

МЕТАЛЛ-АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КАК МЕТОД СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

Шрейнер Е.В.^{1,2}, Гладилевич В.Д.^{1,2}, Кельцьева О.А.^{1,2}, Колоницкий П.Д.³, Ефремов
Т.А.¹, Струков М.К.³, Александрова М.Л.¹, Селютин А.А.³, Суходолов Н.Г.³, Подольская
Е.П.^{1,2}

¹-Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт
токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, ул.
Бехтерева д.1, (812) 365-06-80, e-mail: shreyner.ekaterina@gmail.com;

²-Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, ул. Ивана
Черных д.31-33, (812) 363-0719;

³-Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург,
Университетская набережная д.7-9, (812) 328-20-00

Резюме: Работа посвящена исследованию возможности применения металл-аффинной хроматографии для специфичной экстракции глифосата, аминометилфосфоновой кислоты, пиримикарба, феназепама из водных растворов и плазмы крови крыс. В работе были использованы ранее разработанные два типа металл-аффинных сорбентов на основе пленок Ленгмюра-Блоджетт и нанодисперсных оксидов, содержащих ионы Fe(III), Cu(II), Ni(II). Показано, что данный метод позволяет проводить эффективную пробоподготовку при количественном анализе водорастворимых токсичных веществ, обладающих активными функциональными группами.

Ключевые слова: металл-аффинная хроматография, пленки Ленгмюра-Блоджетт, нанодисперсные оксиды, токсичные вещества.

METAL-AFFINITY CHROMATOGRAPHY AS A METHOD SPECIFICITY EXTRACTION OF HARMFUL CHEMICALS AND THEIR DERIVATIVES FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS AND BIOLOGICAL SOLUTION

Shreyner E.V., Gladilovich V.D., Keltcieva O.A., Kolonitskyi P.D., Efremov T.A.,
Strukov M.K., Alexandrova M.L., Selutin A.A., Suhodolov N.G., Podolskya E.P.
*Federal State Institution of Science "Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological
Agency"*

Institute for Analytical Instrumentation RAS

St. Petersburg State University

Abstract: The work is devoted to research the possibility of using metal-affinity chromatography for specific extraction of glyphosate, aminomethylphosphonic acid, pirimicarb, fenazepam from aqueous solutions and blood plasma of rats. In work we have used the previously developed two types of metal-affinity sorbents based on Langmuir-Blodgett films and nanosized oxide containing ions of Fe (III), Cu (II), Ni (II). It is shown that this method allows efficient sample preparation in quantitative analysis of water-soluble toxic substances with active functional groups.

Key words: metal-affinity chromatography, Langmuir-Blodgett films, nanosized oxide, toxic substances.

Введение

При решении огромного количества токсикологических задач особое место занимает аналитическая химия, в которой, значительное внимание уделяют высокоспецифичным и высокоселективным методам пробоподготовки для выделения органических соединений из биологических сред и объектов окружающей среды.

Например, к таким методам относятся аффинная, лигандобменная и металл-аффинная хроматографии. В последние годы интенсивное развитие получила металл-аффинная хроматография, в основе которой лежит различное сродство гетероатомов органических соединений к ионам металлов [1].

В настоящее время известны два типа сорбентов для металл-аффинной хроматографии:

а) металл-хелатные на основе ионов металлов (Fe^{3+} , Ga^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), хелатированных полидентантными лигандами, иммобилизованными на вспомогательной подложке;

б) металл-оксидные на основе оксидов металлов, чаще всего в виде свободных нанопорошков, либо связанные на инертном носителе [2].

Недавно нами были разработаны два новых типа стационарных фаз для МАХ, содержащие в своем составе ионы металлов. Первая структура представляет собой коллапсированные мономолекулярные слои, полученные по методу Ленгмюра-Блоджетт, в которых поверхность состоит преимущественно из ионов металлов, надежно связанных с поверхностью твердого тела [3]. Структура нами была отнесена к металл-хелатным сорбентам (МХС). Второй тип структуры - нанодисперсный оксид металла (металл-оксидный сорбент, МОС), полученный золь-гель методом с совместным

самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, позволяющим получать высокопористые нанодисперсные структуры [4].

