

STACIONÁRNÍ FÁZE V AFINITNÍ CHROMATOGRAFII

TEREZA VAŘILOVÁ

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
tereza.varilova@seznam.cz*

Došlo 22.7.04, přepracováno 7.3.05, přijato 7.4.05.

Klíčová slova: afinitní chromatografie, afinitní nosič, afinitní ligand, biologicky aktivní látka

Obsah

1. Úvod
2. Princip afinitní chromatografie
3. Nosiče pro afinitní chromatografii
4. Aktivace nosičů
5. Imobilizace afinitního ligandu na tuhý nosič
6. Blokace nezreagovaných aktivních skupin
7. Stanovení množství imobilizovaného ligandu
8. Eluce látek z kolony
9. Příklady použití afinitní chromatografie
10. Závěr

1. Úvod

V dnešní době se stále častěji hledají způsoby analýzy a detekce biologicky aktivních látek, hlavně peptidů, bílkovin, léčiv a drog a složitých směsí, které je potřeba přečistit a rozdělit. Jednou z metod vhodných k tomuto účelu je afinitní chromatografie.

Princip afinitní chromatografie je znám už dlouho^{1,2}. Její aplikaci v HPLC umožnila příprava afinitních stacionárních fází, které snesou práci za vysokých tlaků, ale nezpůsobují denaturaci bílkovin. Stacionární fáze jsou obvykle připravovány na míru pro purifikaci daného proteinu a každý separační proces musí být optimalizován.

Afinitní chromatografie (ALC) je moderní separační metoda, která spojuje výhody HPLC s výjimečnou biologickou specifičností bioafinitní chromatografie. To je též důvodem, proč roste zájem o biochemické a biolékařské aplikace této metody³.

2. Princip afinitní chromatografie

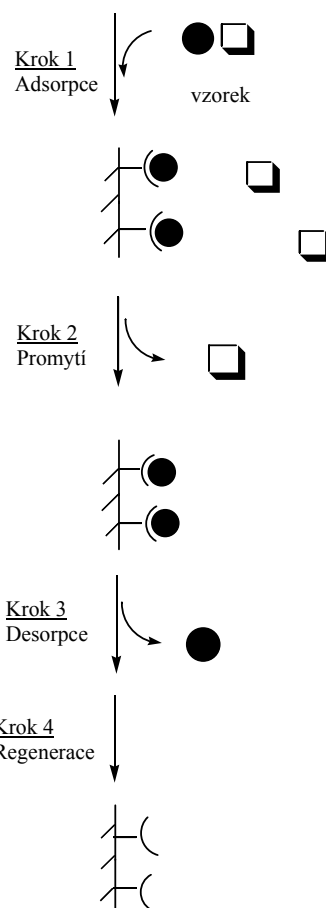
Afinitní chromatografie je založena na výjimečné schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reversibilně komplementární struktury (např. enzym –

substrát, enzym – inhibitor, enzym – kofaktor, protilátka – antigen, protilátka – haptén, hormon – receptor, lektin – sacharid apod.). Biospecifické interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce^{3–5}. Princip separace pomocí afinitní chromatografie je patrný z obr. 1.

Látka E interaguje s ligandem L za vzniku komplexu E...L. Tvorbu tohoto komplexu popisuje rovnice (1) a příslušná rovnovážná konstanta K .



$$K = \frac{[E \dots L]}{[E] \cdot [L]}$$



Obr. 1. **Princip afinitní chromatografie** (upraveno podle⁶); Krok 1 – Nadávkování vzorku: vzorek v roztoku je biospecificky sorbován na ligand stacionární fáze. Krok 2 – nečistoty jsou vymyty z kolony a detegovány jako první pík. Krok 3 – molekula sorbované látky je uvolněna disociací (nebo desorpce) pufrům obsahujícím desorpční činidlo. Krok 4 – afinitní kolona je regenerována a připravena pro další použití

Rovnovážná konstanta K musí být dostatečně vysoká, aby mohlo dojít ke tvorbě komplexu, ale ne tak vysoká, aby znemožnila eluci látek z kolony⁷. Ligandy mohou být monospecifické nebo skupinově specifické. Monospecifické ligandy se vážou silněji než skupinově specifické a rovnovážné konstanty se pohybují řádově mezi 10^6 až 10^8 mol⁻¹ l. Pokud jsou v rozmezí 10^3 až 10^5 mol⁻¹ l, dochází spíše k retardaci látek než ke tvorbě stabilního komplexu. Nad 10^9 mol⁻¹ l musí být použity k eluci látek drastické podmínky^{7,8}.

Kinetika sorpce je v afinitní chromatografii pomalejší než např. v iontově výměnné rozdělovací chromatografii. Důležitá je rovněž otázka, zda imobilizované látky mají stejnou biologickou aktivitu jako neimobilizované. Zatímco v řadě případů bylo potvrzeno shodné chování, jindy byly pozorovány odchylky, např. stacionární fáze se zkříženým albuminem připravené odlišným způsobem vykazovaly různé chromatografické vlastnosti⁹.

