

УДК 543.545.002.56: 577.112

© А. А. Щеглов, А. Ю. Шмыков, В. Г. Мальцев

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРООСМОТИЧЕСКОГО ПОТОКА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ

Предложен способ химической модификации внутренней поверхности капилляра полисульфопропилметакрилатом для стабилизации электроосмотического потока (ЭОП) в капиллярном электрофорезе. Показано, что стабилизирующие покрытия обеспечивают независимость скорости ЭОП от pH, а также отсутствие гистерезиса, характерного для непокрытых кварцевых капилляров. На примере анализа белков сыворотки крови показано, что полисульфопропилметакрилатное покрытие обеспечивает также повышенную разрешающую способность и устраняет необходимость в промывках капилляра раствором щелочи до и после анализа.

ВВЕДЕНИЕ

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) успешно развивается в течение последних двадцати пяти лет. В настоящее время он широко используется для разделения и анализа органических и неорганических катионов и анионов, лекарственных препаратов, биополимеров и их фрагментов и многих других классов веществ, в том числе и белков.

Однако при КЭ белков существует ряд осложняющих проблем, которые до сих пор не нашли удовлетворительного и универсального разрешения. На внутренней поверхности кварцевого капилляра для КЭ (в зависимости от его предыстории) могут располагаться различные комбинации ионизируемых силанольных групп: одиночные силанольные гидроксилы, двойные силанольные гидроксилы (силандиолы), водородно-связанные гидроксилы — и гидрофобных силоксановых групп. Каждый из перечисленных типов силанолов имеет свою константу ионизации [1], адсорбционную активность. Соотношение различных типов силанолов на поверхности кремнезема зависит от многих факторов. Так, например, на зависимости электроосмотического потока (ЭОП) от pH обнаруживается петля гистерезиса [2–4] в зависимости от того, как происходит изменение pH — путем увеличения или уменьшения. Все это приводит к нестабильности электроповерхностных свойств капилляра и их зависимости от предыстории промывок различными растворами электролитов. Такая неоднородность силанольных групп по их адсорбционной активности и степени ионизации является серьезным недостатком кремнеземной поверхности, используемой при КЭ.

Как показано [5], даже маленькая степень адсорбции приводит к серьезному ухудшению в разделении веществ, особенно видно это при анализе

более крупных молекул. Белки имеют способность больше и прочнее сорбироваться, оставаясь на стенке капилляра, чем маленькие молекулы, поскольку молекула белка может взаимодействовать сразу с несколькими активными адсорбционными центрами, что приводит к снижению эффективности, асимметрии пиков, накоплению необратимо адсорбированного белка на стенке капилляра и, как следствие этого, к плохой воспроизводимости результатов последовательных опытов. Наряду с этим заряд на стенке дает и положительный эффект, проявляющийся в ЭОП по направлению к катоду. Накладывающийся на электрофоретическую подвижность ЭОП существенно ускоряет движение зоны белка от точки ввода пробы до окна детектора, что позволяет (в благоприятных условиях) сокращать время анализа до нескольких минут, не используя при этом таких высоких напряжений, которые приводят к разогреву электролита с падением эффективности разделения.

При pH, близком к точке нулевого заряда кремнезема (pH 2)[6], практически все белки — катионы, однако низкая степень ионизации силанольных гидроксидов на поверхности при этом pH предотвращает адсорбцию белка на поверхности, и в этом режиме успешно осуществляются разделения ряда белковых смесей. Недостатком же данного режима КЭ является ничтожный ЭОП при малых pH, что сильно затягивает время анализа, а также то, что этот режим плохо приспособлен для анализа нейтральных и основных белков. В области нейтральных pH КЭ большинства белков на немодифицированном капилляре оказывается невозможным из-за катионно-обменной адсорбции белка на стенке. При высоком pH все белки существуют в растворе в виде анионов и электростатически отталкиваются от отрицательно заряженной стенки. В этих условиях имеет место максимальный ЭОП, что обеспечивает бла-

