



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie



Návod do cvičení

PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE
LABORATORNÍ CVIČENÍ

Mgr. Aleš Mádr

2012

Vzniklo díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy z Fondu rozvoje vysokých škol,
projekt č. 150/2012/G6.

1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA^{1,2}

1.1 Základní princip

Kapilární elektroforéza (CE) je separační elektromigrační technika, která ve svém tradičním uspořádání využívá stejnosměrného elektrického pole k separaci iontů. Elektroforetický separační princip však může být snadno rozšířen o chromatografický princip nebo princip molekulového síta. Do skupiny CE se řadí i separace v pH gradientu, jakým je kapilární izoelektrická fokuse. Mezi elektromigrační separační techniky patří také izotachoforéza, která v CE nachází uplatnění jako tzv. *online prekoncentrační technika*.

1.2 Základní pojmy a vztahy

V CE se používá řada pojmů, které v mnoha ohledech připomínají pojmy používané v chromatografických separačních technikách. *Migrační čas* t_m je doba, za kterou analyt urazí dráhu rovnou vzdálenosti od místa dávkování do místa detekce. Tato vzdálenost se označuje jako *efektivní délka kapiláry* l_{ef} . Ze základních znalostí fyziky lze *rychlost pochybu* v_{ef} iontu v elektrickém poli vyjádřit jako změnu dráhy za jednotku času a zjednodušeně napsat jako (1).

$$v_{ef} = \frac{l_{ef}}{t_m} \quad (1)$$

Je-li síla, která uvádí ion do pohybu, funkcí *intenzity elektrického pole* E , která je definována jako poměr vloženého *napětí* U vůči *celkové délce kapiláry* l_{tot} (2), pak lze definovat *elektroforetickou mobilitu iontu* μ_{ef} (3).

$$E = \frac{U}{l_{tot}} \quad (2)$$

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad (3)$$

Kombinací vztahů (1), (2) a (3) lze získat vztah pro přímý výpočet elektroforetické mobility iontu díky znalosti základních parametrů metody a migračního času analytu (4).

$$\mu_{ef} = \frac{l_{ef}}{t_m E} = \frac{l_{ef} l_{tot}}{t_m U} \quad (4)$$

V praxi však nelze elektroforetickou mobilitu iontu počítat přímo, neboť pozorovaná rychlost iontu je dána často součtem elektroforetické rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku v_{EOF} . Neprovedeme-li korekci, pak počítáme *zdánlivé (pozorované) elektroforetické mobility* μ_{app} (5).

$$v_{app} = v_{ef} + v_{EOF} = \underbrace{(\mu_{ef} + \mu_{EOF})}_{\mu_{app}} E \quad (5)$$

¹ Harvey, D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw Hill: Boston, 2000, s. 798.

² Landers, J. P., *Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, CRC Press: Boca Raton, 2008, s. 1567.

K dalším pojmům, které se často pojí s popisem separace iontů, patří selektivita, rozlišení a účinnost. *Selektivita* α jednoduše řečeno popisuje, jak snadno lze dva ionty od sebe separovat. Je založena na skutečnosti, že v CE je separace umožněna díky rozdílu v elektroforetických mobilitách jednotlivých iontů (6).

$$\alpha = \frac{\mu_{ef,2}}{\mu_{ef,1}}; \mu_{ef,2} \geq \mu_{ef,1} \Rightarrow \alpha \geq 1 \quad (6)$$

Rozlišení R_s je bezrozměrné vyjádření vzdálenosti dvou píků. Pro výpočet se využívá vztahů (7), kde w_1 jsou šířky píku v základně a $w_{1/2,1}$ jsou šířky píku v polovině výšky. $R_s \geq 1,5$ je považováno za rozlišení píků k základní linii a je vyžadováno kvůli minimalizaci chyb způsobených integrováním píků.

