

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

USNADNĚNÉ HYDRODYNAMICKÉ DÁVKOVÁNÍ VZORKU DO SEPARAČNÍ KAPILÁRY V LABORATORNÍCH ELEKTROFRETICKÝCH APARATURÁCH

TEREZA KADLECOVÁ^a,
FRANTIŠEK OPEKAR^a a PETR TŮMA^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2,

^b Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie, Ruská 87, 100 00 Praha 10
opekar@natur.cuni.cz

Došlo 18.12.12, přijato 25.1.13.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, laboratorní aparatura, dávkování vzorku, hydrodynamické dávkování, poloautomatické dávkování

Úvod

V kapalinové chromatografii se pro dávkování vzorku používají dávkovací smyčky, které umožňují opakovatelné nadávkování přesně definovaného objemu vzorku na separační kolonu. V kapilární elektroforéze (CE) je zajištění reprodukovatelného dávkování vzorku větším problémem, protože vzorek je dávkován z nádoby se vzorkem přímo na počátek separační kapiláry. Nadávkované množství vzorku je závislé jak na vlastnostech separačního prostředí, tak i na matici vzorku. Proces dávkování se tak stává primárním zdrojem řady potenciálních chyb. Vzhledem k malým vnitřním průměrům elektroforetických kapilár (5 až 100 μm)¹ se nadávkovaný objem vzorku do separační kapiláry pohybuje v řádu desetin až jednotek nanolitru. Přitom opakovatelnost nadávkování takto malých objemů vzorků do kapiláry je základním předpokladem pro správnou separaci a kvantitativní analýzu. Nejběžnější dávkovací technikou v CE je hydrodynamické dávkování², u kterého je postupováno tak, že nádoba (vialka) se separačním elektrolytem, v níž je ponořen dávkovací konec kapiláry, je vyměněna za nádobku s roztokem vzorku. Poté je zvýšen tlak nad roztokem vzorku, případně snížen tlak v nádobce koncové. Po nadávkování vzorku je nádoba se vzorkem opět nahrazena nádobkou se separačním pufrům; u komerčních přístrojů se běžně dávkuje tlakem 25 až 100 mbar po dobu 0,5–10 s. Méně často je používáno elek-

trokinetické dávkování, u kterého je množství nadávkovaného analytu závislé na jeho mobilitě i na vodivosti použité matrice³.

V laboratorních elektroforetických aparaturách, které jsou stále hojně používány v základním výzkumu⁴ i ve školních laboratořích, je zvýšení hydrodynamického tlaku v nádobce se vzorkem realizováno vesměs tak, že experimentátor zvedne na definovanou dobu dávkovací konec kapiláry i s nádobkou se vzorkem do určité výšky oproti výstupnímu konci kapiláry v koncové elektrodové nádobce^{2,5,6}. Vzorek je nadávkován tlakovým rozdílem $\Delta p = \Delta h \rho g$, kde Δh je výškový rozdíl hladin kapaliny v nádobce vzorku a v elektrodové nádobce s výstupním koncem kapiláry (obvykle 5–10 cm), ρ je hustota roztoku vzorku a g je gravitační zrychlení. Po nadávkování vzorku vrátí experimentátor dávkovací konec kapiláry do základní polohy a nádobku se vzorkem nahradí nádobkou s elektrolytem. Celý postup dávkování je tak ovlivněn subjektivním přístupem experimentátora.