К сожалению, на сегодняшний день практически единственным применением МАХ являются протеомные исследования [5]. Одной из наиболее важных областей применения МАХ является очистка рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности металлов (Cu, Ni и т.д.) к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина [6]. На этом же принципе основывается и использование МАХ в иммуно-ферментном анализе [7]. Кроме того, МАХ на сорбентах, содержащих железо, титан, цирконий является основным методом пробоподготовки при исследованиях фосфопротеома [8].

Тем не менее, универсальность метода МАХ, основанная на вариабельности металла, входящего в состав сорбента, позволяет расширить возможности этого метода, так как дает возможность регулировать сродство сорбента к различным веществам, при этом значительно возрастает специфичность разделения по сравнению с другими методами. Разнообразие свойств металл-аффинных сорбентов должно позволить решать большое число задач при анализе токсичных веществ.

Материалы и методы

Металл-аффинная хроматография на МХС и МОС, содержащих ионы Ni(II), Cu(II) и Fe(III)

В микропробирку поместили 100 дм³ МХС или 2,2 мг МОС, промыли 100 мкл 0,1 % водного раствора трифторуксусной кислоты, супернатант после центрифугирования 4 минуты при 4000 об/мин отбросили. После этого в пробирку с сорбентом добавили 100 мкл раствора токсичного и оставили на 15-30 минут при постоянном перемешивании, после чего пробирку центрифугировали 4 минуты при 4000 об/мин, супернатант отобрали в чистую пробирку. Последовательное элюирование проводили набором элюентов и их различной комбинацией: 100 мкл 0,4 М водного раствора аммиака, 100 мкл 0,5% водного раствора пиперидина, 0.1% трифторуксусной кислотой (ТФУ) в ацетонитриле (MeCN), 15% перфтороктансульфоновой кислоты (ПФОС) в 0.5% пиперидине. Фракции после центрифугирования 4 минут при 4000 об/мин отбирали в чистые пробирки. Количественный анализ проводили методами, которые указаны в таблице 2.

Результаты

Для исследования возможности применения метода МАХ для специфичной экстракции токсичных веществ нами были получены две сорбента с разными типами

структур, каждый из которых имеют свои преимущества. Для сорбентов на основе ПЛБ характерна гладкая поверхность, которая преимущественно состоит из ионов металла, что делает данную структуру сверхдоступной для молекул аналита. Кроме того, в отличие от классического металл-хелатного сорбента (МХС), металл ковалентно связан с подложкой и не переходит в раствор в процессе анализа.

Второй сорбент по типу структуры относится к металл-оксидным сорбентам (МОС). Однако в отличие от большинства классических сорбентов этого типа благодаря особенностям условий синтеза представляет собой нанодисперсную пористую структуру с высокой удельной поверхностью.

Таким образом, для трех металлов (Fe(III), Ni(II), Cu(II)) были получены оба вида сорбентов. Данные металлы относятся к наиболее часто используемым в классической металл-аффинной хроматографии (таблица 1).

В соответствии с теорией Пирсона нами был выбран ряд токсичных веществ, содержащих функциональные группы, предположительно имеющие сродство к металлам, входящим в состав полученных сорбентов.

Во всех случаях сорбцию проводили в кислой среде (pH 2), для десорбции вещества с сорбента использовали метод последовательного элюирования различными растворителями, которые либо относятся к активным донорам (раствор аммиака, пиперидина), либо содержат добавки, сродство которых к металлам много выше, чем у аналита.

Типы сорбентов, аналитов, виды матрицы, а также условия элюирования, метод количественного анализа и степень извлечения сведены в таблицу 2.

Как показано в таблице, для ряда соединений степень извлечения аналитов из воды превышало 70%, что является хорошим показателем для данного метода.

Таблица 1 – Типы сорбентов

Сорбент		Изоэлектрическая точка	Специфичность к атомам	Классическое использование в МАХ
Fe	МОС (Fe ₂ O ₃)	5,5 ед. pH	O, F	фосфопротеомика
	МХС (ПЛБ Fe(III))	3,6 ед. pH		
Ni	МОС (NiO)	6,5 ед. pH	N, O, Cl, Br	очистка рекомбинантных белков
	МХС (ПЛБ Ni(II))	3,5 ед. pH		
Cu	МОС (CuO)	5,5 ед. pH	N, O, Cl, Br	очистка рекомбинантных белков
	МХС (ПЛБ Cu(II))	3,9 ед. pH		

