

INSTRUMENTALNE METODY ROZDZIAŁU I ANALIZY SUBSTANCJI - ELEKTROFOREZA KAPILARNA

Techniki elektroforetyczne wykorzystują zjawisko migracji cząstek obdarzonych ładunkiem (jonów) w polu elektrycznym w kierunku elektrody o przeciwnym znaku. Metody elektroforetyczne umożliwiają zarówno jakościową jak i ilościową analizę próbek wieloskładnikowych.

Początkowo rozdziały elektroforetyczne prowadzone były w roztworach buforowych w specjalnych U-rurkach, następnie w celu zwiększenia zdolności rozdzielczej i stabilności układu zaczęto stosować specjalne nośniki np. bibułę, żel agarozowy, żel poliakrylamidowy. W zależności od stosowanego nośnika oraz rozdzielanych substancji skonstruowano odpowiednie urządzenia do elektroforezy w układzie pionowym lub poziomym.

Zwiększenie sprawności elektroforezy swobodnej uzyskiwano również dzięki zastosowaniu krzemionkowych rurek o małych średnicach [μm] oraz wysokich napięć [kV]. Podstawą rozdziału w elektroforezie kapilarnej są różnice w ruchliwości elektroforetycznej oznaczanych cząstek, które poruszają się z różnymi prędkościami w polu elektrycznym:

$$u = \mu E$$

gdzie: u [cm/s] – szybkość migracji

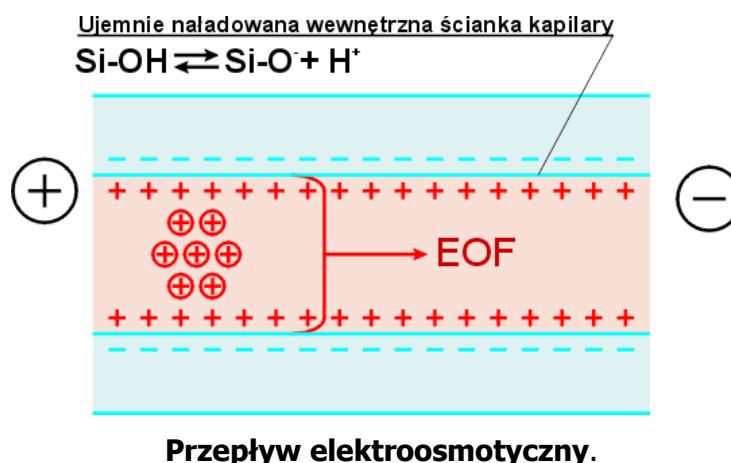
μ [$\text{m}^2/\text{s V}$] – ruchliwość elektroforetyczna

E [V/m] – natężenie pola elektrycznego, które jest funkcją przyłożonego napięcia U [V] i długości kapilary L_k [m]; ($E = U/L_k$)

Ruchliwość elektroforetyczna (μ) jest charakterystyczna dla danego jonu i zależy od jego ładunku q [C], promienia r [pm] i lepkości buforu η [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]:

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

Oprócz migracji elektroforetycznej w kapilarze zachodzi jeszcze zjawisko przepływu elektroosmotycznego, czyli ruchu całości cieczy wypełniającej kapilarę. Kontakt wewnętrznych ścianek szklanej kapilary z roztworem elektrolitu (bufor) powoduje jonizację grup silanolowych (-Si-OH), w wyniku czego ściana kapilary ładuje się ujemnie. Natomiast dodatnio naładowane cząstki z buforu gromadzą się w pobliżu tworząc podwójną warstwę elektryczną o pewnym potencjale elektrokinetycznym. Składa się ona z części bezpośrednio przylegającej do szklanej kapilary oraz części dyfuzyjnej, rozciągającej się w głąb roztworu o nadmiarowym ładunku dodatnim. Jeśli taki układ znajdzie się w polu elektrycznym, wówczas hydratowane kationy z części dyfuzyjnej poruszają się od anody do katody, powodując przepływ cieczy w kapilarze.



