

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Srovnání kapilární elektroforézy a elektroforézy na čipu pro analýzu biologicky aktivních látek

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Jan Kubeš

Bioorganická chemie

RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Jan Kubeš

Poděkování

Poděkování v první řadě patří mému vedoucímu práce nejen za odborné vedení při práci v laboratoři a vypracování této práce, ale i za cenné rady a Hlavně pak za pevné nervy k tomu potřebné. Další poděkování pak patří všem, díky kterým jsem měl možnost na této práci dělat.

Abstrakt

V této práci jsem se zabýval porovnáním metody kapilární elektroforézy a elektroforézy na čipu a jejich možnou aplikaci na biologicky aktivní látky. K porovnání těchto metod jsme použili skupinu fenolových kyselin, které v organismu hrají roli antioxidantů. Dále jsme volili směs sodných a draselných iontů jejichž separace je již dlouho popsána a tak budou sloužit, jako dobrá srovnávací metoda. Navíc sodné a draselné ionty jsou součástí mnoha biochemických pochodů v organismu. Separace sodných a draselných iontů byla provedena metodou zónově kapilární elektroforézy a elektroforézou na čipu. Detekce byla provedena pomocí vodivostního detektoru. U separace fenolových kyselin jsme použili metodu zónové kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí a elektrokinetickou micelární chromatografií s použitím SDS a detekcí UV detektorem. Avšak ani jednu z metod se nám nepovedlo zopakovat na elektroforéze na čipu.

Abstact

In this work, I dealt with comparing the methods of a capillary electrophoresis and electrophoresis on a chip and their possible application to biologically active substances. To compare these methods, we used a group of phenolic acids, which play a role in the body. In addition, we chose a mixture of sodium and potassium ions. Their separation has long been described and serve as a good comparative method. In addition, sodium and potassium ions are involved in many biochemical processes in the body. Separation of sodium and potassium ions was performed by capillary zone electrophoresis and electrophoresis on a chip. Detection was performed by conductivity detector. The separation of phenolic acids, we used the method of capillary zone electrophoresis with conductivity detection and micellar electrokinetic chromatography and UV detection. But even one of the methods we can't repeat the on a chip electrophoresis.

OBSAH:

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Historický vývoj elektroforézy.....	8
2.2 Kapilární elektroforéza.....	9
2.3 Mobilita iontů v kapilární elektroforéze.....	10
2.4 Elektroosmotický tok.....	11
2.5 Instrumentace.....	12
2.5.1 Kapilára.....	13
2.5.2 Detektory.....	13
2.5.2.1 Vodivostní detektory.....	14
2.5.2.1 UV-VIS detektory.....	15
2.6 Separační módy v kapilární elektroforéze.....	16
2.6.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	17
2.6.2 Micelární elektrokinetická chromatografie.....	17
2.7 Elektroforéza na čipu.....	18
2.7.1 Čipy v elektroforéze.....	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1 Chemikálie.....	20
3.2 Příprava pufrů.....	20
3.3 Použité přístroje.....	20
3.3.1 Kapilární elektroforéza.....	20
3.3.2 Čip.....	21
4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	22
4.1 Cíl.....	22
4.2 Fenolové kyseliny.....	22
4.3 Sodné ionty.....	23
4.4 Draselné ionty.....	24
4.5 Analýza pomocí kapilární elektroforézy.....	24
4.5.1 Sodné a draselné ionty.....	24
4.5.2 Fenolové kyseliny.....	25
4.6 Analýza pomocí elektroforézy na čipu.....	28
5 ZÁVĚR.....	30
6 LITERATURA.....	31

1 Úvod

Pojmem elektroforéza se rozumí souhrn metod využívajících k rozdělení analytu migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli. K separaci dochází na základě rozdílných mobilit molekul analytu, které jsou závislé, jak na velikosti náboje na molekule přítomném, tak na samotné velikosti molekuly. Jednotlivé metody provedení elektroforézy se od sebe mohou lišit. Elektroforézu můžeme provádět v plošném nebo kapilárním provedení, dále pak u moderních metod elektroforézy se provádí na tzv. čípech. Elektroforézu pak můžeme rozdělit na:

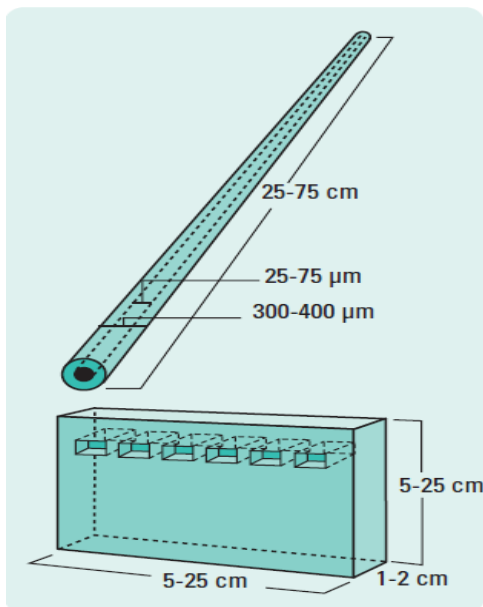
- plošnou
- kapilární
- elektroforézu na čipu.

Ve své práci se budu zabývat kapilární elektroforézou a elektroforézou na čipu a jejich možnou aplikací pro separaci biologicky aktivních látek. Kapilární elektroforéza a elektroforéza na čipu nabízí pro tento druh analýzy obrovský potenciál. Jedná se zejména o spotřebu minimálního objemu vzorku pro analýzu, řádově od piko- po nano- litry. Dále pak možnost aplikovat vysoká napětí a široký rozsah pH, což je u mnoha dnes používaných metod omezujícím faktorem, které nám umožní rychlou analýzu s potřebnými výsledky¹.

2 Teoretická část

2.1 Historický vývoj elektroforézy

Elektroforéza je definována, jako rozdílný pohyb elektricky nabitých molekul (iontů) v elektrickém poli². K separaci dochází na základě rozdílných mobilit, které jsou ovlivněny velikostí molekuly a nábojem přítomným na dané molekule a již ve 20. století byla snaha o využití této migrace iontů v elektrickém poli. První aparaturu elektroforézy představil roku 1973 A. Tiselius³, nositel Nobelovy ceny, který popsal metodu "pohyblivého rozhraní" (moving boundary), která je dnes známá jako zónová elektroforéza. Tiseliova metoda byla velmi jednoduchá a zahrnovala skleněnou zkumavku naplněnou tlumivým roztokem a směsí proteinů zapojenou do elektrického pole. Jejich směr a rychlost migrace byly určeny nábojem a velikostí daného proteinu. Ovšem využití elektroforézy, jaké představil Tiselius, bylo dosti omezené tepelnou difuzí a prouděním. Pro odstranění těchto omezujících faktorů a dosažení lepších výsledků byl kapalný elektrolyt nahrazen nejprve papírem a následně gelem. Gel se používá i dnes v plošném (deskovém) uspořádání nebo i v kapilárním. Obě uspořádání jsou ukázány na obr. 1.



