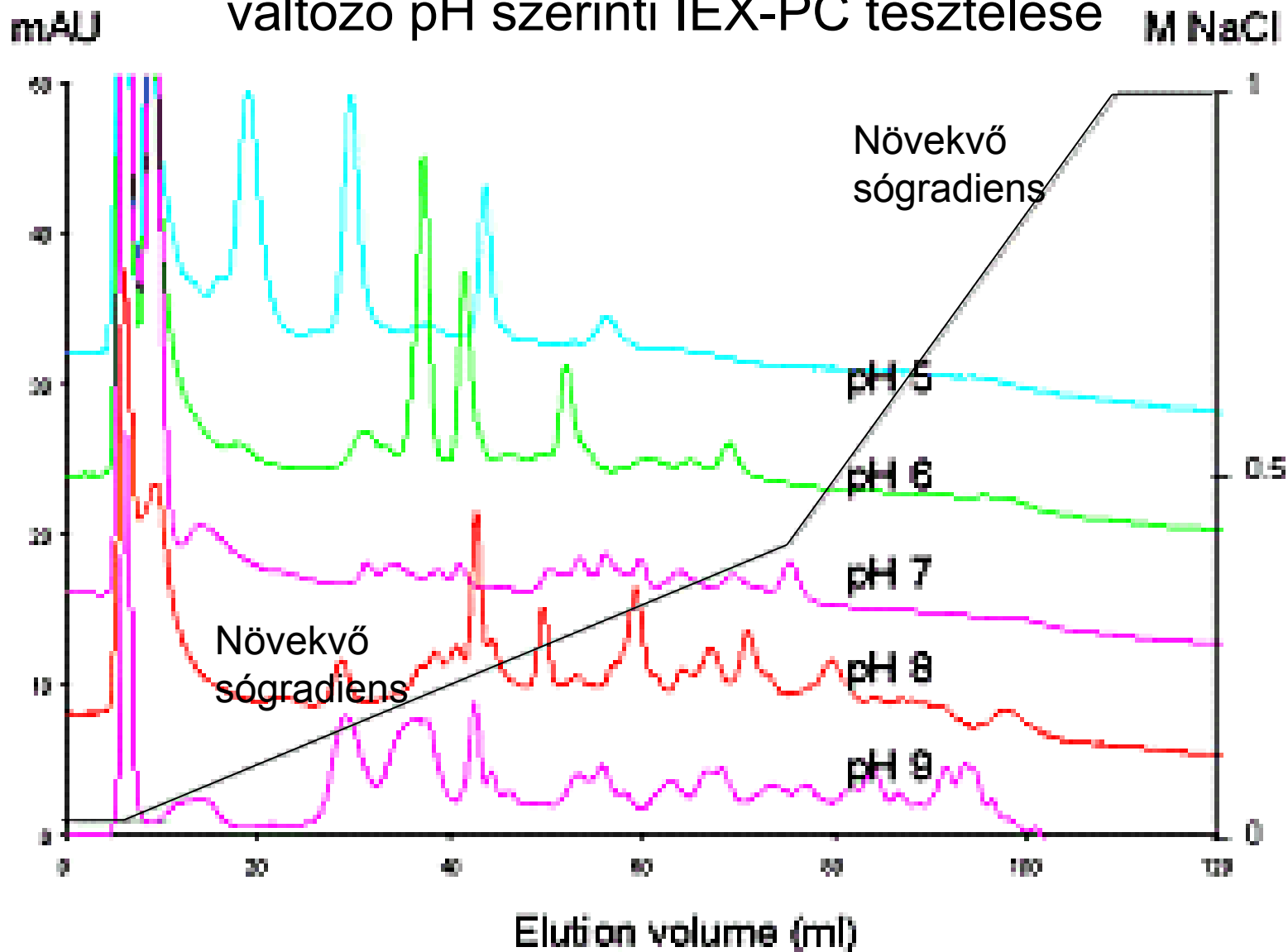
Minél nagyobb a fehérje/peptid eredő töltése, annál erősebben fog abszorbeálódni, és annál magasabb sókoncentráció szükséges a minta deszorbeáltatására.

Az IEX-PC nagyfelbontású módszerénél leggyakrabban **növekvő sókoncentrációjú gradiens-elúciót** alkalmaznak.

Az elúciós sorrend ilyenkor:



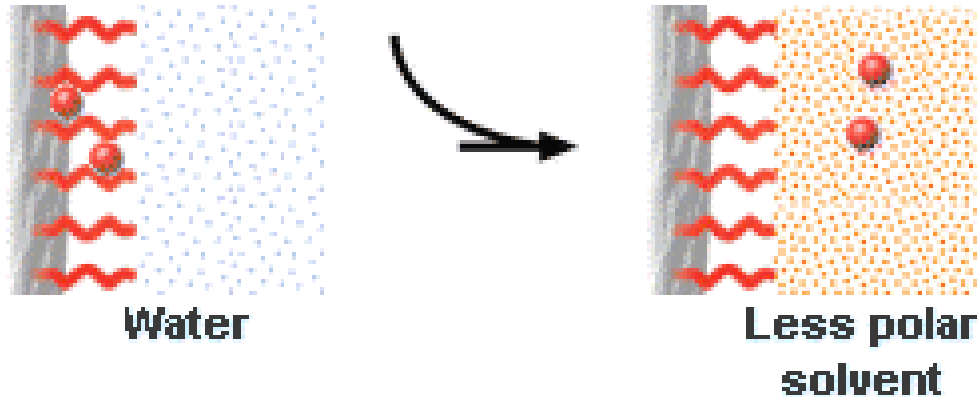
Nyers pancreatin minták (2 mg) változó pH szerinti IEX-PC tesztelése



(készülék: ÄKTAexplorer 100.
oszlop: RESOURCE Q; 6 ml)

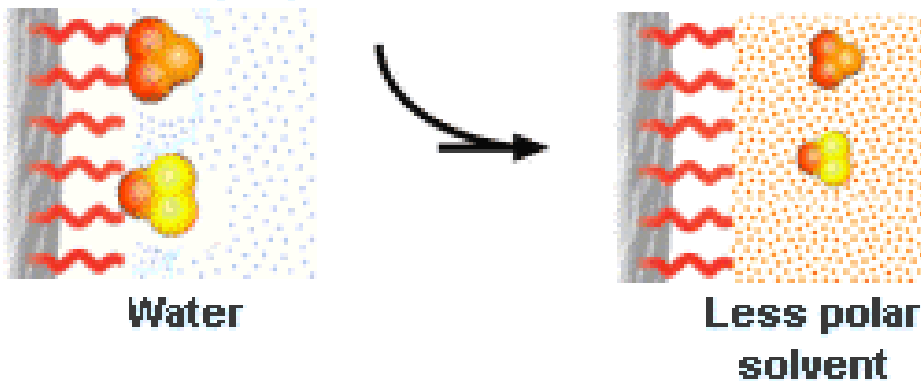
RP-HPLC (fordított fázisú-HPLC) gradiens elúcióval (csökkenő polaritással, oldószererősség-változtatással)

Decrease polar
properties of eluent

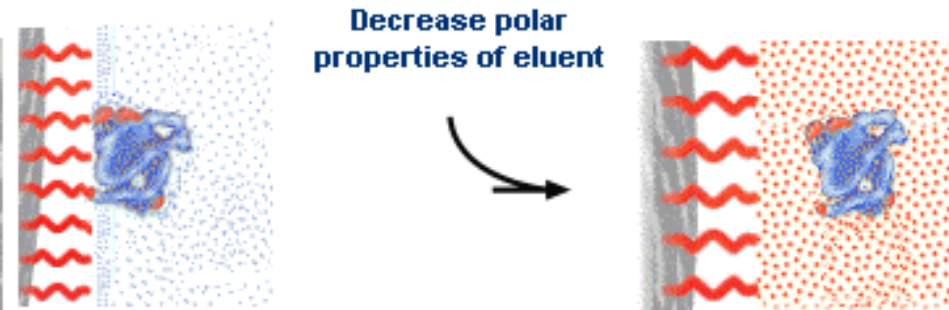


A szerves molekulák általában bekötődnek pl. a C₁₈-módosított szilikagél állófázis szénláncai közé.

Decrease polar
properties of eluent



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



A mozgó fázis polaritásának csökkentése csökkentheti a hidrofób kölcsönhatások erősségét/ azok kialakulásának lehetőségét is.

A fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete nagyobb mértékben függ a külső hidrofób kölcsönhatásokon, mint a szerkezetet stabilizáló erőkn. A fordított fázisú gradiens eluciós elegyeket így a hidrofób kölcsönhatások gyengítésére tervezik, tehát a potenciális denaturálószeretek közül kerülnek ki.



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

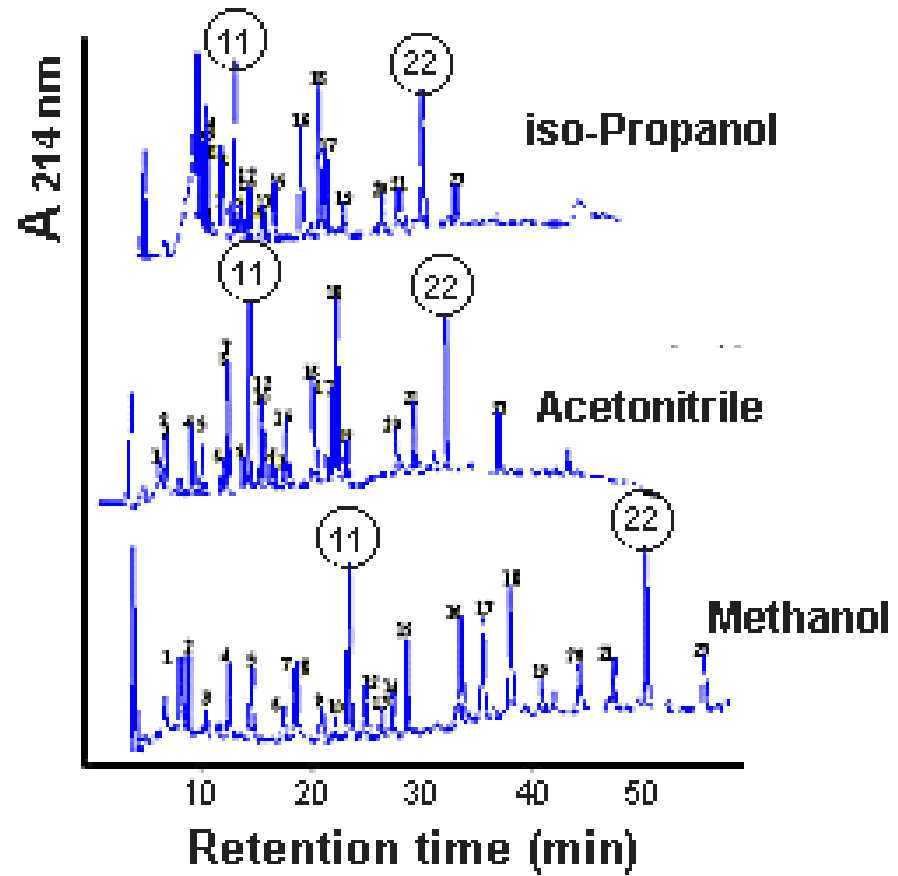
Az RP-HPLC gyakorlati kivitelezése: folyamatos gradiens vagy lépcsős elucióval

Use of Reversed phase HPL-chromatography	
High resolution mode (folyamatos: gradient elution)	Group separation mode (lépcsőszerű: step elution)
Separates peptides, proteins and oligonucleotides according to net hydrophobicity.	Concentrates dilute oligonucleotide and peptide samples.
Suitable for intermediate steps and polishing in multi-step purification protocols.	Suitable for so called solid phase extraction.
Main technique for the purification of synthetic peptides.	Suitable for desalting of peptide and oligonucleotide samples.
Main technique for the analysis of peptides and for peptide mapping.	

RP-HPLC gyakorlati vonatkozásai a peptidek és fehérjék esetén

Peptidek és fehérjék esetén **gradiens elúció** alkalmazása a megszokott (a nemvízes komponenst növekvő arányban adagolva).

Amint az ábrán is látható, az ott szereplő eluensek inkább csak az **eluenserősségükben** különböznek, mintsem hogy befolyásolnák az oszlop szelektivitását (kb. azonos elúciós sorrend marad).



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

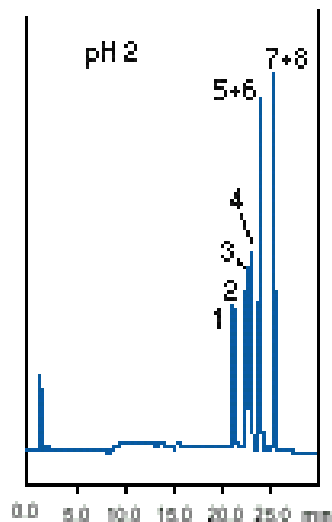
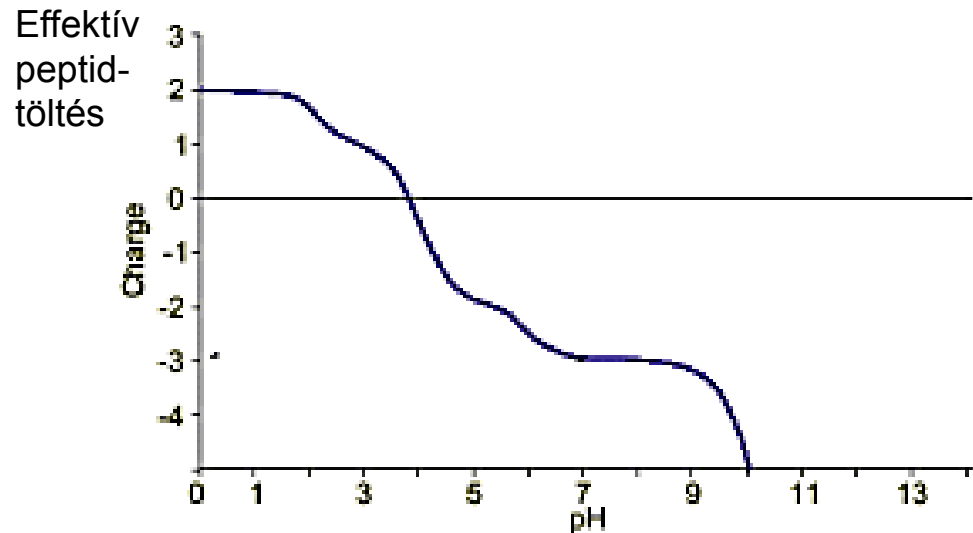
Az **acetonitril** alkalmazása előnyös a nagyon jó UV-eresztőképessége következtében, ill. hogy alig növeli meg az eluens viszkozitását és így a szükséges oszlopnymórást. Így a peptidek és fehérjék elválasztása terén messze a leggyakrabban alkalmazott szerves eluens-módosító komponens, így izopropanolra csak akkor kerül sor, amikor azt a minta stabilitása megköveteli.

