
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

KOMBINOVANÝ DETEKTOR PRO KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZU

MARTIN NOVOTNÝ, FRANTIŠEK OPEKAR
a IVAN JELÍNEK

*UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí,
katedra analytické chemie, Universita Karlova v Praze,
Albertov 2030, 128 40 Praha 2
opekar@natur.cuni.cz*

Došlo 21.10.03, přijato 3.3.04.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, bezkontaktní vodivostní detektor, spektrofotometrický detektor, kombinovaný detektor

Úvod

Při analýzách vzorků obsahujících směs malých anorganických iontů a iontů organických látek metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) vzniká problém, jak současně detegovat oba typy těchto látek. Standardní detekční metoda, spektrofotometrie v UV oblasti, je vhodná pro detekci organických látek, anorganické ionty lze touto metodou detegovat pouze nepřímo. Pro detekci anorganických iontů jsou vhodné detektory založené na měření elektrické vodivosti roztoku. Je tedy zřejmé, že jeden typ detektoru zpravidla neumožní detegovat oba typy analytů současně, takže analýzu je nutno provádět opakovaně. Problém lze do určité míry řešit kombinací obou detektorů, obecně kombinací detektorů založených na různých principech.

V literatuře se lze setkat s několika typy kombinovaných detektorů využívaných pro detekci v zónové elektroforéze, ať již kapilární či čipové. Např. ampérometrický detektor byl kombinován s fluorescenčním¹, spektrofotometrickým² či bezkontaktním vodivostním detektorem³. Nepřímá UV detekce byla použita v kombinaci s přímou vodivostní^{4,5} či hmotnostní detekcí⁶, detektor s diodovým polem kombinovaný s hmotnostním detektorem je popsán v práci⁷. Společným nedostatkem těchto detektorů je zapojení jednotlivých detekčních systémů v sérii, takže záznamy obou detektorů jsou časově posunuty a zachycují zóny separovaných látek v různém stadiu separace. Uspořádání detektoru, který umožňuje spektrofotometrickou a bezkontaktní vodivostní detekci v jednom místě separační kapiláry bylo publikováno v práci⁸. Z praktického hlediska však konstrukční uspořádání publikovaného kombinovaného detektoru není příliš vhodné. Tubulární vodi-

vostní elektrody jsou integrální součástí separační kapiláry a přívod i odvod záření je zprostředkován světlovodnými vlákny přitisknutými v poloze proti sobě kolmo ke kapiláře. Kapilára proto nemůže být při poškození vyměněna, ale musí být sestaven detektor nový, tj. je nutno na nové kapiláře vytvořit vodivostní elektrody a časově náročným postupem adjustovat světlovodná vlákna. Je zřejmé, že takto není možno zajistit reprodukovatelné geometrické uspořádání ani vodivostní, ani optické části detektoru.

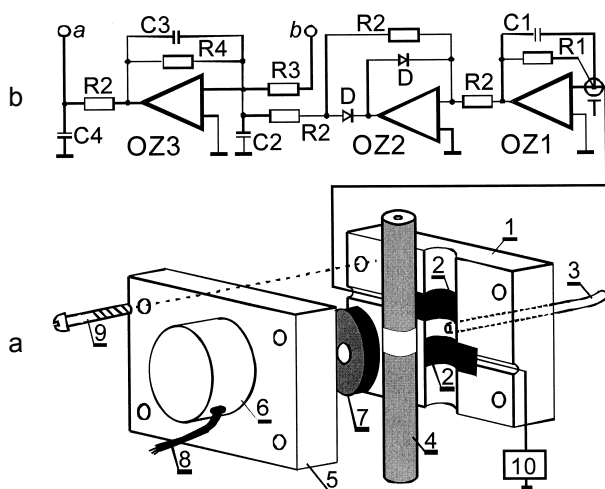
V této práci je popsáno konstrukční uspořádání kombinovaného spektrofotometrického a bezkontaktního vodivostního detektoru, které umožňuje detekci látek v jednom místě kapiláry a je použitelné pro rutinní analýzu, tj. umožňuje vkládání a výměnu separační kapiláry způsobem obvyklým u běžných spektrofotometrických detektorů. Pro vodivostní část detektoru bylo využito uspořádání s poloválcovými elektrodami⁹, do něž byla zaintegrována část optická tvořená pouze jedním světlovodným vláknem přivádějícím ke kapiláře záření ze zdroje. Vláknem je pevně fixováno mezi vodivostními elektrodami, takže při výměně kapiláry zůstává v konstantní poloze. Záření prošlé kapilárou je, podobně jako ve standardních spektrofotometrických detektorech používaných v kapilárních separačních metodách, přímo snímáno fotodiodou umístěnou v blízkosti kapiláry.