Przepływ elektroosmotyczny zależy głównie od następujących parametrów:

- pH buforu (wpływ na stopień jonizacji grup silanolowych i prędkość przepływu)
- stężenie lub siła jonowa buforu
- natężenie pola elektrycznego
- wprowadzenie do buforu dodatkowych substancji chemicznych: rozpuszczalników organicznych, związków powierzchniowo czynnych
- modyfikacja wewnętrznej powierzchni ścianek kapilary

Uzyskanie optymalnej szybkości przepływu EOF przeprowadza się w celu uzyskania jak najlepszej rozdzielczości, w jak najkrótszym czasie. Ponadto stabilność przepływu EOF jest bezwzględnie warunkiem do uzyskania powtarzalnych wyników.

Elektroforeza kapilarna stosowana jest m.in. w analizie żywności i zanieczyszczeń środowiska, także w biochemii, farmacji i medycynie. Wykorzystywana jest ona do oznaczenia zawartości węglowodanów, kwasów nukleinowych, oligonukleotydów, aminokwasów, peptydów, protein, leków, witamin i jonów nieorganicznych. Szerokie zastosowanie tej techniki wynika z występowania jej licznych odmian różniących się pod względem procesu rozdziału oznaczanych substancji.

- kapilarna elektroforeza strefowa (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) - składniki próbki poruszają się z różną prędkością pod wpływem przyłożonego napięcia dzięki różnicy stosunku ładunku do masy cząsteczek.
- micelarna chromatografia elektrokinetyczna (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) – stosuje się bufor z dodatkiem środków powierzchniowo czynnych (surfaktantów), w odpowiednim stężeniu tworzących micelle. Micelle oddziałują ze składnikami próbki na zasadzie interakcji hydrofobowych oraz elektrostatycznych. Hydrofobowe oraz neutralne składniki próbki łączą się z micelami, natomiast cząsteczki polarne pozostają rozpuszczone w buforze.
- żelowa elektroforeza kapilarna (Capillary Gel Electrophoresis, CGE) - proces rozdziału przebiega w kapilarze wypełnionej żelem o odpowiedniej średnicy porów (sit

molekularnych), w których szybkość migracji makromolekuł zależy od wielkości ich cząsteczek.

- kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (Capillary Isoelectric focusing, CIEF) - składniki mieszaniny są rozdzielane w gradiencie pH wytwarzanym we wnętrzu kapilary, poruszając się pod wpływem przyłożonego napięcia do momentu osiągnięcia strefy pH odpowiadającej punktowi izoelektrycznemu (pI) danej substancji.
- izotachoforeza kapilarna (Capillary Isotachopheresis, CITP) - prowadzony jest z zastosowaniem niejednorodnego elektrolitu, a próbka wprowadzana jest do kapilary między dwa bufore: „wiodący”, o ruchliwości jonów większej niż oznaczane jony próbki i „kończący”, o ruchliwości jonu mniejszej niż jony próbki. Po przyłożeniu napięcia rozdzielane jony migrują za buforem „wiodącym” według malejącej ruchliwości.
- elektrochromatografia kapilarna (Capillary Electrochromatography, CEC) - składniki jednorodnych mieszanin rozdzielane są w wyniku ich podziału pomiędzy fazę stacjonarną i ruchomą. W przypadku analitów obdarzonych ładunkiem, wykorzystywana jest również ich ruchliwość w polu elektrycznym.

Aparatura

System do elektroforezy kapilarnej składa się ze źródła wysokiego napięcia (0-30 kV), kapilary, dwóch naczyń z elektrolitem (buforem), dwóch elektrod, systemu do dozowania próbek oraz detektora (Rys.1).

