

# KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA: SIMULACE A EXPERIMENT

## ZADÁNÍ ÚLOHY

Navrhňte vhodný separační systém pro sadu analytů pomocí programu PeakMaster 5.1. Metodou kapilární zónové elektroforézy stanovte disociační konstantu *p*-nitrofenolu.

## TEORETICKÝ ÚVOD

### Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE – capillary zone electrophoresis) patří mezi elektromigrační separační analytické metody, jejichž separační princip je založen na rozdílné migrační rychlosti elektricky nabitých částic v elektrickém poli.

Klíčovým pojmem všech těchto metod je pohyblivost  $\mu_i$  iontu *i*, definovaná jako migrační rychlost tohoto iontu  $v_i$  v elektrickém poli o jednotkové intenzitě

$$\mu_i = \frac{v_i}{E}, \quad (1)$$

kde *E* je intenzita elektrického pole. Pro intenzitu elektrického pole lze odvodit vztah

$$E = \frac{U}{l_C}, \quad (2)$$

ve kterém *U* je vložené napětí a  $l_C$  délka kapiláry. Pohyblivost iontů se zvyšuje s hodnotou náboje daného iontu a klesá s jeho rostoucím hydrodynamickým poloměrem a viskozitou prostředí. Díky především coulombickým interakcím iontů je též funkcí iontové síly. Maximální tzv. limitní hodnoty  $\mu_\infty$  nabývá v nekonečně zředěném roztoku. Pohyblivost při konečné iontové síle se pak nazývá aktuální  $\mu_{i^-}, \mu_{i^+}$ . Pro látky tvořené více formami, mezi nimiž dochází k rychlému ustavení rovnováhy (např. slabé elektrolyty, kineticky labilní komplexy) byla zavedena tzv. efektivní pohyblivost  $\mu_{ef}$ , která vystihuje pohyblivost dané látky jako celku a je definována vztahem

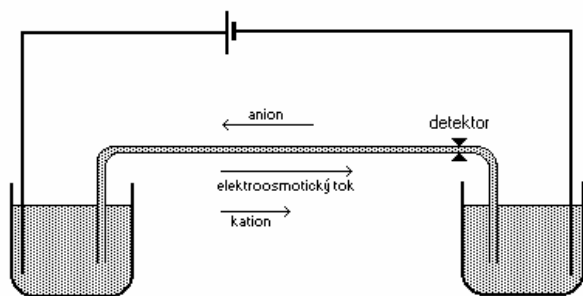
$$\mu_{ef} = \sum_{i=1}^m \frac{c_i \mu_i \operatorname{sgn} z_i}{c}, \quad (3)$$

kde  $c_i$ ,  $z_i$  a  $\mu_i$  označují koncentraci, relativní náboj a aktuální pohyblivost *i*-té iontové formy dané látky, jejíž celková látková (analytická) koncentrace je *c*. Pro slabé jednosytné kyseliny či zásady nabývá výraz pro efektivní pohyblivost jednoduchého tvaru

$$\mu_{ef} = \mu_{A^-} \alpha, \quad (4)$$

ve kterém  $\alpha$  je stupeň disociace. Efektivní pohyblivost slabých elektrolytů lze tedy snadno ovlivňovat prostřednictvím pH roztoku.

Uspořádání experimentu je schematicky znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1. Schéma CZE aparatury

Separace probíhá v křemenné kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do roztoku v elektrodových nádobkách. Celý tento systém je naplněn tzv. základním elektrolytem (BGE – background electrolyte), což je vhodně zvolený pufr. Na elektrody se vkládá napětí z vysokonapěťového stejnosměrného zdroje. Detektor (zpravidla UV fotometr) je umístěn před tzv. výstupním koncem kapiláry, vzorek je dávkován opačným, tedy vstupním koncem kapiláry.

Po nadávkování vzorku a vložení elektrického pole na daný systém dochází v kapiláře ke dvěma základním transportním jevům. Jedním je již zmíněná migrace iontů (ionty putují k opačně nabitě elektrodě), přičemž na základě rozdílné rychlosti migrace se ionty separují. Druhým jevem je elektroosmóza způsobující tok celého roztoku, tzv. elektroosmotický tok (EOF – electroosmotic flow). Křemenné kapiláry obsahují povrchové silanolové skupiny  $-\text{SiOH}$ , které mohou být v roztoku disociovány na  $-\text{SiO}^-$  v závislosti na pH prostředí. Na rozhraní stěna kapiláry-roztok se pak vytváří elektrická dvojvrstva, kdy negativně nabitý povrch kapiláry (nepohyblivý) je v roztoku kompenzován volně pohyblivými kationty. V roztoku tedy převládají kladně nabitě ionty a roztok jako celek je v elektrickém poli unášen směrem ke katodě. Rychlost elektroosmotického toku závisí na pH a iontové síle roztoku. Se zvyšujícím se pH a klesající iontovou silou se rychlost elektroosmotického toku zvyšuje.

