

ISOELECTRIC PH FIELD STEP FOCUSING

Šišperová E., Glovinová E., Pospíchal J.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: el.siska@seznam.cz

ABSTRACT

The capillary electrophoretic method/procedure for the focusing and selective pre-concentration of ampholytes in non-symmetrical pH field step gradient with subsequent on-line ITP analysis was developed and verified. The method is based on creation/formation of stationary neutralization reaction boundary in the column, where ampholytes are selectively focused.

Non-symmetrical pH field step gradient was realized by addition /use/ of ampholyte with convenient properties to the buffer on one side of the neutralization reaction boundary, whereas the second side contained only simple non-ampholytic buffers.

Such electrolyte system has more convenient properties for the focusing over classical simple buffer systems. The pH span of this system can be easily lowered on one half, i.e. from neutral to alkaline, and/or acidic region, which brings more selectivity in focusing, whereas the buffered systems must cover all pH from alkaline to acidic region.

The electrolytes can be set up such a way, that the pH on the ampholyte side can be constant, whilst the pH on the buffered side can be changed, still keeping boundary stationary. This is great advantage especially during the continuous dosing, where dosing electrolyte must have constant pH to keep the reproducibility /– constant fluxes of dosed ions/ and opposite-primary electrolyte can vary pH to set up selectivity.

For the verification of the method, synthetic low-molecular pI markers were selectively pre-concentrated from the mixture and analyzed by ITP [1]. At pH 6.95 of dosing electrolyte, ampholyte of pI 8.6 was pre-concentrated 14.4 times, ampholyte of pI 7 was pre-concentrated 4.1 times and ampholyte of pI 6.2 was pre-concentrated only 1.4 times in the time of 7000sec.

Key words: ITP, Isoelectric focusing, field step gradient focusing

Acknowledgments: This work was supported by Internal Grant Agency of Mendel University in Brno, Czech Republic, Grant No. TP 1/2010 and Grant Agency of Czech Republic No. 06/10/1219.

ÚVOD

Rozvoj analytických metod je v posledních letech spjat především s potřebou analyzovat složité vzorky biologického charakteru. Tato matrice je pro běžné analytické metody poměrně složitá a z tohoto důvodu dochází k vývoji nových separačních metod a jejich kombinací. Mezi nejpokročilejší metody patří elektromigrační separační metody, které umožňují provést v jednom analytickém běhu nejenom vlastní analýzu-separaci, ale také předkoncentraci a předseparaci. Cílem naší práce bylo vyvinout takovouto ideální analytickou metodu se selektivní on-line předkoncentrací a předseparací založenou na výhodných analytických vlastnostech stojícího neutralizačního rozhraní – pH skoku.

Pro stanovení a úspěšné zakoncentrování jednotlivých amfolytů byl vyvinut vhodný elektrolytový systém, vytvářející neutralizační rozhraní. Toto neutralizační rozhraní vzniká mezi kyselou a zásaditou částí elektrolytu pomocí H^+ a OH^- iontů. Dochází zde k selektivní předkoncentraci jednotlivých amfolytů, podle jejich rozličných pI bodů. Na základě pI jsou amfolyty zakoncentrovány více, méně, či vůbec. Pokud pI jednotlivých amfolytů spadá mezi hodnoty pH obou krajních elektrolytů dojde k jejich úspěšnému zafokusování. Ostatní amfolyty pak rozhraním buď procházejí nebo do něho nedomigrují.

Jsou-li analyzované amfolyty přítomny v části elektrolytového systému - v tzv. dávkovacím elektrolytu, pak jsou průchodem elektrického proudu kontinuálně elektromigračně dávkovány do rozhraní, kde se selektivně fokusují - akumulují do stojících zón, jejichž efektivní náboj je nulový. Po naakumulování dostatečného množství analytu jsou zóny mobilizovány a analyzovány. Selektivita fokusace je dána rozdílným pI jednotlivých amfolytů a zvoleným pH obou krajních elektrolytů, tvořících neutralizační rozhraní - pH skok. Z matematického modelu popisujícího neutralizační rozhraní vyplývá, že v doposud popsané elektrolytové systémy, založené na jednoduchých anorganických solích, musí mít symetrický rozsah pH krajních elektrolytů se středem pH 7,12. Pro zvýšení selektivity předkoncentrace jsme vyvinuli elektrolytový systém s nízkomolekulárním amfolytem, který umožňuje použít asymetrický rozsah pH krajních elektrolytů se středem v kyselé oblasti pH.

