

Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE LIF)

Teoretická část

A. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE) je moderní vysoce účinná analytická separační metoda založená na migraci analytů v kapalině mezi dvěma elektrodami o vysokém napětí (10 – 30 kV), realizovaná v kapiláře obvykle o průměru 25-75 μm s detekcí přímo na koloně.

Jedním z módů CE je kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis, CZE), pro niž je charakteristické použití jednoho pracovního elektrolytu (background electrolyte, BGE). V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé zóny putují různými konstantními rychlostmi, jsou oddělené BGE a odezva detektoru na konci kapiláry má charakteristický profil píku, jehož tvar je funkcí mnoha faktorů (dávkování, detekce, difúze, sorpce, rozdílů mobilit analytu a BGE...). Obdobně jako u chromatografie, kvalitativní charakteristika analytu je dána migračním časem píku, kvantita souvisí s výškou a plochou píku.

Elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném nábojem částice a orientací pole. Kladně nabitá částice se pohybuje k zápornému pólu a naopak. Nabitá částice je charakterizována *elektroforetickou pohyblivostí* neboli mobilitou μ , která je číselně rovna konstantní rychlosti v , kterou částice dosáhne v daném prostředí při jednotkové intenzitě elektrického pole. Platí:

$$\mu = \frac{v}{E} = v \cdot \frac{L}{U} \quad \left[\frac{\text{m}^2}{\text{Vs}} \right],$$

kde E je intenzita elektrického pole, U je aplikované napětí, L je vzdálenost na které vzniká gradient napětí (celková délka kapiláry).

Elektroforetická mobilita je výsledkem rovnováhy síly elektrického pole působící na nabitou částici a odporu prostředí: Elektrická síla je úměrná náboji částice a intenzitě elektrického pole ($F = q \cdot E$); proti působí odpor prostředí vyjádřený Stokesovou silou ($F = 3\pi\mu d v$, kde μ je viskozita kapaliny, d je hydrodynamický průměr částice a v je rychlost částice). Elektroforetická mobilita je konvenčně definována jako pozitivní pro kationty a negativní pro anionty.

Elektroforetickou pohyblivost lze vypočítat z migračního času t_m , tj. času, který látka potřebuje k elektromigraci z místa nástřiku do místa detekce, jak je zřejmé z definice:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{l_{ef}}{t_m E} = \frac{l_{ef} L}{t_m U},$$

kde l_{ef} je efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku k detektoru).

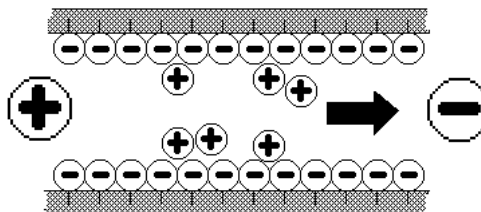
Při použití kapiláry (typicky křemenné) jako separační kolony je prostá elektromigrace snižována nebo zvyšována *elektroosmotickým tokem* (electroosmotic flow, EOF; viz. obr. 1), který je na náboji analytu nezávislý, a pro výpočet skutečné mobility μ pak platí:

$$\bar{\mu} + \bar{\mu}_0 = \frac{l_{ef}L}{t_m U} \quad \Rightarrow \quad \mu = \frac{l_{ef}L}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right),$$

kde t_0 je migrační čas nenabitých částic.

Obr. 1. Elektroosmotický tok

Povrch kapiláry nese nepohyblivý negativní náboj (disociované silanolové skupiny). V důsledku zachování elektroneutality se proto u stěn nachází přebytek pozitivních iontů z roztoku, které pak celou kapalinu unášejí ke katodě. Příklad: EOF má v tomto případě stejný směr jako výsledný pohyb analytu.



Řada látek separovaných elektroforézou má acidobazický charakter. Protože rychlost ustavení ionizační rovnováhy je obvykle mnohem vyšší než rychlost elektromigrace, putují všechny formy téže látky stejnou rychlostí v jedné zóně. Tato výsledná pohyblivost, tzv. *efektivní pohyblivost*, je dána součtem iontových pohyblivostí jednotlivých forem μ_i vynásobených příslušným molárním zlomkem x_i :

