

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### APARATURA PRO ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE V KRÁTKÝCH KAPILÁRÁCH

FRANTIŠEK OPEKAR

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2  
opekar@natur.cuni.cz

Došlo 29.8.11, přijato 27.10.11.

**Klíčová slova:** kapilární elektroforéza, krátká kapilára, rychlá separace, dávkování vzorku, bezkontaktní vodivostní detekce

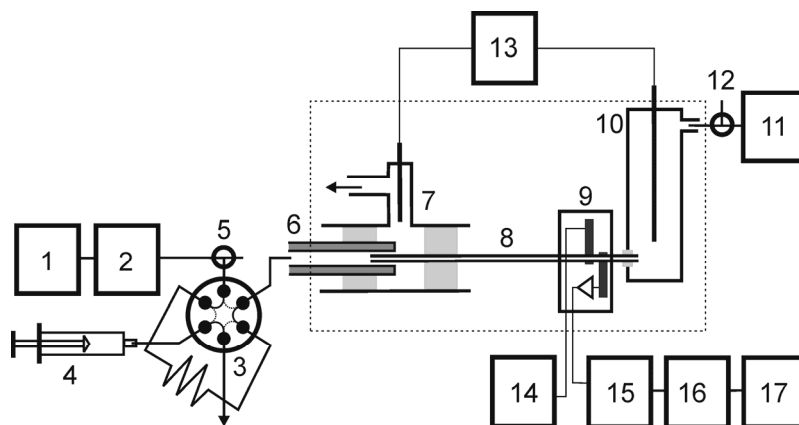
#### Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je účinnou separační metodou, experimentálně jednoduchou, s minimem pohyblivých mechanických komponent a malými požadavky na objemy činidel i vzorků. Ve standardních (komerčně dostupných) aparaturách je doba separace zpravidla 5 až 30 minut. Při řešení některých analytických problémů, např. při sledování kinetiky (bio)chemických reakcí nebo při použití vícedimenzionálních separačních systémů, je nutné, aby doba separace byla mnohem kratší. Rovněž při běžných analýzách velkých množství vzorků i malé zvýše-

ní rychlosti separace přispívá ke zkrácení doby analýzy, což ovlivňuje počet analyzovaných vzorků za jednotku času a tím i cenu analýzy.

Jednou z možností, jak zvýšit rychlost separace, je provedení elektroforézy na skleněném nebo plastovém čipu, kdy je délka separační dráhy řádu jednotek cm a doby analýz v jednotkách až desítkách sekund. Praktickou nevýhodou tohoto způsobu separace je nutnost použít speciální separační systém – elektroforetický čip. Výhodnější z tohoto hlediska se jeví použití standardních elektroforetických kapilár, jejichž délku, vnitřní průměr a materiál lze snadno volit podle potřeby; důležitá je i jejich obecně snadná dostupnost a podstatně nižší cena. Proto jsou hledány způsoby zrychlení separací i při použití běžných kapilár, např. zvyšováním intenzity elektrického pole v kapiláře, urychlováním elektroosmotického toku specifickým pokrytím vnitřní stěny kapiláry či přidavkem modifikátoru do separačního pufru, využitím mnohonásobného dávkování vzorku a zkrácením separační dráhy.

Z experimentálního hlediska je pro elektroforetické separace nejsnazší použití komerčních elektroforetických sestav. Ty však z konstrukčních důvodů neumožňují použití kapilár o celkové délce kratší než asi 20–30 cm. Lze jich však využít tak, že vzorek je dávkován do výstupního konce kapiláry (Short-End Injection), tj. do místa, které je blízko k detektoru. Větší experimentální variabilitu však umožňují specializované aparatury pro provádění separací v krátkých kapilárách – podrobný přehled různých přístupů k tomuto problému lze nalézt v referátu<sup>1</sup>; jeden z možných nových přístupů je popsán v této práci.



Obr. 1. Schéma aparatury používané pro elektroforézu v krátkých kapilárách; 1 – zásobník separačního pufru, 2 – dávkovací pumpa, 3 – šesticečný dávkovací ventil, 4 – plnění dávkovací smyčky, 5 – třicestný ventilek, 6 – PTFE trubička, 7 – dávkovací nádobka se zemnicí elektrodou, 8 – separační kapilára, 9 – detektor, 10 – koncová nádobka s vysokonapěťovou elektrodou, 11 – promývací membránová pumpa, 12 – třicestný ventilek, 13 – zdroj vysokého napětí, 14 – zdroj střídavého napětí, 15 – zesilovač, 16 – A/D převodník, 17 – řídicí počítač

## Experimentální část

Principiálním experimentálním problémem při separacích v krátkých kapilárách je jejich omezená pohyblivost. S krátkou kapilárou nelze manipulovat stejně jako s kapilárami používanými ve standardních elektroforetických sestavách, které jsou dlouhé několik desítek centimetrů. Proto musí být aparatura navržena tak, aby všechny potřebné experimentální kroky, především dávkování vzorku a promývání kapiláry, bylo možno provést tak, aby s kapilárou nebylo nutno pohybovat. Jedna z možných sestav, která splňuje uvedené požadavky je schematicky znázorněna na obr. 1, praktické provedení je zřejmé z obr. 2 a 3.

