

VYUŽITIE AFINITNEJ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH IÓNOCH KOVU NA ANALÝZU VZORIEK ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA

RADOSLAV HALKO a MILAN HUTTA

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava

halko@fns.uniba.sk, hutta@fns.uniba.sk

Došlo 18.5.11, prepracované 20.9.11, prijaté 27.10.11.

Kľúčové slová: separácia, afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu, organické ligandy, humínové látky, vzorky životného prostredia

Obsah

1. Úvod
2. Afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu
 - 2.1. Separačný princíp
 - 2.2. Nepohyblivá fáza
3. Aplikácie afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu na analýzu vzoriek životného prostredia
 - 3.1. Organické ligandy
 - 3.2. Humínové látky
4. Záver

1. Úvod

Afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu (IMAC, Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), nazývaná tiež aj „chelátové sorbenty v afinitnej chromatografii“, je špeciálnym typom afinitnej chromatografie^{1–6}. Pod IMAC je možné ako špecifickú aplikáciu zahrnúť aj niektoré typy ligandovo-výmennej chromatografie chirálnych ligandov^{7,8}. Princíp IMAC je založený na špecifických interakciách stanovovanej látky alebo jej špecifických interakčných miest (funkčne analytických skupín) s iónmi kovu naviazanými na nepohyblivú (stacionárnu) fázu. Toto vzájomné pôsobenie medzi naviazanými iónmi kovu a povrchom separovanej látky je využité na adsorpciu a po malej zmene separačných podmienok na následnú desorpciu látky z nepohyblivej fázy, t.j. má reverzibilný charakter⁹.

Prvé teoretické základy IMAC metódy položil už v roku 1961 Helfferich, ktorý vo svojej práci popísal separáciu malých molekúl na princípe ligandovej výmeny¹⁰. V ďalšej práci sa Everson a Parker venovali štúdiu viazania sa zinočnatého kationu na 8-hydroxy-chinolínovú agarózu a využitie tejto štúdie na separáciu metaloproteínov¹¹.

V roku 1975 Porath a spol. vo svojej práci¹² ako prví zaviedli pojem novej LC pod názvom „Afinitná chromatografia chelátov kovov“ (Metal Chelate Affinity Chromatography). V tejto práci autori úspešne popísali použitie imobilizovaných dvojmocných kationov zinku a meďi na frakcionovanie proteínov nachádzajúcich sa v ľudskom krvnom sére, na základe ich rozdielnej afinity k týmto kationom. Vzhľadom na to, že sa nejedná len o cheláty, bol v roku 1983 pôvodný názov nahradený tým istým autorom na súčasný, t.j. „afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu“. V nasledujúcich vedeckých prácach Porath^{13–15} a Sulkowski^{16–19} položili dobré základy tejto metódy, ktorá si odvtedy získala veľkú popularitu hlavne v biochémií pri purifikácii proteínov z komplexných biologických matric^{20–22}.

V súčasnosti si IMAC metóda, okrem početných aplikácií v biochémií a biotechnológii, postupne našla uplatnenie aj pri separácii a frakcionácii látok z environmentálnych vzoriek (napríklad organických ligandov resp. humínových látok)^{23–35}.

Tento prehľadový článok stručne popisuje všeobecný princíp separácie látok v IMAC metóde, výhody a nevýhody použitia rôznych typov nepohyblivých fáz a možnosti využitia IMAC pri analýze vzoriek životného prostredia (voda, pôda, sedimenty) (tab. I).

2. Afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu

2.1. Separačný princíp

V IMAC je adsorpcia separovanej látky založená na tvorbe koordinačných väzieb medzi imobilizovanými iónmi kovu a voľnými elektrónovými párami funkčných skupín nachádzajúcich sa na povrchu látky. V tomto type chromatografie je nepohyblivá fáza tvorená z nerozpustného nosiča (matrice), na ktorého povrchu sú kovalentnou väzbou naviazané vhodné chelátotvorné ligandy. Takto naviazané chelátotvorné ligandy potom poskytujú voľné elektrónové páry na tvorbu stabilných koordinačných väzieb s rôznymi dvojmocnými resp. trojmocnými kationmi kovov. Podmienkou IMAC separácie je, aby imobilizované ióny kovu chelátovo viazané na ligandy poskytovali ako akceptory elektrónov voľné koordinačné miesta pre viazanie sa elektrón-donorných funkčných skupín separovanej látky. Potom pri separácii zložiek vzorky sa vytvárajú špecifické interakcie, čím dochádza k sorpcii látok na nepohyblivú fázu. Následné uvoľnenie látok z nepohyblivej fázy sa uskutočňuje v závislosti od typu ich naviazania na nepohyblivú fázu napríklad zmenou pohyblivej (mobilnej) fázy (zmenou pH, zloženia atď.) resp. zmenou teploty separačného priestoru. Po elúcii zadrža-

Tabuľka I

Vybrané aplikácie afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu na analýzu vzoriek životného prostredia

Vzorka	Chelátotvorný ligand	Ión kovu	Separáčnne podmienky	Lit.
Morská voda	IDA	Cu ²⁺	Tlmivý roztok, pH 7,0-8,0, a HCl, pH 2,0	23
Povrchová voda z ústia rieky	IDA	Cu ²⁺	NaCl, pH 4,5 a Glycín/NaCl, pH 9,0	24
Jazerná voda	IDA	Cu ²⁺	HCL a NaCl	25,26
Morská voda	IDA	Cu ²⁺	Kyselina mravčia, kyselina octová a NaCl	27
Pôdny roztok	IDA	Cu ²⁺	Fosfátový tlmivý roztok, pH 3,5 a NaCl	28,29
Fulvokyseliny a humínové kyseliny	Celulóza HYPHAN, Chelex 100	Fe ³⁺	Boritanový tlmivý roztok, pH 6,0-12,00 a 4,0-12,00	31,32
Fulvokyseliny	IDA	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	Boritanový tlmivý roztok, pH 8,5-4,0, HCl a glycín	33,34
Humínové kyseliny	Salicyl	Al ³⁺	Octanový tlmivý roztok, pH 8,9-3,9 a HCl, pH 2,0	35

ných látok z IMAC kolóny je potrebné pred ďalším nadávkovaním vzorky uskutočniť jej regeneráciu.