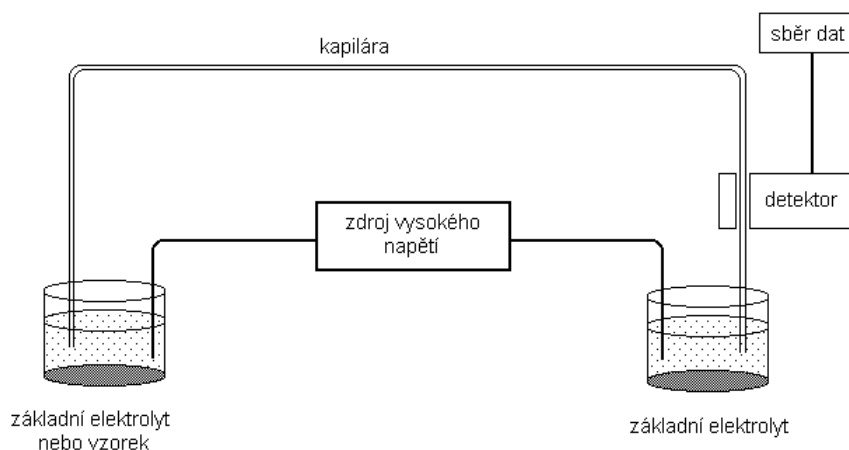
$$\mu_{ef} = \sum x_i \mu_i$$

Analytik stojí většinou před úkolem, jak dosáhnout separace všech nebo alespoň hlavních komponent vzorku, tj. snaží se najít podmínky, za nichž jsou rozdíly efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých analytů maximální. Může k tomu často použít právě změny pH pracovního elektrolytu. V jiných případech je možné změnit mobilitu některých analytů přidáním vhodného komplexujícího iontu kovu (pro separaci ligandů) nebo naopak komplexujícího ligandu (pro separaci iontů kovů) či látek vytvářejících hostitelské komplexy, např. cyklodextrinů nebo crown-etherů. Separační médium lze též modifikovat přidáním nevodného rozpouštědla, gelu nebo lineárního polymeru. Přidáním povrchově aktivní látky (detergentu), která je na povrchu kapiláry adsorbována, je možné eliminovat EOF nebo dokonce obrátit jeho směr, např. kationogenní cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) na povrchu křemenné kapiláry vytvoří kladně nabitou vrstvu místo původní záporné.

B. Instrumentace - teorie

CZE

Základní zařízení pro CZE obsahuje separační kapiláru, zdroj napětí, detektor a zařízení pro záznam analytického signálu (obr. 2). Běžné hodnoty napětí jsou 10 – 30 kV, koncentrace pufru 10 – 50 mM. Analýza se obvykle provádí v křemenných kapilárách, zřídka v kapilárách teflonových nebo skleněných. Křemenné kapiláry jsou z vnější strany chráněny tenkou vrstvou polyimidu, čímž se zamezí jejich křehnutí a lámání. Typický vnitřní průměr (inner diameter, i. d.) kapiláry je 25 – 75 μm , vnější 150 – 400 μm (outer diameter, o. d.), délka 30 – 70 cm, objem řádově jednotky μl .



Obr. 2. Schéma sestavy pro kapilární elektroforézu

Dávkování

Dávkování vzorku (injection) se provádí buď *hydrodynamicky* nebo *elektrokineticky*.

Hydrodynamického dávkování dosáhneme přetlakem na vstupu či podtlakem na výstupu separační kapiláry. Změnu tlaku lze uskutečnit pomocí stlačeného plynu, vývěvy nebo prostým zvýšením polohy nádoby se vzorkem oproti nádobce s BGE na výstupu kapiláry.

Elektrokinetické dávkování vzorku spočívá v aplikaci dávkovacího napětí po stanovenou dobu, obvykle několik sekund. Při elektrokinetickém dávkování závisí nadávkované množství na elektromigračním i elektroosmotickém toku a je diskriminační: do separační kapiláry se přednostně dostávají mobilnější ionty. Pokud má vzorek nižší vodivost než elektrolyt, který se nachází v kapiláře, lze elektrokinetické dávkování využít k účinnému zakoncentrování iontů vzorku (stacking). Elektrokinetické dávkování vykazuje zpravidla nižší reprodukovatelnost.