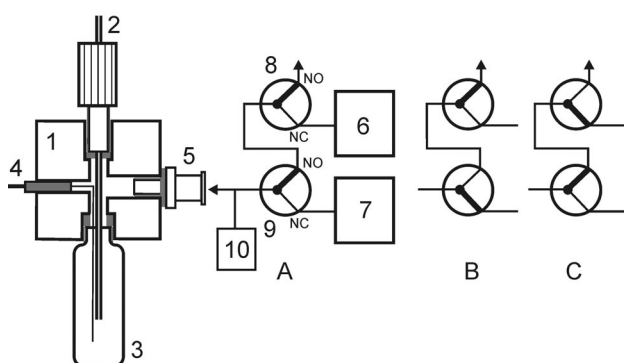
V této práci je testována možnost dávkování zvýšeným tlakem nad hladinou roztoku v nádobce s roztokem vzorku generovaným membránovou pumpou, přičemž dávkovací konec kapiláry je stále ve stejné poloze. Dobu trvání zvýšeného tlaku lze přesně objektivně řídit např. vhodným počítačovým programem. Subjektivní přístup experimentátora je minimalizován, jeho činnost spočívá pouze ve výměně nádobek se vzorkem a elektrolytem u dávkovacího konce kapiláry. Zvýšením tlaku nad roztokem v dávkovací nádobce je řešeno i promývání kapiláry mezi jednotlivými separacemi. Jde v podstatě o zjednodušený systém používaný v komerčních elektroforetických sestavách.

Experimentální část

Dávkovací část aparatury

Sestava dávkovací části aparatury je na obr. 1. V plastovém (poly-methylmethakrylátovém) bločku (1) je plynotěsně (šroubením a těsněním ze silikonového kaučuku) upevněn dávkovací konec separační kapiláry (2), nádoba se separačním elektrolytem nebo roztokem vzorku (3), elektroforetická elektroda (4) a spojka (5). Do ní je připojena hadička ze zdroje tlaku tvořeného dvěma membránovými pumpami (6) a (7) a třicestnými elektromagneticky ovládanými ventily (8) a (9). Na výstupech z pump jsou jednoduché mechanické manostaty pro nastavení a udržování požadovaného tlaku, který tak lze podle potřeby měnit. Dávkovací tlak generovaný pumpou (7) je kontrolován elektronickým tlakoměrem (10), přesná hodnota promývacího tlaku generovaného pumpou (6) není důležitá.

Činnost dávkovací aparatury je následující. Membránové pumpy jsou v činnosti, manostaty udržují na jejich



Obr. 1. Schema dávkovací a promývací části laboratorní elektroforetické aparatury. (1) poly-methylmethakrylátový bloček, (2) dávkovací konec kapiláry, (3) nádobka s roztokem vzorku či elektrolytu (vialka 4 ml, P-lab, ČR), (4) elektroforetická Pt elektroda, (5) vstup pro připojení ke zdroji tlaku (Luer spojka AP16FLT1032N, Ark-Plas, Filipíny), (6) a (7) membránové pumpy (N86KN.18, Laborport, USA), (8) a (9) elektromagneticky ovládané třícestné ventilků (typ 368131230, Asco Scientific, USA), (10) elektronické měřidlo tlaku (GDH 13 AN, Greisinger, Německo). (A), (B) a (C) jsou jednotlivé pracovní pozice třícestných ventilků (NO a NC označuje otevřenou a zavřenou cestu při klidovém stavu ventilků), detaily viz text

výstupech konstantní tlak a aparatura může být v jednom ze tří stavů:

a) V klidovém stavu třícestných ventilků, obr. 1A, je nádobka, ať již s roztokem elektrolytu nebo vzorku, spojena s atmosférou.

b) Při dávkování je na definovanou dobu přepnut ventilek (9), obr. 1B, takže na hladinu roztoku v nádobce se vzorkem působí tlak generovaný pumpou (7). Po skončení dávkování se ventilek (9) vrací do klidové polohy a tlak v nádobce prakticky ihned klesne na hodnotu tlaku atmosférického.

c) Při promývání kapiláry po skončené separaci je na definovanou dobu přepnut ventilek (8), obr. 1C, takže na hladinu roztoku v nádobce s promývacím roztokem působí tlak generovaný pumpou (6). Po skončení promývání se

ventilek (8) vrací do klidové polohy a tlak v nádobce klesne na hodnotu tlaku atmosférického.

V testované aparatuře bylo přepínání ventilků řízeno časovými pulsy generovanými programem vytvořeným v prostředí LabView a odebíranými z univerzální převodníkové desky PCI-6034E (National Instruments, USA). Je zřejmé, že k jejich přepínání lze použít i jiné způsoby generace potřebných pulsů.