A pH szerepe

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

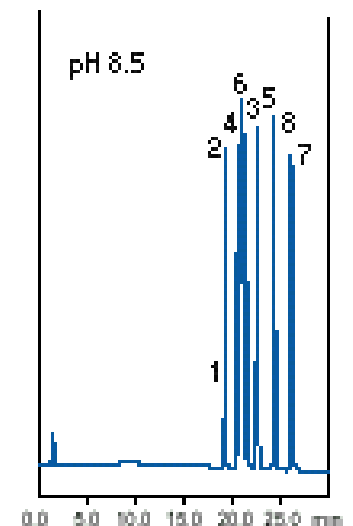
Mivel a peptidok hidrofóbicitását erősen befolyásolja a pH, ezért amikor különböző pH értékeken történik az elválasztás, a peptidok eluciósi ideje számottevően megváltozhat. Pl. a pH értékének a megváltoztatásakor 2-ről 8.5-re ténylegesen átrendeződik az angiotenzin-származékok eluciósi sorrendje, amint az alsó ábra is mutatja.

H-Ile-Ser-Pro-Asp-Gly-His-Glu-Tyr-Ile-Tyr(PO₃)-Val-Asp-Pro-Met-Gln-Leu-Pro-Tyr-OH

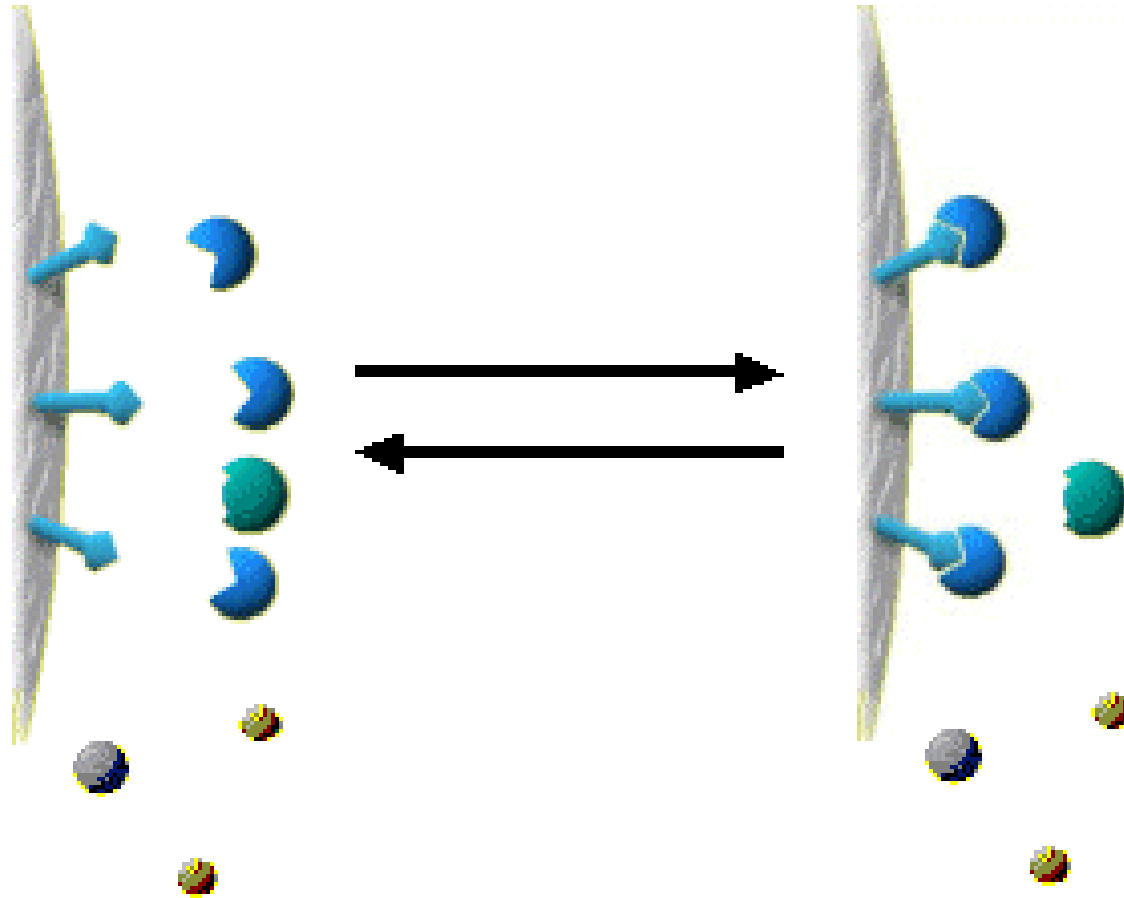


Sephasil C18 peptide

Sample: 1. Val4-Ile7-AT III
2. Ile7-AT III
3. Val4-AT III
4. Sar1-Leu8-AT II
5. AT III
6. AT II
7. des-Asp1-AT I
8. AT I



Affinitás kromatográfia



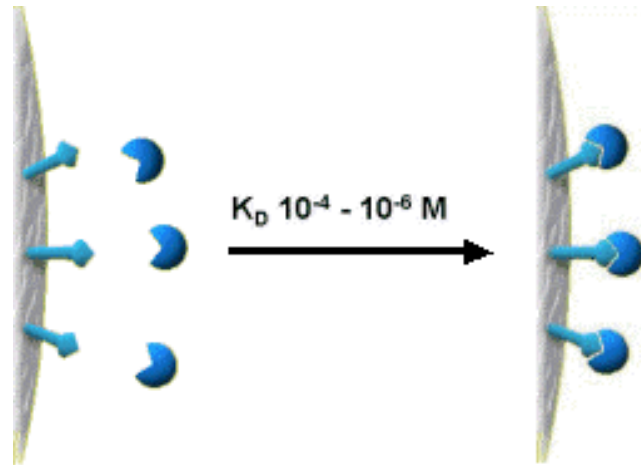
Az affinitás kromatográfia erősen specifikus, de ennek ellenére reverzibilis kötődést mutató kölcsönhatásokon alapszik. Specifikus elválasztásra, preparatív célra, tisztításra alkalmazható módszer.

Csoportspecifikus ligandumokkal működő affinkromatográfiának széles alkalmazási köre és tere van, mivel ma már ilyen célra számos kereskedelmileg is elérhető kötőanyag áll rendelkezésre.

Az alábbi táblázat számos példát sorol fel a leggyakrabban használt ilyen típusú hordozóhoz immobilizált ligandumokról.

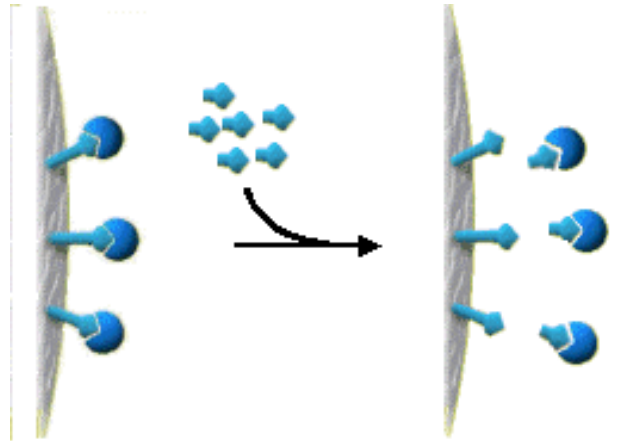
Group-specific ligand	Specificity
Protein A	Fc region of IgG
Protein G	Fc region of IgG
Concanavalin A	Glucopyranosyl and Mannopyranosyl groups
Cibacron Blue	Broad range of enzymes, serum albumin
Procion Red	NADP+ dependent enzymes
Lysine	Plasminogen, ribosomal RNA
Arginine	Serine proteases
Benzamidine	Serine proteases
Calmodulin	Proteins regulated by calmodulin
Heparin	Coagulation factors, lipoproteins, lipases, hormones, steroid receptors, protein synthesis factors, Nucleic acid-binding enzymes
Transition metal ions	Proteins and peptides which contain accessible Histidine

A jó kötődésnél a komplexstabilitási állandó értékei tipikusan $10^4 - 10^6$ M tartományba esnek.

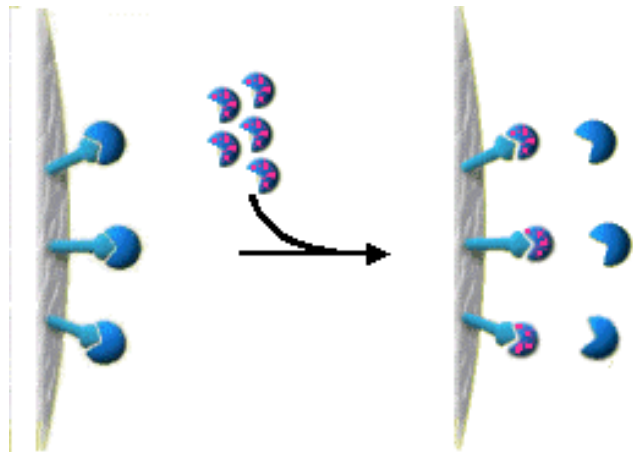


Az eluáló/kiszorítószere vonatkozóan a komplexstabilitási állandó értékek ennél vagy kissé nagyobb, (avagy csak kicsit kisebb tartományba kell, hogy legalább essenek, ekkor viszont nagy koncentrációban kell alkalmazni őket a lemosáshoz)

Elúciós lehetőségek



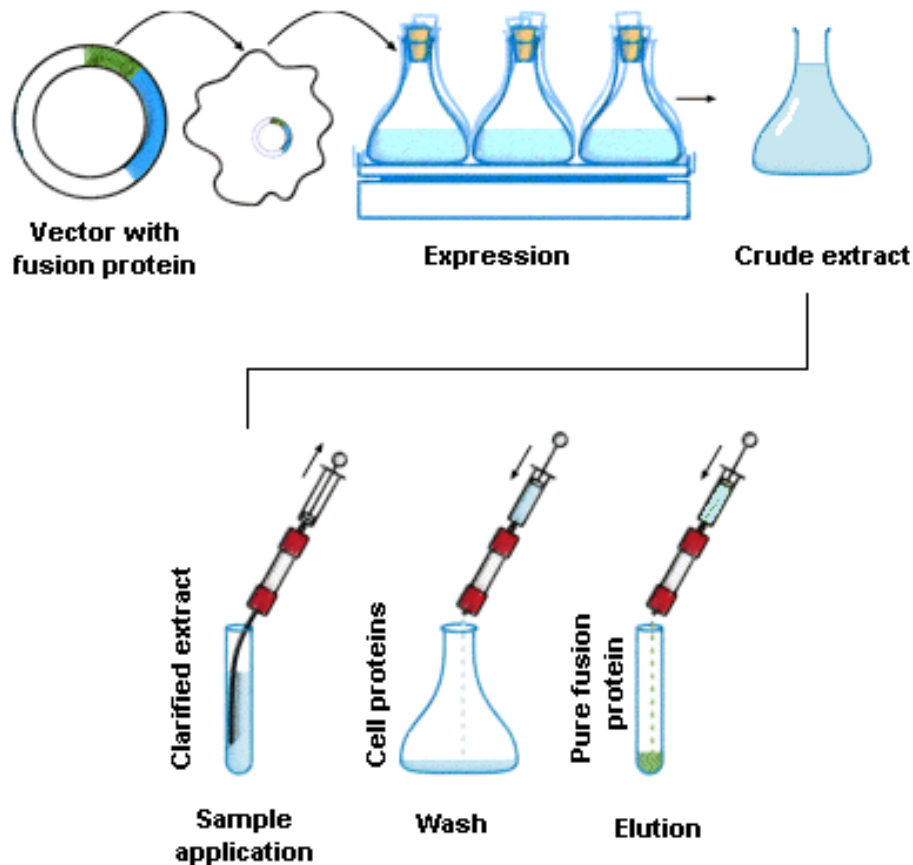
Elúció a célvegyület elvonásával: Szabad ligandumot adagolnak, hogy elvonja a mátrixhoz kötött célvegyületet a mátrixtól.



