

SAJÁT TÖLTÉSŰ KAPILLÁRIS HPLC OSZLOPOK KÉSZÍTÉSE PROTEOMIKAI VIZSGÁLATOKHOZ

**Tóth Gábor^{1,2}, Ozohanics Oliver¹, Vékey Károly¹,
Drahos László¹**

¹ MTA, Természettudományi Kutató Központ, MS Proteomika csoport, Budapest

² BME, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Budapest

Napjainkban egyre elterjedtebb a saját töltésű kapilláris HPLC kolonnák használata. Egyszerűsége, gazdaságossága, és a töltetek széleskörű variálási lehetőségei miatt szinte elengedhetetlen a proteomikában vizsgált komplex mintákhoz. Ennek segítségével a kereskedelmi forgalomban nem elérhető méretű vagy töltetű oszlopok használatára is lehetőség nyílik.

Munkám során célul tűztem ki proteomikai elválasztásokra alkalmas fordított fázisú kapilláris kolonnák készítését, a töltési paraméterek széleskörű optimálásával, valamint élettartam vizsgálattal. A vizsgálatok során kifejlesztettünk egy protokollt 2.6 μm szemcseátmérőjű XB-C18 töltetek 100 μm belső átmérőjű kapillárisba töltésére. Optimaltunk a kapillárist lezáró frit elkészítésének idejét és a kolonna töltés kiválasztott paramétereit. Fontos paraméternek tekintettük a töltetsuszpenzió sűrűségét, ezzel összefüggésben a töltési időt is, emellett vizsgáltuk a töltéshez használt gáz nyomását is.

Az alábbi optimális paramétereket határoztam meg: 1000 perc feletti töltési idő, 30 percig tartó 6000 psi tömörítés, 0.4 mg/ml töltetsuszpenzió töménység. Az így kapott kapilláris kolonnák kromatográfiás paraméterei kiemelkedően jó reprodukálhatósággal jellemezhetőek: a kolonnák jó minőségűek, keskeny csúcsokat, és jó elválást lehet rajtuk elérni. Emellett a retenciók időiben nem mutatkozik számottevő átlagos csúszás (<0.075 perc), így a méréseink jól reprodukálhatóak ($\text{RSD} < 1.1\%$). Fontos kiemelni, hogy a töltet szabadon választható meg, számos HPLC, UHPLC vagy egyéb töltetet és ezek tetszőleges arányú keveréke használható fel, így nagyon nagyfokú változatosságot mutatnak a saját töltésű oszlopok, ezáltal igen specifikus elválasztás érhető el. Munkánk során a fordított fázisú elválasztásra koncentráltunk, mivel így lehetőség nyílt a kereskedelemben kapható megoldásokkal történő összehasonlításra.

Az általunk készített kolonnák reprodukálhatóságának vizsgálatát enoláz standard triptikus emésztményének elválasztásával végeztük. Emellett elvégeztük a kolonnák összehasonlítását hasonló típusú gyári oszloppal. Emellett alfa savas glikoprotein elválasztásával vizsgálatokat végeztünk a kolonnákon való csúcscsúszás jellemzésére is.

A módszer használhatóságának jellemzésére két gazdaságossági paramétert használhatunk: a kolonnák élettartamát, valamint a költséghatékonyságot. Hozzávetőleges számításokat végeztem, melyek során az egy oszlopra eső fajlagos költséget hasonlítom össze hasonló típusú gyári kolonna beszerzési költségével.

Összefoglalva saját kolonnatöltési protokollt dolgoztam ki fordított fázisú kapilláris kolonnák készítéséhez, ennek teljesítőképességét két különböző módon vizsgáltam. Enoláz minták triptikus emésztményével az elválasztás hatékonyságát, és a kromatográfiás paramétereket határoztam meg, míg AGP minták mérésével vizsgáltam a bekövetkező csúcstorzulást. Az oszlopok élettartamára vizsgálatokat, gazdaságosságára számításokat végeztem.