

CE1. Elektroforeza kapilarna – dobór warunków rozdzielania

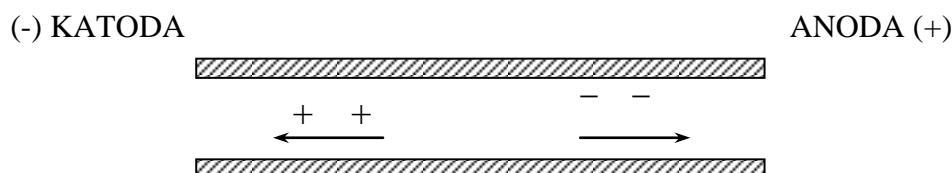
CE2. Elektroforeza kapilarna – oznaczanie homocysteiny w próbkach wodnych

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

1. 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 migrują do anody; kationy do katody.



Migracja jonów w polu elektrycznym

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 prędkością 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 (CE) jako techniki analitycznej.

W następnych latach techniki rozdzielania CE 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.

2. 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 prędkości migracji cząsteczek w polu elektrycznym. Prędkość 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. pozorną** – 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 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 elektroosmotycznego (EOF), używając neutralnego wskaźnika, który porusza się z prędkością równą wielkości EOF. Do takich neutralnych wskaźników należą min. metanol i aceton.

Długość efektywna kapilary mierzona jest od punktu wprowadzania próbki do punktu detekcji. Przy detekcji w kapilarze długość efektywna jest od 5 do 10 cm krótsza od długości całkowitej. W detekcji poza kapilarą (np. spektrometria 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 elektroforegramu, przy użyciu następującego wzoru:

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

t - czas migracji

$w_{1/2}$ - szerokość pików 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 pików (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:

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

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

3. Techniki separacji CE

Uniwersalność CE po części związana jest z możliwością stosowania do rozdzielania składników próbki różnych jej odmian:

- **elektroforeza strefowa** (CZE z ang. *capillary zone electrophoresis*) - jest najczęściej stosowaną techniką CE, umożliwia ona rozdzielanie naładowanych cząstek, na podstawie różnicy w ich ruchliwościach w wolnym roztworze. Poszczególne składniki mieszaniny ustawiają się w oddzielnych strefach.
- **elektroforeza żelowa** (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).
- **izotachoforeza** (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 prędkością.
- **kapilarna elektrochromatografia** (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.
- **micelarna elektrokinetyczna chromatografia** (MEKC z ang. *micellar electrokinetic chromatography*) - przedstawicielka szerokiej grupy technik nazwanych elektrokinetyczną chromatografią (EKC), umożliwia rozdzielanie cząstek obojętnych, dzięki wprowadzeniu do roztworu buforowego związku powierzchniowo czynnego, po przekroczeniu tzw. krytycznego stężenia micelarnego monomery surfaktanta tworzą micelle. Rozdzielenia składników mieszaniny dokonuje się na podstawie różnicy w stopniu ich powinowactwa do miceli.

4. Odczynniki i aparatura CE1 i CE2

- aparat do elektroforezy HP^{3D}CE z detektorem DAD,
- pipety automatyczne,
- kolby miarowe o pojemności 5 i 10 ml,
- bufor boranowy (różne stężenia i wartości pH),
- bufor fosforanowy o pH 7,9,
- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT) o stężeniu 10 μmol/ml,
- homocysteina (Hcy) o stężeniu 10 μmol/ml,
- 3 M kwas chlorowy (VII) (PCA),
- woda dejonizowana.

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
 - Kwas chlorowy (VII) - Kontakt z materiałami zapalnymi może spowodować pożar. Powoduje poważne oparzenia. Ogrzanie grozi wybuchem.
 - R 5 Ogrzanie grozi wybuchem; R 8 Kontakt z materiałami zapalnymi może spowodować pożar; R35 Powoduje poważne oparzenia.
 - S23 Nie wdychać gazu/dymu/pary/rozpylonej cieczy; S26 Zanieczyszczone oczy przemyć natychmiast dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza; S36 Nosić odpowiednią odzież ochronną; S45 W przypadku awarii lub jeżeli źle się poczujesz, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza - jeżeli to możliwe, pokaż etykietę.
- ✓ Pierwsza pomoc:
 - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
 - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
 - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
 - W przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wypluć usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

5. Wykonanie ćwiczenia CE1

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie: czasów migracji, wysokości, powierzchni i szerokości pików, maksymalnego napięcia podczas analizy oraz obliczenie liczby pólk teoretycznych w różnych warunkach prowadzenia analizy.

6. Opracowanie wyników CE1

- a) Wstęp teoretyczny.
- b) Z wykresu zależności natężenia prądu od napięcia wyznaczyć maksymalne możliwe do zastosowania napięcie podczas analizy.
- b) Z uzyskanych elektroforegramów wyznaczyć: czasy migracji, szerokości pików w połowie wysokości, wysokości i powierzchnie pików oraz obliczyć liczbę pólk teoretycznych.
- c) Wnioski – wybór najlepszych warunków rozdzielania analizowanych związków, uzasadnienie.

7. Wykonanie ćwiczenia CE2

Celem ćwiczenia jest ilościowe oznaczenie homocysteiny w próbkach wodnych po jej wcześniejszym przekształceniu w reakcji derywatyzacji w pochodną absorbującą promieniowanie z zakresu UV.

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej:

1. W kolbach miarowych o pojemności 5 ml przygotować 3 serie roztworów standardowych tak aby końcowe stężenie Hcy wynosiło odpowiednio 10, 20, 30, 50, 100 nmol/ml.
2. W tym celu do kolb miarowych wprowadzić po 1000 μ l 0.2 M buforu fosforanowego o pH 8, odpowiednią objętość roztworu Hcy i taką objętość odczynnika CMQT aby stosunek molowy tiol : odczynnik wynosił 1:3. Roztwory dobrze wymieszać.
3. Po 5 minutach do kolb miarowych wprowadzić po 100 μ l 3M PCA, a następnie dopełnić wodą do kreski.
4. W sposób analogiczny przygotować próbkę X o nieznanym stężeniu Hcy.
5. Wykonać analizy elektroforetyczne poszczególnych roztworów.
6. Z otrzymanych elektroferogramów odczytać wysokości i powierzchnie sygnałów analitycznych (pików).

8. Opracowanie wyników CE2

- a) Metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji R^2 .
- b) Wyliczyć względne odchylenie standardowe oraz odzysk dla poszczególnych stężeń.
- c) Oznaczyć zawartość tiolu w próbce X.
- d) Skomentować uzyskane wyniki.

Literatura

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. Witkiewicz Z., „Podstawy chromatografii”, WNT, Warszawa, 2005.
3. Li S.F.Y., “Capillary electrophoresis”, Journal of Chromatography Library, vol. 52, Elsevier, 1993.
4. Biuletyn techniczny firmy Hewlett Packard, publikacja nr 12-5965-5984E, 1997.