

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Új kapilláris izoelektromos fókuszálás tömegspektrometriával

PhD értekezés tézisei

Fenyvesiné Páger Csilla

Témavezető:

Dr. Kilár Ferenc

egyetemi tanár



PÉCS, 2012

1 Bevezetés

A kapilláris izoelektromos fókuszálás az egyik, legnagyobb felbontással rendelkező kapilláris elektroforézis technika, amelyet leginkább fehérjék és peptidok analízisére használnak. A módszer sikeresen alkalmazható az amfoter anyagok izoelektromos pontjának meghatározásán túl, összetett biológiai minták (fiziológiai folyadékok, szövetek) komplex analízisére is. Napjainkban a technika alkalmazási köre folyamatosan nő, ugyanis összekapcsolva más kromatográfiás technikákkal, valamint a tömegspektrometriával, az elválasztások hatékonysága tovább növelhető.

A fehérjék leghatékonyabb elválasztását biztosító kétdimenziós poliakrilamid gél elektroforézis első dimenziója izoelektromos fókuszálás, majd a második dimenzióban a fókuszált fehérjéket méretük alapján választják el a poliakrilamid gélben. A technika érzékenysége és hatékonysága ellenére eléggé időigényes kivitelezéssel (gélek öntése, minták előkészítése, futtatás, festési eljárások) jár és a minták mennyiségi meghatározása sem egyszerű. A módszer kiváltására az utóbbi években jelentősen fejlődő kapilláris izoelektromos fókuszálás-tömegspektrometria (CIEF-MS) kapcsolat tesz kísérletet. Az CIEF-MS technikák egy egyedülálló elválasztási módszert (CIEF) ötvöznek egy nagyon hatékony detektálási móddal. A kapcsolat, bár gyors meghatározásokat tesz lehetővé, automatizálható és érzékeny, megvalósításának azonban vannak korlátai, melyek leginkább a pH gradienst kialakító amfolitok jelenlétéből következnek (a minta ionizációjának elnyomása miatt).

Az általunk alkalmazott szekvenciális injektálási protokollal végrehajtott kapilláris izoelektromos fókuszálás új lehetőségeket nyújt hatékony tömegspektrometriás kapcsolat kialakítására. Kísérleteink során olyan mérési körülményeket próbáltunk kialakítani, amely töltött mintakomponenseket hoz létre, minél kisebb amfolit koncentráció jelenlétében. Ezekkel ugyanis elősegíthetjük az eredményesebb tömegspektrometriás detektálást. Az elválasztás összetett folyamatának értelmezésére a szekvenciális injektálás után végrehajtott kapilláris izoelektromos fókuszálás számítógépes szimulációjából próbáltunk következtetéseket levonni.

2 Célkitűzések

Munkánk során a szekvenciális injektálási protokollt követő kapilláris izoelektromos fókuszálás módszerét tanulmányoztuk és fejlesztettük az elválasztás hatékonyságát befolyásoló paraméterek módosításával. Fő célunk a rendszer tömegspektrometriával való eredményes összekapcsolása volt.

Kutatási célkitűzéseinket a következő pontokban foglaljuk össze:

- A kapilláris izoelektromos fókuszálás anolit és katolit oldatainak módosítása (illékony elektrolit oldatok használata) annak érdekében, hogy a módszert összekapcsolhassuk a tömegspektrometriás detektálással.
- A szekvenciális injektálási protokollal végrehajtott kapilláris izoelektromos fókuszálás során meghatározni az alkalmazott amfolit oldatok minőségének (pH tartományának), az injektált amfolitzónák hosszának és számának elválasztásra gyakorolt hatásait.
- A különböző injektálási protokollok szimulációja során feltérképezni az elválasztások dinamikáját egy széles pH tartományú amfolit alkalmazása mellett.
- Az elektrolit oldatok összetételének (pH-jának) módosítása során olyan elektrolit kombinációk keresése, ahol bizonyos komponensek a pH gradiens elhagyása után az elektrolit oldatba vándorolnak.
- Fehérjekeverék elválasztási lehetőségeinek vizsgálata szekvenciális injektálási protokollal kombinált CIEF-MS rendszerben.

3 Anyagok és módszerek

A vizsgálatokhoz készített minták nyolc különböző izoelektromos pontú (pI) amfoter vegyületet tartalmaztak, amelyek név szerint a következők: 4-amino-2-hidroxi-benzoészav (pI 2,7), 2-amino-5-klór-benzoészav (pI 3,0), 2-amino-benzoészav (pI 3,5), 2-klór-4-(4-morfolinilmetil)-6-nitrofenol (pI 5,3), 2-klór-4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-6-nitrofenol (pI 6,4), 2-(4-morfolinilmetil)-4-nitrofenol (pI 6,6), 2,6-bisz-(4-morfolinilmetil)-4-nitrofenol (pI 7,9) és 4-nitro-2,6-bisz-(1-piperidinilmetil)-fenol (pI 10,4). A fehérjeminták elkészítéséhez lizozimot, citokróm C-t, mioglobint és β -laktoglobulin A-t használtunk.