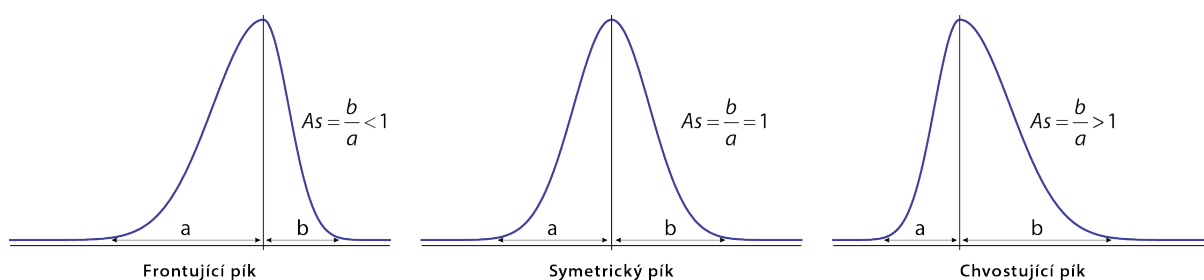
$$R_s = 2 \frac{t_{m,2} - t_{m,1}}{w_1 + w_2} = 1,117 \frac{t_{m,2} - t_{m,1}}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}}; t_{m,2} \geq t_{m,1} \quad (7)$$

Posledním podstatným pojmem je *účinnost* N , kterou lze vypočítat pomocí vztahu (8). Obecně vyšší účinnost znamená užší píky a lepší rozlišovací schopnost. Rozlišení je tedy závislé jak na selektivitě, tak účinnosti.

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 = 8 \ln 2 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (8)$$

Vztahy pro rozlišení a účinnost jsou platné za předpokladu, že pík má tvar Gaussovy křivky, a je tedy symetrický. V praxi je však pozorována asymetrie píků vlivem nežádoucích jevů, jako jsou elektrodisperze, interakce se stěnou kapiláry aj. Pro popis symetrie lze využít celou řadu vztahů. Níže uvedený vztah (9) je založen na myšlence, že v případě symetrie jsou si vzdálenosti od počátku a konce píku k středu rovny.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (9)$$

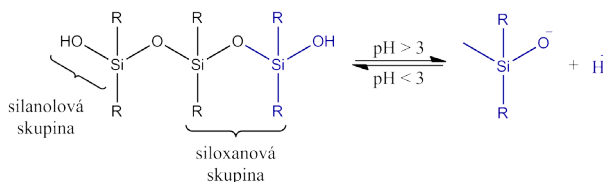


Obrázek 1 - Křivky znázorňující typy asymetrie píků.

1.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je tok iontů roztokem vlivem aplikovaného elektrického napětí. V CE se nejčastěji využívají křemenné kapiláry pokryté vrstvou polyimidu, který zajišťuje pružnost a pevnost kapiláry. Křemenné kapiláry mají dobrou tepelnou vodivost pro odvod Jouleova tepla a jsou transparentní i pro vysokoenergetické UV záření (≥ 185 nm). Vnitřní povrch křemenné kapiláry obsahuje siloxanové a silanolové skupiny. Silanolové skupiny jsou slabými kyselinami a disociují při pH vyšším než 3. Disociací silanolových skupin získává vnitřní

stěna kapiláry záporný náboj. Kationty roztoku, kterým je kapilára naplněna, kompenzují záporný náboj stěny kapiláry a ustanovuje se elektrická dvojvrstva. Při vložení elektrického napětí na elektrody, se začnou kationty pohybovat ke katodě a díky jejich silné solvataci, strhávají s sebou i roztok, kterým je kapilára naplněna. Díky přítomnosti EOF, jehož mobilita je v porovnání s mobilitou řady aniontů zpravidla vyšší, lze současně stanovit kationty i anionty během jedné analýzy. Neutrální molekuly se v kapilární zónové elektroforéze neseperují a pohybují se rychlostí EOF.



Obrázek 2 - Strukturální vzorce silanolové a siloxanové skupiny; reakční schéma disociace silanolové skupiny.

