

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie: Od separačního mechanismu přes analýzu malých molekul ke glykoproteomické analýze

Petr Kozlík

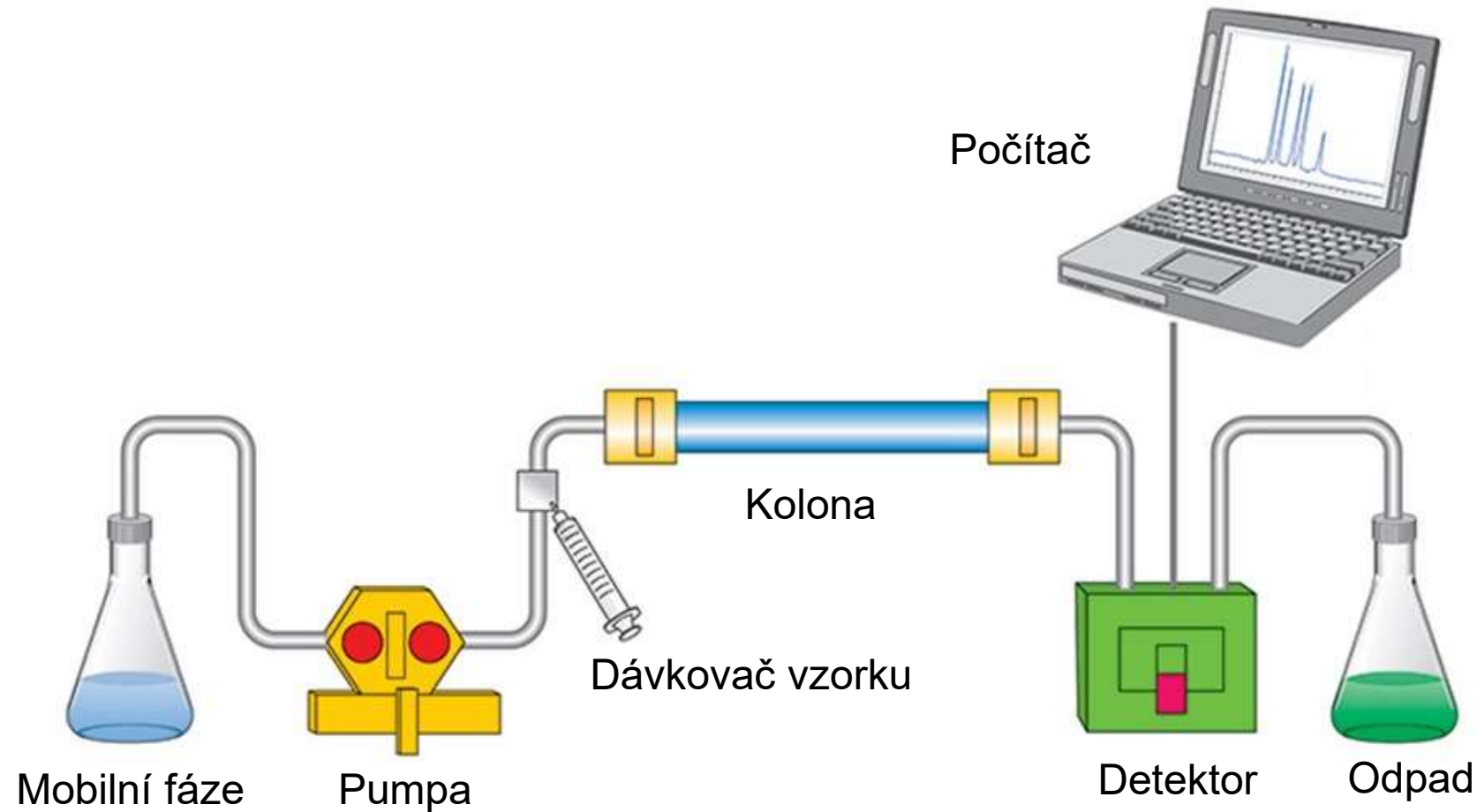
Katedra analytické chemie



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

Kapalinová chromatografie

Založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází.

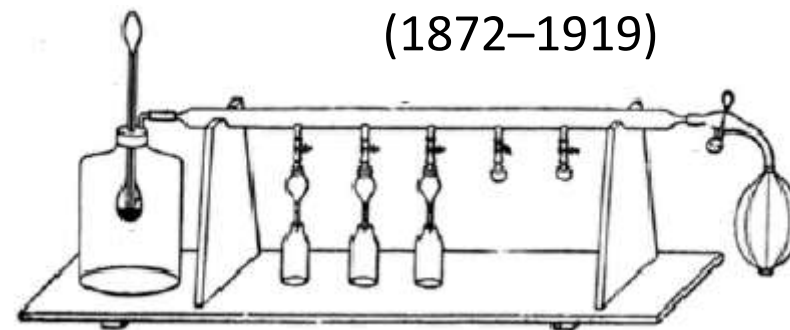


Počátek chromatografie

- objevitel chromatografie
- rusko-italský botanik
- separace rostlinných pigmentů (chlorofyly, xantofyly, karotenoidy)
- zrod chromatografie – 21. března 1903 zasedání Varšavské společnosti přírodních věd
- 1906 – první publikace „*Physikalisch-chemische Studie über das Chlorophyll. Die Adsorptionen*“ v časopise *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*



MICHAIL SEMJOVIČ CVĚT
(1872–1919)



separace na sloupci CaCO_3 , mobilní fáze petrolether

Kapalinová chromatografie

- Arne Wilhelm Kaurin Tiselius – definoval základní principy chromatografie a zavedl techniku gradientové eluce – 1948 Nobelova cena za chemii



Tiselius
(1902–1971)

- Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Synge – objev rozdělovací chromatografie – 1952 Nobelova cena za Chemii



Martin
(1910–2002)



Synge
(1914–1994)

Kapalinová chromatografie

- Csaba Horváth
 - považován za otce HPLC
 - zavedl pelikulární částice
 - vyvinul kapalinový chromatograf s kontrolou parametrů
 - přispěl k pochopení retence v RP-HPLC
 - jako první použil termín vysokoúčinná kapalinová chromatografie se zkratkou HPLC



Csaba Horváth
(1930–2004)

Kapalinová chromatografie – separační systémy

Separační systém:

- Micelární kapalinová chromatografie
- Afinity chromatografie
- Molekulová vylučovací chromatografie
- Chirální chromatografie
- Systém s reverzními fázemi
- Systém s normálními fázemi
- Ionově výměnná chromatografie
- Ionově párová chromatografie
- **Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC)**



HILIC

1990 Alpert – separace aminokyselin na polární stacionární fázi

A.J. Alpert, *Journal of Chromatography*, 499 (1990) 177-196.

1941 Martin a Synge – separace aminokyselin na silikagelové stacionární fázi

+ mobilní fáze: voda/chloroform

A.J. Martin, R.L. Synge, *Biochem J*, 35 (1941) 1358-1368.

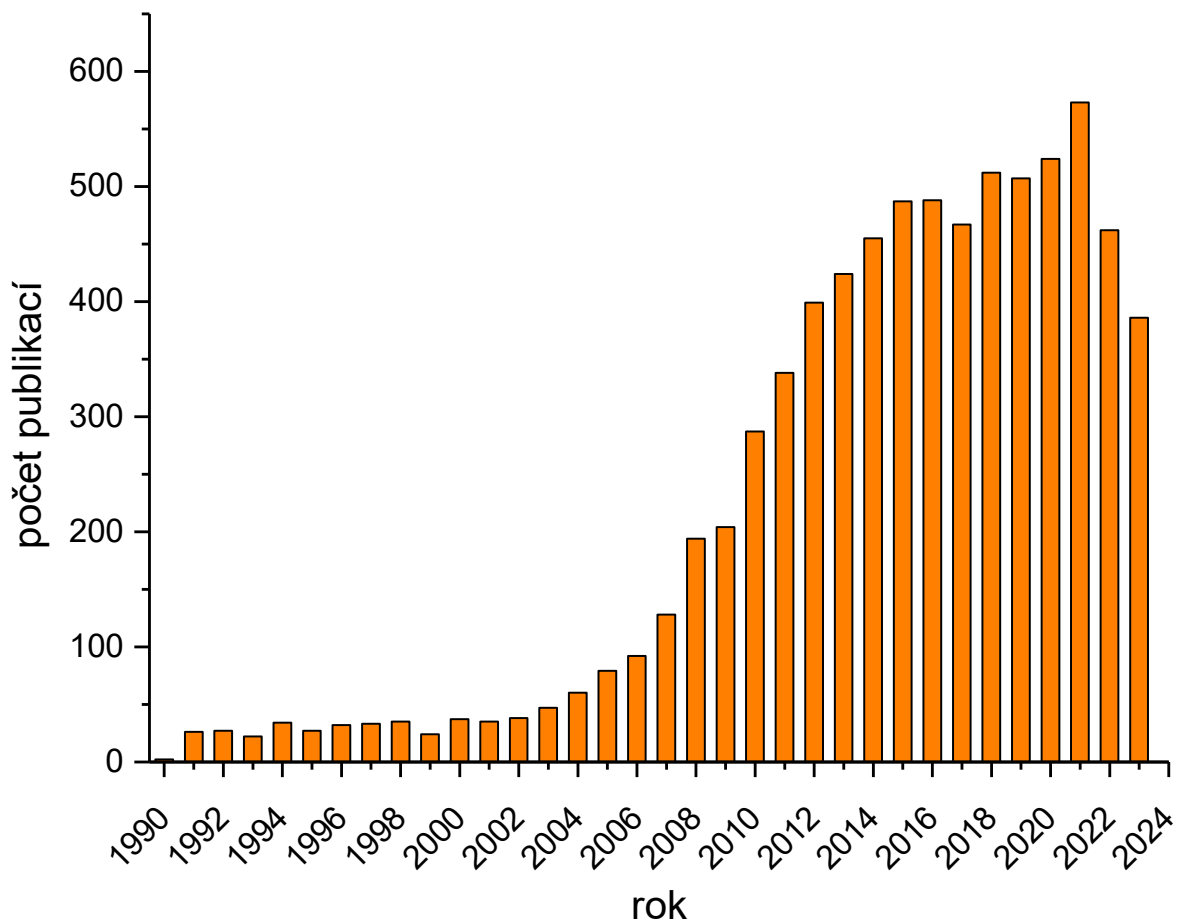
1975 Linden a Lawhead – separace sacharidů na aminopropylové stacionární fázi

+ mobilní fáze: voda/acetonitril

J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Journal of Chromatography*, 105 (1975) 125-133.



HILIC



Počet publikací v letech 1990–2022 obsahujících pojem „HILIC“, nebo „hydrophilic interaction liquid chromatography“, nebo „hydrophilic interaction chromatography“ podle databáze Web of Science ke dni 16.1.2024.