Nejčastěji se používají biologické ligandy (enzymy, receptory, protilátky, Protein A, lektiny, nukleové kyseliny), avšak jejich aplikace je omezena vysokou cenou a/nebo jejich relativní nestabilitou. Proto je snaha nahradit přírodní ligandy syntetickými, robustnějšími. Patří mezi ně nízkomolekulární ligandy jako jsou barviva, chelatotvorné kovy, thiofilní ligandy a deriváty kyseliny borité. Syntetické ligandy vykazují obvykle skupinovou selektivitu, interagují s různými proteiny současně, proto je snaha zvýšit selektivitu separace¹⁰.

Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech s chelatotvornými kovy jako jsou Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ nebo Co²⁺ (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) je velmi účinná pro čištění rekombinantních proteinů a často se používá pro stanovení biologicky aktivních látek v těle¹¹.

3. Nosiče pro afinitní chromatografii

Stacionární fáze se obvykle připravují chemickou vazbou afinitního ligandu na tuhý nosič. Používají se stabilní hydrofilní makroporézní nebo neporézní matrice. Jejich významné charakteristiky jsou velikost částic, distribuce velikosti pórů, přístupný povrch a flexibilita polymeru, protože vysoké dostupnosti ligandu lze dosáhnout pouze s pohyblivými řetězci polymeru⁸. Matrice musí co nejméně interagovat s analytem (minimální nespecifické interakce)^{12,13} a být teplotně, chemicky a mechanicky stabilní^{13,14}. Důležitá je rovněž pH stabilita. Nosič musí obsahovat velké množství chemických skupin, které mohou být aktivovány tak, aby umožnily kovalentní připojení ligandu¹². Některé nosiče dodává výrobce již v aktivované formě, jiné je nutné předem aktivovat.

V určitých případech lze použít fyzikálně chemické vlastnosti stacionární fáze pro zachycení ligandu fyzikálními silami. Tím vzniká snadno regenerovatelný materiál za nízkou cenu. Tak byla např. připravena afinitní stacionární fáze s barvivem Procion-Brown H-A k čištění lysozymu z vaječného bílku¹⁵. Podobně byl imobilizován konkanava-

lin A na oxid zirkoničitý na základě acidobazických interakcí. Stabilita stacionární fáze byla zvýšena reakcí s glutaraldehydem a po použití snadno regenerována odstraněním konkanavalinu z povrchu s možností opětné adsorpce¹⁶.

Existuje řada komerčně dostupných materiálů, vhodných pro přípravu afinitních stacionárních fází.

Silikagel

Silikagel je často používaný nosič pro přípravu stacionární fáze. Jeho povrch je nutné nejprve modifikovat, aby mohl být navázán afinitní ligand (např. zavádění epoxy- nebo isothiokyanátové skupiny). Takto aktivovaný silikagel může přímo reagovat s ligandem, který obsahuje hydroxylové, thiolové nebo aminoskupiny³. Tento materiál snese i vysoké tlaky, ale je nestabilní v kyselé i alkalické oblasti (využitelný rozsah pH je omezen na oblast $2 < \text{pH} < 8$). Nespecifické interakce lze pozorovat již při $\text{pH} > 4$ (cit.¹⁰). Relativně nový nosič je koloidní roztok skleněných vláken. Derivatizací se eliminují nespecifické interakce. Jeho hlavní výhody jsou velký povrch (důsledkem je velká kapacita pro vzorky), vysoká účinnost a mechanická odolnost ve srovnání s měkkými gely (agarosa, perlová celulóza). Nevýhodou, podobně jako u silikagelu, je omezený rozsah pH, takže nelze použít alkalické pufrů, doporučované pro extrakci a přečištění tkáňových proteinů¹⁷.

Anorganické oxidy Al, Ti a Zr

Další skupinou anorganických materiálů používaných jako nosiče jsou různé oxidy kovů¹⁰, nejčastěji Al₂O₃ (alumina), TiO₂ a ZrO₂. Al₂O₃, TiO₂ a ZrO₂ existují v mnoha amorfních a krystalických formách. Jejich chemická stabilita je vyšší než u silikagelu. Alumina je chemicky odolnější než oxid křemičitý a rozpouští se pouze při $\text{pH} > 12$ a pod $\text{pH} < 3$. Avšak její povrch je heterogenní, proto kolona s Al₂O₃ vykazuje nižší účinnost oproti SiO₂. TiO₂ a ZrO₂ mají výborné mechanické vlastnosti a chemickou stabilitu, odolávají vysokým tlakům (až do 500–600 bar) a snášejí práci i v extrémních pH (1–14) (cit.¹⁰).

Agarosové nosiče a jejich deriváty

Nejběžnějším agarosovým nosičem je Sepharosa, která obsahuje dvě polysacharidové jednotky, je stabilní v rozmezí pH 4–9 a snese teploty až do 40 °C. Lze ji používat i při velké koncentraci soli a močoviny. Dále je Sepharosa odolná vůči běžným organickým rozpouštědlům a nevykazuje nespecifické interakce. Nevýhodou je nízká tlaková stabilita, proto není vhodná pro HPLC (cit.¹²). Agarosa s divinylsulfonem (DVS) křížově navázaným na agarosu (DVS-agarosa) má výrazně lepší vlastnosti oproti klasické agarose: je mechanicky stabilní, chemicky stálá v kyselém a neutrálním prostředí a dostatečně teplotně stabilní¹⁸.

