

Микроколоночная хроматография аминокислот и пептидов — высокоэффективный ультрачувствительный метод анализа. Бережковский М. А., Беленький Б. Г., Виноградова Р. Г., Ганицкий М. Б., Жильцова Н. Е., Мальцев В. Г., Шиллов О. П. — В кн.: Приборы для научных исследований и автоматизации эксперимента. Л., «Наука», 1982, с. 121—127.

Рассмотрена математическая модель хроматографии аминокислот, позволяющая провести оптимизацию по чувствительности анализа с учетом размывания хроматографических зон в проточном реакторе. Главным резервом повышения чувствительности анализа является сокращение диаметра колонки, однако полученный при этом выигрыш в чувствительности зависит от скорости элюции, диаметра зерна ионита, времени задержки вещества в реакторе. Оптимальная (по чувствительности) скорость элюции составляет 0.05—0.01 см/с, что на порядок меньше скорости элюции при экспресс-анализе. Однако, поскольку оптимизация по чувствительности приводит также к сокращению длины колонки, использование микроколонок с диаметром 0.5 мм обеспечивает стократный выигрыш в чувствительности по сравнению с анализом на обычной колонке (0.9 см), а продолжительность анализа увеличивается всего в 3 раза. Описаны условия микроколоночной хроматографии, обеспечивающие для аминокислот чувствительность анализа на уровне 10^{-11} — 10^{-13} моль и позволяющие проводить пептидный анализ протеолитического гидролизата 0.1—1 мкг белка. Лит. — 11 назв., ил. — 5.

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ — ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Наряду с увеличением скорости анализа (первая задача оптимизации) важную роль играет повышение его чувствительности (вторая задача оптимизации). Так как хроматографическое размывание в объеме колонки приводит к снижению концентрации образца, увеличение чувствительности анализа может быть достигнуто просто за счет уменьшения диаметра хроматографической колонки. Эту возможность увеличения чувствительности впервые отметил еще Гамильтон [1] применительно к анализу аминокислот. Однако первые попытки микрохроматографии аминокислот на капиллярных колонках не привели к успеху [2, 3] — эффективность хроматографии оказалась ниже, чем в стандартной методике [4].

Это снижение эффективности, связанное с возрастанием роли экстраколлоного размывания при уменьшении размеров колонки, можно преодолеть, существенно сократив объем кюветы детектора и коммуникаций между детектором и колонкой. Задача создания детектора с достаточно малым объемом проточной ячейки была решена С. П. Кузьминым [5], который сконструировал спектрофотометр с объемом кюветы 1 мкл.

В настоящее время систематические исследования в области аппаратуры микроколоночной хроматографии для некоторых классов соединений проводит также Иши [6]. С другой стороны, разработка высокотемпературного нингидринового реактора [7] позволяет сократить время детектирования аминокислот до 3 мин, а использование флуоресцентной реакции [8] — даже до нескольких секунд.

Эти предпосылки позволили нам реализовать идею Гамильтона и разработать ультрачувствительный метод высокоэффективной хроматографии аминокислот и пептидов.

Рассмотрим проблему высокочувствительного хроматографического анализа аминокислот подробнее.

Полнота разделения двух веществ на хроматограмме определяется безразмерным параметром K_R , учитывающим различную подвижность двух компонентов Δx и их размывание σ_1 и σ_2 :

$$K_R = \frac{\Delta x}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} = \frac{\Delta x}{4s}. \quad (1)$$

При этом выбор оптимального K_R диктуется относительной величиной хроматографических пиков, а Δx определяется соотношением

$$\Delta x = AL\Delta R_f \frac{\beta}{R_f^2}. \quad (2)$$

Подставляя (2) в (1), получаем выражение для K_R , представляющее фундаментальный критерий эффективности колоночной хроматографии,

учитывающий как селективность разделения двух компонентов, так и эффективность хроматографической колонки ВЭТТ — H :

$$K_R = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \frac{\Delta K_d}{K_d} (1 - R_f) = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \frac{\theta - 1}{\theta} \frac{K_i}{1 + K_i}; \quad (3)$$

здесь A — площадь сечения колонки; L — ее длина; β — сечение подвижной фазы; R_f — индекс удерживания ($R_f = 1/1+k$, k — фактор емкости); $K_i = \frac{d}{\beta} K_d$; d — сечение неподвижной фазы; K_d — коэффициент распределения; $\theta = K_2/K_1$ — коэффициент относительного удерживания.