Dávkovací zařízení bylo upraveno tak, aby umožňovalo dávkovat i ručním způsobem, tj. zvednutím dávkovacího konce kapiláry, takže oba typy dávkování, testované a ruční, mohly být porovnány.

Elektroforetická část aparatury

Laboratorní elektroforetická aparatura byla sestavena z výše uvedeného dávkovacího zařízení, separační křemenné kapiláry (Polymicro Technologies, USA) o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 57 cm a délce k bezkontaktnímu vodivostnímu detektoru (C^4D) 49 cm; detektor s pracovní frekvencí 330 kHz a amplitudou 14 Vpp byl zhotoven v laboratoři podle schéma v práci⁷. Použit byl vysokonapěťový zdroj Spellman CZE 2000, separace byly prováděny při napětí 25 kV, proud je uveden u jednotlivých elektroferogramů.

Testovacím roztokem byla ekvimolární směs 0,5 mM K^+ , Na^+ a tyraminu. Směs byla separována v pufru 20 mM H_3BO_3 + 10 mM LiOH, pH 9,2. Kapilára byla před měřením promyta 0,1 M NaOH (10 minut), deionizovanou vodou (10 minut) a poté naplněna separačním elektrolytem. Dále byla provedena ukázková separace šesti anorganických kationtů (K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Li^+) v pufru 20 mM 2-(*N*-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES) + 20 mM histidin (His), pH 6,17.

Výsledky a diskuse

Určení vhodné doby dávkování

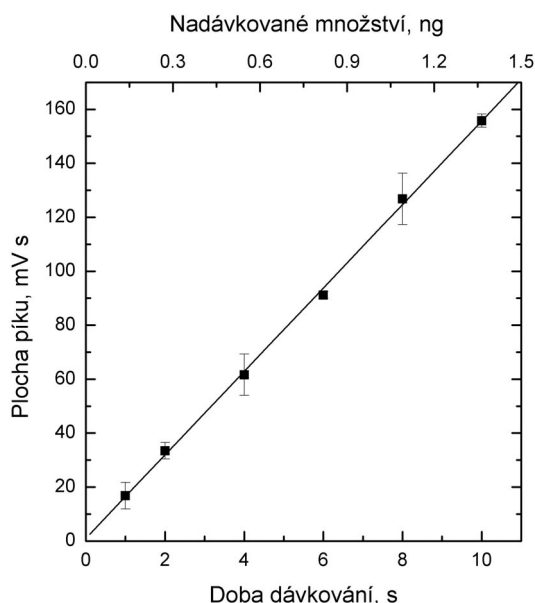
Z předběžných experimentů vyplynulo, že vhodný dávkovací tlak je 50 mbar, podobně jako u komerčních

Tabulka I

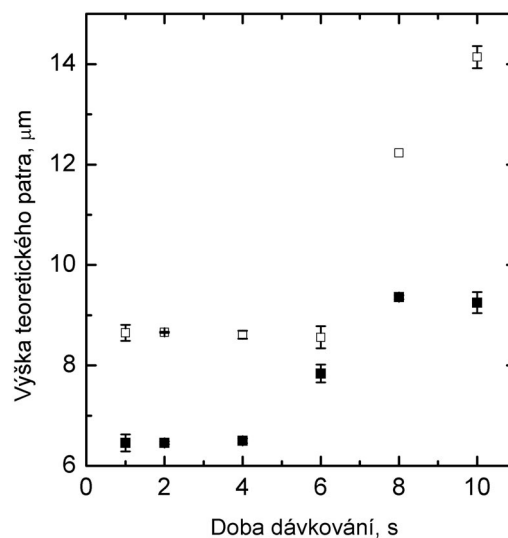
Základní dávkovací parametry pro různé doby dávkování tlakem 50 mbar počítané z Hagen-Poiseuilleovy rovnice

Doba dávkování [s]	Nadávkový objem [nl]	Délka nadávkové zóny vzorku [cm]	Relativní počáteční délka zóny vzorku ^a [%]
1	6,8	0,15	0,27
2	13,6	0,31	0,54
4	27,6	0,62	1,08
6	40,9	0,93	1,62
8	54,5	1,23	2,16
10	68,1	1,54	2,71

