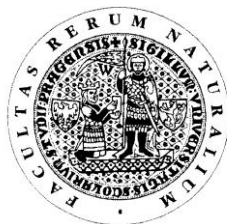


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Petra Podhorná

## ELEKTROFORÉZA V KRÁTKÝCH KAPILÁRÁCH

Electrophoresis in Short Capillaries

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. František Opekar CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a GAČR, projekt č. P206/10/1231.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

podpis

Srdečně děkuji vedoucímu své diplomové práce prof. RNDr. Františkovi Opekarovi CSc., za jeho zájem a ochotu, věcné rady, trpělivost a čas, který mi v průběhu práce věnoval. Dále děkuji Doc. RNDr. Ing. Petru Tůmovi PhD. za odborné konzultace a pomoc při řešení diplomové práce.

## Abstrakt

V laboratoři sestavená aparatura byla použita k elektroforetické separaci v krátké kapiláře. K ověření základních funkcí aparatury byl použit vzorek  $K^+$  a  $Na^+$  iontu. Z naměřených elektroferogramů byly vypočítány základní parametry (separační účinnost, rozlišení, migrační čas). Dále byla na aparatuře separována a detegována uměle připravená směs bazických aminokyselin (arginin, lysin, histidin a jeho deriváty 3-methylhistidin a 1-methylhistidin). Poslední fází bylo stanovení histidinu v reálném vzorku – moči.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, krátká kapilára, bazické aminokyseliny

## Abstract

The laboratory-made apparatus for electrophoretic separations in short capillaries has been tested. The basic functions of the apparatus (separation efficiency, resolution, migration time) have been tested using mixture of  $K^+$  and  $Na^+$  ions. The model mixture of basic amino-acids (arginine, lysine, histidine and its derivatives, 3-methylhistidine and 1-methylhistidine) has also been separated and detected using contactless conductometric detector. Histidine in real sample of urine has also been determined.

Keywords: capillary electrophoresis, short capillary, alkaline aminoacids

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam zkratk  | 7  |
| Předmluva a cíl práce  | 9  |
| 1. Úvod  | 10 |
| 1.1 Kapilární elektroforéza  | 10 |
| 1.1.1 Historie kapilární elektroforézy   | 10 |
| 1.1.2 Princip kapilární elektroforézy  | 10 |
| 1.1.3 Kapilára   | 11 |
| 1.1.4 Efekty uplatňující se při elektroforéze                                    | 12 |
| 1.1.5 Bezkontaktní vodivostní detektor   | 12 |
| 1.1.6 Elektroforéza v krátkých kapilárách a na čipu                              | 13 |
| 1.1.7 Aminokyseliny  | 14 |
| 1.1.8 Elektroforetická separace aminokyselin                                     | 16 |
| 2. Experimentální část   | 18 |
| 2.1 Popis aparatury  | 18 |
| 2.1.1 Elektroforetická část aparatury  | 20 |
| 2.1.2 Detekční část aparatury  | 23 |
| 2.2 Používané chemikálie   | 25 |
| 2.3 Pracovní postup  | 25 |
| 2.4 Vyhodnocování experimentálních výsledků                                      | 26 |
| 3. Výsledky a diskuze  | 28 |
| 3.1 Ověření základních funkcí aparatury  | 28 |
| 3.1.1 Závislost migračního času na velikosti separačního napětí                  | 28 |
| 3.1.2 Závislost separační účinnosti a parametru rozlišení na separačním napětí   | 31 |
| 3.1.3 Závislost separační účinnosti na efektivní délce kapiláry                  | 33 |
| 3.1.4 Závislost odezvy detektoru na koncentraci                                  | 34 |
| 3.1.5 Ověření opakovatelnosti dávkování při použití piezoelektrické pumpy        | 36 |
| 3.2 Separace a detekce bazických aminokyselin                                    | 37 |
| 3.2.1 Separace na kapilárách s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$                | 38 |
| 3.2.2 Porovnání separační účinnosti kapilár s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$ | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.3 Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 25 $\mu\text{m}$ | 44 |
| 3.2.4 Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 10 $\mu\text{m}$ | 46 |
| 3.3 Separace histidinu a jeho derivátů v moči                | 48 |
| 4. Závěr   | 50 |
| Použitá literatura   | 51 |

## Seznam zkratek

|      |   |
|------|---|
| 1-MH | 1-metylhistidin   |
| 3-MH | 3-metylhistidin   |
| Ala  | alanin  |
| AMK  | aminokyselina   |
| Arg  | arginin   |
| CCD  | bezkontaktní vodivostní detekce/detektor<br>( <b>C</b> ontactless <b>C</b> onductivity <b>D</b> etection)           |
| CE   | kapilární elektroforéza<br>( <b>C</b> apillary <b>E</b> lectrophoresis)   |
| CZE  | kapilární zónová elektroforéza<br>( <b>C</b> apillary <b>Z</b> one <b>E</b> lectrophoresis)                         |
| DAD  | detektor diodového pole<br>( <b>D</b> iode <b>A</b> rray <b>D</b> etector)  |
| DNA  | deoxyribonukleová kyselina  |
| EOF  | elektroosmotický tok  |
| Gly  | glycin  |
| His  | histidin  |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie<br>( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography) |
| LIF  | laserem indukovaná fluorescenční detekce<br>( <b>L</b> aser <b>I</b> nduced <b>F</b> luorescence)                   |
| Lys  | lysin   |
| MES  | kyselina morfolinethansulfonová   |
| PEEK | polyether ether keton   |
| PVA  | polyvinylalkohol  |
| TLC  | tenkovrstevná chromatografie<br>( <b>T</b> hin <b>L</b> ayer <b>C</b> hromatography)                                |
| UV   | ultrafialové záření   |

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| $A$         | plocha píku<br>úsek regresní přímky   |
| $B$         | směrnice regresní přímky              |
| $c$         | koncentrace                           |
| $h$         | výška píku                            |
| $H$         | výškový ekvivalent teoretického patra |
| $k_n$       | tabelovaný koeficient                 |
| $K_n$       | tabelovaný koeficient                 |
| $L$         | délka kapiláry                        |
| $l$         | efektivní délka kapiláry              |
| $L_{1/2}$   | interval spolehlivosti                |
| $LOD$       | limit detekce                         |
| $N$         | počet experimentálních bodů           |
| $n$         | počet teoretických pater              |
| $R$         | korelační koeficient<br>rozpětí       |
| $s$         | směrodatná odchylka                   |
| $S_D$       | standardní chyba regresní analýzy     |
| $s_r$       | relativní směrodatná odchylka         |
| $t_{migr}$  | migrační čas                          |
| $U$         | separační napětí                      |
| $w_{1/2}$   | šířka píku v polovině jeho výšky      |
| $\tilde{x}$ | medián                                |
| $\mu_{eff}$ | efektivní mobilita                    |



## Předmluva a cíl práce

Přestože je metoda kapilární elektroforézy stále ve stínu vysokoúčinné kapalinové chromatografie, čím dál více vědeckých skupin a komerčních laboratoří si je vědoma její nesporné výhody. Je to především její jednoduchost a široké uplatnění. Další výhodou je její snadná miniaturizace, která je nyní aktuální ve všech vědních oborech i v průmyslu. Miniaturizace se uskuteční pouhým zkrácením separačního prostřední, tedy kapiláry. Další variantou je využití separace na čipu, která je ale ve srovnání s relativně levnou křemennou kapilárou, poměrně finančně náročná. Jak separace v krátké kapiláře, tak separace na čipu vykazuje vysokou separační účinnost a velmi nízkou spotřebu vzorku. Velké uplatnění má kapilární elektroforéza v klinických laboratořích, kde lze s její pomocí detegovat biologicky aktivní látky a lékařům tak pomáhá diagnostikovat různé nemoci.

**Cílem diplomové práce bylo použít již sestavenou elektroforetickou aparaturu, která k separacím využívá krátké kapiláry. Úkoly, které byly stanoveny:**

- optimalizace aparatury při separaci anorganických iontů
- separace bazických aminokyselin
- srovnání různých typů kapilár
- stanovení histidinu v reálném vzorku – v moči

# 1. Úvod

Cílem předkládané práce je optimalizace aparatury pro elektroforézu v krátkých kapilárách a její využití pro separaci a stanovení biologicky významných látek. Modelovými látkami jsou bazické aminokyseliny, lysin, arginin a histidin a deriváty 1-metyl- a 3-methylhistidin.

## 1.1 Kapilární elektroforéza

### 1.1.1 Historie kapilární elektroforézy

Termínem elektroforéza (slovo pochází z řečtiny a znamená transport pomocí elektriny) se označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic v elektrickém poli [1]. Těmito částicemi mohou být ionty i makromolekuly, např. biologicky významné látky, které nesou náboj.

Pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidních a později i ve vodných roztocích byl popsán roku 1892 [1]. V roce 1937 sestavil švédský elektrochemik Arne Tiselius první elektroforetickou aparaturu a použil ji k separaci proteinů krevního séra [2]. A. Tiseliovi byla roku 1948 za jeho objevy udělena Nobelova cena.

Stellan Hjertén na konci 60. let dvacátého století sestavil první variantu kapilární elektroforézy. K separaci docházelo v rotující skleněné trubici [3].

Kapilární elektroforéza se začala výrazně rozvíjet počátkem 80. let minulého století především díky J. W. Jorgensonovi a K. D. Lukacsové. Zavedli výrobu kapilár z křemenného skla s malými vnitřními průměry a v kapiláře o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  separovali vzorky aminů, dipeptidů nebo aminokyselin. Křehkost kapilár eliminovali potažením vrstvou polyimidu, která zajišťuje mechanickou odolnost [4].

### 1.1.2 Princip kapilární elektroforézy

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je jednou z nejjednodušších a nejpoužívanějších separačních technik. Je to především díky jejím nesporným výhodám jako je relativně jednoduchá instrumentace (není zapotřebí specializovaných pump a dávkovacích zařízení jako např. v HPLC), vysoké rozlišení a účinnost separací,

malá spotřeba vzorku, chemikálií a malé množství odpadu a především rychlost analýzy.

Základním mechanismem CZE je separace jednotlivých analyzovaných iontů, které se liší pohyblivostí, v homogenním prostředí nosného elektrolytu [5]. Ionty se dělí podle náboje, velikosti a tvaru. Nejrychleji putují malé nabitě částice. K separaci dochází v kapiláře, která je vedena přes detektor, který zaznamenává odezvu v závislosti na čase. Výsledný záznam se nazývá elektroferogram. Migrační čas píku analytu určuje kvalitu, jeho výška a plocha kvantitu.