Jestliže katoda je u výstupního konce kapiláry (uspořádání používané u této úlohy - viz Obr. 1.), lze v jednom experimentu analyzovat jak kationty, tak anionty. K detektoru nejprve doputují kationty s nejvyšší elektroforetickou pohyblivostí, následovány jsou kationty s nižší pohyblivostí. Všechny neutrální částice jsou unášeny k detektoru pouze elektroosmotickým tokem. Nelze je tedy separovat, ale využívá se jich jako tzv. značkovačů (markerů) k určení rychlosti EOF. Nakonec jsou k detektoru dopraveny též anionty, přičemž jako poslední budou detekovány ty, jejichž elektroforetická pohyblivost je nejvyšší.

### Stanovení disociační konstanty metodou CZE

Disociační konstanta slabé jednosytné kyseliny HA je dána vztahem

$$K_A = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}}, \quad (5)$$

ve kterém  $a$  značí aktivity. S využitím aproximace, že aktivitní koeficient neutrálních částic je jedna, můžeme tento vztah upravit na tvar

$$K_A = a_{\text{H}_3\text{O}^+} \frac{\alpha}{1-\alpha} \gamma_- \quad \text{resp.} \quad \text{p}K_A = \text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} - \log \gamma_-, \quad (6)$$

ve kterém  $\alpha$  představuje stupeň disociace,  $\gamma_-$  je aktivitní koeficient aniontu  $\text{A}^-$  a  $c$  analytickou koncentrací slabé kyseliny. Zavedením smíšené rovnovážné konstanty  $K^*$  vztahem  $K^* = K/\gamma_-$ , zápis rovnice zjednodušíme

$$\text{p}K_A^* = \text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}. \quad (7)$$

Dosadíme-li stupeň disociace ze vztahu (4), získáme následující rovnici

$$pK_A^* = \text{pH} - \log \frac{\mu_{ef}}{\mu_{A^-} - \mu_{ef}}. \quad (8)$$

Rovnici (8) lze přepsat ve funkční závislost efektivní pohyblivosti na pH

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{A^-}}{1 + 10^{pK_A^* - \text{pH}}}. \quad (9)$$

Ke stanovení  $pK_A$  dané slabé kyseliny je tedy třeba proměřit závislost efektivní pohyblivosti na pH základního elektrolytu. Rovnici (9) lze za předpokladu konstantní iontové síly základního elektrolytu použít k regresi těchto experimentálních dat. Z parametrů regresní křivky získáme smíšenou disociační konstantu  $K_A^*$  resp.  $pK_A^*$  a aktuální iontovou pohyblivost aniontu kyseliny při dané iontové síle. Smíšenou disociační konstantu pak přepočítáme na pravou termodynamickou podle vztahu známého ze základního praktika.