Stacionární fáze

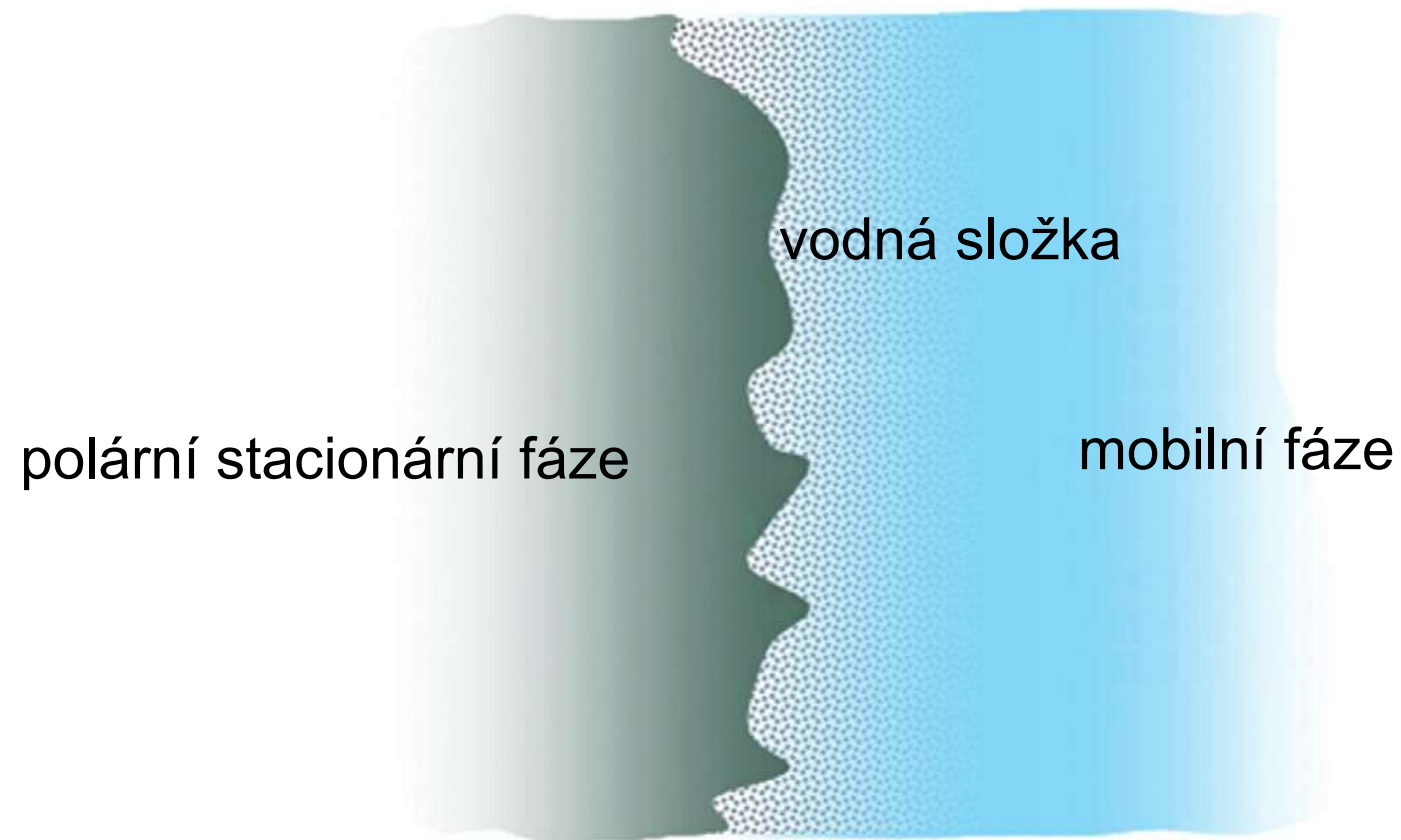
- polární – silikagel a modifikovaný silikagel

Mobilní fáze

- vodná složka (voda nebo pufr)
- organická složka - acetonitril

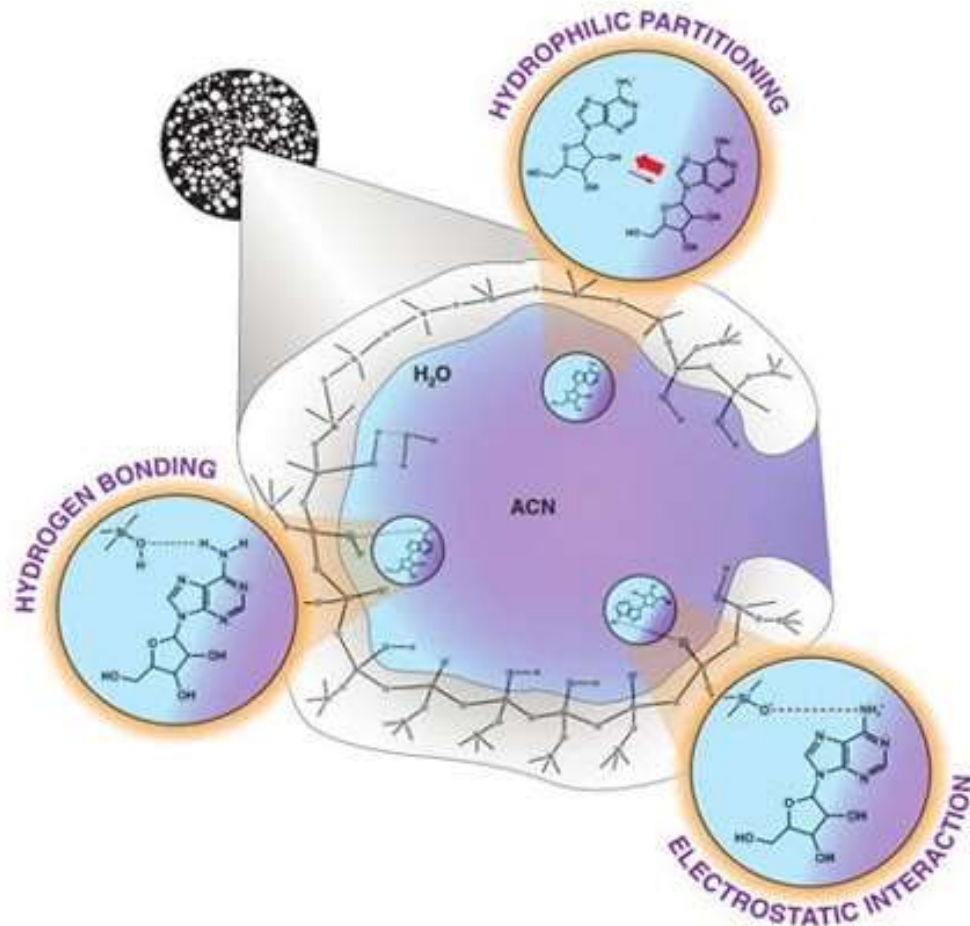
HILIC – separační mechanismus

Separáční mechanismus



HILIC – separační mechanismus

Separáční mechanismus



komplexn  separační mechanismus

- rozdělovací mechanismus
- interakce se samotnou stacionární fázou

HILIC – separační mechanismus

Charakterizace chromatografických systémů

- pochopení separačního procesu
- popis interakcí, které se uplatňují během separace zjednoduší/urychlí proces optimalizace chromatografických podmínek pro konkrétní skupiny analytů
- Waltersův test - silanolvá aktivita, $\alpha = k(N,N\text{-diethyl-}m\text{-toluamid})/k(\text{antracen})$
„hydrofobicita“, $\alpha = k(\text{antracen})/k(\text{benzen})$
- Engelhardtův test - stérická selektivita (pro CH_3), $\alpha = k(\text{ethylbenzen})/k(\text{toluen})$
index polarity, $\text{IP} = k(\text{anilin})/k(\text{fenol})$
- Tanakův test - „hydrofobicita“, $\alpha = k(\text{pentylbenzen})/k(\text{butylbenzen})$
stérická selektivita, $\alpha = k(\text{trifenylen})/k(\text{o-terfenyl})$
kapacita pro iontově-výměnné interakce, $\alpha = k(\text{benzylamin})/k(\text{fenol})$

HILIC – separační mechanismus

Model lineárních vztahů volných energií (LFER)

V - McGowanův charakteristický objem solutu (popisující hydrofobicitu)

A - proton-donorová schopnost analytu pro tvorbu H-vazby

B - proton-akceptorová schopnost analytu pro tvorbu H-vazby

S - dipolarita/polarizibilita (popisující interakce dipól-dipól)

E - schopnost analytu interagovat pomocí n- a π- elektronů

$$\log k = c + v.V + a.A + b.B + s.S + e.E$$

v - disperzní interakce

a - schopnost působit jako akceptor vodíku pro H-vazbu

b - schopnost působit jako donor vodíku pro H-vazbu

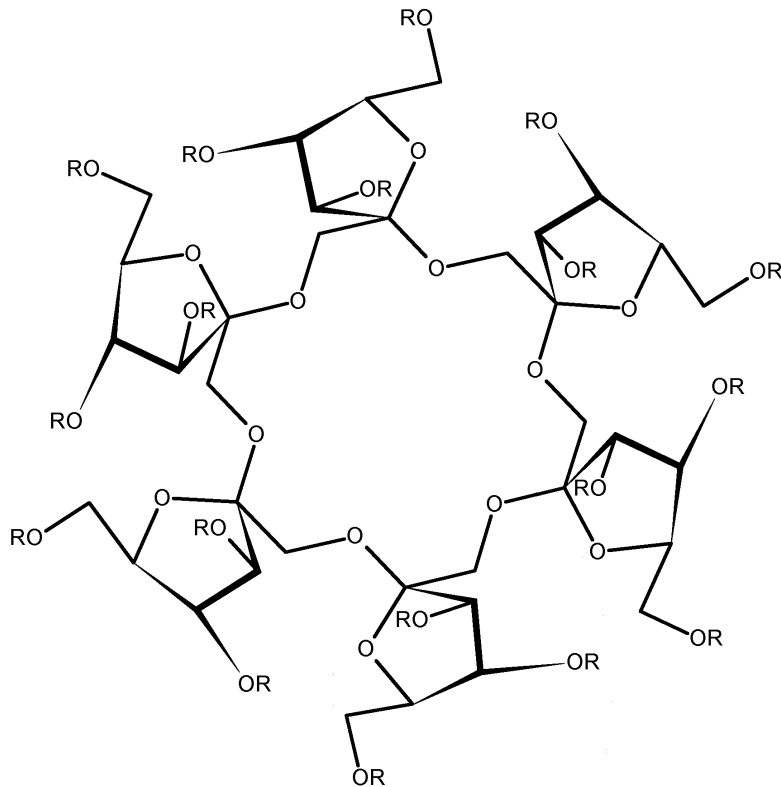
s - dipolarita/polarizibilita (schopnost fází účastnit se interakcí dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól)