Důležitou roli hraje při separaci volba pH nosného elektrolytu. Náboj u slabých kyselin a bází je závislý na pH prostředí. Dalším příkladem jsou aminokyseliny a proteiny, jejichž celkový náboj závisí na vztahu mezi isoelektrickým bodem a hodnotou pH [6]. pH rovněž určuje velikost elektroosmotického toku (EOF).

### 1.1.3 Kapilára

Separace analytů probíhá v kapiláře. V CZE se nejčastěji používají křemenné kapiláry. Jsou levné, vyrábějí se o různých vnitřních průměrech a dají se snadno keramickým nožem seříznout na požadovanou délku. Vzhledem k tomu, že jsou křehké, pokrývají se vrstvou polyimidu, která se dá snadno odstanit. To je nutné např. v kombinaci s UV detekcí. Silanolové skupiny na vnitřním povrchu kapiláry způsobují elektroosmotický tok [7].

Vnitřní povrch kapiláry podléhá často fyzikálně – chemickým změnám, např. adsorpci složek analytu [8]. V důsledku toho je EOF nestabilní a činí CZE méně reprodukovatelnou separační metodou z hlediska stability migračních časů [9]. EOF se dá potlačit modifikací vnitřního povrchu kapiláry (coating), nevýhodou je ale prodloužení doby analýzy. Stabilní EOF např. vykazují křemenné kapiláry, jejichž vnitřní povrch je modifikován silně kyselými funkčními skupinami [7].

Ve spojení s bezkontaktním vodivostním detektorem je možné použít „plastové“ kapiláry z polyether ether ketonu (PEEK) [10]. PEEK je polymer vykazující vynikající mechanické vlastnosti a vysokou teplotní odolnost a od 80. let 20. století je využíván pro konstrukci dílů ve strojírenství a elektrotechnice. Od roku 1998 se materiál PEEK hojně využívá v medicíně pro konstrukci páteřních implantátů a pro výrobu operačních instrumentů [11].

Délka kapiláry používaná v klasické CZE má délku několik desítek cm, běžně 60 až 80 cm. Trendem posledních let je miniaturizace a zvýšení rychlosti doby analýzy. U CZE lze jednoduše zkrátit délku separačního prostředí a tím vyhovět požadavkům dnešní doby. Kromě zkracování kapilár se v některých případech klasické kapiláry nahrazují skleněnými nebo plastovými čipy [12].

#### 1.1.4 Efekty uplatňující se při elektroforéze

Separace látek je v CZE negativně ovlivněna vznikem Jouleova tepla, difúzí a elektroosmózou. Nežádoucí vlivy se mohou zmírnit vhodnou volbou experimentálních podmínek.

Jouleovo teplo vzniká při průchodu elektrického proudu elektrolytem. Je tedy limitujícím faktorem pro využití vysokých napětí a proudů ve snaze zvýšit rychlost separace. Není – li teplo odváděno, snižuje se účinnost separace. Nejméně tepla se generuje v kapilárách s nejmenším vnitřním průměrem, jimiž v důsledku vysokého odporu teče malý proud.

Látky při analýze putují kapilárou v zónách, na jejichž rozhraní je ostrý koncentrační skok. Difúze způsobuje rozmývání hranic zón, čímž dochází ke snížení separační účinnosti a ke vzniku píku tzv. Gaussovského tvaru.

Elektroosmotický tok je častým transporním jevem v elektromigračních metodách. EOF vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry [5]. Všechny ionty jsou díky EOF unášeny stejnou rychlostí, významně tím ovlivňuje migrační čas analytů, separační účinnost a celkovou dobu analýzy. Výhodou EOF je jeho pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry (hydrodynamický tok má parabolický rychlostní profil), takže jeho příspěvek k disperzi zón analytů je zanedbatelný [5], [13].

#### 1.1.5 Bezkontaktní vodivostní detektor

V roce 1998 uveřejnily dvě vědecké skupiny své články pojednávající o využití bezkontaktní vodivostní detekce (CCD) v kapilární elektroforéze [14], [15]. CCD je vhodný k detekci malých anorganických i organických molekul, které vyvolávají velké změny elektrické vodivosti proti vodivosti separačního elektrolytu. Proto

je vhodné při tomto typu detekce použití málo vodivých pufrů, např. pufru MES/His [16].

Bezkontaktní detektor nemá elektrody v přímém kontaktu se separačním pufrem a analyzovanými látkami. Skládá se ze dvou tubulárních elektrod umístěných sériově kolem kapiláry [14], [15], [17]. Na jednu z elektrod je přiváděn střídavý signál o vhodné frekvenci. Druhá elektroda snímá prošlý signál, usměrňuje ho a zesiluje. Nakonec je signál registrován [18].

Hlavní výhodou bezkontaktní detekce je její univerzálnost a jednoduchost. Analyzované látky nemusí absorbovat UV záření nebo být derivatizovány jak je tomu často u UV nebo fluorescenční detekce [19].

### 1.1.6 Elektroforéza v krátkých kapilárách a na čipu

Doba separace při klasickém uspořádání kapilární elektroforézy je průměrně 5 – 30 minut. Různé typy analýz, např. sledování kinetiky biochemických i chemických reakcí, ale vyžadují mnohem kratší dobu separace. Jedním z řešení je zkrácení separačního prostředí využitím krátké kapiláry nebo separace na čipu.

#### *Elektroforéza na čipu*

Prvním přístrojem na bázi mikročipů byl plynový chromatograf zkonstruovaný v roce 1979 [20]. Přestože se přístroj neujal, mikročipy se začaly uplatňovat především v kapilární elektroforéze.

První práce pojednávající o elektroforéze prováděné na čipu byly publikovány v roce 1992 [21], [22]. Vzhledem k výhodám, které elektroforéza na čipu poskytuje, se uplatňuje při analýzách proteinů [23], separaci DNA a DNA sekvenování [24], analýzách potravin [25] a léčiv [26].

Nevýhodou analýzy na čipu je především jeho vysoká cena oproti klasickým křemenným kapilárám.

#### *Elektroforéza v krátkých kapilárách*

Krátkou kapilárou se rozumí kapilára dlouhá řádově jednotky centimetrů. V komerčních elektroforetických sestavách nelze z konstrukčních důvodů využít kapiláru kratší než 20 – 30 cm. Mnohem výhodnější je z hlediska zkrácení separační dráhy u komerčních sestav využití dávkování vzorku do výstupního konce kapiláry [27]. Existují i specializované aparatury s krátkou kapilárou. Často se sestavují

v laboratořích a jsou to v podstatě zmenšené standardní elektroforetické sestavy. Konce kapiláry jsou umístěny v nádobkách, v nichž jsou separační elektrody. Nádobky jsou naplněny separačním elektrolytem. Vzorek je nejčastěji dávkován elektrokineticky. Na aparaturách s tímto uspořádáním byly analyzovány anorganické anionty ve vzorku sněhu [28], lidokain a ofloxacin ve vzorcích moči [29], chinolony v léčivech [30]. Stejně jako u separace na čipu, lze krátkých kapilár využít k separaci fragmentů DNA [31-34]. Podrobně je o separacích v krátkých kapilárách pojednáno v referátovém článku [35] v časopise Chemical Reviews.

### 1.1.7 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické látky s aminoskupinou na uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou. Ve všech živých organismech jsou proteiny složeny z dvaceti biogenních neboli proteinogenních aminokyselin. Některé aminokyseliny (neesenciální) si lidský organismus dokáže syntetizovat sám, jiné (esenciální) musí přijímat v potravě. Mezi esenciální aminokyseliny řadíme valin, leucin, isoleucin, lysin, methionin, threonin, fenylalanin a tryptofan. Jako semiesenciální označujeme aminokyseliny, které jsou nepostradatelné pro vývoj v dětském věku a řadíme mezi ně histidin a arginin.

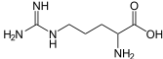
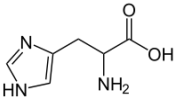
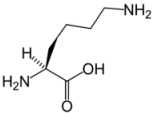
Kromě glycinu mají aminokyseliny na  $\alpha$ -uhlíku chirální centrum a jsou opticky aktivní. V přírodě nacházející se aminokyseliny mají konfiguraci L. Jsou to krystalické, bezbarvé látky, rozpustné v polárních rozpouštědlech.

Aminokyseliny s jednou karboxylovou a jednou aminoskupinou (např. Gly, Ala) jsou ve stavu bipolárního iontu (zwitterion). Mají tedy amfoterní charakter a mohou se chovat jako kyseliny nebo zásady a jejich náboj je určen hodnotou pH. Při nízkém pH je to kladný náboj a naopak. Při určitém pH, tzv. izoelektrický bod, má aminokyselina jako celek nulový náboj.

V případě, že AMK nese dvě aminoskupiny a jednu karboxylovou, jedná se o zásaditou AMK, která je při fyziologickém pH kladně nabitá a její isoelektrický bod je v zásadité oblasti (7,6 – 10,8). Mezi zásadité aminokyseliny patří arginin, histidin a lysin.

Za zásaditou povahu Arg odpovídá jeho guanidinová skupina, Lys má butylamoniový postranní řetězec. Histidinu dává bazický charakter imidazolová část molekuly. Při hodnotě pH 6,0 je tato imidazolová skupina disociována z 50 %, a proto je His v zásadité oblasti fyziologického pH neutrální. Právě proto se často účastní katalytických reakcí enzymů [36].

**Tabulka 1.1. Přehled bazických aminokyselin**

| Vzorec  | Triviální název | Zkratky | Izoelektrický bod |
|---|-----------------|---------|-------------------|
|  | Arginin         | Arg R   | 10,8              |
|  | Histidin        | His H   | 7,6               |
|  | Lysin           | Lys K   | 9,7               |

V roce 1889 byl Drechslerem izolován lysin z hydrolyzátu kaseinu. Původní název lysatin z řeckého lýsis – rozklad, byl zkrácen na lysin. Arginin byl získán v roce 1886 z etiolovaného vličího bobu. Původ názvu je z řeckého slova argentum – stříbro, protože s kyselinou dusičnou tvoří lesklé stříbrné krystaly. Histidin byl v roce 1896 poprvé izolován německým biochemikem Albrechtem Kosselem z hydrolyzátu protaminu z mlíčí jesetera. Název dostal podle řeckého slova histós – tkáň. Mezi poruchy metabolismu histidinu řadíme imidazolaminoacidurii a histidinémií. Nemoci jsou spojeny s poruchami duševního vývoje [37].