Detekce

Detekce je nejčastěji založena na změně absorbance nebo fluorescence při průchodu zóny analytu detektorem. V případě použití *laserem indukované fluorescence* (laser-induced fluorescence, LIF) je s výhodou využito charakteristických vlastností laseru. Jde především o

prostorové vlastnosti laserového paprsku, které jej činí kompatibilní s CE. Laserový paprsek je úzký uspořádaný svazek světla s minimální divergencí a je proto snadné jej zaostřit tak, že prochází mezi vnitřními stěnami kapiláry (šířka svazku jednotky až desítky μm). Protože je záření laseru účinně využito, lze použít i lasery s relativně malým výkonem několika mW. Jistým omezením použití LIF je nedostupnost cenově přijatelných laditelných laserů; obvykle je třeba rozhodnout se pro vhodnou vlnovou délku a vybrat patřičný laser. Nejčastěji používané lasery a vlnové délky jejich emise jsou uvedeny v tabulce:

Laser	Vlnová délka (nm)
HeNe	632
Ar+	488, 514, UV
Diodový	400 – 1000

Nevýhodou fluorescenční (ale i absorbanční) detekce je, že ne všechny látky mají chromofory vykazující dostatečnou fluorescenci nebo absorpci v obvyklé UV-VIS oblasti (180-800 nm) a jejich přímá detekce tedy není vždy možná. Pak je nutno buď analyty derivatizovat reakcí s látkou, která vhodný chromofor obsahuje, nebo použít jiný druh detekce (refraktometrický, amperometrický, vodivostní, MS), případně použít detekci nepřímou. Při nepřímé detekci je v základním elektrolytu přítomna fluoreskující, respektive absorbující látka, kterou putující zóna analytu v daném místě „zředí“ a detektor registruje pokles fluorescence nebo absorbance (negativní pík). Kalibrace s nepřímou detekcí je proto univerzální. I když se takto významně rozšiřuje rozsah látek detekovatelných UV-VIS detektorem, meze detekce jsou zpravidla o několik řádů horší.

C. Instrumentace – praktické provedení (obr. 3)

V tomto přístroji je pro tuto úlohu nainstalován laser DPSS Nd:YAG (diode pumped solid state neodymium-doped yttrium aluminium garnet, 1064 nm) s násobičem frekvence (2x) emitující záření o vlnové délce 532 nm. Laserový paprsek je zaostřen křemennou čočkou o ohniskové vzdálenosti 10 mm do středu kapiláry umístěné na mikrometrickém stojanu. Fluorescenční záření zachycené mikroskopovým objektivem (10x) je nasměrováno přes štěrbinu (prostorová filtrace) na fotonásobič, kterému jsou předřazeny dva filtry (optická filtrace).

Pozn.: Pokud sejmete stínítko a překryjete štěrbinu bílým papírem, na obrazu by měla být jasně viditelná čtyři rozhraní: vzduch/vnější stěna kapiláry, vnitřní stěna kapiláry/roztok, roztok/vnitřní stěna kapiláry a vnější stěna kapiláry/vzduch. Štěrbina by měla být mezi 2. až 3. rozhraním nastavena tak, aby propouštěla (oranžovou) fluorescenci a blokovala (zelené) rozptýlené záření.

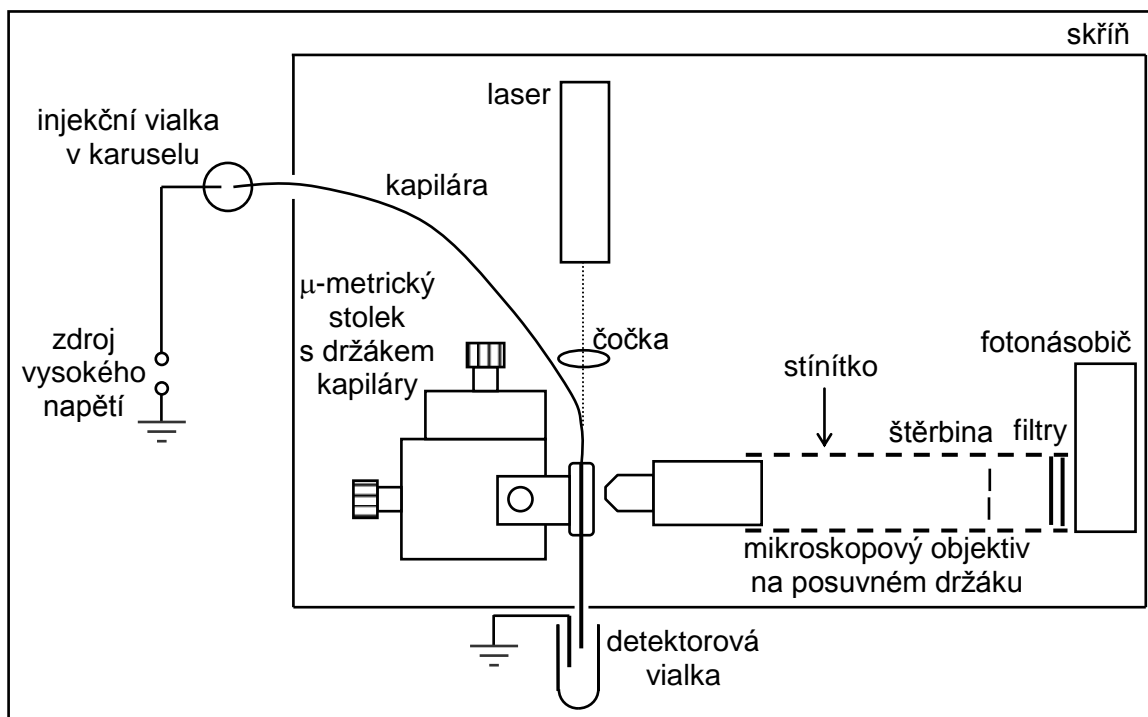
Celá sestava je uzavřena do stínící skříně. Karusel s injekčními a BGE vialkami a přívodem vysokého napětí se nachází v ochranné plastové nádobce jištěné bezpečnostním vypínačem proti úrazu operátora elektrickým proudem. Proud z fotonásobiče je digitalizován pomocí karty s 16-ti bitovým A/D převodníkem v osobním počítači. Získaná data (závislost proudu fotonásobiče na čase) jsou nahrána a uložena do souboru ve formátu ASCII programem LabVIEW. K vyhodnocení a grafické prezentaci dat je použit komerční program (MS Excel).

