

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Az izoelektromos fókuszálás dinamikája

PhD értekezés tézisei

Dr. Takácsi-Nagy Anna

Témavezetők:

Dr. Kilar Ferenc, Dr. Wolfgang Thormann

egyetemi tanárok



PÉCS, 2017

1 Bevezetés

Az izoelektromos fókuszálást (IEF) egy nagyfelbontású analitikai elválasztásként azonosítják, amely amfoter komponensek izoelektromos pontjuk (pI) alapján történik. E technika iránt megnövekedett igény teszi szükségessé a megfelelő modell-számítások elvégzését és elemzését. A számítógépek megjelenésével megújult érdeklődés mutatkozott a szimulációk és a modellprogramok iránt, amelyek segítik az elválasztástudomány körében végzett kutatások jobb megértését. Mielőtt bármilyen laboratóriumi munka elkezdődne, a számítógépes szimulációk lehetővé teszik a rendszer viselkedésének feltárását, ezzel utánozva a valós kísérletek folyamatait, mint például az elválasztási dinamikát, a pH gradiens kialakulását és stabilitását, az elektroforetikus mobilizálást és az amfoter vegyületek fókuszálását. Jó minőségi egyezést kapunk az irodalomban publikált gyakorlati kísérletekkel (Thormann és Mosher 1988; Mosher és mtsai 1992; Mosher, Thormann, és mtsai 1989; Mosher, Dewey, és mtsai 1989; Thormann és mtsai 1986). A szimulációk alkalmasak a teljes szeparációs folyamat lépésről lépésre történő felmérésére, valamint az elválasztási körülmények optimalizálására, mint például az injektálási protokoll, az amfolitok vagy az alkalmazandó elektrolitrendszerek tulajdonságai.

Injektálási protokoll

Az általános gyakorlat szerint a kapillárisban kivitelezett IEF konfigurációkban a mintakomponensek és az amfolitok keverék formájában kerülnek injektálásra. Kilar és munkatársai (Kilar és mtsai 1998) további fejlesztése, a szekvenciális injektálási protokoll hatékony elválasztást biztosít azon amfoter vegyületeket esetében, amelyeknek pI értékei a létrehozott pH gradiens tartományán kívül esnek. Az amfolit és a minta komponenseknek az elektroforetikus térbe való külön-külön injektálása, azaz a szendvics (amfolit/sample/amfolit) vagy félszendvics (amfolit/minta vagy minta/amfolit) injektálási stratégiák egyedi előnyöket nyújtanak az elemzéshez, és további előnyei vannak a tömegspektrometriás detektálás során is (Páger és mtsai 2011).

Amfolitok, idegen anyagok és elektrolitok

A Svensson (Svensson 1961) által leírt természetes gradiensekben elektromos áram hatására az amfolitok keverékéből kialakul a fókuszáló gradienst. Ezeket a természetes pH-gradienseket jól definiált amfoter elektrolitok (amfolitok) képezik, amelyek nagy pufferkapacitással rendelkeznek és jó a vezetőképességük. A hordozó amfolitok olyan kisméretű molekulák, amelyeknek nincs elnyelése olyan hullámhosszon, ahol a fehérjék jellemzően abszorbeálódnak

(Berkelman 2005). A mintákkal való kémiai és biológiai reakció hiánya vagy a festékekkel és más molekulákkal nagyon alacsony, nonspecifikus kötődés ugyancsak kritérium (Haglund 1971, Rilbe 1973, Righetti 1983, Garfin és Ahuja 2005). Az alkalmazott amfolitok általában vizes oldatban vannak jelen, ezért az IEF rendszerben mindig találunk vízmolekulákat. A tiszta víz molekulái biprotikus amfolit molekuláknak tekinthetők, amelyek mindkét pK értéke megegyezik 7,0-tel (Righetti 2005), azonban amfolitként nem hordoznak jelentős töltést, így a átviteli szám megközelíti a nullát. A hidrogén és a hidroxilionok által hordozott töltés elhanyagolható (Shimao 1981). Megfelelő mennyiségű amfolit hiányában a vízionok nettó töltése nulla lesz a pH gradiens semleges pontján (Svensson 1962, Kolin 1970). Ez a folyamat felelős a tiszta vízzóna kialakulásáért.

Az IEF konfigurációk érzékenyek az elektrolitokba vagy a rendszerbe bekerülő idegen anyagok vagy sók igen kis koncentrációjára is (Fidler és mtsai, 1985). Ezek nagymértékben megváltoztathatják az összetevők migrációs sebességét, pH-eltolódást okozhatnak a kapilláris vége felé, sőt a torzulást is. A lúgos pH-n jelenlevő karbonát várhatóan a rendszer pH-ját, vezetőképességét és ionerősségét is érintik (Persat és mtsai 2009, Mikkonen és mtsai, 2015). A záró elektrolitokban feloldott széndioxid hatással van a hagyományos IEF-re, és ezt a hatást gyakran használják endozmózis kiváltására (Delincée és Radola 1978), és mobilizálásra (Hjertén és Zhu 1985).