Derivát histidinu, 3-methylhistidin slouží jako ukazatel míry degradace kontraktilních proteinů (aktinu a myosinu) svalové tkáně. Vzniká metylací postranního řetězce histidinu během post-translační modifikace. 3-methylhistidin už není dál metabolizován a je vyloučen z těla močí [38]. Množství dalšího derivátu histidinu, 1-methylhistidinu, v moči určuje míru konzumace masa [39].

### 1.1.8 Elektroforetická separace aminokyselin

Aminokyseliny (AMK) jsou základní stavební kameny proteinů. Proteiny jsou v těle složkou všech tkání. Tam se také proteiny štěpí na jednotlivé aminokyseliny a z aminokyselin se znovu vytvářejí nové proteiny. Aminokyseliny jsou v organismu transportovány rozpuštěné v krevní plazmě. Můžeme je však najít i v jiných tělných tekutinách, jako je moč, plodová voda a tkáňový a mozkomíšni mok. Stanovení aminokyselin v těchto biologických tekutinách je důležité z hlediska klinické praxe. Vytváří obraz výživového stavu organismu a nestandardní hladina aminokyseliny může poukazovat na některou z vrozených poruch metabolismu této AMK.

Standardně je pro stanovení aminokyselin v laboratoři využíváno iontově-výměnné chromatografie nebo chromatografie na chemicky vázaných fázích s postkolonovou derivatizací ninhydrinem [40], TLC nebo HPLC [41]. Kapilární elektroforéza má velký potenciál pro stanovení aminokyselin v biologických matricích.

Důležitou součástí experimentů je především výběr vhodného typu detekce. Pouze čtyři proteinogenní aminokyseliny (fenylalanin, tyrozin, tryptofan a histidin) absorbují v UV oblasti spektra. Fotometrická UV detekce a laserem indukovaná fluorescence jsou i přesto nejpoužívanějšími detekčními technikami. Problém chybějících chromoforů a fluoroforů je řešen derivatizací [42].

Nejvýhodnějším postupem je výběr typu detekce, který umožňuje stanovení všech aminokyselin v jejich nativní formě, jako je např. nepřímá UV detekce nebo detekce vodivostní. Nepřímá UV detekce pracuje na principu přidavku silně absorbující látky do separačního pufru. Zóna separovaného analytu má potom nižší koncentraci absorbujícího iontu než je jeho koncentrace v okolním elektrolytu. Po průchodu zóny analytu detektorem se na elektroferogramu objeví záporný pík [43].

Univerzální detekční technikou je vodivostní detekce založená na rozdílné vodivosti analytů a okolního separačního pufru. Jednoduše lze stanovit malé anorganické ionty v reálných matricích jako je pitná voda. V literatuře najdeme publikace zabývající se stanovením a separací organických molekul typu monosacharidů a disacharidů [44], peptidů [45] a aminokyselin [46-52].

Separace dvaceti proteinogenních AMK v krevní plazmě a plodové vodě [46], [47] proběhla v octové kyselině s přidavkem (hydroxyethyl)celulozy. V experimentu bylo



využito bezkontaktní vodivostní detekce. V kapiláře o délce 80 cm, k detektoru 67 cm a vnitřním průměru křemenné kapiláry 75  $\mu\text{m}$  se AMK rozdělily do 60 minut.

Coufal a kolektiv také elektroforeticky separovali dvacet AMK s využitím stejného typu detekce [48]. Byl použit i stejný separační elektrolyt. Na kapiláře o délce 80 cm, k detektoru 66,5 cm a o vnitřním průměru kapiláry 50  $\mu\text{m}$  se aminokyseliny rozdělily za 30 minut.

Stanovení 1-methylhistidinu a 3-methylhistidinu [49] v moči bylo provedeno v klasickém uspořádání kapilární elektroforézy i s využitím separace na čipu. Délka kapiláry byla 80 cm, k detektoru 67 cm a vnitřní průměrem kapiláry byl 75  $\mu\text{m}$ . Délka separačního kanálku byla 53 mm. K separaci byla použita octová kyselina a hydroxid amonný s přídavkem hydroxyethylcelulozy. Článek vyhodnocuje oba typy separace jako srovnatelné.

**Tabulka 1.2. Příklady stanovení aminokyselin v biologických matricích kapilární elektroforézou**

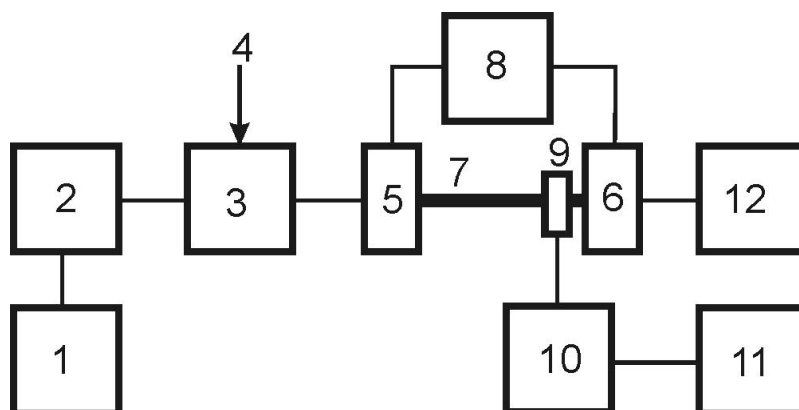
| Typ separace                               | Typ detekce | Biologická matrice | Analyt                         | Reference |
|--|-------------|--------------------|--------------------------------|-----------|
| kapilára 80/67 cm<br>(75 $\mu\text{m}$ )   | CCD         | plodová voda       | proteinogenní<br>aminokyseliny | [51]      |
| kapilára 80/67 cm<br>(75 $\mu\text{m}$ )   | CCD         | krevní plasma      | proteinogenní<br>aminokyseliny | [46]      |
| čip<br>53 mm                               | CCD         | moč                | His, 1MH, 3MH                  | [49]      |
| kapilára 80/67 cm<br>(75 $\mu\text{m}$ )   | CCD         | moč                | His, 1MH, 3MH                  | [49]      |
| kapilára 65/56,5 cm<br>(75 $\mu\text{m}$ ) | DAD         | moč                | His, 1MH, 3MH                  | [50]      |
| kapilára 85/50 cm<br>(50 $\mu\text{m}$ )   | LIF         | lidské sérum       | deriváty Arg                   | [52]      |

## 2. Experimentální část

Základní sestava aparatury pro elektroforézu v krátkých kapilárách byla převzata z diplomové práce [53], avšak na základě výsledků prvních testů byla provedena její optimalizace a zásadní modernizace.

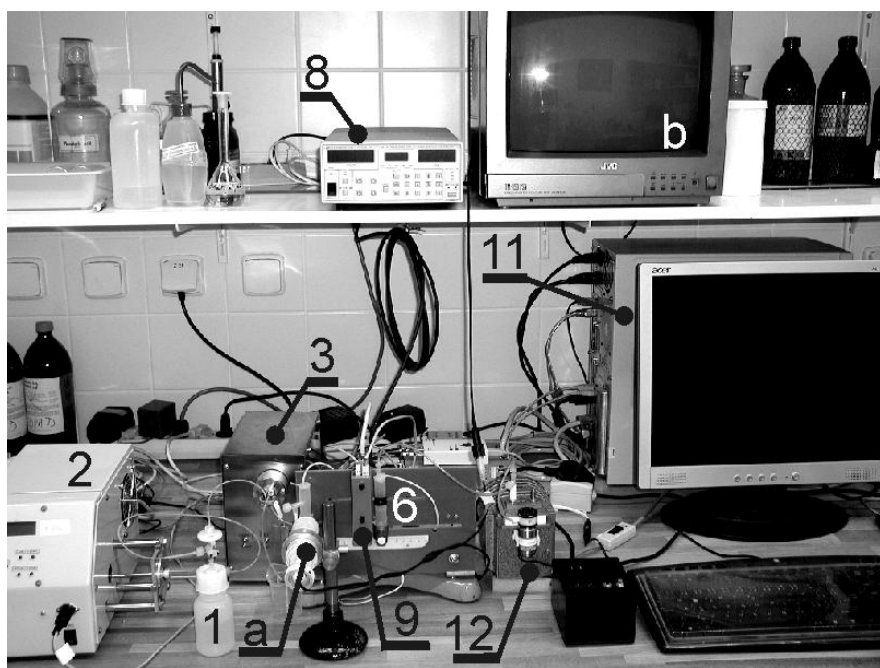
### 2.1 Popis aparatury

Blokové schema aparatury je na obr. 2.1. S krátkou kapilárou nelze manipulovat stejně, jako s kapilárami dlouhými několik desítek centimetrů, které jsou používány ve standardních elektroforetických sestavách. Proto musí být aparatura navržena tak, aby všechny potřebné experimentální kroky, především dávkování vzorku a promývání kapiláry, bylo možno provést, aniž je nutno s kapilárou pohybovat. V původním experimentálním uspořádání byla pro dávkování použita pístová lineární pumpa, v modernizované verzi piezoelektrická mikropumpa. Na obr. 2.2 jsou fotografie aparatury a na obr. 2.3 je detail části aparatury se separační kapilárou.