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

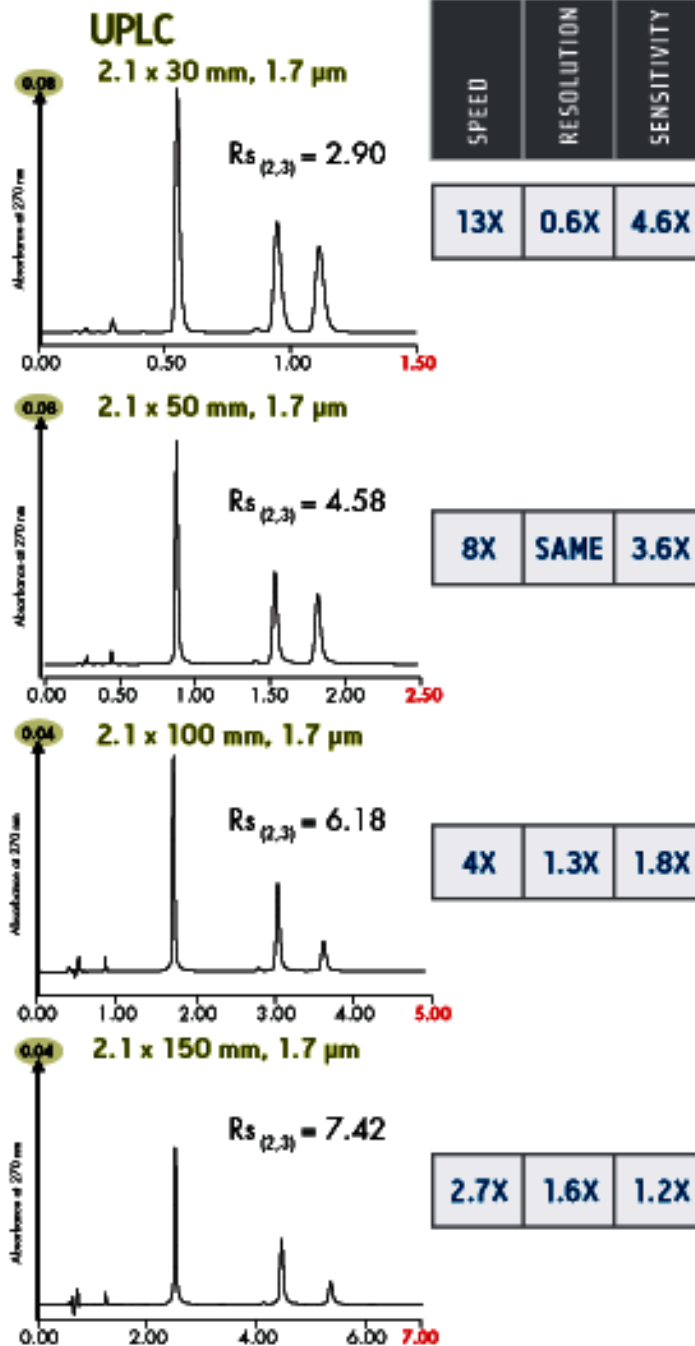
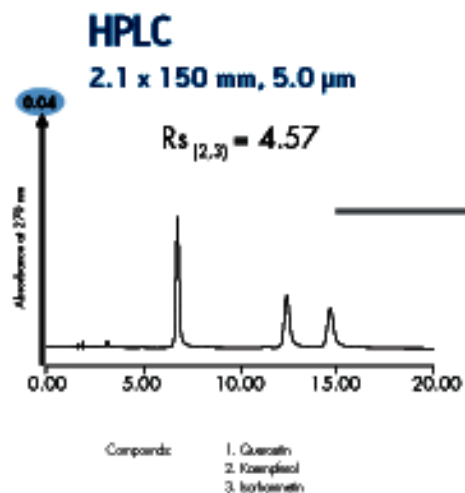
Rekombináns proteinek affin-kromatográfiája

A rekombináns fehérjéket számottevően egyszerűsített módon tisztíthatják, ha az affinrész génjét egyesítik a rekombináns fehérje génjével. A gazdavektor (plazmid) kifejleszti a rekombináns proteint a hozzácsatolt affinrészsel együtt és affin-kromatográfias technikát lehet alkalmazni az ún. *fúziós fehérje* izolálásához és tisztításához. Bár nem mindig szükséges, az affinrészt speciális hasító enzimekkel el lehet távolítani a tisztítás után.



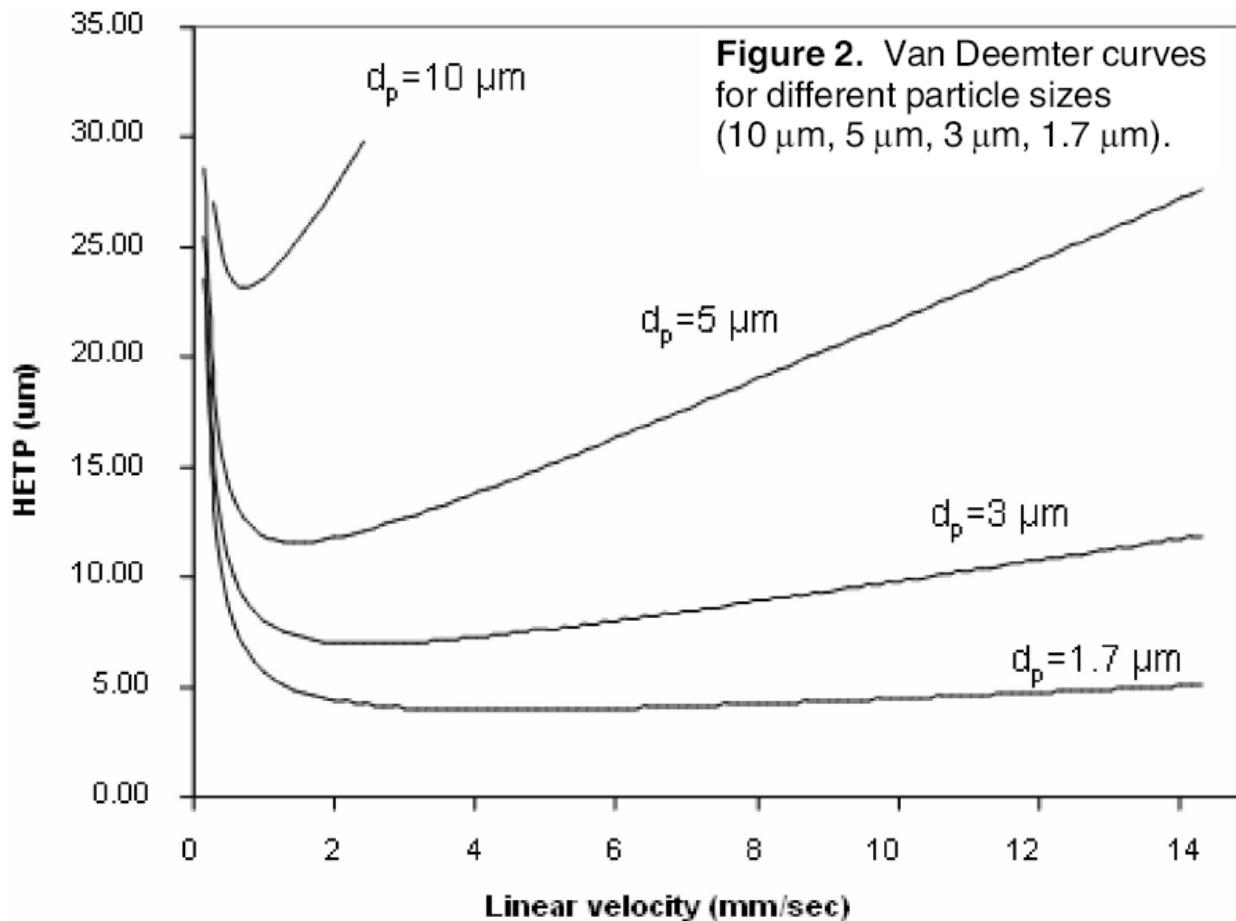
HPLC -- UPLC összevetés

Elúciós idő/felbontás kompromisszumok



HPLC vs UPLC: van Deemter diagram

- Az összehasonlítás alapja a klasszikus Van Deemter diagram.
- Apróbb töltetreszecskek: kisebb zónaszélesedés (HETP) még viszonylag nagyobb lineáris áramlási sebességeknél is → lehetőség a rövidebb elemzési időkre (magnövelt lineáris áramlási sebességnél mérve)



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

Flow Rate [mL/min]:

ID = 1.0 mm 0.07

ID = 2.1 mm 0.3

ID = 4.6 mm 1.4

Kapilláris elektroforetikus módszerek

Kapilláris: $d = 50-100\mu\text{m}$, általában kvarcüveg, néha teflon (PTFE)

Nagyfeszültség: $=10-30\text{ kV}$, ionokat, ionizálódó, v. ionizált része(cské)ket biztosan mozgatja \rightarrow elektroforézis (eltérő ionmozgékonyosság, eltérő **állandó** vándorlási sebesség)
 \rightarrow komponensek szétválása, szétválasztása

A **kapillárisban** kondenzált fázis(ok): pufferoldat(ok), micellás oldat, gél, kromatográfiás töltet lehet \rightarrow egyedi módszerek:

CZE – kap. zónaelektroforézis

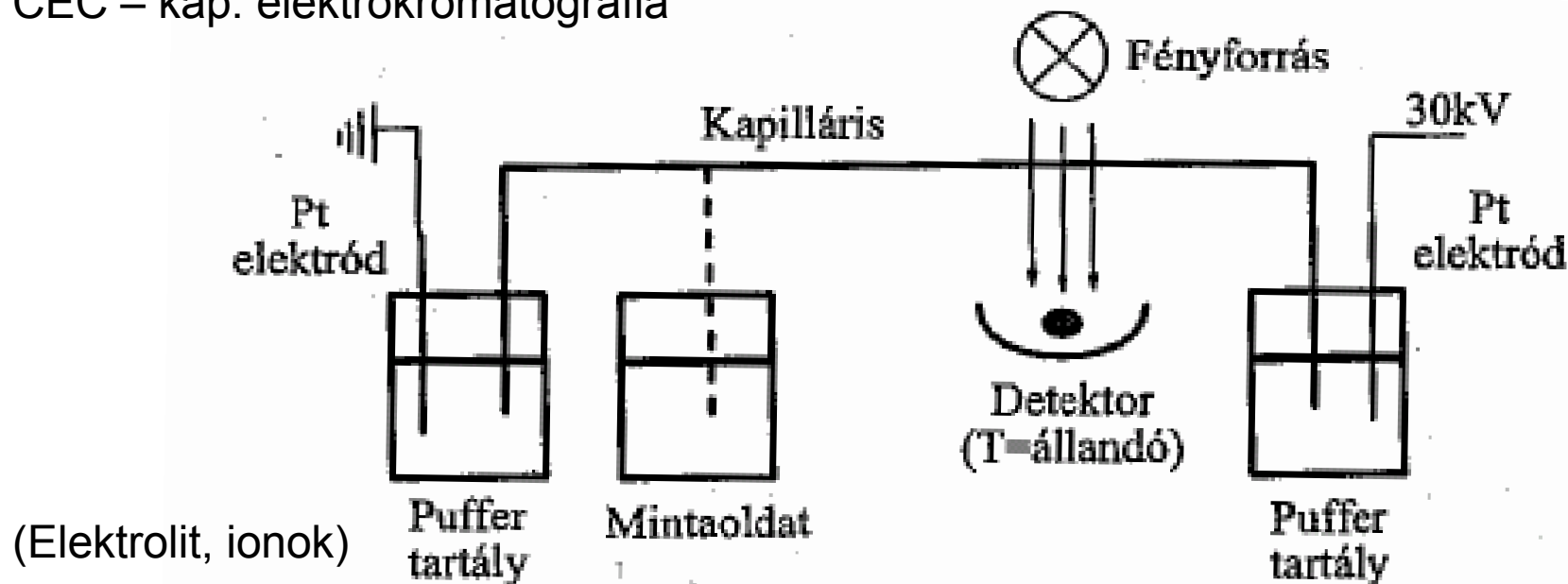
CITP – kap. izotachoforézis

MECC – micelláris elektrokinetikus krom. (SDS);

CGE – kap. gélelektroforézis

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

CEC – kap. elektrokratográfia

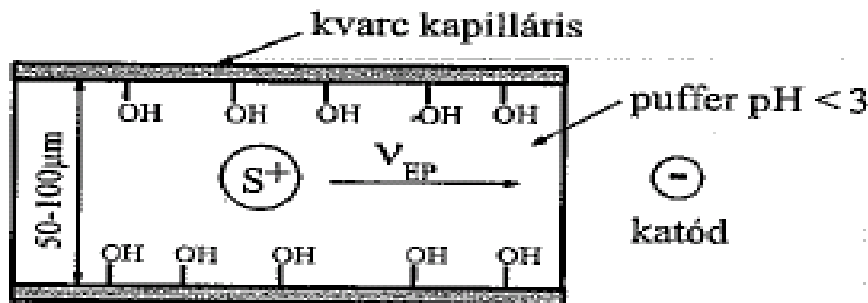


18.8. ábra A kapilláris elektroforézis készülék elemei

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

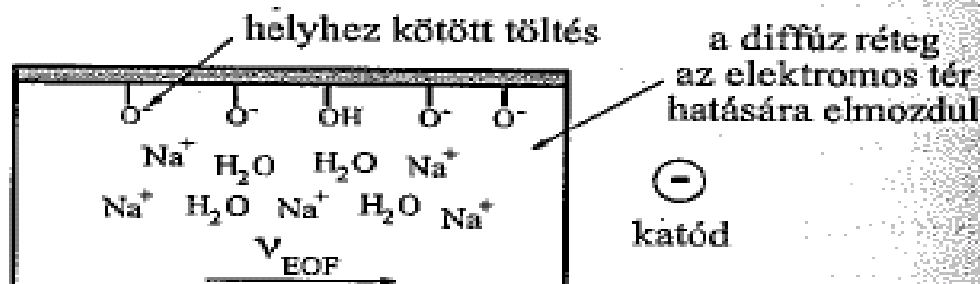
A.: pH < 3, nincs EOF

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



B.: EOF létrejött

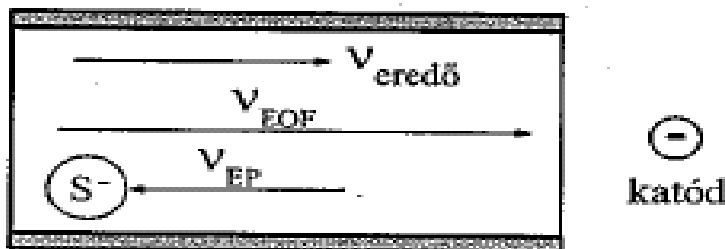
pH > 3 közegben: elektrooszmotikus (v_{EOF}) áramlás is a katódfelé (hidratált kationok + oldószer (víz) együtt)!