Dosažení nízkých detekčních limitů je založeno na účinné excitaci, citlivé detekci a redukcí šumu. Účinná excitace je dosažena řádným zaostřením prakticky veškerého výkonu laseru dovnitř kapiláry. Citlivá detekce spočívá v účinné kolekci emitovaného záření a použití citlivého detektoru s vysokým ziskem (fotonásobič). Šum je různého původu a tomu odpovídají i prostředky použité k jeho omezení:

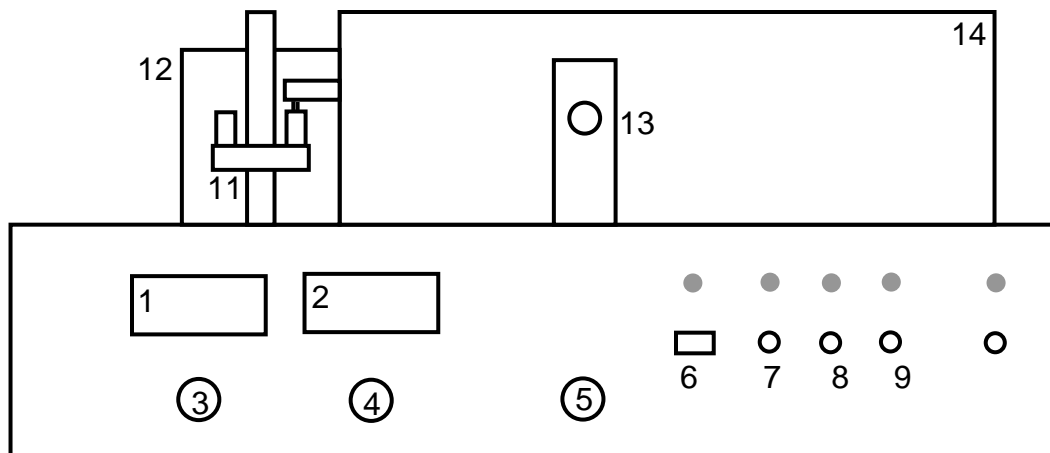
- a) rozptýlené záření laseru
 - zařazení optických filtrů a štěrbin před fotonásobič
 - vložení stínítek do skříně
 - černý nefluoreskující nátěr skříně, ve které je sestava umístěna
- b) pronikání okolního bílého světla
 - umístění sestavy do skříně
 - optické utěsnění všech štěrbin a otvorů
- c) elektrické interference, zejména indukce síťového signálu
 - použití RC filtru pro potlačení šumu o frekvencích nad ~10 Hz
 - integrace signálu po dobu odpovídající násobku periody síťového signálu – program CELIF v prostředí LabVIEW

CE

V přístroji je použita nemodifikovaná křemenná kapilára s efektivní délkou 30 cm, celková délka kapiláry je 37 cm, průměry kapiláry: i.d. 50 nebo 75 μm , o.d. 360 μm (obr. 3 a 4).