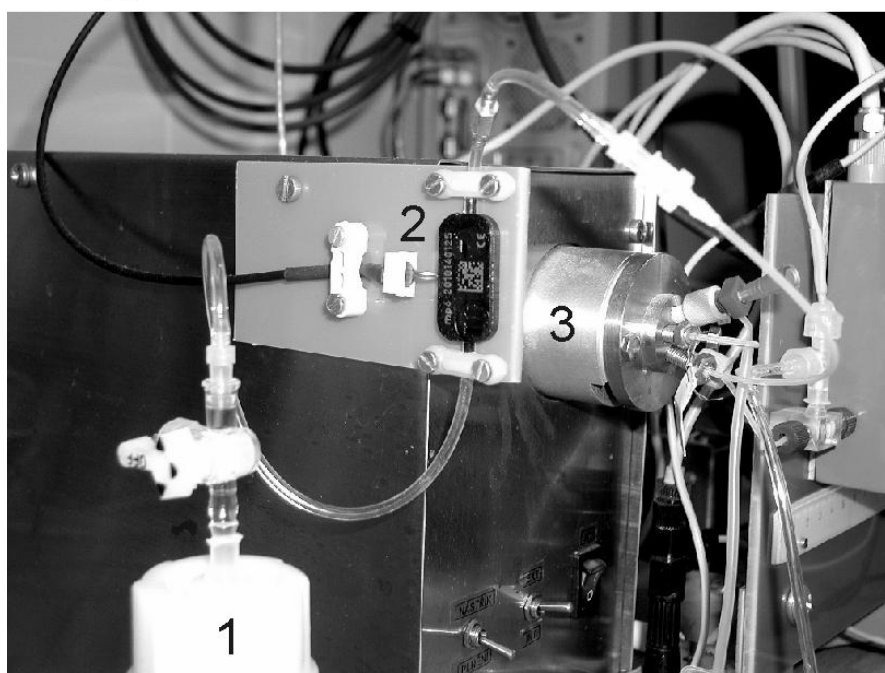


*Obr. 2.1. Blokové schema elektroforetické sestavy pro elektroforézu v krátkých kapilárách podle [53].*

*1 - zásobník základního elektrolytu, 2 - dávkovací pumpa, 3 - šesticečný dávkovací ventil, 4 - plnění dávkovací smyčky, 5 - dávkovací zařízení (schema viz obr. 2.4), 6 - koncová nádobka, 7 - separační kapilára, 8 - zdroj vysokého napětí, 9 - detektor (detail viz obr. 2.3), 10 - elektronika detektoru, 11 - řídicí počítač, 12 - promývací pumpa.*



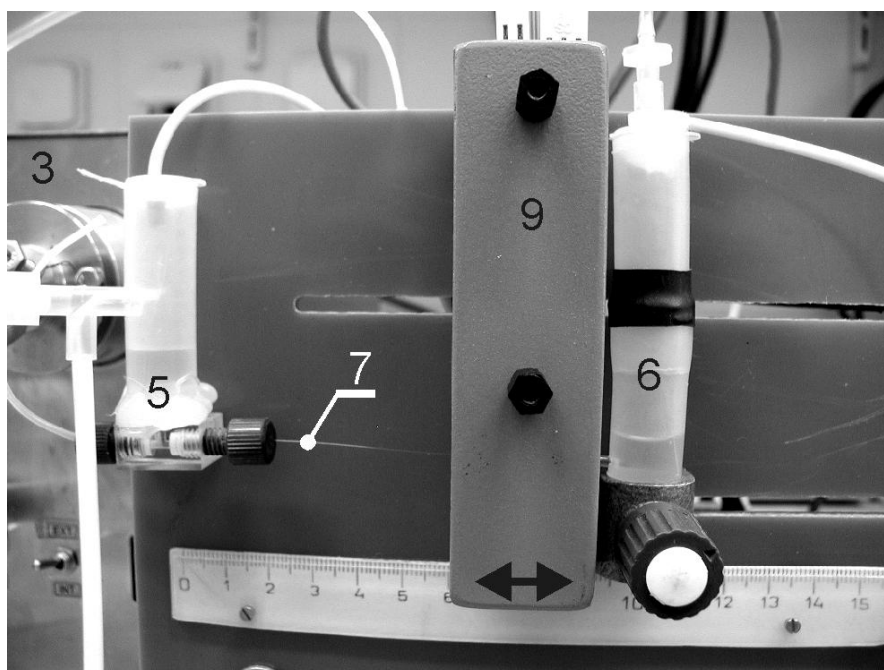
**A**



**B**

*Obr. 2.2. Fotografie aparatury pro elektroforézu v krátkých kapilárách (čísla jednotlivých komponent jsou shodná s čísly v blokovém schématu na obr. 2.1).*

*A – sestava s pístovou lineární pumpou (a - kamera snímající dávkovací konec kapiláry, b - monitor, tyto části nejsou v blokovém schématu uvedeny). B – detail s piezoelektrickou mikropumpou umístěnou na těle elektromagnetického dávkovacího ventilu.*



**Obr. 2.3. Detail umístění kapiláry mezi dávkovacím zařízením a koncovou nádobkou (číslování jednotlivých částí je stejné jako v blokovém schématu na obr. 2.1).**

**Změnou pozice detekční cely lze měnit délku kapiláry mezi dávkovacím zařízením a detektorem.**

### 2.1.1 Elektroforetická část aparatury

Pístová lineární pumpa (2), (Labio, ČR) nebo piezoelektrická mikropumpa, typ mp6 (Bartels mikrotechnik, Germany).

Elektronicky ovládaný dávkovací ventil smyčkový (3), typ C102M (Labio, ČR) s dávkovací smyčkou o objemu 15  $\mu\text{l}$ . Smyčka byla plněna injekční stříkačkou (4).

Vvysokonapětový zdroj (8), typ PS 350/5000 (Stanford Research Systems, USA).

Testované separační kapiláry (7):

- a) křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 a 50 a 25  $\mu\text{m}$  (Composite Metal Services, GB);
- b) křemenná kapilára s vnitřním PVA povlakem o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Germany);
- c) plastová PEEK kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (VICI AG International, Switzerland).

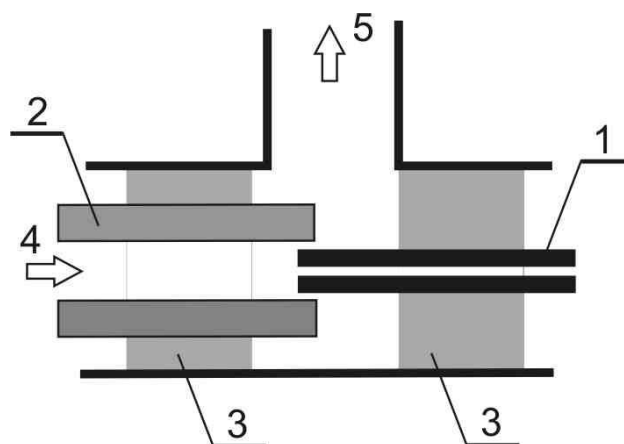
Testovány byly kapiláry o celkové délce 10 cm (pokud není uvedeno jinak) a různé

efektivní délce, tj. délce od dávkovacího konce k detektoru (od 4 cm; kratších efektivních délek kapilár nebylo možno z mechanických důvodů používat). Kapilára byla mezi jednotlivými analýzami promývána definovanou dobu podtlakem generovaným membránovým čerpadlem (12), typ M 401 (JZD Výčapy, ČR).

Elektroforetické elektrody byly platinové drátky umístěné v malých rezervoárech separačního pufu, zemní elektroda byla v dávkovacím zařízení (5), vysokonapěťová v koncové nádobce za detektorem (6).

Vzorek byl do kapiláry dávkován v jednoduchém zařízení (5) jehož schema je na obr. 2.4; princip dávkování byl převzat z práce [54]. Přírodní PTFE trubička (Supelco, USA) měla vnější průměr 1,58 mm a vnitřní průměr 0,8 mm. Vzorek byl do kapiláry nadávkován tak, že současně s přepnutím dávkovacího ventilu do polohy „inject“ byla na definovanou dobu zapnuta dávkovací pumpa. Objem vzorku z dávkovací smyčky byl nesený proudem separačního pufu kolem dávkovacího konce kapiláry. Doba dávkování tak byla řízena dobou, po kterou protékala kolem kapiláry zóna roztoku vzorku. Dávkování bylo prováděno bez přerušení vysokého napětí na elektroforetických elektrodách, takže bylo dávkováno kombinovaným způsobem – hydrodynamicky a elektrokineticky. Při používání pístové pumpy bylo dávkováno po dobu 5 s s průtokovou rychlostí separačního pufu  $1520 \mu\text{l s}^{-1}$ ; Za těchto podmínek byla zóna vzorku v kontaktu s dávkovacím koncem kapiláry asi 1 s (měřeno při nadávkování vzduchové bublinky místo roztoku vzorku). Při použití piezoelektrické mikropumpy bylo dávkováno rovněž 5 s při průtokové rychlosti  $1520 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ ; zóna vzorku byla v kontaktu s dávkovacím koncem kapiláry 0,3 s.

Dávkovací konec kapiláry, na němž se mohou zachytit malé bublinky vzduchu, byl monitorován kamerou. Případné bublinky je nutno odstranit, protože ovlivňují dávkování vzorku.

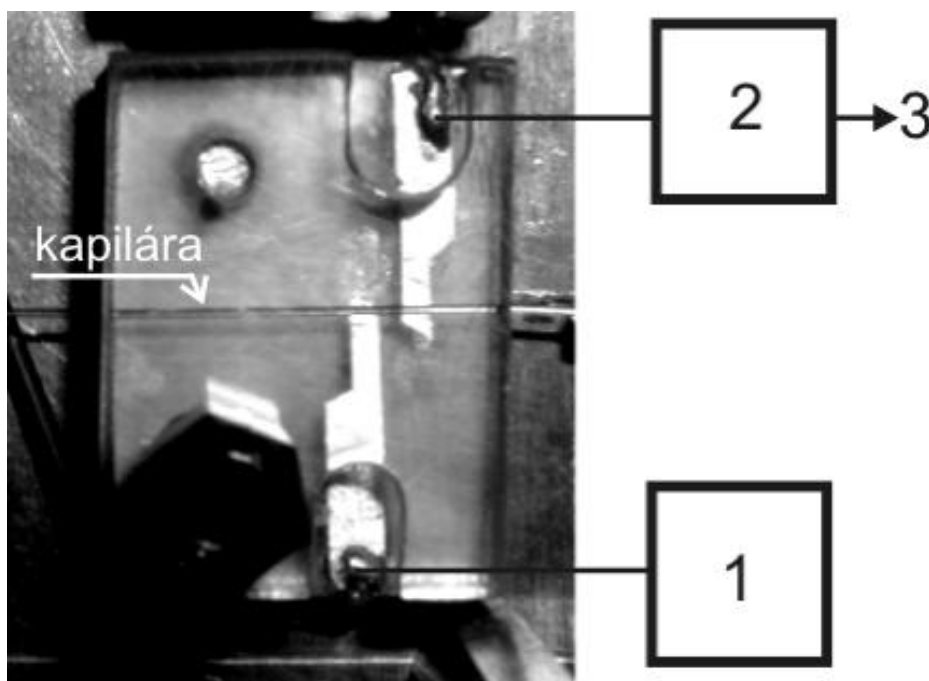


**Obr. 2.4. Schema dávkovacího zařízení.**

*Dávkovací konec separační kapiláry (1) zasahuje do přívodní PTFE trubičky (2). Proud separačního pufru (4) nesoucí zónu analytu z dávkovací smyčky protéká teflonovou trubičkou kolem kapiláry a dochází k nadávkování vzorku. Po dobu dávkování odtéká separační pufr trubičkou (5) do malého rezervoáru v němž je umístěna zemnicí elektroforetická elektroda. Přívodní trubička a kapilára jsou fixovány ve stabilních polohách silikonovým těsněním (3)*