### Elektroforetická část aparatury

Jednotlivé komponenty separační části elektroforetické aparatury jsou upevněny na novodurové destičce, viz fotografie na obr. 2. Jsou to dávkovací nádobka tvaru „T“ vyrobená z plexiskla (7), detektor (9) a koncová nádobka (10). Detektorem a koncovou nádobkou lze pohybovat ve vodorovném směru v drážkách vyfrézovaných v nosné novodurové destičce. Tak lze přizpůsobit aparaturu kapilárám různých délek, případně měnit efektivní délku kapiláry, tj. délku od dávkovacího konce k detektoru.

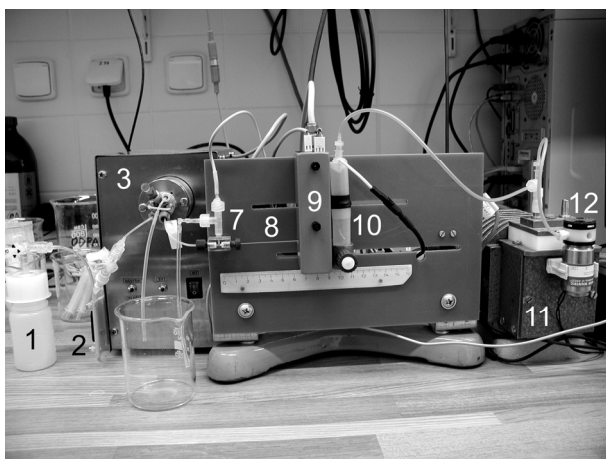
Pro dávkování vzorku do kapiláry bylo využito principu popsaného v práci<sup>2</sup>. Vzorek je přiváděn od dávkovacího ventilu (3) standardní PTFE trubičkou (6) o vnějším průměru 1,58 a vnitřním průměru 0,8 mm (Supelco, USA). Do ústí PTFE trubičky v dávkovací nádobce je do hloubky asi 0,5 mm zasunut dávkovací konec kapiláry (8). PTFE trubička a kapilára jsou v dávkovací nádobce fixovány ve stabilních polohách šroubením (není zakresleno) a silikonovým těsněním. Vzorek je do kapiláry nadávkován tak, že současně s přepnutím dávkovacího ventilu do polohy „inject“ je na definovanou dobu zapnuta dávkovací pumpa

(2) pumpující separační pufr ze zásobní nádoby (1) do dávkovací části, takže definovaný objem vzorku z dávkovací smyčky je proudem separačního pufru nesený kolem dávkovacího konce kapiláry. Doba dávkování je tak řízena dobou, po kterou protéká kolem ústí kapiláry zóna roztoku vzorku; přebytek separačního pufru odtéká po dobu dávkování do odpadu. Dávkováno je bez přerušení vysokého napětí na elektroforetických elektrodách, takže vzorek je nadávkován kombinovaným způsobem – hydrodynamicky a elektrokineticky.

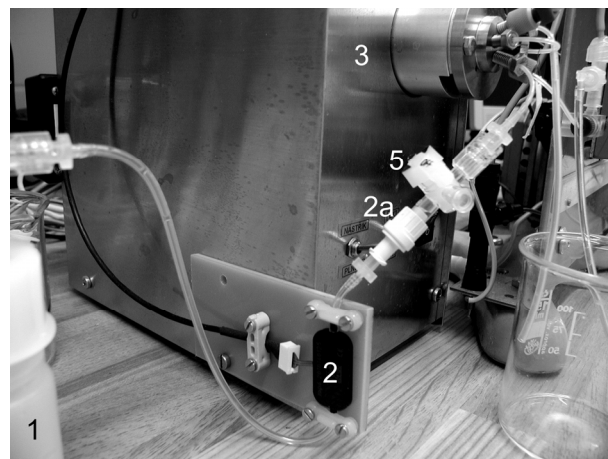
Používán byl elektronicky ovládaný dávkovací ventil, typ C102M (Labio, ČR) s dávkovací smyčkou o objemu 15  $\mu\text{l}$ . Smyčku lze plnit např. injekční stříkačkou (4). Separační pufr byl pumpován piezoelektrickou mikropumpou, typ mp6 ovládanou mp-x kontrolerem (Bartels mikrotechnik, Německo). Vhodné parametry dávkování jsou např.: celková doba dávkování (aktivace dávkovací pumpy) 5 s, průtoková rychlost  $95 \mu\text{l s}^{-1}$ . Za těchto podmínek je v popisované aparatuře zóna vzorku v kontaktu s dávkovacím koncem kapiláry asi 0,5 s (měřeno nadávkováním vzduchové bublinky místo roztoku vzorku, tj. není uvažována disperze). Podstatně delší doba dávkování byla volena proto, aby se po nadávkování dostala zóna vzorku dostatečně daleko od dávkovacího konce kapiláry.

