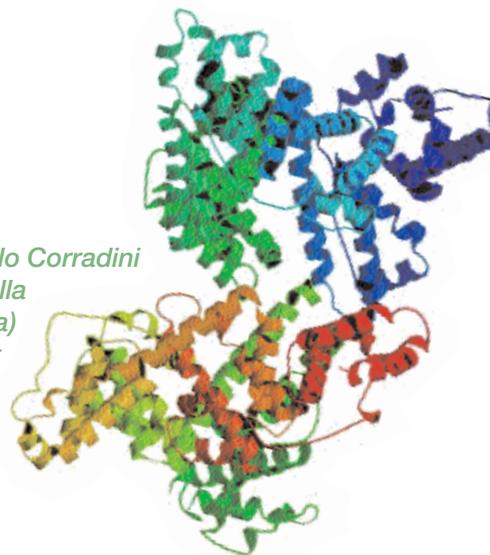


Lucio Bevilacqua, Danilo Corradini
Istituto di Metodologie Chimiche del CNR - Area della
Ricerca di Roma 1 - Monterotondo Stazione (Roma)
danilo.corradini@milib.cnr.it



ELETTROFORESI CAPILLARE DI PEPTIDI E PROTEINE

Sistemi tampone e additivi innovativi delle soluzioni elettrolitiche

L'articolo illustra brevemente l'azione condotta da alcuni additivi delle soluzioni elettrolitiche e da sistemi tampone innovativi nel controllare l'equilibrio protonico, regolare velocità e direzione del flusso elettroosmotico e consentire l'efficiente separazione di peptidi e proteine basiche in elettroforesi capillare con capillari di silice fusa non sottoposti ad alcun trattamento di modificazione chimica della parete interna. I sistemi tampone investigati sono costituiti da oligoammine alifatiche in combinazione con un acido monoprotico o poliprotico. L'efficace azione di mascheramento dei gruppi silanolo esercitata dai sistemi tampone e additivi proposti consente la loro utilizzazione per la separazione di proteine basiche in un ampio intervallo di pH utilizzando capillari di silice fusa non modificati chimicamente.

L'elettroforesi capillare zonale (CZE) è estesamente utilizzata per separazioni su scala analitica di composti macromolecolari, per i quali è minima la diffusione nella soluzione elettrolitica in cui avviene il processo separativo basato sulla migrazione differenziale di analiti carichi sottoposti all'azione di un campo elettrico. La bassa velocità di diffusione delle macromolecole limita gli effetti di ampliamento longitudinale della zona di migrazione di questi analiti, con conseguente restrizione dell'ampiezza del picco di rivelazione e corrispondente elevato valore dell'efficienza. Nella separazione mediante CZE di peptidi o proteine i vantaggi derivanti dalla bassa diffusione longitudinale delle macromolecole possono essere annullati dalle possibili interazioni che questi analiti possono stabilire con la parete interna dei capillari di silice fusa normalmente utilizzati, la cui superficie è costellata di gruppi silanolo ionizzabili di diverso tipo (vicinali, geminali, isolati). Tale effetto è particolarmente sensibile nel caso di peptidi e proteine basiche per i quali le interazioni possono assumere valori così elevati da determinare il loro adsorbimento irreversibile sulla parete del capillare o, quantomeno,

bassi valori dell'efficienza, insufficiente risoluzione e tempi di migrazione non adeguatamente ripetibili.

Le strategie utilizzate per minimizzare le interazioni di proteine e peptidi con la parete del capillare sono state descritte in diverse recensioni (1-5) ed includono la modificazione chimica della superficie interna del capillare; l'impiego di soluzioni elettrolitiche ad elevati valori di forza ionica, per sopprimere le interazioni elettrostatiche di peptidi o proteine con la parete del capillare; l'impiego di soluzioni elettrolitiche a valori di pH estremi, sia in ambiente acido (inferiore a pH 2,0) per sopprimere la ionizzazione dei gruppi silanolo, sia in ambiente alcalino, al fine di rendere gli analiti e la parete del capillare entrambi carichi negativamente e, conseguentemente, non interagenti tra loro.