3.1 Kapilláris izoelektromos fókuszálás

A kapilláris izoelektromos fókuszálós kísérleteinkhez egy HP 3D gyártmányú kapilláris elektroforézis készüléket használtunk. Az elválasztások egy részét 50 μm belső átmérőjű, kezeletlen kvarc kapillárisokban végeztük, amelyek hossza 49 és 81,3 cm közé esett. A fehérjeminták mérése kezelt, PVA (polivinil-alkohol) kapillárisban történt, amely 124 cm (effektív hossz: 20,5 cm) \times 50 μm méretű volt. Az alkalmazott térerő 200 és 300 V/cm között változott. Anolit és katolit oldatokként különböző pH-jú és koncentrációjú hangyasav és ammónium-hidroxid oldatokat, illetve ezek keverékét használtuk. A minta és az amfolitok szekvenciális injektálási protokollja két, vagy három egymást követő lépésben 50 mbar nyomással történt (a kapilláris anódos végén). A feszültség hatására a pH gradiens elmozdítását a kezeletlen kapillárisokban a katód irányú elektroosmotikus áramlás végzi. A kezelt (PVA) kapillárisban kettő, vagy tíz perc fókuszálást követően 50 mbar nyomás alkalmazásával (feszültség fenntartása mellett) juttattuk el az izoelektroforetikus mintázatot a detektorokhoz. Az elválasztó kapillárison történő spektrofotometriás detektálást a 2,7; 3,0 és 3,5 izoelektromos pontú mintakomponensek esetén 200 és 250 nm-en, az 5,3; 6,4; 6,6; 7,9 és 10,4 izoelektromos pontú festékek esetén 200, 250 és 280 nm-en, míg fehérjék esetén 200 és 280 nm-en végeztük.

3.2 Tömegspektrometriás körülmények

A kapilláris elektroforézis készüléket egy Agilent LC/MSD Trap XCT Plus gyártmányú tömegspektrométerrel kapcsoltuk össze, amely ioncsapda analizátorral rendelkezik. Az Agilent LC/MSD Trap 5.3 programmal vezérelt MS berendezés egy ESI (elektrospray ionizáció) illesztőegységen keresztül csatlakozik a CE rendszerhez. Az egy gáztalanítóval és egy 1:100 elosztóval felszerelt Agilent 1100 izokratikus pumpa 10 $\mu\text{l}/\text{perc}$ -es áramlási sebességgel szállította a metanol:víz (1:1 arányú) elegyét (kiegészítő folyadék). A nyolc különböző izoelektromos pontú amfoter vegyület vizsgálatokor a tömegspektrométert az 50–1000 m/z tömegtartományban negatívion-módban használtuk. A tömegspektrumok adatgyűjtésénél öt tömegspektrumot átlagoltattunk. A kapilláris feszültséget 3 kV-ra állítottuk. A mérésekhez 250°C-os hőmérsékletű szárító gázt (nitrogén) 4 l/perc áramlási sebességgel, illetve 12,5 psi nyomású porlasztó gázt (nitrogén) használtunk.

A fehérjék vizsgálatokor a tömegspektrométert pozitívion-módban használtuk a 300–3000 m/z tömegtartományban. Az adatgyűjtésnél tizenöt szkennelést átlagoltattunk, és 3 kV-

ra állítottuk a kapilláris feszültségét. A mérésekhez 10 psi nyomású porlasztó gázt, valamint 325°C-os hőmérsékletű szárító gázt 5 l/perc áramlási sebességgel használtunk. A kiegészítő folyadék összetétele ezekben a mérésekben a metanol:víz (4:1 arányú) elegy volt, amely 1% (v/v) hangyasavat is tartalmazott. Az előbb említett folyadékot 5 µl/perc-es áramlási sebességgel használtuk.

3.3 Szimuláció

A szimulációkat GENTRANS programmal végeztük, az eredményeket SigmaPlot Scientific Graphing 10 segítségével jelenítettük meg. A szimulációs kísérletekben hét nitrofenol festéket (pI=5,3; 6,4; 6,6; 7,2; 7,9; 8,6 és 10,4) választottunk el. A 10 cm hosszú fókuszálási teret (kapillárist) 4000 egyenlő hosszúságú szegmensre osztottuk fel és a kísérletekben 1000 V feszültséget alkalmaztunk. A pH gradienst kialakító amfolit 101 komponensből állt, amelyeknek az izoelektromos pont értékei egyenletesen oszlottak el az alkalmazott 3–11 pH tartományban ($\Delta pI=0,08$). Minden amfolitkomponens ΔpK értéke 2,5; mobilitása $2,5 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ és kezdeti koncentrációja $0,0002 \text{ mol/dm}^3$ volt. A minta- és amfolitzónákat a teljes kapilláris hossz 20%-ába töltöttük. Anolitiként $0,01 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú foszforsavat, katolitiként $0,02 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú nátrium-hidroxidot alkalmaztunk.