C.: negatív töltéssel rendelkező anyag átlagos vándorlási sebességének bemutatása

Eredő hatás (sebességre):

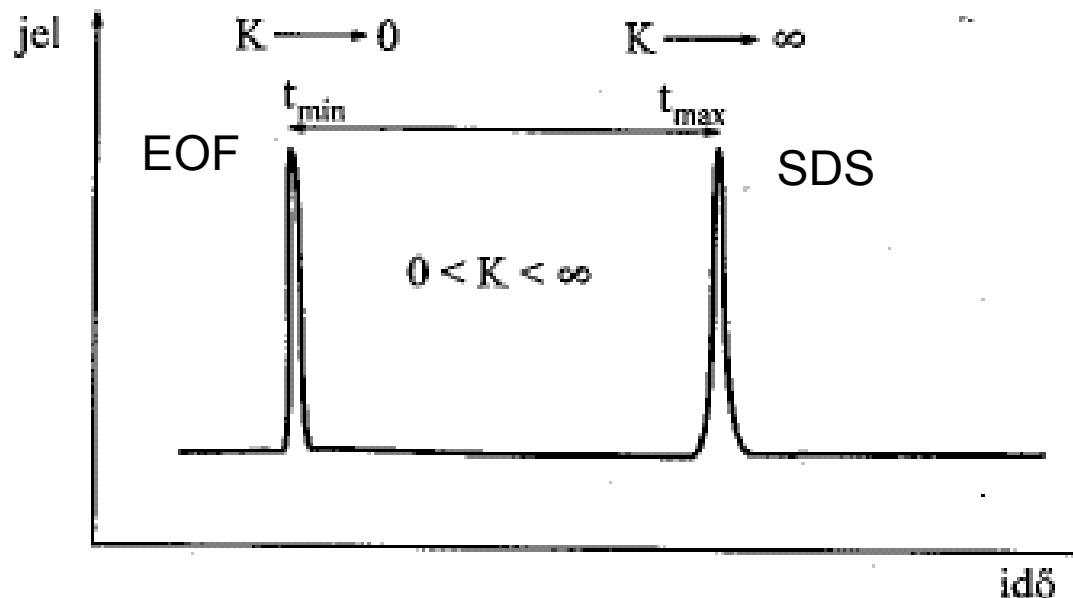
Ad absurdum, még az anionok is a katód felé vándorolhatnak!



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

EOF elektrooszmózisos áramlás hatása

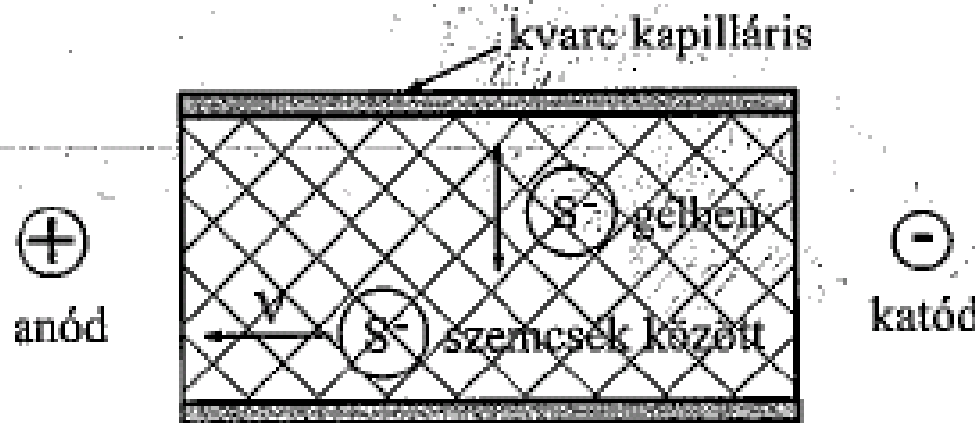
- **Semleges** részecskék is vándorolnak vele! ($v = \text{közös} = v_{\text{EOF}}$)
- Nátrium-dodecilszulfonát (SDS) micellákat is adagolva, melyhez a semleges hidrofób anyagok molekulái eltérő mértékben társulhatnak, visszatartódhatnak, esetleges szétválások léphetnek fel:



18.4. ábra A vándorlási időablak, ahol t_{\min} az SDS micellákkal kölcsönhatásba nem lépő, míg t_{\max} az SDS által teljes mértékben oldott molekula vándorlási ideje

EOF elektrooszmózisos áramlás kiküszöbölése

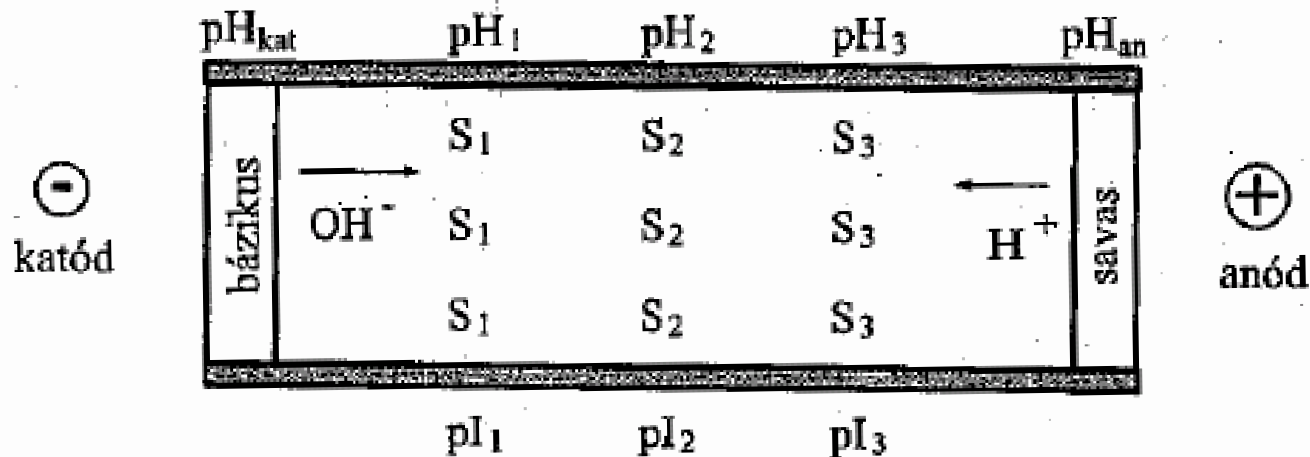
- Poliakrilamid-gél (puffer helyetti) használatával (\rightarrow CGE) kűszöböljük ki, csak az egyedi ionmozgékonyság fog számítani (pl. nagymolekulájú anyagok pl. fehérjék esetén megnő az elválasztás szelektivitása)



18.2. ábra A kapilláris gélelektroforézis (CGE) elve. Az S^- molekula vagy a gél pórusaiban van ($v = 0$) vagy a gél szemcsék között, ekkor elektromos erőtér hatására vándorol ($v > 0$)

Izoelektromos fókuszálás (CIEF, pl. fehérjékre)

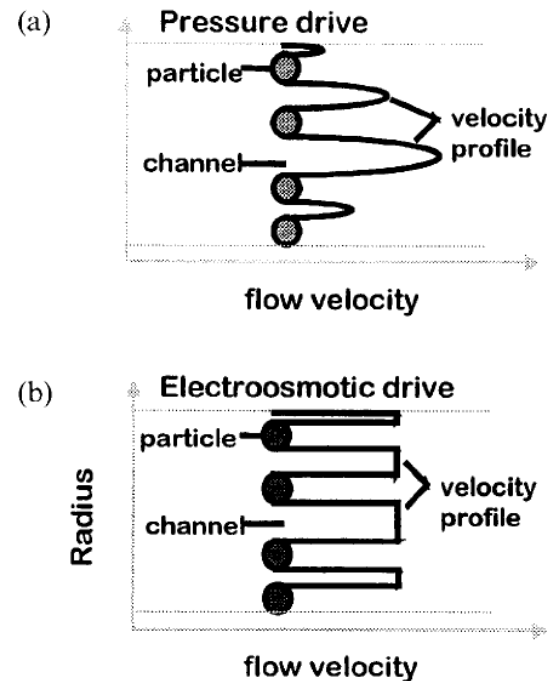
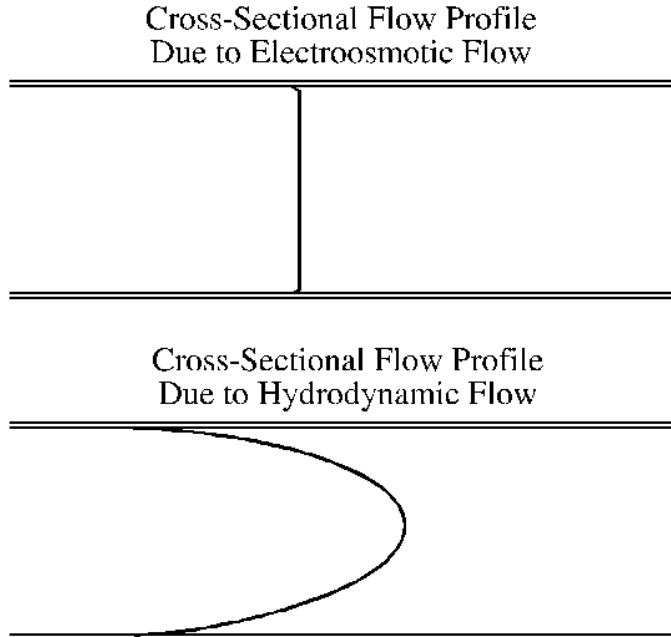
- Ikerionos fehérje/peptid/aminosav szerkezetek esetén: az izoelektromos ponton (pI -n) = izoelektromos pH -n, (kívülről semleges!) \rightarrow megáll az ikerion vándorlása



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

Kapilláris Elektrokromatográfia (Capillary ElectroChromatography, CEC)

- Nyomáskülönbség helyett az elektroosmotikus áramoltatást (EOF, Electroosmotic Flow) alkalmazva, azaz „elektro-pumpálva” a mozgó fázist töltött mikro-oszlopban
 - analizálhatók töltött és semleges komponensek a HPLC-hez hasonlóan;
 - az állófázisokat a HPLC, ill. UPLC innovációk szerint lehet választani.
- Az elektroosmotikus áramoltatás tökéletesebb áramlási profilt biztosít:
 - a szögletes áramlási profil kisebb zónaszélesedést, nagyobb oszlophatékonyságot, jobb felbontást biztosít.



Kapilláris elektroforetikus módszerek alkalmazási köre igen széles !

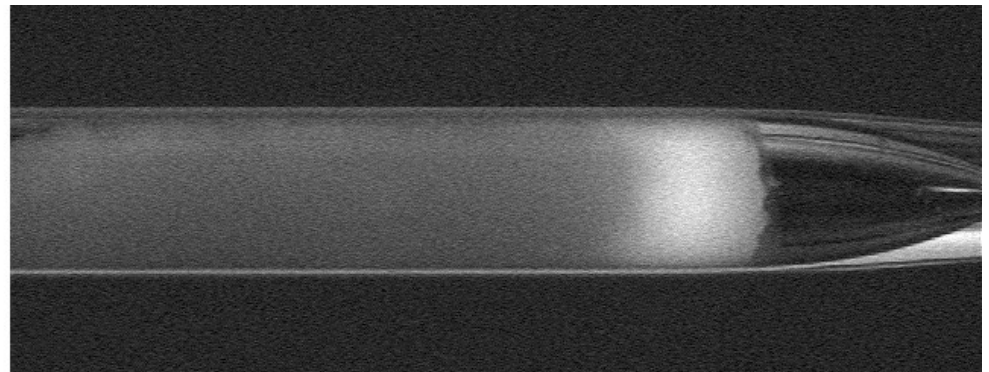
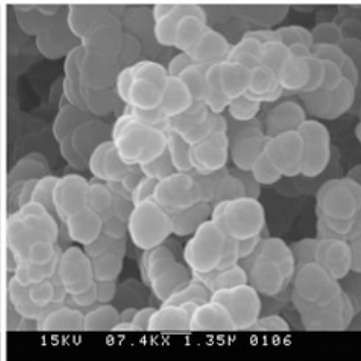
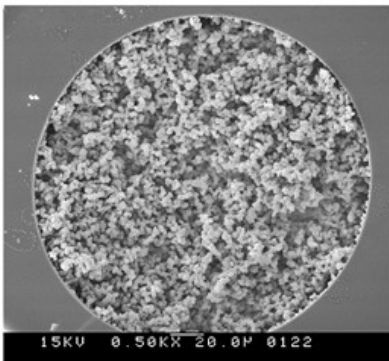
- Lásd az anal. kémia jegyzet 18 fejezet 10-12 oldalait!
- Szervetlen kationok, anionok
- Gyógyszeralapanyagok és degradációs termékeik, pl. ...
- Aminosavszármazékok, peptidek, fehérjékre kidolgozott detektálási lehetőségek
- Szénhidrátok, glükózidok
- Nukleotidok, oligonukleotidok, nukleinsavak
- Optikailag aktív vegyületekre is ötletes megoldások

Újdonságok, modern irányzatok a kromatográfiában

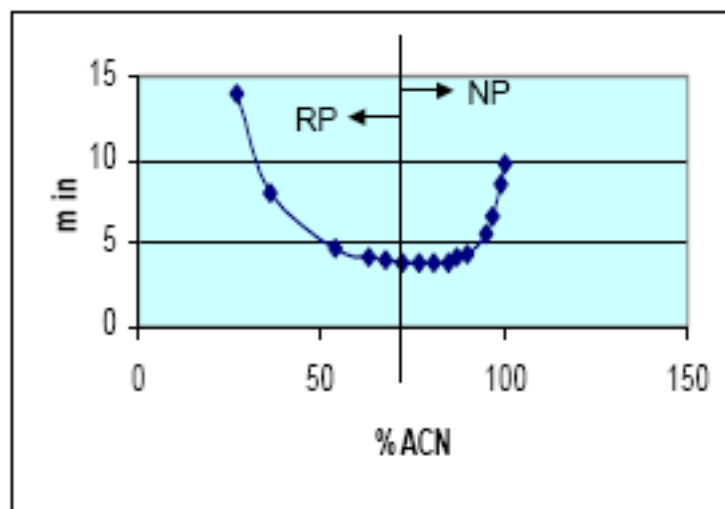
- Szemelvények fognak következni

Pórusos monolitikus mikrooszlop-töltetek

- Monolit kolonnák: egybefüggő pórusos elválasztó közeg
 - könnyebb előállíthatóság
 - nincs szükség záró végtömítésekre
 - változatos felületi módosíthatóság
 - nincs részecskéközi tér/üreg (nincs visszakeveredés)
 - konvektív áramlás a mozgó fázisban (megnövekedő anyagátadás!)
 - nagyobb áteresztő képesség (kisebb áramlási nyomásveszteség)
 - jó kolonnahatékonyság (nagy fajlagos felület)
 - a rögzített ágyas álló fázis sokkal stabilabb lehet