Nessuna di queste strategie è priva di controindicazioni. La modificazione chimica della parete del capillare può essere soggetta al progressivo deterioramento con l'uso, specialmente in ambiente alcalino. L'impiego di soluzioni elettrolitiche ad elevata forza ionica limita la possibilità di applicare valori elevati del campo elettrico ai quali può risultare eccessiva la corrispondente intensi-

tà di corrente elettrica e la quantità di calore prodotto per effetto Joule, a questa proporzionale, il cui mancato o parziale smaltimento produce gradienti di temperatura all'interno del capillare con conseguenze negative sull'efficienza delle separazioni. Infine, l'uso di soluzioni elettrolitiche a valori estremi della scala di pH può determinare problemi di stabilità e/o solubilità degli analiti, in particolare delle proteine.

Un'ulteriore strategia, diffusamente investigata presso il nostro laboratorio, consiste nell'incorporare nella soluzione elettrolitica una o più sostanze che abbiano la capacità di minimizzare le interazioni di proteine e peptidi con la parete del capillare di silice fusa. L'azione di questi additivi spesso consiste nel mascherare i siti attivi presenti sulla parete del capillare con i quali peptidi o proteine interagiscono; nel competere con questi analiti per detti siti interattivi; nella formazione di coppia ionica con i residui amminocidici basici della catena polipeptidica, limitando così la loro capacità ad interagire con i gruppi silanolo presenti sulla superficie del capillare.

Gli studi eseguiti presso il nostro laboratorio hanno condotto all'individuazione di una varietà di sostanze che possono essere efficacemente utilizzate come additivi delle soluzioni elettrolitiche per la separazione di peptidi e proteine basiche in capillari di silice fusa, tra le quali amminozuccheri (6), ammine alifatiche terziarie (7), diammine alifatiche (8) e oligoammine (9-11). Per alcune di queste sostanze è stata anche dimostrata l'efficacia nel controllare l'equilibrio protonico in ampi intervalli di pH, proponendole come tamponi delle soluzioni elettrolitiche in sostituzione di quelli tradizionalmente in uso. L'azione di alcuni di questi additivi e soluzioni tampone nel sopprimere le interazioni di peptidi e proteine con la parete del capillare e nel controllare il flusso elettroosmotico in capillari di silice fusa non modificati chimicamente è brevemente descritta in questo rapporto.

Dipendenza del flusso elettroosmotico dalla composizione della soluzione elettrolitica

L'applicazione di un campo elettrico agli estremi di un capillare di silice fusa riempito con una soluzione elettrolitica genera un flusso costante di liquido in direzione del catodo, definito flusso elettroosmotico (EOF). Questo fenomeno si verifica in conseguenza della presenza del doppio strato elettrico all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica. Nei capillari di silice fusa, il doppio strato elettrico trae origine dalla presenza sulla parete del capillare di gruppi silanolo, la cui dissociazione genera uno strato di cariche negative che per essere bilanciate attraggono verso la parete del capillare i cationi della soluzione elettrolitica, che si concentrano all'interfaccia solido-liquido originando il doppio strato elettrico schematizzato in Figura 1.

L'applicazione di un campo elettrico agli estremi del capillare produce la migrazione verso il catodo dei cationi mobili concentrati nel doppio strato elettrico e, essendo questi ioni solvatati, si

genera nel capillare un flusso di liquido diretto dall'anodo verso il catodo. Ne consegue che il flusso elettroosmotico è proporzionale al grado di dissociazione dei gruppi silanolo e pertanto aumenta con il pH della soluzione elettrolitica fino a raggiungere un valore massimo intorno a pH 8,0 ove la dissociazione dei gruppi silanolo è pressoché totale.

Quando la velocità del flusso elettroosmotico è superiore alla velocità di migrazione verso l'anodo delle specie con carica netta negativa, queste sono trasportate al catodo ad una velocità proporzionale alla differenza tra la mobilità elettroforetica e la mobilità elettroosmotica. Conseguentemente, la presenza del flusso elettroosmotico consente di eseguire la rivelazione delle specie in esame posizionando il rivelatore in prossimità della zona catodica del capillare ove migrano le specie cariche e neutre. Inoltre, il flusso elettroosmotico, che a differenza di una pompa meccanica non genera un flusso a profilo parabolico, limita i fenomeni di allargamento delle bande di migrazione alla sola diffusione longitudinale, contribuendo all'elevata efficienza del sistema.