EOF, případně záporný náboj stěny kapiláry, je pro řadu analýz nežádoucí. V kyselém prostředí je EOF velmi slabý a nestabilní. Záporný náboj stěny kapiláry může být zdrojem nežádoucích adsorpcí na stěnu kapiláry vlivem iontových interakcí, například při separaci proteinů. Proto se do základního elektrolytu přidávají například hydrofilní polymery, které potlačují EOF a dokážou vytvářet efektivní povlaky na vnitřní stěně kapiláry.

2 PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE³

V CE se během posledních dvou desetiletí objevily techniky založené na zakoncentrování vzorku přímo v kapiláře před samotnou separací, tzv. *online prekoncentrace*. Cílem prekoncentrace je zajistit dostatečnou detekční citlivost, která je v případě spektrofotometrické detekce omezena délkou optické dráhy (rovna vnitřnímu průměru kapiláry) a zvýšit účinnost separace. V odborné literatuře se stále objevují nové prekoncentrační techniky, které jsou založeny na čtyřech základních prekoncentračních principech. Jednotlivé principy se dají kombinovat a obecně lze říct, že prekoncentrační principy jsou v závislé na složení vzorku a základního elektrolytu.

2.1 „Stacking“

„Stacking“ je velmi jednoduchou prekoncentrační technikou. Je založena na rozdílných koncentracích nebo vodivostech mezi základním elektrolytem a vzorkem. V kapiláře pak po nadávkování vzorku vznikají dvě zóny s různou elektrickou vodivostí. Oběma zónami musí procházet stejný proud, a proto je intenzita elektrického pole v zóně s nižší vodivostí (vyšším odporem) vyšší, než v zóně s vyšší vodivostí (nižším odporem). V praxi se toho dosahuje naředěním vzorku zředěným základním elektrolytem nebo vodou. Analyty se pak zakoncentrují na rozhraní mezi zónou vzorku a základního elektrolytu.

2.2 Přechnodná izotachoforéza

V přechnodné izotachoforéze se analyty před separací seřadí za sebou podle klesající elektroforetické mobility. To je zajištěno dávkování vzorku mezi vedoucí elektrolyt, který má nejvyšší elektroforetickou mobilitu, a koncový elektrolyt, který má naopak nejnižší elektroforetickou mobilitu. Tím jsou popsány základní podmínky pro izotachoforézu. V CE se využívá jen přechnodně (dočasně). Po seřazení analytů se naruší izotachoforetické podmínky například nahrazením koncového elektrolytu.

³ Simpson Jr., S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* **2008**, 1184, 504-541.

Analogicky funguje i zakoncentrování vzorku v klasické gelové elektroforéze. Koncentrační a separační gel obsahují glycin, liší se však v pH. V koncentračním gelu glycin vystupuje jako koncový elektrolyt, na rozhraní gelů se mění pH, a tím se změně i elektroforetická mobilita glycinu. Glycin přestane být koncovým elektrolytem a dochází k separaci vzorku na oddělené zóny s mezerami vyplněnými glycinovým pufrům.

2.3 Zakoncentrování na pH rozhraní

Princip zakoncentrování na pH rozhraní využívá disociační rovnováhy slabých kyselin a zásad. Elektroforetická mobilita je závislá mimo jiné na náboji. Pokud analyt, který je slabou kyselinou nebo zásadou vstoupí do zóny s pH, při kterém je elektroneutrální, jeho elektroforetický pohyb kapilárou ustane. Časem se zóna s pH, při kterém je analyt elektroneutrální, vypufnuje základním elektrolytem a analyt získá zpět náboj.