гоприятные условия в КЭ. Следует заметить, что оба режима в которых возможен КЭ белка (при pH 2 или pH 10–11) не лишены важных недостатков. При низком pH малая величина ЭОП не позволяет проводить экспрессные анализы, кроме того, хотя адсорбция и минимальна, но исследования [7–9] показывают, что она есть. Белок накапливается на стенках капилляра, что приводит к неудовлетворительной воспроизводимости. В боратной системе (pH 10–11), хотя условия и благоприятные, но различие в зарядах молекул кислых белков нивелируется, и они разделяются недостаточно четко.

Подавлять кулоновское взаимодействие можно, увеличивая ионную силу буферов или электролитов [10–13]. Взаимодействие между стенкой капилляра и растворенным веществом при этом ослаблено за счет экранирования. Однако высокая ионная сила буферов и высокая концентрация солей вызывает увеличение джоулева тепла в капилляре, приводящая к уширению зоны и потерям эффективности.

В настоящее время разработаны многие химические методы модификации внутренней поверхности капилляра путем ковалентной прививки адсорбционно-инертных покрытий метилцеллюлозы, полиакриламида, поливинилового спирта, полиэтиленгликоля и так далее [14–18]. Показано, что такие покрытия подавляют адсорбционную активность силанольных групп, но также уменьшают до очень малой величины ЭОП. Таким образом, хотя и имеется преимущество адсорбционной инертности, но катионные и анионные разделяемые вещества не могут быть проанализированы в ходе одного анализа, и анализ (так же как при pH 2 на немодифицированном капилляре) требует значительного времени. Поэтому представляет интерес такая химическая модификация поверхности капилляра в которой силанольные группы, трудно поддающиеся контролю по степени ионизации, заменялись бы на сильные кислотные группы, ионизируемые нацело во всем диапазоне pH. Такой капилляр обладал бы всеми преимуществами немодифицированного капилляра в боратной системе при дополнительном преимуществе высокой стабильности ЭОП и, следовательно, воспроизводимости и надежности анализа.

В настоящей работе предлагается такой способ стабилизации внутренней поверхности капилляра и приводятся некоторые данные, показывающие, что он действительно устраняет перечисленные недостатки кварца в практической работе.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для измерения ЭОП и для методических работ по КЭ белков использовался прибор капиллярного электрофореза НАНОФОР 01 (ИАНП РАН, Госреестр № 22828-02).

1.1. Химическая модификация внутренней поверхности капилляра

Химическую модификацию внутренней поверхности капилляра с прививкой сильноокислых сульфопропильных групп осуществляли путем последовательной "промывки капилляра" (пропускания через капилляр) следующими растворами реагентов: дистиллированной водой (5 мин); 0.1M NaOH (10 мин); дистиллированной водой (5 мин); 0.1M HCl (5 мин); дистиллированной водой (5 мин); 1 ч — 1 % водным раствором уксусной кислоты; 1 ч — 1 % (по объему) раствором 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate, 98 % (Aldrich) в 1 % водном растворе уксусной кислоты. Капилляр оставляли на 24 ч в растворе, а затем проводили промывку капилляра 50 % (по объему) водным раствором ацетонитрила (CH_3CN) в течение 5 мин и дистиллированной водой (5 мин). По завершении вышеуказанных стадий к силанольным группам кварца присоединялись (через силоксановую связь) способные к радикальной полимеризации метакрильные группы. Далее проводили сополимеризацию этих привитых метакрильных групп с сульфопропилметакрилатом. Для этого через капилляр пропускали 1 ч водный раствор 3-Sulfopropylmethacrylate, potassium salt, 98 % (Aldrich). Капилляр оставляли на 24 ч. Химическая схема модификации приведена на рис. 1.