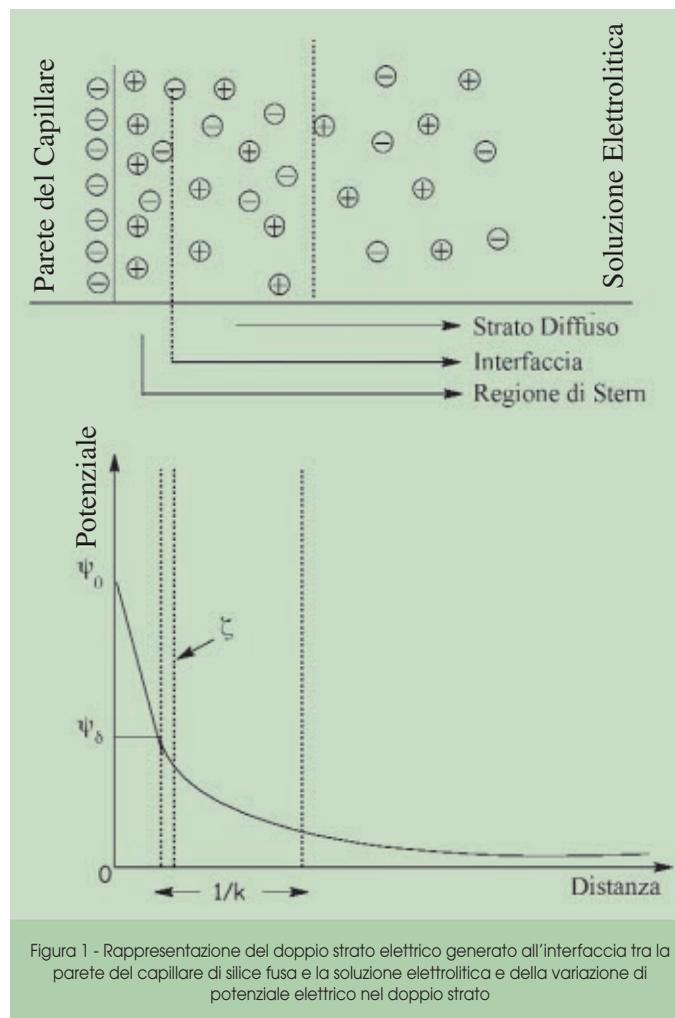


Figura 1 - Rappresentazione del doppio strato elettrico generato all'interfaccia tra la parete del capillare di silice fusa e la soluzione elettrolitica e della variazione di potenziale elettrico nel doppio strato

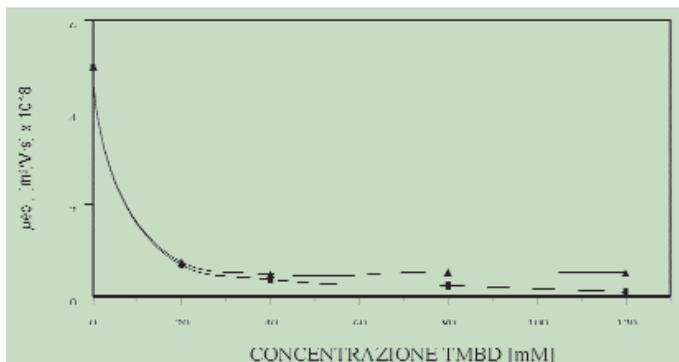


Figura 2 - Dipendenza del flusso elettroosmotico dalla concentrazione di N,N,N',N'-tetrametil-1,3-butandiammina (TMBD) nella soluzione elettrolitica costituita dalla diammina in combinazione con acido fosforico (■) o acido citrico (▲). Capillare, silice fusa (Quadrex, New Haven, CT, USA) 0,050 mm I.D. x 370 mm lunghezza complessiva (300 mm al rivelatore); potenziale elettrico applicato, 10 kV; temperatura, 25 °C; sostanza neutra utilizzata per la misura del flusso elettroosmotico, ossido di mercurio; rivelazione a 254 nm

Variazioni di pH, forza ionica, viscosità e composizione della soluzione elettrolitica modificano sensibilmente il doppio strato elettrico all'interfaccia solido-liquido, influenzando il flusso elettroosmotico e le interazioni di peptidi e proteine con la parete del capillare. Gli studi intrapresi presso il nostro laboratorio hanno evidenziato che la dipendenza del flusso elettroosmotico dalla concentrazione di composti amminici incorporati nella soluzione elettrolitica è conseguente alla loro immobilizzazione nella regione di Stern del doppio strato elettrico, determinata da interazioni aggiuntive a quelle di natura elettrostatica e, a temperatura e forza ionica costanti, segue un andamento tipico delle isoterme di Langmuir (6-7).