Mezi dávkovací pumpou a dávkovací nádobkou byl zařazen jednak zpětný ventilek (použit byl typ 14039-10, WPI, USA) bránící toku separačního pufru zpět do zásobníku v době, kdy není pumpa aktivována a plastový třicestný ventilek (5) (použit byl typ 14035-10, WPI, USA), který umožňoval přímé dávkování roztoku injekční stříkačkou do dávkovací nádoby např. při aktivaci kapiláry roztokem hydroxidu; detail piezoelektrické pumpy s uvedenými ventily je na obr. 3.

Výstupní konec kapiláry byl umístěn v koncové nádobce (10) o objemu 5 ml (plastová nádobka na vzorky, kat. č. K000737, P-Lab, ČR); kapilára procházela do nádoby silikonovým těsněním fixovaným v její stěně. Pod-



Obr. 2. Pohled na elektroforetickou část aparatury. Číslo u jednotlivých komponent odpovídají číslům na obr. 1



Obr. 3. Detailní pohled na dávkovací piezoelektrickou pumpu. Číslo u jednotlivých komponent opět odpovídají číslům na obr. 1; 2a je zpětný ventilek

tlakem v koncové nádobce, generovaným membránovou pumpou (11) (použit byl typ M 401, JZD Výčapy, ČR), mohla být kapilára promývána separačním pufrem mezi jednotlivými analýzami nebo při její aktivaci roztokem hydroxidu. Aby promývání probíhalo definitou dobu, tj. pouze po dobu aktivace membránové pumpy, byl mezi koncovou nádobkou a membránovou pumpu zařazen elektromagneticky ovládaný třicestný ventil (12) (použit byl typ 368131230, ASCO Scientific, USA). Ten byl řízen tak, aby po dobu aktivace membránové pumpy byla koncová nádobka hermeticky uzavřena a po jejím vypnutí byla nádobka ihned spojena s atmosférou, tj. podtlak v ní byl okamžitě zrušen.

Elektroforetickými elektrodami byly platinové drátky, zemní elektroda byla v dávkovací nádobce, vysokonapěťová v nádobce koncové. Použit byl vysokonapěťový zdroj (13), typ PS 350/5000 (Stanford Research Systems, USA), poskytující napětí do 5 kV.

#### Elektronická část aparatury

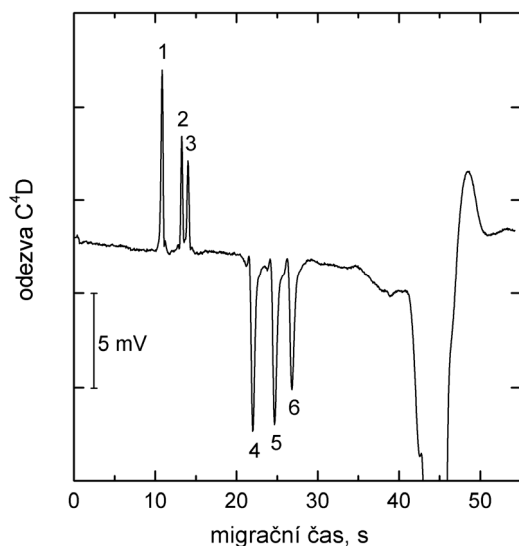
V aparatuře byla použita bezkontaktní vodivostní detekce,  $C^4D$  (Capacitively Coupled Contactless Conductometric Detection), jejíž princip lze nalézt např. v práci<sup>3</sup>. Detektor (9) obsahuje detekční celou podle práce<sup>4</sup>, tvořenou dvěma semitubulárními elektrodami z Al fólie o šířce 1 mm s mezerou mezi nimi rovněž 1 mm. Elektrody jsou vlepeny v drážce o průměru rovném vnějšímu průměru kapiláry, která je vytvořena v plexisklové destičce.