Записанная в (3) величина ВЭТТ H включает как среднюю ВЭТТ хроматографической колонки H_c , так и ВЭТТ, связанную с дисперсией экстраколлоного размывания $\sigma_{вз}^2$:

$$H = H_c + \frac{\sigma_{вз}^2 R_f^2}{A^2 \beta^2 L}. \quad (4)$$

Из (4) видно, что вклад экстраколлоного размывания $\sigma_{вз}^2$ в среднюю ВЭТТ растет при увеличении R_f и уменьшении размеров колонки. Иными словами, если при переходе к капиллярным микроколонкам нет возможности уменьшить $\sigma_{вз}^2$, то для сохранения разделения приходится увеличивать длину колонки или уменьшать R_f , т. е. увеличивать K (K_d).

Запишем теперь выражение для чувствительности анализа. Известно, что концентрация вещества в максимуме хроматографического пика определяется соотношением

$$C_{\max} = \frac{q}{[2\pi(\sigma_{вс}^2 + \sigma_{вз}^2)]^{1/2}} = \frac{q}{\left[2\pi \left(HL \frac{\pi^2 \beta^2 r_c^4}{\bar{R}_f^2} + \sigma_{вз}^2 \right)\right]^{1/2}}, \quad (5)$$

где q — количество анализируемого вещества; $\sigma_{вс}^2$ — дисперсия размывания в хроматографической колонке.

Переход к последнему равенству в (5) выполнен с использованием соотношения (4).

Определяя чувствительность анализа δ как отношение сигнала прибора S к количеству анализируемого вещества: $\delta = S/q$, можно написать соответствующие выражения для δ при использовании фотометрического и флюориметрического детекторов:

для фотометра

$$\delta = \frac{K \epsilon_\lambda l K'_\lambda}{\left[2\pi \left(HL \frac{\pi^2 \beta^2 r_c^4}{\bar{R}_f^2} + \sigma_{вз}^2 \right)\right]^{1/2}}, \quad (6)$$

для флюориметра

$$\delta = \frac{K I_{0\lambda} \varphi_\lambda \epsilon_\lambda K'_\lambda l}{\left[2\pi \left(HL \frac{\pi^2 \beta^2 r_c^4}{\bar{R}_f^2} + \sigma_{вз}^2 \right)\right]^{1/2}}; \quad (7)$$

здесь ϵ_λ — молекулярная экстинкция; φ_λ — квантовый выход люминесценции; $I_{0\lambda}$ — интенсивность возбуждающего излучения; K'_λ — чувствительность фотоприемника; K — коэффициент электрического усиления; l — толщина кюветы.

Из (6) и (7) видно, что наряду с улучшением технических характеристик детекторов (увеличением K , K'_λ , $I_{0\lambda}$, l) важнейшую роль в повышении чувствительности анализа играет уменьшение радиуса колонки (r_c), экстраколлоного размывания ($\sigma_{вз}^2$) и ВЭТТ (H). Роль L и R_f может быть проанализирована только при учете заданной величины K_R .