In Figura 2 è riportato un esempio della dipendenza della mobilità elettroforetica (μ_{eo}) dalla concentrazione di N,N,N',N'-tetrametil-1,3-butandiammina (TMBD) in una soluzione elettrolitica costituita da questa diammina e acido fosforico o acido citrico. Con entrambe le soluzioni elettrolitiche il flusso elettroosmotico diminuisce con la concentrazione di TBDM nella soluzione elettrolitica secondo un andamento proprio delle isoterme di adsorbimento, come precedentemente descritto. Le diverse pendenze delle curve che descrivono le variazioni di μ_{eo} in funzione della concentrazione di TBDM in presenza dei due diversi acidi è stata correlata alla diversa influenza dell'acido sull'adsorbimento della diammina. Tale effetto è più evidente quando l'acido poliprotico è sostituito da un acido monoprotico. Per esempio, con soluzioni elettrolitiche costituite da 40 mM TBDM titolato a pH 6,2 con acido fosforico o con acido citrico, il flusso elettroosmotico è catodico, mentre è anodico quando l'acido poliprotico è sostituito dall'acido formico. La Figura 3 descrive l'andamento di μ_{eo} in funzione del pH con soluzione elettrolitica costituita da 40 mM TBDM e acido formico. Con questo tampone il flusso elettroosmotico è catodico a pH 8,0 e anodico a valori di pH inferiori a 8,0.

Soluzioni elettrolitiche con potere tampone in ampi intervalli di pH e bassa conducibilità

La Tabella a fronte riporta i valori di pK_a , la struttura e gli acronimi di alcuni degli agenti tampone recentemente investigati nel nostro laboratorio (11). Questi tamponi sono costituiti da oligoammine alifatiche in miscela con acidi poliprotici o monoprotici. Dai valori di pK_a riportati in Tabella si evince che soluzioni tampone costituite da acido fosforico in combinazione con dietilentriammina (DIEN) o trietilentetrammina (TETA) hanno la capacità di controllare l'equilibrio protonico in intervalli di pH più ampi di quelli permessi da soluzioni tampone costituite dall'acido fosforico e un suo sale di un metallo alcalino o dalla combinazione dei diversi sali di un metallo alcalino dell'acido fosforico, brevemente indicate come tampone fosfato. Ciò è quanto si deduce anche dai grafici riportati in Figura 4 che illustrano le variazioni del potere tamponante (β) in funzione del pH di una soluzione 0,1 M di tampone fosfato a confronto con le variazioni di β nello stesso intervallo di pH relativo ai tamponi DIEN fosfato e TETA fosfato, preparati da soluzioni 0,1 M di DIEN o TETA titolate al valore di pH richiesto con acido fosforico. La grandezza β esprime la capacità del sistema tampone ad opporsi a variazioni di pH per l'aggiunta di un acido o una base forte ed è stata calcolata secondo il metodo descritto da Butler (12). I grafici di Figura 4 mostrano che le soluzioni DIEN fosfato e TETA fosfato hanno potere tamponante maggiore di quello del tampone fosfato ed assicurano un adeguato potere tamponante anche ad intervalli di pH entro i quali non è possibile controllare l'equilibrio protonico per mezzo del tampone fosfato.

I grafici di Figura 5 illustrano le variazioni dell'intensità di corrente misurata in corrispondenza dei valori di potenziale elettrico applicato agli elettrodi con soluzioni elettrolitiche a pH 3,0 costituite da DIEN fosfato 40 mM, TETA fosfato 40 mM e tampone fosfato a due diverse concentrazioni, equivalenti alle concentrazioni di acido