Kapilára je k elektrodám přitížena druhou plexisklovou destičkou. Cela je od okolního prostředí odstíněna kovovou skříňkou. Elektronika detektoru je založena na obvodu popsaném v pracích<sup>5,6</sup>. Snímač střídavého proudu prošlého detekční celou (proudový sledovač) a usměrňovač byly umístěny v těsné blízkosti detekční cely, tj. uvnitř stínící skříňky. Vstupní střídavý signál o frekvenci 320 kHz a amplitudě 18 V byl odebírán z laboratorně sestaveného zdroje (14) s integrovaným obvodem MAX 038 (Maxim, USA)<sup>7</sup>. Usměrněný signál z detektoru (9) byl zesílen zesilovačem (15) a registrován 24 bitovým A/D převodníkem Panther 1000 (16) řízeným programem Ecomac 0.97 (Ecom, s.r.o., ČR); pro spouštění registrace dat byla použita jednotka Panda 30 od téže firmy. Vysoká rychlost převodu a vysoké rozlišení je pro rychlé separace v krátkých kapilárách důležité, protože doby separací jsou často řádově pouze jednotky až desítky sekund.

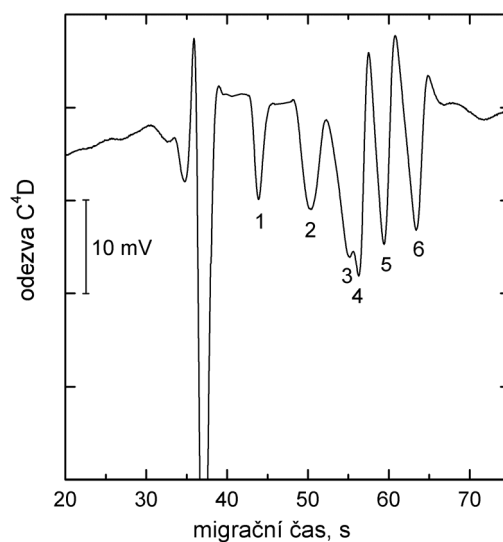
Přepínání dávkovacího ventilu a spouštění piezoelektrické pumpy při dávkování vzorku, spouštění registrace dat a ovládání promývací pumpy po ukončení separace bylo přes jednoduchá rozhraní řízeno počítačem (17) vybaveným univerzální měřicí kartou PCI-6034E a programem vytvořeným v prostředí LabView (National Instruments, USA).

#### Výsledky a diskuse

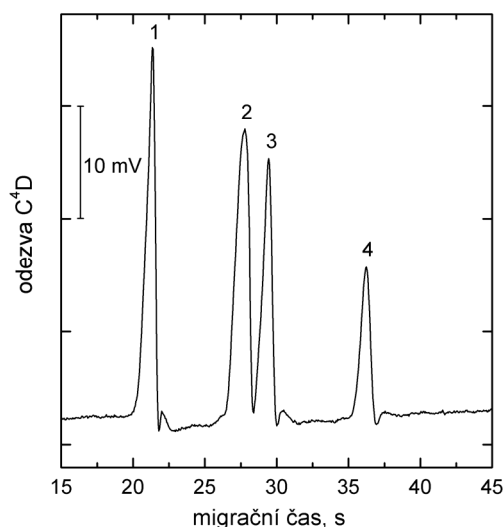
Použití popisované elektroforetické sestavy ilustrují následující elektroferogramy. Na obr. 4 je separována směs



Obr. 4. Separace modelové směsi vodného roztoku anorganických iontů (koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ), histidinu a jeho derivátů (koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ). Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 –  $\text{Na}^+$ , 4 – 3-methyl histidin, 5 – histidin, 6 – 1-methyl histidin. Křemenná kapilára, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , délka celková 8 cm, délka k detektoru 6 cm, separační puf 20 mM MES + 5 mM LiOH (pH 5,9), separační napětí 5 kV, proud 8  $\mu\text{A}$



Obr. 5. Separace modelové směsi vodného roztoku sacharidů (koncentrace 1 g  $\text{dm}^{-3}$ ). Identifikace píků: 1 – sacharosa, 2 – laktosa, 3 – galaktosa, 4 – glukosa, 5 – fruktosa, 6 – ribosa. Křemenná kapilára, vnitřní průměr 10  $\mu\text{m}$ , celková délka 10 cm, délka k detektoru 8 cm, separační elektrolyt 75 mM NaOH, separační napětí 5 kV, proud 14  $\mu\text{A}$



