



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav biochemie



Návod do cvičení

**KVALITATIVNÍ ANALÝZA NEZNÁMÝCH VZORKŮ PIV
POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S BEZKONTAKTNÍ
VODIVOSTNÍ DETEKČÍ**

Mgr. Kateřina Dadáková

Mgr. Aleš Mádr

2013

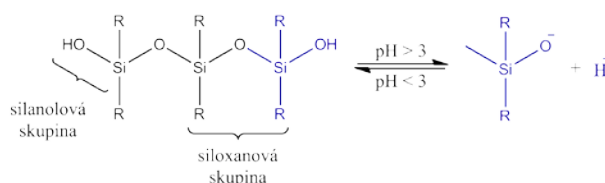
Vzniklo díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy z Fondu rozvoje vysokých škol,
projekt č. 599/2013/G6.

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Kapilární elektroforéza¹

Kapilární elektroforéza (CE) je elektromigrační separační technika. Separace probíhají v kapiláře s vnitřním průměrem typicky 25 – 75 μm, celkové délky 20 – 100 cm. Kapilára je naplněna elektrolytem, na jejíž konce je aplikováno stejnosměrné elektrické napětí. Separací princip je v základním uspořádání založený na rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Iontová pohyblivost je funkcí náboje a velikosti částice. Zmíněný elektroforetický princip separace lze v CE snadno rozšířit o chromatografické principy anebo principy molekulového síta, a to pouhou modifikací elektrolytu, kterým je kapilára naplněna v průběhu separace. Aplikační možnosti CE jsou velmi rozsáhlé. CE může sloužit k stanovení anorganických i organických iontů, neutrálních látek, proteinů a peptidů, fragmentů nukleových kyselin, či dokonce živých bakteriálních buněk. V praxi nachází uplatnění jako komplementární analytická technika ke kapalinové chromatografii a nejvíce se využívá v akademické sféře a farmaceutickém průmyslu.

Jelikož je separace závislá na náboji částic, který je v případě slabých kyselin a zásad závislý na pH prostředí, používaný elektrolyt je vždy pufr. Na pH je závislý i elektroosmotický tok (EOF), který lze jednoduše popsat jako tok elektrolytu kapilárou v důsledku náboje na vnitřní stěně kapiláry. V CE se nejčastěji využívají kapiláry křemenné pro dobrou transparentnost v UV oblasti spektra a dobrou tepelnou vodivost.



Obrázek 1 -Strukturní vzorce silanolové a siloxanové skupiny; reakční schéma disociace silanolové skupiny.

EOF je někdy nežádoucí, a proto se eliminuje přidávkem hydrofilních polymerů do základního elektrolytu, jako jsou (hydroxyethyl)-celulosa nebo polyethylenglykol.

Podstatnou součástí každé separační techniky je detektor, který zaznamenává změny vlastností roztoku procházejícího kapilárou. K nejběžnějším detekčním technikám patří spektrofotometrie v UV a viditelné oblasti spektra. Dále lze využít fluorescenční detekci, hmotnostní spektrometrii anebo elektrochemické detekce založené na principech amperometrie a konduktometrie.