Polyakrylamidové gely

Jedná se o hydrofilní kopolymery¹² založené na bázi akrylamidu a akrylamidových derivátů. Jakožto syntetické

polymery nejsou napadány mikroorganismy a mají delší trvanlivost. Jsou stále ve zředěných roztocích solí, detergentů, močoviny a v organických rozpouštědlech, i když za extrémních podmínek lze pozorovat určitou změnu pórovitosti. Mezi nejpoužívanější polyakrylamidové nosiče patří Bio-Gely, které jsou stabilní při pH 1–10.

Hydroxyalkylmethakrylátové nosiče

Tyto materiály se připravují polymerací hydroxyalkylesterů kyseliny methakrylové s alkylen-bis(methakryláty). Poměrem reagujících složek lze řídit počet reaktivních skupin, pórovitost i velikost vnitřního povrchu gelu. Jejich výhodou je chemická i mechanická stabilita a rezistence vůči mikroorganismům. Jejich nevýhodou je částečně hydrofobní charakter, a tedy i náchylnost k nespecifickým hydrofobním interakcím¹².

Mezi nejrozšířenější hydroxyalkylmethakrylátové nosiče patří hydroxyethylmethakrylát (HEMA), což je makroporézní kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu. HEMA se dodává v různé velikosti částic, je stabilní až do tlaku 20 MPa a při pH 2 až 12 a kompatibilní s většinou organických rozpouštědel^{19,20}.

Dále sem patří Toyopearl^{21–23}, což je hydrofilní, makroporézní sorbent na bázi kopolymeru ethylenglykolu a methakrylátu. Je stabilní při pH 2–12 a v teplotním rozmezí 4–60 °C. Má značný vylučovací limit (100 nm), vysokou kapacitu a definovanou velikost částic. Výhodou jsou minimální nespecifické interakce a vysoká výtěžnost proteinů, enzymů a glykoproteinů. Komerčně dostupný je tento nosič pod názvem TSK-gel od firmy Tosoh.

Dextranové gely

Dextran je větvený polysacharid složený z jednotek glukosy, který vzniká ze sacharosy působením některých mikroorganismů. Rozpustný dextran obsahuje přes 90 % glykosidických vazeb α -1,6 a je větvený glykosidickými vazbami 1,2, 1,3 a 1,4. Trojrozměrný gel se připravuje reakcí rozpustného dextranu s epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Dextranové gely¹², komerčně známé pod názvem Sephadex, jsou chemicky velmi stálé (nemění se ani dvouměsíčním působením 0,2 M NaOH při 60 °C). Glykosidické vazby jsou však citlivé k hydrolýze při nízkých hodnotách pH a také mechanická stabilita je nižší.

Celulosa

Celulosa je tvořena hlavně lineárním polymerem D-glukosových jednotek vázaných vazbou β -1,4, přičemž v malém měřítku se vyskytuje i vazba 1,6. Komerčně dostupná mikrokrytalická celulosa je obvykle zesíťována nějakým činidlem se dvěma funkčními skupinami, např. epichlorhydrinem, a je značně chemicky stálá¹².

Protože celulosa je snadno dostupná a levná, je nejvíce používaná v průmyslové oblasti. Perlová celulosa je všestranný, makroporézní, hydrofilní materiál s velkou kapacitou. Ve formě membrány je to oblíbená matrice. Vlákennitá celulosa je důležitý sorbent pro vazbu DNA

(DNA-celulosa)²⁴. Její nevýhodou je nízká mechanická stabilita.

Polystyren

Polystyreny¹³ s různým stupněm zesíťování jsou odolnější vůči tlaku než polysacharidové nosiče, i když ve srovnání s anorganickými materiály vykazují nižší tlakovou toleranci. Polystyren může bobtnat v přítomnosti organických rozpouštědel. Vzhledem k hydrofobnímu charakteru polymeru vykazuje nespecifické interakce a nižší účinnost. Tyto nevýhody mohou být částečně odstraněny pokrytím polymeru vhodnou sloučeninou nebo blokováním zbytkových funkčních skupin. Vlastnosti polystyrenu mohou být změněny zabudováním řetězce polyethylenglykolu do málo zesíťovaného polymeru. Tento nový materiál dobře bobtná v organických i vodných roztocích.

Nové materiály

Materiály připravené sol-gel technologií umožňují zakapsulování ligandů při zachování jejich biologické aktivity. Ligandy nejsou vázány chemicky, pouze fyzikálními silami²⁵. Materiály připravené sol-gel technologií obsahující proteiny byly využity jako imunoafinitní sorbenty. Vykazovaly vyšší stabilitu z hlediska denaturace a mikrobiální degradace i nižší nespecifické interakce²⁶. Z dosavadní praxe se zdá, že optimalizací výrobního procesu bude možné zajistit, aby selektivita fáze byla dána pouze zachycenými ligandy.