Experimentální část

Mechanické uspořádání detektoru

Celkové mechanické uspořádání detektoru je znázorněné na obr. 1a. Vodivostní část detektoru je zcela obdobná bezkontaktnímu vodivostnímu detektoru popsanému v práci⁹. V plexisklové destičce (1) o rozměrech 45×65 mm a tloušťce 10 mm je vytvořena poloválcová drážka o průměru rovném přibližně vnějšímu průměru separační kapiláry, zde asi 400 μm. V drážce jsou vlepeny dvě elektrody (2) z hliníkové fólie o tloušťce 10 μm, šířce 3 mm a vzdálené od sebe 2 mm. Tato plexisklová destička je nepohyblivá, je připevněna k desce s plošným spojem, na níž je zapojen elektronický obvod vodivostního detektoru. Na jednu z elektrod je přiváděn střídavý signál z funkčního generátoru (10), druhá je spojena s elektronikou vodivostní části detektoru.

Pro optickou část detektoru byl využit komerční spektrofotometrický detektor LCD 2082 (Ecom, ČR) upravený tak, aby záření od zdroje mohlo být vedeno ke kapiláře světlovodným vláknem. Jeden konec světlovodu o průměru 100 μm a délce asi 25 cm byl vlepen epoxidovým lepidlem do injekční jehly vhodného průměru, zkrácené na délku 10 mm. Ta byla spolu se světlovodem uchycena šroubem M2 v otvoru hliníkového válečku tvořícího redukci pro spojení s blokem deuteriové výbojky uvnitř spektrofotometrického detektoru fy Ecom. Druhý konec



Obr. 1. a – Schéma mechanického uspořádání kombinovaného detektoru (jednotlivé komponenty nejsou pro přehlednost zakresleny v měřítku): 1 – pevná plexisklová destička, 2 – elektrody, 3 – světlovodné vlákno přivádějící záření ze spektrofotometru, 4 – separační kapilára, 5 – pohyblivá plexisklová destička, 6 – fotodioda, 7 – optické stínění, 8 – kabel spojující fotodiodu s elektronikou ve spektrofotometrickém detektoru, 9 – spojovací šroub, 10 – funkční generátor. b – elektronické zapojení vodivostní části detektoru: OZ1, OZ2 – Burr Brown OPA606KP, OZ3 – Analog Devices OP177, R1 – 1 M Ω , R2 – 10 k Ω , R3 – 100 k Ω , R4 – 300 k Ω , C1 – 1 pF, C2, C4 – 1 μ F, C3 – 0,1 μ F, D – křemiková dioda 1N4448, T – teflonem izolovaný pájecí bod

světlovodného vlákna (3) prochází nepohyblivou plexisklovou destičkou (1) do mezery mezi vodivostními elektrodami tak, aby se jeho čelo právě dotýkalo vložené separační kapiláry. V optimální poloze může být vlákno fixováno zatmelením nebo pružným těsněním stlačovaným šroubem. Separační kapilára (4) s vytvořeným průhledným okénkem je přitlačována k elektrodám a světlovodnému vláknu pohyblivou plexisklovou destičkou (5). V destičce je otvor o průměru 2 mm jímž záření prošle kapilárou dopadá na velkoplošnou fotodiodu (6). Fotodioda, použitá z komerčního detektoru bez úprav, je s destičkou (5) pevně spojená. Mezi oběma destičkami je optické stínění z černé polyurethanové pěny (7) přilepené k destičce (5). Destičky jsou k sobě přitlačovány čtyřmi šrouby (9). Signál z fotodiody je veden kabelem (8) do komerčního detektoru, kde je zpracováván.