Obr. 1: Plošné a kapilární uspořádání elektroforézy (převzato z cit. 7)

Hlavním faktorem řídícím separaci při elektroforéze v gelu je velikost molekuly. Největší uplatnění našla tato metoda v biochemii a i dnes patří mezi jednu z nejoblíbenějších metod při separaci nukleových kyselin a proteinů. Nevýhodou je poměrně dlouhý čas analýzy, obtíž s

detekcí a automatizací. Další možností, jak se vyhnout nežádoucím omezením bylo použití kapilár s malým vnitřním průměrem. Vlivem malého průměru mají kapiláry minimální vodivost a tudíž vytváření jen malé množství tepla a zamezení proudění uvnitř kapiláry. Díky tomu lze gel nahradit kapalným elektrolytem. První použití kapiláry při elektroforéze předvedl roku 1967 S. Hjertén, který pracoval s kapilárami s vnitřním průměrem 1 mm⁴. Následně Virtanen, Mikkers a Everaerts přišli s kapilárami vyrobenými ze skla, nebo teflonu s vnitřním průměrem přibližně 200 µm. Nakonec metodu kapilární elektroforézy zdokonalili Jorgenson a Lukacs⁵, kdy začátkem roku 1980 předvedli kapiláry s vnitřním průměrem 75 µm. Jorgenson dále představil obrovský potenciál kapilární elektroforézy, jako analytické metody a matematicky popsal děje, kterými se kapilární elektroforéza řídí, a jejich vliv na kvalitu separace. Neustálá snaha dosáhnout rychlejších a přesnějších analýz vedla ke konceptu elektroforézy na čipu. Potenciál přístrojů založeným na mikročipech byl předveden už v roce 1979 integrovaným plynovým chromatografem a roku 1990 následován kapalinovým chromatografem. Avšak tyto přístroje byly brzo opomenuty. S ideálním využitím mikročipů přišli roku 1992 Manz, Harrison, Verpoorte a Widmer a to spojením mikročipu s kapilární elektroforézou⁶. V dnešní době jsou již vyráběny komerční automatizované zařízení a to zejména přístroje pro analýzu proteinů a nukleových kyselin.

2.2 Kapilární elektroforéza

Současný vývoj elektroforézy je zaměřen převážně na kapilární elektroforézu. Dnešní kapiláry jsou převážně vyráběny z taveného křemene s vnitřním průměrem od 25 do 150 µm. Výhodou malých vnitřních průměrů kapilár je generace minimálního množství tepla, které vzniká průchodem elektrického proudu elektrolytem a navíc obrovská plocha kapiláry ku množství elektrolytu efektivně napomáhá k odvodu tepla. Díky tomu lze použít kapalně elektrolyty spolu s vysokými hodnotami elektrického pole (100 až 500 V/cm) při analýze. Vlivem vysokých hodnot elektrického pole dochází ke zkracování doby analýzy a zvýšení kvality separace. Další neopomenutelnou výhodou je potřeba minimálního množství elektrolytu i analytu. Což je hlavní výhodou pro kvantitativní analýzy a možnou automatizaci⁷. V posledním době je snaha o další miniaturizaci tzv. mikrofluidní systémy na čipu. Kapilární elektroforéza v sobě skýtá obrovský potenciál využití při analýzách anorganických iontů, organických látek, ale i biologických materiálů, jako jsou buňky a viry.

V dnešní době si kapilární elektroforéza vydobyla své místo nejen ve výzkumných laboratořích, ale i ve forenzních, klinických a farmaceutických laboratořích, při kontrole kvality potravin a čistoty životního prostředí^{8,9,10}.

2.3 Mobilita iontů v kapilární elektroforéze

Při kapilární elektroforéze využíváme k separaci analytu na jednotlivé složky jejich rozdílných rychlostí migrace v elektrickém poli a lze je popsat rovnicí 1.

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

E je intenzita vloženého elektrického pole, μ_e je elektroforetická mobilita a v je rychlost iontu. Elektroforetická mobilita jednotlivých iontů je pro dané prostředí a iont konstantní a tudíž i charakteristická. Je dána rovnováhou mezi elektrickou silou na iont působící, rovnice 2, a odporem kladoucím prostředí proti pohybu iontu, rovnice 3:

$$F_E = q \cdot E \quad (2)$$

$$F_O = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (3)$$

q je náboj nesoucí iont, r je hydrodynamický poloměr iontu, η je viskozita prostředí. Elektroforetickou mobilitu pak lze odvodit z rovnováhy, kdy:

$$F_E = F_O$$

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

Z rovnice 1 vyplývá:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (4)$$

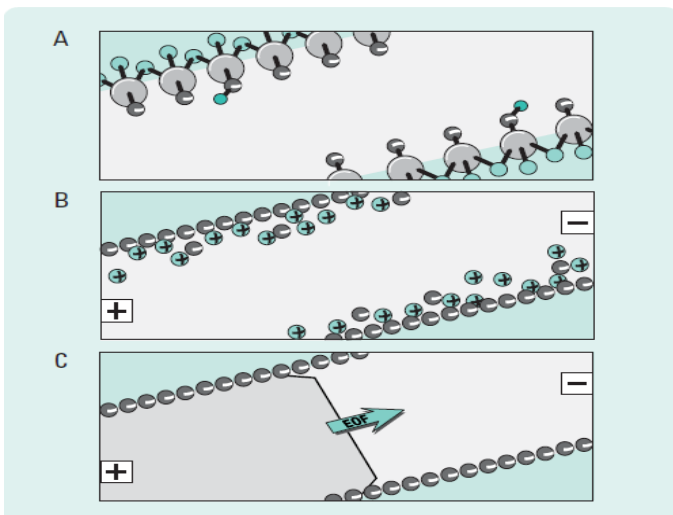
Z rovnice 4 je patrné, že elektroforetická mobilita je přímo úměrná náboji přítomnému na daném iontu a nepřímo úměrná jeho velikosti. Hodnoty elektroforetických mobilit lze pro jednotlivé ionty nalézt v tabulkách, jako konstantu pro daný iont. Tabelované hodnoty jsou vztaženy na molekuly při nekonečném zředění a na plně disociované (ionizované) molekuly. Tyto hodnoty se pak liší od hodnot experimentálně změřených, které se nazývají efektivní mobilita. Rozdíl mezi hodnotami tabelovanými a efektivními jsou způsobeny např. neúplnou disociací molekuly (nenese tak velký náboj, jak by tomu bylo u molekuly zcela disociované). Tuto skutečnost můžeme popsat rovnicí 5:

$$\mu_{\text{efektivní}} = \alpha \cdot \mu_e \quad (5)$$

α je stupeň disociace a je tedy značně závislý na pH. Efektivní mobilita (experimentálně změřená) pak dále odráží efekty teploty, ovlivňování iontů, iontové síly atd.