Vtištěné syntetické receptory představují nový typ vysoce selektivních afinitních stacionárních fází, založených rovněž na molekulovém rozpoznávání. Jejich příprava spočívá v polymeraci jednoho nebo více monomerů se zesíťovadlem, poroginem (rozpuštědlem) a iniciátorem polymerace v přítomnosti analytu (ligandu). Po polymerizaci je extrahován rozpustný analyt a v polymeru zůstane obtisky s umělými vazebnými místy. Takto získaný materiál je schopen selektivně rozpoznat a vázat vtištěnou molekulu^{27–29}.

Vtištěné syntetické receptory mají oproti biologickým receptorům řadu výhod. Zatímco přírodní receptory mají omezenou stabilitu, jejich příprava je obtížná a vyžaduje purifikační procesy, jsou syntetické receptory na bázi vtištěných polymerů velmi robustní a vydrží eluci řadou rozpouštědel. Odstraňují tak problémy spojené s nestabilitou biomolekul a komplikovanou přípravou afinitních stacionárních fází. Nevýhodou mohou být nespecifické interakce samotného polymeru²⁹.

Monolitické fáze našly uplatnění i v afinitní chromatografii. Jejich hlavní výhoda proti náplňovým kolonám spočívá v extrémně rychlých separacích, důležitých při analýze labilních látek, jako jsou proteiny. Mezi další výhody patří nižší spotřeba vzorku a rozpouštědel a nižší detekční limit³⁰. Komerčně dostupné jsou i monolitické disky, na něž je možné navázat afinitní ligandy a využít je při izolaci biologicky aktivních látek³¹. Afinitní monolitické disky byly použity pro separaci monospecifických polyklonálních protilátek³².

4. Aktivace nosičů pro afinitní chromatografii

Pokud není nosič aktivovaný již od výrobce, je nutné jej ještě před navázáním ligandu aktivovat. Aktivačních reakcí existuje velmi mnoho, nejběžnější jsou:

- Bromkvanová metoda (CNBr)³³; Tento způsob převažuje pro aktivaci polysacharidových nosičů a je často používán v laboratorním i průmyslovém měřítku. Má řadu výhod: je téměř univerzální (lze ho proto použít pro polymery obsahující hydroxylové skupiny), na aktivované nosiče lze navázat jak malé, tak vysokomolekulární ligandy obsahující primární aminoskupiny a příprava nosičů je relativně jednoduchá. Mezi nevýhody patří vysoká toxicita bromkvanu. Tato metoda je zvláště mírná pro vazbu citlivých biomolekul, jako jsou enzymy a protilátky. Příklad aktivace nosiče a vazby ligandu je uveden na obr. 2.
- Aktivace divinylsulfonem (DVS)³³; Divinylsulfon je bifunkční činidlo, které se používá podobně jako v předchozím případě pro aktivaci nosičů s hydroxylovými skupinami. DVS zavádí reaktivní vinyl skupiny do matrice pro vazbu aminů, alkoholů, thiolů a fenolů. Gely aktivované DVS jsou reaktivnější než gely aktivované epoxy skupinami, a proto je vazebný proces rychlejší a účinnější. Jsou vhodné pro imobilizaci cukrů prostřednictvím jejich hydroxylových skupin. Nevýhodou je nestabilita imobilizovaných ligandů v alkalickém prostředí daná labilní etherovou vazbou mezi DVS a nosičem.
- Aktivace epoxy skupinami (bisoxiranem)³³; Bisoxira-

ny mohou být použity pro zavedení epoxy skupiny do mnoha hydroxylovaných polymerů. Jako aktivační činidlo se nejčastěji používá 1,4-butandiol-diglycidylether, který v alkalické oblasti reaguje ochotně s hydroxylovými skupinami za vzniku derivátů obsahujících hydrofilní raménko (spacer) o dlouhém řetězci s reaktivní oxiranovou skupinou na konci. Mezi bisoxiranem a matricí se vytvoří stabilní etherová vazba. Koncová epoxyskupina může reagovat s ligandy, které obsahují hydroxylové, aminové nebo thiolové skupiny.

- Aktivace organickými sulfonylchloridy³³; Tato metoda se používá pro aktivaci agarosy a dalších hydroxylovaných matric. Organické sulfonylchloridy, jako jsou *p*-toluensulfonylchlorid (tosylchlorid) a 2,2,2-trifluoroethansulfonylchlorid (tresylchlorid), reagují s neaktivními hydroxylovými skupinami nosiče na aktivní sulfonové skupiny. Tyto aktivované nosiče mohou být použity pro vazbu ligandu obsahující thiolové a/nebo amino skupiny (thiolové skupiny jsou reaktivnější). Vazbu ligandu lze provést ve vodných i organických rozpouštědlech (např. v dimethylformamidu). Materiály aktivované tresylem jsou velmi účinné pro imobilizaci ligandů v neutrálním prostředí při 4 °C.
- Triazinová metoda^{33,34}; Trichlor-s-triazin lze použít pro aktivaci agarosových nosičů (využívá se pro imobilizaci heparinu). Hlavní nevýhodou aktivace pomocí trichlor-s-triazinu je jeho vysoká toxicita. Tento způsob aktivace je méně běžný.