4 Eredmények és következtetések

A kapilláris izoelektromos fókuszálás korábban kidolgozott szekvenciális injektálási protokollal megvalósított módszerét azzal a céllal módosítottuk, hogy a rendszert tömegspektrométerhez kapcsolhassuk. A nem illékony anolit és katolit oldatokat illékony hangyasavra és ammónium-hidroxidra cseréltük, illetve elhagytuk a korábban elektrooszmotikus áramlás (EOF) kontrollálásához használt metilcellulózt is. Kísérleteinkből az derült ki, hogy az anolit és katolit oldatok koncentrációja és pH-ja is befolyásolja a kialakuló pH gradiens tulajdonságait és ezáltal az elválasztások hatékonyságát.

4.1 Az amfolitzónák minőségének, hosszának és számának hatása a fókuszálásra

A szekvenciális injektálási protokoll legfőbb előnye az, hogy alkalmazásával olyan pH tartományú amfolit oldatok is használhatók az elválasztások során, amelyek nem fedik le a mintakomponensek izoelektromos pontjait.

A többféle pH tartományú és gyártójú amfolittal megvalósított elválasztások során a kétféle hullámhosszon történő UV detektálás lehetőséget adott arra, hogy nyomon követhessük a mintakomponensek (280 nm-en) és az amfolitzóna (200 nm-en) pontos elhelyezkedését. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy bár az amfolit pH tartományán kívül eső izoelektromos ponttal rendelkező komponensek közeledtek az amfolitzóna széleihez, de nem hagyták el a pH gradienst. Mivel kezeletlen kapillárisban az amfoter molekulák fókuszálása és detektor felé történő mozgatása egy időben zajlik, lehetséges, hogy a detektálás idejében a komponensek még nem érték el az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-értéket, ezért egy köztes állapotot detektáltunk. Az anolit és katolit oldatok pH-ja is szerepet játszik abban, hogy az amfolitzóna széléhez elért komponens el tudja-e hagyni a pH gradienst. Azaz olyan töltésű ionná válik-e a katolitban/anolitban, amely elősegíti számára az amfolitzóna elhagyását.

A 6,4 és 6,6 izoelektromos pontú festékeket kivéve hatékony elválasztásokat tapasztaltunk azokban a kísérletekben is, ahol az injektálási protokoll során csak egyetlen amfolitzónát alkalmaztunk a mintazóna előtt vagy mögött. Egy széles pH tartományú amfolit használata esetén az amfolitzóna mögé injektált minta komponensei az anolit oldattal érintkezve (izoelektromos pontjuknál kisebb pH-n) kationként kezdenek el vándorolni a katód felé, azaz bejutnak az amfolitzónába. Ott addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-értéket, azaz izoelektromos pontjuk alapján megtörténik az elválasztás. Fordított esetben a katolit oldattal érintkező mintakomponensek (izoelektromos pontjuknál nagyobb pH-n) anionként az anód, vagyis az amfolitzóna felé mozogva addig haladnak a folyamatosan kialakuló pH gradiensben, amíg nettó töltésük nullává nem válik. Szűk pH tartományú amfolit oldatok alkalmazásakor, a mintakomponensek elválasztásának elméleti megfontolásai problémát vetnek fel egyetlen amfolitzóna injektálása esetén. Az ezekben az esetekben tapasztalt „nem várt” elválasztás csak azzal magyarázható, hogy a szűk pH tartományú amfolit oldatok olyan amfolitkomponenseket is tartalmaznak (feltehetően nagyon kicsi mennyiségben), amelyeknek az izoelektromos pontja kívül esik a gyártó által jelzett pH tartományon és ezek a komponensek felelősek az elválasztásért.

A két különböző detektálási módszerrel (MS és UV detektálással) kapott izoelektroferogramok megfelelő összevethetőségéhez mindkét detektort azonos távolságra (69 cm-re) helyeztük az injektálási ponttól és azonos térerőt alkalmaztunk. A CIEF-MS kísérletek során rövidebb volt az elválasztások időtartama az UV detektáláshoz képest. Ezt a jelenséget a kiegészítő folyadék és a porlasztó gáz áramlása okozhatta, amelyek egyfajta szívó hatást eredményezve gyorsíthatták a kapillárisban lévő folyadék áramlását az MS detektor felé. A csúcsok zónaszélesedése az MS izoelektroferogramokon a kiegészítő folyadék mintazóna hígító hatásával magyarázható. A kiegészítő folyadék és a porlasztó gáz indukálta hátrányok ellenére, a mintakomponensek detektálása és azonosítása könnyen megvalósítható a festékek ismert tömegspektrumainak segítségével.