V súčasnosti existuje viacero pracovných postupov pri separácii látok IMAC metódou, ale vo väčšine prípadov je možné opísať ho nasledujúcimi piatimi základnými krokmi:

- naplnenie a zrovnováženie chromatografickej kolóny,
- imobilizácia iónov kovu,
- dávkovanie vzorky,
- elúcia vzorky,
- regenerácia chromatografickej kolóny.

2.2. Nepohyblivá fáza

Dôležitým krokom pred samotnou IMAC analýzou je správny výber nepohyblivej fázy, t.j. nosiča, chelátotvorného ligandu a imobilizovaného iónu kovu³⁶. Informácie o ich vlastnostiach, použití, výhodách a nevýhodách môžeme čerpať aj z množstva publikovaných vedeckých prác zameraných prevažne na využitie IMAC v biochemickej oblasti^{20–22}.

Prvé nosiče v IMAC metóde patrili do skupiny mäkkých gélov, ako napríklad agaróza, perlová celulóza alebo zosieťovaný dextrán. Výhodou týchto nosičov je ich vysoký hydrofílny charakter, ich ľahká derivatizácia, veľká pórovitosť ako aj veľký rozmer pórov. Vďaka uvedeným vlastnostiam poskytuje tento typ nosičov možnosť naviazať čo najväčší počet chelátotvorných ligandov. Zároveň sa u nich vyskytuje nízka nešpecifická adsorpcia. Nevýhodou je ich ľahká stlačiteľnosť, t.j. neposkytujú stabilné lôžko počas LC procesu. Tým sa ich použitie obmedzuje len pre LC analýzy s nízkymi prietokmi pohyblivej fázy a nie je ich možné použiť v HPLC²⁰.

Vzhľadom k uvedeným skutočnostiam bolo snahou viacerých autorov vyvinúť nové pevnejšie nosiče pre IMAC^{36–38}. Jednou z možností je použitie upraveného porézneho skla, ktoré spĺňa podmienku pevnosti nosiča aj

pri vyšších prietokoch pohyblivej fázy, vďaka zlepšenému prenosu makromolekúl vo vnútri častíc nosiča³⁹. Nevýhodou tohto nosiča je, že sa na jeho povrchu nešpecificky adsorbujú látky, čo je spôsobené hydrofóbnymi interakciami. Navyše porézne sklo je nestabilné v zásaditom prostredí pri pH hodnote väčšej ako 8.

Riešením tohto problému sa zaoberali viacerí autori, ktorí skĺbili výhody porézneho skla a hydrofílnych polymérnych gélov. Povrchovou úpravou porézneho skla naviazaním vrstvy hydrofílného polyméru ako napríklad chitosanu³⁹, agarózy⁴⁰ a dextránu⁴¹ dosiahli zníženie nereverzibilnej sorpcie separovaných látok. Zvýšením hydrofílnosti povrchu nosiča sa tiež zvýšila jeho chemická stabilita a jeho kapacita. Na záver by sme mohli zhrnúť, že okrem už uvedených vlastností, nosiče používané v IMAC by mali byť fyzikálne, chemicky, mechanicky a tepelne stále a mali by poskytovať možnosť regenerácii nepohyblivej fázy bez degenerácie samotného nosiča. Zároveň by mali poskytovať možnosť naviazať čo najväčší počet chelátotvorných ligandov.

Existuje niekoľko spôsobov naviazania chelátotvorných ligandov na nosič, ktoré sa prevažne realizuje pomocou kovalentných väzieb³⁶. Výber najvhodnejšieho spôsobu závisí od vlastností nosiča ako aj od typu ligandu. V IMAC sa kovalentné viazanie ligandu na vhodný nosič realizuje väčšinou prostredníctvom oddaľujúceho ramena (angl. spacer arm), aby sa zabránilo sterickým prekážkam väzbe separovanej látky (väčšinou makromolekuly) na chelátotvorný ligand (väčšinou nízkomolekulová zlúčenina) a to dvoma spôsobmi. V prvom spôsobe je nosič aktivovaný vhodným aktivačným činidlom a potom oddaľujúce rameno, zvyčajne krátky alkylový reťazec, je kovalentne prichytený cez aktívne miesta na nosič. Samotný chelátotvorný ligand je potom naviazaný na opačný koniec molekuly oddaľujúceho ramena. V druhom spôsobe je už vopred syntetizovaný ligand s oddaľujúcim ramenom a potom je v jednom kroku naviazaný priamo na nosič⁴².

Dôležité je, aby naviazaný chelátotvorný ligand bol stabilný počas adsorpčných a desorpčných procesov aj v prípade opakovaného použitia. Ako chelátotvorné ligandy pre IMAC sú vhodné zlúčeniny, ktoré s látkami tvoria reverzibilné, špecifické a pevné komplexy. Navyše musia obsahovať takú funkčnú skupinu, ktorú je možné použiť pre ich kovalentné naviazanie na nosič. V poslednej dobe sa v IMAC metóde kladie čoraz častejšie väčší dôraz na univerzálnosť chelátotvorných ligandov, čo by malo priniesť zjednodušenie charakterizácie IMAC separačného procesu.