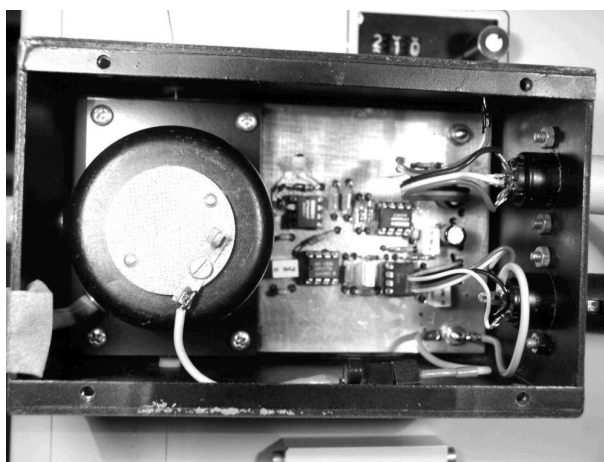
Elektronické zapojení vodivostní části detektoru

Schéma elektronického zapojení pro bezkontaktní vodivostní detekci (obr. 1b) bylo upraveno dle práce¹⁰. Je v něm využito standardních obvodů s operačními zesilovači. Střídavý signál sinusového průběhu z funkčního generátoru (FG 2002C, Goldstar, Korea) je přiváděn na jednu z poloválcových vodivostních elektrod, prochází kapilárou a je snímán druhou vodivostní elektrodou. Je zesilován proudovým sledovačem (OZ1), jednoduše usměrněn

(OZ2) a dále zesílen invertujícím zesilovačem (OZ3). Pomocné napětí (–10 až +10 V) přivedené do bodu b ve vstupu OZ3 umožňuje kompenzovat signál pozadí. Z výstupu a zesilovače OZ3 je signál veden k registračnímu zařízení. Obvod byl zapojen na desce s plošným spojem. Kritickým bodem obvodu je vstup OZ1 – přírodní vodič od vodivostní elektrody musí být co nejkratší a vstup OZ1 byl pájen na pájecí bod izolovaný od desky s plošným spojem teflonem. K registraci signálu byl využit počítač vybavený univerzální měřicí deskou PCI-6024E a programem Lab-View (National Instruments, USA). Nemá-li registrační zařízení dostatečně vysoký vstupní odpor, je nutno registračnímu zařízení předřadit impedanční převodník (napěťový sledovač); je-li ve výstupním filtru R2C4 v obr. 1b hodnota R2 = 10 k Ω , pak by registrační zařízení mělo mít vstupní odpor alespoň 10⁷ Ω .

Celková sestava detektoru

Detektor sestavený na desce s plošným spojem s elektronikou vodivostního detektoru je umístěn v kovové krabici o rozměrech 130 × 80 × 70 mm zajišťující jeho elektrické i optické odstínění od vnějšího prostředí. Vnitřní stěny krabice i obě plexisklové destičky jsou začerněny matným lakem. Celá sestava uvnitř stínící krabice je vidět na obr. 2. Krabice je připevněna k čelnímu panelu spektrofotometrického detektoru LCD 2082 (Ecom, ČR), (viz obr. 3). Vkládání kapiláry do detektoru je obdobné jako při použití standardních spektrofotometrických detektorů: odstraní se kryt stínící krabice, pohyblivá plexisklová destička se po uvolnění přitlačovacích šroubů oddálí od destičky nepohyblivé, otvory v horní a spodní stěně stínící krabice se vsune kapilára, vloží se do drážky tak, aby optické okénko bylo v místě, kde je mezi vodivostními elektrodami světlovodné vlákno a její poloha se zafixuje přitisknutím pohyblivé destičky a utažením přitlačovacích šroubů.



Obr. 2. Pohled na sestavu detektoru uvnitř ochranné stínící krabice; detekční část je vlevo, je zakrytá pouzdrum s velkoplošnou diodou z detektoru LCD 2082 (Ecom, ČR). Vpravo je elektronický obvod vodivostní části detektoru a konektory pro přívod napájecího napětí a spojení elektronického obvodu s počítačem



Obr. 3. Umístění kombinovaného detektoru na čelním panelu UV detektoru LCD 2082 (Ecom, ČR); separační kapilára vstupuje do detektoru shora, pod detektorem je koncová elektroforetická nádobka. Na levé straně detektoru jsou konektory BNC pro přívod střídavého napětí z funkčního generátoru k vodivostní části a kabel spojující velkoplošnou diodu s elektronikou UV detektoru. Konektory vpravo – viz obr. 2