A CIEF-MS kísérletekben az MS detektálás hatékonyságát a vizsgált komponensek kémiai környezete jelentősen befolyásolja. Az EOF jelenlétében végbemenő fókuszálás az általunk használt szekvenciális injektálási protokollal megvalósítva, egy összetett pH gradiens kialakulást feltételez, ahol az amfolit- és mintakomponensek az EOF jelenlétében vándorolnak, de a vándorlási sebességük folyamatosan változik, míg végül eléri „végső pozíciójukat” a detektor felé mozgó pH gradiensben, vagy azon kívül. Azok a mintakomponensek, amelyek izoelektromos pontja kívül esik az alkalmazott amfolit oldat pH tartományán, a „végső pozíciójukban” (akár a pH gradiensben, akár azon kívül helyezkednek el) valószínűleg töltött állapotban maradnak. Vagyis, ha az előbb említett molekulák sorban állnak az amfolitzóna katolit vagy anolit felé eső határánál, akkor ebben a kémiai környezetben ionos állapotban lesznek jelen, amely elősegíti ezen anyagok eredményesebb MS ionizációját és detektálását. Az amfolitzóna határainál kisebb lehet az amfolitkomponensek koncentrációja is, amely szintén hatékonyabb MS detektálást tesz lehetővé a mintakomponensek számára, mivel csökken az amfolitkomponensek által okozott zavaró hatás (amikor a minta ionizációját elnyomja az amfolitkomponensek ionizációja).

A többféle amfolit oldattal (és injektálási protokollal) megvalósított kísérletekből az a következtetés vonható le, hogy kapilláris izoelektromos fókuszálás szekvenciális injektálási protokollal kombinálva hatékonyan összekapcsolható MS detektálással. A kezeletlen szilika kapillárisban kialakított CIEF-MS módszerek gyorsak (10 percen belüli elválasztások). Az egyetlen amfolitzóna alkalmazásával (a mintazóna előtt, vagy mögött) megvalósított injektálással kapott sikeres elválasztások egy új lehetőséget nyitnak a szekvenciális injektálási protokollok kialakításában. Mivel az utóbbi rendszerekben a fókuszálás megvalósulása egy összetett folyamat eredménye, ezért annak megértése az izoelektromos fókuszálás részletes szimulációját teszi szükségessé.

4.2 A különböző injektálási protokollok szimulációja

A szimulációs kísérletek során a mintainjektálás módjának elválasztásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk kezeletlen kapillárisban egy széles pH tartományú (3–11 pH) amfolitoldatot használva. A kapillárisban kialakuló elektroosmotikus áramlás a katód irányába mozdította el a kialakuló pH gradienst. A hagyományosan használt mintainjektálás (a minta és az amfolit homogén keverékének használata) mellett hatféle injektálási módot hasonlítottunk össze. A minta elhelyezkedhetett az amfolitzóna elején, végén és az amfolitzóna belsejében is, valamint a zóna előtt, mögött és két amfolitzóna között is (az utóbbi három esetben a mintazóna nem tartalmazott amfolitot).

Ha az előbb említett hatféle módon juttattuk be a mintát a kapillárisba, akkor a minta elválasztása és fókuszálása kationos, vagy anionos vándorlásként, vagy ezek keverékeként értelmezhető, amikor a minta az amfolitzóna anód, vagy katód felőli végén, vagy valahol a zónában helyezkedett el. Az elválasztások szinte zónaelektroforézis-szerűen történtek, azzal az eltéréssel, hogy az elválasztás közege itt folyamatosan változott az időben (a pH gradiens fokozatos kialakulása miatt). A molekulák ilyen módon bekövetkező elválasztása teljesen eltért az eddig tapasztalt, a fókuszálás elején úgynevezett „kettős-csúcsokat” eredményező elválasztástól (amely akkor alakul ki, ha a mintát és az amfolitot injektálás előtt egyenletesen keverik össze). Mind a hatféle esetben a mintakomponensek gyorsabban váltak el egymástól, mint az amfolitkomponensek. Majd a kezdeti elkülönülés után a komponensek addig vándoroltak a pH gradiensben, amíg el nem érték azt a helyet, ahol a nettó töltésük nullává vált (izoelektromos pontnak megfelelő pH-érték).

A szimulációs kísérletekből az is kiderült, hogy abban az esetben, amikor a mintát két amfolitzóna közé injektáljuk (és a minta nem tartalmaz amfolitot) a fókuszálás során a gradiens egyéb részeihez képest egy kisebb amfolit koncentrációjú rés alakul ki a minta eredeti helyén. Ennek a résnek a tulajdonságai mintamátrix függőek voltak és itt a pH gradiens meredeksége laposabbá vált. Ez a fajta mintainjektálási mód egy elektromos vezetőképesség „*gap*”-et (rés/völgyet) (egy túlmelegedett részt) eredményez a kapillárisban, amelynek romboló hatásai lehetnek a fókuszálásra.

A szimulációk eredményei azt mutatták, hogy a minta rövid zónában való injektálása a kapilláris izoelektromos fókuszáláshoz előnyös lehet kezeletlen kapillárisban.

Azért, hogy a szekvenciális injektálási protokollal végrehajtott kapilláris izoelektromos fókuszálást még hatékonyabban tudjuk alkalmazni amfoter anyagok elválasztására, szűk pH

tartományú amfolitok felhasználásával is tervezünk szimulációkat, amelyek elősegítik a fókuszálás összetett folyamatának megértését.

