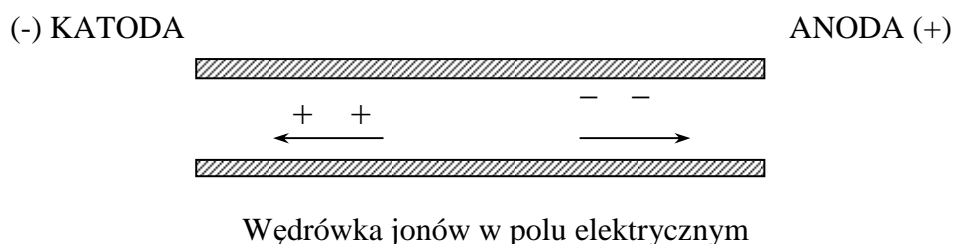


WYSOKOSPRAWNA ELEKTROFOREZA KAPILARNA (HPCE)

WSTĘP

Zjawisko elektroforezy polega na poruszaniu się lub migracji cząstek naładowanych w polu elektrycznym w wyniku przyciągania względnie odpychania.

Najprostszy diagram obrazujący proces elektroforezy jest przedstawiony poniżej: pod wpływem pola elektrycznego aniony wędrują do anody; kationy do katody.



Elektroforeza jako technika rozdzielania substancji została zainicjowana przez Tiseliusa w 1937 roku. Po umieszczeniu w rurce między roztworem buforów mieszaniny protein i po przyłożeniu pola elektrycznego zaobserwował, że składniki próbki migrują w kierunku i z szybkością zdeterminowaną ich ładunkiem oraz ruchliwością. Za tą pracę Tiselius dostał nagrodę Nobla w dziedzinie nauk separacyjnych.

Sprawność rozdzielania w wolnym roztworze była ograniczona przez dyfuzję termiczną oraz konwekcję. Dlatego elektroforeza tradycyjna przeprowadzana jest w mediach zapobiegających konwekcji, np.: poliakrylamid lub żel agarozowy. Elektroforeza na żelu agarozowym w postaci płytek jest jedną z szerzej stosowanych technik rozdzielania biologicznych makrocząsteczek (kwasy nukleinowe) pod względem masy. Minusem jednak jest długi czas analizy, mała sprawność, trudności z detekcją i automatyzacją.

Alternatywą do sztabek są rurki o wąskim przekroju oraz kapilary. Zastosowanie kapilary uwolniło od zjawiska konwekcji i dyfuzji oraz umożliwiło utrzymanie stałej temperatury medium analitycznego wewnątrz rurki. Początkowo stosowano szklane lub teflonowe kapilary o wewnętrznej średnicy 200 μm . W latach 80-tych po raz pierwszy użyto krzemionkowej kapilary o średnicy 75 μm . Wtedy też Jorgenson rozszerzył teorię elektroforezy, opisał zależności między operacyjnymi parametrami oraz jakością rozdzielania, wykazał także potencjalne zastosowania wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) jako techniki analitycznej.

W następnych latach techniki rozdzielania HPCE zostały rozszerzone, elektroforeza nie była już ograniczona do rozdzielania makrocząsteczek ale umożliwiła w pojedynczej analizie

separację kationów, anionów oraz cząstek obojętnych. Wprowadzenie nowych opcji umożliwiło wykorzystanie elektroforezy w wielu dziedzinach nauki.

PODSTAWOWE PARAMETRY ANALITYCZNE

Parametry analityczne dla elektroforezy kapilarnej są opisane podobnymi równaniami, terminami jak w chromatografii. Podstawowymi i najbardziej praktycznymi wartościami są: ruchliwość, czas migracji, dyspersja, sprawność oraz rozdzielczość.

Ruchliwość

Rozdzielanie na drodze elektroforezy jest oparte na różnicy w szybkości migracji cząsteczek w polu elektrycznym. Szybkość poruszania się jonu (V) opisana jest wzorem:

$$V = \mu_e E$$

gdzie:

μ_e - ruchliwość elektroforetyczna [cm^2/Vs]

E - pole elektryczne [V/cm]

Pole elektryczne jest funkcją przyłożonego napięcia i długości kapilary. Ruchliwość dla danego jonu czy medium jest stała i jest to cecha charakterystyczna tego jonu. Ruchliwość elektroforetyczną opisuje wzór:

$$\mu = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

gdzie:

q - ładunek jonu

η - lepkość roztworu

r - promień jonu

Z równania wynika, że małe, obdarzone wysokim ładunkiem cząstki charakteryzują się wysoką ruchliwością, podczas gdy cząstki duże, obdarzone małym ładunkiem mają małą ruchliwość.

Wyróżniamy 3 rodzaje ruchliwości:

- **r. absolutna** – wartość teoretyczna, wielkość stała i charakterystyczna dla danego jonu. Oznaczana jest przy pełnym ładunku poruszającego się jonu i ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia.
- **r. efektywna** – wartość wyznaczana eksperymentalnie, nie jest wielkością stałą, zależy głównie od pH i składu buforu.