^a Relativní délka vztažená k celkové délce kapiláry



Obr. 2. Závislost plochy píku draselného iontu na době dávkování tlakem 50 mbar. Body jsou střední hodnoty ze tří opakovaných měření, chybová úsečka představuje interval spolehlivosti počítaný pro hladinu významnosti 95 %



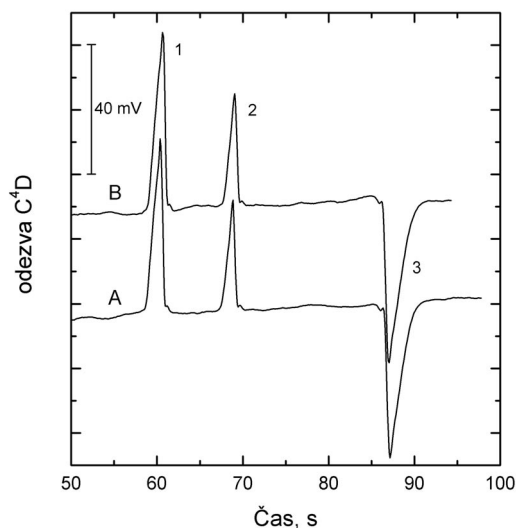
Obr. 3. Závislost výšky teoretického patra na době dávkování tlakem 50 mbar určená pro K⁺ ion (□) a Na⁺ ion (■). Body jsou střední hodnoty ze tří opakovaných měření, chybová úsečka představuje interval spolehlivosti počítaný pro hladinu významnosti 95 %

elektroforetických přístrojů. Pro odhad objemu nadávkovaného roztoku vzorku do kapiláry (V_{inj}) byla použita Hagen-Poiseuilleova rovnice, $V_{inj} = \Delta p r^4 t_{inj} / 8 \eta L$, kde Δp je tlakový rozdíl (dávkovací tlak), r vnitřní poloměr kapiláry, t_{inj} doba dávkování, η dynamická viskozita a L celková délka kapiláry². Pro danou kapiláru je nadávkovaný objem vzorku určen součinem dávkovacího tlaku a doby dávkování. Vypočítané parametry dávkování pro různé doby dávkování jsou shrnuty v tab. I.

Promývání kapiláry mezi jednotlivými analýzami bylo prováděno tlakem 1000 mbar po dobu 40 s.

Jak lze očekávat, plochy píků testovaných iontů lineárně rostou s rostoucí dobou dávkování; pro ilustraci je na obr. 2 tato závislost uvedena pro draselný ion. Tuto závislost lze znázornit i ve formátu plocha píku – množství nadávkovaného iontu, vypočítané z nadávkovaného objemu (tab. I) a známé koncentrace. Pak směrnice této závislosti udává citlivost detekce příslušného iontu za použitých experimentálních podmínek. Byly zjištěny citlivosti 0,12, 0,10 a 0,05 mV s pg⁻¹ pro K⁺, Na⁺ a tyramin.

S rostoucí dobou dávkování se zvyšuje odezva detektoru, avšak, jak je zřejmé z obr. 3, kde jsou uvedeny výšky teoretických pater pro draselný a sodný ion, od určité doby dávkování výšky teoretických pater vzrůstají (separační účinnosti klesají). Proto, na základě výsledků uvedených v obr. 3, byla pro další měření zvolena doba dávkování 4 s, což při tlaku 50 mbar odpovídá délce nadávkované zóny rovné 1 % z celkové délky kapiláry. Toto zjištění kore-



Obr. 4. Elektroferogramy ekvimolární směsi 0,5 mM draselného (1), sodného (2) iontu a tyraminu (3) získané při vyvinutém (A) a ručním (B) dávkování. Separační pufr 20 mM H₃BO₃ + 10 mM LiOH, pH 9,2, separační napětí/proud 25 kV/14 μA

sponduje s učebnicovým doporučením pro praktické CE analýzy, podle kterého by délka nadávkované zóny neměla překročit 1–2 % z celkové délky kapiláry⁸.