V súčasnosti sa v IMAC používa viacero komerčne vyrábaných nepohyblivých fáz s rôznymi chelátotvornými ligandami. Medzi najpoužívanejšie v IMAC patria tieto chelátotvorné ligandy: 8-hydroxychinolín (8-HQ), kyselina iminodietová (IDA), kyselina salicylová (Sal), kyselina nitrilotrioctová (NTA), kyselina *N*-karbamoyl-asparágová (CM-Asp) a triskarboxymetyletyl diamín (TED), ktoré sa líšia maximálnym počtom donorových skupín, napríklad IDA je trojdonorová, NTA je štvordonorová a TED je päťdonorová (obr. 1). Podľa ich molekulovej štruktúry a chelátotvorného mechanizmu môžeme zoradiť ligandy podľa ich klesajúcej sily imobilizovať ióny kovov a to v poradí od viacdonorových po jednodonorové ligandy⁴³.

Treba si však uvedomiť, že ak bude ión kovu chelátotvorným ligandom imobilizovaný príliš silne, nezostane mu dosť afinity na vytvorenie väzby so separovanou látkou. Naopak ak bude ión kovu naviazaný na ligand príliš slabo, môže dôjsť k jeho konkurenčnému naviazaniu sa na viac ligandov separovanej látky do vysietenia koordinačných schopností a vytvorenie chelátu v pohyblivej fáze. Na druhej strane, príliš slabé naviazanie iónu kovu na li-

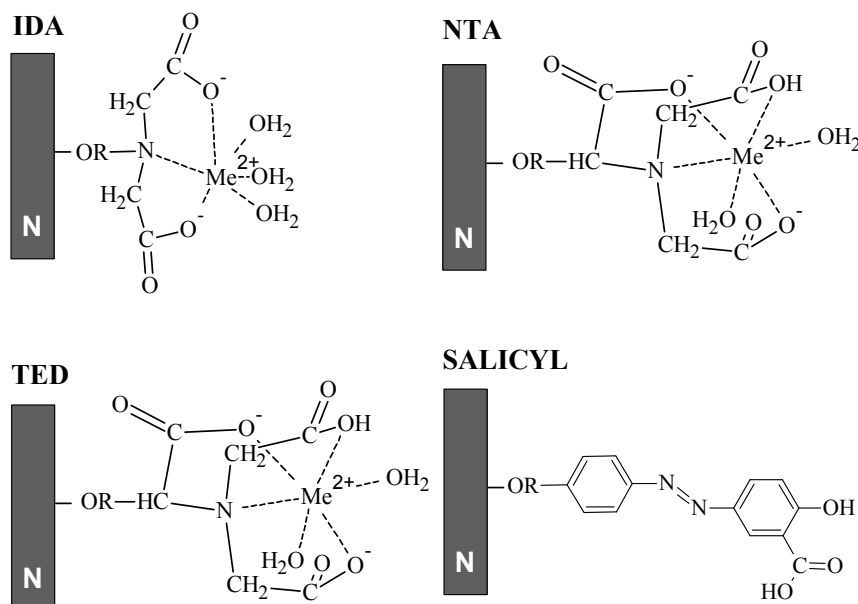
gand môže viesť až k jeho nežiaducemu uvoľneniu do elučného roztoku. Preto je dôležité ponechať iónu kovu práve taký počet stupňov voľnosti, aby mohol definovane viazať molekulu látky. Imobilizácia iónov kovu prebieha najčastejšie vo vhodnom vodnom tlmivom roztoku, v deionizovanej vode alebo v slabej kyseline.

Vznik komplexu imobilizovaný ión kovu – látka, ako aj jeho stabilita, sa líši od typu použitého iónu kovu. V IMAC metóde existuje viacero klasifikácií iónov kovov. Najpoužívanejšou klasifikáciou je rozdelenie podľa ich polarizovateľnosti, ktorú popísal Pearson⁴⁴. Podľa neho sa povaha iónov kovov, ako Lewisových kyselín resp. zásad, rozdeľuje do troch základných kategórií na základe ich rôznej afinity k nukleofilným skupinám biopolyméru, a to na:

- tvrdé (najvyššia afinita),
- stredne tvrdé (stredná afinita),
- mäkké (najnižšia afinita).

Do skupiny tvrdých iónov kovov patria napríklad Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , a Mg^{2+} , ktoré sa prednostne viažu s kyslíkom, alifatickým dusíkom a fosforom. Stredne tvrdé ióny kovov sú prevažne dvojmocné kationy Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Co^{2+} , ktoré prednostne vytvárajú koordinačné väzby s aromatickým dusíkom, kyslíkom resp. sírou. Mäkké ióny kovov, akými sú napríklad Cu^+ , Hg^{2+} a Ag^+ sa prednostne viažu na síru.