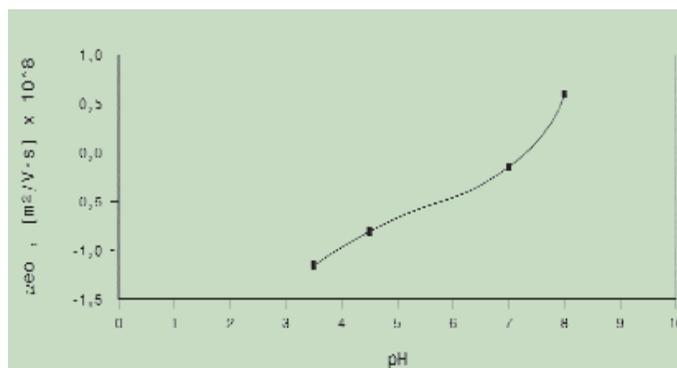


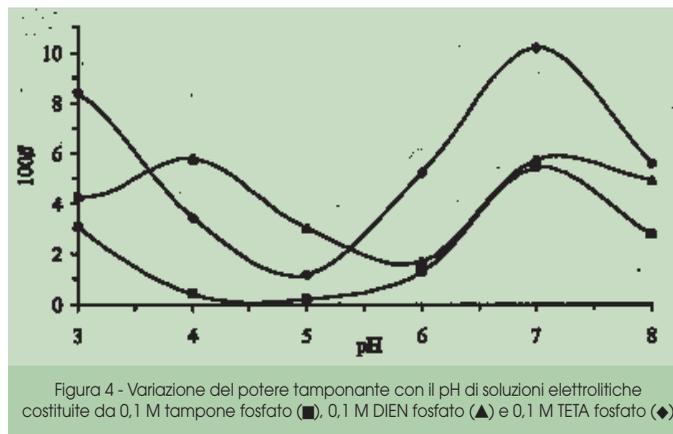
Figura 3 - Dipendenza della mobilità elettroosmotica dal pH della soluzione elettrolitica costituita da 40 mM TBDM titolata al valore di pH richiesto con acido formico. Condizioni sperimentali come in Figura 2

fosforico richieste per titolare a pH 3,0 le soluzioni di DIEN e TETA 40 mM. I valori di corrente misurati con le soluzioni DIEN fosfato e TETA fosfato risultano essere sensibilmente minori di quelli ottenuti con il tampone fosfato alle due diverse concentrazioni, in dipendenza della minore conducibilità degli ioni DIEN e TETA rispetto a quella dello ione sodio.

Risulta pertanto evidente che oltre ad assicurare il controllo dell'equilibrio protonico in ampi intervalli di pH, le soluzioni tampone ad elevata forza ionica costituite da DIEN fosfato e TETA fosfato consentono di applicare valori di potenziale elettrico superiori a quelli permessi dal tampone fosfato di forza ionica paragonabile, mantenendo i corrispondenti valori di corrente nei limiti entro i quali la legge di Ohm è lineare, ovvero, entro i quali non si ha un eccessivo sviluppo di calore per effetto Joule.

Separazioni di proteine basiche in capillari di silice fusa con tamponi a base di DIEN o TETA

Gli studi intrapresi presso il nostro laboratorio hanno anche evidenziato l'elevata capacità di mascheramento dei gruppi silanolo presenti sulla superficie dei capillari di silice fusa esercitata da una varietà di oligoammine alifatiche, tra le quali la dietilentriammina e la trietilentetrammina, come evidenziato in questo rapporto. Tale azione è efficace nel sopprimere le interazioni di natura elettrostatica tra parete del capillare e analiti cationici quali le proteine basiche. Gli elettroferogrammi di Figura 6 (A e B) mostrano la separazione di proteine basiche ottenuta a pH 4,0 e a pH 8,0 con un capillare di silice fusa non sottoposto ad alcun trattamento di modificazione chimica della parete interna. Il punto isoelettrico delle proteine in esame varia da 9,5 (citocromo



C) a 11,0 (lisozima). Pertanto a pH 4,0 e a pH 8,0 le proteine hanno carica netta positiva, mentre la parete del capillare è carica negativamente per effetto della ionizzazione dei gruppi silanolo presenti sulla sua superficie. In assenza di un efficace agente mascherante, quale dimostrano essere le due oligoammine alifatiche DIEN e TETA, la separazione sarebbe estremamente problematica a pH 4,0 e del tutto inattuabile a pH 8,0 in conseguenza delle forti interazioni elettrostatiche che si instaurerebbero tra le cariche di segno opposto della superficie del capillare e delle proteine basiche.

È stato dimostrato che l'azione di mascheramento dei gruppi silanolo esercitata da DIEN e TETA è conseguente all'adsorbimento di queste oligoammine alifatiche sulla superficie del capillare, al quale corrisponde la modificazione della regione di Stern del doppio strato elettrico all'interfaccia tra solido e liquido, con conseguente variazione del potenziale zeta e, conseguentemente, del flusso elettroosmotico (11). Ulteriori indagini

hanno evidenziato la possibilità di regolare la selettività del sistema separativo utilizzando soluzioni elettrolitiche costituite da oligoammine alifatiche in combinazione con diversi acidi monoprotici e poliprotici, capaci di formare coppie ioniche selettive con diverse proteine e peptidi (10). Altri studi hanno evidenziato la possibilità di modificare la selettività nella separazione delle proteine in elettroforesi capillare incorporando un sale di un metallo di transizione nella soluzione elettrolitica costituita da una oligoammina alifatica in combinazione con un acido poliprotico (13).