Obr. 3. Schéma přístroje pro CE-LIF



Obr. 4. Popis přístroje

- 1 ukazatel vysokého napětí
- 2 ukazatel proudu
- 3 nastavení vysokého napětí
- 4 nastavení omezení proudu (ukazatel nastaven zhruba na 25 %)
- 5 nastavení vysokého napětí pro fotonásobič (nastaven na hodnotu "650")
- 6 přepínač ovládání local/remote (stlačený = local)
- 7 vypínač vysokého napětí pro CE
- 8 vypínač vysokého napětí pro fotonásobič
- 9 vypínač laseru
- 10 síťový vypínač
- 11 karusel s injekčními vialkami
- 12 kryt karuselu
- 13 detektorová vialka
- 14 skříň

Program CELIF (LabVIEW)

Program CELIF byl vytvořen v prostředí LabVIEW za účelem digitalizace signálu pomocí 16-ti bitové A/D karty. Program umožňuje provádět měření na přístroji CELIF v manuálním módu (local) nebo v automatickém módu (remote). Během všech úloh budete používat mód “remote”, kdy jsou pomocí programu CELIF ovládány dávkování, laser, fotonásobič, napětí separace i doba analýzy. Program CELIF otevřete kliknutím na ikonu “CELIF latest version” na pracovní ploše. Před zahájením každého experimentu je třeba zadat jméno souboru (nejlépe s příponou .txt) včetně adresáře, maximální dobu nahrávání dat (např. 15 minut) a vzorkovací frekvenci (4 Hz).

Upozornění: *Nový název souboru je nutné zadat před každou analýzou, jinak dojde k přepisu souboru a ke ztrátě dat!*

Dále nastavte napětí a čas elektrokinetického dávkování a hodnotu napětí separace. Po zadání všech parametrů spustíte program pomocí bílé šipky (“run”) nacházející se v levé horní části okna programu. Pomocí příslušných tlačítek v levé části okna se zapíná laser a fotonásobič (PMT). Napětí pro dávkování se zapíná tlačítkem “injection”, vypnutí následuje automaticky ve zvoleném čase. Napětí a nahrávání separace se spouští tlačítkem “START CE”.

Před spuštěním analýzy je doporučeno vymazat displej (přesuňte kurzor myši na displej, stiskněte pravé tlačítko myši, a v menu zvolte “Clear chart”).



UPOZORNĚNÍ



Vypínač vysokého napětí zapínejte, pouze když je karusel se vzorky chráněn průhledným plastovým krytem!

Fotonásobič zapínejte, pouze když je zakryt ochrannou skříní!

Při manipulaci s laserovým paprskem se nikdy nedívejte přímo do laseru. Pozor na odrazy paprsku od držáků nebo od kovového pásku hodinek!

Experimentální část

A. Optimalizace sestavy

Stanovení detekčního limitu rhodaminu 6G

Před vlastní separací je třeba přesvědčit se o správné funkci přístroje. Cílem této úlohy je, abyste se seznámili s přístrojem, pochopili základní principy a naučili se základní ovládání.

1. Příprava roztoků

Připravte 100 ml pufru BGE, 50 mM kyseliny citrónové v 10 % EtOH (v/v) a titrujte jej roztokem konc. amoniaku (příp. 1M NaOH) na $pH = 2,5$. Pufrem BGE naplňte 2 vialky. Připravte sadu vialek vzorků s rhodaminem 6G o koncentracích 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M a 10^{-11} M v pufru BGE.

Zásobní roztok rhodaminu 6G je 2 mM. Roztoky řed'te postupně v několika krocích (např. 10x, 100x nebo 1000x) do malých objemů (100-1000 μ l). Z důvodů nižší přesnosti nepipetujte méně než 1 μ l. Pro vzorky použijte malé vialky o objemu 200 μ l. Objem každého vzorku by neměl být menší než 150 μ l.

Roztoky (BGE a vzorky) zbavte rozpuštěných plynů v ultrazvukové lázni (3 min).

2. Ověření správné funkce CE-LIF stanovením detekčního limitu rhodaminu 6G

Plnění kapiláry

Naplňte kapiláru pufrem BGE a dbejte, aby přitom dovnitř kapiláry nevníkla bublina: kapiláru opět plňte pufrem od detekčního konce, protlačte alespoň 3 kapky pufru, který nechte vsakovat do tampónu přiloženého k injekčnímu konci kapiláry. Zvedněte injekční vialku s pufrem a ještě několik sekund pokračujte v protlačování pufru kapilárou. Detekční konec kapiláry mírně ohněte směrem dolů, odstraňte stříkačku a co nejdříve nasad'te detektorovou vialku s pufrem. Nastavte potenciometrem hodnotu vysokého napětí $HV = 0$. Po zakrytí karuselu krytem zapněte vysoké napětí a postupně jej potenciometrem zvyšujte na 15 kV. Dojde-li k jiskření (které poznáte podle praskavého zvuku), je třeba přerušit experiment a vyčistit prostor karuselu. Je-li vše v pořádku, další zapínání vysokého napětí provádějte bez předchozího vynulování HV potenciometrem. Zaznamenejte hodnotu proudu a sledujte ji po dobu ~30 s. Kolísá-li hodnota proudu nebo klesne-li o více než 10%, je nutno kapiláru znovu naplnit pufrem.