Väzby medzi separovanými látkami a tvrdými iónmi kovov majú väčšinou iónový charakter, zatiaľ čo s mäkkými iónmi kovov sú predovšetkým kovalentnej povahy. Stredne tvrdé ióny kovov tvoria hlavne koordinačné väzby. Okrem týchto typov väzieb sa môžu vyskytovať aj



Obr. 1. Štruktúry vybraných chelátotvorných ligandov používaných v IMAC metóde; IDA – kyselina iminodietová, NTA – kyselina nitrilotrioctová, TED – triskarboxymetyletyl diamín, SALICYL – kyselina salicylová, N – nosič a OR – oddeľujúce rameno

hydrofóbne interakcia a elektrostatické coulombovské sily. V súčasnosti sú najpoužívanejšie dvojmocné katióny prechodných kovov (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Co^{2+}) a trojmocné katióny kovov (Fe^{3+} a Al^{3+})⁴⁵.

K dôležitejším krokom v IMAC metóde patrí aktivovanie, premývanie nepohyblivej fázy a zrovnováženie (ekvilibrovanie) pohyblivej fázy a nepohyblivej fázy v IMAC kolóne, ktoré sa realizujú rôznymi tlmivými roztokmi alebo vodným roztokom kyseliny EDTA. Existuje popísaných viacero možností týchto krokov, ale momentálne neexistuje žiadny postup, ktorý by bol akceptovaný za štandardnú procedúru.

3. Aplikácie afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu na analýzu vzoriek životného prostredia

3.1. Organické ligandy

Schopnosť viacerých organických ligandov tvoriť komplexy s rôznymi iónmi kovov bola už v minulosti veľakrát detailne popísaná^{46,47}. Sila koordinačnej väzby medzi určitým organickým ligandom a iónom kovu závisí od viacerých faktorov, napríklad od pH, iónovej sily, ale predovšetkým je charakterizovaná konštantou stability komplexu. Tvorba rôzne stabilných komplexov organických ligandov bola využitá aj pri ich izolácii resp. separácii pomocou IMAC metódy. Práce venované tejto problematike väčšinou len prebrali IMAC separačné podmienky (nosiče, chelátotvorné ligandy, ióny kovov a elučné činidlá) z prác publikovaných v oblasti biochémie resp. biotechnológie^{23–29}. Ich cieľom bolo skôr podrobnejšie charakterizovanie získaných IMAC frakcií ďalšími analytickými metódami. V týchto prácach bol najpoužívanejší overený IDA- Cu^{2+} systém, aj vzhľadom na jeho širokú komerčnú dostupnosť.

Tento systém použili vo svojej práci aj Midorikawa a Tanoue²³, ktorí sa zaoberali izolovaním organických ligandov z rozpustených organických látok (DOM, dissolved organic matter) z morskej vody na základe ich interakcií s med'natými kationmi. Extrahované organické ligandy potom ďalej charakterizovali na základe ich rôznej afinity ku Cu^{2+} a z nameraných dát fluorescenčných spektier.

V tom istom roku Gordon a spol. uverejnili článok²⁴, v ktorom IDA- Cu^{2+} IMAC systémom izolovali organické ligandy z riečnej vody pri ústí do Atlantického oceánu. V práci študovali vplyv pH, rýchlosti prietoku a objemu elučného činidla (chloridu sodného a glycinu) a skladovania vodnej vzorky na výťažnosť organických ligandov. Získané dve frakcie boli detekované diferenčne pulznou anodickou stripping voltampérometriu (DPASV) a ďalej charakterizované UV-VIS spektrami.

V nasledujúcich dvoch prácach^{25,26} autori Wu a Tanoue opäť použili IDA- Cu^{2+} systém na frakcionáciu organických ligandov z jazernej vody Lake Biwa. Analýzou IMAC frakcií na základe distribúcie podľa veľkosti

molekúl zistili, že z celkového množstva organických ligandov (t.j. 1,4–4,0 % všetkých rozpustených organických látok) sa 67–79 % nachádza vo frakcii s relatívnou molovou hmotnosťou do 5000, zatiaľ čo zvyšok sa nachádza vo frakcii s relatívnou molovou hmotnosťou od 5000.

Vachet a Callaway²⁷ využili na charakterizáciu slabou a silne zadržaných IMAC frakcií organických ligandov s afinitou na Cu^{2+} vysokoúčinnú rozmerovo-vylučovaciu chromatografiu (HPSEC) a MS. Z nameraných výsledkov vyplýva, že frakcie s vyššou afinitou ku Cu^{2+} majú nižšiu relatívnu molovú hmotnosť (okolo 270).

Posledné dve práce využívajúce IDA- Cu^{2+} IMAC systém na separáciu rozpustených prírodných ligandov z pôdnych vzoriek publikovali Paunovic a spol.^{28,29}. Rozhodujúcim faktorom pre zadržanie ligandov na IMAC kolóne bola tvorba terciárnych komplexov IDA- Cu^{2+} -ligand. Zaujímavým zistením bolo, že konštanty stability komplexov Cu^{2+} -ligand nehrali významnú úlohu na zadržanie látok²⁸. Tie ligandy, ktoré obsahovali len karboxylové funkčné skupiny (napríklad EDTA – log K 18,8 resp. kyselina salicylová – log K 10,6) neboli zadržané na kolóne, zatiaľ čo zadržaná časť látok vykazovala prítomnosť *N*-heterocyklických aromatických štruktúr. To môže byť vysvetlené tým, že látky s *N*-heterocyklickou aromatickou štruktúrou majú silnú schopnosť tvoriť terciálne med'naté komplexy typu ligand1- Cu^{2+} -ligand2, kde π -väzby medzi *N*-heterocyklickými aromatickými jadrami a Cu^{2+} stabilizujú tento komplex. Vyvinutá IMAC metóda bola použitá na frakcionáciu organických ligandov z pôdnych roztokov.