Struttura, acronimi e valori dei pKa di agenti tampone utilizzati in CE di peptidi e proteine

Nome	Acronimo	Struttura	pKa
Dietilentriammina	DIEN	$H_2NC_2H_4NHC_2H_4NH_2$	4,23
			9,02
			9,84
Trietilentetrammina	TETA	$H_2NC_2H_4NHC_2H_4NHC_2H_4NH_2$	3,25
			6,56
			9,08
			9,74
N,N,N',N' tetrametil-1,3-butandiammina	TMBD	$(CH_3)_2NCH(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)_2$	7,9
			10,3
Acido fosforico	-	H_3PO_4	2,15
			7,2
			12,38
Acido formico	-	$HCOOH$	3,75

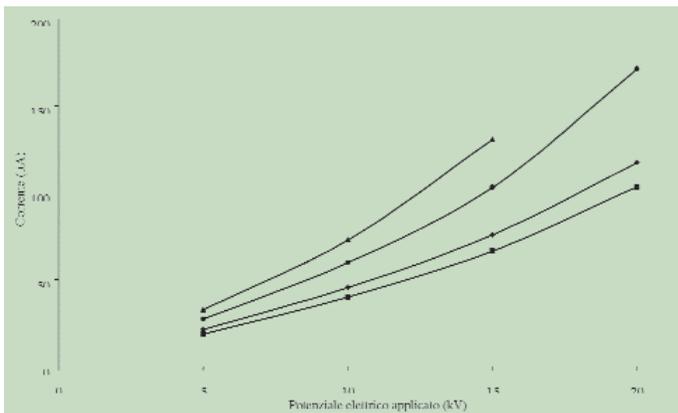


Figura 5 - Andamento della corrente in funzione del potenziale elettrico applicato con diverse soluzioni elettrolitiche di diversa composizione e medesimo valore di pH 3,0. Composizione soluzione elettrolitica, (◆) 40 mM DIEN fosfato, (■) 40 mM TETA fosfato, (●) 140 mM sodio fosfato e (▲) 172 mM sodio fosfato; capillare, silice fusa (Quadrex, New Haven, CT, USA) 0,050 mm I.D. x 370 mm lunghezza complessiva (300 mm al rivelatore); temperatura, 25 °C

Dipendenza del flusso elettroosmotico dal pH con i tamponi DIEN fosfato e TETA fosfato

Oligoammine alifatiche, quali quelle descritte in questo rapporto, assumono una o più cariche positive in dipendenza del pH, del numero dei gruppi amminici e del loro pK_a . L'adsorbimento delle oligoammine alifatiche nella regione del doppio strato elettrico all'interfaccia tra la parete interna del capillare e la soluzione elettrolitica determina la variazione della densità di carica positiva nella regione immobilizzata del doppio strato elettrico (regione di Stern). Gli effetti dell'adsorbimento di specie cariche positivamente possono risultare nella diminuzione del potenziale zeta negativo all'interfaccia tra solido e liquido, nei casi in cui la densità di carica negativa dovuta alla ionizzazione dei gruppi silanolo sia maggiore della densità di carica positiva introdotta dall'ammina adsorbita, oppure nell'inversione del potenziale zeta da negativo a positivo, nel caso in cui la densità di carica positiva, introdotta dall'adsorbimento dell'oligoammina, ecceda la densità di carica negativa dovuta alla ionizzazione dei gruppi

silanolo. In questo caso si ha anche l'inversione della direzione del flusso elettroosmotico da catodico ad anodico.

I grafici di Figura 7 illustrano le variazioni di flusso elettroosmotico in dipendenza del pH osservate con tampone fosfato, con DIEN fosfato e con TETA fosfato. In presenza di tampone fosfato la variazione del flusso elettroosmotico è descritta dall'andamento della ionizzazione dei gruppi silanolo, minima in ambiente acido e progressivamente crescente con l'aumentare del pH fino ad essere completa al di sopra di pH 7,0, al quale corrisponde il valore massimo del flusso elettroosmotico.