Рассчитаем оптимальные условия высокочувствительного анализа аминокислот, построив зависимость размывания в хроматографе σ_v^2 от параметров хроматографического эксперимента (диаметра зерна d_p , скоро-

сти элюции u , давления в колонке Δp). Для этого запишем уравнение для H_{c_i} :

$$H_{c_i} = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{1}{30} \frac{K_i}{(1+K_i)^2} \frac{d_p^2 u}{D_s} + \omega_1 \frac{d_p^2 u}{D_m}; \quad (8)$$

здесь $\omega_1 = \frac{1}{98\gamma} \left(\frac{\nu-1}{\nu+1} \right)^2 m^2$; γ — коэффициент извилистости ($\gamma=0.6$); m — отношение диаметра колонки к диаметру зерна; ν — отношение скоростей у стенки колонки и в ее центре; D_m и D_s — коэффициенты диффузии в подвижной фазе и в зерне; λ — структурный фактор ($\lambda=1.2$).

Формула (8) написана в соответствии с [9]. В ней «вихревая» диффузия представлена двумя членами: для близкодствующего эффекта (первый член) и трансколлоного эффекта (последний член). При малых скоростях элюции большую роль начинает играть размывание, связанное с молекулярной диффузией (второй член).

Для расчета экстраколлоного размывания $\sigma_{v_s}^2$ использовалось уравнение для тейлоровской диффузии в капиллярном реакторе [10], главном источнике экстраколлоного размывания в хроматографическом анализаторе аминокислот, с заменой скорости в капилляре (u_c) на скорость в колонке (u): $u_c = uA/a$, где a — площадь сечения капилляра:

$$\sigma_{v_s}^2 = \left(2a^2 D_m + \frac{1}{24} \frac{A^2 \beta^2 u^2 a}{\pi D_m} \right) t_p, \quad (9)$$

где t_p — время нахождения в реакторе.

Как видно из (9), экстраколлоное размывание уменьшается при уменьшении времени нахождения в реакторе t_p и уменьшении сечения капилляра реактора a . Отсюда очевидны преимущества флюориметрического детектора при микроколлоном анализе аминокислот, у которого время детектирования минимально, а также целесообразность уменьшения времени нингидринового детектирования за счет повышения температуры реактора [7].

Условия сохранения разделения K_R (3) и условие экстремума ($\partial \sigma_v / \partial u = 0$) функции $\sigma_v^2 = A^2 \beta L (1+K_i) H_i$, полученной из (4) с учетом (8) и (9), позволяет получить систему из двух уравнений:

$$M_1 L^2 - \left(M_2 + \frac{M_3}{U_{\text{опт}}} + M_4 U_{\text{опт}} \right) L - M_5 U_{\text{опт}}^2 - M_6 = 0, \quad (10)$$

$$K_1 U_{\text{опт}}^3 + K_2 U_{\text{опт}}^2 L - K_3 L = 0, \quad (11)$$

где

$$M_1 = \left(\frac{K_i}{1+K_i} \right)^2 \left(\frac{\theta-1}{\theta} \right), \quad M_2 = 32 K_R^2 \lambda d_p,$$

$$M_3 = 16 K_R^2 \gamma D_m, \quad M_4 = 16 K_R^2 \left(\frac{1}{30} \frac{K_i}{(1+K_i)^2} \frac{d_p^2}{D_s} + \frac{\omega_1 d_p^2}{D_m} \right),$$

$$M_5 = \frac{2}{3} \frac{a t_p}{\pi D_m (1+K_i)^2}, \quad M_6 = \frac{32 K_R^2 a^2 D_m t_p}{A^2 \beta^2 (1+K_i)^2}, \quad K_1 = \frac{1}{12} \frac{a t_p}{\pi D_m},$$

$$K_2 = (1+K_i)^2 \left(\frac{K_i}{30(1+K_i)^2} \frac{d_p}{D_s} + \frac{\omega_1 d_p^2}{D_m} \right), \quad K_3 = \gamma D_m (1+K_i)^2.$$

Определив из этой системы $U_{\text{опт}}$ и L для разных значений d_p , легко получить давление Δp , время анализа t , соответствующие оптимуму по чувствительности:

$$U = \xi \frac{d_p^2}{L} \Delta p, \quad (12)$$

$$t = \frac{L^2}{R_f \xi d_p^2 \Delta p}, \quad (13)$$

где $\xi = \beta^3/180(1 - \beta)^2 \eta$; η — вязкость.