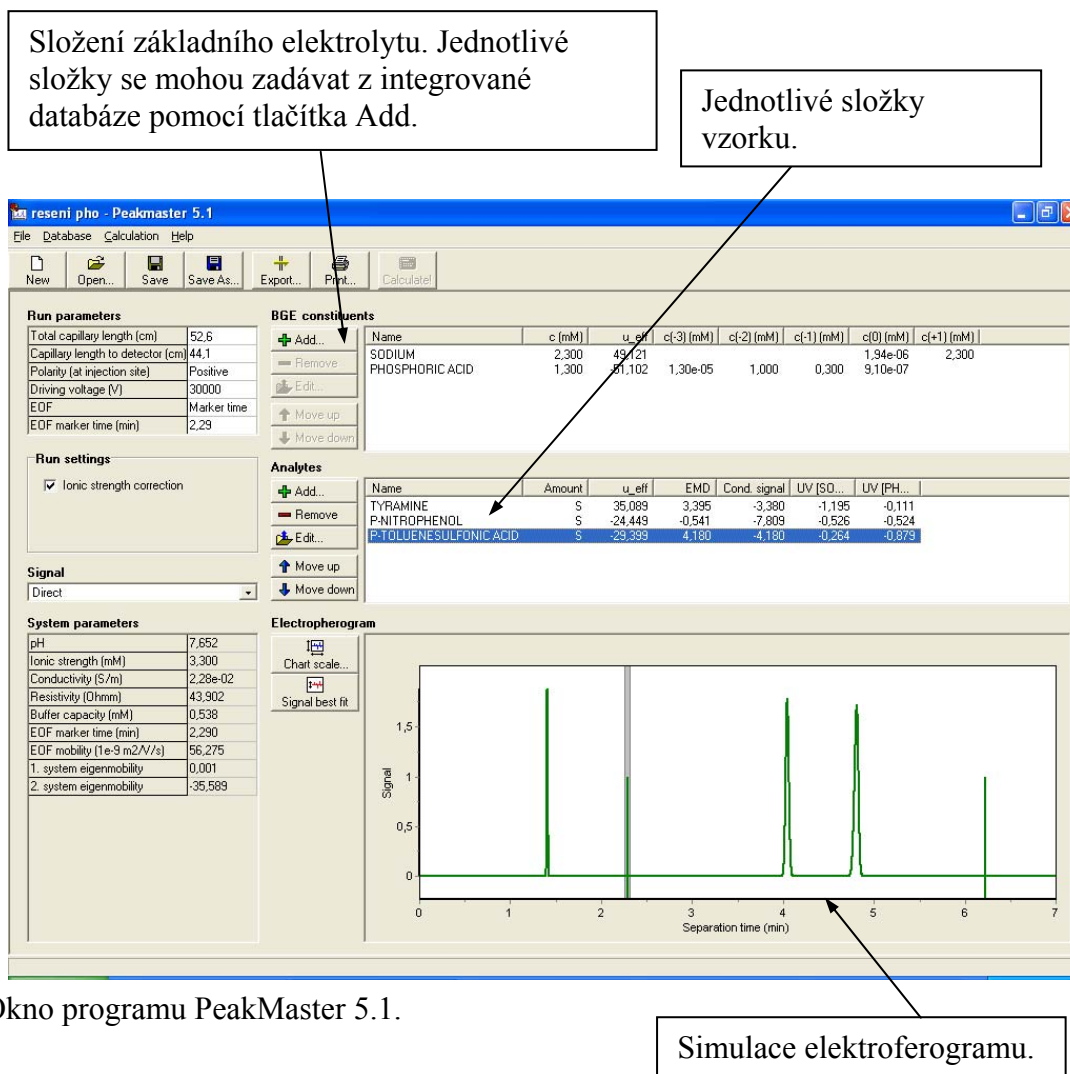
### **Optimalizace separace**

Proces optimalizace spočívá v nalezení separačního systému, ve kterém jednotlivé složky vykazují dobré rozlišení, dostatečný signál detektoru a separaci v co nejkratším čase. Rozlišení je určováno především rozdíly v aktuálních pohyblivostech separovaných látek, je však významně snižováno elektromigrační disperzí. Ta je důsledkem nelineární povahy kapilární elektroforézy a způsobuje rozšiřování píků (trojúhelníkovitý tvar píků). Tendence analyzované složky k elektromigrační disperzi je komplexní jev, který závisí na pohyblivostech, disociačních konstantách a nábojových číslech daného analytu a složek základního elektrolytu a na složení základního elektrolytu. Mezi další požadované charakteristiky separace patří dostatečný signál detektoru. Optimalizace separace často probíhá metodou pokus-omyl. Jelikož experimentální vyhledávání vhodných separačních podmínek je časově i materiálně velmi náročné, nabízí se velký prostor pro počítačové simulace.

### **Matematický a počítačový model PeakMaster 5.1**

Program PeakMaster 5.1 představuje užitečný nástroj k vyhledávání optimálních podmínek pro separaci. Program umožňuje předpovědět důležité parametry separačního systému a simuluje výsledek separace. Program dále počítá pohyblivosti systémových píků; v případě, že se jejich pohyblivost blíží pohyblivosti některého z analytů, dochází k tzv. rezonanci, která značně ztěžuje, ne-li znemožňuje analýzu daného analytu. Výsledek simulace může uživatel vizuálně vyhodnotit a rozhodnout se, je-li daný systém vhodný. Je tedy možné virtuálně měnit složení základního elektrolytu tak, abychom separaci, ale i detekci optimalizovali.