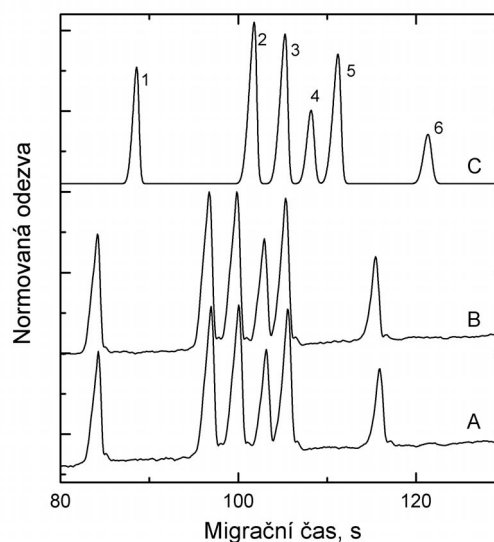
Porovnání testovaného a ručního dávkování

Pro testované a ruční dávkování byly zvoleny stejné dávkovací podmínky, aby bylo možno přímo porovnat zjištěné analytické a separační parametry: 50 mbar \times 4 s pro testované a 10 cm (přibližně 10 mbar) \times 20 s pro dávkování ruční. Ilustrační elektroferogramy testované směsi a směsi šesti kationtů registrované při dávkování oběma metodami jsou na obr. 4 a 5. Na obr. 5 je pro porovnání uveden i modelový elektroferogram generovaný programem Peak Master^{9,10} (aby bylo možno experimentální a modelový elektroferogram přímo porovnat, jsou uvedeny v normované formě). Základní sledované parametry obou metod dávkování jsou uvedeny a porovnány v tab. II a III.

Z obr. 4, 5 a především z dat v tab. II a III je zřejmé, že oba způsoby dávkování jsou zcela ekvivalentní z hlediska nadávkovaného množství vzorku do kapiláry při zachování stejné hodnoty $\Delta p \times t_{inj}$. Relativní směrodatné odchylky (RSD) pro plochu píku jsou pro vyvinuté dávkování cca o 50 % nižší než při ručním dávkování. Tento fakt jednoznačně dokládá, že u vyvinutého dávkování je do značné míry eliminován vliv činnosti experimentátora. Hodnoty RSD z plochy píku pro vyvinutý způsob dávkování se pohybují v rozmezí 1,15–1,3 %, což odpovídá opakovatelnosti hydrodynamického dávkování u komerčních přístrojů CE (RSD 1–2 %)^{2,11}. Testované dávkování je proto vhodnou náhradou běžně používaného ručního dávkování se zvedáním dávkovacího konce kapiláry s několika dalšími výhodami:

a) s kapilárou není třeba pohybovat, je ve stabilní poloze;

b) vzorek je nadávkován s vyloučením subjektivních chyb experimentátora pouhým stisknutím tlačítka časovače ovládajícího dobu přepnutí třicestného ventilku;



Obr. 5. Normované elektroferogramy modelové ekvimolární směsi 0,05 mM draselného (1), barnatého (2), vápenatého (3), sodného (4), hořečnatého (5) a lithného (6) iontu získané při vyvinutém (A) a ručním (B) dávkování; modelový elektroferogram vytvořený programem PeakMaster (C). Separační pufr 20 mM MES/His, pH 6,17, separační napětí/proud, 25 kV/7 μ A

Tabulka II

Porovnání základních parametrů ručního a vyvinutého hydrodynamického dávkování roztoku vzorku o ekvimolární koncentraci 0,5 mM draselného a sodného iontu a tyraminu. Výsledky jsou z pěti opakovaných měření, intervaly spolehlivosti jsou počítány pro hladinu významnosti 95 %

Analyt	K ⁺	Na ⁺	Tyramin
Podíl ploch píkú ^a	1,09 \pm 0,03	1,05 \pm 0,02	1,05 \pm 0,01
Podíl výšek píkú ^a	1,05 \pm 0,01	1,05 \pm 0,02	1,04 \pm 0,01
Podíl výšek teoretického patra ^a	0,99 \pm 0,01	0,99 \pm 0,12	1,08 \pm 0,08