e - interakce s n- a π- elektrony analytu



HILIC – separační mechanismus

Cyklofruktanové stacionární fáze



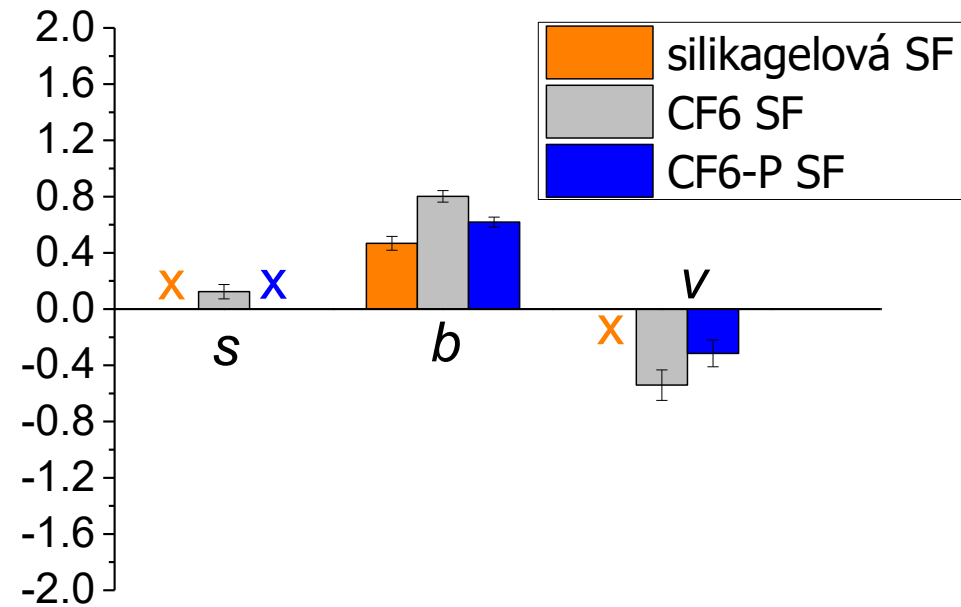
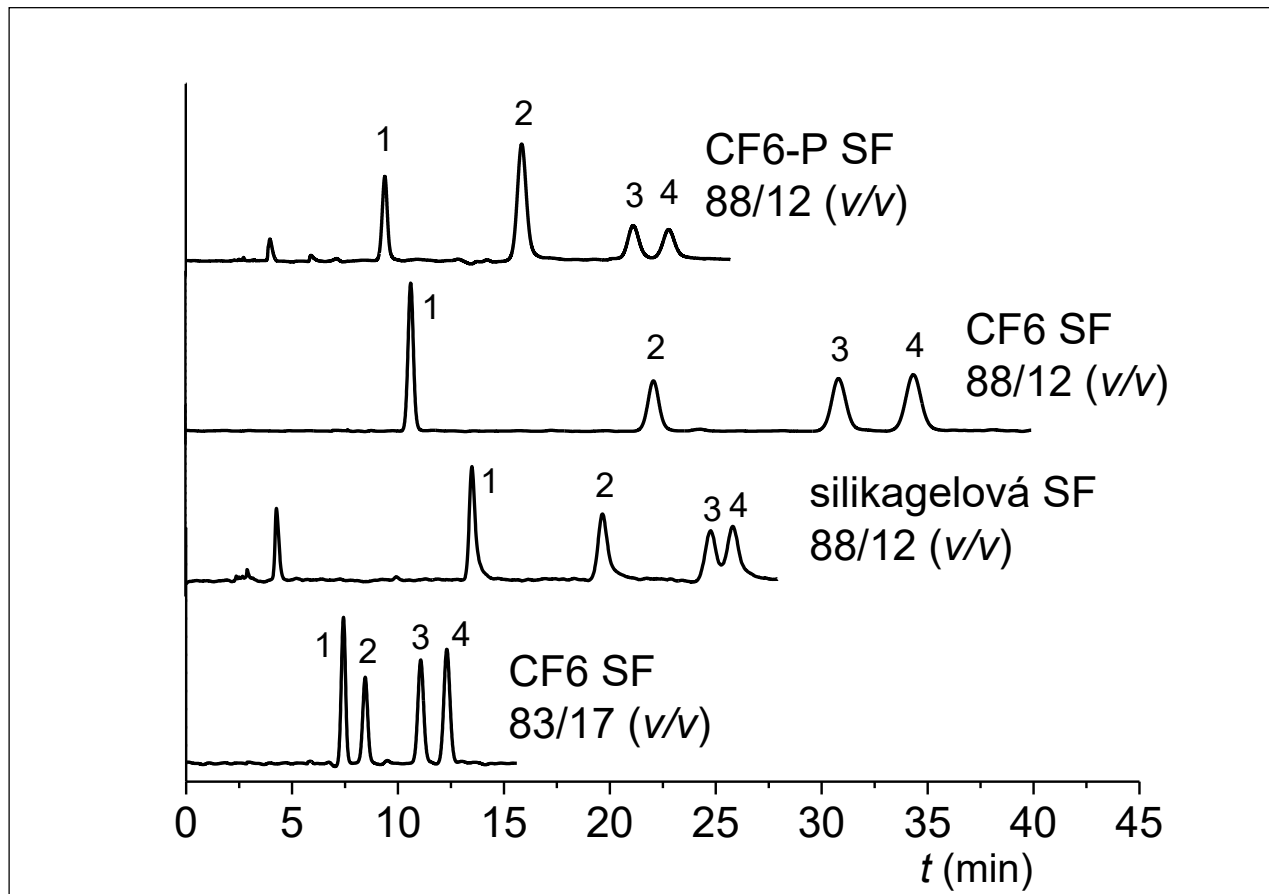
R = H nebo derivatizační skupina

- 2011 v HILIC
 - cyklické oligosacharidy
 - 6 - 8 D-fruktofuranosových jednotek
- 1) silikagelová SF (250 x 4,6 mm; 5 μ m)
 - 2) CF6 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) – nederivatizovaný cyklofruktan
 - 3) CF6-P (250 x 4,6 mm; 5 μ m) – cyklofruktan derivatizovaný izopropylými skupinami

HILIC – separační mechanismus

Cyklofruktanové stacionární fáze

ACN/20mM octan amonný (v/v), pH 4,00



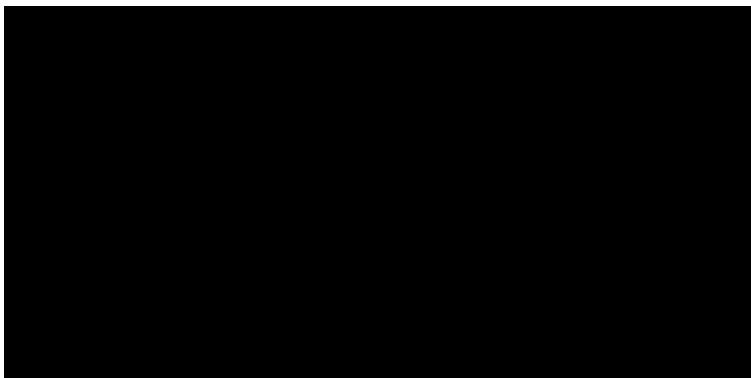
- 1 - leucin enkefalin amid
- 2 - [D-Ala²]leucin enkefalin
- 3 - leucin enkefalin
- 4 - [Met⁵]enkefalin

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie v analýze malých molekul



HILIC – analýza malých molekul

Stanovení alantoinu v lidském séru



- biomarker oxidativního stresu u lidí
- nízké koncentrace
- vysoká polarita
- nepřítomnost chromoforu pro UV detekci

Parametr	Alantoin
Lineární rozsah (μM)	0,05 – 100
LOD (μM)	0,0001
LLOQ (μM)	0,05
ULOQ (μM)	100
Denní správnost (RE, %), $n = 5$	± 4
Mezi denní správnost (RE, %), $n = 5$	± 6
Denní přesnost (RSD, %), $n = 5$	≤ 9
Mezi denní přesnost (RSD, %), $n = 5$	≤ 11
Výtěžnost (%), $n = 3$	99 – 100
Matriční efekt (%), $n = 6$	70 – 105

Podmínky metody	
Kolona	Acquity BEH Amide (100 \times 2,1 mm; 1,7 μm)
Složka A MF	Acetonitril
Složka B MF	0,1 % kyselina mravenčí
Eluce	Isokratická 90/10 (A/B, v/v)
Průtok MF	0,3 ml/min
Objem vzorku	2 μl
Teplota na koloně	30 °C
Teplota vzorku	5 °C
Detekce	QqQ (MRM mód)
Celková doba analýzy	4 minuty

Spolupráce s Revmatologickým ústavem a Neurologickou klinikou Všeobecné fakultní nemocnice



HILIC – analýza malých molekul

Stanovení pterinů v kutikule ploštic

- Výskyt: hmyz, obojživelníci, plazi, ryby a člověk
- Funkce: rozmanitá (např. podíl na různých buněčných procesech)
- Pigmenty hmyzu
 - erythropterin (červená)
 - leukopterin (bílá) → Funkce ochranná
 - xanthopterin (žlutá)
- Pigmenty hmyzu
 - vývojové stádium
 - roční období
 - lokalita a složení potravy



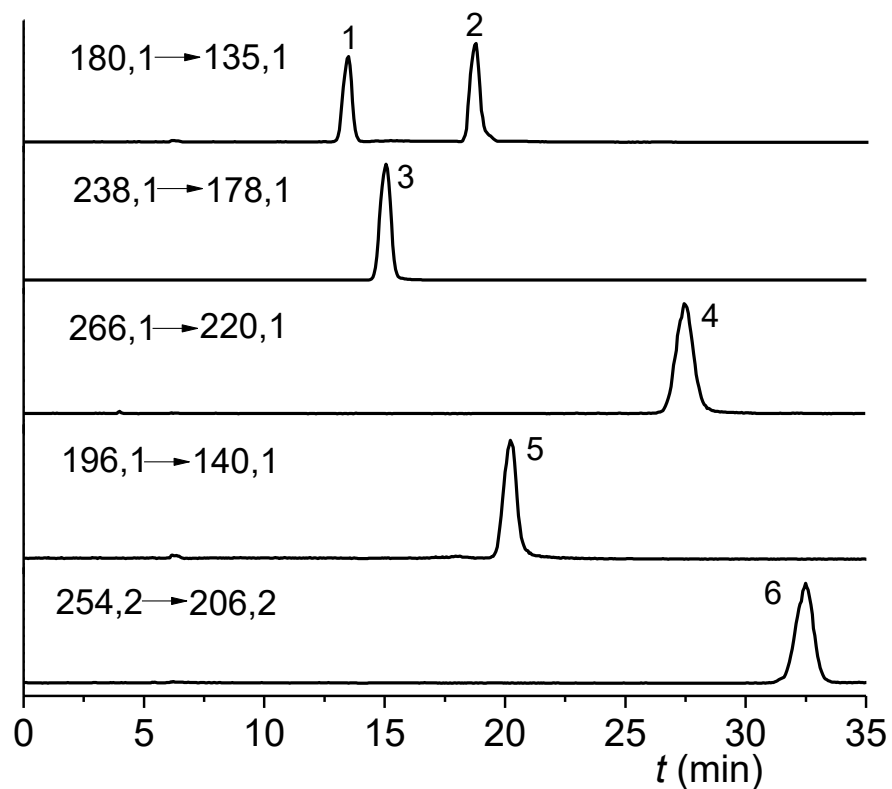
Graphosoma lineatum a
Graphosoma semipunctatum z
různých lokalit a v
různých vývojových
stádiích

Spolupráce s Katedrou zoologie PŘF UK – studium vztahu predátorů a ploštic



HILIC – analýza malých molekul

Stanovení pterinů v kutikule ploštic



Podmínky metody

Kolona	ZIC-HILIC (150 × 4,6 mm, 3,5 μm)
Složka A MF	Acetonitril
Složka B MF	5 mM octan amonný pH 6,8
Eluce	Isokratická 85/15 (A/B, v/v)
Průtok MF	0,5 ml/min
Objem vzorku	2 μl
Teplota na koloně	30 °C
Teplota vzorku	10 °C
Detekce	QqQ (MRM mód)
Celková doba analýzy	35 minut
Extrakční činidlo	dimethylsulfoxid

Chromatogramy separace standardů pterinů o koncentraci 625 ng/ml označení analytů: 1, isoxanthopterin 2, xanthopterin 3, biopterin 4, erythropterin 5, leukopterin 6, neopterin



Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie v glykoproteomické analýze