A pH-gradiens kialakulása és stabilitása az IEF-rendszerben használt anolittól és katolittól is függ. Az elektrolitok összetétele és fizikai kémiai paraméterei jelentős mértékben befolyásolják az elektroforetikus rendszerek teljesítményét. Az elektrolitoldatok ionerőssége és pH-értéke befolyásolja az érzékenységet és a hatékonyságot is. Általában nem illékony savakat és bázisokat használják anolitként és katolitként. A legtöbb esetben a foszforsav és a nátrium-hidroxid oldat bizonyult alkalmasnak.

2 Célkitűzések

Munkám célja a kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolatos egyes folyamatok tanulmányozása számítógépes modellezés segítségével. A számítógépes szimulációk azért is fontosak, mert az elválasztási folyamatok egyes fázisai nem láthatók jól a valós kísérletek során.

A kapilláris izoelektromos fókuszáló rendszerek tekintetében a következő célokat tűztem ki:

- A különböző injektálási protokollok és a kezdeti mintaeloszlás hatásának vizsgálata az izoelektromos fókuszálási folyamatra.
- Az anolit és a katolit pH-jának az izoelektromos fókuszálás szelektivitására és sebességére gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A különböző elektrolitoldat-párok hatásának vizsgálata az elválasztás dinamikájára.
- A fókuszálás során azoknak a feltételeknek a feltárása, amelyek a tiszta vízzőna kialakulásához és megelőzéséhez vezetnek.
- Az elektroforetikus rendszerekben bizonyos szennyeződések hatásának vizsgálata az ionerősségre, vezetőképességre és a pH-ra.

3 Anyagok és módszerek

3.1 A szimulációs program

Az IEF kezdeti szimulációja többek közt a Bier és munkatársai nevéhez fűződő modell programmal volt lehetséges (Bier és mtsai 1983, Saville és Palusinski 1986, Palusinski és mtsai, 1986). Mosher és Thormann ezen korai szimulációs program alapján fejlesztették ki GENTRANS (generalised model for transient electrophoretic processes) modelljüket. (Thormann és mtsai 1986, Mosher, Thormann és mtsai 1989, Sounart és mtsai 2005, Thormann és mtsai.) Ez a program lehetővé teszi a fehérjék és peptidek (Mosher, Gebauer és mtsai 1992), biprotikus amfolitok, egyértékű gyenge savak és bázisok, valamint egyértékű erős savak és bázisok kezelését. *In situ* elektroozmotikus áramlást (EOF) számol ún. „fal titrálás” alapján (Mosher és mtsai, 1995, Thormann és mtsai, 1998), és lehetővé teszi a dugó szerű áramlás alkalmazását (Thormann és mtsai, 1993). A programot továbbfejlesztették 300 komponens és maximálisan 20000 szegmens használatára. A szükséges bemeneti paraméterek közé tartozik a kapilláris tér hossza és szegmentáltsága, az egyes komponensek kezdeti eloszlása, a pK és a mobilitási értékek, amelyek leírják az egyes vegyületeket, továbbá szükséges definiálni az elektroozmózis adatait, az áramsűrűséget és az elektroforézis időtartamát.

A modell kimeneti adatai közé tartozik az egyes komponensek koncentrációja, pH-értéke, ionerőssége, áramlási eloszlása és vezetőképességi értékei, és a szimulációs folyamat végén a nettó elektroosmotikus áramlás és áramsűrűség is rendelkezésre áll. A szimulációk végrehajthatók fix vagy változó határfeltételekkel, ami szabályozza, hogy a puffer és mintavegyületek szabad átjárása akadályozott vagy megengedett legyen az elválasztó térbe ill. a térből. Ez a szimulációs program magában foglalja az adatsimítás lehetőségét is, amely eltávolítja a numerikus oszcilláció következtében létrejött negatív koncentrációkat, és ezáltal lehetővé teszi a szimulációk végrehajtását kisebb szegmensek használatával.

A bemutatott modell részletesen leírja azokat az alapelveket, amelyek az oldatok elektroneutralitására, a tömeg- és a töltésmegmaradásra, valamint a különböző reakcióegyensúlyokra vonatkoznak (Okhonin és mtsai 2004, Andreev és Lisin 1993, Mosher, Dewey és mtsai, 1989). Ez az egydimenziós szimulációs program magába foglalja az egységes grideket használó másodrendű centrális differenciasémákat, és figyelmen kívül hagyja a kapilláris fal adszorpcióját; az egyedüli hangsúly a komponensek hosszirányú eloszlásán van.

3.2 Bemeneti paraméterek és a szimulációk végrehajtása

Az előzőekben leírt GENTRANS programot használtuk a szimulációk során. Egy 10 cm-es kapillárist szimuláltunk, amelyet 10000, egyenlő hosszúságú szegmensre osztottunk ($x = 10 \mu\text{m}$). A szimuláció kezdetén az amfolitok és a minta komponensek a kapilláris 2 centiméterét (3-23 % vagy 40-60%) foglalták el, a kapilláris anódos oldalán vagy közepén.