^a Podíl: ruční dávkování/vyvinuté dávkování

Tabulka III

Relativní směrodatné odchylky (RSD) plocha a výška píkú určených z pěti opakovaných měření roztoku vzorku o ekvimolární koncentraci 0,5 mM draselného a sodného iontu a tyraminu při vyvinutém a ručním hydrodynamickým dávkování. RSD jsou počítány pro hladinu významnosti 95 %

Analyt	Vyvinuté dávkování			Ruční dávkování		
	K ⁺	Na ⁺	tyramin	K ⁺	Na ⁺	tyramin
RSD plochy píkú	1,29	1,20	1,15	2,41	2,46	2,34
RSD výšky píkú	0,80	1,20	0,86	1,22	1,54	1,82

c) parametry dávkování (tlak, doba) lze při optimalizaci dávkování velice snadno a reprodukovatelně měnit (především při využití počítačem asistované obsluhy);

d) dávkování je rychlé, což umožňuje analýzu většího počtu vzorků za jednotku času;

e) stejného principu jako pro dávkování lze využít i pro promývání kapiláry nejen mezi jednotlivými separacemi, ale i např. při aktivaci kapiláry, úpravě jejího vnitřního povrchu atp.

Závěr

Vyvinutá metoda výrazně usnadňuje a urychluje dávkování vzorku do separační kapiláry v laboratorně sestavených elektroforetických aparaturách. Lze ji vřadit do počítačového programu řídicího separačního procesu – ovládní vysokonapěťového zdroje, sběr a zobrazování dat z detektoru, atp., a tím minimalizovat vliv „lidského faktoru“ při provádění analýz. Princip je s výhodou využitelný i při promývání kapiláry. Na experimentátora zbývá pouze výměna nádobek s pufrem, vzorkem a případně s promývacím roztokem.

Práce vznikla za finanční podpory GA ČR, projekt P206/10/1231 a MŠMT ČR, projekt MSM 0021620857.

LITERATURA

- Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
- Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performance capillary Electrophoresis, A Primer*. Agilent Technologies, Waldbron 2010.
- Huang X. H., Gordon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 60, 375 (1988).
- Vochyánová B., Opekar F., Tůma P., Štulík K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1549 (2012).
- Novotný M., Opekar F., Jelínek I., Štulík K.: *Anal. Chim. Acta* 525, 17 (2004).
- Kašička V., Prusík Z., Pospíšek J.: *J. Chromatogr. A* 608, 13 (1992).
- Novotný M., Opekar F., Jelínek I.: *Chem. Listy* 99, 132 (2005).
- Altria K. D., Fabre H.: *Chromatographia* 40, 313 (1995).
- Gaš B., Coufal P., Jaroš M., Muzikář J., Jelínek I.: *J. Chromatogr., A* 905, 269 (2001).
- <http://web.natur.cuni.cz/gas>, staženo 14.12. 2012.
- Ahuja S., Jimidar M. I.: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*. Elsevier, San Diego 2008.

T. Kadlecová^a, F. Opekar^a, and P. Tůma^b
^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bDepartment of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague): **Facilitated Hydrodynamic Sample Introduction into Separation Capillary in Laboratory Electrophoretic Devices**

A simple and fast method of pressure sample introduction of a sample into a separation capillary of electrophoretic device is described. Except manual exchange of the vessel with a separation buffer for that with a sample, the other sampling steps are computer-controlled. Without moving the capillary, the sample is introduced by pressure generated by a membrane pump and adjusted with a simple mechanical manostat applied to a vessel with the sample solution for a defined time period. The method was tested on separation of a 0.5 mM K⁺, Na⁺ and tyramine mixture. The results were compared with those obtained by a manual sampling utilizing an elevation of the capillary sampling end. Under the same sampling conditions, the results of both methods are quite comparable. The repeatability of the described method is better than that of the manual method. The same principle can be used for capillary washing or for its activation.