Tabulka I

Reakční podmínky imobilizace pro různé funkční skupiny (upraveno podle⁴)

Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky
Bromkvan	-NH ₂	pH 7–10, doba 1–12 h, teplota 4–25 °C
Divinylsulfon	-NH ₂ -OH -SH	pH 6–11, doba 2–24 h, teplota 4–25 °C
Epoxy	-NH ₂ -OH -SH -COOH	pH 5–12, doba 4–72 h, teplota 4–60 °C
Tresyl	-NH ₂	pH 7–9, doba 2–16 h, teplota 4–25 °C
Aldehyd	-NH ₂	pH 3–10, doba 1–12 h, teplota 4–25 °C

Nosič	Aktivace	Vazba	Afinant
— OH	+BrCN	— O-CN + H ₂ N-ligand	— O-CNH-ligand
— OH	+ClSO ₂ CH ₂ CF ₃	— SO ₂ CH ₂ CF ₃ + H ₂ N-ligand	— NH-ligand + HOSO ₂ CH ₂ CF ₃

Obr. 2. Příklad aktivace nosiče a vazby ligandu (upraveno podle¹⁴); BrCN – aktivace bromkvanem, ClSO₂CH₂CF₃ – aktivace tresylchloridem

5. Imobilizace afinitního ligandu na tuhý nosič

Imobilizace biomolekul na anorganické, organické a polymerní povrchy jsou obvykle založeny na kovalentní vazbě, fyzikální adsorpci, zachycení v semipermeabilní membráně a mikroenkapsulaci v polymerních mikrokuličkách a hydrogelech. Nejčastější je imobilizace pomocí kovalentní vazby. Ostatní metody nejsou obecně použitelné a ve většině případů jsou omezeny jen na malý rozsah analytů a aplikací⁸.

Podmínky imobilizace se liší v závislosti na vlastnostech ligandu a typu aktivních skupin nosiče. Reakční podmínky imobilizace pro nosiče s různými aktivními skupinami ukazuje tabulka I. Z ní je patrné, že na většinu běžných nosičů je možné imobilizovat afinitní ligand v teplotním rozmezí 4–25 °C (pouze pro epoxy aktivní skupiny lze teplotu zvýšit až na 60 °C) a během 24 hodin. Hodnota pH imobilizace se liší podle konkrétního typu ligandu a jeho reagující skupiny.

Bylo zjištěno, že imobilizaci na epoxy aktivované nosiče lze podpořit zvýšením koncentrace solí v roztoku (např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_3PO_4) v důsledku zvýšení hydrofobních interakcí. Pro proteiny a nukleotidy se imobilizace zvýší v neutrálním prostředí, kdežto pro malé afinitní ligandy při vyšším pH (cit.³⁵).

Jako ligandy mohou být použity všechny látky schopné biospecifické reverzibilní vazby. Nízkomolekulární ligandy jsou stabilnější a stericky lépe dosažitelné než vysokomolekulární ligandy, které jsou hůře definovatelné a mohou podléhat denaturaci¹⁴.

6. Blokace nezreagovaných aktivních skupin

Protože po imobilizaci afinitního ligandu na tuhý nosič zůstane na nosiči vždy část skupin aktivních, je nutné je zablokovat⁴. K tomu se nejčastěji využívá dvou postupů:

- Vazba vhodné látky na zbytkové aktivní skupiny nosiče: na nezreagované aktivní místo nosiče se naváže vhodná látka (např. glycin, glycerol nebo ethanolamin), která by neměla ovlivňovat sorpci a desorpci analytu.
- Hydrolyza zbytkových aktivních skupin vedoucí k jejich odstranění: provádí se v alkalickém prostředí a je využitelná pouze pro ligandy, které jsou v tomto prostředí stálé.

Pro vymytí nekovalentně vázaného afinitního ligandu se používají pufrы s vysokou iontovou silou a pH, při kterém probíhala imobilizace.

7. Stanovení množství imobilizovaného ligandu

Důležitou charakteristikou afinitní stacionární fáze je množství kovalentně navázaného ligandu¹². Ke zjištění jeho koncentrace bylo vypracováno mnoho metod:

Diferenční analýza

Množství ligandu vázaného k nosiči se vypočítá z rozdílu mezi celkovým množstvím ligandu přidávaného do reakční směsi a množstvím nezreagovaného ligandu, které se získá po důkladném promytí sorbentu. Tato metoda je velmi nepřesná, zejména když se kovalentně váže jen malá část ligandu, nebo je-li ligand špatně rozpustný.

Přímá spektrometrie

V případě transparentních nosičů se může zjišťovat množství kovalentně navázaného ligandu přímou spektrometrií.