Kísérleteinkben általában 101 biprotikus modell amfolitot alkalmaztunk, amelyek széles (nyolc pH egységnyi) vagy szűk (két pH egységnyi) gradienst hoztak létre az anolit (10 mM foszforsav) és a katolit (20 mM nátrium hidroxid) között. A következő pH gradienseket vizsgáltuk: 3,00-11,00; 5,00-7,00; 7,00-9,00; 4,80-6,80; 7,20-9,20; 5,20-7,20; 6,80-8,80; 4,00-8,00; 6,00-8,00, illetve ezek variációit, amelyeket hozzáadott úgynevezett „peremkomponensekkel” bővítettük. Minden amfolit esetében a ΔpK 2,5; míg az ionos mobilitás $2,5 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$ volt. Ha másképp nincs feltüntetve az amfolitok kezdeti koncentrációja 200 μM volt. Az alkalmazott amfolitok izoelektromos pontjai közti különbség 0,02 (101 és 141 amfolit esetén), 0,04 (101 amfolit; 4,00-8,00 pH gradiens esetén) és 0,08 (101 amfolit; 3,00-11,00 pH gradiens esetén) volt.

A mintakomponensek kezdetben a teljes kapilláris 2%-át (0,2 cm-t) foglalták el, és ezeket a következő módokon injektáltuk: két amfolitzóna közé (szendvics-injektálás), az amfolitzónán belül rövid zónaként (az amfolitzóna anódos vagy katódos végébe), vagy az amfolitzónán kívül, a zóna anódos vagy katódos oldalára (félszendvics-injektálás). Szimulációkat futtattunk amfolitokkal kevert mintákkal is.

A szimulációkban mintakomponenseket klorid sókként alkalmaztunk, így 2,711 mM kloridiont is felhasználtunk az injektálás során, míg egyes szimulációknál 1 mM koncentrációban karbonát iont is használtunk, amelyet a katolithoz adtunk, szemlélve a légköri széndioxid lúgos pH-n való oldódását.

A szimulációk 40, 25 vagy 10 percig futottak 1000 V állandó feszültségen, 100 vagy 200 A/m² állandó áramsűrűségen továbbá 100 μm/s állandó EOF-vel vagy EOF nélkül. A kezdeti határszélességek minden esetben 0,001%-ot tettek ki, és nyitott-katódos kapilláris végződést használtunk, amely megengedte a komponensek szabad vándorlását az elválasztási térbe ill. térből. Az alkalmazott határfelületi körülmények állandóak voltak a kapilláris anódos végénél (Thormann és mtsai 2007). A Mosher és munkatársai (Mosher és mtsai 2011) által leírt adatsimítást használtuk. A 10000 szegmenst felhasználó szimulációk Intel Pentium G 870 3.1 GHz és G 2130 3.2 GHz processzorral felszerelt személyi számítógépeken futottak, a CPU idő 54 és 88 óra közt volt. A grafikai ábrázoláshoz az adatokat a SigmaPlot Scientific Graphing Software (SPSS, Chicago, IL, USA) 11.0 verziójával dolgoztuk fel.

A szimulációs futások során alkalmazott minták és elektrolitok bemeneti paramétereit az 1. táblázatban mutatjuk be.

A szimulációk egyik sorozatában két pH egységet lefedő gradienseket modelleztünk úgy, hogy a gradiens anódos oldalán fokozatosan növekvő koncentrációjú peremkomponenseket alkalmaztunk a következő koncentrációkban: 2,31; 2,88; 3,60; 4,50; 5,63; 7,04; 8,80; 11,0; 13,7; 17,2; 21,5; 26,8; 33,6; 41,9; 52,4; 65,5; 81,9; 102; 128 és 160 μM. Ugyanezeket a komponenseket csökkenő koncentrációban (160-2,31 μM) a gradiens katódos oldalán is injektáltuk.

A cIEF-MS kapcsoláshoz szükség van illékony elektrolitoldatok alkalmazására, így a második csoportba tartozó szimulációkat 10 mM hangyasavval és 20 mM ammónium-hidroxiddal végeztük, és összehasonlítottuk a 10 mM foszforsavat és 20 mM nátrium-hidroxidot használó rendszerekkel.

A harmadik csoportba tartozó szimulációk esetében 100 mM ammónium hidroxidot (pH: 5,0) és 50 mM hangyasavat (pH: 11,0) ill. azok titrált változatait alkalmaztuk. A katolit (10,8; 10,3; 9,8; 8,9; 8,1) és az anolit (pH = 5,0; 2,5) kívánt pH értékét 50 mM hangyasav 100 mM ammónium-hidroxiddal és 100 mM ammónium-hidroxiddal és 50 mM hangyasavval történő titrálásával állítottuk be.

1. Táblázat A szimulációkban használt minta komponensek és elektrolitok bemeneti paramétere^{a)}

Komponens	pKa ₁	pKa ₂	Mobilitás (x10 ⁻⁸ m ² /Vs)	Kezdeti koncentráció ^{b)} (μM)		
				anolit	minta	katolit
pI 5,3 festék	3,70	6,90	2,0		463	
pI 6,4 festék	4,68	8,12	2,0		398	
pI 6,6 festék	5,10	8,10	2,0		520	
pI 7,2 festék	5,70	8,70	2,0		368	
pI 7,9 festék	6,81	8,99	2,0		329	
pI 8,6 festék	7,70	9,50	2,0		281	
pI 10,4 festék	9,50	11,30	2,0		352	
H ₃ PO ₄ ^{c)}	2,00	-	3,67	10,000		
HCOOH	3,75	-	5,66	10,000		
H ₂ CO ₃	6,35	10,33	4,61; 7,18			1000
Cl ⁻	-	-	7,91		2711	
Na ⁺	-	-	5,19			20,000
NH ₄ ⁺	9,25	-	7,62			20,000
H ⁺			36,27			
OH ⁻			19,87			

- a) A pK és a mobilitási értékeket a Simul5 adatbázisból vettük (<http://web.natur.cuni.cz/gas/>).
- b) Mind a hét festék koncentrációja 143 μg/mL-nek felel meg. A festékeket klorid sókként injektáltuk.
- c) A foszforsavat egyértékű gyenge savként kezeltük, mivel csak alacsony pH környezetben alkalmazzuk.