Obr. 6. Elektroferogram modelové směsi anorganických iontů (koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ). Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 –  $\text{Na}^+$ , 4 –  $\text{Li}^+$ . Kapilára PEEK, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , celková délka 10 cm, délka k detektoru 8 cm, separační elektrolyt 20 mM MES + 20 mM HIS (pH 6,2), separační napětí 5 kV, proud 8  $\mu\text{A}$

anorganických iontů, jejichž zóny zvyšují vodivost separačního pufru, a derivátů histidinu, v jejichž zónách je vodivost proti vodivosti pufru menší. Za experimentálních podmínek uvedených u obrázku bylo dosaženo prakticky úplné separace anorganických iontů do 15 sekund a aminokyselin do 30 s. Stejná separace histidinů ve standardní elektroforetické aparatuře<sup>8</sup> s kapilárou o efektivní délce 67 cm vyžadovala dobu 17 min.

Na obr. 5 je separace modelové směsi sacharidů běžně se vyskytujících v potravinářských produktech. V silně alkalickém prostředí migrují sacharidy jako anionty, takže jejich zóny jsou na elektroferogramu až za nástríkovou zónou. V použité kapiláře o efektivní délce 8 cm se neoddělí galaktosa od glukosy, metoda v uvedeném uspořádání proto není vhodná pro analýzu sacharidů v mléčných výrobcích, kde se galaktosa vyskytuje jako produkt štěpení laktosy. Ostatní běžné sacharidy jsou zcela separovány za 65 s. Galaktosu od glukosy lze oddělit za více než dvojnásobnou dobu ve standardním elektroforetickém uspořádání<sup>9</sup> s kapilárou o vnitřním průměru 5  $\mu\text{m}$  a efektivní délky 18 cm.

Poslední ilustrační elektroferogram byl získán s PEEK kapilárou. Výrazně snížená rychlost elektroosmotického toku v plastové kapiláře ve srovnání s kapilárou křemennou se projeví prodloužením migračních časů, viz elektroferogramy na obr. 4 a 6.

## Závěr

Popsaná aparatura představuje otevřený laboratorní experimentální systém, který lze snadno přizpůsobit řešení

konkrétního separačního problému jak z hlediska uspořádání jednotlivých komponent, tak i programového vybavení. Délky používaných separačních kapilár závisí na konstrukčních rozměrech jednotlivých částí aparatury. V popisovaném zařízení bylo možno používat standardní elektroforetické křemenné nebo (díky bezkontaktní vodivostní detekci) kapiláry plastové (PEEK) o vnějším průměru 380  $\mu\text{m}$  a celkové délce 6 až 16 cm a efektivní délce 4 až 14 cm. Je zřejmé, že aparaturu lze vybavit i optickou detekcí při použití detektoru s vedením záření optickými vlákny.

*Autor děkuje Petře Podhorné a Blance Vochyánové, studentkám katedry analytické chemie na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, za poskytnutí ilustračních elektroferogramů, které byly získány na popisované aparatuře při řešení jejich diplomových projektů. Finančně byla práce podporována GA ČR, projekt P206/10/1231 a MŠMT ČR, projekt MSM 0021620857.*

## LITERATURA

- Opekar F., Coufal P., Štulík K.: Chem. Rev. 109, 4487 (2009).
- Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: J. Chromatogr., A 883, 223 (2000).
- Opekar F., Štulík K.: Chem. Listy 104, 1148 (2010).
- Tůma P., Opekar F., Štulík K.: Electrophoresis 23, 3718 (2002).
- da Silva J. A. F., do Lago C. L.: Anal. Chem. 70, 4339 (1998).
- Novotný M., Opekar F., Jelínek I.: Chem. Listy 99, 132 (2005).
- <http://www.alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/72720/MAXIM/MAX038.html>, staženo 12. srpna 2011.
- Tůma P., Samcová E., Opekar F., Jurka V., Štulík K.: Electrophoresis 28, 2174 (2007).
- Tůma P., Málková K., Samcová E., Štulík K.: Anal. Chim. Acta 698, 1 (2011).

**F. Opekar** (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague, Czech Republic): **Apparatus for Electrophoretic Separations in Short Capillaries**

A specialized electrophoretic apparatus in H-configuration has been designed for separations in short capillaries with lengths of a few cm. The sample injection and the capillary rinsing are designed so that the capillary position is unchanged. The sample injector consists of an electronically-controlled six-way injection valve, a piezoelectric micropump and a delivery tube in which the separation capillary inlet is fixed. The sample is injected without interrupting the separation voltage. The capillary rinsing is provided by a membrane pump generating vacuum in the end vial. The apparatus is equipped with a contactless conductometric detector. All the operations and data acquisition are computer-controlled.