4.3 A katolit és az anolit oldatok összetételének hatása a fókuszálásra

A CIEF-MS kísérletekben a mintakomponensek amfolitzóna (pH gradiens) elhagyása (azaz egy amfolit-mentes környezetben való elhelyezkedés ionos formában) elősegíti a vizsgált molekulák MS detektálását/ionizációját, mivel csökken az amfolitkomponensek jelenlétének zavaró hatása.

Elméletileg, ha a vizsgált minta izoelektromos pontja nagyobb, mint a katolit oldat pH-ja (azaz a katolitba kerülő részecske kationként a katód felé mozdul), vagy a minta izoelektromos pontja kisebb, mint az anolit pH-ja (azaz az anolitba kerülő molekula anionként az anód felé mozdul), akkor a fókuszálási folyamat végén az amfolit pH tartományán kívüli izoelektromos ponttal rendelkező mintakomponenseknek ki kellene vándorolni a pH gradiensből.

Három (különböző gyártótól származó) szűk pH tartományú amfolitot és öt nitrofenol festéket (amelyek izoelektromos pontjának többsége kívül esett az alkalmazott amfolitok pH tartományán) választottunk ki a kísérleteinkhez, amelyek során megvizsgáltuk az elektrolit oldatok pH-jának hatását az izoelektromos fókuszálás folyamatára. Kísérleteink azt mutatták, hogy az elektrolit oldatok összetételének (pH-jának, az egyes ionok koncentrációjának) megváltoztatása a fókuszálás folyamatának egyéb paramétereit is jelentősen befolyásolja. A következő paraméterek változását figyeltük meg: az amfolit zónájának hossza, a mérés időtartama, a vizsgált részecskék vándorlási tulajdonságai (összefüggve az anyag izoelektromos pontjával), a csúcsok felbontása, a csúcsok alakja (vagyis a fókuszálás hatékonysága), a mintakomponensek töltése (abszorpciós spektrum változása).

A két különböző gyártó által forgalomba hozott, de elméletileg azonos pH tartományt (7–9 pH) lefedő amfolit oldatok használatakor bár találtunk hasonlóságokat az elválasztásokban, de a 10,4 pI-ú festék helyzete a pH gradiensben nagyon eltérő volt az azonos mérési körülmények alkalmazásakor. Míg a BioLyte amfolitban az előbbi anyag mindig (bármilyen elektrolit oldat kombinációt is használtunk) a pH gradiensben vándorolt (bár izoelektromos pontja kívül esik az amfolit pH tartományán), addig az Ampholine-ban ugyanez a komponens majdnem mindig a pH gradiens szélén (vagy azon kívül) jelent meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a BioLyte a gyártó által jelzett (7–9) pH tartományán

kívüli (annál nagyobb) izoelektromos pontú amfolitkomponenseket is tartalmazhatott, amelyek izoelektromos pontja 10,4 körüli.

10-es pH-nál kisebb pH-jú katolit oldatok használatakor megfigyelhető, hogy bizonyos kísérleti körülmények között (Ampholine pH 7–9 esetén, ha $pH_{\text{anolit}} = 6,0$; 6,9 vagy 7,5 és $pH_{\text{katolit}} = 9,9$ vagy 9,1; Servalyt pH 6–8 esetén, ha $pH_{\text{anolit}} = 5,0$; 5,9 vagy 6,5 és $pH_{\text{katolit}} = 8,9$) a 10,4 pI -ú anyag az amfolitzóna előtt, azt elhagyva haladt a katód felé. Ez összhangban volt elvárásainkkal, azaz a 10,4 pI -ú komponens pozitív ionként vándorolt a 9,9 és 9,1 pH-jú katolitban és az Ampholine pH 7–9 amfolit nem tartalmazott 10-nél nagyobb izoelektromos pontú amfolitkomponenseket. Mivel a Servalyt pH 6–8 esetén (az Ampholine pH 7–9-hez képest) kevesebbszer tapasztaltuk a 10,4 pI -ú komponens amfolitzóna elhagyását, ezért ez az amfolit 9-nél nagyobb, de 10,4-nél kisebb izoelektromos pontú amfolitkomponenseket is tartalmazhatott. A BioLyte-ban a korábban már említett a 10,4 izoelektromos pont körüli amfolitkomponensek jelenléte nem engedte, hogy 10,4 pI -ú festék elhagyja az amfolitzónát. Az amfolitzóna anolit felé eső végénél sosem tapasztaltuk az 5,3 pI -ú festék pH gradiensen kívüli vándorlását, még azokban a kísérletekben sem, ahol az anolit oldat pH-ja nagyobb volt, mint 5,3. A jelenség itt is az amfolitkeverékek összetételével magyarázható. Azaz, az amfolitok tartalmazhattak a gyártók által jelzett pH tartományukon kívüli, annál kisebb izoelektromos pontú amfolitkomponenseket (5,3 körüli pI -tal). Ezek jelenléte okozhatta azt, hogy azok a mintakomponensek is, amelyek izoelektromos pontja elvileg kívül esett az alkalmazott amfolit pH tartományán a pH gradiensben (amfolitzónában) vándoroltak.