4 Eredmények és következtetések

4.1 A kapilláris izoelektromos fókuszálást érintő különböző injektálási protokollok szimulációja

A különféle mintainjektálási sémákat alkalmazva, hét minta és 101 amfolit izoelektromos fókuszálását vizsgáltuk számítógépes modellezéssel. Az amfolitok izoelektromos pontjai közti különbség 0,08 volt és a komponensek egy 3,00–11,00 pH gradienst formáltak 20 mM katolit (nátrium hidroxid) és 10 mM anolit (foszforsav) között. A szimulációkat 1000 V állandó feszültség mellett végeztük 100 $\mu\text{m/s}$ konstans katódos endozmotikus áramlással.

Az injektálási sémában, ahol a mintákat és a hordozó amfolitokat homogén keverékben alkalmazzuk, a fókuszálódott zónák megjelenése előtt egy átmeneti kettős front megközelítés látható. Minden olyan esetben, amikor a mintákat a kiindulási amfolitzónában rövid zónaként injektáltuk, amfolit zónák között (hordozó amfolitok hiányában), vagy az amfolit zónák előtt vagy után vezettük be, a festékek sokkal gyorsabb elválása volt tapasztalható, mint a hordozó amfolitoké. Ha a rövid mintazóna kapillárisba juttatása az amfolit zóna anódos végén vagy az anódos oldalán történik az amfolit komponensek jelenlétében vagy hiányában, akkor kationként vándorló csúcsokat látunk. Anionként vándorolnak a komponensek az ellenkező esetben, amelyben a mintákat egy rövid zónába helyezzük az amfolit zóna katódos oldalán vagy a katódos végén. Vegyes folyamat várható akkor, amikor a mintákat egy rövid zónában, a kezdeti amfolit zóna közepére pozícionáljuk (amfolit komponensek jelenlétében vagy hiányában). A folyamat jellege függ a molekulaion környezetétől (pH) és tulajdonságaitól (pI). Azokban a szimulációkban, ahol a gradiens kezdeti komponense 7-es izoelektromos ponttal rendelkezik, a $pI > 7$ minták kationként, míg és a $pI < 7$ festékek anionként viselkednek. A hét minta elválasztási folyamata teljesen különbözik a kettős front közelítéstől, ami a minták és az amfolitok egyenletes keverésénél tapasztalható.

Az elválasztás egy olyan átmeneti környezetben történik, amelyet a savas karakterű amfolitok felhalmozódása és a bázikus amfolitok mennyiségének csökkenése idéz elő, és ezáltal körülbelül pH 3 és pH 7 közötti pH-gradiens képződik. A kialakult pH és térerő mintázatok nagyon hasonlítanak egymásra a négy módszerben. Azonban, amikor a minták az amfolit zónán belül egy rövid zónát foglalnak el, az hatással van a hordozó amfolitok csúcsmagasságára és koncentrációjára.

Bár a szimuláció 101 amfolit komponenst tartalmaz, a szendvics-injektálás rést (úgynevezett „gap”-et) hoz létre, amely viszonylag alacsony számú amfolitot tartalmaz. Ez a régió a térerő mintázatban egy úgynevezett „hot spot”-ot eredményez és ez káros hatást fejt ki. Ez a jelenség az amfolitok alacsony koncentrációjának következtében alakul ki a kezdeti folyadékelemben. Ezt a régiót eredetileg a minta foglalja el, és az amfolitok normál eloszlását ott nem lehet biztosítani. Ezért a régió tulajdonságai a mintamátrixtól függenek; a pH-gradiens itt laposabb lesz. Ez a jelenség, az úgynevezett "memória-hatás", ami a szendvics-injektálás sajátja (Takácsi-Nagy és mtsai 2012, Thormann és Kilár 2013). A valós kísérletekben tapasztalható fókuszáló rendszerben több komponens jelenik meg ebben a hiátusban, az alkalmazott amfolitok megnövekedett száma miatt.

4.2 A vízzóna elválasztásra gyakorolt hatása

A vízzóna tulajdonságát és elválasztásra gyakorolt hatását vizsgáltuk hét minta jelenlétében és két pH egységet lefedő gradiens alkalmazásával, amelynek kezdő vagy utolsó komponense a semleges pH érték (pH 7) körüli izoelektromos pontú molekula volt. Ebben a szimulációs csoportban katolitiként 10 mM foszforsav, anolitiként 20 mM nátrium-hidroxid szolgált. Hat féle, két pH egységet felölelő gradienst tartalmazó szimulációs konfigurációt vizsgáltunk (5,00-7,00; 7,00-9,00; 4,80-6,80; 6,80-8,80; 5,20-7,20 és 7,20-9,20) 100 A/m² állandó áramsűrűségen és állandó elektrokozmosis áramlás mellett.