MATERIÁL A METODIKA

Elektrolyty - Elektrolyty byly vyvinuty a pufrovány protiionty tak, aby mobilita H^+ a OH^- iontů v kyselém a alkalickém prostředí byla menší než u ostatních iontů stejného náboje. To umožnilo korektní migrace iontů a také následné použití H^+ a OH^- iontů jako terminátoru při mobilisaci. Zvolené pH bylo nastaveno s ohledem na nejlepší pufrovací schopnost na hodnotu pK protiionu.

Základní elektrolyty pro tvorbu neutralizačního rozhraní se skládají z alkalické a kyselé části. Jako alkalický základní elektrolyt byl zvolen octan amonný upravený hydroxidem amonným na

MENDELNET 2010

pH=8,62. Kyselá část elektrolytu - octan amonný upravený kyselinou octovou má mít standardně hodnotu pH 5,4. Při těchto hodnotách pH elektrolytů jsou velikosti opačných toků H^+ a OH^- iontů v rovnováze a neutralizační rozhraní stojí. Přídavkem vhodné koncentrace aminokyseliny histidinu do kyselého elektrolytu dojde ke zvýšení pH na hodnotu 6,95 a zároveň k vázání solvolytického toku H^+ iontu na histidinový kation, při zachování jeho velikosti a směru pohybu. To umožní i při změně pH jednoho elektrolytu zachovat stojící neutralizační rozhraní. Místo H^+ iontů jsou neutralizovány histidinové kationy za tvorby zwitterionového histidinu s efektivním nulovým nábojem.

Přídavkem vzorku do jednoho elektrolytu / v našem případě do elektrolytu s histidinem / se tento stává dávkovacím elektrolytem a působením elektrického proudu jsou z něj elektrokinetiky dávkovány jednotlivé amfolyty. Systém byl přizpůsoben tak, aby se z dávkovacího elektrolytu, umístěného v terminační komůrce, o pH 6,95, selektivně nadávkovaly jen některé amfolyty, k čemuž přispívá zvolené pH elektrolytu. Takový systém umožní mobilizaci a identifikaci jednotlivých amfolytů ve vytvořených barevných zónách analyzovaných v detektoru.

Jako mobilizační elektrolyt pak může sloužit pro kationtovou mobilizaci H^+ iont, tedy kyselina octová, pro aniontovou mobilizaci OH^- iont, tedy hydroxid amonný. V našem případě jsme používali pouze kationtovou mobilizaci.

Povrchově aktivní látka, polyethylenglykol (PEG) - Umožňuje zvýšit viskozitu, což omezí elektroosmózu roztoku a dosažení ostřejších zón.

Vzorek – Nízkomolekulární syntetická barviva o pI 8,6, 7 a 6,2.

Přístroj - Izotachoforetický analyzátor Spišská Nová Ves, byl použit ve dvoukolonovém uspořádání. V horní tzv. separační kapiláře proběhla fokusace a předkoncentrování, ve spodní analytické kapiláře byl vzorek analyzován.

Konce každé kapiláry jsou připojeny k elektrodovým komůrkám, které obsahují vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt (v horní části přístroje). Vzorek se dávkuje injekční stříkačkou (v horní části přístroje). Zóna prochází přes detektor, který vyhodnotí údaje a pošle elektrický signál do zapisovače. V jednotlivých kolonách jsme měli procházející proud 250 μA a 75 μA .