Kyselá nebo enzymová analýza

Působením kyseliny za drastičtějších podmínek dochází k hydrolyze vazby mezi ligandem a nosičem a uvolní se volný ligand nebo produkt jeho degradace, který lze stanovit (např. v případě proteinů analýzou aminokyselin). Tato metoda není příliš výhodná, protože může dojít k současnému rozkladu nosiče (tento problém lze částečně řešit enzymovou hydrolyzou za mírných podmínek).

Elementární analýza

Množství navázaného ligandu lze také určit z elementární analýzy. Stanovuje se přítomný prvek, např. síra, jod, dusík nebo fosfor. Elementární analýza dusíku může poskytovat zkrácené výsledky, protože jeho obsah vzrůstá při aktivaci bromkyanem.

Radioaktivita

V některých případech lze použít ligand značený radioizotopem. Jako radioizotopy se nejčastěji používají ^3H , ^{32}P , ^{57}Co .

8. Eluce látek z kolony

Látky, které silně interagují se stacionární fází, se zadrží v koloně a je nutné je uvolnit do mobilní fáze. Eluci analytů z kolony je možno provést dvěma způsoby⁴:

- Nespecifická eluce; Při této metodě látka eluuje při změně některé z vlastností mobilní fáze, např. hodnoty pH, iontové síly, relativní permitivity nebo teploty. Ve většině případů stačí pro eluci změna hodnoty jedné veličiny. Při analýze proteinů je nutno dodržet podmínky, při kterých nedochází k jejich denaturaci.
- Specifická eluce; Při tomto způsobu eluce se do mobilní fáze přidá látka, která vytvoří s ligandem pevnější komplex než je původní komplex analytu. Tento způsob eluce bývá šetrnější ke stanovovaným látkám.

Eluci lze provést izokraticky nebo pomocí gradientu. Izokratický způsob je vhodný pro jednoduché látky, které mají malou afinitu k ligandu. V případě použití gradientové eluce je důležité zvolit vhodnou strmost gradientu: při mírném gradientu se většinou látky dobře rozdělí, ale jejich píky nebývají dostatečně úzké, při strmém gradientu se analyty hůř rozdělí, ale píky jsou ostřejší.

Tabulka II

Příklady použití afinitní chromatografie

Biologicky aktivní látka	Afinitní ligand	Původ vzorku	Lit.
Aspartátové proteasy	aromatické aminokyseliny	žaludeční sliznice	66
Pepsin	DIT ^a	žaludeční sliznice	42, 43
Heparin vázající a heparin nevázající proteiny	heparin	kančí semenná plazma	55,56
Serinové proteasy	BPTI ^b	hovězí a lidský intervertebrální disk	41
FABP ^c	Lb-FABP	kuřecí játra	67
Mléčný represor β-galaktosidasy	DNA - sepharosa	bakterie	68
IgA ^d	TG19318 (syntetický peptidový ligand)	supernatant surové buněčné kultury	52,53
IgM ^e	TG19318 (syntetický peptidový ligand)	myš	54
AGP ^f	kyselina imidodiodiová s Cu (II)	plazma	69
Molekulový receptor viru dengue	rekombinantní E protein	dengue virus typ 4	47
Lektin	Affi-gel, blue gel	houby <i>Xerocomus spadiceus</i>	70
Estradiol	tetrapeptid	–	45
Glykoproteiny	Con A ^g	lidské krevní sérum, rakovinotvorné buňky	71
Glykoproteiny	lektin	–	72
L-, D-tryptofan	HSA ^h	–	73
Deriváty benzodiazepinu	HSA	–	74
Atrazin (pesticid)	antiatrazin - protilátka	zemina	39

^a DIT – 3,5-dijodo-L-tyrosin, ^b BPTI – bazický pankreatický inhibitor trypsinu, ^c FABP – proteiny vážící mastné kyseliny,^d IgA – imunoglobulin A, ^e IgM – imunoglobulin M, ^f AGP – α₁-kyselý glykoprotein, ^g Con A – konkanavalin A, ^h HSA – lidský sérový albumin

9. Příklady použití afinitní chromatografie

Metoda afinitní chromatografie se nejčastěji používá k izolaci peptidů, proteinů, glykoproteinů a obecně biologicky aktivních látek. Vybrané aplikace použití afinitní chromatografie ukazuje tabulka II. Z této tabulky je patrné, že možnosti aplikace této metody jsou velmi široké. Afinitní metody se hodí pro prekoncentraci stopových množství sloučenin, čištění analytů v komplexních směsích i k analýze látek³⁶. Také se používají pro analýzy v oblasti životního prostředí³⁷, např. pesticidů^{37–39} a toxinů^{37,40}. Tato stanovení bývají komplikována složitými maticemi a časovou nutností několika předseparačních kroků³⁷.

Četné aplikace jsou v lékařství a medicíně, např. enzymy^{41–44}, hormony^{45,46}, viry a jejich genetický fond^{47–49}, rakovinotvorné markery^{50,51}, protilátky^{52–54}, proteiny semenné plazmy^{55,56} a léky či drogy^{57,58}. ALC je nepostradatelnou metodou v proteomice^{59–61}.