A kísérletsorozatban megfigyeltük bizonyos komponensek ($pI=6,4$ és 6,6) vándorlási sorrendjének változását, vagy a molekulák egyúttvándorlását is. Ezekből a jelenségekből arra következtethetünk, hogy az elektrolit oldatok összetételének jelentős hatása van a fókuszálás folyamatára és egyúttal a mintakomponensek töltöttségi állapotára is.

Bár az elektrolit oldatok pH-jának módosításával végzett kísérletek azt mutatták, hogy a háromféle gyártótól származó amfolitok mindegyike tartalmaz a jelzett pH tartományukon kívüli izoelektromos pontú komponenseket, mégis ki tudunk alakítani olyan kísérleti körülményeket, ahol a mintakomponens töltött részecskeként vándorolt az amfolitzónán kívül. Különösen a katolit oldat pH-jának beállítása kisebb pH-értékre, mint a vizsgálandó részecske izoelektromos pontja, segítette elő a minta amfolitzóna elhagyását. Ezek az eredmények előnyösek a tömegspektrometriás detektálással megvalósított kapilláris izoelektromos fókuszálások esetén.

4.4 A fehérjék CIEF-MS elválasztása

A fehérjék kapilláris elektroforézissel történő elválasztásakor a legnagyobb kihívást a kapilláris belső fala és a makromolekula között kialakuló irreverzibilis kölcsönhatás kiküszöbölése jelenti. A falon létrejövő adszorpció a csúcsok kiszélesedéséhez és az elválasztások hatékonyságának romlásához vezet. A kezelt kapillárisok alkalmazásával gátolhatjuk, vagy csökkenthetjük a fehérje és a kapilláris fala közötti kölcsönhatást.

A fehérjék (lizozim, citokróm C, mioglobin, β -laktoglobulin A) CIEF-MS elválasztása egy kezelt PVA (polivinil-alkohol) kapillárisban történt. Mivel ebben a kapillárisban az EOF nagysága a nullához közelít, ezért a CIEF kísérleteinkhez a korábbiaktól eltérően (ahol az EOF végezte a mobilizálását) a fókuszálási lépés után nyomással történt a pH gradiens mozgatása. A CIEF-MS mérések követelménye az amfolit koncentrációjának csökkentése, annak érdekében, hogy elkerüljük a minta ionizációjának elnyomását. A túl kicsi amfolit koncentráció viszont befolyásolja a fókuszálás hatékonyságát, ezért az amfolit oldatok koncentrációját nem csökkentettük 1% alá.

Az elektrolit oldatok pH-jának szisztematikus változtatásakor azt tapasztaltuk, hogy csak az a komponens hagyta el a pH gradienst, amelynek izoelektromos pontja nagyobb volt, mint a használt amfolit pH tartománya. Ezért a fehérjékkel végzett kísérletekben a korábban használt 7–9 pH tartományú amfolit mellett kisebb pH tartományú (4–6 pH) amfolit oldatokat is alkalmaztunk annak érdekében, hogy több fehérje hagyhassa el az amfolitzónát. A 7–9 pH tartományú amfolit oldat alkalmazásakor a lizozim ($pI=11,1$) és a citokróm C ($pI=10,2$) az amfolitzóna szélén jelent meg, nem hagyta el azt. A 4–6 pH tartományú amfolit alkalmazásakor összehasonlítottuk a két, illetve csak egy amfolitzónát használó injektálási módokat, és azt állapítottuk meg, hogy mindkét esetben elválaszthatóak a fehérjék egymástól. Bár itt sem hagyta el a lizozim a pH gradienst, a kapott tömegspektrumokon jól látszott, hogy a lizozim tömegspektruma szinte nem is tartalmaz amfolitkomponenseket. Vagyis a lizozim „majdnem” amfolit-mentesen érte el az MS detektort.

A fehérjékkel végzett mérések során azt tapasztaltuk, hogy a szekvenciális injektálási protokoll (amely kevesebb amfolit mennyiséget használ) alkalmazásakor (illetve az egyéb kísérleti körülmények megfelelő beállítása mellett) az amfolitzónában a pH gradiensen kívüli izoelektromos pontú anyagok töltött állapotban lesznek (akár elhagyják az amfolit zónáját, akár nem), ez mindenképpen elősegít egy hatékonyabb MS detektálást.

5 Összefoglalás

A szekvenciális injektálási protokollal végrehajtott kapilláris izoelektromos fókuszálást sikeresen összekapcsoltuk az ioncsapda analizátorral rendelkező tömegspektrométerrel. Az elválasztás hatékonyságát befolyásoló paraméterek szisztematikus változtatása során új módszereket találtunk az amfoter anyagok hatékonyabb elválasztására és eredményesebb tömegspektrometriás detektálására.