Elektroforetická testovací aparatura

Aparatura pro elektroforetická měření byla sestavena v laboratoru z vysokonapěťového zdroje Spellman CZE 1000 (Spellman, USA), křemenné, polyimidem pokryté kapiláry o vnitřním průměru 75 μm a vnějším průměru 375 μm (Silica Tubing & Optical Fibers, Slovensko) a převodníku umožňujícího ovládání vysokonapěťového zdroje a sběr a zobrazení signálů z obou částí detektoru programem LabView (National Instruments, USA). Vzor byl dávkován hydrodynamicky zvednutím dávkovacího konce kapiláry o 10 cm proti hladině v koncové nádobce na dobu 10 s. Použité roztoky nosného elektrolytu a testovacích roztoků byly připraveny z chemikálií pro analýzu v deionizované vodě. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Další podrobnosti experimentálních podmínek jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Experimentální podmínky pro elektroforetická měření

Parametr	Hodnota
Délka kapiláry celková/ k detektoru	69 cm/60 cm
Separací napětí/proud	20 kV/13–14 mA
Separací pufr	H ₃ BO ₃ (20 mM), LiOH (10 mM), pH 9,22
Parametry detekce	Spektrofotometrická část: vlnová délka 210 nm Vodivostní část: napětí sinusové- ho průběhu, frekvence 200 kHz, amplituda ± 10 V

Výsledky a diskuse

Vlastnosti spektrofotometrické části detektoru

Základní analytické parametry spektrofotometrické části detektoru byly určovány pro roztoky kyseliny salicylové v koncentračním oboru $5 \cdot 10^{-5}$ až 10^{-2} mol.dm⁻³ a byly porovnávány s parametry získanými za stejných experimentálních podmínek při použití komerčního spektrofotometrického detektoru Unicam 4225 (Unicam, Anglie).

Lineární dynamický rozsah testovaného detektoru byl $5 \cdot 10^{-5}$ až $5 \cdot 10^{-3}$ mol.dm⁻³. Kalibrační závislost plochy píku, P [mAU.s], na koncentraci kyseliny salicylové, c [mol.dm⁻³], určená ze 6 koncentrací z tohoto rozsahu lze popsat rovnicí

$$P = -0,13 (1,33) + 2,10 \cdot 10^5 (4,50 \cdot 10^3) c$$

(v závorce je standardní odchylka) se standardní chybou $s_{x,y} = 1,56$ mAU.s a korelačním koeficientem 0,999. Limit detekce, určený ze vztahu $3s_{x,y}$ /směrnice kalibrační závislosti, byl $2 \cdot 10^{-5}$ mol.dm⁻³. Limit detekce vyjádřený v absolutním množství dávkované salicylové kyseliny byl 33 pg.

Ve srovnání s výsledky získanými při použití komerčního detektoru byla citlivost testovaného detektoru (porovnávány byly směrnice koncentrační závislosti) třikrát vyšší, ale čtyřikrát vyšší byl limit detekce. Příčinou vyšší hodnoty limitu detekce je zřejmě ne zcela robustní laboratorní konstrukce optické části detektoru projevující se určitou nestabilitou signálu (ovlivnění hodnoty $s_{x,y}$) a pravděpodobně i opticky neoptimalizovaný kontakt světlovodného vlákna s kapilárou. Rozptýl nefokusovaného záření má nepochybně vliv i na šířku registrovaných píků, což se projevilo na hodnotě výškového ekvivalentu teoretického patra H . Podíl hodnot H zjištěných z parametrů píků registrovaných optickou částí testovaného detektoru a spektrofotometrickým detektorem Unicam byl 1,38, tj. hodnota H je v případě testovaného detektoru téměř o 40 % vyšší než u komerčního detektoru. Šum základní linie nepřevyšoval hodnotu 0,1 mAU.