## 2.1.2 Detekční část aparatury

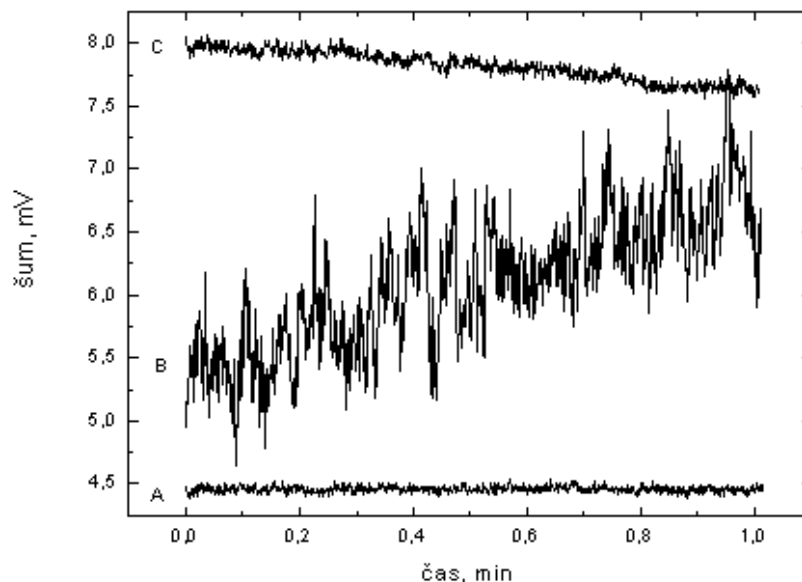
Bezkontaktní vodivostní detektor byl vyrobený v laboratoři a jeho podrobné schema je uvedeno např. v publikaci [55]. Detekční cela, obr. 2.5, obsahuje dvě semitubulární elektrody z hliníkové fólie o šířce 1 mm, s mezerou mezi nimi rovněž 1 mm, vlepěné v drážce, vytvořené v plexisklové destičce, o průměru rovném vnějšímu průměru kapiláry. Kapilára je k elektrodám přitížena druhou plexisklovou destičkou. Detekční cela je od okolního prostředí odstíněna kovovou skříňkou.



**Obr. 2.5. Detail detekční cely bezkontaktního vodivostního detektoru se semitubulárními elektrodami. 1 – generátor střídavého napětí, 2 – měřidlo proudu (usměrňovač a zesilovač), 3 – výstup k počítači.**

Na základě výsledků prvních testů aparatury byla provedena změna v elektronické části detektoru. Při použití komerčního digitálního generátoru vstupního střídavého napětí pro bezkontaktní vodivostní celu, typ FG 503 firmy Motech (Taiwan), byl zjištěn šum základní linie asi 1 mV. Vzhledem k tomu, že šum samotného zesilovače zpracovávajícího signál z detekční cely byl při odpojení cele pouze 0,1 mV, byly testovány i jiné zdroje vstupního střídavého signálu. Jako optimální se ukázal laboratorně sestavený analogový zdroj s integrovaným obvodem MAX 038 (Maxim, USA) [56], při jehož použití byl šum základní linie srovnatelný se šumem samotného

zesilovače, asi 0,13 mV, viz obr. 2.6. Ve všech dalších měřeních byl proto používán tento zdroj střídavého napětí sinusového průběhu o konstantní frekvenci 320 kHz a amplitudě 18 Vpp (peak-to-peak).



**Obr. 2.6.** Časový záznam šumu bezkontaktního vodivostního detektoru s různými zdroji vstupního střídavého signálu.

*A – šum zesilovače při odpojené detekční cele, B – šum detektoru s detekční celou k níž byl přiveden střídavý signál z generátoru FG 503, C – šum detektoru v němž byl použit generátor s obvodem MAX 038. Při všech měřeních byla použita frekvence sinusového napětí 320 kHz a amplituda 18 Vpp. Separační kapilára byla prázdná, tj. bez roztoku pufry.*

Dávkování vzorku, tj. přepínání dávkovacího ventilu a ovládání dávkovací pumpy bylo řízeno počítačem pomocí programu vytvořeného v prostředí LabView (National Instruments, USA). Pro převod řídicích signálů z počítače na měřicí aparaturu byla použita univerzální měřicí karta PCI-6034E (National Instruments, USA). Tato karta může být použita rovněž pro sběr dat z detektoru, avšak místo ní byl použit externí převodník Panther 1000 (Ecom, ČR). Tento převodník umožňuje převod analogového signálu na signál digitální rychleji a s vyšším rozlišením než uvedená univerzální karta, což je pro rychlé separace v krátkých kapilárách důležité. Sběr dat převodníkem Panther a záznam dat do paměti počítače bylo ovládáno programem Ecomac 0.97 (Ecom, ČR).



## 2.2 Používané chemikálie a roztoky

- deionizovaná voda, Milli – Q Plus, Millipore, USA
- chlorid sodný, p.a., LACHEMA a.s., ČR
- chlorid draselný, SCHERING a.g. Berlin, DE
- chlorid hořečnatý – hexahydrát, p.a., LACHEMA a.s., ČR
- chlorid barnatý – dihydrát, p.a., LACHEMA a.s., ČR
- chlorid vápenatý, p.a., LACHEMA a.s., ČR
- 2 – morfolinethansulfonová kyselina – monohydrát, > 99 %, MERCK
- kyselina boritá, pro elektroforézu, SIGMA – ALDRICH
- hydroxid lithný – monohydrát, MERCK
- hydroxid sodný,  $\geq 98$  %, SIGMA
- kyselina octová,  $\geq 99$  %, FLUKA
- L – Histidin, > 99 %, MERCK
- 3 – methyl – L – histidin, SIGMA – ALDRICH
- N – methyl – L histidin,  $\geq 98$  %, FLUKA
- acetonitril, > 99,8 %, SIGMA – ALDRICH
- L – Lysin – monohydrát, > 98,5 %, ROTH, DE
- L – Arginin,  $\geq 98$  %, SIGMA – ALDRICH

## 2.3 Pracovní postup

Z plastové lahvičky s pufrem byla plněna pumpa, ze které byl separační pufř dál vháněn do aparatury. Před každým měřením se kapilárou naplněnou pufrem nechal po dobu 20 minut procházet elektrický proud při separačním napětí 5 kV. Vzorek byl nadávkován do toku separačního pufřu. Při daném napětí tedy v kapiláře docházelo k separaci. Podle zvolených experimentálních podmínek trvala separace několik vteřin až minut. Po skončení separace byla kapilára po dobu deseti sekund promývána pufrem. Intervaly mezi jednotlivými separacemi trvaly přibližně jednu minutu. Po celou dobu experimentu nebylo separační napětí vypínáno.

## 2.4 Vyhodnocování experimentálních výsledků

Plochy, migrační časy, výšky a šířky píků v polovině výšky byly z elektroferogramů vyhodnocovány programem Origin 6.0 (Microcal Software, USA).

Střední hodnota souboru měření byla odhadnuta použitím mediánu. Rozpětí bylo vypočteno podle vztahu (2-1), směrodatná odchylka podle vztahu (2-2), relativní směrodatná odchylka podle vztahu (2-3) a interval spolehlivosti podle vztahu (2-4).

$$R = x_{\max} - x_{\min}, \quad (2-1)$$

je rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty.

$$s = k_n \cdot R, \quad (2-2)$$

kde  $k_n$  je tabelovaný koeficient.

$$s_r = 100 \cdot \frac{s}{\tilde{x}}, \quad (2-3)$$

kde  $\tilde{x}$  je medián souboru měření.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R, \quad (2-4)$$

$K_n$  je tabelovaný koeficient. Hodnoty tabelovaných koeficientů byly převzaty ze skript [57].

Separační účinnost je dána počtem teoretických pater  $n$  a výškovým ekvivalentem teoretického patra  $H$ :

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{migr,i}}{w_i} \right)^2 = 5,545 \cdot \left( \frac{t_{migr,i}}{w_{1/2,i}} \right)^2 \quad (2-5)$$

$$H = \frac{l}{n}, \quad (2-6)$$

kde  $t_{mig}$  je migrační čas analytu,  $w_j$  je šířka píku při základně,  $w_{1/2,j}$  je šířka píku v polovině jeho výšky a  $l$  je délka kapiláry k detektoru.

Míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků charakterizuje rozlišení  $R$ :

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{migr,i} - t_{migr,j})}{w_i + w_j}. \quad (2-7)$$

Při určování efektivní elektroforetické mobility,  $\mu_{eff}$  [ $\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$ ], bylo využíváno následujících vztahů:

$$\mu_i = \frac{lL}{t_{migr,i}U} \quad (2-8)$$

$$\mu_{eof} = \frac{lL}{t_{eof}U} \quad (2-9)$$

$$\mu_{eff} = \frac{lL}{t_{migr,i}U} - \frac{lL}{t_{eof}U} = \frac{lL}{U} \left( \frac{1}{t_{migr,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (2-10)$$

$$\mu_{eff} = \mu_i - \mu_{eof} \quad (2-11)$$

kde  $\mu_{eff}$  je efektivní mobilita [ $\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$ ],  $L$  [cm] je celková délka kapiláry a  $l$  [cm] délka k detektoru,  $U$  [V] je hodnota separačního napětí a  $t_{eof}$  [s] je doba průchodu neiontové látky kapilárou určená z elektroferogramu.