2.4 Elektroosmotický tok¹¹

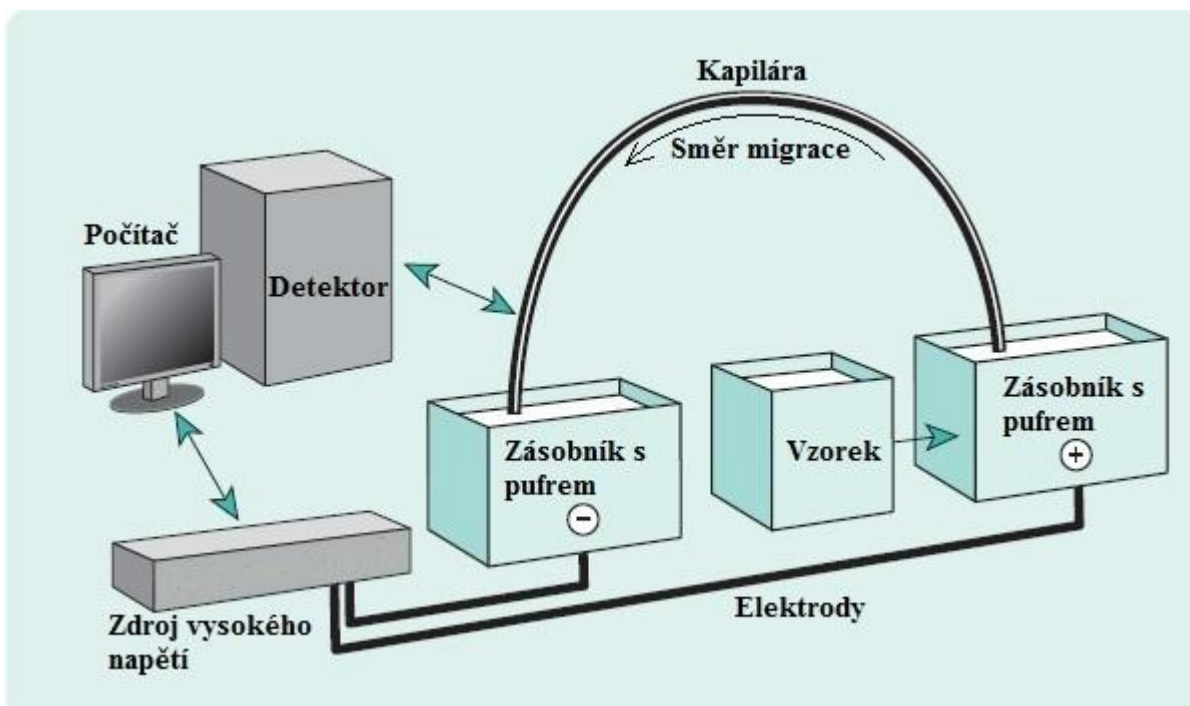
Dalším faktorem, kterým můžeme ovlivnit analýzu u kapilární elektroforézy je elektroosmotický tok, který plní podobnou funkci, jako pumpa u HPLC. Je způsoben disociací silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry. Síla elektroosmotického toku je dána množstvím disociovaných silanolových skupin. Disociaci lze ovlivnit pomocí pH, kdy při vysokých hodnotách pH je stěna kapiláry zcela disociována a elektroosmotický tok je nejsilnější. S klesajícím pH klesá i množství disociovaných silanolových skupin a tedy i síla elektroosmotického toku, obr. 2A. Disociaci dochází k zápornému nabití vnitřní stěny kapiláry, která k sobě přitahuje kladně nabitě ionty, aby byla zachována elektroneutralita. Tím vzniká v blízkosti stěny kapiláry rozdílný elektrický potenciál než v jejím středu. Říkáme, že v kapiláře vznikla difuzní dvojvrstva, obr. 2B. Po vložení elektrického pole na kapiláru kationty tvořící difuzní dvojvrstvu jsou unášeny směrem ke katodě a díky svým solvatačním obalům strhávají s sebou i okolní roztok. Dochází tak k pumpování nejen kladně nabitých částic, ale i celého roztoku uvnitř kapiláry, obr. 2C. V důsledku toho jsou ke katodě unášeny spolu s kationty, které jsou elektroosmotickým tokem urychleny i neutrální molekuly pohybující stejnou rychlostí jakou má elektroosmotický tok, tak i anionty, které jsou opožděny za elektroosmotickým tokem vlivem opačného náboje, což nám umožňuje při správně zvoleném elektroosmotickém toku separovat v jedné analýze kationty, neutrální látky, ale i anionty.



Obr. 2: A) Disociované silanolové skupiny na vnitřní straně kapiláry. B) Vznik difuzní dvojvrstvy. C) Znárodnění elektroosmotického toku (převzat z cit. 7)

2.5 Instrumentace¹²

Kapilární elektroforéza je charakteristická svojí poměrně nenáročnou instrumentací. Základní schéma elektroforézy zobrazuje obr. 3.



Obr. 3: Schematické zapojení kapilární elektroforézy (převzato z cit. 7)

Skládá se ze dvou zásobníků s elektrolytem spojených elektrodami, které jsou připojeny na zdroj vysokého elektrického napětí, který by měl poskytovat stabilní napětí (možná odchylka je 0,1 % pro zachování kvalitativní a reprodukovatelné analýzy¹³). Elektrický okruh uzavírá kapilára. Kapilára u většiny přístrojů bývá chlazená pro zachování konstantních podmínek v celé délce kapiláry a tím i zlepšení kvality analýzy. Na opačném konci než došlo k nástřiku vzorku je umístěn detektor spojený s vyhodnocovacím zařízením. Dávkování vzorku u kapilární elektroforézy na rozdíl od jiných instrumentálních metod neprobíhá skrz různá dávkovací zařízení, ale pouhou výměnou zásobníku s elektrolytem za zásobník se vzorkem. Vzorek je následně do kapiláry nasán tlakem, nebo vložení elektrického pole.

2.5.1 Kapilára

Dnešní kapiláry jsou převážně vyráběny z taveného křemene, nebo teflonu s vnitřními průměry od 50 do 75 μm . Typické délky kapilár se pohybují mezi 10 až 100 cm. Výhodou křemenných kapilár je vlastnost křemene neabsorbovat v UV oblasti což umožňuje použití UV detektorů. Nevýhoda kapilár připravených z čistého křemene je jejich křehkost. Z toho důvodu jsou potaženy polyimidovým obalem, který kapiláre umožňuje dobrou ohebnost.

2.5.2 Detektory

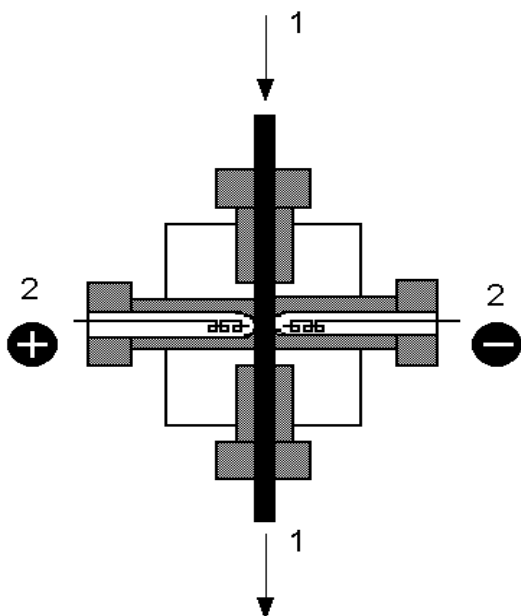
K detekci u kapilární elektroforézy dochází nejčastěji přímo v kapiláře, tedy přes stěnu kapiláry. To zaručuje přesnější analýzu, protože při detekci stále dochází k separaci, tudíž nedochází k rozmývání, nebo smíchání zón. V kapilární elektroforéze využíváme nejčastěji tři typů detektorů:

- a) fluorescenční detektor
- b) vodivostní detektor
- c) UV-vis detektor

Další možnou detekcí je spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Zde už k detekci nedochází přímo v kapiláře. Při své práci jsem pracoval s vodivostním a UV-vis detektorem, a proto se budu zaměřovat výhradně na ně.

2.5.2.1 Vodivostní detektory

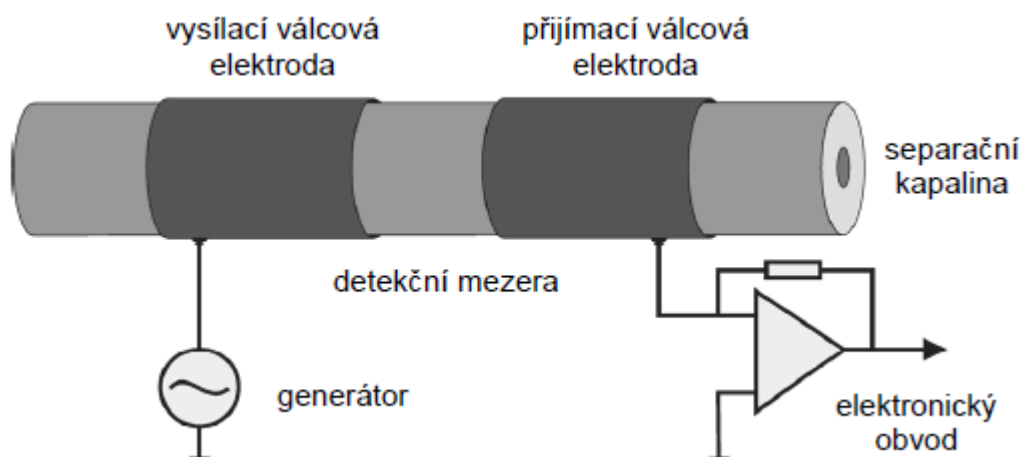
Vodivostní detektory jsou charakteristické svojí univerzálností, proto bývají častou volbou nejen při elektroforetických analýzách. Prvními vodivostními detektory byly tzv. kontaktní. Schéma kontaktního vodivostního detektoru je zobrazeno na obr. 4.