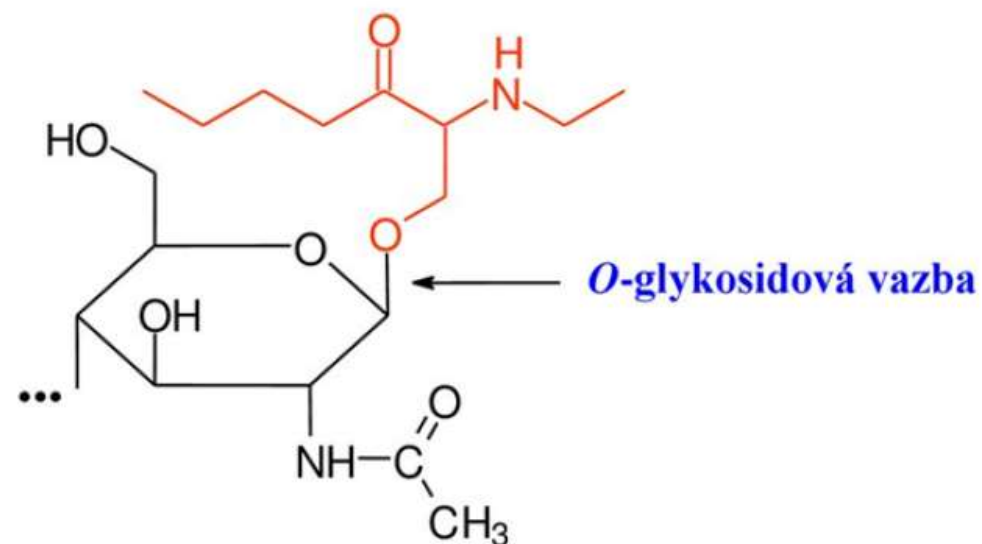
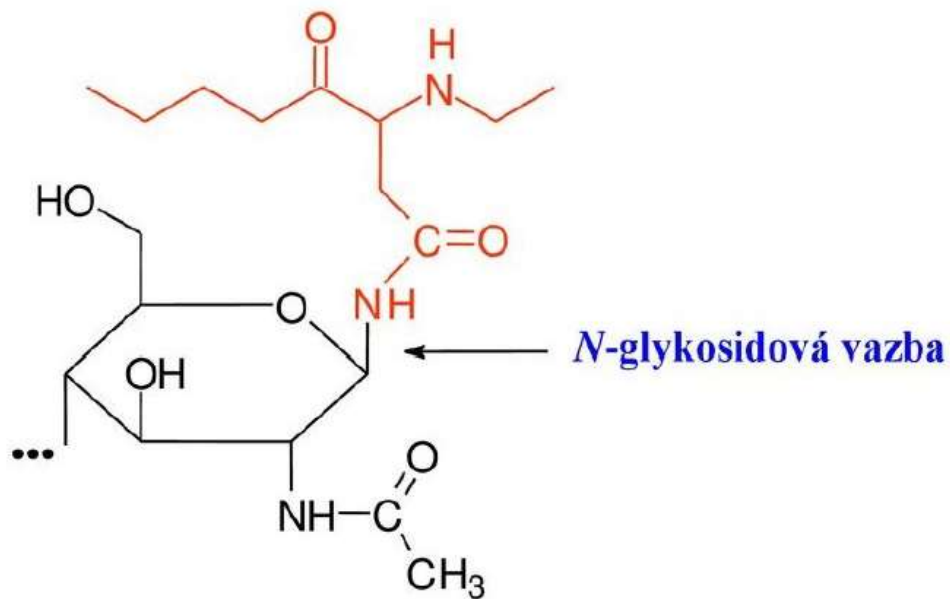
Glykoproteiny

- Proteiny modifikované oligosacharidovými řetězci
- Funkce v živých organismech
 - strukturní
 - transportní
 - ochranné
- Biomarkery řady různých onemocnění
- Bioléčiva

HILIC – glykoproteomická analýza

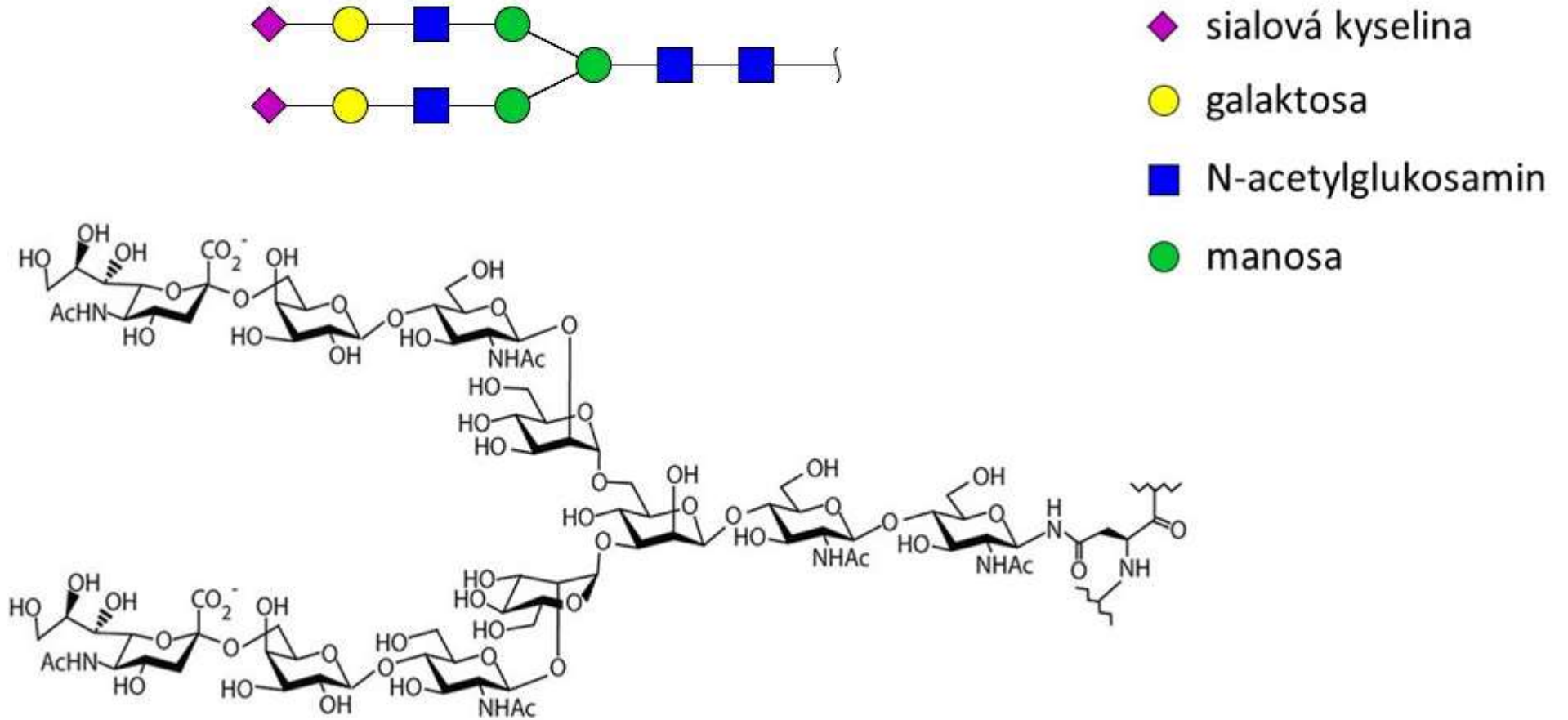
Glykoproteiny

- N-glykosylace – glykany vázány přes dusík na postranní řetězec asparaginu
- O-glykosylace – glykany vázány přes kyslík na postranní řetězec serinu nebo threoninu