Na rozdiel od predchádzajúcich prác, Baldwin a spol.³⁰ použili IDA- Al^{3+} systém na izoláciu prírodných organických ligandov z huby *Pisolithus tinctorius*. Hlinitý kation bol zvolený z dôvodov, že hliník je vo forme hlinito-kremičitanov najčastejšie sa vyskytujúci kovový prvok v zemskej litosfére a má vysokú afinitu interagovať s organickými ligandami za vzniku komplexných zlúčenín. Na elúciu zadržaných zložiek bol použitý 1 mol l^{-1} vodný roztok hydroxidu amónneho a zozbierané frakcie boli charakterizované technikou ESI-MS.

3.2. Humínové látky

Humínové látky (HL) sú vďaka svojmu chemickému zloženiu a heterogenite chemickej štruktúry schopné interagovať s látkami nepolárneho ako aj polárneho charakteru. V dôsledku prítomnosti viacerých typov funkčných skupín (napríklad karboxylových, fenolických, dusíkových, enolových, hydroxylových a pod.) majú HL záporný náboj a tým aj predpoklad zvýšenej afinity viazať ióny rôznych kovov⁴⁸. Schopnosť HL viazať kovy je jednou z najvýznamnejších vlastností HL a využíva sa vo viacerých oblastiach života. V prírodných systémoch tieto látky môžu viazať napríklad znečisťujúce kovy, a následne tak významným spôsobom ovplyvňovať také procesy, ako sú transportné javy, biodostupnosť, toxicita, regeneračné a čistiace procesy týchto systémov a pod.⁴⁹. Štúdiami možných interakcií rôznych iónov kovov s HL sa venovalo viacero autorov a na túto tému bol uverejnený veľký počet

vedeckých prác^{50–53}. Ucelený prehľad danej problematiky uverejnil Tipping vo svojej monografii⁴³. Napriek veľkému súboru informácií a nameraných experimentálnych dát, poznatky o týchto interakciách stále nie sú úplne jednoznačné. Vplyv prostredia (voda, pôda a sedimenty), v ktorom sa HL prirodzene nachádzajú, zohráva tiež dôležitú úlohu pri popise týchto mechanizmov. V pôdnom prostredí, vzájomným pôsobením produktov rozličného stupňa premeny organických zvyškov a HL s minerálnym podielom pôdy dochádza k tvorbe organominerálnych zlúčenín. Vznik organominerálnych zlúčenín závisí hlavne od chemickej štruktúry HL t.j. od počtu a typu funkčných skupín, stupňa polymerizácie, stupňa huminifikácie, stupňa oxidácie a pomeru medzi aromatickou zložkou jadra a periférnymi reťazcami s hydrofilnými funkčnými skupinami. Podľa typu viazania sa HL s minerálnym podielom pôdy môžeme organominerálne zlúčeniny rozdeliť na⁵⁴:

- hetereopolárne soli,
- komplexo-heteropolárne soli,
- adsorpčné komplexy.

Z pohľadu našej problematiky sú pre nás zaujímavé komplexo-heteropolárne soli, ktoré vznikajú reakciou HL (humínových kyselín a fulvokyselín) s komplexotvornými iónmi kovov. Tie sa vytvoria, ak sa dve alebo viac koordinačných miest okolo iónu kovu obsadí donorovými skupinami ligandu za vzniku vnútornej kruhovej štruktúry (chelátu). V pôde plnia funkciu ligandu najmä jednoduché organické zlúčeniny ako aj chelátotvorné funkčné skupiny HL. Komplexačná schopnosť HL závisí predovšetkým od množstva funkčných skupín, ktoré obsahujú kyslík (–COOH, fenolické –OH a C=O skupiny). Zastúpenie týchto funkčných skupín je okrem iného ovplyvnené aj pH hodnotou prostredia a tým aj mierou disociácie. Napríklad v slabo kyslom prostredí sa na vzniku koordinačnej väzby prevažne podieľajú karboxylové skupiny ale so zvyšujúcim sa pH sa k nim pridávajú aj fenolické skupiny v dôsledku disociácie protónu z –OH skupiny. Každá funkčná skupina má inú afinitu ku rôznym katiónom kovov.

Všeobecne znižovanie afinity funkčných skupín ku iónom kovov môže byť zoradené nasledovne⁵⁵: enolová > aminová > azo > N v cykle > karboxylová > éterová > karbonylová.

Na druhej strane poradie klesajúcej schopnosti iónov kovov podieľať sa na tvorbe chelátov je nasledujúce⁵⁵: $\text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$.

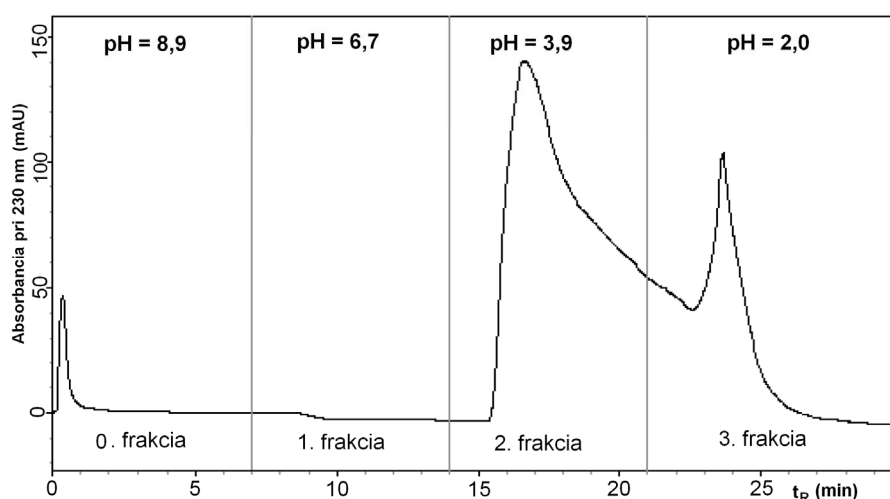
Je pravdepodobné, že v prírodných systémoch pri určitej hodnote pH a iónovej sile s prítomnými kovmi prednostne reagujú vždy určité typy molekúl HL, ich určité frakcie⁵⁶. Tieto vlastnosti HL sa dajú potom využiť aj na ich separáciu a charakterizáciu IMAC metódou.