Az értekezés tézisei:

- A szekvenciális injektálási protokollt követő kapilláris izoelektromos fókuszálás elektrolit rendszerét illékony anolit (hangyasav) és katolit (ammónium-hidroxid) oldatokra cseréltük. Ezáltal lehetőség nyílt a módszer tömegspektrometriával való összekapcsolására. Megállapítottuk, hogy az anolit és katolit oldatok koncentrációja és pH-ja is befolyásolja a kialakuló pH gradiens tulajdonságait, azaz a fókuszálások hatékonyságát.
- Egyetlen amfolitzóna injektálásakor (a minta zónája elé, vagy mögé) is eredményes elválasztásokat valósítottunk meg. Ezzel egy új injektálási eljárást vezettünk be.
- A kapcsolt CIEF-MS rendszerekben az amfoter anyagok gyors elválasztását értük el. Az elektropray illesztőegység adottságai (kiegészítő folyadék, porlasztógáz) az elválasztások hatékonyságát többnyire csökkentette, de az esetlegesen el nem váló csúcsok azonosítása az anyagok tömegspektrumainak ismeretében könnyen megvalósítható.
- A szimulációk során a különféle injektálási protokollok összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a minta rövid zónában való injektálása az amfolitzóna elé, vagy mögé különösen előnyös lehet a kezeletlen kapillárisokban (elektroozmotikus áramlás jelenlétében) kialakított kapilláris izoelektromos fókuszálásokhoz. A szimulációk lehetőséget adtak a fókuszálás során lezajló összetett folyamatok értelmezésére.
- Az elektrolit oldatok összetételének (pH-jának) megfelelő beállításával sikerült elérni egy, az amfolit pH tartományán kívüli izoelektromos pontú anyag amfolitzóna elhagyását.
- Olyan mérési körülményeket alakítottunk ki, amelyek alkalmasak voltak egy fehérjekeverék kapilláris izoelektromos fókuszálással megvalósított elválasztására tömegspektrometriás detektálás alkalmazása mellett.

6 Megjelent közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Páger Cs., Dörnyei Á., Kilár F.: Sequential injection setup for capillary isoelectric focusing combined with MS detection

Electrophoresis 2011, 32, 1875–1884

IF: 3,303

Takácsi-Nagy A., Kilár F., **Páger Cs.**, A. Mosher R., Thormann W.: Sampling strategies for capillary isoelectric focusing with electroosmotic zone mobilization assessed by high-resolution dynamic computer simulation

Electrophoresis 2012, 33, 970–980

IF: 3,303 (2011)

Páger Cs., Vargová A., Takácsi-Nagy A., Dörnyei Á., Kilár F.: Effect of electrolyte pH on capillary isoelectric focusing with narrow pH range ampholytes

Electrophoresis (közlésre elfogadva)

IF: 3,303 (2011)

Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

Kilár F., Gagy L., Kilár A., **Páger Cs.**, és mások: Effect of chemical structure on molecular recognition by proteins followed by capillary electrophoresis. ITP 2006, 15th International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, 28-30 August, 2006, Paris, France, Abstract Book, L12, pp.24.

Páger Cs., Rezeli M., Kilár F., Végvári Á.: Capillary isoelectric focusing of dyes in uncoated capillary with UV and MS detections. 7th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS project, 10-15 June, 2007, Pécs, Hungary, Abstract Book, pp.46.

Páger Cs., Rezeli M., Kilár F., Végvári Á.: CIEF-MS analysis of different dye substances in uncoated capillary. 22nd International Symposium on MicroScale Bio-separations & Methods for Systems Biology, 9-13 March, 2008, Berlin, Germany, Abstracts Book, pp.265.

Páger Cs., Kilár F.: Possibilities of determination of different dye substances using CIEF-MS analysis. 9th International Symposium on Instrumental Analysis, 29 June – 2 July, 2008, Pécs, Hungary, Abstract Book, pp.100.

Kilár F., **Páger Cs.**, Takácsi-Nagy A., Thormann W.: Kapilláris izoelektromos fókuszálás tömegspektrometriával kapcsolva – modell-számítások. Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2008, 2008. november 5-7, Sárvár, konferencia munkaanyag 68.o.

Páger Cs., Kilár F.: Possibilities of modification of sandwich injection set-up in CIEF analysis with MS detection. 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, 2-4 September, 2009, Siófok, Hungary, Abstract Book, P41, pp.111.

Páger Cs., Dörnyei Á., Kilár F.: Effects of the sandwich injection parameters on the pH gradient in CIEF analysis with MS detection. CECE 2009 6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 6-7 November, 2009, Pécs, Hungary, Abstract Book, P34, pp.71.

Kilár F., **Páger Cs.**, Takácsi-Nagy A., Dörnyei Á., Thormann W.: Capillary isoelectric focusing coupled to mass spectrometry. CECE 2009 6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 6-7 November, 2009, Pécs, Hungary, Abstract Book, L18, pp.36.

Páger Cs., Takácsi-Nagy A., Thormann W., Kilár F.: Novel methodology to couple isoelectric focusing with mass spectrometry – experimental and theoretical advances. 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010, 21-25 March, 2010, Prague, Czech Republic, Abstract Book, L13, pp.32.

Páger Cs., Vargová A., Kilár F.: Effect of the pH of the anolyte and catholyte solutions in CIEF analysis with sandwich injection set-up. 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010, 21-25 March, 2010, Prague, Czech Republic, Abstract Book, P090, pp.105.