2.4 „Sweeping“

Název „sweeping“ pochází z anglického slovesa „to sweep“, které doslova znamená „smést“. Původně byla tato prekoncentrační technika vyvinuta pro zakoncentrování neutrálních analytů separovaných módem CE, který se nazývá micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). V MEKC se kromě elektroforézy uplatňuje distribuční rovnováha mezi analytem v roztoku a vázaným v micelární fázi (chromatografický princip). V praxi se dávkuje vzorek neobsahující micely do kapiláry naplněné základním elektrolytem s obsahem micel (např. dodecylsulfátu sodného). Micely jsou nabitě prostorové útvary, které po aplikaci elektrického napětí vstupují do zóny vzorku, interagují s analyty a dochází k jejich zakoncentrování. Platí při tom závislost, že čím je interakce analytu v zóně vzorku s micelou vyšší, tím vyšší je koncentrační účinnost.

3 CHLORIDOVÝ STACKING/PSEUDOIZOTACHOFORÉZA⁴

Vzorky biologického původu často obsahují vysoké koncentrace solí kyseliny chlorovodíkové, např. plasma nebo moč. Takové vzorky jsou velmi vodivé a před analýzou se často ředí vodou nebo organickými rozpouštědly za účelem snížení vodivosti, a v případě organických rozpouštědel i vysrážení proteinů. Vysoká vodivost vzorku často vede k nežádoucímu rozšiřování píku. Přesto byl pozorován pozitivní vliv přítomnosti chloridových iontů na účinnost. Jedná se o případy, kdy negativní vlivy vodivosti vzorku jsou potlačeny nějakou prekoncentrační technikou. V případě chloridových iontů, které můžou vystupovat jako vedoucí iont, se nabízí princip přechodné izotachoforézy. Přesné chování a funkce jednotlivých složek vzorku je nejasné a jen obtížně je lze studovat. Proto se hovoří o tzv. *pseudoizotachoforéze* nebo „stackingu“, kdy slovo „stacking“ nabývá obecného významu, jakým je zakoncentrování vzorku v kapiláře.

4 CÍL CVIČENÍ

Cílem laboratorního cvičení je diskutovat závislosti doby dávkování a iontové síly vzorku na účinnost separace. Získané výsledky konfrontovat se závislostí doby dávkování a iontové síly vzorku na tvar píku. Diskuze se bude opírat o zaznamenaná data analýzy roztoku glycinu (nebo směsi aminokyselin) s různou koncentrací NaCl a dobou dávkování. V průběhu laboratorního cvičení si studenti připraví roztoky podle Tabulky 1, pod odborným dohledem nastaví základní parametry přístroje CE a vyhodnotí záznamy pomocí softwaru Agilent ChemStation. Získané údaje, kterými jsou migrační čas, šířka píku, počátek a konec píku, využijí pro výpočet účinnosti a symetrie píku glycinu (nebo jiné aminokyseliny) a přehledně graficky vyobrazí.

⁴ Křivánková, L., Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P., *et al.*, *Electrophoresis* **2003**, 24, 505-517.

5 PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Přístroje, materiál a chemikálie

- Agilent G7100A CE System
- Bezkontaktní vodivostní detektor
- Automatické pipety 20 – 200 μl , 100 – 1000 μl

- Plastové mikrozkuřavky (eppendorfkvy), objem 1,5 ml
- Plastové špičky k automatickým pipetám
- Plastové vialky a víčka kompatibilní s přístrojem pro CE

- Kyselina octová, 99%
- (hydroxyethyl)-celulosa
- Glycin (případně jiné aminokyseliny)
- NaCl
- Milli-Q H₂O (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)

5.2 Základní roztoky

- 15% (m/v) NaCl
- 2 mM směs vybraných aminokyselin
- 1% (m/m) (hydroxyethyl)-celulosa
(připravuje se minimálně den před cvičení za kontinuálního míchání)
- Základní elektrolyt: 8 % (v/v) kyselina octová, 0,05 % (m/m) (hydroxyethyl)-celulosa

5.3 Nastavení přístroje pro CE

Kapilára: 50/375 μm vnitřní/vnější průměr; 48,0/33,6 cm celková/efektivní délka; křemenná

Napětí: +24 kV (500 V cm^{-1})