A szimulációs adatok azt mutatták, hogy a fókuszálás során kialakul a tiszta vízzóna, amikor a hordozó amfolitok által létrehozott pH gradiens nem fedi a semleges régiót: ha 7,00 pH-nál fejeződik be, vagy amikor 7,00 pH-nál kezdődik. Abban az esetben, ha a gradiens pH 7,00-nél vagy alatta végződik, a vízzóna kifejlődése látható a pH tartomány katódos oldalán. Az ellenkező, anódos oldal vízzónája akkor várható, ha az alkalmazott pH-gradiens 7,00-nél vagy annál magasabb pH-n kezdődik. Nem találunk vízzónát akkor, ha a "jó" amfolitok a semleges területet lefedik. Ezen túlmenően a vízzóna akkor is kialakul olyan mintakomponensek jelenlétében, amelyek a fókuszáló gradiensen kívülre vándorolnak. Ezek az elemek olyan ITP zónákat képeznek, amelyek az elektrolitoldatok vezető komponensei mögött migrálnak, nevezetesen a kationként a katolit ($pI > 7$ -es komponensek) vagy anionként anolit ($pI < 7$) felé.

Két, 7.00-9.00 pH gradienst kezelő konfigurációt vizsgáltunk és elemeztünk különböző alkalmazott áramsűrűség mellett. A nagyobb áramsűrűségnél (200 A/m^2) az elválasztás előrehaladottabb, mivel a szimulációban dupla Coulomb töltés áramlik át a kapillárison, szemben a 100 A/m^2 használó szimulációval. Ez a hatás nemcsak a képződött vízzónában nyilvánul meg, hanem a gradiens katódos végén levő komponensek számában is látható (kilenc ill. négy komponens alkotja az izotachoretikusan vándorló szerkezetet a gradiens katódos részében). Az amfolitzónák között elhelyezkedő minta zóna kezdeti területe (gap) hosszabb a nagyobb áramsűrűség esetén. Ezt a rést kisebb amfolit koncentráció és alacsonyabb pH-gradiens jellemzi (Takácsi-Nagy és mtsai 2012).

Ezenkívül az áramsűrűség hatással van a szimuláció során fókuszálódott minták és a további komponensek alakjára és csúcsmagasságára. Arra számítottunk, hogy az összes amfoter vegyület koncentrációja emelkedik és a csúcsok élesebbek lesznek, kisebb átfedéssel. A megnövelt áramsűrűség azonban nem befolyásolja az ITP zónák koncentrációját, de a határaik élesebbé válnak. Az ITP ezen jellemző jelenségei jól ismertek (Mao és mtsai 2000, Mosher és Thormann 2002, Thormann és Mosher 2006, Thormann és mtsai 2007).

További, peremkomponenseket használó konfigurációkat tanulmányoztunk számítógépes szimulációk segítségével. Az amfolitzóna mindkét oldalán hozzáadott, folyamatosan csökkenő koncentrációjú peremkomponenseket alkalmaztunk annak érdekében, hogy utánozzák az amfolitok kereskedelmi keverékeit, amelyeket kapilláris izoelektromos fókuszáláshoz általában használnak. Kimutatható, hogy a további, kis mennyiségben jelenlevő amfolitok megakadályozzák a vízzóna kialakulását, és csökkentik a vezetőképességi rést, mivel ezek a molekulák a semleges régiót fedik le. A hozzáadott vegyületek izotachoretikus spacerekként viselkednek a pH gradiens és az elektrolit oldatok vagy az ITP zónákként vándorló mintakomponensek (amelyek izoelektromos pontja kívül esik a pH gradiensen) és más ionok között.

Fontos megjegyezni, hogy a szimulációban használt amfolitok (fő gradiens komponensek és peremkomponensek) darabszáma még mindig sokkal kevesebb, mint a amfolitok összmennyisége a kereskedelmi keverékek felhasználásával végzett kísérletekben. Ennek ellenére ez a közelítés tükrözi a valós, kereskedelemben kapható szűk tartományt lefedő amfolitokat és a 7.00 pH-értéknél kezdődő vagy véget érő gradienseket, és a cIEF-ben további vagy peremkomponensek nélkül használhatók az elektrolitikus gap és a hot spot áthidalására.

Az légköri szén-dioxid izoelektromos fókuszálásra gyakorolt hatását egy másik szimulációban vizsgáltuk. Az 5,00-7,00 és 7,00-9,00 közötti pH-tartományokat tartalmazó konfigurációkat a 20 mM nátrium-hidroxid katolitba adagolt 1 mM szénsavval újraszimuláltuk.