1.2. Измерение электроосмотической подвижности

Измерение электроосмотической подвижности в зависимости от pH раствора и от типа ионизируемых групп на поверхности рабочего капилляра проводилось следующим образом. Дозировалась проба электрически нейтрального, но поглощающего в УФ-области вещества, который в КЭ движется со скоростью ЭОП. По времени выхода пика рассчитывалась электроосмотическая подвижность.

Условия: обычный или химически модифицированный кварцевый капилляр с внешним полиимидным покрытием (внутренний диаметр 30 мкм, наружный диаметр 360 мкм, общая длина 45 см); рабочее напряжение 25 кВ, катод на выходе; спектрофотометрическое детектирование, $\lambda = 214$ нм; ввод пробы гидродинамический (давлением), 0.05 бар, 30 с; термостатирование капилляра — +25 °С. В качестве маркера ЭОП использовался диметилформамид (ДМФА) 5 % (по объему) в соответствующем рабочем электролите. Перед началом работы и между опытами — промывка капилляра рабочим электролитом 5 мин. По окончании работы — промывка капилляра дистиллированной водой 5 мин.

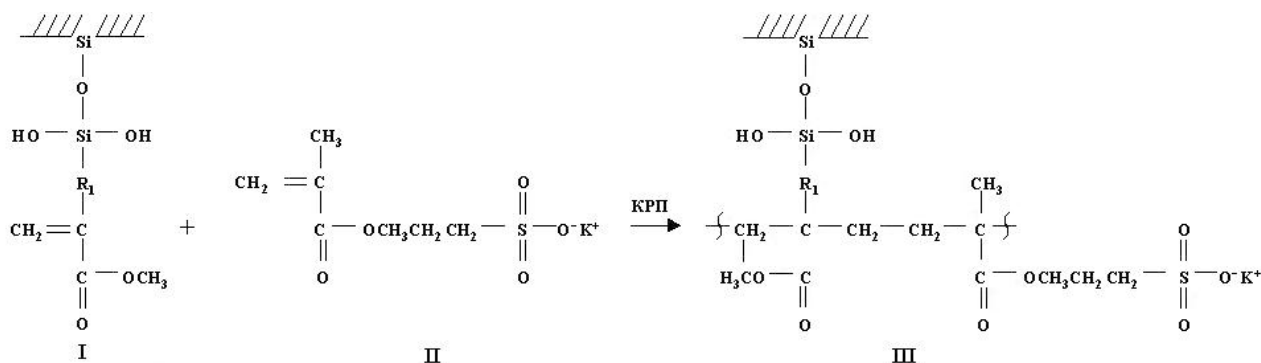


Рис. 1. Химическая модификация внутренней поверхности кварцевого капилляра. I — привитые метакрильные группы на поверхности; II — сульфопропилметакрилат; III — полимер сульфопропилметакрилата; КРП — катализатор радикальной полимеризации

Рабочие электролиты приготавливаются путем растворения соответствующего количества компонентов буферного раствора, включая солевые добавки, в дистиллированной деионизированной воде и доведения pH раствора до заданной величины при помощи pH-термо-милливольтметра MFpH-03 (ООО НП ЦЭЗ) с комбинированным pH-электродом "Вольта-pH-3014" (ООО "Потенциал"). Калибровка pH-метра осуществлялась с использованием стандартных рабочих эталонов pH 4.01; 6.86; 9.18. В качестве рабочего электролита использовался водный раствор 10^{-3} М KCl, приготовленный по навеске соли. Растворы с заданной величиной pH приготавливались титрованием раствора KCl, 0.1 М КОН и 0.1 М HCl соответственно.

1.3. Условия проведения анализа белков сыворотки крови

Приготовление рабочего электролита и буфер-растворителя пробы (БРП) осуществлялось следующим образом.

В 800 мл дистиллированной воды растворялось 9.27 г борной кислоты, pH рабочего электролита доводилось до 10.2 добавлением 2-молярного NaOH. Доводился объем буфера до 1000 мл, и снова доводился pH до 10.2 тем же раствором щелочи. Рабочий электролит имеет молярность по борной кислоте: 0.15 М.