Takácsi-Nagy A., **Páger Cs.**, Kilár F., Thormann W.: Advances of computer modelling in capillary isoelectric focusing. CECE 2010 7th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 14-17 October 2010, Pécs, Hungary, Abstract Book, P28, pp.63.

Kilár F., **Páger Cs.**, Vargová A., Takácsi-Nagy A., Thormann W.: Capillary isoelectric focusing combined with MS detection. HPLC 2011 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19-23 June 2011, Budapest, Hungary, L16

Páger Cs., Vargová A., Kilár F.: The effect of pH of the background electrolytes on CIEF applying sequential injection protocol. HPLC 2011 36th International Symposium on High-

Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19-23 June 2011, Budapest, Hungary, P1-G-146-Tu

Kilár F., **Páger Cs.**, Dörnyei Á., Vargová A., Takácsi-Nagy A., Thormann W.: The strength and future of isoelectric focusing in bioanalysis. 27th International Symposium on Microscale Bioseparations and Analyses MSB 2012, 12-15 February 2012, Geneva, Switzerland, KN37

Páger Cs., Dörnyei Á., Kilár F.: CIEF-MS analysis of proteins using sequential injection setup. 27th International Symposium on Microscale Bioseparations and Analyses MSB 2012, 12-15 February 2012, Geneva, Switzerland, P704

Az értekezés témáján kívül készült tudományos közlemények

Gáspár A., **Páger Cs.**: Capillary electrophoretic determination of mercury compounds in different matrixes. *Chromatographia*, 2002, 56, 115-120 IF: 1,23

Páger Cs., Gáspár A.: Possibilities of determination of mercury compounds using capillary zone electrophoresis. *Microchemical Journal*, 2002, 73, 53-58 IF: 1,325

Vasas G., Gáspár A., **Páger Cs.**, Surányi Gy., Máthé Cs., M-Hamvas M., Borbély G.: Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2004, 25, 108-115 IF: 3,743

Stanová A., Marák J., Rezeli M., **Páger Cs.**, Kilár F., Kaniánsky D.: Analysis of therapeutic peptides in human urine by combination of capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry with preparative capillary isotachopheresis sample pre-treatment. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 8701-8707 IF: 4,531

Tálos K., Pernyeszi T., Majdik C., Hegedúsova A., **Páger Cs.**: Cadmium biosorption by baker's yeast in aqueous suspensions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2012, 77, 549-651 IF: 0,879 (2011)

Az értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

Páger Cs., Gáspár A.: Higanyvegyületek meghatározása kapilláris elektroforézis módszerrel. 44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, 2001. június 25-27, Baja, MKE kiadvány, 95-98. o.

Páger Cs., Gáspár A.: Speciation of mercury using capillary zone electrophoresis. Balaton Symposium, 2-4 September, 2001, Siófok, Book of Abstracts, pp.56.

Páger Cs., Gáspár A.: Speciation of mercury using capillary electrophoresis. X. Hungarian-Italian Symposium on Spectrochemistry, 1-5 October, 2001, Eger, Abstract Book, pp.104.

Gáspár A., **Páger Cs.**, Kilár F.: Applicability of capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection to mercury speciation. HPCE 2002, 15th International Symposium on Microscale Technique, 13-18 April, 2002, Stockholm, Abstract Book, P247, pp.332.

Gáspár A., Posta J., Buglyó P., **Páger Cs.**: Application of capillary zone electrophoresis for speciation analysis. 3rd International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 23-29 June, 2002, Warsaw, Abstract Book, pp.13.

Páger Cs., Gáspár A.: Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis. 3rd International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 23-29 June, 2002, Warsaw, Abstract Book, pp.43.

Páger Cs., Gáspár A., Kilár F.: A kapilláris elektroforézis alkalmazása lézer indukált fluoreszcens detektálással higany speciációs vizsgálatokhoz. 45. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, 2002. július 1-3, Siófok, MKE kiadvány, 172-175. o.

Gáspár A., **Páger Cs.**, Kilár F.: Speciation analysis of mercury compounds by capillary electrophoresis. Euroanalysis 12, 8-12 September, 2002, Dortmund, Abstract Book, pp.112.

Vasas G., Gáspár A., **Páger Cs.**, Borbély G.: Determination of cyanobacterial toxins by HPLC and CE methods. 4th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 22-29 June, 2003, Cluj Napoca, Romania, Abstract Book, L7. pp.17.

Gáspár A., **Páger Cs.**, Kilár F.: Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. 6th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 29 May - 4 June, 2005, Prague, Czech Republic, Abstract Book, P8, pp.68.

Tálos K., **Páger Cs.**, Kilár F.: Determination of nitrate and nitrite by capillary isotachopheresis in different water samples. International Conference "Students for students", 18-20 April, 2008, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, pp.134.

Gálicza J., Vargová A., Sándor V., **Páger Cs.**, Fodor R., Miklóssy I., Ábrahám B., Lányi Sz., Kilár F.: Preparation and investigation of bioactive transferrin-iron complexes formed with different synergistic anions. 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010, 21-25 March, 2010, Prague, Czech Republic, Abstract Book, P240, pp.181.