Obr. 4. Schéma kontaktního vodivostního detektoru. (převzato z cit. 14)

1) směr toku kapaliny skrz detektor, 2) elektrody

Výhodou je jejich konstrukční nenáročnost a možnost miniaturizace a tedy použití pro kapiláry při kapilární elektroforéze. Nevýhodou jsou vysoké nároky kladené na mobilní fázi, která je v přímém kontaktu s elektrodami detektoru, na které je vloženo střídavé napětí. Mobilní fáze musí být takřka nevodivá. Přítomnost vodivých látek v rozpouštědle může zapříčinit rušení detekce, v krajních případech vede až ke spálení elektrod a znehodnocení detektoru. Tento problém byl vyřešen příchodem vodivostního detektoru, kde roztok mobilní fáze nepřichází do přímého kontaktu s elektrodami tedy bezkontaktní vodivostní detektor, jehož schéma je zobrazeno na obr. 5.



Obr. 5. Schéma vodivostního bezkontaktního detektoru (převzato z cit. 15)

Při použití bezkontaktních vodivostních detektorů roztok elektrolytu není v kontaktu s elektrodami, ale dochází k detekci přes stěnu kapiláry, což umožňuje použití nejrůznějších elektrolytů pro separaci. Dnešní bezkontaktní vodivostní detektory se skládají ze dvou elektrod ovinutých kolem kapiláry oddělených detekční mezerou. Na první elektrodu je generátorem vkládán střídavý signál (řádově desítky kHz až 1 MHz), který prochází stěnou kapiláry a je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře. Výsledný signál je snímán druhou elektrodou¹⁵. Použití bezkontaktního vodivostního detektoru při kapilární elektroforéze se ukázalo jako ideální řešení.

2.5.2.2 UV-VIS detektory

UV-VIS detektory stejně jako vodivostní patří mezi univerzální a v dnešní době jsou nejpoužívanější metodou k detekci látek při analytických analýzách. Díky vlastnosti křemenné kapiláry neabsorbovat záření v UV a viditelné oblasti je možno využít těchto detektorů i u kapilární elektroforézy. Kvůli své křehkosti jsou křemenné kapiláry pokryty vrstvou polyimidu. Tato vrstva však v místě detekce chybí, mluvíme o tzv. detekčním okénku o definované velikosti (2 – 5 mm). V tomto místě prochází záření kapilárou a dochází k jeho absorpci analytem. Výhodou UV-VIS detektoru vybavených diodovým polem je možnost snímat během jedné analýzy celé spektrum. Což nám poskytne další cenné informace o analyzované látce¹⁶. Příspěvkem k celkové univerzálnosti tohoto detektoru je možnost detegovat i látky neabsorbující v UV a viditelné oblasti. Jedná se o tzv. nepřímé stanovení,

kdy jako elektrolyt volíme látku v UV a viditelné oblasti absorbující. Na záznamu pak sledujeme pokles absorbance, kdy se do detekčního okénka dostala zóna analytu.

2.6 Separační módy v kapilární elektroforéze

Pod pojmem kapilární elektroforéza rozumíme soubor separačních metod využívajících k rozdělení analytu kapiláru a pohyb elektricky nabitých částic v elektrickém poli¹⁷. K nejnámějším patří:

1. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Zde se využívá dvou elektrolytů, vedoucího, jehož mobilita je v daném systému nejvyšší, a koncového, jehož mobilita je nejnižší. Mezi tyto elektrolyty se dávkuje vzorek a po aplikaci elektrického pole dojde k seřazení složek do jednotlivých zón podle svých elektroforetických mobilit. Nevýhodou je možnost v jedné analýze stanovit pouze kationty, nebo anionty. Elektroosmotický tok je v tomto případě eliminován.

2. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Využívá se pro separaci biologických molekul, zejména proteinů. Metoda využívá existence isoelektrického bodu. Kapilára je naplněna směsí amfolytů. Po aplikaci elektrického pole dojde k migraci molekul do oblasti pH, která odpovídá jeho isoelektrickému bodu, kde se zastaví.

3. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

K rozdělení dochází na základě rozdílných mobilit látek v určitém prostředí. Jedná se o nejběžnější používanou metodu, při které lze díky správně zvolenému elektroosmotickému toku stanovit v jedné analýze kationty i anionty.

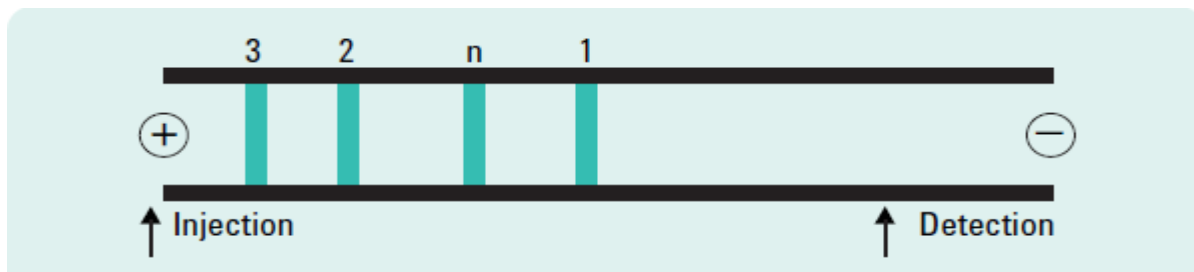
4. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Principiálně se jedná o techniku využívající k rozdělení vlastností jako CZE. Jedná se o metodu vyvinutou pro separaci nenabitých látek. K roztoku elektrolytu je přidán tenzid a po aplikaci elektrického pole jsou všechny látky unášeny elektroosmotickým tokem. K rozdělení analytu dochází na základě různě silné chemické interakce mezi použitým tenzidem a jednotlivými složkami analytu.

Zmíněné módy jsou jen některé z možných módů používaných při kapilární elektroforéze. V mé práci jsem se setkal s módy CZE a MEKC, kterým dále budu věnovat větší pozornost.

2.6.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Je jednou z nejpoužívanějších metod při kapilární elektroforéze. Metoda je založena na rozdílných elektroforetických mobilitách jednotlivých složek analytu. Tudiž rychlost jednotlivých složek bude dána jejich velikostí a nábojem. Klíčovou roli u kapilární zónové elektroforézy hraje elektroosmotický tok, kterým lze upravit čas analýzy, ale také jeho správně zvolená velikost umožní stanovit v jedné analýze, jak kationty, tak i neutrální látky, ale i anionty. Aby i anionty putovaly stejným směrem jako kationty, musíme elektroosmotický tok volit dostatečně silný na to, aby překonal elektroforetické mobility daných aniontů. Výsledkem je seřazení jednotlivých složek analytu do zón podle velikosti jejich elektroforetické mobility viz. obr. 6.



Obr. 6 Seřazení složek analytu do jednotlivých zón, 1 kationty urychlené EOF, n neutrální látky pohybující se rychlostí EOF, 2,3 anionty opožďující se za EOF. (převzato z cit. 7)

Klíčovou roli při určení síly elektroosmotického toku hraje pH, které musí být během celé analýzy konstantní. Jako elektrolyty tudíž volíme roztoky pufrů¹⁸.