Le variazioni del flusso elettroosmotico in dipendenza del pH con tamponi DIEN fosfato o TETA fosfato riflettono l'andamento dell'adsorbimento delle due oligoammine nella regione di Stern del doppio strato elettrico, diversamente influenzato dai distinti valori di pK_a delle due oligoammine e dalla loro struttura molecolare. TETA ha quattro gruppi amminici (due primari e due secondari) e due valori di pK_a in ambiente acido. L'adsorbimento di questa oligoammina alifatica nell'intervallo di pH 3,0-7,0 determina un valore di densità elettrica positiva nella regione di Stern del doppio strato elettrico che eccede quello della densità elettrica negativa, dovuto alla ionizzazione dei gruppi silanolo, con il risultato che il flusso elettroosmotico è anodico. A pH 8,0 il flusso elettroosmotico è catodico, ma circa quaranta volte minore di quello misurato con il tampone fosfato. Ciò sta ad indicare che anche a questo valore di pH si ha un significativo adsorbimento di TETA, ma che la densità di carica negativa dovuta alla ionizzazione dei gruppi silanolo eccede la densità di carica positiva associata all'adsorbimento dell'oligoammina che, come si può dedurre dai due valori maggiori di pK_a (9,08 e 9,74), è carica positivamente.

Con il tampone DIEN fosfato il flusso elettroosmotico è catodico a tutti i valori di pH, ma sensibilmente minore di quello misurato con il tampone fosfato. Ciò sta ad indicare che la densità di carica positiva nella regione di Stern del doppio strato elettrico dovuta all'adsorbimento di DIEN non eccede mai la densità di carica elettrica negativa dovuta alla ionizzazione dei gruppi silanolo, anche al più basso valore di pH ove tale ionizzazione è minima.

Bibliografia

- (1) D. Corradini, *J. Chromatogr. B*, 1997, **699**, 221.
- (2) I. Rodriguez, S.F.Y. Li, *Anal. Chem. Acta*, 1999, **383**, 1.
- (3) P.G. Rigetti *et al.*, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 603.
- (4) P.G. Rigetti, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2001, **22**, 337.
- (5) V. Dolník, K.M. Hutterer, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 4163.
- (6) D. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1994, **661**, 305.
- (7) D. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1995, **709**, 127.
- (8) D. Corradini, G. Cannarsa, *Electrophoresis*, 1995, **16**, 630.
- (9) D. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24**, 2785.
- (10) D. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1013**, 221.
- (11) D. Corradini, L. Spreccacenero, *Chromatographia*, 2003, **58**, 587.
- (12) J. N. Butler, *Equilibri Ionici in Soluzione, Elementi per una trattazione matematica*, versione italiana della prima edizione a cura di R. Freddi, Società Editrice Universo, Roma, 1969, 163.
- (13) D. Corradini *et al.*, *Zhurnal prikladnoï khimii*, 1999, **72**, 96.

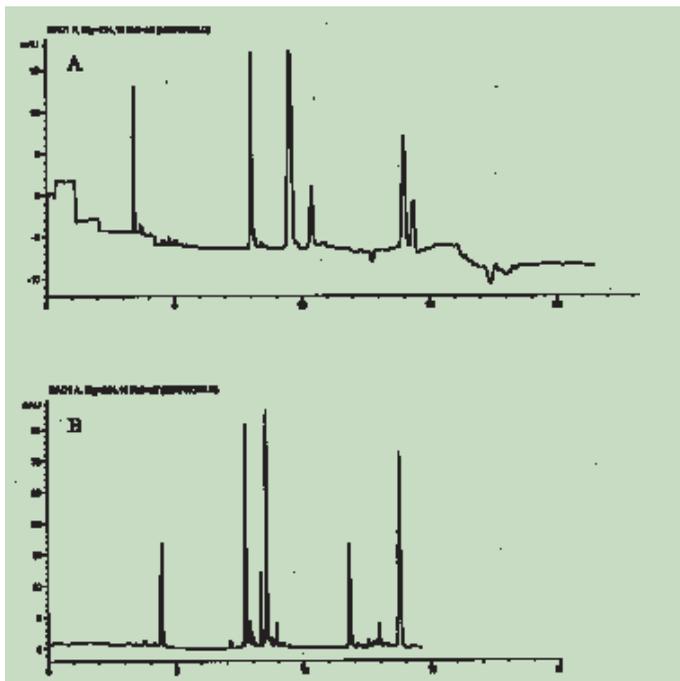


Figura 6 - Separazione di proteine basiche in capillare di silice fusa non sottoposto a modificazione chimica con soluzione elettrolitica costituita da TETA fosfato 80 mM a pH 4.0 (A) e pH 8.0 (B). Capillare, silice fusa (Quadrex, New Haven, CT, USA) 0,050 mm I.D. x 370 mm lunghezza complessiva (300 mm al rivelatore); potenziale elettrico applicato, 10 kV; temperatura, 25 °C

Ciò può essere ascritto a diversi fattori, tra i quali il minor numero di gruppi amminici (tre invece di quattro) e la presenza di un solo valore di pK_a in ambiente acido.