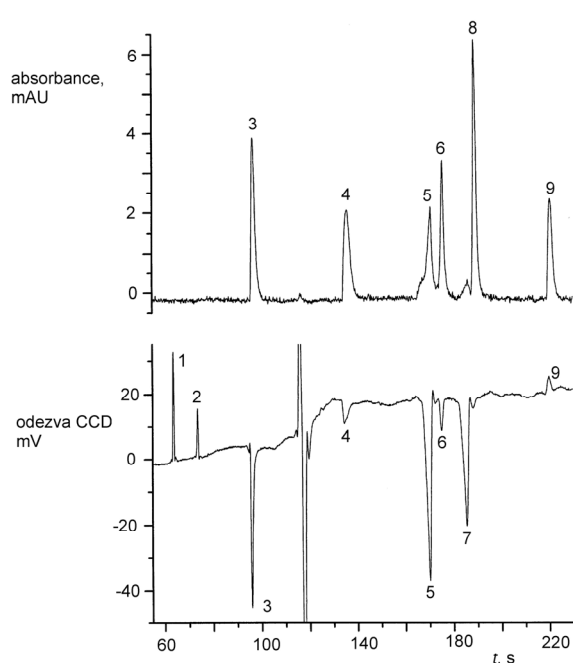
Vlastnosti vodivostní části detektoru

Základní parametry vodivostní části detektoru byly určovány pro roztoky chloridu draselného v koncentračním oboru $1 \cdot 10^{-7}$ až 10^{-3} mol.dm⁻³. Lineární dynamický rozsah byl $1 \cdot 10^{-5}$ až 10^{-3} mol.dm⁻³. Kalibrační závislost plochy píku, P [mV.s], na koncentraci KCl, c [mol.dm⁻³], určenou ze 6 koncentrací z tohoto rozsahu lze popsat rovnicí

$$P = 3,60 (1,40) + 1,05 \cdot 10^5 (2,80 \cdot 10^3) c$$

(v závorce je standardní odchylka) se standardní chybou $s_{x,y} = 2,30$ mV.s a korelačním koeficientem 0,999. Limit detekce byl $1 \cdot 10^{-7}$ mol.dm⁻³. Limit detekce vyjádřený v absolutním množství dávkovaného KCl byl 0,08 pg. Tyto parametry jsou srovnatelné s publikovanými parametry bezkontaktních vodivostních detektorů nejruznějších konstrukcí^{9,11}.

Podíl hodnot H zjištěných z parametrů píků registro-



Obr. 4. **Elektroforeogram modelové směsi**; experimentální podmínky jsou v tabulce I, separační pufr SP2. Identifikace píků: 1 – K^+ (1,4), 2 – Na^+ (1,4), 3 – tyramin (0,3), 4 – histidin (0,2), 5 – askorbová kyselina (1,0), 6 – sorbová kyselina (0,3), 7 – máselná kyselina (1,8), 8 – salicylová kyselina (0,07), 9 – gallová kyselina (0,02) (v závorce jsou koncentrace v $mmol \cdot dm^{-3}$), CCD – bezkontaktní vodivostní detektor

vaných vodivostní částí testovaného detektoru a spektrofotometrickým detektorem Unicam byl 0,91. Z toho vyplývá, že vodivostní část detektoru nepřispívá k dodatečnému rozšiřování píků. Šum základní linie nepřevyšoval hodnotu 0,25 mV, drift (viz obr. 4) nebránil vyhodnocování elektroforeogramu.

Využití detektoru

Na obr. 4 je elektroforeogram modelové směsi látek ilustrující využití kombinovaného detektoru. Z jednoho záznamu je možno stanovit jak látky absorbující UV záření, tak látky detegovatelné pouze vodivostním detektorem. Některé látky poskytují odezvu obou částí detektoru, což může přispět k identifikaci látek v analyzované směsi. Další příklady elektroforeogramů modelových směsí i praktické analýzy jsou uvedeny v práci⁸.

Závěr

V práci je ukázáno, že i v laboratoři lze sestavit kombinovaný vodivostní a spektrofotometrický detektor použitelný pro rutinní analýzu, tj. umožňující vkládání a výměnu separační kapiláry způsobem obvyklým u běžných

spektrofotometrických detektorů. Parametry obou částí detektoru jsou vyhovující pro běžné aplikace. Dá se očekávat, že použitím profesionálních technologií lze dosáhnout lepších pracovních charakteristik detektoru než při laboratorním zhotovování jeho jednotlivých komponent. Jde především o zavedení fokusace optického paprsku do středu kapiláry a lepší fixaci optického vlákna v definované poloze.