Megállapítható, hogy magas pH-n a katolitban feloldódott széndioxid hatással lehet a kialakult zóna struktúrákra. A savas komponens formája a pH-értéktől függ - a katolitban karbonát ionok formájában, míg a foszforsav után hidrogénkarbonát vagy mindkét formában találjuk, amint az az 1. táblázatban látható. A szimulációk szemléltetik a szénsav jelenlétét a katolit és anolit között minden zónában, valamint egy anolit mögött kialakult növekvő hosszúságú zónát. Ezenkívül a szénsavból származó különböző karbonát ionok a rendszerben ellenionként viselkednek, mobilizálva az amfolit komponenseket a gradiens bázikus oldalán, amely végsősoron megakadályozza a tiszta vízzóna kialakulását. Ez a folyamat nagyon hasonlít az elektroforetikus mobilizálás folyamatához, ahol anionokat adnak a katolithoz (Thormann és Mosher 2008), és amely a gradiens katódos kisodródásának, ún. „cathodic drift” elősegítőjeként tekinthető. A pI 7.00 amfolit által formált ITP zóna viszonylag magas koncentrációt (1,286 mM) ér el, amely szintén 2,32 μ M koncentrációjú karbonát ionot tartalmaz, ezért ezen zóna pH-ja alacsonyabb ($pH = 6,9937$) és vezetőképessége nullánál magasabb (0,3276 mS/m) lesz. A pI 5,00- 5,04 amfolitok által képzett, a gradiens savas felén kialakult ITP-struktúrákban jelenlevő karbonát ion koncentrációk 0,106 és 0,114 mM között változnak, azonban a pH és a vezetőképesség profilokban nem látható szignifikáns hatás a pH-gradiens ezen oldalán. Ez a jelenség összevethető a gradiens másik oldalán kialakult ITP zónáknál tapasztaltakkal, lúgos pH-n (Thormann és Mosher 2006, Thormann és mtsai 2007). A katolitban jelenlevő karbonát ionok koncentrációja meghatározza a fókuszáló részben és az ITP zónákban jelentkező különböző karbonát ionok koncentrációját. A kezdetben kevesebb, mint 1 mM koncentrációjú szénsavból származó különböző karbonát ionok a rendszerben (a katolit mellett) alacsonyabb koncentrációban lesznek jelen a többi szegmensben, és rövidebb zónákat hoz létre az anolit mögött. Ezzel szemben az 1 mM feletti karbonát ionok nagyobb koncentrációt eredményeznek a fókuszáló részben és az ITP zónában, és nagyobb területen helyezkednek el az anolit mögött. Azonban az ITP-struktúra kialakulásában részt vevő amfolit komponensek száma csökken a szénsav jelenlétében, ugyanakkor, a szénsavnak nincs hatása az anolit migrációjára. Ezek a tapasztalatok összhangban állnak Hirokawa és munkatársai kísérleteivel (Hirokawa és mtsai 1991).

4.3 Az elektrolitok tulajdonságainak az elválasztásra gyakorolt hatása

Az előző szimulációkban foszforsav- és nátrium-hidroxid-oldatokat alkalmaztunk anoliként és katolitiként. A cIEF-tömegspektrométer kapcsolat kompatibilitása érdekében illékony elektrolitokra van szükség. Az előző összeállítás (foszforsavat és nátrium-hidroxidot használó rendszer), valamint az illékony elektrolit oldatokkal (hangyasav és ammónium-hidroxid) futtatott szimuláció került összehasonlításra.

Az elektrolitoldatok felcserélése nem volt szignifikáns hatással az elválasztás fókuszáló részére. Mind az ITP-határvonalak migrációs rátái, mind a vándorló ITP zónák koncentrációi függenek az elválasztásokban alkalmazott elektrolitok tulajdonságaitól (Takácsi-Nagy és mtsai 2017). Nincs jelentős különbség a két szimuláció fókuszáló része vagy a minták migrációja között. Az öt mintakomponens (pH 5,3; 6,4; 6,6; 7,2 és 7,9) a pH gradiensen fókuszálódik, és a pI 8,6 és 10,4 minták is a várakozásoknak megfelelően viselkednek: és anionként vándorolnak a 4,00-8,00 pH-gradiensén kívül, ami összhangban van a korábbi megállapításokkal (Thormann és Kilár 2013).

További szimulációkat hajtottunk végre a pH-szabályozott elektrolitok elektroforetikus rendszerekben kifejtett hatásának vizsgálata céljából. Vizsgáltuk a pH-szabályozott elektrolitok elektroforetikus viselkedését és hatását az elválasztásra, a két pH egységet lefedő amfolitzónát a kapilláris közepére (40-60%) helyeztük el, endozmózis jelenléte nélkül. Azt találtuk, hogy a 100 mM ammónium-hidroxid és az 50 mM hangyasav közé injektált minták, elérik az izoelektromos pontjukat, és a fókuszálás jó teljesítménye várható. Az IEF elválasztás mechanizmusa és a minták eloszlása nagyon hasonlít a korábbi szimulációhoz, amely 7,00-9,00 pH-gradiensekkel futott. A pH-szabályozott elektrolitokkal végzett szimulációból nyert adatok azt mutatják, hogy a katolit az anolit fokozatos titrálása a gradiens összes komponensének migrációjának változását eredményezi. Amikor az ammónium-hidroxid oldatot titráljuk az anolittal, a formiát ionok a katolitról a teljes elválasztási téren keresztül az anolitig vándorolnak, ahol felhalmozódnak, hasonlóan a katolithoz hozzáadott karbonátiókhöz. Minden amfolit és mintakomponens részleges nettó pozitív töltésre tesz szert, amely elektroforetikus migrációt indít el a katód felé az alkalmazott elektromos tér hatására. Az elválasztás természete inkább izotachoforetikus, mint izoelektromos, és ennek következtében a minták alakja meglehetősen széles lesz, amihez hasonlóan korábban már leírtak (Chartogne és mtsai 2002). Ez a jelenség fokozódik a hangyasav katolitról történő mennyiségének növekedésével.