Okno programu PeakMaster 5.1 je znázorněno na Obr. 2. Do programu je třeba zadat složení základního elektrolytu, vzorku a experimentální parametry. Po stisku tlačítka „Calculate“ získáme charakteristiky základního elektrolytu (především pH, iontovou sílu a pufrální kapacitu), charakteristiky analytů (hodnoty efektivních mobilit, elektromigračních disperzí a veličiny úměrné odezvám UV a vodivostní detekce) a simulaci elektroferogramu.



Obr. 2. Okno programu PeakMaster 5.1.

### Základní informace o aparatuře Agilent CE

Klíčové součásti každé aparatury pro CZE jsou zřejmé z Obr. 1. *Agilent CE* obsahuje spektrofotometrický UV-VIS detektor (190-600 nm) s diodovým polem (DAD- diode array detector). Kapilára je umístěna v kazetě umožňující její temperování v širokém rozsahu teplot. Jako elektrodové nádoby a nádoby na vzorky či média k proplachování kapiláry se využívají polyetylenové nebo skleněné vialky o obsahu cca 1 ml. Vialky se vkládají do karuselu s očíslovanými pozicemi. Dále aparatura obsahuje kompresor vzduchu k proplachování kapiláry a tzv. hydrodynamickému dávkování vzorku (na hladinu kapaliny ve vstupní vialce se aplikuje nastavitelný tlak vzduchu).

Nedílnou součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem *Agilent Capillary Electrophoresis (on line)* pro řízení aparatury, sběr a vyhodnocení dat. Experiment provádí aparatura automaticky podle sledu příkazů zadaných v tzv. metodě. Pro tuto úlohu byla vytvořena metoda *Praktik*. Hlavní informace, které metoda musí zahrnovat, jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Parametry metody

Obecný popis	Hodnoty zvolené v metodě <i>Praktik</i>
Pozice vialek v karuselu obsahující BGE	8, 9
Teplota kazety s kapilárou	25°C
Vkládané napětí - polarita	+ odpovídá Obr. 1.

- hodnota	30 kV
Dávkování vzorku - způsob	hydrodynamický
- tlak resp. $\Delta p$	7 mbar
- čas, po který je tlak aplikován	7 s
Vlnové délky, při kterých má být zaznamenán elektroferogram	214 nm, 320 nm, 400 nm
Proplachování kapiláry před experimentem	
- pozice vialek „z“ → „do“	1. krok 9 → 6    2. krok 8 → 9
- čas, po který je aplikován tlak 940 mbar	1. krok 2 min    2. krok 1 min
Čas, za který má být experiment ukončen	12 min

Dalšími nezbytnými údaji, které však nejsou součástí metody, jsou údaje o konkrétním experimentu. Musí být zadaná pozice vialky v karuselu, kde se nachází vzorek, a jméno souboru, do kterého budou uložena data z daného experimentu. Dále je vhodné zadat název vzorku a jméno operátora.

Příkazy k proplachování kapiláry, aplikaci napětí, dávkování vzorku apod. lze zadávat i jednotlivě. Slouží např. k promývání kapiláry po skončení všech experimentů.

Zadávání parametrů metody a údajů o experimentu, spouštění experimentů a provádění samostatných příkazů je přístupné z okna obrazovky *Method and Run Control*, které je znázorněno na Obr. 3. K prohlížení a dalšímu zpracování naměřených elektroferogramů slouží okno obrazovky *Data Analysis*. Ukázka tohoto okna je na Obr. 4.