Další ovládání přístroje už budete provádět jen v modu "remote" pomocí programu CELIF. Zapněte laser a napětí na fotonásobiči (hodnotu "600" nastavenou potenciometrem neměňte) a signál z fotonásobiče sledujte pomocí programu CELIF. Po ustálení by krátkodobé kolísání signálu mělo být zhruba 10 úrovní (min.-max.).

Dávkování a experiment

Poté, co jste ověřili, že je kapilára řádně naplněna, můžete nadávkovat první vzorek. V programu CELIF zadejte jméno souboru, dobu analýzy (15 minut) a vzorkovací frekvenci (4 Hz). Při vypnutém napětí zaměňte vialku s pufrem BGE pod elektrodou za vialku se vzorkem s nejnižší koncentrací rhodaminu 6G (stlačení, pootočení a uvolnění karuselu – opatrně, aby nedošlo ke zlomení elektrody nebo kapiláry!). Pomocí programu proveďte injektáž při 5kV po dobu 10 s. Vyčkejte na pokles proudu na hodnotu nižší než 1 μA a zaměňte vialku se vzorkem za vialku s pufrem BGE. Hned poté opět zapněte start analýzy (napětí a sběr dat). Zaznamenejte hodnotu proudu a sledujte, zda se v průběhu analýzy významně nemění. Zopakujte experiment s ostatními vzorky ze sady. Nezapomeňte vždy zadat nové jméno souboru pro následující měření! Po skončení všech experimentů naplňte obě vialky a kapiláru čerstvým roztokem BGE.

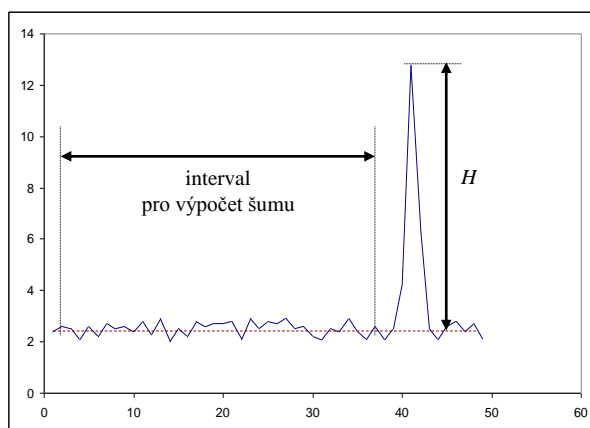
Vyhodnocení výsledků

Výsledky vyhodnoťte pomocí programu Excel; proveďte import získaných ASCII dat do jednoho listu a sestrojte jeden graf se všemi zaznamenanými elektroforegramy. Do tabulky zanešte migrační časy, výšky a plochy píků analytu, šířku píku v polovině výšky (peak full width at half maximum, FWHM) a počet teoretických pater. Proveďte kalibraci, t.j. sestrojte lineární kalibrační grafy výšky píku vs. koncentrace a plochy píku vs. koncentrace.

Z elektroforegramu rhodaminu 6G o nejnižší koncentraci, při které jste detekovali signál, spočítejte koncentrační limit detekce – z hodnot šumu (minimálně dvacet) předcházejících píku rhodaminu 6G spočítejte jeho směrodatnou odchylku s a detekční limit získáte podle vztahu:

$$LOD = \frac{3 \cdot s \cdot c}{H}$$

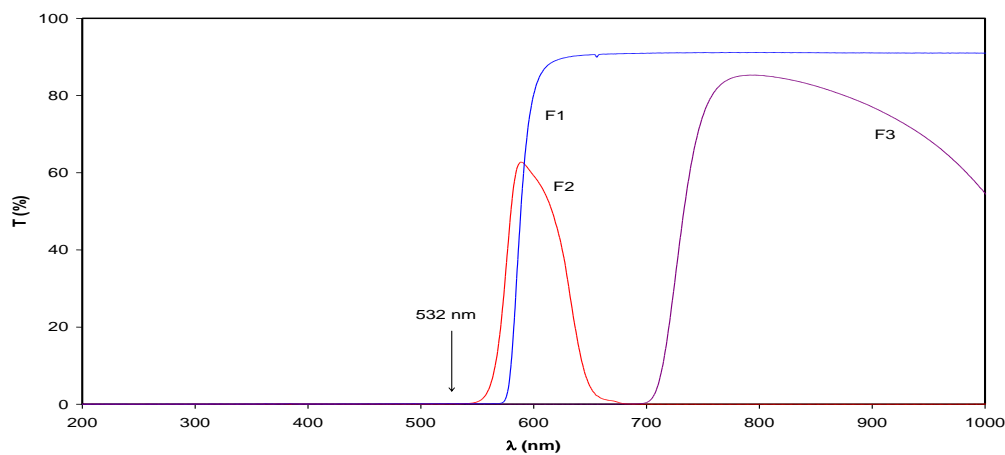
kde H je výška píku rhodaminu 6G a c je jeho koncentrace (obr. 5). Pokuste se vyjádřit limit detekce v jednotkách látkového množství.



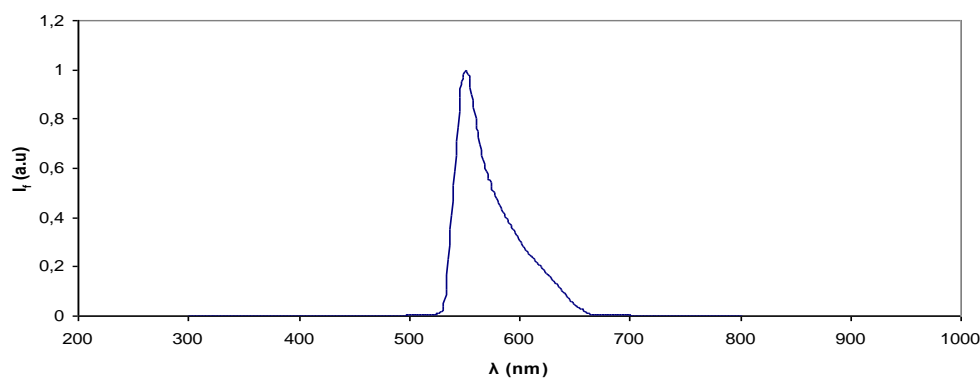
Obr. 5. Schéma elektroforegramu pro výpočet LOD

3. Otázky

1. Před fotonásobič jsou zařazeny 2 z filtrů, jejichž transmisní spektra jsou na obr. 6a. Obr. 6b je emisní spektrum rhodaminu 6G. Které filtry byste vybrali pro CELIF detekci? Proč?



Obr. 6a. Spektra propustnosti vybraných filtrů



Obr. 6b. Emisní spektrum rhodaminu 6G

2. Vysvětlete nenulovou hodnotu signálu a šumu v případě, že je v kapiláře pouze voda nebo BGE.
3. Vysvětlete chvostování píku rhodaminu B. Jak je v úloze omezeno? Jaké další způsoby, jak ho omezit, byste navrhli?
4. Porovnejte vypočtené hodnoty počtu teoretických pater při experimentech s různou koncentrací rhodaminu. Vysvětlete případné rozdíly.
5. Při výkonech vyšších než ~ 1 W na metr kapiláry často dochází k zvýšenému rozmývání zón analytů vlivem tepla. Jaký výkon vyzařovala kapilára (ve formě Jouleova tepla) při Vašem měření? Mohlo být vzniklé teplo příčinou rozmytí zón (píků)? Navrhněte, jak snížit nadměrné zahřívání kapiláry.
6. Je možné, že některé z experimentů nevyšly tak, jak jste si představovali. Popište odchylku od očekávaného chování a pokuste se o její zdůvodnění.
7. Vypočítejte rychlost zóny a efektivní iontovou mobilitu rhodaminu 6G při separaci.