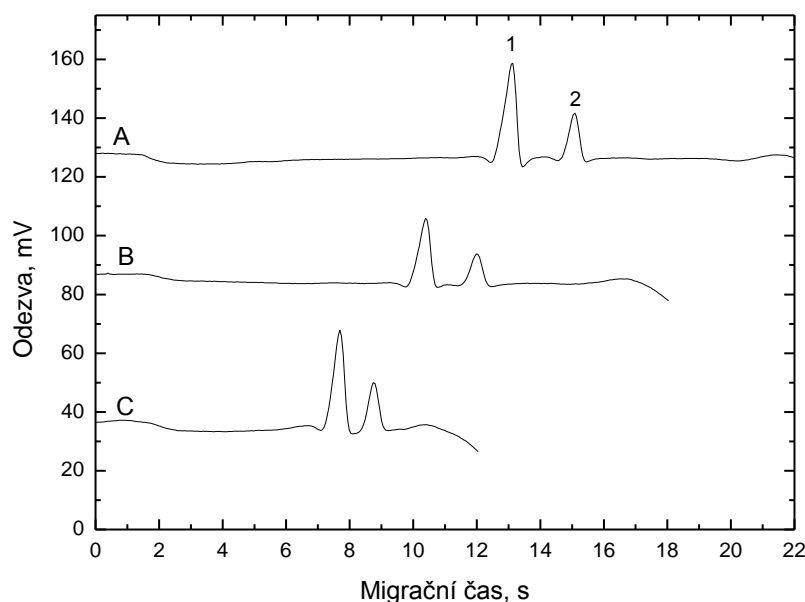
Limit detekce udává, jaké nejmenší množství analytu lze danou metodou detekovat. Podle normy IUPAC je detekční limit definován jako trojnásobek směrodatné odchylky signálu, který je získán opakovaným měřením vzorku, podělený citlivostí. Pro výpočet limitu detekce byl použit parametr standardní chyba regresní přímky  $S_D$ , a její směrnice  $B$ :

$$LOD = \frac{3S_D}{B} \quad (2-12)$$

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Ověření základních funkcí aparatury

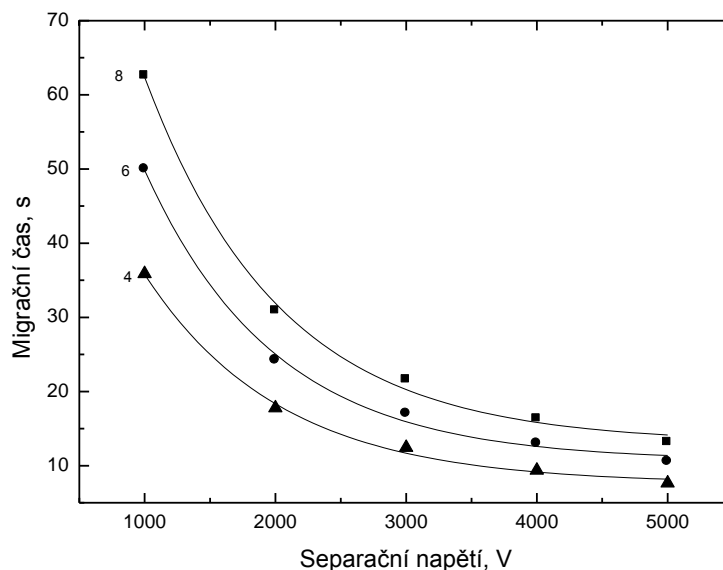
Všechny dále uváděné výsledky (pokud není uvedeno jinak) byly získány s kapilárou o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm, efektivní délky 8, 6 a 4 cm. Analyzovaná směs  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$  iontů ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) byla dávkována ve vodě. Separační pufr byl 20 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ +10 mM LiOH (pH 9,3) nebo 20 mM HAc + 10 mM LiOH (pH 4,7). Dávkovací smyčka v šesticeštném ventilu byla 15  $\mu\text{l}$ , průtok pufru v době dávkování byl 1520  $\mu\text{l/s}$ , doba dávkování 5 s. Separační napětí bylo 1 až 5 kV. Ilustrační příklad elektroferogramů, z nichž byly vyhodnocovány sledované parametry, je na obr. 3.1.



**Obr. 3.1.** Elektroferogram směsi vodného roztoku  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$  iontu při separačním napětí 5 kV v kapiláře o celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (A), 6 cm (B) a 4 cm (C). Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Na}^+$ .

##### 3.1.1 Závislost migračního času na velikosti separačního napětí

Na obr. 3.2. je uvedena závislost migračního času na separačním napětí. Z grafu vyplývá že migrační čas s rostoucím separačním napětím klesá. Charakter závislosti je obdobný i pro sodný ion a rovněž pro separaci v acetátovém pufru.



**Obr. 3.2. Závislost migračního času na separačním napětí pro  $K^+$  v boritanovém pufru pro kapiláry o efektivní délce uvedené v cm u křivek. Další experimentální podmínky viz text.**

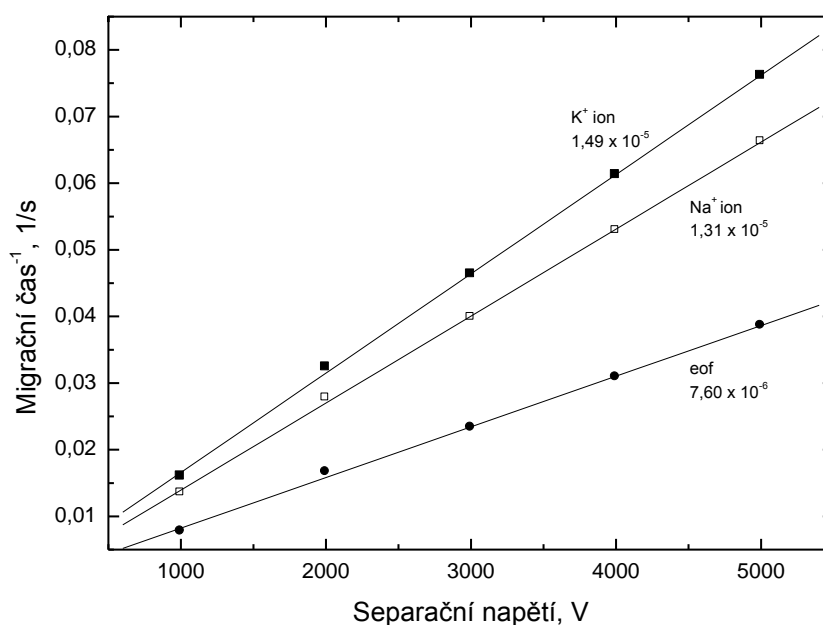
Závislost migračního času na velikosti separačního napětí lze využít pro určení efektivní mobility příslušných iontů (viz kap 2.4). V tabulkách 3.1 a 3.2 jsou uvedena experimentálně naměřená data použitá k výpočtu efektivních mobilit. Z rov. (2-8) a (2-9) plyne, že závislost převrácené hodnoty migračního času iontu či doby průchodu nenabitě látky na separačním napětí je lineární se směrnici rovnou  $\mu_i/lL$  resp.  $\mu_{eof}/lL$ . Na obr. 3.3 jsou uvedeny tyto závislosti pro  $K^+$  a  $Na^+$  ion v boritanovém pufru. Z takto zjištěných směrnic a známých délek  $l$  a  $L$  lze určit mobility  $\mu_i$  a  $\mu_{eof}$ , a použít je dle rov. (2-11) k výpočtu efektivní elektroforetické mobility.

**Tabulka 3.1. Experimentální hodnoty migračních časů použitých k určení efektivních mobilit  $K^+$   $Na^+$  iontu v borátovém pufru (20 mM  $H_3BO_3$  + 10 mM LiOH, pH = 9,3). Další experimentální podmínky viz text.**

| $U$ [V] | $K^+, t_{migr,i}$ [s] | $Na^+, t_{migr,i}$ [s] | $t_{eof,water\ gap}$ [s] |
|---------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| 1000    | 62,6 ± 2,2            | 74,0 ± 3,0             | 129,7 ± 2,0              |
| 2000    | 30,9 ± 2,4            | 36,0 ± 3,6             | 60,1 ± 13,3              |
| 3000    | 21,6 ± 0,1            | 25,1 ± 0,1             | 42,9 ± 0,7               |
| 4000    | 16,3 ± 0,1            | 18,9                   | 32,4 ± 0,5               |
| 5000    | 13,1 ± 0,1            | 15,1 ± 0,1             | 25,9 ± 0,4               |

**Tabulka 3.2.** Experimentální hodnoty migračních časů použitých k určení efektivních mobilit  $K^+$   $Na^+$  iontu v acetátovém pufru (20 mM HAc + 10 mM LiOH, pH = 4,67). Další experimentální podmínky viz text.

| $U$ [V] | $K^+, t_{migr,i}$ [s] | $Na^+, t_{migr,i}$ [s] | $t_{eof,water\ gap}$ [s] |
|---------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| 1000    | $92,5 \pm 6,8$        | $124,2 \pm 10,8$       | $480,6 \pm 161,4$        |
| 2000    | $44,2 \pm 0,7$        | $57,3 \pm 1,2$         | $177,6 \pm 7,8$          |
| 3000    | $29,5 \pm 1,2$        | $37,9 \pm 1,9$         | $117 \pm 13,3$           |
| 4000    | $21,1 \pm 0,4$        | $26,6 \pm 0,5$         | 75,0                     |
| 5000    | $16,3 \pm 0,2$        | $20,3 \pm 0,3$         | $55,8 \pm 1,6$           |



**Obr. 3.3.** Příklad závislosti převrácené hodnoty pozorovaného migračního času na velikosti separačního napětí použitý pro určení efektivní elektroforetické mobility  $K^+$  a  $Na^+$  iontu v boritanovém pufru. Kapilára o efektivní délce 8 cm. Směrnice v  $s^{-1}V^{-1}$  jsou uvedeny u jednotlivých závislostí.

Zjištěné hodnoty efektivních mobilit jsou v tabulce 3.3.

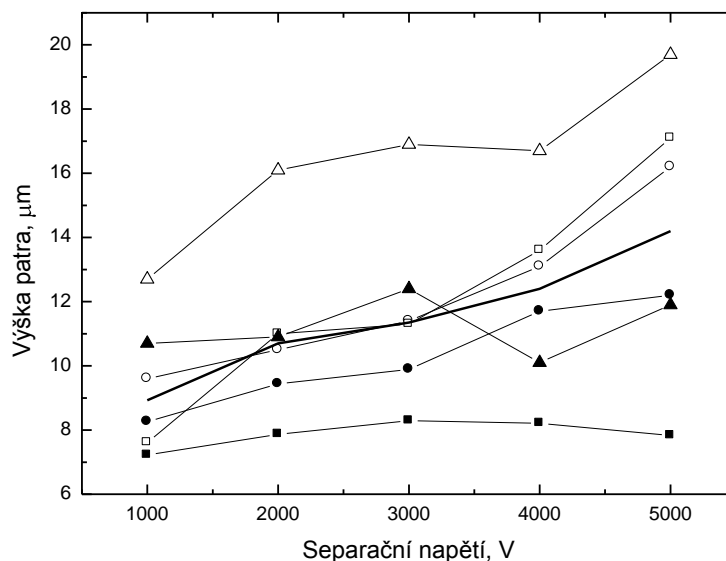
**Tabulka 3.3. Hodnoty zjištěných efektivních mobilit  $K^+$  a  $Na^+$  iontů v borátovém a acetátovém pufru.**

|                | $K^+, \mu_{eff} [cm^2s^{-1}V^{-1}]$ | $Na^+, \mu_{eff} [cm^2s^{-1}V^{-1}]$ |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Borátový pufr  | $5,8 \times 10^{-4}$                | $4,3 \times 10^{-4}$                 |
| Acetátový pufr | $7,8 \times 10^{-4}$                | $5,9 \times 10^{-4}$                 |

V boraxovém pufru byly zjišťovány efektivní mobility  $i$  z měření prováděných v kapilárách o efektivní délce 6 a 4 cm. Střední hodnota všech zjištěných efektivních mobilit v tomto pufru byla  $(5,5 \pm 1,2) \times 10^{-4} cm^2s^{-1}V^{-1}$  pro draselný a  $(4,1 \pm 0,6) \times 10^{-4} cm^2s^{-1}V^{-1}$  pro sodný ion. Hodnoty efektivních mobilit jsou srovnatelné s hodnotami nalezenými v literatuře [58].