V súčasnosti existujú dva prístupy pre separáciu HL použitím IMAC metódy. Prvý prístup využíva klasické chelátotvorné sorbenty s imobilizovanými iónmi kovu (napríklad systém IDA-Cu^{2+} resp. Salicyl-Al^{3+})^{33–35}. Druhý prístup využíva naviazanie Fe^{3+} na ionexovom gély^{31,32}.

Wu a spol.^{33,34} použili komerčne dostupný chelátotvorný ligand IDA kovalentne naviazaný na sefárovízom gély ako nosiči. V prvej práci³³ autori študovali vplyv pH a iónovej sily na zadržanie HL s použitím rôznych dvoj- a trojmocných katiónov kovov (Cu, Ni, Co a Cd). Zistili, že zvyšovaním pH a iónovej sily sa zvyšuje zadržanie HL na IMAC kolóne. Väzbová kapacita HL a retenčný objem študovaných štyroch kovových katiónov v IMAC bola v nasledujúcom poradí: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. Autormi vybraný IDA-Cu^{2+} IMAC systém bol použitý na frakcionáciu HL pri rôznych pH hodnotách (4,1; 6,9 a 8,5). Na elúciu zadržaných frakcií HL bol použitý eluent s nízkym pH (pH 2,0). Zozbierané frakcie HL boli ďalej charakterizované UV-VIS a fluorescenčnými spektrami. Namerané spektrálne údaje ukazujú, že frakcie HL s vyššou afinitou ku Cu^{2+} môžu mať vyššiu relatívnu molovú hmotnosť a vyššiu proporciu zlúčenín, ktoré absorbujú resp. fluoreskujú žiarenie pri vyšších vlnových dĺžkach. Rozdielna schopnosť HL zadržiavať sa v IDA-Cu^{2+} systéme pri rozdielnom pH elučného prostredia bola autormi použitá na navrhnutie IMAC metódy s gradientovou elúciou so skokovou zmenou pH pohyblivej fázy.

Ďalšia práca tých istých autorov³⁴ sa zamerala na frakcionáciu a charakterizáciu dvoch vzoriek prírodných vodných fulvokyselín a jednej komerčne dostupnej fulvokyseliny Suwannee River, kde IMAC separačné podmienky boli prebraté z predchádzajúcej práce³³. Zozbierané IMAC frakcie HL boli ďalej charakterizované SEC resp. RP HPLC. Namerané výsledky z SEC potvrdzujú predchádzajúce tvrdenie, že frakcie HL bez afinity k Cu^{2+} majú nižšiu relatívnu molovú hmotnosť ako frakcie HL s vyššou afinitou k Cu^{2+} . Zároveň, frakcie HL so silnejšou afinitou k Cu^{2+} vykazujú relatívne vyšší hydrofóbny charakter, čo bolo potvrdené RP-HPLC analýzou príslušných frakcií HL. Rozdiel v relatívnej molovej hmotnosti HL bol pozorovaný aj pri zmene elučného roztoku, kedy pri použití glycínu oproti vodnému roztoku HCl boli namerané vyššie relatívne molové hmotnosti frakcií HL s vyššou afinitou k Cu^{2+} .

Odlišný prístup na frakcionáciu HL bol použitý v práci³⁵ (obr. 2). Pre tento prípad boli vybrané Al^{3+} na naviazanie na nepohyblivú fázu. Ako chelátotvorný sorbent sa autori rozhodli použiť Iontosorb Salicyl, ktorý obsahuje salicylovú skupinu viazanú cez azo skupinu v bočnom reťazci modifikovanej celulózy. Tento sorbent obsahuje len neutrálne skupiny a selektivita sorpcie látok závisí len od ich reaktivity s kyselinou salicylovou. Okrem už uvedeného dôvodu, bol tento sorbent vybraný aj z ďalších dvoch dôvodov. Prvý dôvod je, že salicylová funkčná skupina je jednou z funkčných skupín, ktoré sa prirodzene vyskytujú v HL. Po druhé, chelát Sal-Al^{3+} má vysokú hodnotu konštanty stability ($\log K = 14,1$). Zadržanie HL na kolóne bolo študované pri troch rôznych hodnotách pH elučného prostredia a to pH 8,9; 6,7 resp. 3,9. Zadržaná časť HL bola eluovaná s $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HCl s pH 2,0. Z nameraných výsledkov je zrejme, že najviac HL sa zadržalo pri pH 6,7. Dá sa predpokladať, že HL s veľkým počtom funkčných skupín budú mať väčšiu afinitu ku Al^{3+} pri tejto hodnote pH prostredia.