На рис. 1 и 2 изображены эти зависимости для микроколоночного ($d_c = 0.05$ см) и обычного (макроколоночного, $d_c = 1$ см) анализаторов аминокислот.

Все расчеты выполнены для наиболее трудно разделяемой пары аминокислот треонин—серин при условии $K_R = 1$. Динамический хроматографический режим, обеспечивающий разделение этой пары, тем более пригоден для разделения остальных аминокислот.

Сравнение рис. 1 и 2 показывает, что использование микроколонок позволяет достигнуть стократного увеличения чувствительности анализа

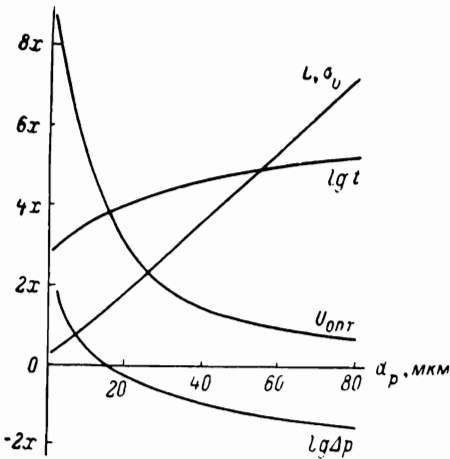


Рис. 1. Зависимость минимального стандартного отклонения пика, минимальной длины колонки, оптимальной скорости элюции, времени анализа и давления на входе колонки от диаметра зерна ионита в случае микроколоночной хроматографии аминокислот ($d_c = 0.05$ см).

x соответствует 10 см (L); 10^{-3} см³ (σ_p); 2.5×10^{-3} см \cdot с⁻¹ ($U_{\text{опт}}$); 1 ($\lg t$), t — в с; 1 ($\lg \Delta p$), Δp — в кгс \cdot см⁻².

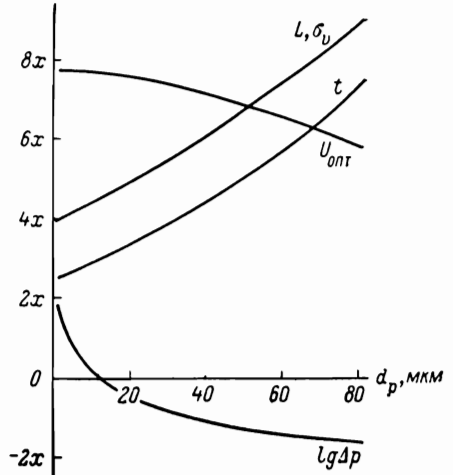


Рис. 2. Зависимость минимального стандартного отклонения пика, минимальной длины колонки, оптимальной скорости элюции, времени анализа и давления на входе колонки от диаметра зерна ионита в случае хроматографии на обычном приборе ($d_c = 1.0$ см).

x соответствует 10 см (L); 0.4 см³ (σ_p); 2×10^{-4} см \cdot с⁻¹ ($U_{\text{опт}}$); $5 \cdot 10^4$ с (t); 1 ($\lg \Delta p$), Δp — в кгс \cdot см⁻².

по отношению к оптимизированному по чувствительности макроколоночному варианту анализа (выигрыш по чувствительности по сравнению со скоростной хроматографией на обычном приборе будет еще выше). Из рис. 1 видно, что при $d_p = 5-10$ мкм удается полностью разделить аминокислоты на колонке длиной $10-20$ см за счет использования оптимальных скоростей элюции ($0.005-0.01$ см/с). Поскольку время разделения рассматриваемой пары аминокислот по стандартной методике составляет $t = L(1 + K_R)/u = 1.9 \cdot 10^3$ с, то при ультрамикроразделе приходится идти на незначительное (примерно в 2 раза) увеличение продолжительности анализа.