Důležité jsou práce zaměřené na stanovení vazebných konstant pro kvantifikaci interakce protein-ligand^{45,62–65}. Jako příklad je možné uvést stanovení vazebné konstanty

komplexu heparinu s protrombinem III ($3,4 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ l}$, cit.⁶³).

Afinitní chromatografie se často kombinuje a doplňuje s dalšími separačními technikami, např. s dvoudimenzionální elektroforézou (2-DE). Před vlastní separací proteinů metodou 2-DE lze afinitní chromatografii použít pro prekoncentraci a předúpravu vzorku⁵⁹.

10. Závěr

Afinitní chromatografie je metoda separace a izolace biologicky aktivních látek, založená na jejich specifických interakcích (molekulovém rozpoznávání) s ligandy. Během posledních dvaceti let prošla velkým vývojem a stala se účinným nástrojem pro řadu aplikací. V současné době dochází k velkému pokroku ve vývoji afinitních stacionárních fází (vtištěné polymery, materiály připravené sol-gel technologií a monolitické fáze) i v miniaturizaci techniky (např. afinitní membrány).

Základní charakteristiky afinitní chromatografie jsou shrnuty v tabulce III.

Tabulka III

Přehled hlavních charakteristik afinitní chromatografie (upraveno podle⁸)

Parametr	Hodnota
Princip separace	dělí molekuly podle biospecifické aktivity
Využití	– jednostupňové přečištění cílové molekuly, – čištění označených rekombinantních proteinů, – skupinové separace, – odstranění specifických kontaminantů
Separční charakteristiky	– rozlišení velmi vysoké, – zatížení vysoké, – rychlost střední, – výtěžek vysoký
Hlavní parametr optimalizace	výběr afinitního ligandu
Specifikace	– velmi jednoduchý purifikační protokol, – vyžaduje pouze jednoduché vybavení, – velmi vhodné pro značené rekombinantní proteiny

LITERATURA

- Rajagopalan T. G., Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. 241, 4940 (1966).
- Walters R. R., Buck R. P.: J. Chromatogr., A 188, 61 (1980).
- Hynek R.: Chem. Listy 89, 93 (1995).
- Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. 2. vydání. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Kašička V.: Chem. Listy 91, 320 (1997).
- Man C. T., Hodges R. S. (ed.), v knize: *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, str. 480. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Glatz Z.: Chem. Listy 96, 127 (2002).
- <http://www.amershambiosciences.com>, staženo 17. 2. 2005.
- Allenmark S.: *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*. 2. vydání. Ellis Horwood, New York 1991.
- Leonard M.: J. Chromatogr., B 699, 3 (1997).
- Zouhar J.: Chem. Listy 93, 683 (1999).
- Lowe C.R., Dean P.D.G.: *Afinitní chromatografie*. SNTL, Praha 1979.
- Tozzi C., Anfossi L., Giraudi G.: J. Chromatogr., B 797, 289 (2003).
- Štulík K.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
- Giuliano K. A.: Anal. Biochem. 200, 370 (1992).
- Glavanovich M. H., Carr P.W.: Anal. Chem. 66, 2584 (1994).
- Zusman R., Zusman I.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 175 (2001).
- Porath J., Låås T., Janson J.-Ch.: J. Chromatogr., A 103, 49 (1975).
- Čoupek J., Vinš I.: J. Chromatogr., A 658, 391 (1994).
- Turková J., Bláha K., Horáček J., Vajčner J.: J. Chromatogr., A 215, 165 (1981).
- Tosoh Bioscience: 2003 Laboratory Products Catalogue, str. 93.
- Matsumoto I., Ito Y., Seno N.: J. Chromatogr., A 239, 747 (1982).
- Nakamura K., Suzuki T., Kamichika T., Hasegawa M., Kato Y., Sasaki H., Inouye K.: J. Chromatogr., A 972, 21 (2002).
- Gemeiner P., Polakovič M., Mislovičová D., Štefuca V.: J. Chromatogr., B 715, 245 (1998).
- Jin W., Brennan J. D.: Anal. Chim. Acta 461, 1 (2002).
- Spitzer B., Cichna M., Markl P., Sontag G., Knopp D., Niessner R.: J. Chromatogr., A 880, 113 (2000).
- Sellergren B.: J. Chromatogr., A 673, 133 (1994).
- Kandimalla V. B., Ju H.: Anal. Bioanal. Chem. 380, 587 (2004).
- Quaglia M., De Lorenzi E., Sulitzky C., Massolini G., Sellergren B.: Analyst 126, 1495 (2001).
- Pan Z., Zou H., Mo W., Huang X., Wu R.: Anal. Chim. Acta 466, 141 (2002).
- Tennikova T. B., Freitag R.: J High Resol. Chromatogr. 23, 27 (2000).
- Josic D., Lim Y.-P., Štrancar A., Reutter W.: J. Chromatogr., B 662, 217 (1994).
- Hramson G. T., Mallia K. A., Smith P. K.: *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press, London 1992.
- Finlay T. H., Troll V., Hodgins L. T.: Anal. Biochem. 108, 354 (1980).
- Wheatley J. B., Schmidt D. E. Jr.: J. Chromatogr., A 849, 1 (1999).
- Stevenson D.: J. Chromatogr., B 745, 39 (2000).