Pracovní parametry vodivostní části detektoru (především frekvenci vstupního napětí) je třeba optimalizovat k dosažení nejvyšší citlivosti, či lépe, nejlepšího poměru signál/šum. Dle teorie podané v práci¹² signál kapacitně vázaného bezkontaktního vodivostního detektoru monotónně roste s růstem frekvence, avšak experimentálně zjištěné frekvenční závislosti publikované v literatuře jsou velice rozdílné, viz¹¹ a citace tam uvedené. Odezva je evidentně komplexní funkcí řady parametrů souvisejících nejen s geometrií detekční cely, ale i se složením roztoku a vlastnostmi prvků elektronické části detektoru. Pro konkrétní testovanou konfiguraci detektoru je proto nutno určit optimální pracovní frekvenci experimentálně.

Práce byla finančně podporována Grantovou agenturou ČR, grant 203/01/0653 a částečně Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR, výzkumný záměr JI 3/98:113100002.

LITERATURA

1. Lapos J. A., Manica D. P., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* 74, 3348 (2002).
2. Huang X. J., You T. Y., Yang X. R., Wang E. K.: *Talanta* 49, 425 (1999).
3. Wang J., Pumera M.: *Anal. Chem.* 74, 5919 (2002).
4. Klampfl C. W., Katzmayer M. U., Buchberger W.: *Electrophoresis* 19, 2459 (1998).
5. Klampfl C. W., Katzmayer M. U.: *J. Chromatogr., A* 822, 117 (1998).
6. Bondarenko P. V., Wolf B., Cai H., Vincent J. B., Macfarlane R. D., Vigh G.: *Anal. Chem.* 70, 3042 (1998).
7. Heitmeier S., Blaschke G.: *J. Chromatogr., B* 721, 93 (1999).
8. Chvojka T., Jelínek I., Opekar F., Štulík K.: *Anal. Chim. Acta* 433, 13 (2001).
9. Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: *Electroanalysis* 13, 989 (2001).
10. da Silva J. A. F., do Lago C. L.: *Anal. Chem.* 70, 4339 (1998).
11. Zemann A. J.: *Electrophoresis* 24, 2125 (2003).
12. Gaš B., Zuzka J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 23, 3520 (2002).

M. Novotný, F. Opekar, and I. Jelínek (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague*): **Combined Detector for Capillary Electrophoresis**

A new design of a combined UV-spectrophotometric and contactless conductivity detector is described. The conductometric part consists of two semicylindrical electrodes onto which the separation capillary is pressed. A

single optical fiber fixed in the gap between the electrodes brings light to the capillary with a transparent window. A photodiode fixed close to the optical window records the light passed through the capillary. This arrangement permits simultaneous conductometric and spectrophotometric detection at the same place of the capillary and easy exchange of the capillary without an effect on the geometry of both parts of the detector.

ADVANCE LEATHER TECHNOLOGY TRAINING COURSE

Supported by Ministry of Commerce of the People's Republic of China, **China Leather & Footwear Industry Research Institute (CLFI)** is planning to sponsor a three weeks *training course of advance leather technology* in October 2005 in Beijing, China.

The focus of the training course is from the leather technicians, managers and related government officers.

The training course will be designed within the following aspects:

1. Tanning technology for cowhide garment leather and upper leather, sheepskins garment leather, goatskin upper leather, as well as the leather made from special skins such as fish skin, snake skin, crocodile skin and ostrich skin etc.... And the tanning technology of eco-leather products.
2. Cleaning production technology based on eliminating sulfide and Cr^{6+} .
3. The treatment technology for tannery effluents.
4. Reutilization of tannery waste including of abstracting protein, collagen fiber spinning etc...
5. Relative standards and testing methods.

In order to get approved by Ministry of Commerce of the People's Republic of China, now we need your requirement or opinion of training course.

If you are interested in some of the training courses, please send us your requirements promptly, the requirements should includes:

Brief introduce of your enterprise, company or government branch.

The training courses that you are interested in.

Your sign or seal of your enterprise, company or government branch.

Sincerely yours

CHINA LEATHER & FOOTWEAR
INDUSTRY RESEARCH INSTITUTE
CLFI Fax: 0086-10-64337830

Přihlášky můžete poslat faxem na výše uvedené číslo, v každém případě mailem na adresu: doc. Ing. Jan Tříška, CSc, triska@uek.cas.cz, RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc., nada@uek.cas.cz, Ústav ekologie krajiny AV ČR, České Budějovice