2.6.2 Micelární elektrokinetická chromatografie MEKC

Princip rozdělení analytu je kombinací metody CZE a chromatografie. Metoda MEKC využívá látek (tenzidů), které jsou tvořeny hydrofilní a hydrofobní částí. Tenzid je přidán k elektrolytu nad svojí tzv. kritickou micelární hodnotou. Při této koncentraci se tenzid začíná samovolně agregovat. Analyt se pak dělí na základě své chemické afinity mezi fází tenzidu a elektrolytu. Čím silnější afinitu látka bude mít k fázi tenzidu, tím déle se v ní bude zdržovat a o to více se změní její migrační čas. Stejně jako u CZE i při použití metody MEKC hraje roli správná volba síly elektroosmotického toku. Nejčastější látkou jako tenzid při metodě MEKC je dodecylsulfát sodný (SDS). Další látky možné použít jako tenzid při MEKC jsou ukázány v tabulce I.

	<i>tenzid</i>	<i>Kritická micelární koncentrace [mM]</i>
<i>záporně nabité</i>	SDS	8,2
<i>kladně nabité</i>	DTAB	14
	CTAB	1,3
<i>bez náboje</i>	Octylgcoside	-
	n-dodecyl- β -D-maltoside	0,16
	Triton X-100	0,24
<i>kladně i záporně nabité</i>	CHAPS	8
	CHAPSO	8
<i>další</i>	Cholic acid	14
	Deoxycholic acid	5
	Taurocholic acid	10-15

Tabulka I. Možné tenzidy při metodě MEKC (převzato z cit 4)

Význam použití metody MEKC je k stanovení i elektricky nenabitých částic. V dnešní době se metoda MEKC využívá při farmaceutických analýzách, analýzách potravin a životního prostředí¹⁸.

2.7 Elektroforéza na čipu

Principy a metody elektroforézy na čipu jsou stejné, jako u elektroforézy kapilární. K separaci analytu dochází v kanálcích vyleptaných do čipu za použití mikrofabrikačních metod. Čipová elektroforéza umožňuje analýzu až několika desítek vzorků současně. Vzorky jsou nanášeny do systému kanálků čipu a následně elektrokineticky vpraveny do injektorové oblasti, kde probíhá vlastní elektroforetická separace. Čipy na rozdíl od kapiláry snáze odvádí generované teplo a i separační kanál je mnohem kratší nežli kapilára, což nám umožňuje aplikace mnohem vyšších hodnot elektrického pole a tím i urychlit dobu analýzy. Další neopomenutelnou výhodou jsou objemy látek nutných k analýze. Při elektroforézách na čipu se pohybujeme v objemech řádově v pikolitrech. Nevýhoda je poměrně vysoká složitost a náročnost výroby čipů. K detekci se využívá nejčastěji vodivostních detektorů a fluorescenčních mikroskopů. Další možností detekce je zapojení s hmotnostní spektrometrií.

2.7.1 Čipy v elektroforéze

Původním materiál pro výrobu mikročipů bylo sklo nebo křemen. Výroba se prováděla tzv. mikrofabrikačními metodami, které zahrnovaly mokré tepelné leptání nebo fotolitografii¹⁹. Jak již ale bylo řečeno dříve, tyto metody výroby jsou značně nákladné a složité. Další možností přípravy mikročipů je využití polymerů a to zejména polydimethylsiloxan a polymethylmethakrylát. Mikročipy z polymerů se vyrábí odléváním z tzv. masky, která se vyrábí např. z křemene a potřebná struktura se do ní vyleptá. Výroba mikročipů pomocí polymerů je ve srovnání s výrobou mikročipů ze skla jednodušší a levnější, což je hlavní výhodou této metody.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro přípravu nosných elektrolytů (pufrů) pro separaci byly použity chemikálie: kyselina boritá, MES, histidin, dodecylsulfát sodný (SDS), hydroxid sodný v čistotě p.a. a deionizovaná voda Millipse 18 MΩ/cm.

3.2 Příprava elektrolytů

Potřebný pufr byl připraven smísením odpovídajícího množství kyseliny borité nebo MES s deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 35 mM pro kyselinu boritou a 10 mM pro MES. Následně bylo pH upraveno pomocí 50 % a 10 % roztoku hydroxidu sodného (w/w) na požadovanou hodnotu 9,5 pro borátový pufr. Pro pufr MES byla hodnota upravena přidáním histidinu na pH 6,0. Hodnota pH byla průběžně sledována pH metrem. Nakonec k roztoku borátového pufru byl přidán roztok SDS o koncentraci 50 mM, který byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství SDS v daném pufru.

3.3 Použité přístroje

3.3.1 Kapilární elektroforéza

Měření byly prováděny na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), který je na obr. 7. Detekce byla provedena detektorem diodového pole snímajícím při 200 nm a bezkontaktním vodivostním detektorem navrhnutým skupinou Prof. Gaše (PřF UK Praha). Signál (0-1 V) z CCD detektoru byl zpracován pomocí Agilent 35900E dvoukanalovým A/D převodníkem (Agilent Technologies). Kapilára zvolená pro analýzu byla nepokrytá křemenná kapilára (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA) s vnitřním průměrem 50 μm a celkovou délkou 48,5 cm a efektivní 40 cm. Kapilára byla termostatována na 25°C a vložené napětí pro separaci a dávkování bylo -10 kV. Před prvním měřením byla

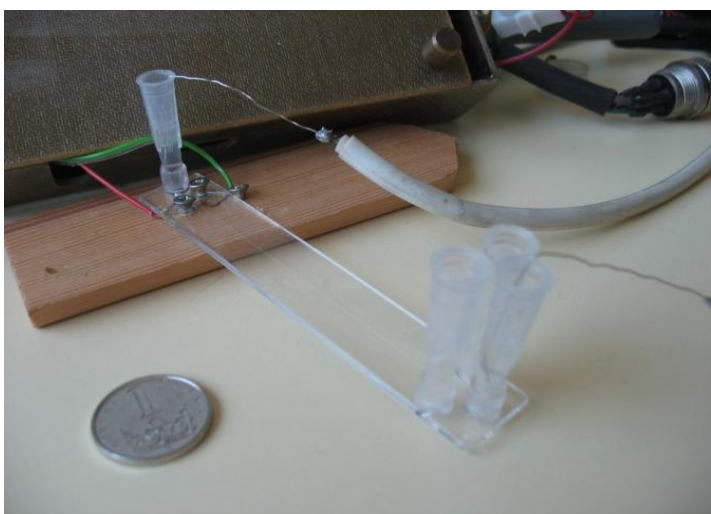
kapilára vymyta 0,1 M NaOH po dobu 5 minut a deonizovanou vodou 5 minut nakonec roztokem pufru po dobu 15 minut. Mezi měřeními byla kapilára promývána deonizovanou vodou po dobu 5 minut a rotokem pufru také 5 minut.



Obr.7. fotografie přístroje HP^{3D} CE

3.3.2 Čip

Čip použitý pro analýzu byl zakoupen od Německé firmy Chip-shop. Připojení k vodivostní cele bylo problematické, špatná konektivita s jiným systémem než dodává Chip-Shop viz. obr.8. Integrace se zdrojem napětí Spellman Detekce byla provedena pomocí bezkontaktního vodivostního detektoru navrženým profesorem Opekarem (PřF UK Praha), sběr dat pomocí softwaru DataApex. Zdrojem vysokého napětí byl Spellman CZE1000R.



Obr.8. Elektroforéza na čipu

4 Výsledky a diskuse

4.1 Cíl

Jako cíl mojí bakalářské práce jsme zvolili porovnání metody kapilární elektroforézy s elektroforézou na čipu pro separaci biologicky aktivních látek. Elektroforéza obecně má pro separaci biologicky aktivních látek velký potenciál. Na rozdíl od metod chromatografie elektroforéza umožňuje použití širokého rozmezí pH, které u chromatografie není možné. Navíc spotřeba látek pro analýzu ať už se jedná o vzorek nebo pomocné kapaliny je minimální řádově v piko- až nano- litry. Další výhodou je poměrně snadná automatizace a instrumentální nenáročnost. Pro porovnání jsme zvolili skupinu fenolických kyselin, dále pak sodné a draselné ionty. Fenolové kyseliny jsme zvolili z důvodů jejich antioxidantních účinků v organismu. Sodné a draselné ionty jsme volili z důvodů přítomnosti v biologických procesech v organismu a navíc separace a detekce těchto iontů je již dobře známá a poslouží tedy, jako dobrá srovnávací metoda²⁰.