Bár a bemutatott adatok egy katód felé történő elektroforetikus mobilizációt írnak le, minden levont következtetés az anód felé történő mobilizálásra is érvényes. Ugyanez a migrációs mechanizmus jön létre akkor, amikor az anolit a katolit ionjait tartalmazza – a minták ebben az esetben negatívan töltöttek és izotachoforetikus zónákként az anód felé vándorolnak. Ezt kémiai mobilizálásként is értelmezhetjük, amikor az elektroneutralitás a kapilláris belsejében nem érhető el a katolitban jelenlevő formiát ionok miatt. Ez a jelenség összhangban van a korábbi tanulmányokkal (Hjertén, Liao és mtsai 1987, Thormann és Mosher 2006, Thormann és mtsai 2007). Ha mindkét elektrolitot titráljuk, a mintazónák kétirányú ITP migrációt mutatnak, alakjuk pedig kiszélesedik. Mind az ITP-határok migrációs rátái, mind a migráló ITP zónák koncentrációi függenek az elválasztásban használt elektrolitok tulajdonságaitól (Takácsi-Nagy és mtsai 2017).

5 Az értekezés tézisei

1. Az injektálási protokollok összehasonlításakor, amikor a mintákat rövid zónaként az amfolit zónán belül vagy azzal szomszédosan injektáljuk, a mintakomponensek migrációja gyorsabb, mint az amfolitok migrációja. Az elválasztás során a komponensek kationként vagy anionként mozognak vagy vegyes folyamat várható. A kezdeti elválasztás után a minták tovább vándorolva elérik az izoelektromos pontjuknak megfelelő helyüket. Ez teljesen eltér a fókuszálódott zónák megjelenése előtti kettős front közelítéstől, amit a minták és az amfolitok homogén keverékeként való injektálásakor tapasztalunk.
2. A szekvenciális injektálási elrendezések új lehetőségeket kínálnak olyan amfolit zónák esetében, amelyek nem fedik az alkalmazott minták izoelektromos pontját. A különféle injektálási módokkal végzett szimulációk azt mutatják, hogy a kapilláris izoelektromos fókuszálás legkedvezőbb elrendezése, ha kiinduláskor a pH-gradiens savas végén vagy oldalán helyezzük el a mintákat.
3. A szendvics injektálás a fókuszálódott gradiensben egy ún. „gap”-et eredményez, mivel az amfolitok koncentrációja viszonylag alacsony lesz ott, ahol a kiindulási helyzetben a minta az amfolitok helyét foglalta el. Ennek a következtében a pH profil és a gradiens laposabb lesz, és valószínűsíthető, hogy ezen régió vezetőképességi rést (ún. „hot spot”-ot) jelent, amely káros hatással lehet. A többi injektálási módszernél nem tapasztalunk ilyen jelenséget.
4. A szűk, két pH egységet fedő gradiens jelenlétében, amelyek pH 7,00 körül kezdődnek vagy végződnek, a tiszta vízzóna kialakulása vizsgálható. A gradiens katódos oldalán vízzóna kialakulása várható, ha a pH-tartomány 7,00-nél, vagy az alatt végződik, míg az anódos oldalon vízzónát akkor figyelhetünk meg, amikor a gradiens 7,00-nél vagy a felett kezdődik. A vízzóna megjelenése nem várható, ha a kialakított gradiens komponensei lefedik a semleges zónát. Ez az eset nagyon hasonlít azokhoz a szimulációkhoz, amelyekben hozzáadott, fokozatosan csökkenő koncentrációjú ún. „peremkomponenseket” használunk, a pH gradiens mindkét szélén. Ez modellezi a kereskedelmi forgalomban beszerezhető, cIEF-hez használható amfolit-keverékeket, amelyek mindig tartalmaznak kis koncentrációban amfolitokat a feltüntetett pH tartományon kívül.
5. A vízzóna hossza függ az alkalmazott áramsűrűségtől és az elektroforézis időtartamától. Ezen szakasz hossza egyenes arányban áll a rendszerben alkalmazott töltések számával, illetve az elektroforézis időtartamával. Ezen túlmenően a szennyeződések, például a katolitikban feloldódott légköri széndioxid vagy más sók befolyásolják a tiszta vízzóna

kialakulását. Bár a szénsavnak nincs szignifikáns hatása a vezetőképességre vagy a pH-profilokra, a pI 7.00 és az alatti amfoter minták komponensei elektroforetikusan mobilizálódnak a katód felé.

6. A különféle elektrolitoldatok, savak és bázisok, amelyeket anolitoknak és katolitoknak használnak, nincsenek szignifikáns hatással az elválasztás fókuszáló részére, de a pH gradiens mindkét oldalán az izotachoforetikus szerkezetek és a koncentrációk függenek az elektrolitok tulajdonságaitól. A szimulációk azt is kimutatták, hogy a katódhoz közeli oldalon elhelyezkedő 7,00-es vagy annál alacsonyabb izoelektromos ponttal rendelkező amfolitok elektroforetikusan mobilizálódnak, és izotachoforetikus zónákként a katód felé vándorolnak.