Эту особенность высокочувствительной хроматографии можно иллюстрировать рис. 3, на котором показана рассчитанная на основе приведенных выше формул зависимость времени разделения и чувствительности анализа (в условиях полного разделения) от скорости элюции.

Видно, что оптимальная по времени анализа скорость элюции на два порядка выше оптимума по чувствительности. Но если в условиях скоростной хроматографии мы жертвуем чувствительностью на порядок, то при ультрамикроразделе потери во времени разделения не столь велики

(в 2—3 раза), т. е. микроколоночная (капиллярная) хроматография может быть осуществлена и в скоростном режиме, однако ее преимущества в смысле увеличения чувствительности будут в какой-то степени утрачены.

Следует еще раз отметить, что главный резерв повышения чувствительности анализа заключается в снижении диаметра хроматографической колонки (d_c): $\delta \sim d_c^{-2}$. Однако нижний предел уменьшения d_c до сих пор не исследован, хотя из формул (6) и (7) очевидно, что это ограничение связано с увеличением экстраколоночного размывания при нарушении оптимального соотношения между объемом детектора, дозатора, реактора и объемом хроматографической колонки. При этом ограничения в объеме детектора связаны с необходимостью реализации оптимальных технических параметров (например, максимальной толщины кюветы в фотоме-

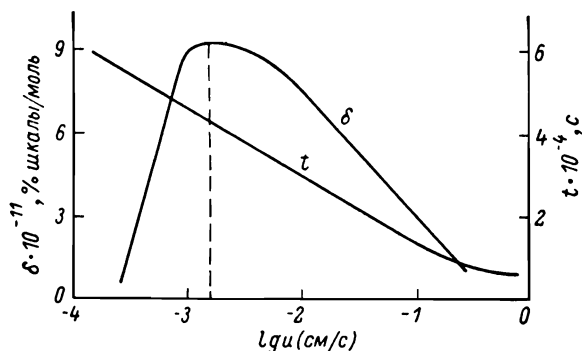


Рис. 3. Зависимость времени разделения и чувствительности анализа от скорости элюции, рассчитанная при условиях: $K_R = 1$; $\sigma_o = 0$; $K_i = 4$; $\theta = 1.1$; $d_p = 10$ мкм.

трическом детекторе). Существенно, что при уменьшении диаметра колонки целесообразно при сохранении скорости потока u соответствующее уменьшение диаметра капиллярного реактора, поскольку, как следует из (9), дисперсия удерживаемого объема в капилляре уменьшается пропорционально A^2 (при условии $A^2\beta^2u \gg 48aD_m$, которое выполняется благодаря $D_m \leq 10^{-5}$ см²/с).

Важный резерв увеличения чувствительности анализа аминокислот связан со снижением времени задержки в реакторе t_p и соответствующим уменьшением экстраколоночного размывания. При флюориметрическом детектировании это достигается легко, ибо полнота реакции аминокислот с ортофталевым диальдегидом или флюорескамином обеспечивается в течение нескольких секунд. Что касается нингидринового детектирования, то здесь уменьшения t_p можно достичь путем повышения температуры реакции до 130° [7] или еще выше.

На основе развитых представлений разработан ультрачувствительный анализ аминокислот на колонке $L = 15$ см, $d_c = 0.05$ см, заполненной ионообменной смолой «Aminex A-7» ($d_p = 8 \pm 2$ мкм) или «Durgum DC-5» ($d_p = 6 \pm 1$ мкм).

Схема микроколоночного анализатора аминокислот реализована в микроколоночном хроматографе ХЖ3301, разработанном в СКБ аналитического приборостроения НТО АН СССР.