Teplota kazety: 25 °C

Dávkování: hydrodynamicky; 50 mbar po dobu 6-36 sekund

Promývání kapiláry: 3 min základním elektrolytem před analýzou

Doba separace: 10 min (závisí na výběru aminokyselin)

Doba analýzy: 13 min

Detekce: Bezkontaktní vodivostní detekce; pracovní frekvence 2,46 MHz; model „CCD – Admet“, Rev. 5.06

5.4 Příprava vzorků

Podle níže uvedené Tabulky 1 se připraví roztoky o výsledném objemu 1 ml. Pro srovnání hodnot vodivosti roztoků a vodivosti základního elektrolytu, byla vodivost základního elektrolytu vypočítána stejným algoritmem se zanedbáním přítomnosti (hydroxyethyl)-celulosa. Hodnota vodivosti 8% (v/v) kyseliny octové (1,39 M) činí 0,202 S/m.

Tabulka 1 - Tabulka hodnot pro přípravu roztoků s definovanou koncentrací NaCl a aminokyselin(y). Hodnoty vodivosti byly vypočítány *in-silico* s aproximací na vodný roztok NaCl o definované koncentraci.

Koncentrace		Objem, μl			Vodivost*
NaCl % (m/v)	Aminokyseliny μM	15 % (m/v) NaCl	2 mM směs aminokyselin	H ₂ O	S/m
0	200	0	100	900	0
0,3	200	20	100	880	0,514
0,6	200	40	100	860	0,985
0,9	200	60	100	840	1,437
1,2	200	80	100	820	1,875
1,5	200	100	100	800	2,304

* Vypočítaná *in-silico* v programu Peakmaster 5.3 Complex (web.natur.cuni.cz/gas)

5.5 Analýza a vyhodnocení záznamů

Studenti pod odborným dohledem provedou analýzu připravených roztoků vzorku a záznamy vyhodnotí integrací píku metodou parabolické interpolace vybraného analytu. Hodnoty migračních časů, šířky píků, doby počátku a konce píků převedou do tabulkového procesoru nebo neformátovaného textu, který jsou schopni doma otevřít a data použít k vypracování protokolu.

5.6 Výsledky

Studenti vypočítají účinnost podle vztahu (8). Hodnoty uvedou do tabulky a graficky vyobrazí.

Tabulka 2 - Tabulka vypočítaných hodnot účinnosti podle vztahu (8). Hodnoty účinnosti přísluší píku glycinu získaných analýzou roztoků glycinu s různou iontovou silou (koncentrací NaCl) a dobou dávkování rozdílem tlaků 50 mbar. Hodnoty účinnosti jsou bezrozměrná čísla.

NaCl % (m/v)	Doba dávkování vzorku, s \times 50 mbar					
	6	12	18	24	30	36
0						
0,3						
0,6						
0,9						
1,2						
1,5						

Podle vztahu (9) vypočítají symetrii píku a uvedou do tabulky.

Tabulka 3 - Tabulka vypočítaných hodnot symetrie podle vztahu (9). Hodnoty symetrie přísluší píku glycinu získaných analýzou roztoků glycinu s různou iontovou silou (koncentrací NaCl) a dobou dávkování rozdílem tlaků 50 mbar. Hodnoty symetrie jsou bezrozměrná čísla.

NaCl % (m/v)	Doba dávkování vzorku, s \times 50 mbar					
	6	12	18	24	30	36
0						
0,3						
0,6						
0,9						
1,2						
1,5						

5.7 Diskuze a závěr

6 OBSAH PROTOKOLU

Student odevzdá protokol shrnující základní princip a popis experimentu. Bude obsahovat:

- Tabulku s vypočítanými hodnotami účinnosti
- Grafické znázornění účinnosti na době dávkování a iontové síle vzorku
- Tabulku s vypočítanými hodnotami symetrie píku
- Diskuzi výsledků a závěr
- Komentář ke cvičení, návrhy na zlepšení apd. (*volitelné*)