4.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny patří do skupiny polyfenolů, které jsou charakteristické přítomností jednoho a více aromatických jader, které jsou dále substituovány hydroxylovými skupinami. Do dnešní doby již bylo zaznamenáno několik tisíc polyfenolických látek s nejrůznějšími strukturami. Hlavní zájem u těchto látek zbudila jejich antioxidantní schopnost, která podle studií převyšuje dříve známé antioxidanty (vitamíny), jako vitamín C, β -karoten a další. Hlavním úkolem antioxidantů v organismu je redukce škodlivých forem kyslíku tzv. volných radikálů, které jsou vedlejším produktem některých metabolických drah organismu. Tyto radikály jsou vysoce reaktivní díky svému nepárovému elektronu a mohou vyvolat vznik některých forem rakoviny, kardiovaskulární nemoci a dalších. Antioxidanty se s volnými radikály vypořádávají několika mechanismy²¹.

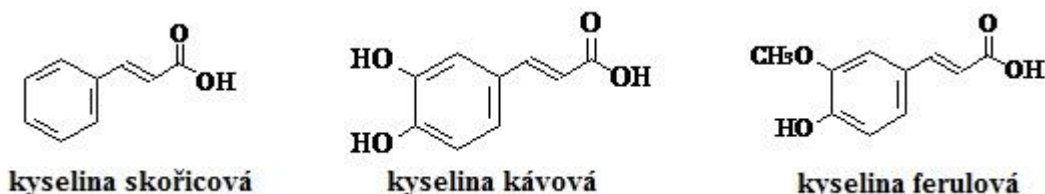
- Obsahují snadno oxidovatelnou skupinu, která reaguje s volným elektronem radikálu
- inhibují enzymy odpovědné za tvorbu volných radikálů

- Tvoří komplex s kovovými ionty, které sou koenzymem pro enzymy tvořící volné radikály.

Bylo zjištěno, že polyfenoly mají kromě antioxidantních účinků a vliv na další biologické pochody v organismu. Dnešní životní styl je hlavní příčinou vzniku nerovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty. Z toho důvodu se dnes doporučuje zvýšená konzumace ovoce a zeleniny, které jsou bohatým zdrojem antioxidantů a tedy i polyfenolů. Polyfenoly v rostlinách plní roli metabolitů a jejich struktura, množství a funkce se rostlinu od rostliny liší. Nejvíce polyfenolů pak obsahují švestky dále pak rozinky, borůvky, ostružiny, kapusta, jahody, špenát, čaj a víno, kde podle vědce Simona Maxwella se antioxidanty nacházejí v nejméně změněném a nadmíru efektivní formě²¹. Polyfenoly se dají rozdělit do tří základních skupin a to na:

- skupina flavonoidů
- skupina stilbanů a lignanů
- skupina fenolických kyselin.

Polyfenolové kyseliny tvoří asi jednu třetinu z celkového zastoupení látek v polyfenolech. Nejvyšší zastoupení polyfenolických kyselin v naší potravě má kyseliny hydroxyskořicová, kyselina kávová a kyselina ferulová (obr. 9) a jejich estery.



Obr. 9. polyfenolové kyseliny

4.3 Sodné ionty

Sodík se vyskytuje v lidském organismu a patří tedy mezi biogenní prvky. V lidském organismu se vyskytuje ve formě iontu a je k životu nepostradatelný. Hlavní funkcí sodných iontů je tvorba elektrického potenciálu na povrchu buněk, který je využíván např. k vedení vzruchů na nervových buňkách. K tvorbě potenciálu dochází pomocí enzymu nazývaného sodno-draselná pumpa, která pumpuje sodné ionty ven z buňky a draselné dovnitř v poměru

3:2 za spotřeby ATP. Tím vzniká již zmíněný elektrický potenciál na povrchu buňky. Nedostatek sodných iontů může zapříčinit nízký krevní tlak, nevolnost a další. Nadbytek pak naopak vysoký krevní tlak a vyšší zátěž pro ledviny, protože právě ledvinami se sodík dostává z těla ven. Hlavním zdrojem sodíky pro organismus je sůl. Dalšími pak mrkev, červená řepa či celer.

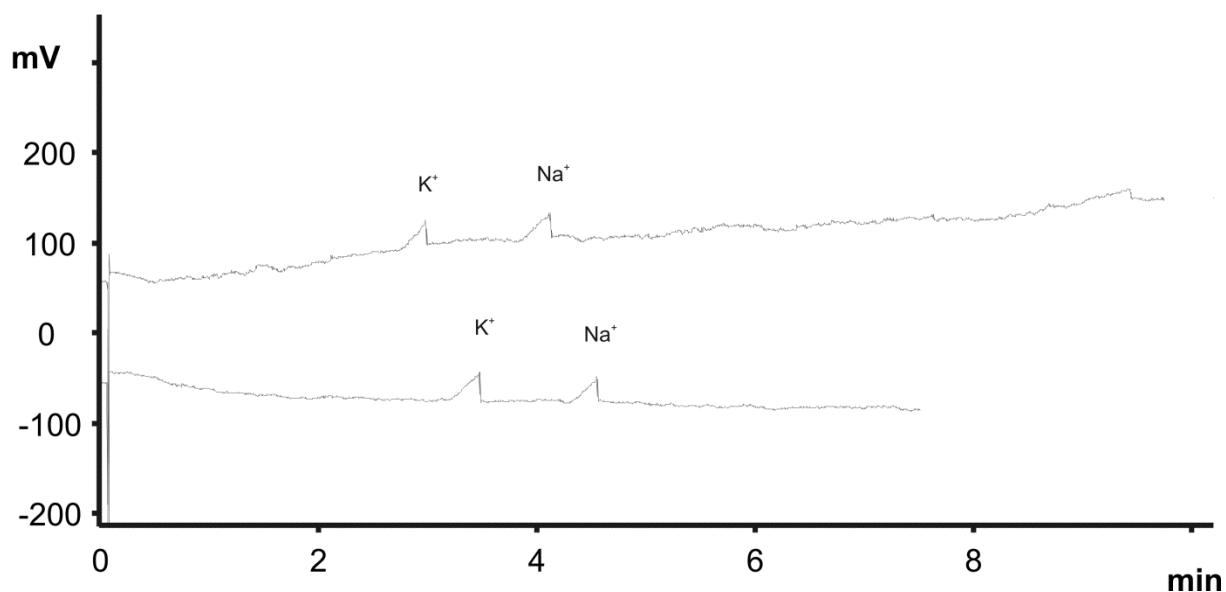
4.4 Draselné ionty

Draselné ionty jsou mnohem důležitější a dalo by se říct, že zajišťují veškeré funkce organismu. Kromě sodno-draselné pumpy dále ovlivňuje přesnou funkci kardiovaskulárního systému, svalový tonus a mnoho dalšího. Jeho nedostatek může být příčinou nespavosti, nedostatku cukru, vysokého krevního tlaku až poškození srdce. Jeho nadbytek vyvolává bolesti břicha průjmy v krajních případech stejně jako jeho nedostatek poškození srdce. Zdrojem draslíku pro organismus je veškerá strava, protože draslík je přítomen téměř všude. Nejvíce draslíku však obsahuje ovoce a zejména pak banány a pomeranče.