Для приготовления буфера в 800 мл дистиллированной воды растворялось 1.85 г борной кислоты, по откалиброванному pH-метру доводился pH до 8.0 добавлением 2-молярного NaOH. Доводился объем буфера до 1000 мл, и снова доводился pH до 8.0 тем же раствором щелочи. Буфер-растворитель пробы имеет молярность по борной кислоте 0.03 М.

Готовые буферные растворы фильтровались с помощью вакуумной системы через стекловолочный фильтр 1 мкм и хранились в холодильнике. Свежевзятую сыворотку разбавляли БРП в 4 раза и замораживали в морозильнике (-20°C). Пробу для использования размораживали по мере надобности и хранили в холодильнике ($+4^{\circ}\text{C}$) в течение 5 дней.

Условия анализа белков сыворотки крови: обычный или химически модифицированный кварцевый капилляр с внешним полиимидным покрытием (внутренний диаметр 30 мкм, наружный диаметр 360 мкм, общая длина 45 см); рабочее напряжение $+25$ кВ, катод на выходе; спектрофотометрическое детектирование, $\lambda = 214$ нм; ввод пробы гидродинамический (давлением), 0.05 бар, 30 с; термостатирование капилляра — $+25^{\circ}\text{C}$. Перед началом работы и между опытами — промывка капилляра рабочим электролитом 5 мин. По окончании работы — промывка капилляра дистиллированной водой 5 мин.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 изображена зависимость электроосмотической подвижности от pH рабочего электролита на обычном кварцевом капилляре и на капилляре с привитым полисульфопропилметакрилатом. Характер зависимости для немодифицированного капилляра и величины электроосмотической подвижности при разных pH в целом соответствуют известным литературным данным [5, 14]. Характерно, что для этих измерений, полученных в различных лабораториях, величины электроосмотической подвижности все же варьируют в пределах 30 %, что объясняется использо-

ванием капилляров от различных поставщиков и соответственно вариациями в физико-химических свойствах плавленого кварца, т. е. материала капилляра. На поверхности немодифицированного кремнезема при рН, близких к точке нулевого заряда (рН 2), электроосмотический поток падает почти до нуля, а в области высоких рН (рН 10–12) зависимость электроосмотической подвижности от рН отсутствует, ЭОП достигает своей предельной величины.

В соответствии с уже описанными ранее наблюдениями [2–4, 14] на зависимости электроосмотической подвижности от рН наблюдается петля гистерезиса. При уменьшении рН на K^+ -форме кремнезема наблюдается более высокая скорость ЭОП, чем при увеличении рН на H^+ -форме кремнезема. При крайних значениях рН эти различия пропадают. По-видимому, гистерезис связан с различной поверхностной долей более кислых вицинальных силанолов при кислых и щелочных рН. На представленном рис. 2 показаны также соответствующие зависимости электроосмотической

подвижности от рН для капилляра с привитым полисульфопропилметакрилатом. Видно, что замена неоднородных по степени ионизации слабокислых силанольных групп на сильнокислые сульфогруппы обеспечивает постоянный заряд поверхности во всем исследуемом диапазоне рН. Сульфокислоты как сильные электролиты нацело ионизируются при любых рН, и поэтому на таком модифицированном капилляре ЭОП уже не зависит от рН рабочего электролита.

Для практики КЭ полное устранение эффекта гистерезиса является очень важным, т. к. на полученном стабилизированном капилляре устраняется зависимость времен удерживания пиков от предыстории промывок капилляра различными растворами электролитов, характерная для обычных кварцевых капилляров и приводящая к неудовлетворительной воспроизводимости анализов.