Conclusioni

I dati riportati in questo breve rapporto evidenziano che soluzioni elettrolitiche costituite da oligoammine alifatiche in combinazione con un acido monoprotico o poliprotico sono efficaci nel controllare l'equilibrio protonico in ampi intervalli di pH e nel mascherare i gruppi silanolo presenti sulla parete interna dei capillari di silice fusa, fonte di deleterie interazioni con peptidi e proteine.

L'azione di mascheramento dei gruppi silanolo esercitata dalle

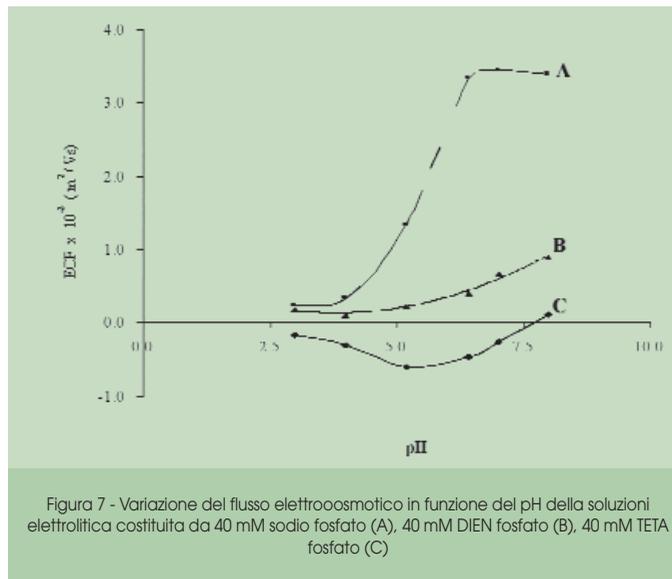


Figura 7 - Variazione del flusso elettroosmotico in funzione del pH della soluzioni elettrolitica costituita da 40 mM sodio fosfato (A), 40 mM DIEN fosfato (B), 40 mM TETA fosfato (C)

oligoammine alifatiche è conseguente al loro adsorbimento sulla superficie del capillare, al quale corrisponde la modificazione della regione di Stern del doppio strato elettrico all'interfaccia tra solido e liquido, con conseguente variazione del potenziale zeta e, coerentemente, del flusso elettroosmotico. L'adsorbimento è influenzato da pH, forza ionica, composizione chimica della soluzione elettrolitica e concentrazione dell'oligoammina. Nella generalità dei casi studiati l'influenza della concentrazione dell'oligoammina sul flusso elettroosmotico segue un andamento simile a quello delle rappresentazioni grafiche e dei modelli matematici che descrivono le isoterme di adsorbimento di Langmuir.

La combinazione delle oligoammine con acidi poliprotici di diversa composizione determina variazioni della selettività nella separazione delle proteine che è anche possibile regolare mediante incorporazione nella soluzione elettrolitica di sale dei metalli di transizione o di altri additivi opportunamente selezionati.

Ringraziamenti: Le ricerche descritte in questo lavoro sono state in parte finanziate dal Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft and Kultur (Austria), progetto "Phyto-Proteomics and Phyto-Metabolomics".

Capillary Electrophoresis of Peptides and Proteins Novel Buffering Agents and Additives of the Electrolyte Solutions

ABSTRACT 

This brief report illustrates the action performed by novel buffering agents and additives of electrolyte solutions in controlling the protonic equilibrium, modulating velocity and direction of the electroosmotic flow, and allowing efficient separations of peptides and basic proteins by capillary electrophoresis with uncoated bare fused silica capillaries. The investigated buffering agents consist of aliphatic oligoamines in combination with either a monoprotic or a polyprotic acid. They allow regulating the protonic equilibrium in a wide pH range and permitting applying high electric voltage keeping the proportional current limited to the linear region of the Ohm law, which means within values at which the heat produced by the Joule is easily dissipated. The efficient masking effect performed by the novel additives and buffering agents allow their use for the separation of peptides and proteins in bare fused silica capillaries, without the need of their chemical coating.