4.5 Analýza pomocí kapilární elektroforézou

4.5.1 Sodné a draselné ionty

Separace těchto iontů je již dlouho popsána. Detekci lze provést vodivostním detektorem, ale i pomocí UV detektu nepřímou detekcí. Jako separační elektrolyt byl použit pufr MES/His o pH 6 a koncentraci 10 mM, který je možno použít pro oba způsoby detekce. Z našeho pohledu je výhodnější použití detekce pomocí vodivostního detektoru, protože při analýze na čipu využijeme téže detekce. Testovali jsme směs sodných a draselných iontů oba ve formě chloridu. Provedli jsme 5 analýz s dávkováním 5 s 50 mbar, koncentrace iontů byla 10^{-5} mol/L a napětím +15 kV. Výsledky dvou po sobě jdoucích analýz jsou zobrazeny na obr. 10.

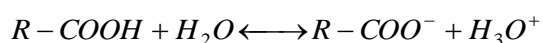


Obr. 10. Analýza sodných a draselných iontů s vodivostní detekcí

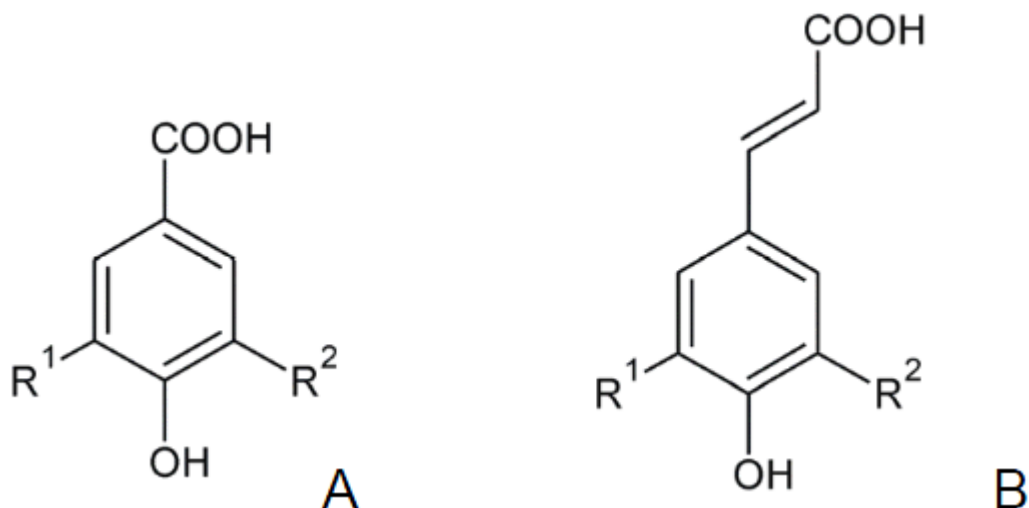
Výsledek ukazuje, že lze separovat sodné a draselné ionty kapilární elektroforézou. Dále jsme zjistili zvýšením koncentrace jednoho z iontů, že draselné ionty migrují rychleji než sodné, což je v souladu s teorií kapilární elektroforézy.

4.5.2 Fenolové kyseliny

Obecně platí, že fenolové kyseliny jsou ve vodném prostředí slabé kyseliny:



Pro analýzu jsme vybrali kyseliny: (a) syringová, (b) sinapová, (c) ferulová, (d) kumarínová, (e) vanilinová, (f) hydroxybenzoová, (g) kávová, (i.s.) fenylalanin, jejichž struktury jsou zobrazeny na obr. 11.



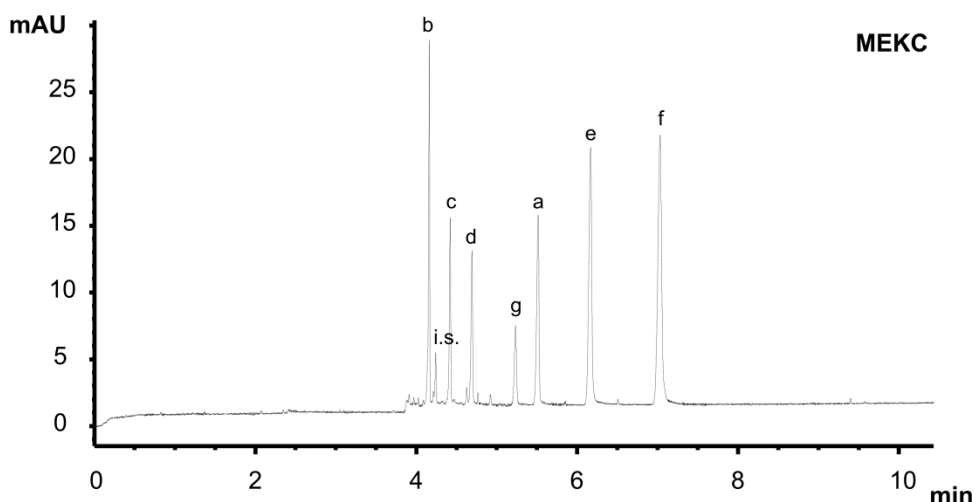
Obr. 11. Struktury fenolových kyselin; A) $R^1 = R^2 = H$, 4-hydroxybenzoová kyselina; $R^1 = CH_3$, $R^2 = H$, syringová kyselina; $R^1 = H$, $R^2 = OCH_3$, vanilová kyselina; B) $R^1 = R^2 = H$, kumarinová kyselina; $R^1 = R^2 = OH$, kávová kyselina; $R^1 = OCH_3$, $R^2 = H$, ferulová kyselina; $R^1 = OCH_3$, $R^2 = OCH_3$, sinapová kyselina

Tyto kyseliny mají pK mezi 4 - 5 z čehož vyplývá, že v prostředí pH 2,5 a méně budou neutrální a v elektrickém poli se nebudou pohybovat svojí vlastní mobilitou. Naopak v prostředí pH 6,5 a více budou ve formě aniontu a mít svoji vlastní mobilitu. To umožňuje stanovit tyto kyseliny dvěma zbusoby.

- a) micelární elektrokinetickou chromatografií v kyselém pH
- b) kapilární zónovou elektroforézou v zásaditém pH

ad a)

Separčním elektrolytem byl pufr fosfát/NaOH o pH 2,5 a koncentraci 50 mM s 50 mM SDS, koncentrace kyselin byla 10^{-4} mol/L a napětí -20 kV. Výsledek je zobrazen na obr. 12.

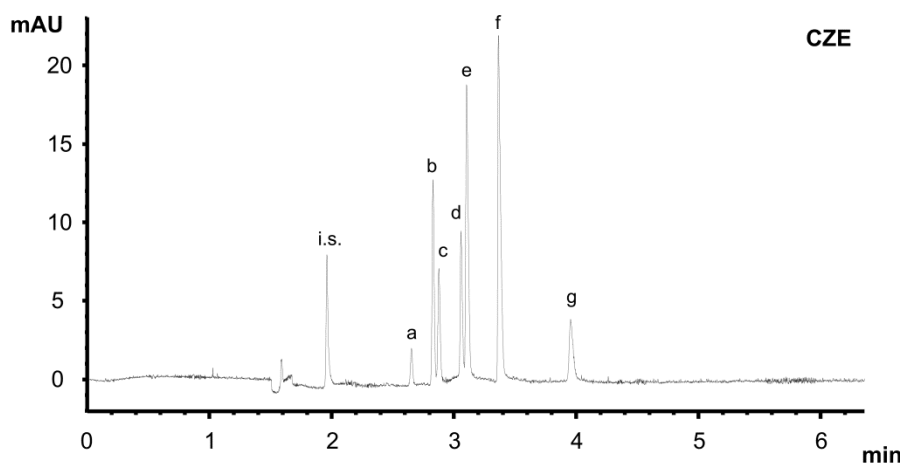


Obr. 12. Analýza fenolových kyselin metdou MEKC

V tomto případě analýzy lze předpokládat nutný přídavek SDS o koncentraci nejméně 50 mM. Ovšem SDS je sodná sůl a způsobí tak velký nárůst vodivosti elektrolytu a znemožní tak ve většině případu detekci vodivostním detektorem. Tato metoda se pak vzhledem k možnému použití pro čip jeví, jako méně vhodná.

ad b)

Pro tento typ analýzy se používají pufrы o pH 6,5. Při této hodně pH je v roztoku přítomno malé množství OH^- a H_3O^+ iontů, které jsou vysoce vodivé a rušily by detekci při využití vodivostního detektoru. Nicméně v našem pokusu jsme jako elektrolyt zvolili borátový pufr o pH 9,5 a koncentraci 35 mM. Teto pufr má dvě výhody. Samotná kyselina boritá není díky své struktuře moc vodivá a navíc má schopnost interagovat s vicinálními dioly a tím modifikovat selektivitu separace fenolových kyselin. Koncentrace kyselin byla 10^{-4} mol/l a napětí +20 kV. Výsledek je zobrazen na obr. 13.