Kapilary zbudowane są najczęściej ze szkła krzemowego lub z syntetycznego kwarcu nie absorbującego promieniowania nadfioletowego. W celu mechanicznego wzmocnienia kapilary pokrywa się cienką warstwą polimeru poliimidowego. Średnica wewnętrzna stosowanych kapilar wynosi 20-100 μm , a długości mieszczą się w zakresie 20-100 cm. Końce kapilary umieszcza się w naczyniach z odpowiednim elektrolitem oraz elektrodami. Pobieranie próbki polega na chwilowym umieszczeniu jednego końca kapilary w naczyniu z próbką, po wprowadzeniu próbki do kapilary ponownie koniec kapilary umieszcza się w naczyniach wypełnionych buforem. W momencie przyłożenia wysokiego napięcia do elektrod następuje rozdział składników próbki.

Substancje rozdzielane metodą elektroforezy kapilarnej wykrywane są przez pomiar charakterystycznych dla nich właściwości fizykochemicznych przy zastosowaniu różnych detektorów, montowanych u wylotu kapilary. Najczęściej stosuje się detektory fluorymetryczne, spektrofotometryczne, elektrochemiczne, spektrometrię masową.

Głównymi zaletami elektroforezy kapilarnej są: małe zużycie odczynników, małe objętości próbek oraz krótkie czasy analiz.



Schemat aparatu do elektroforezy kapilarnej

ANALIZA WITAMIN ROZPUSSZCZALNYCH W WODZIE METODĄ MICELARNEJ CHROMATOGRAFII ELEKTROKINETYCZNEJ

Zastosowanie buforu z dodatkiem surfaktantów w stężeniu przekraczającym krytyczne stężenie micelizacji powoduje powstanie miceli. Micele te podczas elektroforezy działają jako pseudo-stacjonarna faza chromatograficzna, pozwalając na równoczesny rozdział kationów, anionów oraz cząsteczek neutralnych. Metodą tą można rozdzielać i analizować m.in. witaminy rozpuszczalne w wodzie zawarte w preparatach farmaceutycznych.

Cel ćwiczenia:

Oznaczanie wybranych witamin grupy B [tiamina, ryboflawina, kwas nikotynowy, pirydoksyna] w preparacie multiwitaminowym. Analiza ilościowa metodą dodatku wzorca.

Wykonanie:

1. Przygotować system do elektroforezy kapilarnej do pracy poprzez umieszczenie w naczynkach elektrodowych buforu do elektroforezy [50 mM kwas borowy, 20 mM NaCl, 50 mM SDS, pH 9.2. Uwaga: bufor należy przefiltrować przez filtr 0,45 μm i odgazować] oraz 0.1 M NaOH do regeneracji kapilary. Stosowana kapilara: 50 μm x 65 cm [do detektora].
2. Przygotowanie próbek: przygotować 100 μl badanej próbki preparatu farmaceutycznego w odpowiednim rozcieńczeniu. Próbkę przenieść do fiolek do elektroforezy i umieścić w aparacie do elektroforezy.
3. Uruchomić program sterujący DAX i zaprogramować parametry rozdziałów elektroforetycznych :
 - 1/ regeneracja kapilary: 0.1 M NaOH: 2 min @ 2000 mbar
 - 2/ równoważenie buforem: 2 min @ 2000 mbar
 - 3/ pobieranie próbki: 0.1 min @ 50 mbar, 0.01 min zero detector
 - 4/ elektroforeza: 20 min @ 20 kV

Detekcja spektrofotometryczna przy $\lambda = 225 \text{ nm}$

3. Przeprowadzić analizę elektroforetyczną próbki.

4. Do próbki dodać znaną ilość wzorca wybranej witaminy i ponownie przeprowadzić analizę elektroforetyczną. Opisaną czynność powtórzyć jeszcze dwukrotnie.

Opracowanie wyników i dyskusja:

Zidentyfikować wybraną witaminę, sporządzić wykres zależności pola powierzchni odpowiedniego piksu od stężenia użytego standardu i wyznaczyć stężenie witaminy w próbce. Obliczyć błąd względny na podstawie rzeczywistej zawartości witaminy w preparacie (korzystając z danych producenta umieszczonych na opakowaniu) i przedyskutować poprawność otrzymanego wyniku.