Postup analýzy – Do spodní analytické kapiláry nalijeme vedoucí elektrolyt, do vrchní separační kapiláry alkalický fokusační elektrolyt a do vrchní terminační komůrky dávkovací kyselý elektrolyt s velmi zředěným roztokem vzorku. pH dávkovacího elektrolytu upravíme tak, aby spolu s fokusačním elektrolytem vytvořil v koloně stojící rozhraní. Po zapnutí proudu jsou pak, v prvním kroku jednotlivé ionty vzorku selektivně dávkovány průchodem elektrického proudu do vytvořeného stojícího rozhraní, kde se mezi elektrolyty fokusují ve formě iontů s nulovým efektivní nábojem. Po naakumulování dostatečného množství vzorku, což je viditelné opticky, je ve druhém kroku analýzy vyměněn elektrolyt v horní elektrodové komůrce přístroje za mobilizační, konkrétně za kyselinu octovou. Působením kyseliny dojde ke změně nulového efektivního náboje v zónách na pozitivní, které působením elektrického proudu zvolna putují ve formě ostrých zón do separační

kapiláry. Ve třetím kroku se stává v separační kapiláře mobilizační elektrolyt terminačním a zóny podstupují v ITP módu běžnou izotochoforetickou analýzu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY NA DÁVKOVACÍM ČASE

Funkčnost metody byla ověřena sestrojením klasické kalibrační závislosti délky zóny na dávkovacím čase, která je rovněž lineární. Grafy prokazují, že v zónách dochází k rozdílnému zakoncentrování jednotlivých barevných amfolytů. Amfolyt o pI 8,6 prokazuje, že délka zóny přímo úměrně závisí na dávkovacím čase. Další barevný amfolyt o pI 7 se zakoncentrovává již méně díky jeho nižšímu pI a amfolyt o pI 6,2 se nezakoncentrovává již skoro vůbec. Z toho plyne, že pokud bychom použili amfolyt ještě o nižším pI nejenom že by nedošlo k zafokusování, ale jeho množství by se ještě snížilo o proti původní koncentraci, což by bylo způsobeno jeho migrací pryč opačným směrem z rozhraní.

Složení elektrolytů:

Vedoucí elektrolyty: L1: 0,01M NH₄OH + 0,01M NH₄Ac + 1% PEG + 400ppm povrchově aktivní látky, pH=8,62

L2: 0,01M NH₄Ac + 1% PEG + 400ppm povrchově aktivní látky, pH=6,75

Zakončující a mobilizační elektrolyt: T2: 0,03M HAc, pH=3,12

Dávkovací elektrolyt: T1: 0,002M HIS + 0,01M NH₄Ac + vzorek amfolytů, pH=6,95

Vzorek: nízkomolekulární syntetické barvy o pI=8.6+7+6.2

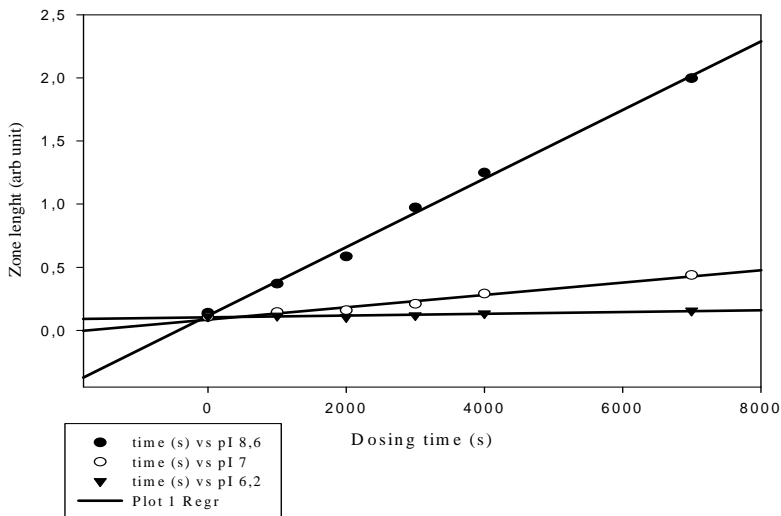
Tab 1: Závislost délky zóny na dávkovacím čase