U-Shaped Retention



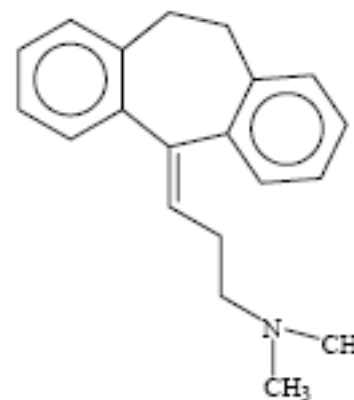
- Retention increases at high organic and high aqueous MP
- Strong solvent: Mixture of Aqueous:Organic

Discovery Cyano

Flow = 1mL/min

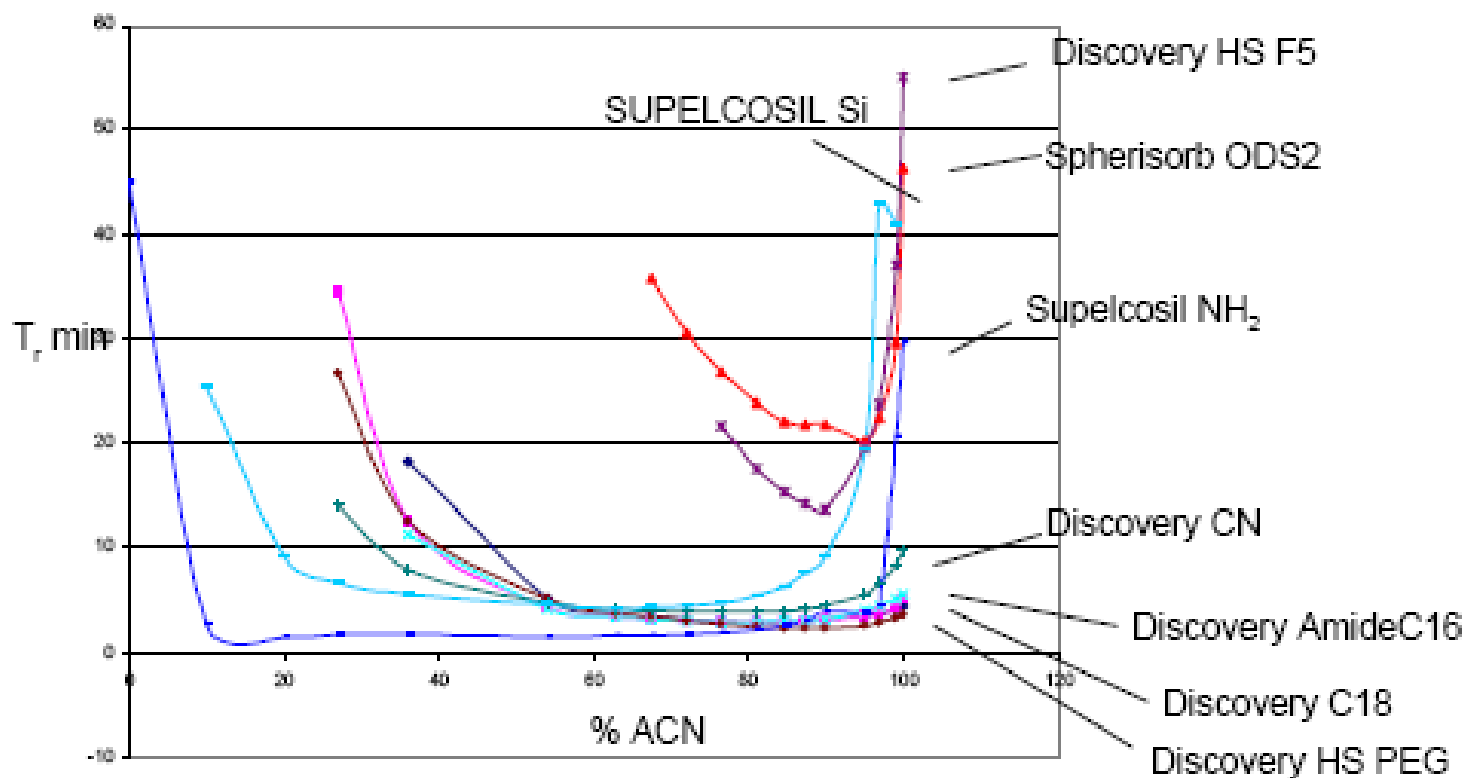
MP: A = ACN w/ 5mM Ammonium acetate

B = Water w/ 5mM Ammonium acetate (pH 6.8)



Amitriptyline

Other Phases Exhibiting HILIC Character



Amitriptyline; flow = 1mL/min; M.P. = 5mM NH₄OAc, pH 6.8; 35°C; 230nm

Advantages of Using Phases Exhibiting U-Shaped Retention

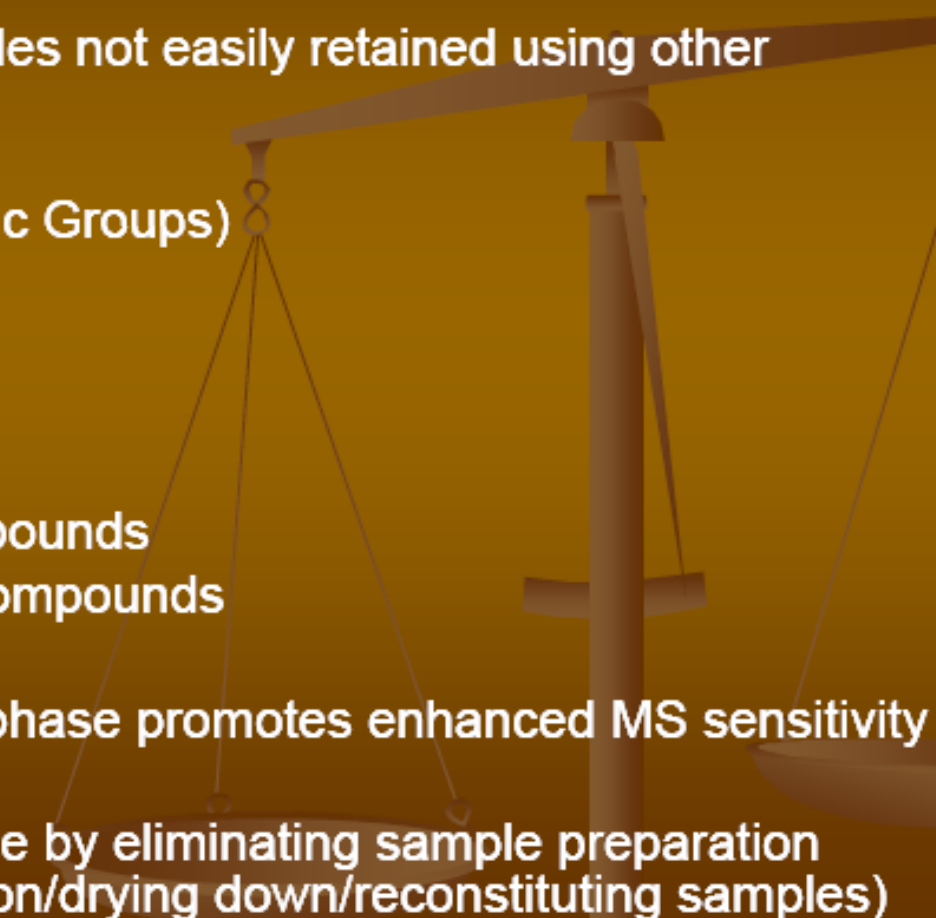
- Provide unique selectivity vs. C18 phases
- Presents twice the opportunity for retention/resolution (high and low % organic)
- Can use simple water:organic MP's
- Often faster analysis
- Retain aqueous-soluble analytes
- Retain organic-soluble analytes
- Increase LC/MS sensitivity at high organic MP's
- Reduce sample pre-treatment requirements
- Do not collapse



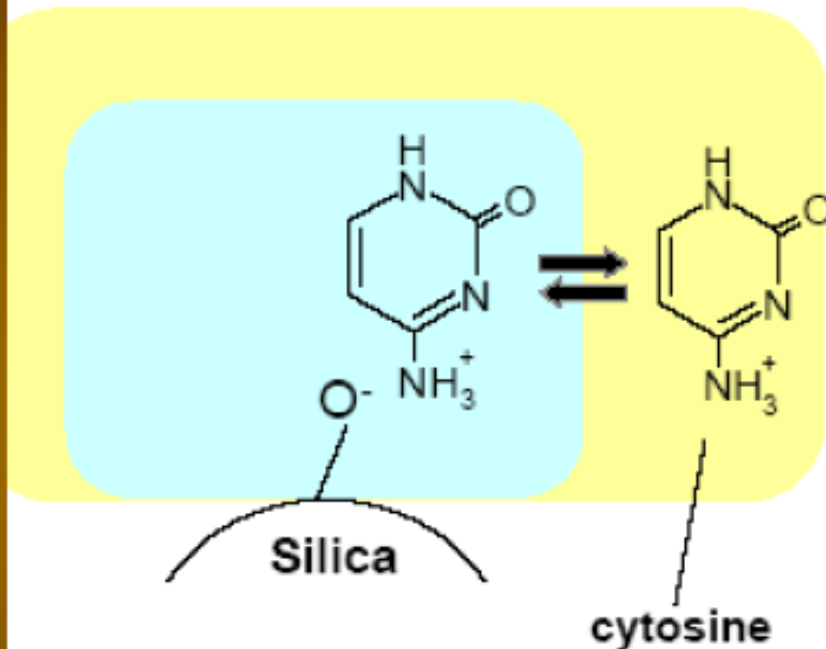
Summary

- HPLC phases can contain both RP and NP modes of retention
- For basic analytes on C18 phases, the mechanism in the HILIC region is not readily explained by siloxide anion electrostatic interactions as the major contributing factor
- Level of base deactivation of C18 phases can be approximated by their amount of HILIC character
- Several advantages exist for developing methods on phases that give U-shaped retention curves
- A wide variety of phases exist that do show U-shaped curves, including fluorinated, C18, silica, NH₂, and CN

Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

- **Complimentary selectivity to RP-HPLC**
 - Able to retain molecules not easily retained using other phases
 - Nucleotides
 - Amino Acids (Basic Groups)
 - Amines
 - Peptides
 - Phenols
 - Carbohydrates
 - Glycosylated compounds
 - Phosphorylated compounds
 - High organic mobile phase promotes enhanced MS sensitivity
 - Reduced analysis time by eliminating sample preparation steps (i.e., fractionation/drying down/reconstituting samples)
- 

How does HILIC work?



80% acetonitrile

20% aqueous,
e.g., pH 5

HILIC Mechanisms on Silica

- Polar analyte **partitions** into and out of adsorbed water layer
- Charged polar analyte can undergo **cation exchange** with charged silanol groups
- **Combination** of these mechanisms results in **enhanced** polar retention
- **Lack** of **either** of these mechanisms results in **no** polar retention

<http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs/HILIC>

Vizes normál fázisú kromatográfia (Aqueous Normal Phase, ANP chromatography)

A vizes normál fázisú kromatográfiában a poláris hidrofil analit(ikum) megoszlik a viszonylag poláris álló fázis és a viszonylag nem-poláris mozgófázis között. Az ANP-t gyakran HILIC-nek is nevezik, mely egyúttal csupán egy lehetséges mechanizmus, amely csak egyike azoknak a mechanizmusoknak, amelyek APN feltételek között lejátszódhatnak.

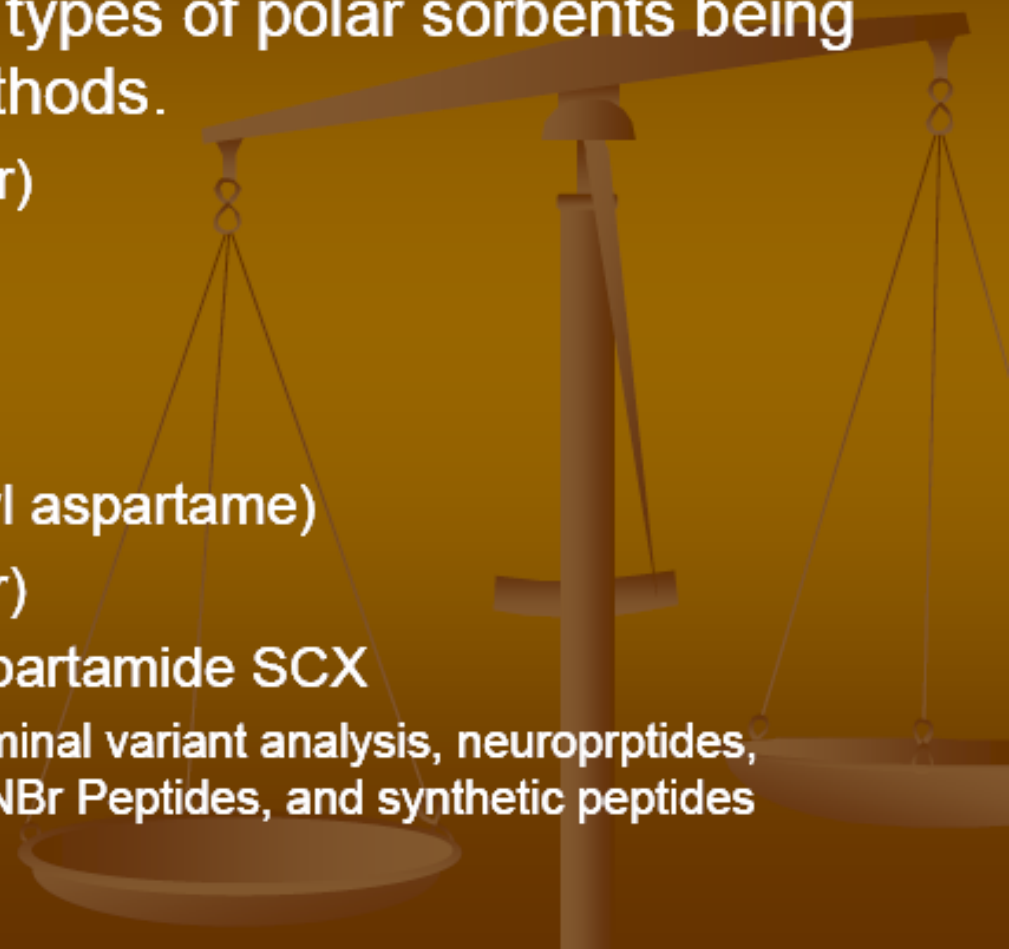
Ezt a HILIC-mechamizmus úgy írja le mint a poláris álló fázis kitűntetett hidratálódását a mozgó fázisból származó vizes komponensekkel és a mozgó fázis szükségszerű elszegényedését vízben. Így egy kétfázisú rendszer épül fel, ahol egy kvázi-immobilizált vizes réteg található a felület közelében és egy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

A poláris komponensek megoszlást mutathatnak a szervesanyagban gazdag mozgó fázis és a felületközeli álló vizes oldószer között.