На рис. 4 представлена хроматограмма смеси кислых и нейтральных аминокислот ($5 \cdot 10^{-11}$ моля каждой аминокислоты), полученная на этом анализаторе в условиях, оптимальных по чувствительности. Проведенный эксперимент показывает хорошее согласие с рассчитанными условиями высокочувствительного анализа по длине колонки L , которое в эксперименте отвечает разделению треонин—серин с $K_R = 0.85$ (по расчету $K_R = 1$).

Чувствительность анализа существенно (в 100 раз и более) повышается при использовании флуориметрического детектирования, основанного на применении ортофталевого диальдегида [8]. В последнем случае нами

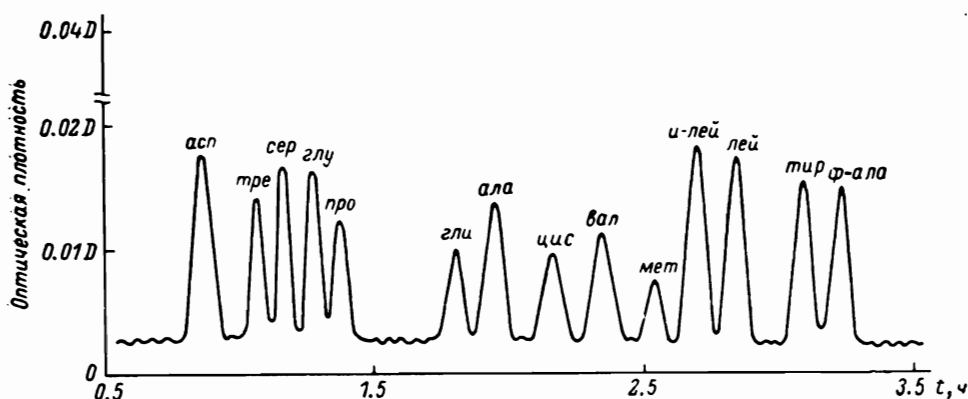


Рис. 4. Хроматограмма искусственной смеси кислотных и нейтральных аминокислот ($5 \cdot 10^{-11}$ моль каждой аминокислоты).

Условия: колонка (при 50°C), $L=15$ см, $d_c=0.05$ см, сорбент «Aminex A-7» (фирма «Bio Rad»); $d_p=8 \pm 2$ мкм; скорость элюции 125 мкл/ч; скорость подачи нингидринового реагента 63 мкл/ч. Элюция цитратными буферными растворами: 1) 0.2 н. Na^+ , pH 2.8, 5% пропанола — 90 мкл; 2) 0.2 н. Na^+ , pH 3.25, 160 мкл; 3) 0.2 н. Na^+ , pH 4.25, 9% пропанола — 125 мкл. Реактор: 5 см фторопластового капилляра с внутренним диаметром 0.03 см; температура 160°C . Фотометрия: $\lambda=570$ нм, шкала 0—0.05D, кювета 1 мкл. Дозировка — 5 мкл образца.

была достигнута чувствительность микроколоночного анализа аминокислот лучше $5 \cdot 10^{-13}$ моль.

Периодические флуктуации нулевой линии, заметные на хроматограмме, связаны с ухудшением смешивания нингидринового реактива и

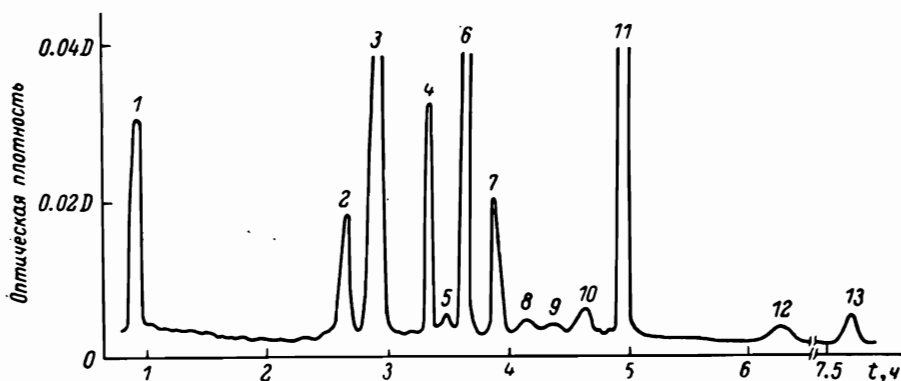


Рис. 5. Хроматограмма триптических пептидов (1—13) окисленной рибонуклеазы (1 мкг белка).