### 3.1.2 Závislost separační účinnosti a parametru rozlišení na separačním napětí

Separací účinnost byla určována ze vztahů uvedených v kapitole 2.4. Na obr. 3.4. je v grafu znázorněna závislost separační účinnosti vyjádřená výškou teoretického patra na separačním napětí. Dle rov. (2-5) byla separační účinnost počítána s použitím hodnoty  $w_{1/2}$ . Tyto hodnoty jsou velice malé a pohybují se v rozmezí od 1,5 do 0,4 s. Proto je obtížné přesně určit šířku v polovině výšky píku. Z toho vyplývá rozptýl bodů uvedených v grafu.



**Obr. 3.4. Závislost separační účinnosti vyjádřené výškou teoretického patra na separačním napětí. Prázdné body:  $K^+$ , plné body:  $Na^+$ . Identifikace kapilár: čtverec – 8 cm, kruh – 6 cm, trojúhelník – 4 cm. Tučnou čarou je vyznačen medián.**

Separační účinnost by měla růst s rostoucím separačním napětím dle vztahu [59].

$$n = \frac{\mu_{eff} U l}{2DL}, \quad (3-1)$$

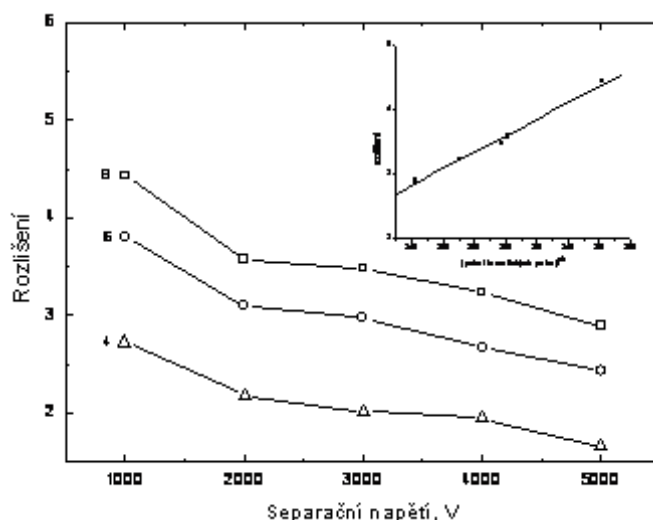
kde  $D$  [ $cm^2 s^{-1}$ ] je difúzní koeficient migrující látky. Teoretické hodnoty  $n$  lze dosáhnout pouze v případě, že se neuplatňuje rozšiřování zón v důsledku generovaného Jouleova tepla a další jevy přispívající k rozšiřování zón separovaných látek. Z obr. 3.4 je zřejmé, že separační účinnost pro oba ionty s rostoucím napětím klesá, takže efekty vedoucí k rozšiřování zóny mají větší vliv než velikost separačního napětí.

Dalším vyhodnocovaným parametrem souvisejícím s účinností separačního procesu bylo rozlišení. Použitý vztah pro výpočet je uveden v kapitole 2.4, rov. (2-7). Jak lze očekávat, hodnota rozlišení klesá s klesající efektivní délkou kapiláry, ale klesá i s rostoucím separačním napětím. Pokles zřejmě souvisí s klesající separační účinností s rostoucím napětím, viz obr. 3.4. To potvrzuje i graf vložený v obr. 3.5. Zjištěná lineární závislost mezi parametrem rozlišení a odmocninou počtu teoretických pater je v souladu s rovnicí [60].



$$R_s = \frac{\sqrt{n}(\mu_i - \mu_j)}{4(\bar{\mu} + \mu_{eof})} \quad (3-2)$$

kde  $\bar{\mu} = (\mu_i + \mu_j)/2$  je střední mobilita.



**Obr. 3.5.** Závislost parametru rozlišení na separačním napětí pro kapiláry o různé efektivní délce (délky uvedeny u křivek v cm). Vložený graf – závislost rozlišení na odmocnině z počtu teoretických pater.

### 3.1.3 Závislost separační účinnosti na efektivní délce kapiláry

Parametry píků získané z naměřených elektroferogramů byly použity k výpočtu separační účinnosti. V tabulce 3.4. jsou vypočítaná data uvedena v závislosti na efektivní délce kapiláry. Bylo použito separační napětí 5000 V.

**Tabulka 3.4.** Separační účinnost a parametry píků draselného iontu při různých efektivních délkách kapiláry.

| $K^+$         | efektivní délka kapiláry |                       |                       |
|---------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
|               | 4 cm                     | 6 cm                  | 8 cm                  |
| $h$ (mV)      | $35,83 \pm 3,03$         | $23,38 \pm 13,05$     | $34,70 \pm 5,81$      |
| $w_{1/2}$ (s) | $0,40 \pm 0,07$          | $0,40 \pm 0,07$       | 0,45                  |
| počet pater/m | 50 825                   | 61 850                | 58 625                |
| $H$ (cm)      | $1,97 \times 10^{-3}$    | $1,62 \times 10^{-3}$ | $1,71 \times 10^{-3}$ |
| $R$           | 1,65                     | 2,43                  | 2,89                  |

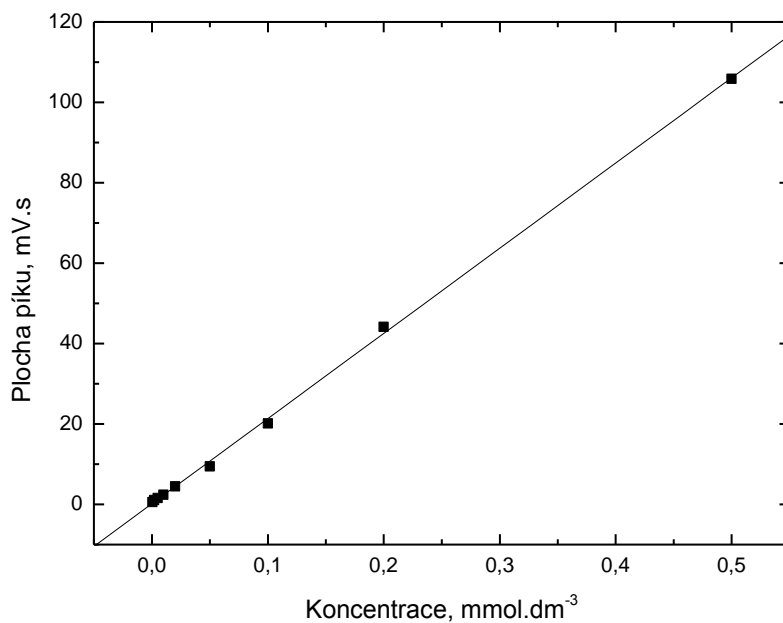
Lze říci, že separační účinnost na efektivní délce kapiláry nezávisí. Kdyby byla u kapiláry s efektivní délkou 4 cm šířka píku  $w_{1/2} = 0,37$  s (tj. o pouhé 3 setiny sekundy menší, a to je hodnota ležící uvnitř intervalu spolehlivosti), pak by počet teoretických pater přepočtený na metr byl 59 000 a výška patra by byla  $1,7 \times 10^{-3}$  cm. Za těchto podmínek by byly separační účinnosti těchto kapilár zcela srovnatelné.

### 3.1.4 Závislost odezvy detektoru na koncentraci

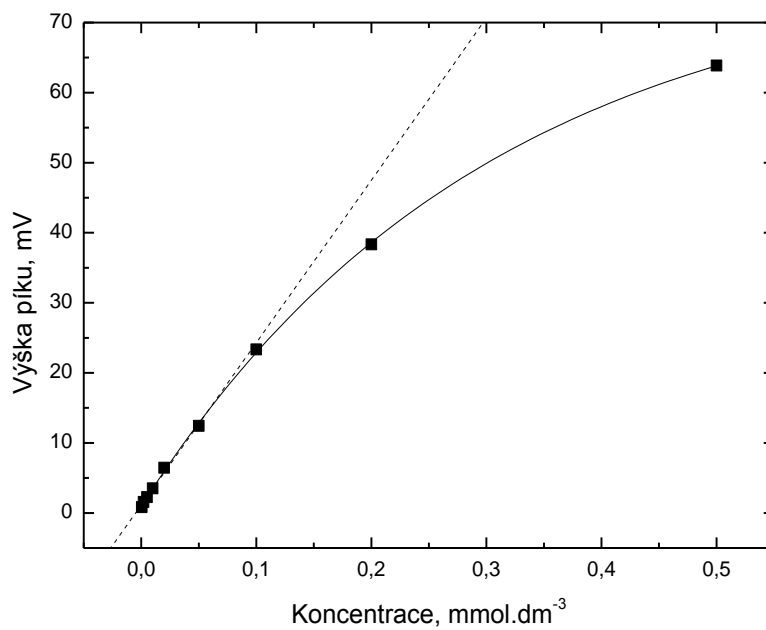
Koncentrační závislost byla měřena pro draselný iont v prostředí acetátového pufru v 10 cm dlouhé kapiláře a délce k detektoru 8 cm a vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Kalibrační data, plocha a výška píku, jsou v tabulce 3.5. Každá hodnota je mediánem ze tří měření. Grafické zpracování kalibračních závislostí je na obr. 3.6 a 3.7. Závislost plochy píku na koncentraci je lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací. Závislost výšky píku na koncentraci lze považovat za lineární pouze pro nízké koncentrace, do asi  $2 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ dm $^{-3}$ . Lineární závislosti lze popsat rovnicí regresní přímky ve tvaru  $Y = A + BX$  (kde A je úsek přímky a B její směrnice), jejíž parametry jsou v tabulce 3.6.