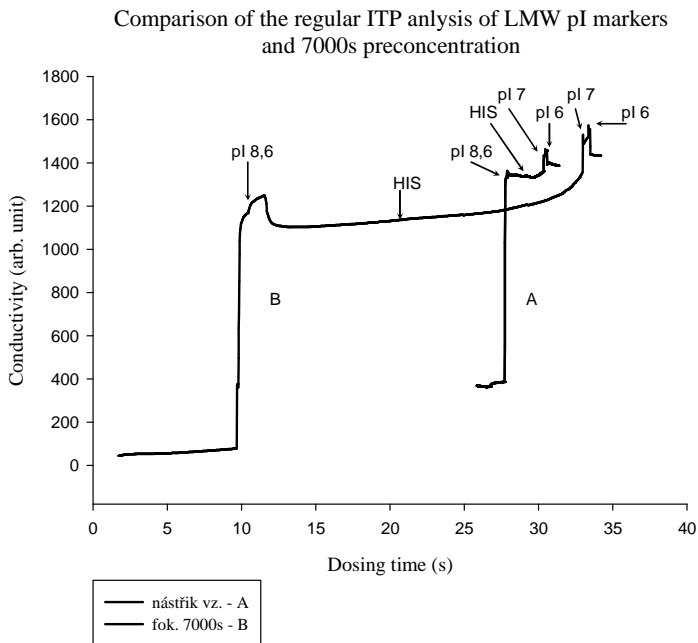
čas dávkování (s)	pI 8,6	pI 7	pI 6,2
0	0,139	0,106	0,109
1000	0,369	0,142	0,115
2000	0,585	0,158	0,105
3000	0,972	0,208	0,118
4000	1,248	0,29	0,134
7000	1,997	0,438	0,156

$$r^2 = 0,995$$

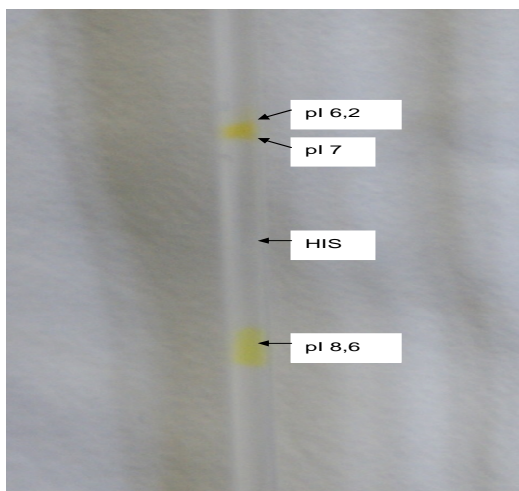
Obr. 1: Závislost délky zóny na dávkovacím čase

Dependence of the zone length
on the dosing time/constant conc of LMW pI markers
(8.6,7,6.2)





Obr. 3: Fokusované zóny



Viditelné rozhraní mezi jednotlivými zónami, vzniklé zóny jsou dokonale oddělené a čisté.

ZÁVĚR

Byl vytvořen elektrolytový systém a metoda fokusace v asymetrickém skokovém gradientu pH, který byl ověřen na modelových nízkomolekulárních syntetických barevných amfolytech. Dosažený stupeň zakoncentrování závisí na pI jednotlivých amfolytů a době fokusace, za dobu 7000 sec. došlo k zakoncentrování amfolytů o pI 8,6 14,4krát, pI 7 4,1krát a pI 6,2 1,4krát . Tím jsme prokázali správnost a účinnost metody. Tato metoda řádově rozšiřuje analytické schopnosti standardních elektromigračních metod a může najít uplatnění při pokročilých analýzách biologických vzorků.

LITERATURA

Pospíchal J., Glovinová E. (2001): Analytical Aspects of Carrier Free Isoelectric Focusing, Journal of Chromatography, 918(1): 195-203.

Slais, K., Friedl, Z. (1994): Low-Molecular-Mass pI Markers For Isoelectric-Focusing , Journal of Chromatography A, 661 (1-2): 249-256.