A katolit pH-értékének fokozatos, hangyasavval történő csökkentése indukálja az összes komponens elektroforetikus migrációját a katolit felé; a minták alakja szélesebbé válik, és a gradiens tömörödik. Az összes vegyület migrációja az ellenkező irányba prognosztizálható, ha az anolítot ammónium-hidroxiddal titráljuk. Kétirányba migráló mintákat és kiszélesedett gradienseket figyeltünk meg mindkét elektrolit pH-beállításával.

6 Megjelent közlemények

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

- I. **Takácsi-Nagy, Anna**, Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, Mosher R.A, Thormann, Wolfgang: Sampling strategies for capillary isoelectric focusing with electroosmotic zone mobilization assessed by high-resolution dynamic computer simulation. *Electrophoresis* 2012; 33(6):970-980. doi: 10.1002/elps.201100525 IF: 3.303 (2012)
- II. **Takácsi-Nagy, Anna**, Kilár, Ferenc, Thormann, Wolfgang: Modeling of formation and prevention of a pure water zone in capillary isoelectric focusing with narrow pH range carrier ampholytes. *Electrophoresis* 2017; 38 (5):677-88. doi: 10.1002/elps.201600314 IF: 2.482 (2017)
- III. Páger, Csilla; Vargová, Andrea; **Takácsi-Nagy, Anna**; Dörnyei, Ágnes; Kilár, Ferenc Effect of electrolyte pH on CIEF with narrow pH range ampholytes. *Electrophoresis* 2012, 33, 3269-3275. doi: 10.1002/elps.201200175 IF: 3.303 (2012)

Az értekezéshez kapcsolódó absztraktok és poszterek

1. Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang: Kapilláris izoelektromos fókuszálás tömegspektrometriával kapcsolva – modell-számítások. Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2008, 5-7 November 2008, Sárvár, Hungary, Abstract Book, p. 68
2. **Takácsi-Nagy, Anna**, Páger, Csilla, Kilár, Ferenc, Thormann, Wolfgang: Advances of computer modelling in capillary isoelectric focusing. CECE 2010 7th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 14-17 October 2010, Pécs, Hungary, Abstract Book, p.63, P28
3. **Takácsi-Nagy Anna**, Páger Csilla, Wolfgang Thormann, Kilár Ferenc: A kapilláris izoelektromos fókuszálás új gyakorlatának elméleti megközelítése, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2010, 10-12 November 2010, Tapolca, Hungary, P-39
4. Kilár Ferenc, Páger Csilla, Dörnyei Ágnes, Vargová Andrea, **Takácsi-Nagy Anna**, Thormann Wolfgang: Isoelectric focusing coupled to mass spectrometry for bioanalysis, CECE 2011 - 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 3-4 November 2011, Brno, Czech Republic, Abstract Book, p. 28 (ISBN: 978-80-904959-0-6)
5. Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, Dörnyei, Ágnes, A. Vargová, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang: 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
6. **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang, Kilár, Ferenc: Modeling of sampling strategies for capillary isoelectric. 30th International Symposium on Microscale Bioseparations and Analyses MSB 2014, April 27 – May 1 2014, Pécs, Hungary, P70
7. **Takácsi-Nagy, Anna**, Kilár, Ferenc, Thormann, Wolfgang: Modeling of the development of a pure water zone in capillary isoelectric focusing. 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2-4 September 2015, Siófok, Hungary, P55

Az értekezéshez kapcsolódó előadások

1. **Takácsi-Nagy, Anna**, Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, Dörnyei, Ágnes, Thormann, Wolfgang: Capillary isoelectric focusing coupled to mass spectrometry. CECE 2009 6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 6-7 November 2009, Pécs, Hungary, Abstract Book, p.36, L18
2. Páger, Csilla, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang, Kilár, Ferenc: 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, p.32, L13
3. **Takácsi-Nagy, Anna**, Páger, Csilla, Kilár, Ferenc, Thormann, Wolfgang: XXXIII. Kémia Előadói Napok, 25-27 October 2010, Szeged, Hungary
4. Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, Vargová Andrea, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang: 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 (ISBN: 978-963-89335-0-8)
5. Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, Dörnyei, Ágnes, A. Vargová, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang: Isoelectric Focusing Coupled to Mass Spectrometric Detection. 18th International Conference on Chemistry, 22 – 25 November 2012, Băile Felix, Romania
6. Kilár, Ferenc, Páger, Csilla, **Takácsi-Nagy, Anna**, Thormann, Wolfgang: Practical Insights of Capillary Isoelectric Focusing Coupled to Mass Spectrometry. 14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 28 June – 6 July 2014, Bratislava – Smolenice, Slovakia, L25

Diplomadolgozat

Takácsi-Nagy Anna: Új elválasztástechnikai módszerek a gyógyszeranalízisben, gyakorlati és elméleti modell-kísérletek (2010)

Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások és poszterek

Gálicza, Judit, **Takácsi-Nagy, Anna**, Fisher-Fodor, Éva, Sorițău, Olga, Andrea Vargová, Beáta Ábrahám, Ferenc Kilár, Szabolcs Lányi: Internalization and Cytotoxicity Assays of Transferrin Complexes on Stem cell-like Tumour Glioblastoma Cells. 17th International Conference on Chemistry, 3-6 November 2011, Cluj-Napoca, Romania