HILIC Stationary Phase Selection

There are several types of polar sorbents being used in HILIC methods.

- Cyano (most polar)
- Polymeric HILIC
- Silica
- Amide
- Poly (hydroxyethyl aspartame)
- Amino (least polar)
- Polysulfoethyl Aspartamide SCX
 - proteomics, n-terminal variant analysis, neuroprptides, growth factors, CNBr Peptides, and synthetic peptides



Separation Methods for HILIC LC-MS

- Proteins and Peptides

- 10mM TEA, pH 2.8, 80-85% acetonitrile

- Sugars and Oligisaccharides

- No salt necessary, 80-85% acetonitrile

- Oligonucleotides

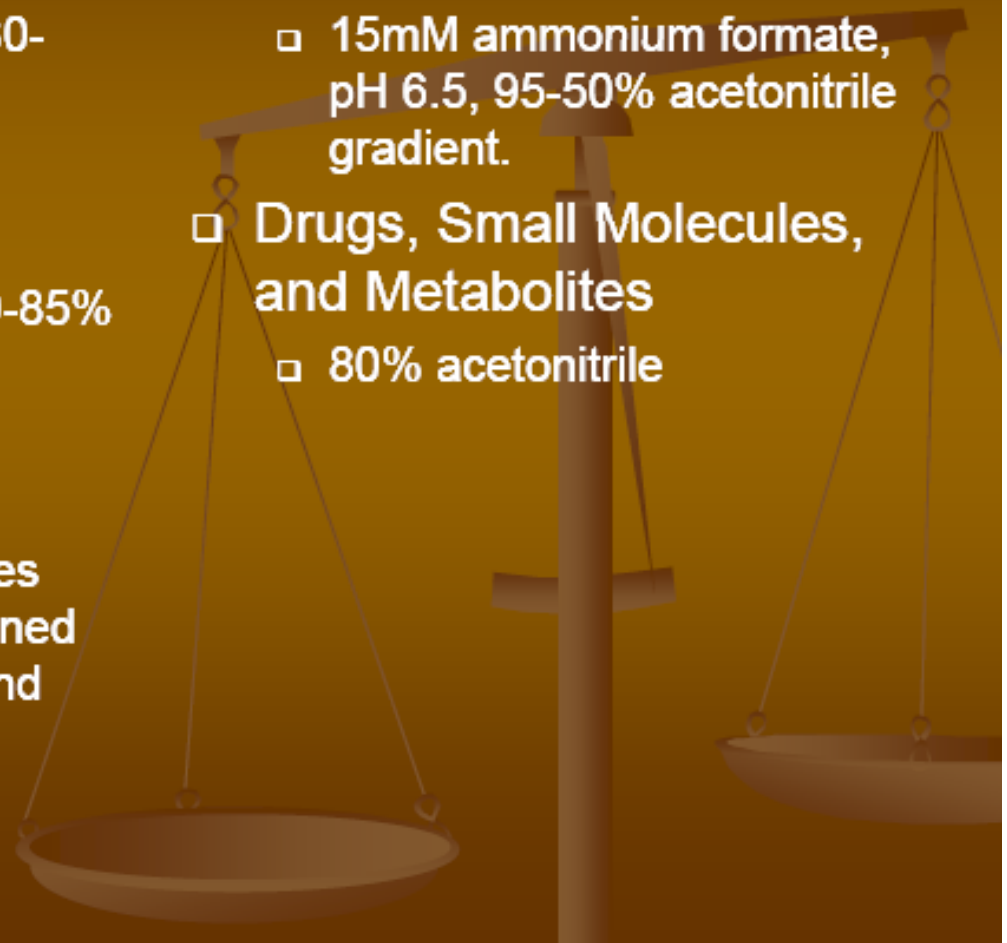
- Salt gradient in 75% acetonitrile. (Cysteines and glycines are retained more than alanines and threonines in these methods.)

- Phospholipids

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

- Drugs, Small Molecules, and Metabolites

- 80% acetonitrile



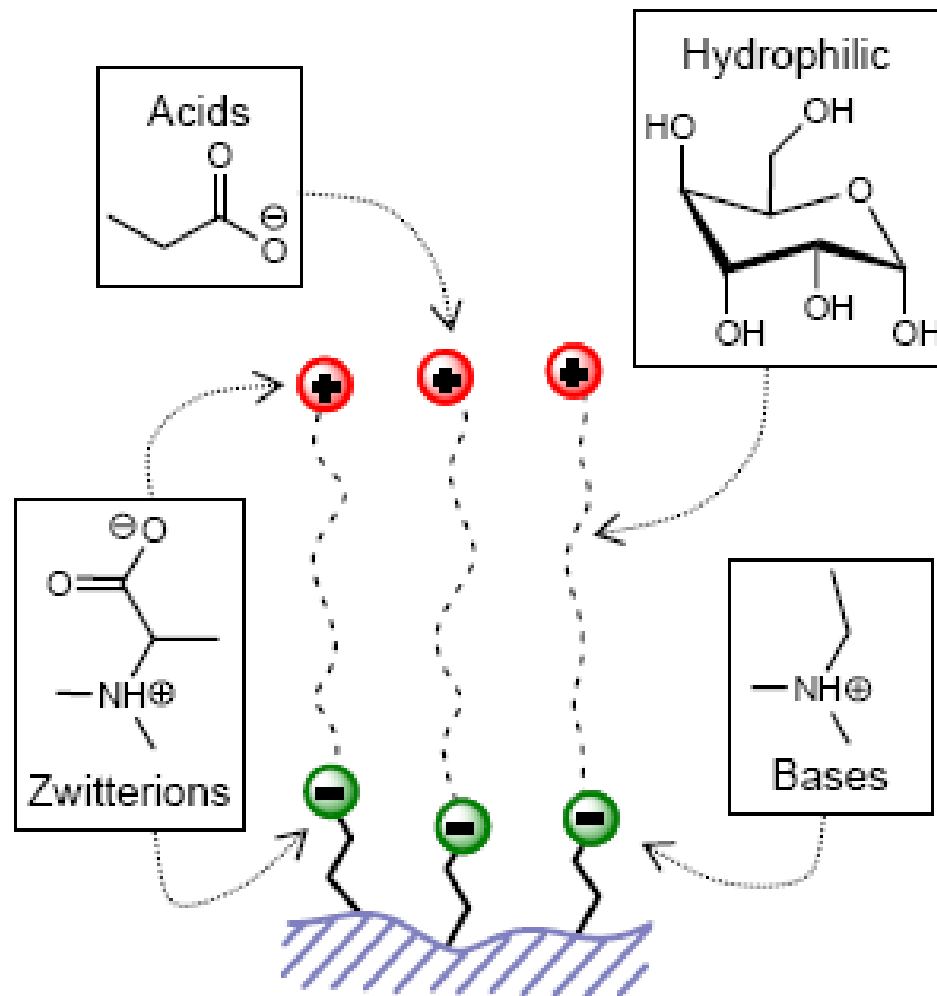


Figure 1. Different types of interactions of Obelisc N stationary phase with different analytes allow to retain many types of charged and hydrophilic compounds.

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

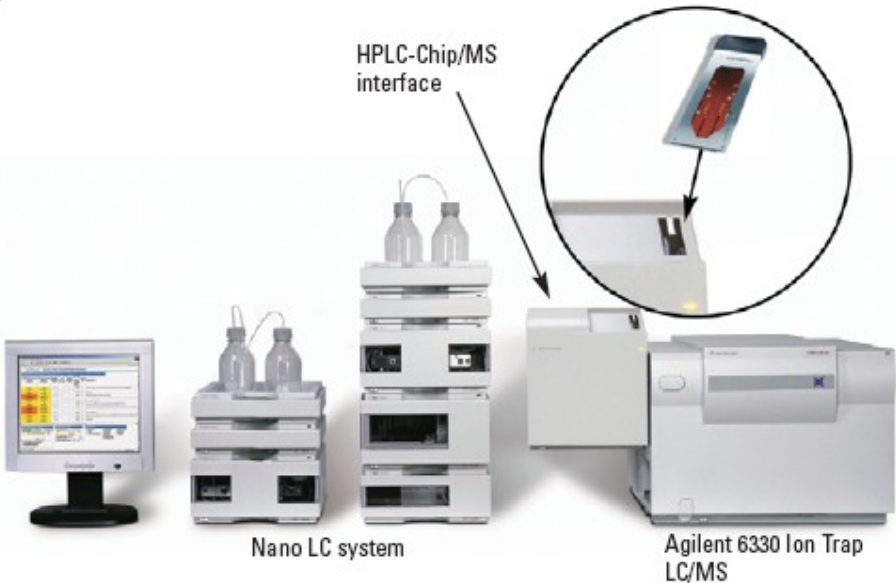


Figure 1
Agilent HPLC-Chip/MS system.

HPLC-Chip (G4240-65001) összetevői:

- Egy 40-nL-es dúsító oszlop
5- μ m-os részecske méretű
ZORBAX 80 SBC18 töltettel;
- Egy 0.075 x 43 mm-es analízisoszlop
5- μ m-os részecske méretű
ZORBAX 80 SBC18 töltettel.
- Az összes összeköttetés a két oszlop, valamint az analízis oszlop és a nanospray kibocsátó között
- A nanospray kibocsátó (10- μ m ID).

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

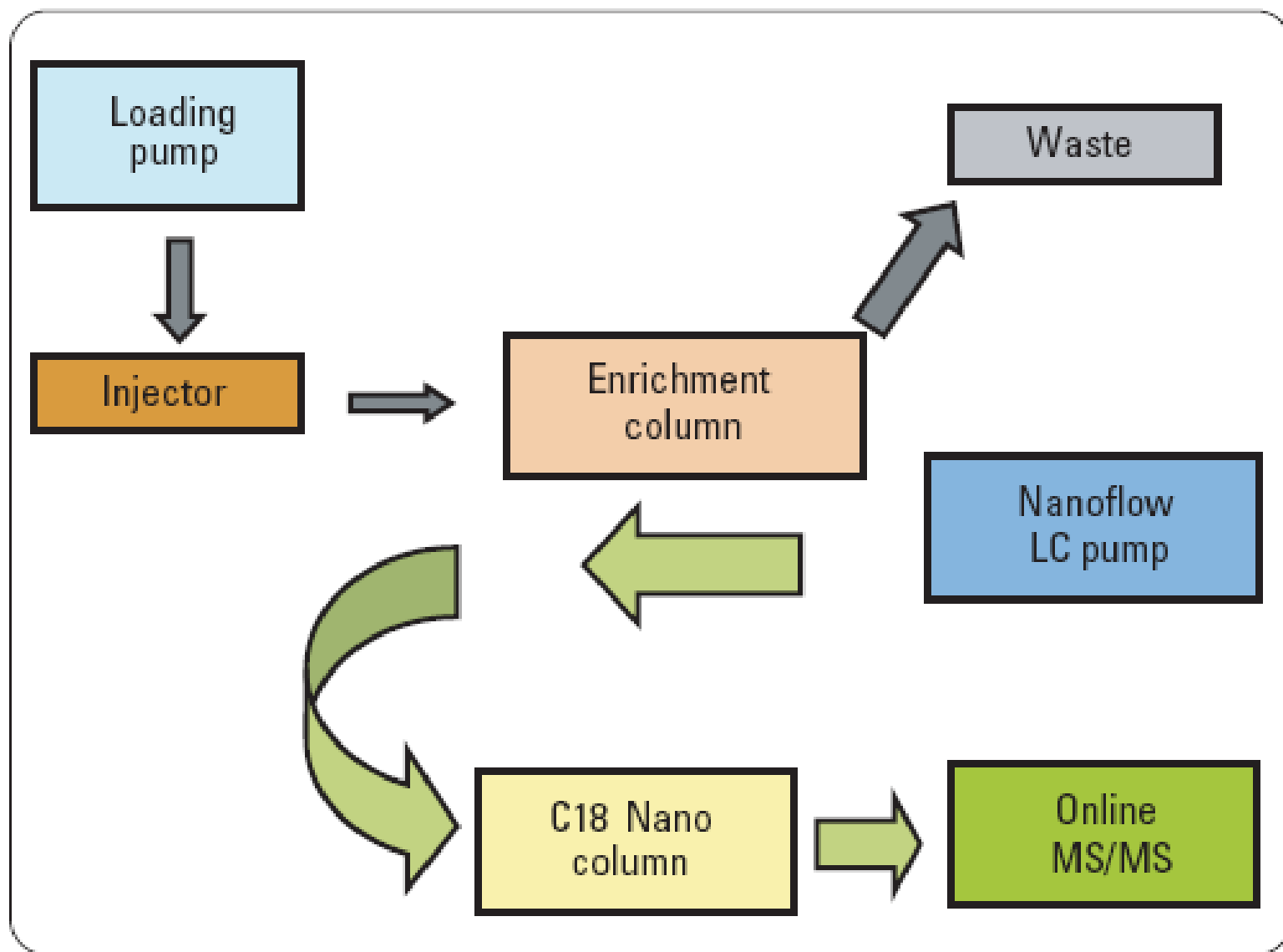


Figure 1
Flow diagram for a conventional nanoflow LC/MS system with sample enrichment.