Таблица 2 – Анализ ряда токсичных соединений с помощью методов МАХ

сорбент	вещество (гетероатом)	матрица	набор элюентов	метод колич. анализа	степень извлечения, %
МХС ПЛБ Ni(II)МОС (NiO)/	глифосат (N,O)	вода	0.4 М аммиак	АЭС-ИСП	93%/70%
	аминометилфосфоновая кислота (N,O)	вода	0.4 М аммиак	АЭС-ИСП	96%/82%
	феназепам (N)	вода	0.1% ТФУ в МеСN, 0.5% пиперидин	ВЭЖХ-УФ	65%/53%
		плазма крови крыс	0.1% ТФУ в МеСN, 0.5% пиперидин		51%/55%
	пиримикарб (N)	вода	0.1% ТФУ в МеСN, 0.5% пиперидин	ВЭЖХ-УФ	76%/72%
		плазма крови крыс	0.1% ТФУ в МеСN, 0.5% пиперидин		42%/40%
	дильдрин (Cl)	вода	0.4 М аммиак, 15% ПФОС в 0.5% пиперидине	ГХ	75%/85%
		плазма крови крыс	0.4 М аммиак, 15% ПФОС в 0.5% пиперидине		71%/72%
МОС (CuO)/	глифосат (N,O)	вода	0.4 М аммиак	АЭС-ИСП	93%/85%
	аминометилфосфоновая кислота (N,O)	вода	0.4 М аммиак	АЭС-ИСП	85%/82%

МХС ПЛБ Cu (II)					
МХС	пептид SSNGHV(pY)EKLSSI (a/к остаток Y)	вода	0.1% ТФУ, 0.5% пиперидин, MeCN	ВЭЖХ- МС	74%/82%
МХС ПЛБ Fe (III)МОС (Fe ₂ O ₃)/	пептид YKVPQLEIVPN(pS)AEER (a/к остаток S)	вода	0.4 М аммиак, 0.5% пиперидин, 0.015% ПФОС в 0.5% пиперидине	ВЭЖХ- МС	78%/81%
	пептид SR(pT)P(pS)LPTPPTREPК (a/к остаток S и Y)	вода	0.4 М аммиак, 0.5% пиперидин, 0.015% ПФОС в 0.5% пиперидине	ВЭЖХ- МС	51%/64%

Примечание. АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, ГХ – газовая хроматография, ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Заключение

Таким образом, в результате работы было показано, что метод металл-аффинной хроматографии как на металл-хелатных, так и на металл-окисдных сорбентах может быть эффективно использован при пробоподготовке для качественного и количественного анализа водорастворимых токсичных веществ, обладающих активными функциональными группами. Метод отличается простотой, невысокой стоимостью расходных материалов, высокой эффективностью и имеет широкие перспективы в токсикологическом анализе.

Литература

1. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Metalchelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation // *Nature*. – 1975. – V. 258. – P. 598– 599.
2. Block H., Maertens B., Spriestersbach A. et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review // *Methods Enzymol.* – 2009. – V. 463. – P. 439–473.
3. Кельцьева О.А., Гладилович В.Д., Прусаков А.Н. и др. Регулярные мультимолекулярные сорбенты (РММС). Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // *Научное приборостроение*. – 2012. – Т. 22 – № 4. – С. 50–55.
4. А. А. Селютин, П. Д. Колоницкий, Н. Г. Суходолов, Е. В. Шрейнер, Н. В. Краснов, Е. П. Подольская Синтез и характеристика нанорегулярных сорбентов на основе оксида циркония // *Научное приборостроение*. – 2013. – Т. 23. – № 1 – С. 115–122.
5. Sun X., Chiu J.-F., He Q.-Y. Application of immobilized metal affinitychromatography in proteomics // *Expert Rev. Proteomics*. – 2005. – V. 2. – P. 649–657.
6. Mateo C., Fernandez-Lorente G., Pessela B.C.C. et al. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions // *J. Chromatogr. A*. 2001. – V. 915. – P. 97–106.
7. Knecht S., Ricklin D., Eberle A.N., Ernst B. Oligohistags: Mechanisms of binding to Ni²⁺ -NTA surfaces // *J. Mol. Recognit.* – 2009. – V. 22. –P. 270–279.
8. Posewitz M.C., Tempst P. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71 –N 14. – P. 2883–2892.