- **r. pozorna** – odpowiada aktualnej średniej wartości dla danego roztworu i jest sumą r. efektywnej (μ_e) oraz r. przepływu elektroosmotycznego (μ_{EOF}):

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$$

Czas migracji

Czas potrzebny do przemieszczenia się substancji do detektora nazywany jest czasem migracji, jest proporcjonalny do drogi oraz prędkości migracji. Czas migracji oraz inne parametry doświadczalne służą do obliczenia ruchliwości pozornej μ_a :

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV}$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$$

gdzie:

V - przyłożone napięcie [V]

l - efektywna długość kapilary (do detektora) [cm]

L - całkowita długość kapilary [cm]

t - czas migracji [s]

E - pole elektryczne [V/cm]

Ruchliwość efektywna μ_e może być obliczona z ruchliwości pozornej poprzez niezależne pomiary przepływu elektroforetycznego, używając neutralnego wskaźnika, który porusza się z prędkością równą wielkości EOF. Do takich neutralnych wskaźników należą min.: metanol, aceton.

Długość efektywna kapilary mierzona jest od punktu wprowadzania próbki do punktu detekcji. Przy detekcji na kapilarze długość efektywna jest od 5 do 10 cm krótsza od długości całkowitej. W detekcji poza-kapilarą (np.: spektroskopia mas) obie długości są sobie równe. Znajomość obu długości jest ważna, ponieważ czas migracji i ruchliwość są określone przez długość efektywną, podczas gdy pole elektryczne przez długość całkowitą.

Rozproszenie (dyspersja) i sprawność

Dyspersja polega na rozproszeniu strefy roztworu, powstaje w wyniku różnicy w prędkości migracji roztworu w obrębie strefy. Może być określona szerokością piku (w_b), dla piku o rozkładzie Gauss'a:

$$w_b = 4\sigma$$

σ - odchylenie standardowe piku (w czasie, długości lub objętości)

Dyfuzja powoduje zmniejszenia sprawności kapilary czyli zmniejszenie ilości pólk teoretycznych. Sprawność określona liczbą pólk teoretycznych (N) opisuje wzór:

$$N = \frac{\mu_e V l}{2DL} = \frac{\mu_e E l}{2D}$$

D - współczynnik dyfuzji (zależy od niego poszerzenie pasma)

Liczbę pólk teoretycznych można obliczyć z elektroferogramu, przy użyciu następującego wzoru:

$$N = 5,54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2$$

t - czas migracji

$w_{1/2}$ - szerokość piku w połowie wysokości

Rozdzielczość

Rozdzielanie składników badanego roztworu jest podstawowym celem w dziedzinie nauk separacyjnych. Rozdzielczość jest definiowana wzorem:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{(t_2 - t_1)}{4\sigma}$$

t - czas migracji

w - szerokość piku (pasma) u podstawy

Rozdzielczość dla dwóch sąsiadujących składników może być także wyrażona wzorem z uwzględnieniem sprawności:

$$R = \left(\frac{1}{4} \right) N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \right)$$

gdzie:

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$$

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_2 + \mu_1}{2}$$

TECHNIKI SEPARACJI HPCE

Uniwersalność HPCE po części związana jest z możliwością stosowania różnych technik rozdzielania, do których zaliczamy:

- **elektroforezę strefową** (CZE z ang. *capillary zone electrophoresis*) - jest najczęściej stosowaną techniką HPCE, umożliwia ona rozdzielanie naładowanych cząstek, na podstawie różnicy w ich ruchliwościach w wolnym roztworze. Poszczególne składniki mieszaniny ustawiają się w oddzielnych strefach.
- **elektroforezę żelową** (CGE z ang. *capillary gel electrophoresis*) - stosowana jest do rozdzielania makrocząsteczek biologicznych, rozdzielanie mieszaniny dokonuje się na podstawie różnicy w ich wielkościach, na odpowiednim polimerze, pełniącym rolę sita molekularnego.
- **izoelektroogniskowanie** (CIEF z ang. *capillary isoelectric focusing*) - wykorzystywana jest do rozdzielania białek i peptydów na podstawie ich punktu izoelektrycznego. Gradient pH w kapilarze powstaje dzięki wprowadzeniu do buforu amfolitów (substancji obojnakich posiadających w swojej cząsteczce zarówno ugrupowania o charakterze zasadowym jak i kwasowym).
- **izotachoforezę** (CITP z ang. *capillary isotachopheresis*) - próbkę umieszcza się między dwoma buforami: wiodącym i zakańczającym. Bufory dobiera się tak, aby ich efektywne ruchliwości obejmowały efektywne ruchliwości jonów w próbce. Po przyłożeniu pola elektrycznego następuje przepływ buforu w kapilarze i dochodzi do uszeregowania jonów zgodnie z ich ruchliwościami w przylegające do siebie strefy, które migrują ze stałą szybkością.
- **kapilarną elektrochromatografię** (CEC z ang. *capillary electrochromatography*) - łączy cechy chromatografii z elektroforezą. Kapilara, podobnie jak w chromatografii, wypełniona jest fazą stałą, ale w odróżnieniu od chromatografii, gdzie ruch fazy ruchomej jest wymuszony ciśnieniem przyłożonym z zewnątrz, w elektrochromatografii migracja następuje w wyniku przepływu elektroosmotycznego.
- **micelną elektrokinetyczną chromatografię** (MEKC z ang. *micellar electrokinetic chromatography*) - umożliwia rozdzielanie cząstek obojętnych, dzięki wprowadzeniu do roztworu buforowego związku powierzchniowo czynnego, po przekroczeniu tzw. krytycznego stężenia micelnego monomery surfaktanta tworzą micelle. Rozdzielanie składników mieszaniny dokonuje się na podstawie różnicy w stopniu ich powinowactwa do miceli.