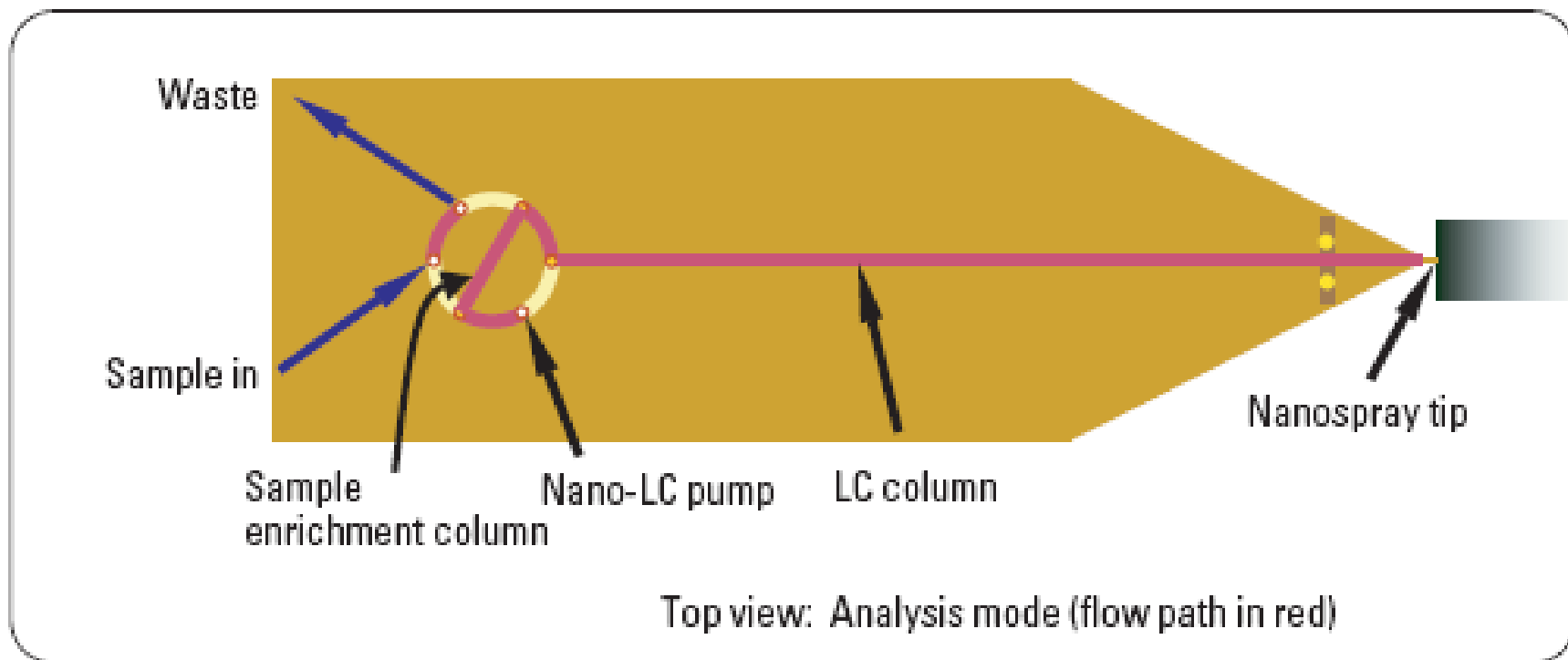


Figure 2
Diagram of the HPLC-Chip.

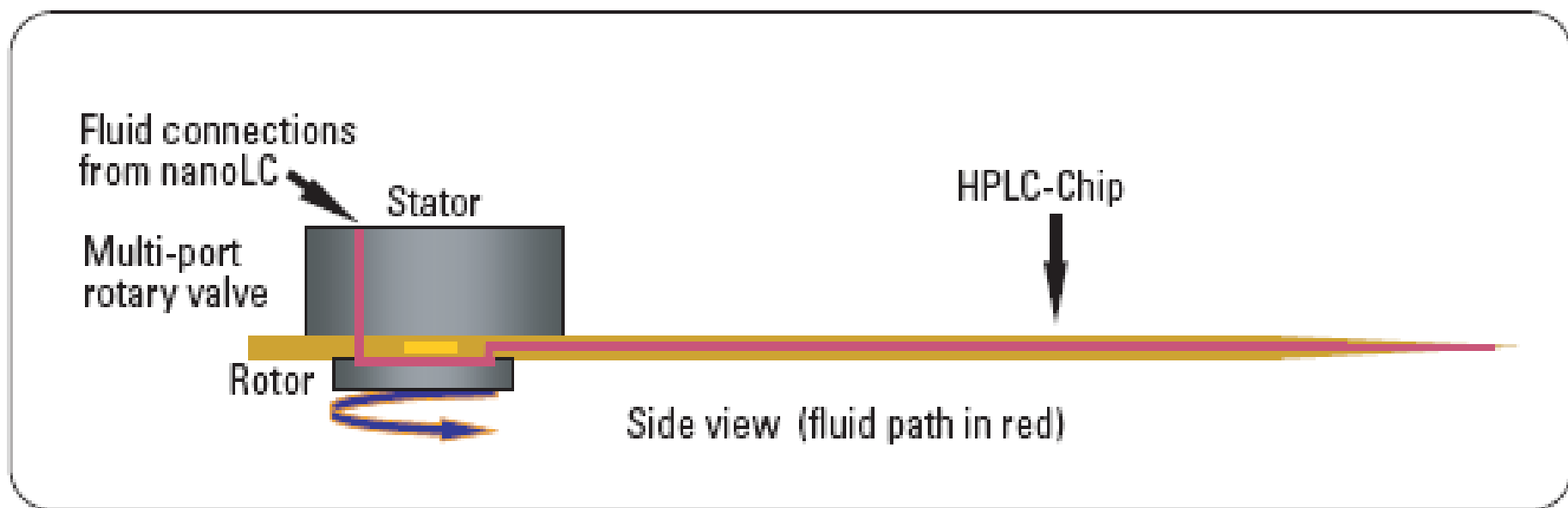


Figure 4

The microvalve in the HPLC-Chip/MS interface docks to an HPLC-Chip.

Comparison of HPLC-Chip/MS and conventional analysis with nanocolumns

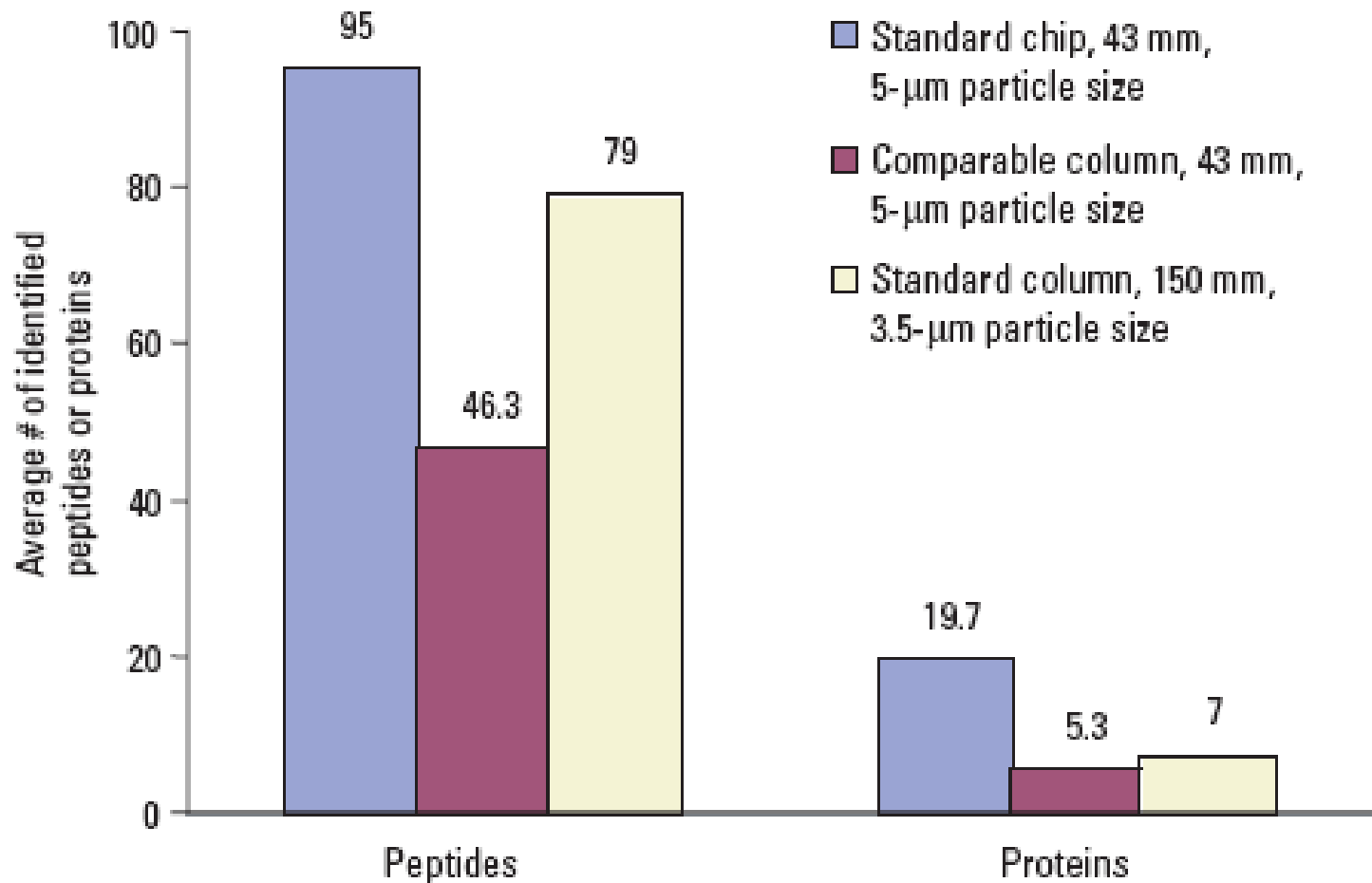


Figure 5

Average number of identified peptides and proteins from yeast gel band using the HPLC-Chip/MS (43 mm) versus conventional LC/MS with nanocolumns (43 mm and 150 mm).

Először is, a HPLC-Chip összetevőinek integrálása eliminálta a legtöbb forrasztott összeköttetést, miáltal a holt térfogatok lecsökkentek.

Másodszor, a minta adszorpcióját ezeken a helyeken biokompatibilis poliimidbevonattal, és a mintaabszorpcióra hajlamos bonyolult összeköttetések elhagyásával minimalizálták.

Harmadszor, mivel az elektronspray emittert ráintegrálták a HPLC-Chip-re, a kolonna utáni diszperzió elhanyagolható mértékűre csökkent.

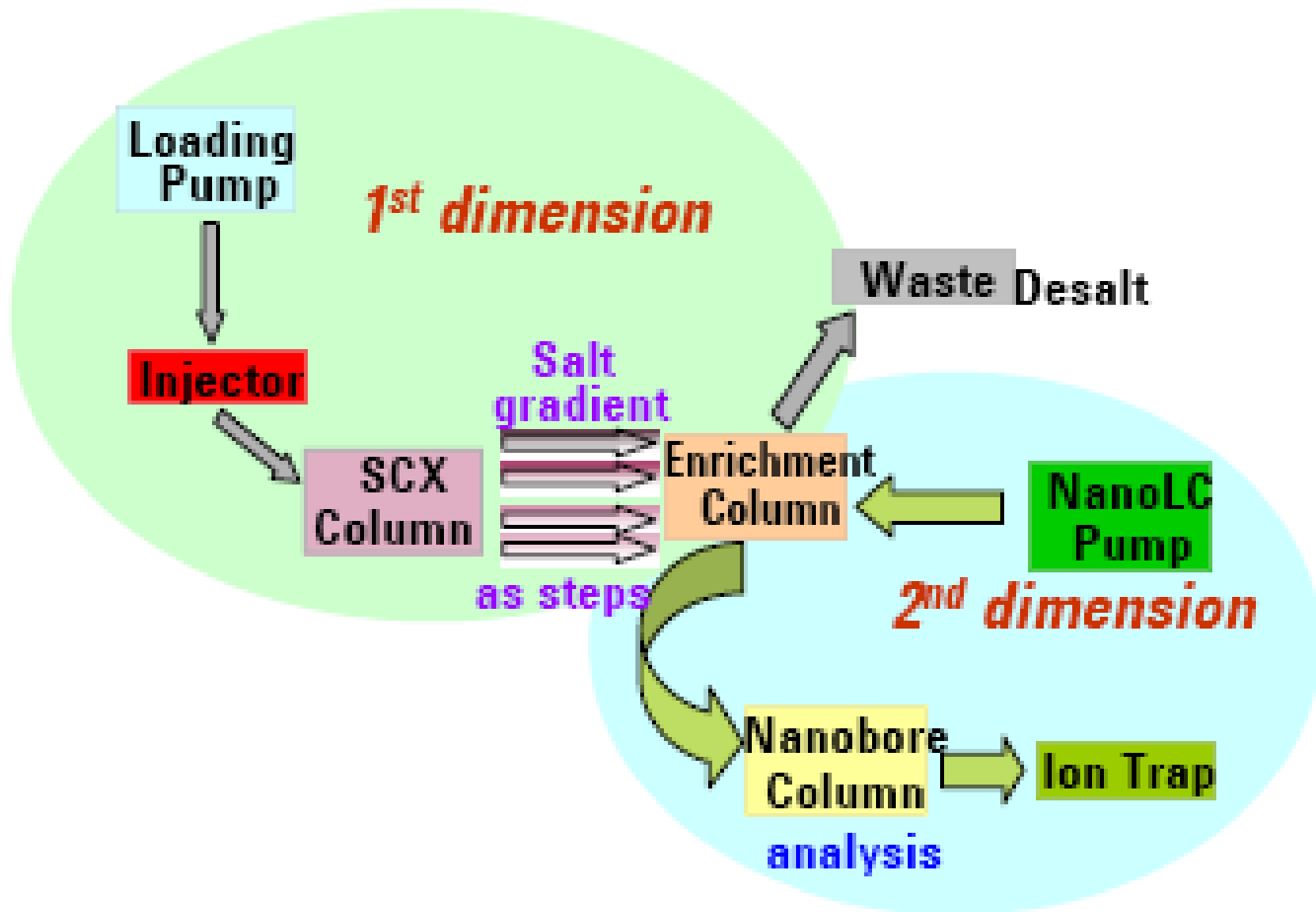
Végezetül, a minta útvonal optimalizált megtervezése minimalizálta a mintaveszteséget és csökkentette a holt-térfogatot.