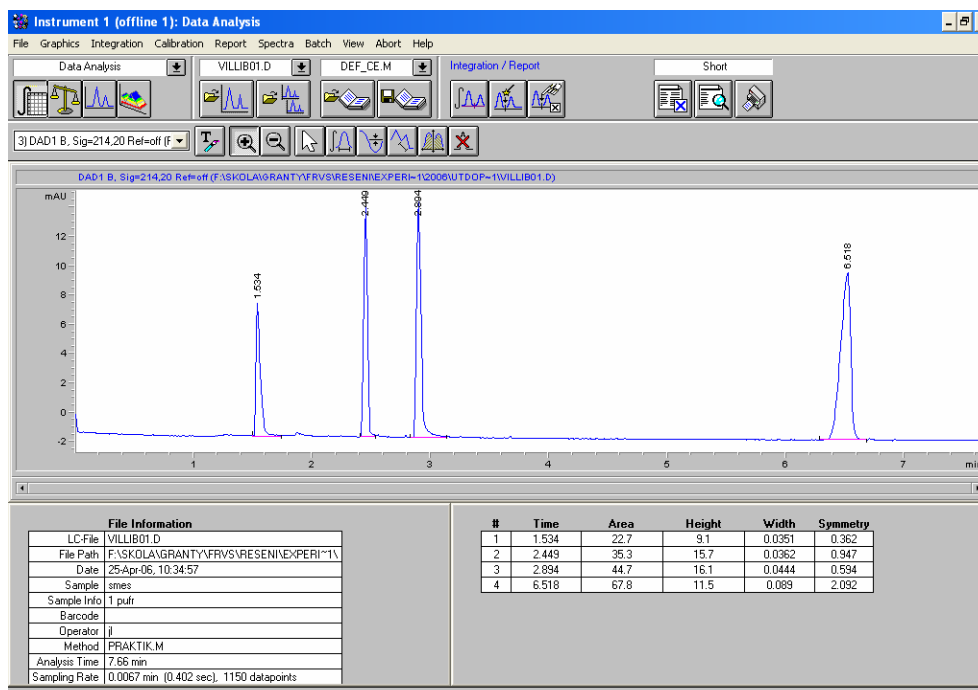
Volba okna

Údaje o experimentu –  
zadávají se do tabulky, která se  
otevře po “kliknutí” na symbol

Schéma

“ On line “ okna zobrazují aktuálně signál detektoru, tzn. že zobrazují signál i během jednotlivě zadávaných příkazů – viz text.

Obr. 3. Okno *Method and Run Control* programu *Agilent Capillary Electrophoresis (on line)*.



Obr. 4. Okno *Data Analysis* programu *Agilent Capillary Electrophoresis (on line)*.

### Určení pohyblivosti z experimentálních dat

Výstupem experimentu je elektroferogram, což je časový záznam signálu detektoru. Z elektroferogramu tedy získáme informaci o čase  $t_i$ , za který doputuje  $i$ -tá složka od vstupního konce kapiláry k detektoru, tedy urazí dráhu  $l_D$ . Celkovou rychlost pohybu  $i$ -té složky  $v_i$  tedy určíme jako

$$v_i = \frac{l_D}{t_i}. \quad (10)$$

Celková rychlost složky nesoucí kladný náboj  $v_{i,+}$  je dána součtem velikostí rychlosti migrace této složky  $v_{i,+,\text{mig}}$  a rychlosti EOF  $v_{\text{EOF}}$ , tedy

$$v_{i,+} = v_{i,+,\text{mig}} + v_{\text{EOF}}. \quad (11)$$

Pro celkovou rychlost složky nesoucí záporný náboj pak platí analogicky

$$v_{i,-} = v_{\text{EOF}} - v_{i,-,\text{mig}}. \quad (12)$$

Rychlost EOF určíme z času  $t_{\text{EOF}}$ , za který doputuje k detektoru marker. Aktuální pohyblivosti  $\mu_{i,+}$  a  $\mu_{i,-}$  (respektive  $\mu_{\text{ef},+}$  a  $\mu_{\text{ef},-}$  u slabých elektrolytů) vypočítáme ze vztahů

$$\mu_{i,+} = \frac{v_{i,+,\text{mig}}}{E} = \frac{l_D l_C}{U} \left( \frac{1}{t_{i,+}} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (13)$$

a

$$\mu_{i,-} = \frac{v_{i,-,\text{mig}}}{E} = \frac{l_D l_C}{U} \left( \frac{1}{t_{\text{EOF}}} - \frac{1}{t_{i,-}} \right). \quad (14)$$

## POSTUP PRÁCE

- Navrhnete vhodný separační systém pro sadu analytů pomocí programu PeakMaster 5.1.

K demonstraci základních jevů uplatňujících se v CZE bude vámi analyzovaný vzorek obsahovat kromě *p*-nitrofenolu a thiomocoviny jako značkovače EOF, dále ještě tyramin (4-(2-aminoethyl)fenol), který se v dané oblasti pH chová jako silná zásada, a *p*-toluensulfonovou kyselinu, která patří mezi silné kyseliny. Tyramin není obsažen v integrované databázi, přidejte jeho charakteristiky pomocí tlačítka Add (limitní iontová mobilita  $u(+1)$ ) je rovna 38 v jednotkách  $10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ ,  $pK_A(+1)$  činí 9,5.