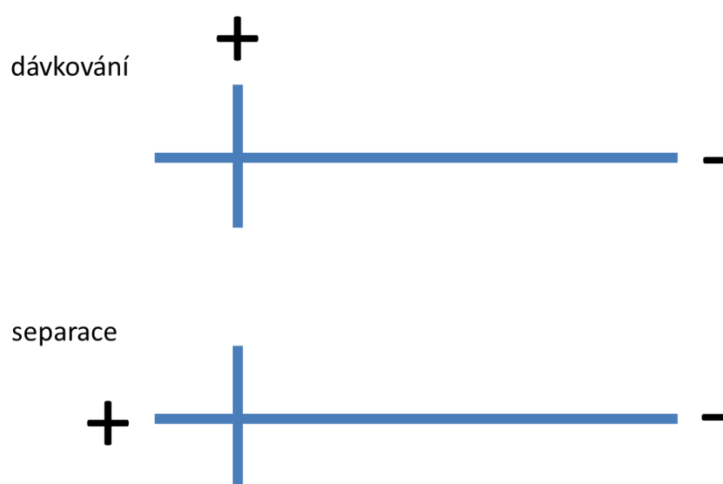


Obr. 13. Analýza fenolových kyselin metdou CZE

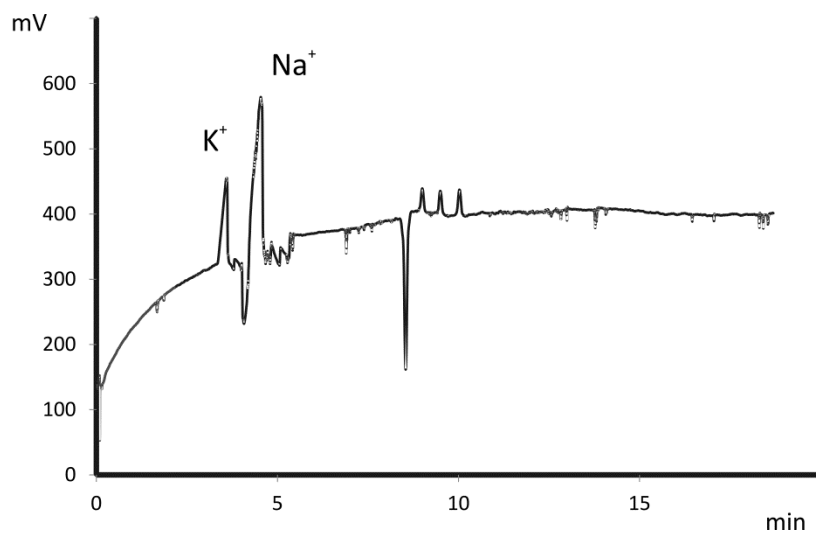
Z obrázku je vidět celkem zdařilá separace, lze tedy uvažovat o využití této metody pro separaci fenolových kyselin i v uspořádání na čipu.

4.6 Analýza pomocí elektroforézy na čipu

Nejprve jsme testovaly analýzu sodných a draselných iontů s detekcí vodivostním detektorem. Elektrolyt by stejný, jako v případě kapilární elektroforézy. Dávkování vzorku proběhlo elektrokineticky při +5 kV 3 s. Schéma dávkování je zobrazeno na obr. 14. Analýza probíhala při napětí 10 kV a výsledek je zobrazen na obr. 15.



Obr. 14. Schéma dávkování při elektroforéze na čipu.



Obr. 15. Analýza sodných a draselných iontů

Spajky a další vzhled je zřejmě způsoben neodladěním detektoru čipu a spojením detektoru čipu s druhým detektorem. Fenolické kyseliny se dosud na čipu nepodařilo analyzovat, pravděpodobně je nutná změna elektrolytu

5 Závěr

V této práci bylo ověřeno obrovské využití kapilární elektroforézy, jako metody k analýze biologicky aktivních látek. Navíc využití nových technologií, jako je elektroforéza na čipu vede k dalšímu zdokonalení. Výhodou analýzy na čipu oproti v kapiláře je několika násobné zrychlení analýzy a minimální spotřeba látek. Nevýhoda této technologie je zatím poměrně složitá výroba, možnost snadného ucpání kanálku čipu a špatná automatizace analýzy.

6 Literatura

1. Brajter-Toth, A.: *Electroanalytical Methods For Biological Meterials*. Marcel Dekker inc., New York, 2002
2. Baker, D. R.: *Capillary Electrophoresis*. Weley-Interscience, New York, 1995. N.Y. 10158-0012
3. Hjertén, S.: Free zone electrophoresis. *Chromatographic Reviews* 9, 1967, s. 122-143, 147-219
4. Tiselius, A.: A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures. *Transactions of the Faraday Society* 33, 1937, s. 524-531
5. Jorgenson, J.W., Lukacs K.D.: Capillary zone electrophoresis. *Science* 222, 1983, s. 266-272
6. Manz, A., Harrison, D., Verpoorte, E. M.J., Fettingner, J.C., Paulus, A., Lüdi, H., Widmer, H. M.: Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip. *Journal of CHromatography* 593, 1993, s. 253-258
7. Primer A.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 2009
8. Frazier, R.A., Ames, J.M., Nursten, H.E.: *Capillary electrophoresis for food analysis: Methods development*. The Royal Society of Chemistry, UK, 2000
9. Petersen, J. R., Mohammad, A. A.: *Clinical and forensic aplication of capillar electrophoresis*. Humana press, 2001. ISBN 0-89603-645-6
10. Subramanian, G.: *Quality Assurance in Environmental Monitoring*. Hardcover , 1995. ISBN 3-527-28724-8
11. Pazourek, J.: *Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium*, 2003
12. Altria, Kevin D.: *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, Operation and applications*. vyd. 52. Humman press inc. New Jersey. 1996
13. Primer A.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 2009
14. http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html#_top. Staženo dne 10.6.2012

15. Tůma, P., Samcová, E.: Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické listy 101*, 2007, s. 201-205
16. Pazourek, J.: *Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium*, 2003. Kapitola 5.
17. Li, S. F. Y.: *Capillary electrophoresis: Principles, methods, and applications*, Elsevire Science Publisher B.V. 1992
18. Altria, Kevin D.: *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, Operation and applications*. vyd. 52. Humman press inc. New Jersey. 1996
19. Henry, Charles S.: *Microchip capillary electrophoresis: Methods and Protocols*, Human press Inc. New Jersey. 2006
20. Beck, W., Engelhardt, H.: Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection, *Chromatographia 3*, 1992
21. Vodrážka, Z.: *Biochemie, Academia*. Praha. 2007
22. Maxwell, S., Cruickshank, A., Thorpe, G.: Red wine and antioxidant activity in serum. *The Lancet 344*, 1994, s. 193-194