Obr. 2. Chromatografický záznam separácie humínových látok v Salicyl- Al^{3+} IMAC systéme; zadržané časti humínových látok boli eluované s elučným roztokom skokovou zmenou hodnoty pH od 8,9 po 2,0 (cit.³⁵)

Na frakcionáciu vodných HL autori v prácach^{31,32} použili rozdielny prístup v naviazaní iónov kovov na nepohyblivú fázu. Namiesto chelátotvorného ligandu kovalentne naviazaného na vhodný nosič si zvolili systém, kde Fe^{3+} boli priamo naviazané na rôzne ionexy. Ako ionexy boli použité sorbenty na báze prírodného celulóзовého vlákna – Cell, celulózy typu – HYPHAN a chelátového meniča – Chelex 100. Všetky sorbenty boli naplnené do preparatívnej HPLC kolóny. Pracovný postup frakcionácie HL bol podobný ako v predchádzajúcich prácach. Na zadržanie HL boli použité boritanové tlmivé roztoky pri rôznych pH hodnotách (6,0–12,0) v prostredí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl. V tomto prípade mechanizmus separácie HL bol založený na ich viazaní sa s Fe^{3+} -ionexom, ktoré je silnejšie so zvyšujúcim sa počtom funkčných skupín v molekulách HL. Pokiaľ ide o väzbový mechanizmus, silné vodíkové mostíky medzi hydroxy skupinami hydroxidu železitého a fenolovými a karboxylovými funkčnými skupinami molekúl HL hrajú významnú úlohu a ich väzbová sila závisí hlavne od pH hodnoty prostredia. Priebežné štúdium viedlo k návrhu chromatografickej metódy na frakcionáciu HL s použitím skokovej gradientovej elúcie zvyšovaním pH s boritanovým tlmivým roztokom od pH 8 do 12,5 pre Cell- Fe^{3+} a od pH 4 do 12,5 pre HYPHAN a Chelex 100. Pri vyššom pH eluované frakcie HL môžu zahŕňať nie len samostatné molekuly HL, ale aj ich komplexy s kationmi kovu. V prípade použitia Cell- Fe^{3+} bolo získaných až sedem frakcií HL. V prípade HYPHAN bolo získaných do šesť frakcií. Všetky získané frakcie HL boli následne podrobené ďalšiemu štúdiu ich vlastností zameranému hlavne na ich komplexačnú schopnosť (viazať mednaté ióny) a spektrálne charakteristiky (pomer absorbancie pri 265/365 nm resp. FTIR spektra).

4. Záver

Vzhľadom na už publikované práce, IMAC metóda môže predstavovať vhodný nástroj na izoláciu a separáciu organických ligandov ako aj HL. Získané výsledky dovoľujú lepšie porozumieť povahe týchto látok a ich charakterizácii na základe afinity s kationmi kovov a tak možnosť modelovať ich správanie sa v životnom prostredí. Výsledky tiež poukazujú na to, že IMAC je vhodnou metódou na ich frakcionáciu, kde získané frakcie môžu byť ďalej charakterizované viacerými analytickými metódami (SEC, RP-HPLC, MS, UV-VIS resp. fluorescenčnou spektrometriou). Pomocou týchto metód sa môžu získať ucelenejšie informácie o charaktere, štruktúre, funkčnosti a možnostiach týchto látok a ich použití v rozličných oblastiach života.

Napriek uvedeným skutočnostiam IMAC metóda má aj niekoľko nedostatkov resp. niekoľko potenciálnych problémov. Jeden z hlavných nedostatkov je časová náročnosť analýzy, zahrňujúca hlavne proces prípravy a regenerácie chromatografickej kolóny. V prípade HL si musíme uvedomiť, že IMAC metóda bola pôvodne vyvinutá pre separáciu malých molekúl (napríklad proteínov, organických ligandov), preto pri separácii HL treba počítať aj s existenciou rozmerovo-vylučovacieho efektu. Zároveň v IMAC systéme sa môže vyskytovať problém s vymývaním imobilizovaných iónov kovu z chromatografickej kolóny a tým aj problém s presným charakterizovaním použitého systému. Rápidna zmena pH elučného prostredia, napríklad od 2 do 12, môže hlavne v prípade HL spôsobovať zmeny ich štruktúry alebo usporiadania nábojov.

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantov MŠ SR VEGA 1/0329/10, APVV-0595-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