Можно обратить внимание на то, что на полученном капилляре с привитыми сульфогруппами электроосмотическая подвижность все же ниже максимальной величины электроосмотической подвижности на немодифицированном капилляре. Это, по-видимому, связано с недостаточно высокой степенью прививки сульфогрупп. Известно [6], что при реакции с органосиланами вступают в реакцию только не более трех из пяти силанольных групп, расположенных на 1 нм^2 поверхности кремнезема. Поскольку в предлагаемом нами методе покрытия используется не только силилирование, но и последующая радикальная сополимеризация на поверхности сульфопропилметакрилата в принципе представляется возможным достигнуть и более высокой плотности сульфогрупп на поверхности. Величина ЭОП может быть даже еще более увеличена за счет предварительного травления поверхности капилляра бифторидом аммония с образованием поверхностной шероховатости [19].

3. ПРИМЕРЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В КЭ ПОЛУЧЕННОГО СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ПО ЭОП КВАРЦЕВОГО КАПИЛЛЯРА С ПРИВИТЫМИ СУЛЬФОГРУППАМИ

Предложенное в настоящей работе стабилизированное сульфопокрытие было испытано в режиме наиболее распространенного биомедицинского анализа, который осуществляется на приборах КЭ, а именно в анализе белков сыворотки крови. Белки как соединения, наиболее чувствительные к взаимодействиям с поверхностью капилляра, позволяют быстро и надежно оценить пригодность поверхности для практического КЭ. На рис. 3, а показана электрофореграмма белков сыворотки крови, полученная на стабилизированном капилляре с привитым полисульфопропилметакрилатом.

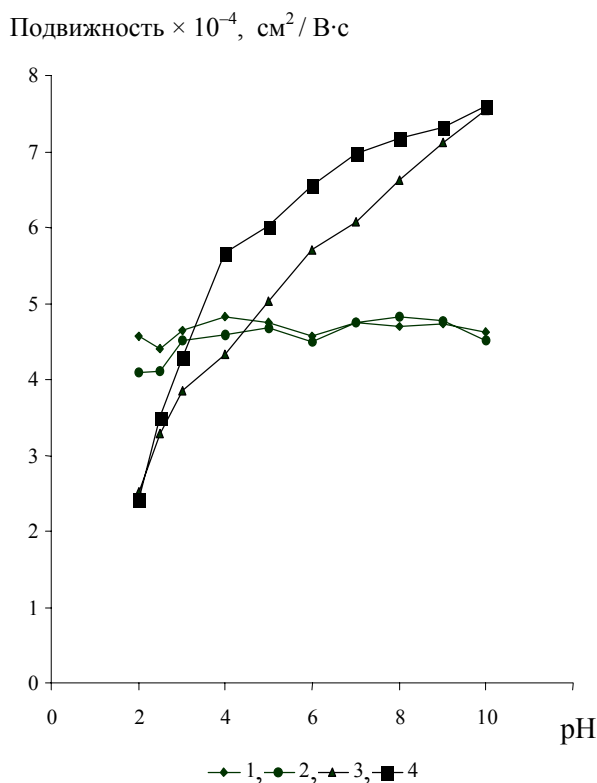


Рис. 2. Зависимость электроосмотического потока от рН. На модифицированном капилляре: 1 — в сторону увеличения рН, 2 — в сторону уменьшения рН; на немодифицированном капилляре (петля гистерезиса): 3 — в сторону увеличения рН, 4 — в сторону уменьшения рН