Z integrované databáze se pokuste vybrat takové složky základního elektrolytu, které budou tvořit pufr vhodný pro pH v oblasti  $pK_A(pNF) \pm 0,5$ . V této oblasti pH se bude efektivní pohyblivost *p*-nitrofenolu výrazně měnit s pH. Koncentrace jednotlivých složek je třeba zvolit tak, aby pH bylo v požadované oblasti a iontová síla byla nízká, přibližně 3mM. Na základě vypočtených parametrů a simulovaného elektroferogramu rozhodněte, zda vybraný základní elektrolyt vyhovuje požadavkům optimalizovaného systému.

- Příprava základních elektrolytů

Ze zásobních roztoků 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  připravte do 25 ml odměrných baněk pět pufrů podle Tabulky 2. Odměrné baňky doplňte deionizovanou vodou. Změřte pH těchto pufrů a naměřené hodnoty porovnejte s hodnotami vypočtenými, které jsou uvedeny v Tabulce 2. Nevyhovující pufrы připravte znovu.

Z každého pufru odpipetujte vždy 600  $\mu\text{l}$  do dvou vialek.

Tabulka 2.

Spotřeby zásobních roztoků jednotlivých složek potřebných k přípravě 25 ml fosfátového pufru o daném pH a iontové síle *I*.

Pufr č.	V[ml]		pH	I[mmol.dm <sup>-3</sup> ]
	0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$		
1	4,00	1,30	6,64	3,16
2	2,80	1,65	6,90	3,10
3	1,90	2,00	7,15	3,16
4	1,20	2,25	7,40	3,18
5	0,75	2,50	7,65	3,30

- Příprava vzorku

K dispozici máte zásobní roztoky 0,005 M tyraminu, 0,0025 M thiomocoviny, 0,0025 M *p*-nitrofenolu a 0,0025 M kyseliny *p*-toluensulfonové. Do 4 ml lahvičky připravte vzorek smíšením těchto komponent v objemových poměrech 1:2:2:1 podle uvedeného pořadí. 300  $\mu\text{l}$  této směsi odpipetujte do vialky.

- Příprava aparatury k měření

K promývání kapiláry naplňte tři vialky deionizovanou vodou a dále si připravte dvě prázdné vialky. Jednu použijete na „propláchnutí“ kapiláry vzduchem, druhou jako odpadní při promývání kapiláry. Vialky umístěte do karuselu přístroje podle tabulky *Vial Table*, kterou naleznete v nabídce *Instrument* v okně *Method and Run Control*. Jako první základní elektrolyt použijte pufr č.1. Kapiláru propláchněte vodou - z každé vialky vždy po dobu 2 minut.

- Vlastní měření  
Proměřte elektroferogramy vzorku v připravených pufrech. Nezapomeňte zadat parametry pro jednotlivé experimenty (viz Obr. 3).
- Ukončení experimentální práce  
Kapiláru propláchněte vodou - z každé vialky vždy po dobu 2 minut. Vyprázdňte odpadní vialku. Vodu ve vialkách vyměňte a proplachování zopakujte. Nakonec vysušte kapiláru proudem vzduchu – 1 minutu „proplachujte“ z prázdné vialky. Použité nádoby pečlivě vymyjte deionizovanou vodou.

### Vyhodnocení experimentů

- Záznamy z experimentů vytiskněte ve formě *Report*. Jednotlivé píky na elektroferogramech přiřaďte příslušným látkám ze vzorku a přiřazení zdůvodněte. K identifikaci zóny *p*-nitrofenolu využijte znalostí ze základního praktika.
- Vypočítejte pohyblivost elektroosmotického toku (rychlost EOF vztažená na jednotkovou intenzitu elektrického pole) a aktuální resp. efektivní pohyblivosti separovaných látek.
- Závislost efektivní mobility na pH proložte vlastní regresní funkcí dle rovnice (9). Pro počáteční odhady parametrů použijte hodnoty  $pK_A^* = 7$ ,  $\mu_{A^-} = 3 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ . Stanovte pravou termodynamickou disociační konstantu *p*-nitrofenolu.
- Určete dávkovaná látková množství sloučenin ve vzorku. Dále vypočítejte, kolikrát se vymění objem kapiláry při proplachování po dobu jedné minuty.

Parametry použité kapiláry nezbytné k výpočtům jsou uvedeny na kazetě.