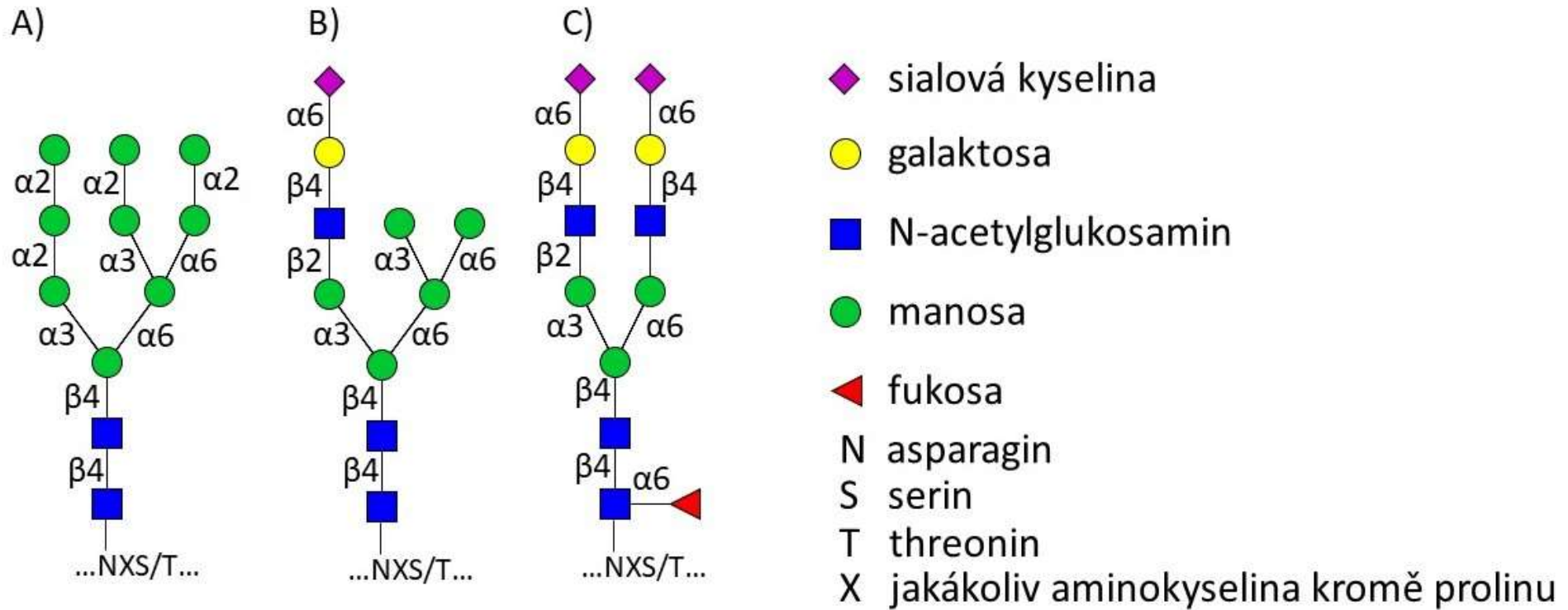
HILIC – glykoproteomická analýza

Glykoproteiny



HILIC – glykoproteomická analýza

Glykoproteiny



Základní typy N-glykanů: A) vysoce manosový B) hybridní C) komplexní

HILIC – glykoproteomická analýza

Glykoproteiny

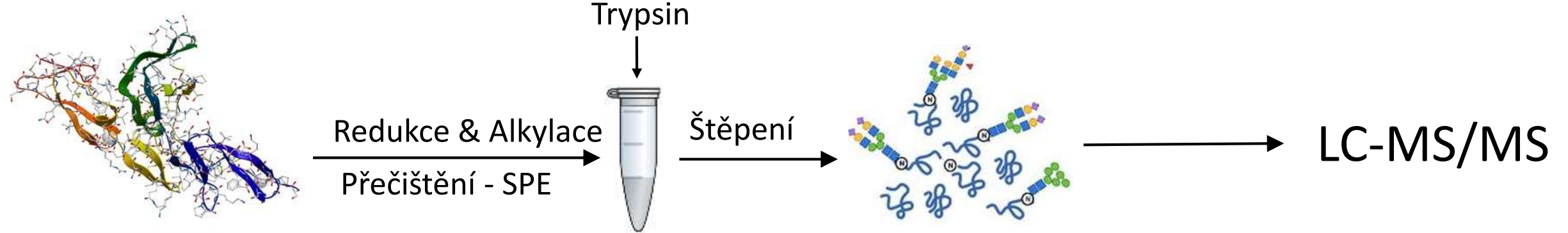
- mikroheterogenita X makroheterogenita



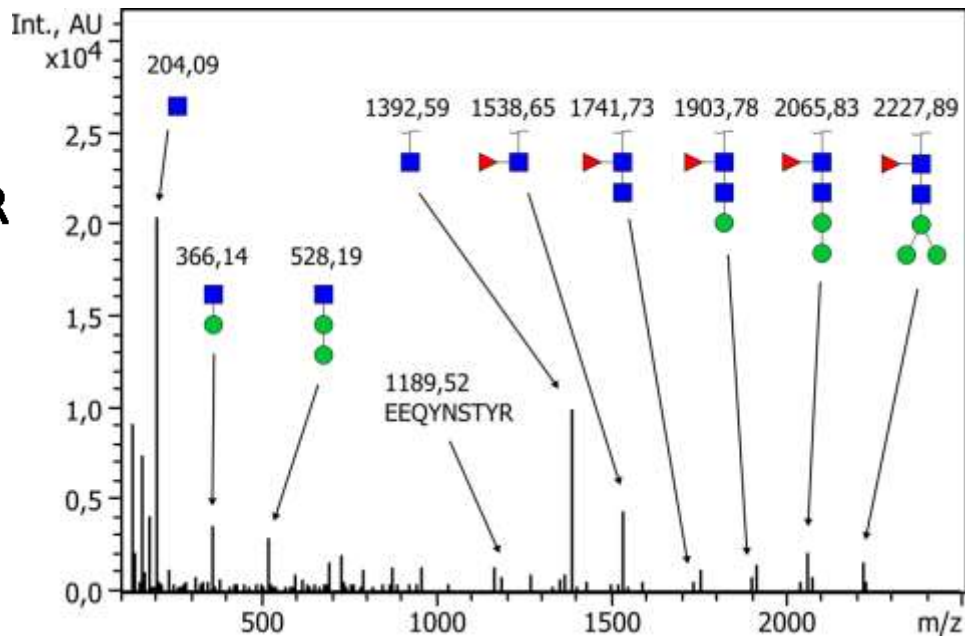
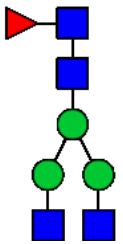
- nižší ionizační účinnost
- nízké koncentrace v komplexních směsích

HILIC – glykoproteomická analýza

Glykoproteiny



EEQYNSTYR



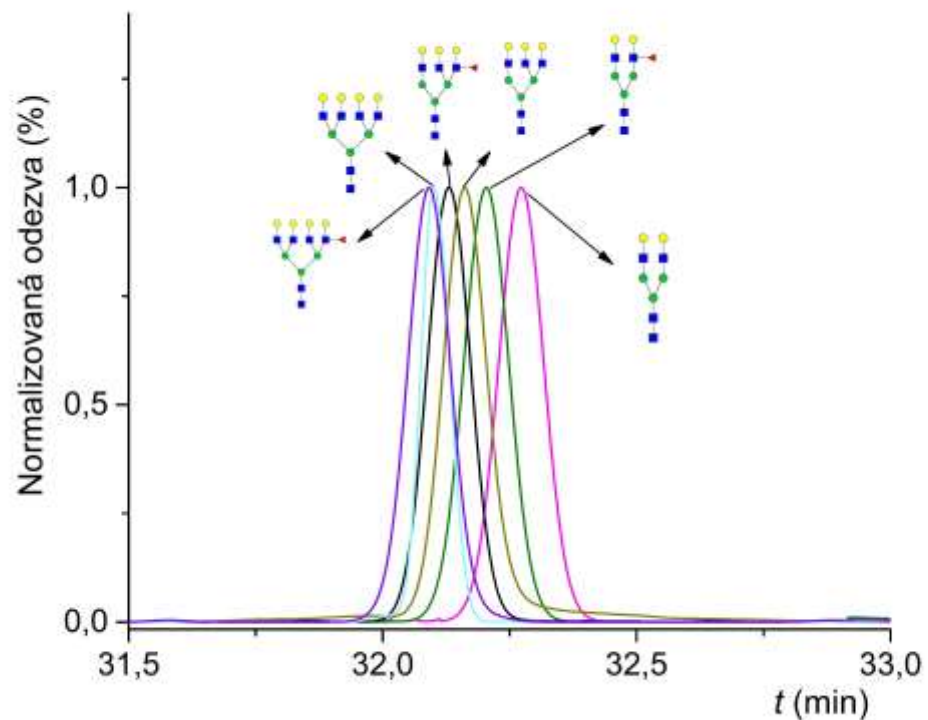
- prekurzor ve stavu 3+, $m/z = 878,68$
- kolizní energie 35-70 eV
- nižší ionizační účinnost
- nekompletní fragmentační spektra
- fragmentace ve zdroji
- migrace fukosy v plynné fázi

HILIC – glykoproteomická analýza

Haptoglobin: VVLHPNYSQVDIGLIK

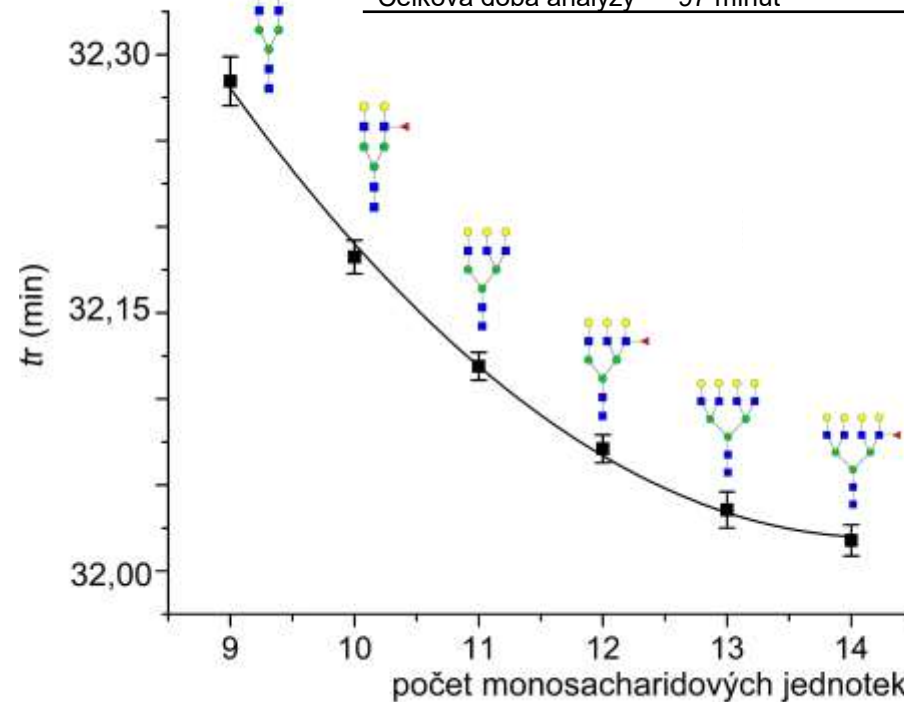
RP-HPLC mód: C18 SF

Nízké rozlišení



Experimentální podmínky

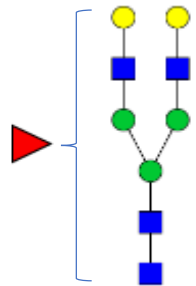
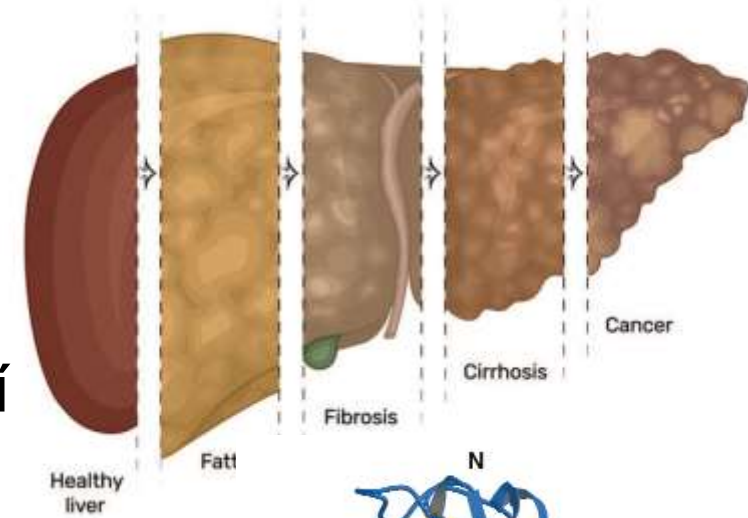
Kolona	Acquity UPLC Peptide BEH C18 (150 mm × 78 μm, 1,7 μm)
Složka A MF	Acetonitril s 0,1% kyselina mravenčí
Složka B MF	0,1% kyselina mravenčí
Eluce	Gradientová
Průtok MF	0,4 μl/min
Objem vzorku	1 μl
Teplota na koloně	40 °C
Teplota vzorku	10 °C
Detekce	QToF (Data-dependentní analýza)
Celková doba analýzy	97 minut



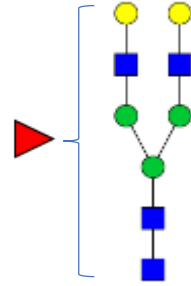
HILIC – glykoproteomická analýza

Analýza N-Glykopeptidů hemopexinu

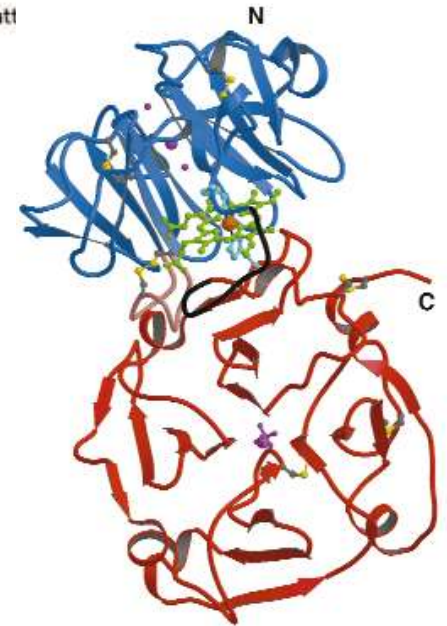
- plazmatická bílkovina vázající hem
- změna v rámci jaterního onemocnění
- možnost **neinvazivního** sledování progresu onemocnění
- klíčové pro určení prognózy a indikaci léčby



SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR



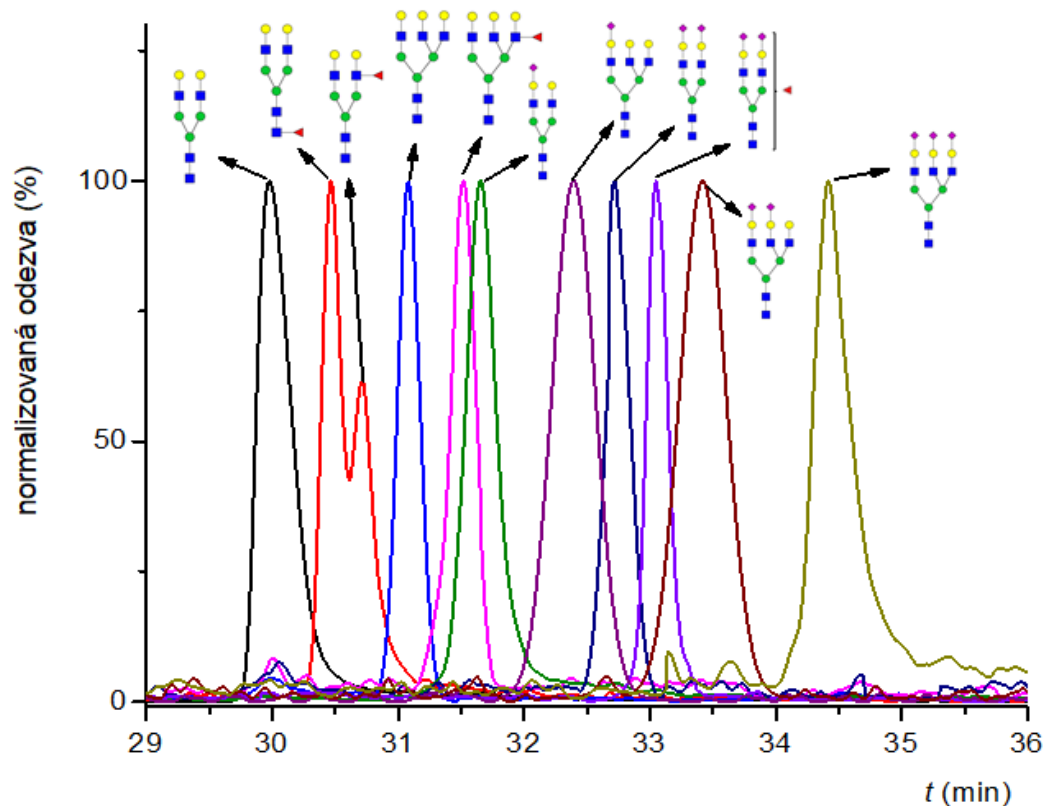
ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH



HILIC – glykoproteomická analýza

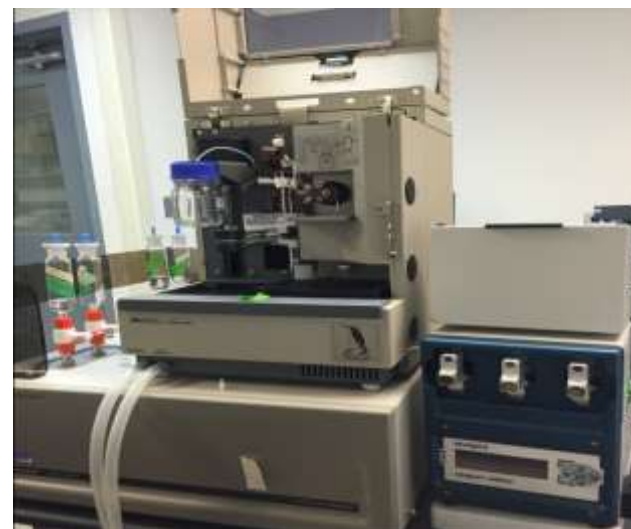
Analýza N-Glykopeptidů hemopexinu

SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR



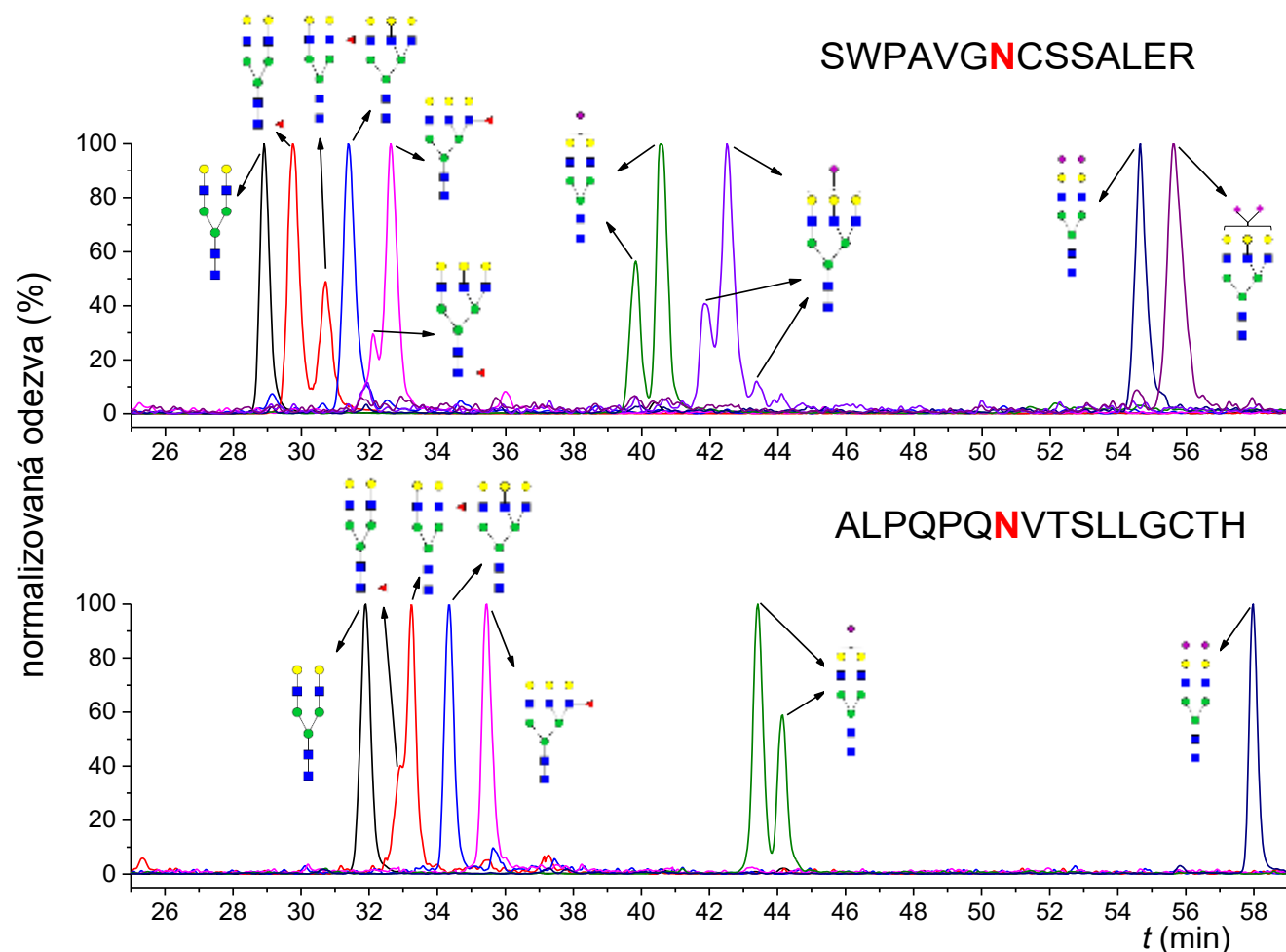
Experimentální podmínky

Kolona	HALO HILIC (150 mm × 75 μm, 2,7 μm)
Složka A MF	Acetonitril s 0,1% kyselina mravenčí
Složka B MF	2% acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí
Eluce	Gradientová
Průtok MF	0,5 μl/min
Objem vzorku	1 μl
Teplota na koloně	30 °C
Teplota vzorku	10 °C
Detekce	QTRAP (SRM)
Celková doba analýzy	90 minut