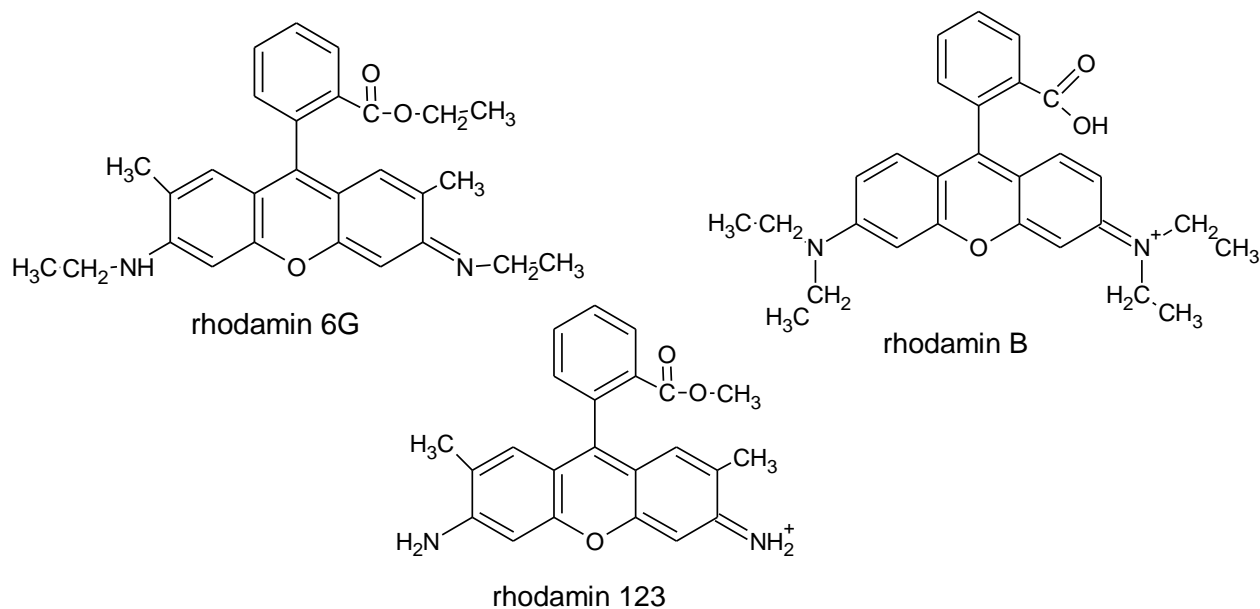
B. Separace rhodaminových barviv

Promývejte kapiláru roztokem BGE 5 minut a ověřte stabilitu proudu při 15 kV.

Připravte si směs rhodaminových barviv, tak aby finální koncentrace rhodaminu 6G, rhodaminu 123 a rhodaminu B (obr. 7) byly ve vzorku 1 nM, 100 nM a 10 nM. Pro ředění použijte BGE.

Zásobní roztoky vznikly rozpuštěním v 10 % etanolu a mají následující koncentrace:

rhodamin 6G	2 mM
rhodaminu 123	300 μ M
rhodaminu B	1 mM.



Obr. 7. Strukturální vzorce jednotlivých rhodaminových barviv

Směs barviv dávkujte elektromigračně při 5 kV po dobu 10 s z připraveného roztoku. Jako BGE použijte opět 50 mM roztok kyseliny citrónové v 10 % EtOH (v/v) titrovaný na pH 2,5 koncentrovaným amoniakem. Elektroforézu provádějte při napětí 15 kV. Pomocí programu MS Excel sestrojte elektroforegram separace. Po skončení všech experimentů naplňte obě vialky a kapiláru čerstvým roztokem BGE.

Otázky

1. Porovnejte migrační časy piků s migračním časem piků rhodaminu 6G z úlohy A. Který z piků přísluší rhodaminu 6G?
2. Kolik piků pozorujete v elektroforegramu? Liší se tento počet od Vašeho očekávání? Pokud ano, pokuste se rozdíl vysvětlit.
3. Ze strukturních vzorců znáte velikost jednotlivých barviv a můžete odhadnout náboj barviv při $\text{pH} \sim 2,5$. Určete, který pik přísluší rhodaminu B a rhodaminu 123.
4. Do tabulky zaneste migrační časy analytů, spočítejte efektivní mobility analytu a počet teoretických pater pro jednotlivé analyty.
5. Navrhněte možnosti, jak zvýšit separační účinnost (počet teoretických pater).
6. Z kalibračního grafu změřeného v úloze A vypočtete koncentraci rhodaminu 6G ve směsném vzorku a porovnejte ji s očekávanou hodnotou.

C. Protokol

V protokolu uveďte své jméno, datum a názvy úloh, přičemž za celou skupinu postačí jeden protokol. Preferován je protokol v elektronické formě. Do protokolu neopisujte princip ani zadání úloh. Uveďte však všechny podmínky (příprava vzorku, ředění, dávkování, příprava kapiláry, proud kapilárou atd.), za kterých byla naměřena data tak, aby bylo možné experiment zopakovat. Výsledky uvádějte v přehledné grafické podobě (grafy – Excel, tabulky). Odpovězte na otázky na konci úloh.

V závěru posuďte úlohy, které jste absolvovali. Diskutujte reprodukovatelnost, citlivost, význam úlohy. Budeme vděční za všechny komentáře a návrhy, jak úlohu vylepšit.