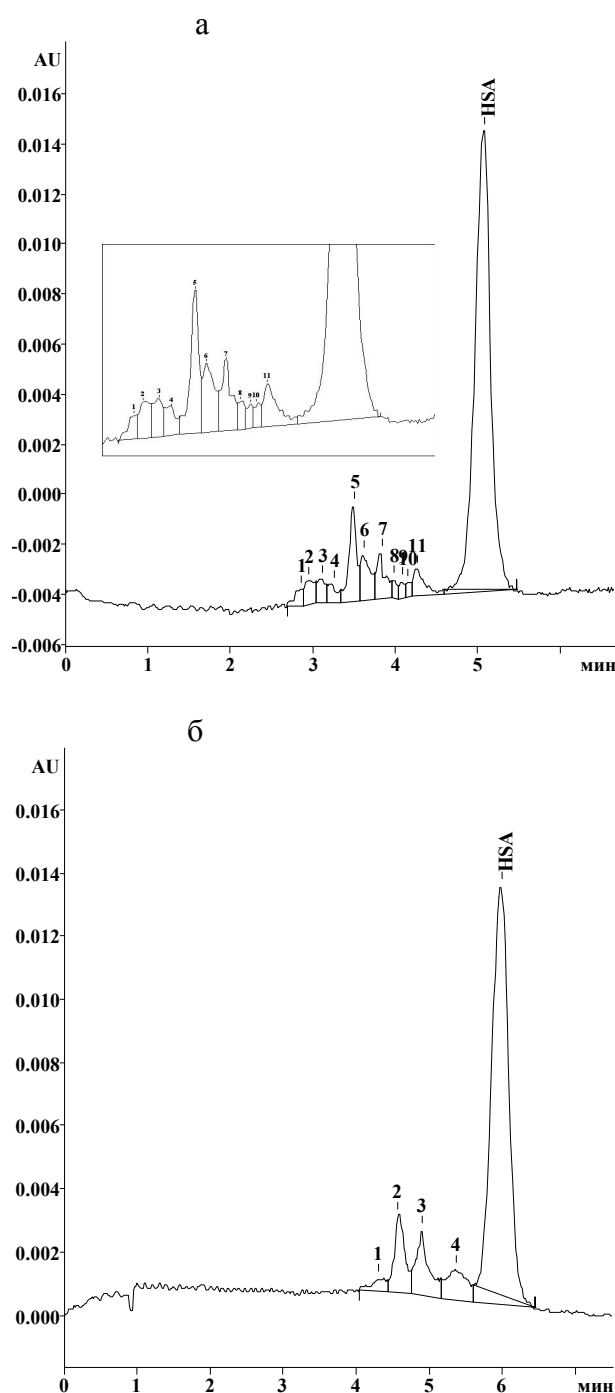


Рис. 3. Электрофореграммы белков сыворотки крови, полученные: а — на стабилизированном капилляре с привитым полисульфопропилметакрилатом, б — на немодифицированном капилляре. Условия: прибор — Нанофор 01; проба — сыворотка крови, разбавленная в 200 раз в буфер-растворителе пробы; капилляр — 30 мкм; детектирование — 214 нм; ввод пробы — давлением 0.05 бар, 30 с; напряжение — +25 кВ; буфер — боратный, pH 10.2

На рис. 3, б — электрофореграмма белков сыворотки крови на немодифицированном капилляре. Видно, что полученное покрытие позволяет улучшить разделение основных белковых фракций сыворотки. И при этом благодаря высокой скорости ЭОП время анализа не превышает 6 мин. Поскольку сульфопокрытия стабилизированы по ЭОП, в промежутке между анализами теряется необходимость промывки раствором щелочи, и достаточно только промывки рабочим электролитом. Испытания стабильности показали, что в боратном буфере (pH 10.2) сульфопропилметакрилатное покрытие обеспечивает возможность проведения до 100 циклов анализа белков сыворотки крови без заметного изменения характеристик покрытия (ЭОП) и разрешения белковых фракций. Такая высокая стабильность, по-видимому, объясняется тем, что эфиры метакриловой кислоты более гидролитически стабильны по сравнению с акрилатными покрытиями.

ВЫВОДЫ

1. На зависимости электроосмотической подвижности от pH обнаруживается петля гистерезиса, которая, по-видимому, обусловлена неравновесным состоянием форм кремнезема. Наличие гистерезиса, или "памяти", поверхности капилляра о предыдущих промывках затрудняет стабилизацию ЭОП в КЭ и ухудшает воспроизводимость этого метода.