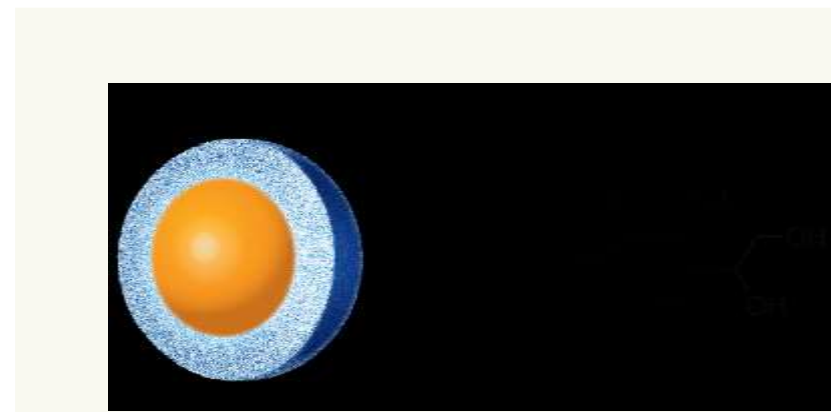
HILIC – glykoproteomická analýza

Analýza N-Glykopeptidů hemopexinu



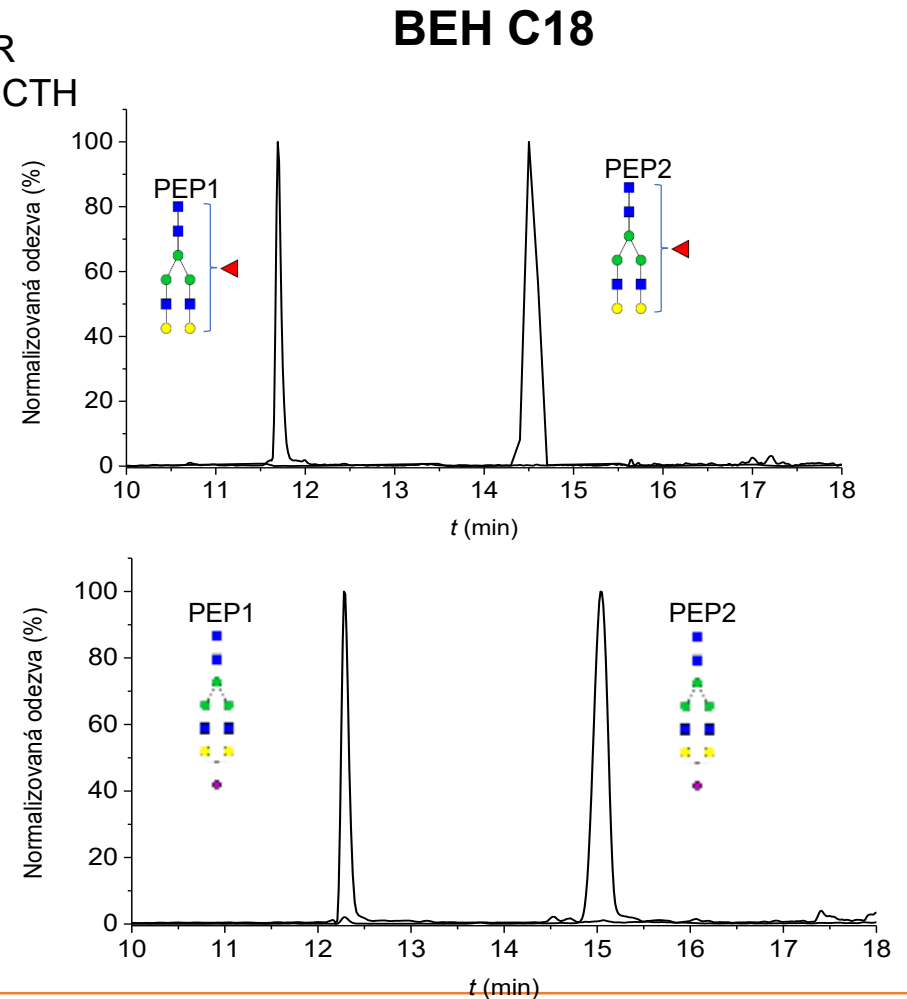
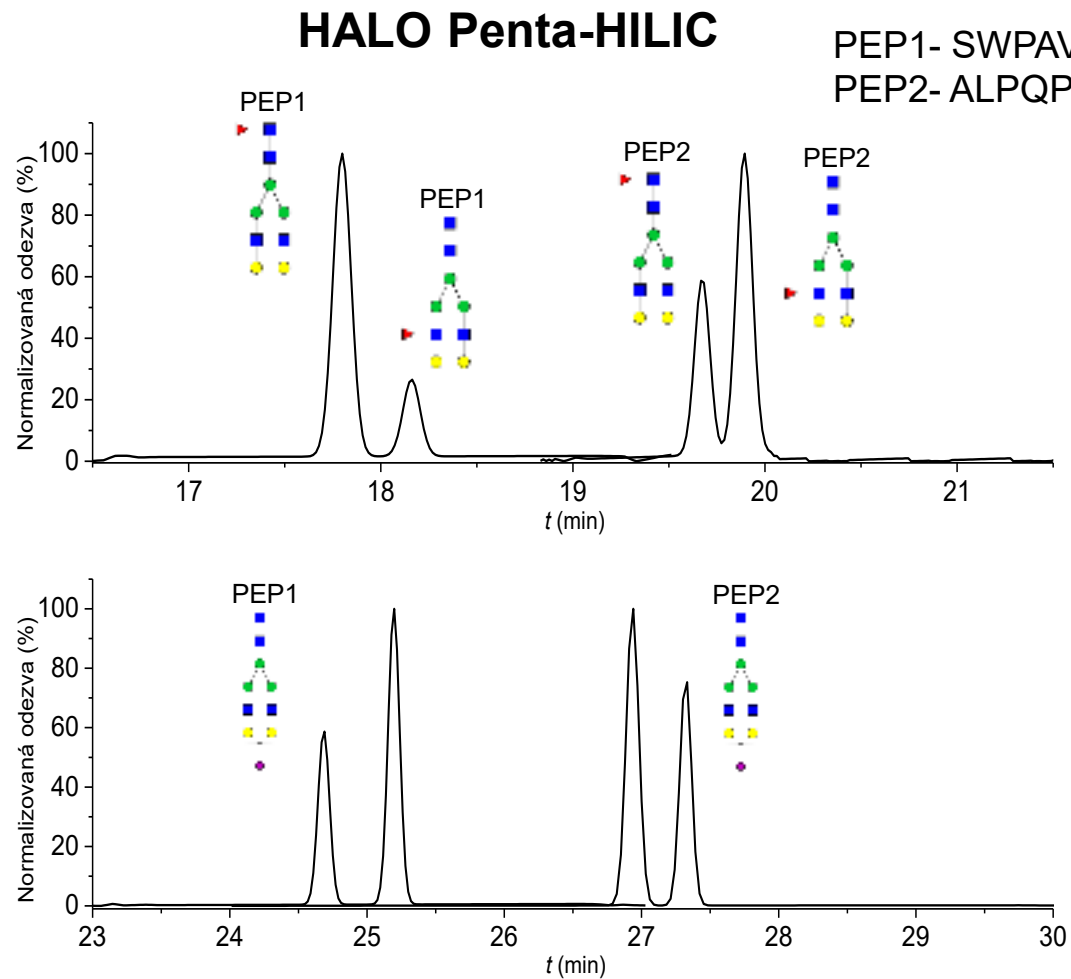
Experimentální podmínky

Kolona	HALO penta HILIC (150 mm × 75 μm, 2,7 μm)
Složka A MF	Acetonitril s 0,1% kyselina mravenčí
Složka B MF	0,1% kyselina mravenčí
Eluce	Gradientová
Průtok MF	0,4 μl/min
Objem vzorku	1 μl
Teplota na koloně	40 °C
Teplota vzorku	10 °C
Detekce	QTRAP (SRM)
Celková doba analýzy	90 minut



HILIC – glykoproteomická analýza

Analýza N-Glykopeptidů hemopexinu



HILIC – glykoproteomická analýza

Identifikace N-glykopeptidů - glykoproteomické programy



- porovnání dat s in-silico databází
- mnoho falešně pozitivních nebo negativních výsledků

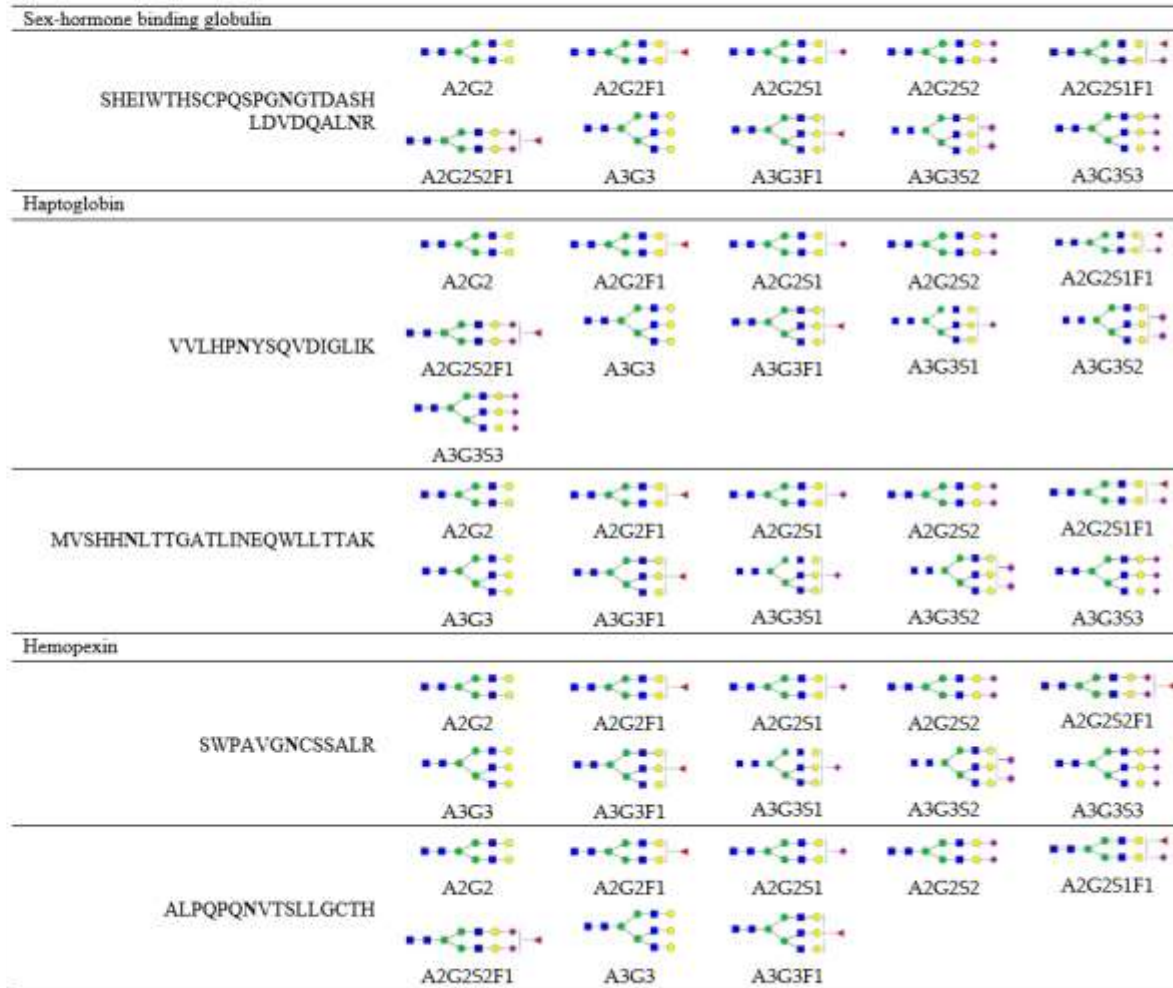
retenční chování glykopeptidů v HILIC = doplňující informace k MS/MS datům



snížení nesprávné identifikace glykopeptidů

HILIC – glykoproteomická analýza

Identifikace N-glykopeptidů



❖ HILIC

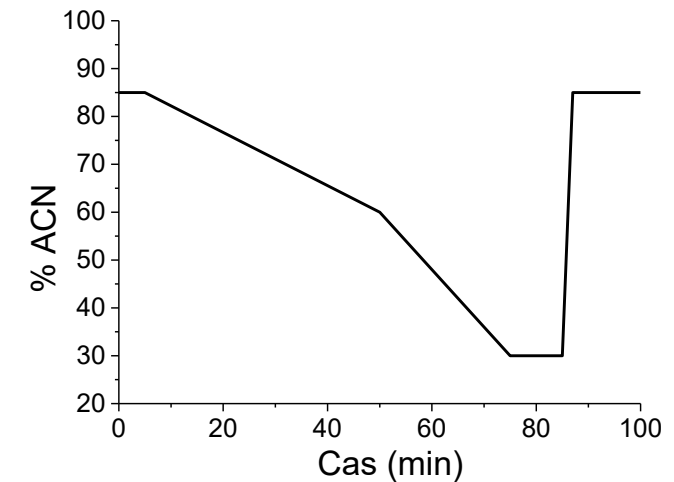
- Kolona:

- HALO Penta-HILIC (2,7 μm; 75 μm x 150 mm)

- Mobilní fáze:

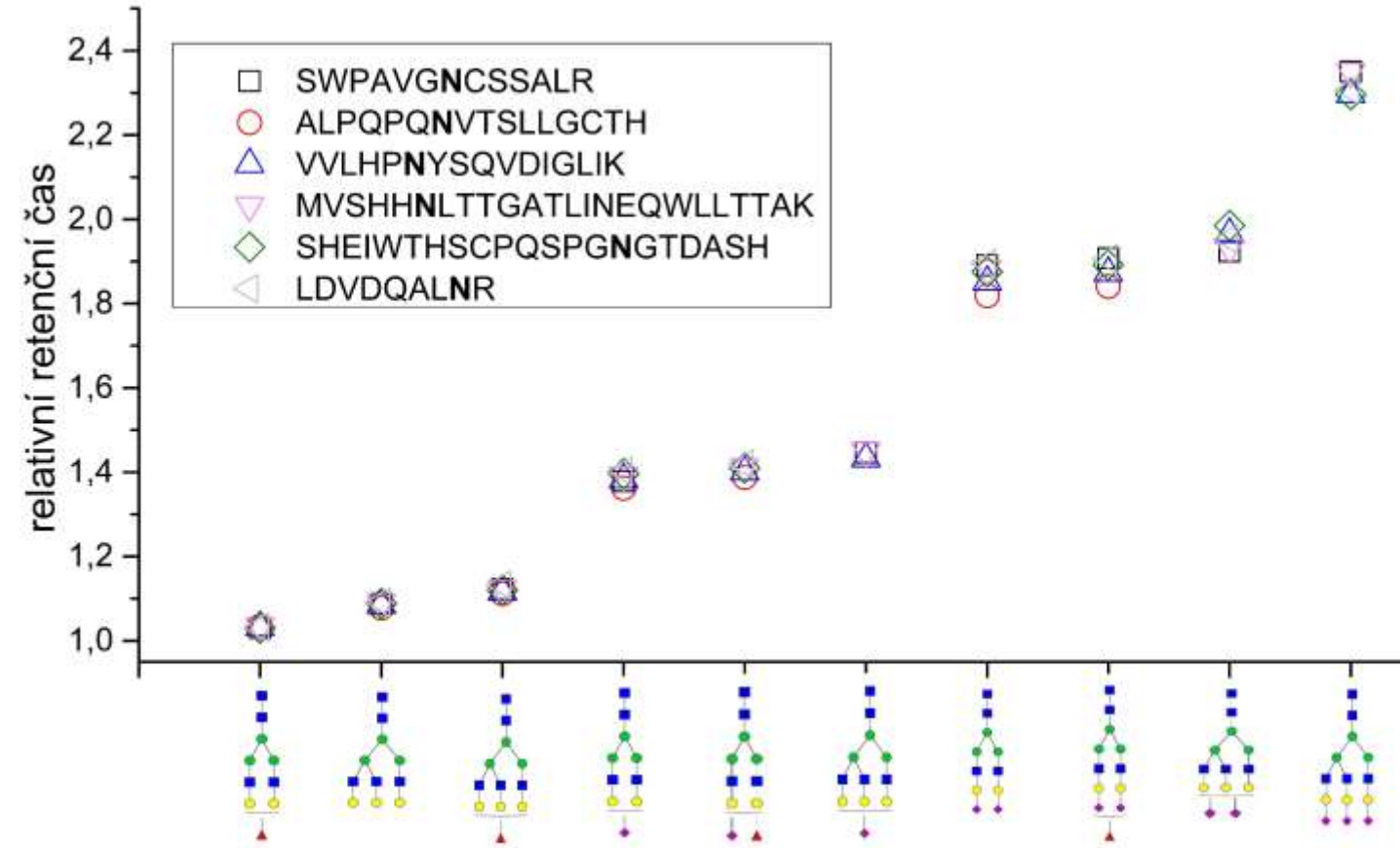
- A: H₂O s 0,1% HCOOH

- B: ACN s 0,1% HCOOH

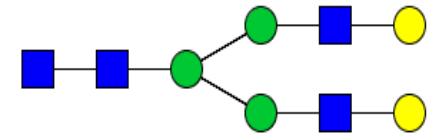


HILIC – glykoproteomická analýza

Identifikace N-glykopeptidů – koncept retenčních oken

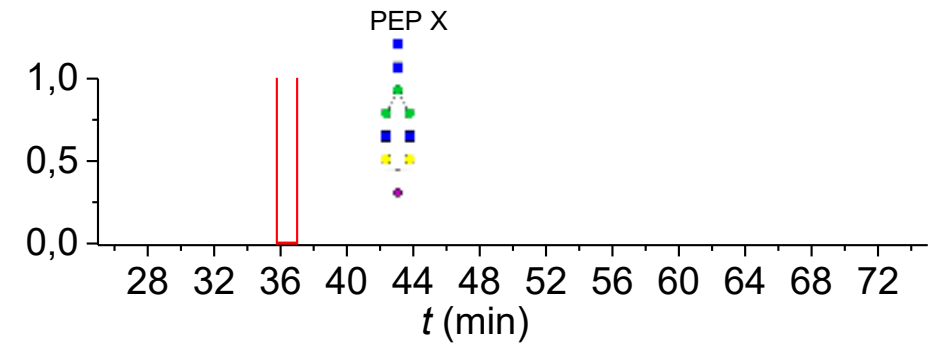


$$RRT = tr_x \text{ glykoforma} / tr_{A2G2}$$



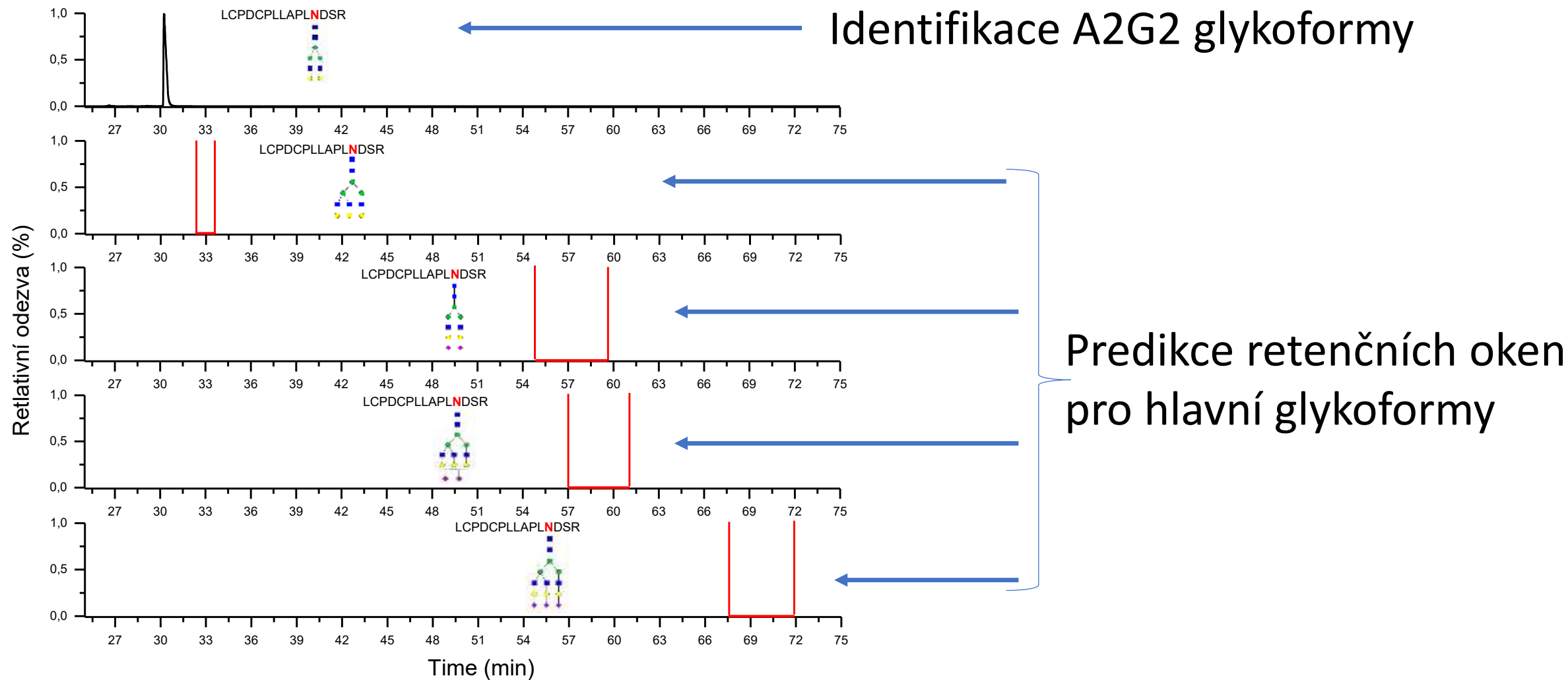
Horní a dolní limit: $RRT \pm 3 \times SD$

Určení retenčního okna



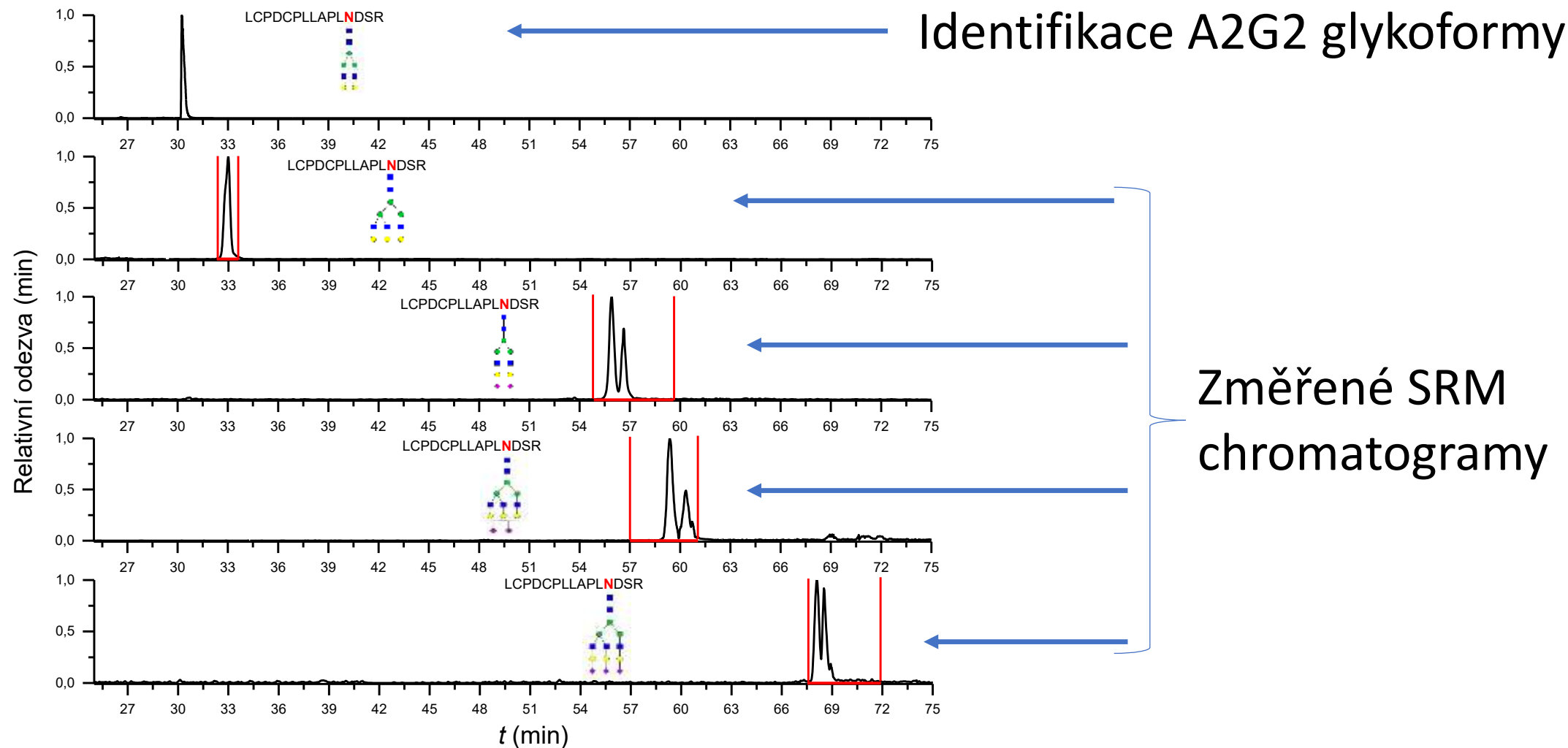
HILIC – glykoproteomická analýza

Predikce retenčních oken glykopeptidů v HILIC



HILIC – glykoproteomická analýza

Predikce retenčních oken glykopeptidů v HILIC



Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

- komplexní retenční mechanismus
- vhodný chromatografický mód pro polární látky
- potenciál v analýze glykoproteinů
 - velké rozlišení jednotlivých glykoformem + schopnost separovat isobarické isoformy
 - neinvazivní serologické HILIC metody ke sledování progresu různých onemocnění
 - predikce retenčních oken napomůže snížit falešné identifikace glykopeptidů
 - využití v charakterizaci bio-farmaceutik (kontrola výrobního procesu)

Děkuji za pozornost