- Lehotay J.: *Separáčné metódy v analytickej chémii*, str. 91. Nakladateľstvo STU, Bratislava 2009.
- Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Lowe C. R.: *An Introduction to Affinity Chromatography*, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1979.
- Glatz Z.: Chem. Listy 96, 127 (2002).
- Vodičková H., Pacáková V., Šestáková I., Mader P.: Chem. Listy 95, 477 (2001).
- Zouhar J.: Chem. Listy 93, 683 (1999).
- Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., Sachkova T. P.: J. Chromatogr., A 92, 359 (1977).
- Davankov V. A., Semechkin A. V.: J. Chromatogr., A 141, 313 (1977).
- Chaga G. S.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 313 (2001).
- Helfferich F.: Nature 189, 1001 (1961).
- Everson R. J., Parker H. E.: Bioinorg. Chem. 4, 15 (1974).
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: Nature 258, 598 (1975).
- Porath J., Olin B.: Biochemistry 22, 1621 (1983).
- Hemdan E. S., Zhao Y. J., Sulkowski E., Porath J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1811 (1989).
- Porath J.: Protein Expression Purif. 3, 263 (1992).
- Sulkowski E.: Trends Biotechnol. 3, 1 (1985).
- Sulkowski E.: Bioassays 10, 170 (1989).
- Sulkowski E.: J. Mol. Recognit. 9, 389 (1996).
- Sulkowski E.: J. Mol. Recognit. 9, 494 (1996).
- Gaberc-Porekar V., Menart V.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 335 (2001).
- Zatloukalová E.: Chem. Listy 98, 254 (2004).
- Gutierrez R., del Valle E. M. M., Galan M. A.: Sep. Purif. Rev. 36, 71 (2007).
- Midorikawa T., Tanoue E.: Mar. Chem. 52, 157 (1996).
- Gordon A. S., Dyer B. J., Kango R. A., Donat J. R.: Mar. Chem. 53, 163 (1996).
- Wu F., Tanoue E.: Org. Geochem. 32, 11 (2001).
- Wu F., Tanoue E.: Org. Geochem. 32, 1311 (2001).
- Vachet R. W., Callaway M. B.: Mar. Chem. 82, 31 (2003).
- Paunovic I., Schulin R., Nowack B.: J. Chromatogr., A 1100, 176 (2005).
- Paunovic I., Schulin R., Nowack B.: Eur. J. Soil Sci. 59, 198 (2008).
- Baldwin C., Cumming J., Timperman A. T.: Analyst 130, 318 (2005).
- Kuckuk R., Burda P.: Fresenius' J. Anal. Chem. 366, 95 (2000).
- Burda P., Jakubowski B., Kuckuk R., Kulmer K., Heumann K. G.: Fresenius' J. Anal. Chem. 368, 689 (2000).
- Wu F. C., Evans R. D., Dillon P. J.: Anal. Chim. Acta 452, 85 (2002).
- Wu F. C., Evans R. D., Dillon P. J.: Anal. Chim. Acta 464, 47 (2002).
- Halko R., Neuročný T., Hutta M.: Pol. J. Soil Sci. 42, 149 (2009).
- Vařilová T.: Chem. Listy 99, 570 (2005).
- Turner J. L., Wildsmith J., Boland J., Moeller-Gaa J., Ray K., Dapron J. G., Scott G. B. I.: FASEB J. 20, A529 (2006).
- Kara A., Osman B., Yavuz H., Besirli N., Denizli A.: React. Funct. Polym. 61, 61 (2005).
- Shi Q. H., Tian Y., Dong X. Y., Bai S., Sun Y.: Biochem. Eng. J. 16, 317 (2003).
- Zhou F. L., Muller D., Jozenfonvicz J.: J. Chromatogr., A 510, 71 (1990).
- Lakhiari H., Muller D.: J. Chromatogr., B 808, 35 (2004).
- Zou H. F., Lou Q. Z., Zhou D. M.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 199 (2001).
- Tipping E. (ed.): *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press, Cambridge 2002.
- Pearson R. G. (ed.): *Hard and Soft Acids and Bases. In Benchmark Papers in Inorganic Chemistry*, str. 53–59 a 67–85. Hutchinson & Ross, Stroudsburg 1973.
- Ueda E. K. M., Gout P. W., Morganti L.: J. Chromatogr., A 988, 1 (2003).
- Holzbecher Z., Diviš L., Král M., Šůcha L., Vlášil F.: *Organická činidla v anorganické analýze*. SNTL, Praha 1975.
- Fries J., Getrost H.: *Organic Reagents for Trace Analysis*. E. Merck, Darmstadt 1977.
- Ghabbour E. A., Davies G. (ed.): *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001.
- Klučáková M., Pelikán P., Lapčík L., Lapčíková B., Kučerík J., Kaláb M.: J. Polym. Mater. 17, 337 (2000).
- Elkins K. M., Nelson D. J.: Coord. Chem. Rev. 228, 205 (2002).
- Barančíková G., Makovníková J.: Plant Soil Environ. 49, 565 (2003).
- Yamamoto Y., Takahashi Y., Shimizu H.: Geochem. J. 44, 39 (2010).
- Terbouche A., Djebbar S., Benali-Baitich O., Bouet G.: Soil Sediment Contam. 19, 21 (2010).
- Zaujec A., Chlpík J., Nádašský J., Szombathová N., Tobiašová E.: *Pedológia a základy geológie*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Nitra 2009.
- <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/kombi2.htm>, stiahnuté 10.01.2011.
- Powell H. K. J., Town R. M.: Anal. Chim. Acta 267, 47 (1992).

R. Halko and M. Hutta (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University, Bratislava, Slovakia*): **Application of Metal Ion Affinity Chromatography in Analysis of Environmental Samples**

This article reviews the advances in metal ion affinity chromatography (IMAC). The method is widely used for separation and characterization of a variety of biological

macromolecules in biochemistry, molecular biology and related sciences. This review describes basic principles of the method. Various types of matrices, chelating ligands and immobilized metal ions, their utilization and advantages or disadvantages are discussed. Applications of IMAC to isolation, fractionation and separation of natural organic ligands from aquatic or soil environment are presented.

Pronajmeme laboratoř!

Naše společnost AHV ekologický servis, s.r.o. nabízí k nájmu vybavenou chemickou laboratoř, která provádí a zajišťuje analýzu pitných, povrchových, kotelních a odpadních vod, výluhů z odpadů, odpadů, zemin a kalů.

Vybavení: UV-VIS, FTIR, pH-metr, ECAFLOW, konduktometr, digitální termo-reaktor, chlazený laboratorní inkubátor, plynová chromatografie, T.O.C., A.A.S., muflová pec, sušárna, vodní lázeň, laboratorní sklo a další.

Více informací na webu: **www.labservis.cz**

Kontakt:

AHV ekologický servis, s.r.o.
Svojšovice 40
251 63 Strančice

Ing. Jan Vošahlík, Ph.D.
vosahlik@ahv.cz
mobil: 603 437 544