2. Предложен способ химической модификации внутренней поверхности капилляра путем замены неоднородных и трудно ионизируемых силанольных групп на однородные сильноокислые сульфогруппы, ионизируемые в интервале pH = 2–10. Метод прививки сульфогрупп основан на силилировании поверхности метакрилоилоксипропилтриметоксисиланом с последующей радикальной сополимеризацией сульфопропилметакрилата. Способ модификации отличается простотой, и все необходимые стадии обработки в капилляре могут быть произведены автоматически на приборе КЭ НАНОФОР 01.

3. Показано, что в капилляре с привитыми сульфогруппами ЭОП имеет достаточно большую и постоянную величину во всем диапазоне pH. Эффект гистерезиса отсутствует, что свидетельствует о быстром установлении равновесия. Таким образом, переход на капилляры с привитым сульфопропилметакрилатом представляется перспективным способом преодоления недостатков кремнеземного материала.

4. В анализе белков сыворотки крови на капилляре с привитыми сульфогруппами было продемонстрировано, что предложенное покрытие позволяет улучшить разрешающую способность КЭ

и упростить методику за счет отказа от ряда промежуточных промывок капилляра, необходимых при работе на немодифицированном капилляре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chiari M., Nesi M. and Righetti P.G. Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology / Righetti P.G., ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996. 1 p.
2. McCormick R.M. // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2322–2338.
3. Lukacs K.D., Jorgenson J.W. // J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1985. N 8. P. 407–411.
4. Altria K.D., Simpson C.F. // Chromatographia. 1987. N 24. P. 527–532.
5. Hjerten S. High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption // J. Chromatogr. 1985. V. 347. P. 191.
6. Айлер Р. Химия кремнезема. М., 1982. 919 с.
7. Lauer H.H. and McManigill D. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 166.
8. McCormick R.M. // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2322.
9. Bruin G.J.M., Chang J.P., Kuhlman R.H. et al. // J. Chromatogr. 1989. V. 471. P. 429.
10. Bushey M.M. and Jorgenson J.W. // J. Chromatogr. 1989. V. 480. P. 301.
11. Green J.S. and Jorgenson J.W. // J. Chromatogr. 1989. V. 478. P. 63.
12. Swedberg S.A. // Anal. Biochem. 1990. V. 185, N 1. P. 51.
13. Bullock J.A. and Yuan L.C. // J. Microcol. Sep. 1991. N 3. P. 241.
14. Jorgenson J.W. and Lukacs K.D. Capillary zone electrophoresis // Science. 1983. V. 222. P. 266.
15. McCormick R.M. Capillary zone electrophoresis separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2322.
16. Bruin G.J.M., Huizen R., Kraak J.C., Poppe H. Performance of carbohydrate-modified fused-silica capillaries for the separation of proteins by zone electrophoresis // J. Chromatogr. 1989. V. 480. P. 339.
17. Cobb K.A., Dolnik V., Novotny M. Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically stable surface structures // Anal. Chem. 1990. V. 62. P. 2478.
18. Swedberg S.A. Characterization of protein behavior in high-performance capillary electrophoresis using a novel capillary system // Anal. Biochem. 1990. V. 185. P. 51.
19. Pesek J.J., Matyska M.T., Swedberg S., Udivar S. // Electrophoresis. 1999. N 20. P. 2343–2348.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 20.10.2003.

PURPOSEFUL REGULATION OF ELECTROOSMOTIC FLOW IN CHEMICALLY MODIFIED FUSED-SILICA CAPILLARIES FOR OPTIMIZATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF PROTEINS

A. A. Shcheglov, A. Yu. Shmykov, V. G. Maltsev

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

Chemical modification of the capillary inner surface by means of grafting poly(sulfopropylmethacrylate) has been suggested in order to stabilize the electroosmotic flow (EOF). It is shown that such modified stable coatings provide independence of EOF rate from pH as well as the absence of hysteresis typical for untreated silica capillaries. By the example of serum protein analysis, it has been demonstrated that poly(sulfopropylmethacrylate) coating also provides increased resolution of protein fractions and eliminates the necessity of capillary rinse with alkali solution before and after analysis.