Триптический гидролиз в течение 17.5 ч при 37°C . Элюция: 1) цитратный буферный раствор, pH 3.0, 0.2 н. Na^+ (B1) — 70 мкл; 2) $\frac{2}{3}$ B1 + $\frac{1}{3}$ B2 — 250 мкл; 3) $\frac{1}{3}$ B1 + $\frac{2}{3}$ B2 — 250 мкл; 4) ацетатный буферный раствор, pH 5.0, 0.2 н. Na^+ (B2) — 1400 мкл. Скорость подачи нингидринового реагента — 125 мкл/ч. Остальные условия см. рис. 4.

элюата при использовании проточного микрореактора. Здесь в качестве реактора использовался отрезок фторопластового капилляра длиной 5 см с внутренним диаметром 0.03 см. В обычных анализаторах аминокислот вязкий нингидриновый реагент смешивается с элюатом на большой скорости, т. е. в условиях квазитурбулентности, так как эффективный диаметр миксера и реактора существенно меньше диаметра колонки. В дальней-

шем флуктуации дополнительно выравниваются при протекании через многометровый капиллярный реактор.

В условиях микроколоночной хроматографии используемый капиллярный микрореактор не обеспечивает необходимого выравнивания флуктуаций, однако качество нулевой линии может быть улучшено при использовании реактора, заполненного инертным микросферическим порошком $d_p=5-10$ мкм или при введении в смеситель ультразвукового капиллярного волновода.

На микроколоночном анализаторе аминокислот при использовании той же колонки можно осуществлять также высокочувствительный хроматографический анализ пептидов.

На рис. 5 представлена хроматограмма, полученная при анализе триптического гидролизата 1 мкг окисленной рибонуклеазы. Зарегистрированное число пиков (13) соответствует теоретическому числу пептидов, полученных при гидролизе рибонуклеазы трипсином, который рвет пептидные связи вблизи лизина и аргинина.

Заметим, что приведенный результат основан на нингидриновом детектировании. Использование ортофталевого диальдегида для регистрации пептидов при микроколоночной хроматографии позволяет анализировать протеолитические гидролизаты менее 0.1 мкг белка, тогда как наивысший современный уровень чувствительности анализа пептидов [11] соответствует 30—50 мкг.

Авторы статьи выражают благодарность В. П. Козлову за выполнение отдельных экспериментов по микроколоночной хроматографии пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hamilton P. B., Bogue D. C., Anderson R. H., Anal. Chem., 1960, v. 32, p. 1782.
2. Kirsten E., Kirsten R., Biochem. Z., 1964, Bd 8, S. 287, 339.
3. Stegemann H., Bernhard G., Microchim. akta, 1961, v. 4, N 8, p. 36.
4. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., Anal. Chem., 1958, v. 30, p. 1190.
5. Кузьмин С. Н., в кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот. М., 1973, с. 76.
6. Ishi D., Asai K., Hibi K., Jonokushi T., Nagaja M., J. Chromatogr., 1977, v. 144, p. 157.
7. Anderson N. G., Stevens R. H., Holleman I. W., Anal. Biochem., 1963, v. 26, p. 104.
8. Roth M., Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 880.
9. Giddings J. C. Dynamics of Chromatography. New York, 1965.
10. Taylor C., Proc. Roy. Soc. (London), 1953, v. A219, p. 186.
11. Benson I. R., Anal. Biochem., 1976, v. 71, p. 127.