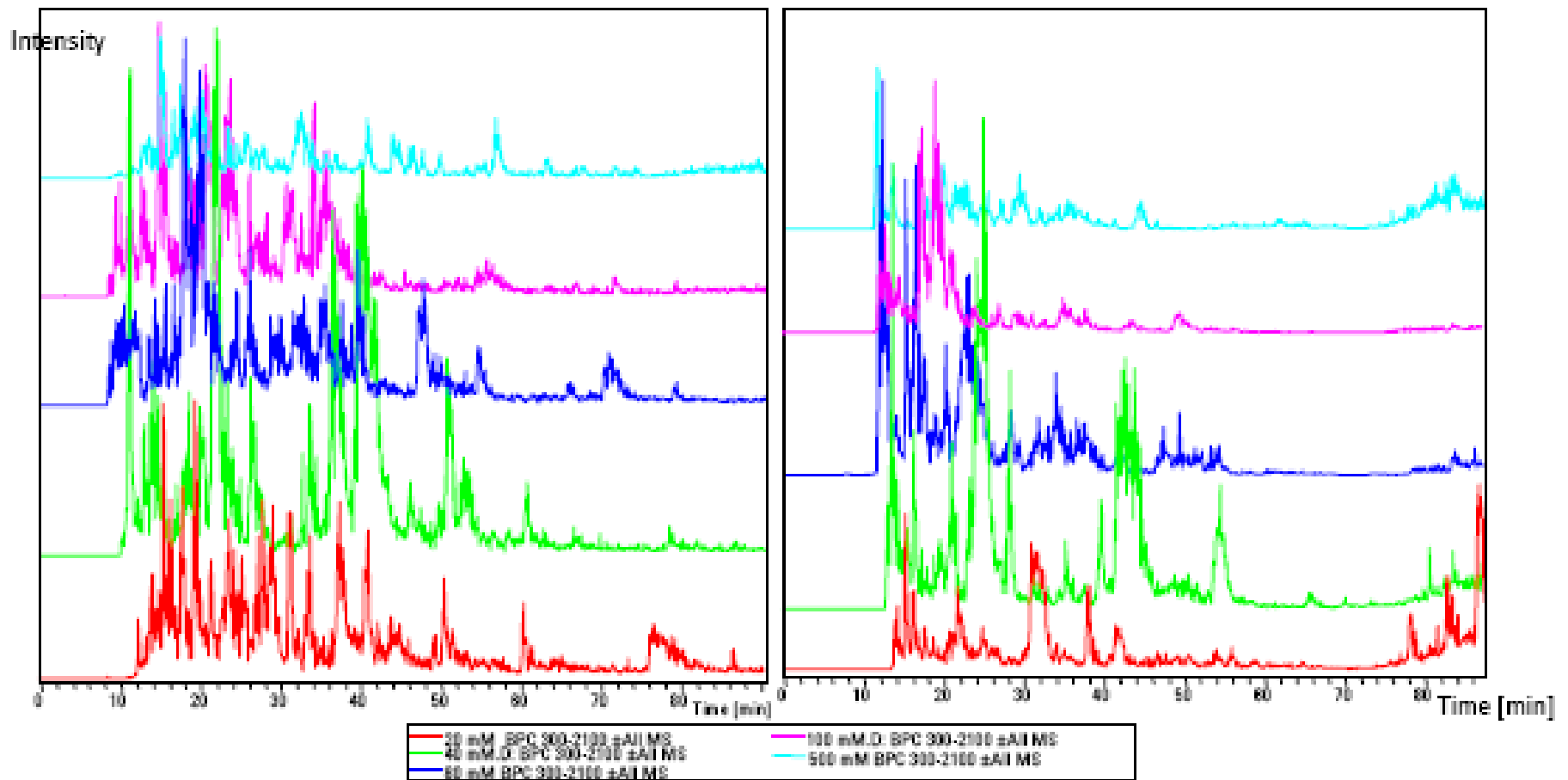
Ezek a fejlesztések jelentős mértékben megnövelték az azonosítható peptidek és fehérjék számát a HPLC-Chip kialakításán keresztül.

Két-dimenziós kromatográfia

Az SCX és RP kolonnák és a nanospray iontrap MS/MS kombinálásával széleskörű és érzékeny megkülönböztető képességű proteomikai analízis lehetőségét demonstrálták egy összetett biológiai minta segítségével.

Sikeresen demonstrálták pl. néhány protein protein-alegységének az érzékeny detektálását több ezer proteint tartalmazó háttérből.



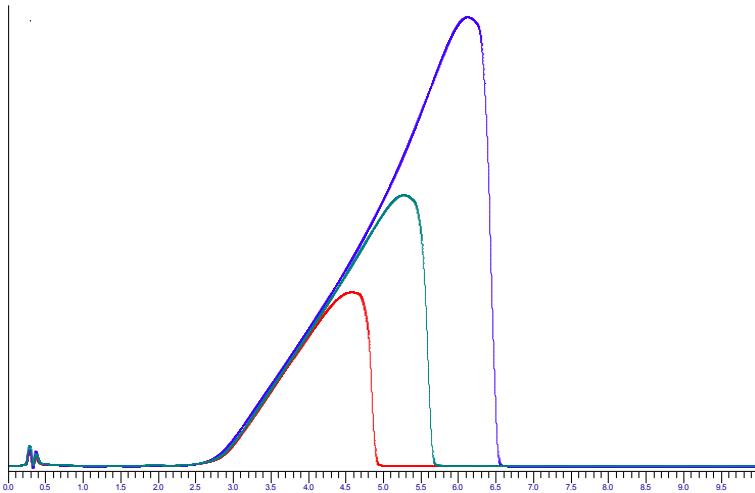


Base peak chromatograms from selected 2D-SCX-RP fractions (left lactose, right glucose culture)

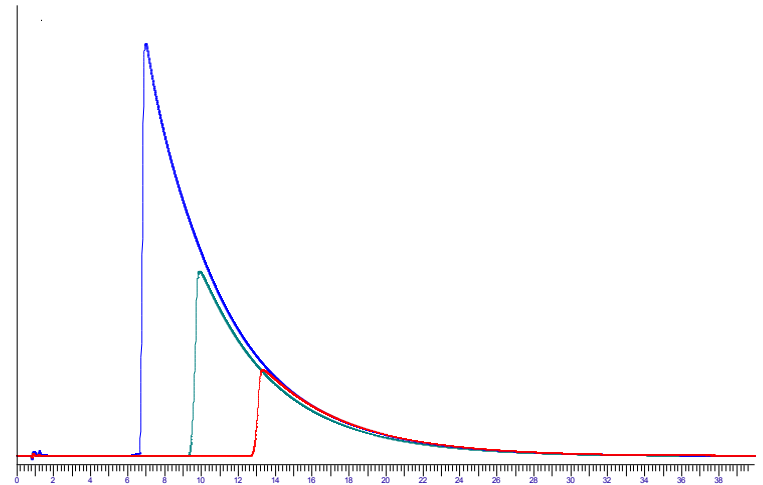
Chromatography

Experiments

Ibuprofen peaks at different concentrations



Kromasil C4 column
50x3mm
Particle size: 13 μ m
Eluent: 80/20 AcN/ KH_2PO_4 buffer
pH=4.4



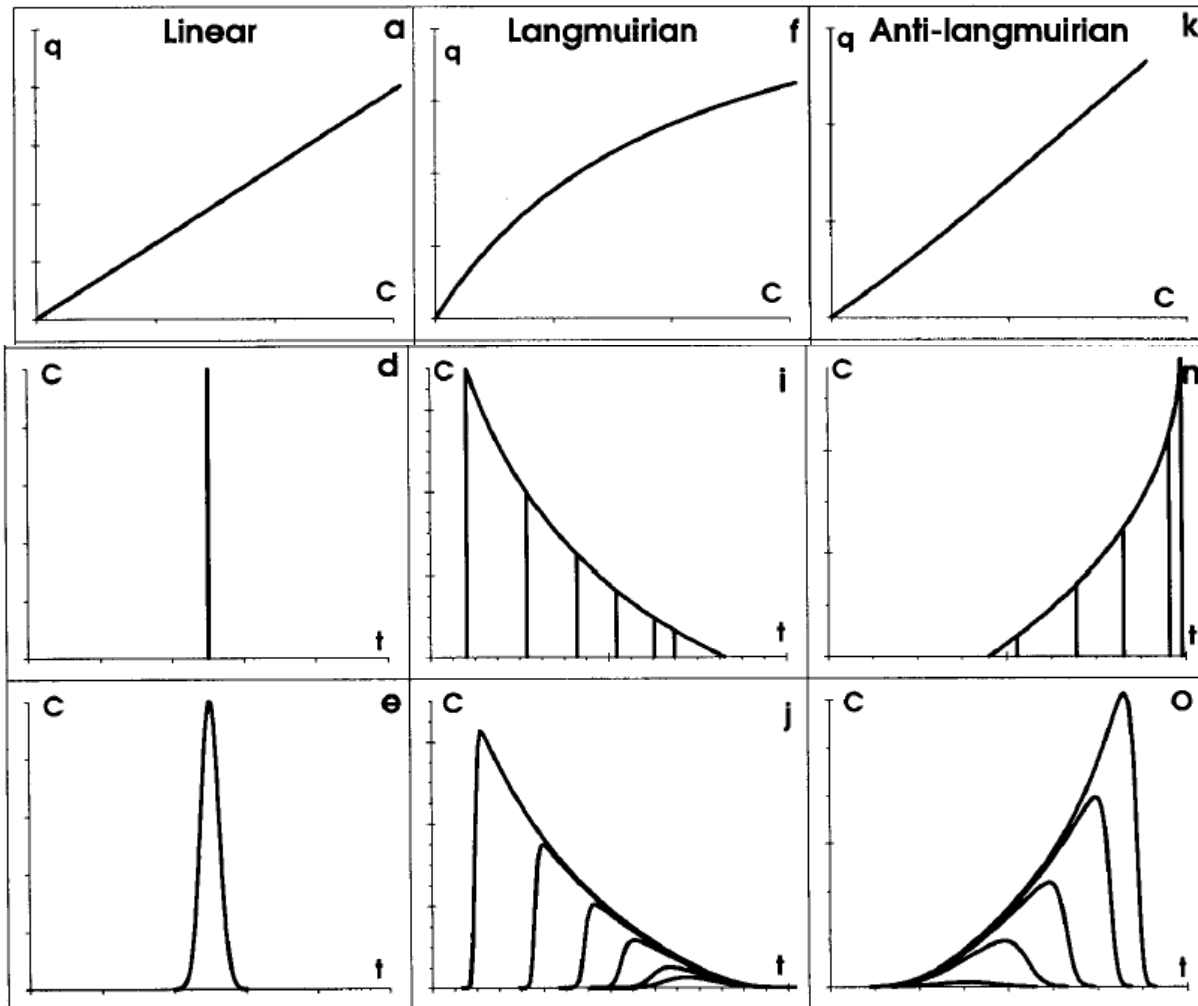
Purospher RP-18 column
125x4 mm
Particle size: 5 μ m
Eluent: 30/70 AcN/ KH_2PO_4
buffer pH=4.4

Chromatography

Theory

$N = \infty$

$N < \infty$



The differential equation of nonlinear chromatography for $N=\infty$

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{1 + F \frac{dq}{dC}} \frac{\partial C}{\partial z} = 0$$

u linear velocity

F phase ratio

$C(z,t)$ concentration in the mobile phase

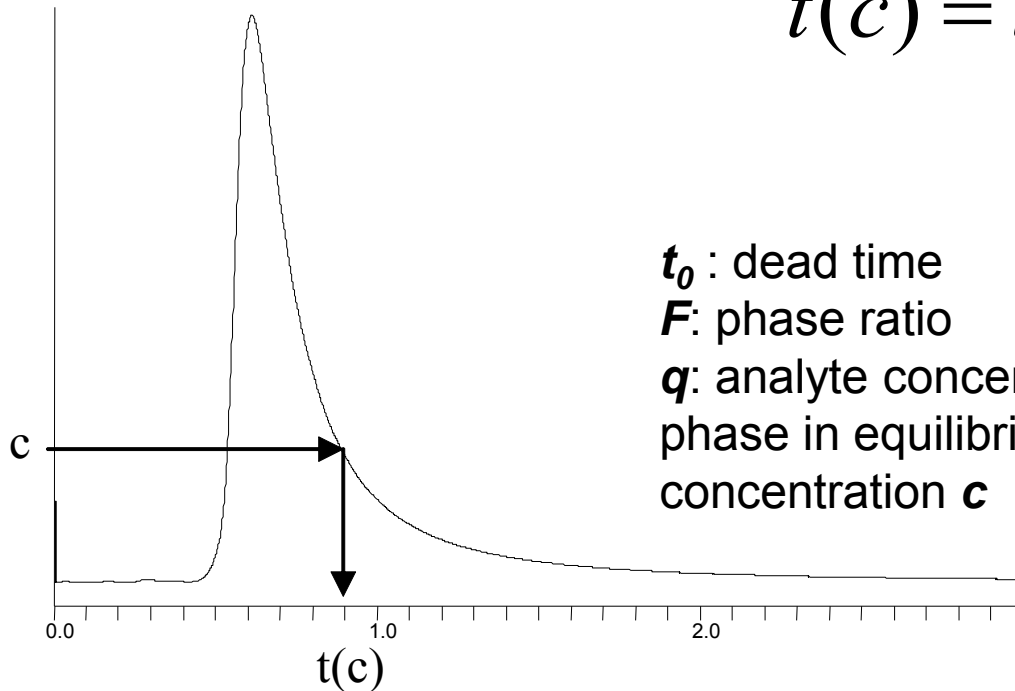
$q(z,t)$ concentration in the stationary phase

Note: the chromatogram can be calculated directly from the isotherm, without knowing the site distribution

Theory of nonlinear chromatography

Equation of the tail:

$$t(c) = t_0 \left(1 + F \frac{dq}{dc} \right)$$



t_0 : dead time

F : phase ratio

q : analyte concentration in stationary phase in equilibrium with mobile phase concentration c