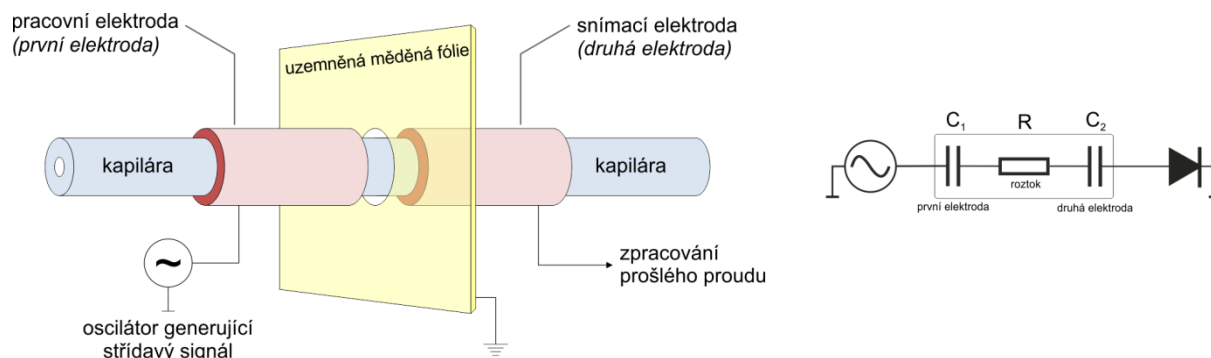
1.2 Bezkontaktní vodivostní detekce²

Bezkontaktní vodivostní detekce (C⁴D) patří mezi univerzální detekční techniky. Je založena na měření elektrické vodivosti roztoku, který se nachází v tzv. detekční cele. Elektrody nejsou v přímém kontaktu s měřeným roztokem, neboť se využívá vysokofrekvenčního signálu, který prochází i nevodivým materiálem, jakými jsou vzduch a stěna kapiláry. Na první elektrodu se přivádí vysokofrekvenční střídavý signál, který je jako střídavý proud registrován druhou elektrodou. Velikost prošlého proudu je úměrný vodivosti roztoku, který se nachází v detekční cele. Registrovaný proud je usměrněn, zesílen, pomocí A/D převodníku digitalizován a dále již zpracováván počítačem.

¹ Landers, J. P., *Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, CRC Press: Boca Raton, 2008, s. 1567.

² Opekar, F., Štulík, K., *Chem. Listy* **2000**, *104*, 1148-1154.

Na obrázku 2 můžete vidět schéma detekční cely a její zjednodušení do podoby elektrického obvodu složeného ze dvou kondenzátorů (C) a odporu (R).



Obrázek 2 - Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru a zjednodušené schéma elektrického obvodu detekční cely (vpravo).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Přístroje, materiál a chemikálie

- Agilent G7100A CE System
- Bezkontaktní vodivostní detektor (interní označení: 2.46 MHz C⁴D)
- Ultrazvuková lázeň
- Automatické pipety 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l

- Kádinka, 150 ml
- Stříkačkový membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μ m
- Injekční stříkačka, 10 ml
- Plastové mikrozkušavky (eppendorfký), objem 1,5 ml
- Plastové špičky k automatickým pipetám
- Plastové vialky a víčka kompatibilní s přístrojem pro CE

- Kyselina octová, 99,9%
- 1% (m/m) (hydroxyethyl)-celulosa
(připravuje se minimálně den před cvičení za kontinuálního míchání)
- 10 mM 4-nitro-L-fenylalanin (NO₂-Phe) v 1M HCl
- 1M NaOH
- 0,1M NaOH
- Milli-Q H₂O (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)

2.2 Nastavení přístroje pro CE

Základní elektrolyt: 10% (v/v) kyselina octová, 0,05 % (m/m) (hydroxyethyl)-celulosa

Vzorek: 1,025 \times ředěné pivo s přidavkem 250 μ M NO₂-Phe

Dávkování vzorku: 50 mbar 6 s

Separáční napětí: +24 kV

Teplota kazety: 25 °C

Kapilára: 50 μ m/365 μ m vnitřní/vnější průměr; 48,0/33,6 cm celková/efektivní délka