37. Van Emon J. M., Gerlach C. L., Bowman K.: *J. Chromatogr.*, B 715, 211 (1998).
38. Thomas D. H., Beck-Westermeyer M., Hage D. S.: *Anal. Chem.* 66, 3823 (1994).
39. Ferrer I., Hennion M.-C., Barceló D.: *Anal. Chem.* 69, 4508 (1997).
40. Carvajal M., Arroyo G.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 1301 (1997).
41. Šťovíčková J., Podrazký V., Trnavský K.: *J. Chromatogr.*, B 575, 229 (1992).
42. Arnoštová H., Kučerová Z., Tišlerová I., Trnka T., Tichá M.: *J. Chromatogr.*, A 911, 211 (2001).
43. Tonková E., Tichá M., Kučerová Z.: *Int. J. Biochromatogr.* 4, 35 (1998).
44. Sahin-Tóth M.: *Pancreatolgy* 1, 461 (2001).
45. Tozzi C., Anfossi L., Giraudi G., Giovannoli C., Baggiani C., Vanni A.: *J. Chromatogr.*, A 966, 71 (2002).
46. Rulli S. B., Zitta K., Calandra R. S., Campo S.: *Neuroendocrinology* 78, 280 (2003).
47. Reyes-del Valle J., del Angel R. M.: *J. Virol. Methods* 116, 95 (2004).
48. Eshaghi M., Tan W. S., Mohidin T. B. M., Yusoff K.: *Virus Res.* 106, 71 (2004).
49. Guarino L., Mistretta T.-A., Dong W.: *Virus Res.* 90, 187 (2002).
50. Sumi S., Arai K., Yoshida K.-I.: *J. Chromatogr.*, B 764, 445 (2001).
51. Zusman I.: *J. Chromatogr.*, B 715, 297 (1998).
52. Palombo G., De Falco S., Tortora M., Cassani G., Fassina G.: *J. Mol. Recognit.* 11, 243 (1998).
53. Fassina G., Verdoliva A., Palombo G., Ruvo M., Cassani G.: *J. Mol. Recognit.* 11, 128 (1998).
54. Palombo G., Verdoliva A., Fassina G.: *J. Chromatogr.*, B 715, 137 (1998).
55. Maňásková P., Liberda J., Tichá M., Jonáková V.: *J. Chromatogr.*, B 770, 137 (2002).
56. Kraus M., Tichá M., Jonáková V.: *J. Reprod. Immunol.* 51, 131 (2001).
57. Zhou S.: *J. Chromatogr.*, B 797, 63 (2003).
58. Demir Y., Alayli A., Demir N.: *Pharm. Biol.* 42, 434 (2004).
59. Lee W.-Ch., Lee K. L.: *Anal. Biochem.* 324, 1 (2004).
60. Fan X., She Y.-M., Bagshaw R. D., Callahan J. W., Schachter H., Mahuran D. J.: *Anal. Biochem.* 332, 178 (2004).
61. Geng M., Zhang X., Bina M., Regnier F.: *J. Chromatogr.*, B 752, 293 (2001).
62. Winzor D. J.: *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1010 (2003).
63. Hogg P. J., Jackson C., Winzor D. J.: *Anal. Biochem.* 192, 303 (1991).
64. Bergman D., Winzor D. J.: *Anal. Biochem.* 153, 380 (1986).
65. Winzor D. J., Munro P. D.: *J. Chromatogr.*, A 597, 57 (1992).
66. Kučerová Z., Tichá M.: *J. Chromatogr.*, B 770, 121 (2002).
67. Massolini G., Calleri E.: *J. Chromatogr.*, B 797, 255 (2003).
68. Robinson F. D., Moxley R. A., Jarrett H. W.: *J. Chromatogr.*, A 1024, 71 (2004).
69. Hervé F., d'Athis P., Tremblay D., Tillement J.-P., Barré J.: *J. Chromatogr.*, B 798, 283 (2003).
70. Liu Q., Wang H., Ng T. B.: *Peptides* 25, 7 (2004).
71. Geng M., Zhang X., Bina M., Regnier F.: *J. Chromatogr.*, B 752, 293 (2001).
72. Caron M., Sève A.-P., Bladier D., Joubert-Caron R.: *J. Chromatogr.*, B 715, 153 (1998).
73. Chattopadhyay A., Tian T., Kortum L., Hage D. S.: *J. Chromatogr.*, B 715, 183 (1998).
74. Kaliszan R.: *J. Chromatogr.*, B 715, 229 (1998).

T. Vařilová (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague*): **Stationary Phases for Affinity Chromatography**

Stationary phases for affinity chromatography are reviewed. Attention is paid to the selection of supports (including new materials such as sol-gel derived materials, monolithic disks and imprinted polymers), their activation, method of immobilization and determination of immobilized ligands. Selected applications are summarized.