Promývání kapiláry: 180 s 1M NaOH, 30 s 0,1M NaOH, 60 s H₂O, 120 s BGE; 60 s H₂O

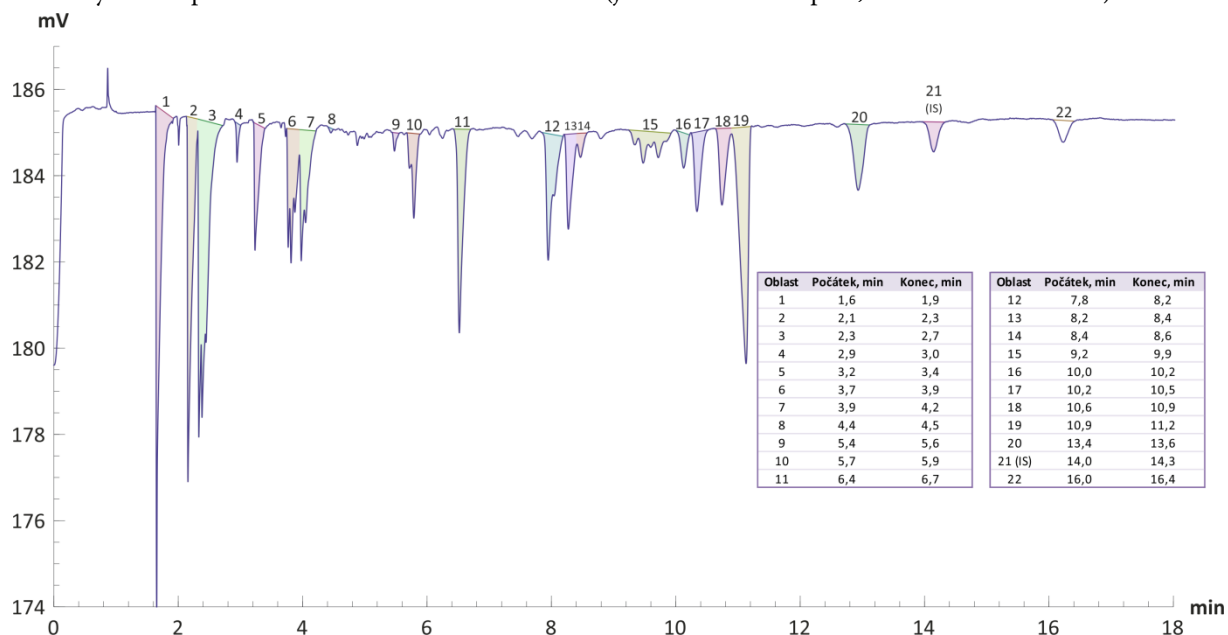
Doba analýzy: 20 min

2.3 Příprava vzorků

1. Přibližně 20 ml vzorku piva se přelije do kádinky o objemu 150 ml nebo větším. Následně je ponořen do ultrazvukové lázně na 5 sekund. Vzorek se tak zbaví většiny rozpuštěného CO₂ a dojde k jeho napěnění. Jakmile pěna opadne, je vzorek přefiltrován přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μm a dodatečně odplyněn ponořením do ultrazvukové lázně na 10 minut.
2. Takto upravený vzorek se nechá temperovat na teplotu zásobního roztoku NO₂-Phe (10 mM NO₂-Phe). Poté se smíchá 25 μl 10 mM NO₂-Phe s 975 μl vzorku piva. Vznikne tak 1,025× ředěný vzorek piva obohacený o 250 μM NO₂-Phe. Po promíchání jsou vzorky připraveny k analýze.
3. Do víalčky se přenese 600 μl vzorku, víalčka se vzorkem se umístí do známé pozice v karuselu a spustí se analýza.

2.4 Analýza a vyhodnocení záznamů

Pod odborným dohledem se neznámé vzorky pív postupně zanalyzují. Podle obrázku 3 se provede integrace vyznačených oblastí. Plochy jednotlivých oblastí se importují do připravené tabulky, která ukáže procentuální shodu s knihovnou v závislosti na zvolené chybě. Podle rozdílů ve shodách mezi jednotlivými vzorky pív v knihovně se pořízený záznam neznámého vzorku srovná s dvěma až třemi záznamy z knihovny s nejvyšší procentuální shodou. Závěrem by měla být úspěšná identifikace neznámého vzorku piva anebo sdělení, že neznámý vzorek piva nemá žádnou shodu s knihovnou (jedná se zkrátka o pivo, které v knihovně není).



Obrázek 3 - Oblasti záznamu, které se integrují metodou parabolické interpolace. Plochy jednotlivých oblastí se exportují do tabulkového softwaru pro hledání nejvyšší shody s knihovnou. Záznam je 1,025× ředěné pivo Bernard světlé výčepní pivo obohacené o 250 μM NO₂-Phe (IS).

2.5 Úkol

Identifikace neznámého vzorku piva.