**Tabulka 3.5. Data pro kalibrační závislost plochy (A) a výšky (h) píku draselného iontu.**

| $c (\text{K}^+) [\text{mol/l}]$ | $A [\text{mV}\cdot\text{s}]$ | $h [\text{mV}]$  |
|---------------------------------|------------------------------|------------------|
| $5 \times 10^{-4}$              | $105,82 \pm 12,17$           | $63,87 \pm 3,74$ |
| $2 \times 10^{-4}$              | $44,15 \pm 4,94$             | $38,34 \pm 2,11$ |
| $1 \times 10^{-4}$              | $20,10 \pm 1,07$             | $23,35 \pm 0,47$ |
| $5 \times 10^{-5}$              | $9,41 \pm 3,13$              | $12,44 \pm 3,09$ |
| $2 \times 10^{-5}$              | $4,48 \pm 0,91$              | $6,45 \pm 0,31$  |
| $1 \times 10^{-5}$              | $2,42 \pm 0,09$              | $3,51 \pm 0,29$  |
| $5 \times 10^{-6}$              | $1,55 \pm 0,04$              | $2,26 \pm 0,09$  |
| $2 \times 10^{-6}$              | $1,04 \pm 0,16$              | $1,57 \pm 0,17$  |
| $1 \times 10^{-6}$              | $1,06 \pm 0,09$              | $1,54 \pm 0,13$  |
| $5 \times 10^{-7}$              | $0,59 \pm 0,26$              | $0,83 \pm 0,20$  |



***Obr. 3.6. Kalibrační závislost plochy píku  $K^+$  na jeho koncentraci***



***Obr. 3.7. Kalibrační závislost výšky píku  $K^+$  na jeho koncentraci***

**Tabulka 3.6. Parametry kalibračních přímek pro stanovení draselného iontu v acetátovém pufru.**

| Parametr  | Pro plochu píku                          | Pro výšku píku                           |
|---|--|--|
| Úsek, mV·s (mV)   | 0,265 (0,341)                            | 0,828 (0,098)                            |
| Směrnice, mV·s·mmol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup><br>(mV·mmol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ) | 212 (1,960)                              | 279 (9,521)                              |
| Koeficient determinace  | 0,999                                    | 0,997                                    |
| Počet bodů  | 10                                       | 5  |
| Lineární dynamický rozsah,<br>mol·dm <sup>-3</sup>  | 5×10 <sup>-7</sup> až 5×10 <sup>-4</sup> | 5×10 <sup>-7</sup> až 2×10 <sup>-5</sup> |
| LOD, mol·dm <sup>-3</sup>   | 6,7×10 <sup>-6</sup>                     | 1,6×10 <sup>-6</sup>                     |

### 3.1.5 Ověření opakovatelnosti dávkování při použití piezoelektrické pumpy

Po nahrazení pístové lineární pumpy piezoelektrickou pumpou byla ověřena opakovatelnost dávkování. Byl použit vodný roztok 0,01 mmol·dm<sup>-3</sup> K<sup>+</sup> a Na<sup>+</sup> iontů, dávkováno bylo do pufru MES + LiOH, který byl v dalších měřeních použit pro separaci vzorové směsi aminokyselin. Separační napětí bylo 5 kV. Vzorek byl dávkován do kapiláry o celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm. Použita byla kapilára o vnitřním průměru 50 μm. Vzorek byl nadávkován desetkrát. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.7. Je vidět, že dávkování s použitím piezoelektrické mikropumpy je dostatečně opakovatelné, aby bylo prakticky dobře použitelné. Rozměrově je tato pumpa lépe kompatibilní s aparaturou pro separace v krátkých kapilárách než pumpa pístová, viz. obr. 2.2.

**Tabulka 3.7. Výška a plocha píku K<sup>+</sup> iontu zjištěná při 10x opakovaném nadávkování roztoku 0,01 mmol·dm<sup>-3</sup> K<sup>+</sup> a Na<sup>+</sup> do kapiláry o vnitřním průměru 50 μm, celkové délce 10 cm a délce k detektoru 8 cm. V závorce je uvedena relativní směrodatná odchylka.**

| Kapilára | Výška píku, mV | Plocha píku, mV·s |
|----------|----------------|-------------------|
| 10/8 cm  | 13,32 (2,72 %) | 9,62 (2,71 %)     |

## 3.2 Separace a detekce bazických aminokyselin

Elektroforetická aparatura byla použita k separaci uměle připravené směsi aminokyselin. Byly vybrány bazické aminokyseliny arginin, histidin a jeho deriváty, 1-metyl- a 3-methylhistidin. Aminokyseliny byly separovány v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 10, 25 a 50  $\mu\text{m}$ , v kapiláře z materiálu PEEK o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a v křemenné kapiláře pokryté polyvinylalkoholem o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (kalibrační závislosti byly určovány pouze ve standardní 50 $\mu\text{m}$  křemenné kapiláře, v ostatních kapilárách byly sledovány pouze separační parametry).

Další bazickou aminokyselinou je lysin. Ukázalo se však, že za používaných experimentálních podmínek nebylo možno rozdělit Arg a Lys, protože jejich elektroforetické mobility jsou velmi blízké, jak bylo zjištěno experimentálně, viz tabulka 3.8. Proto byla dále testována směs histidinů pouze s Arg. Pro kontrolu správné činnosti aparatury byla společně s aminokyselinami dávkována i směs anorganických iontů,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ .

Celková délka kapilár byla 10 cm, efektivní délky pak 8, 6 a 4 cm nebo celková délka 6 cm, efektivní délka 4 cm. Vzorky byly dávkovány ve vodě. Experimentální podmínky jsou uvedeny v tabulce 3.9.

**Tabulka 3.8. Zjištěné elektroforetické mobility argininu a lysinu změřené v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Pro srovnání je uvedena i mobilita histidinu.**

| Aminokyselina | $\mu_{eff} [\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}]$ |
|---------------|---|
| His           | $1,80 \times 10^{-4}$                               |
| Arg           | $2,85 \times 10^{-4}$                               |
| Lys           | $2,77 \times 10^{-4}$                               |

**Tabulka 3.9. Experimentální podmínky při separaci aminokyselin**

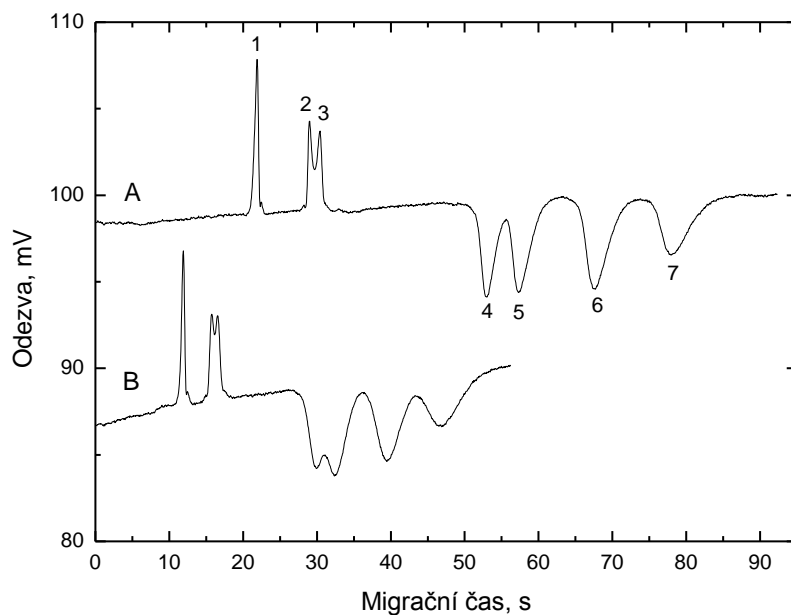
| Parametr  |  |
|---|--|
| Separáční pufr  | 20mM MES + 5mM LiOH<br>(pH=5,8)  |
| Vzorek anorg. iontů (koncentrace v $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) | $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ (10)                   |
| Vzorek aminokyselin (koncentrace v $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )   | His, 1-MH, 3-MH (0,1)<br>Arg (0,05)                                    |
| Kapilára  | délka 10 cm, k detektoru 8 a 4 cm<br>nebo délka 6 cm, k detektoru 4 cm |
| Separáční napětí  | 5000 V   |
| Průtokov  rychlost  | $1520 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$                                 |
| Dávkovací smyčka  | 15 $\mu\text{l}$   |
| Doba dávkování  | 0,3 s  |
| Typ detekce   | bezkontaktní vodivostní detektor                                       |

### 3.2.1 Separace na kapilárách s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$

Pro separaci aminokyselin byly pouřity tři různ  kapiláry s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ : křemenn  kapilára, křemenn  kapilára pokryt  polyvinylalkoholem a PEEK kapilára.

#### *Křemenn  kapilára s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$*

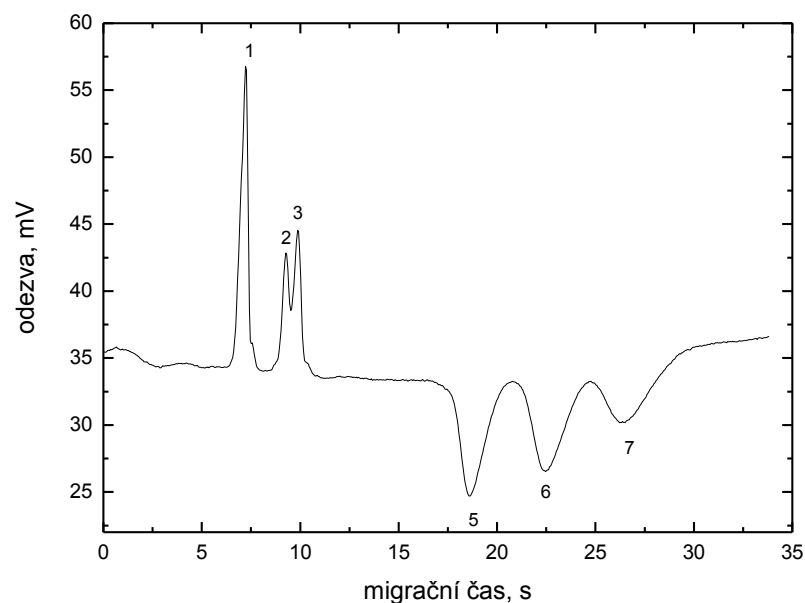
Příklad separace testovaných látek v křemenn  kapiláře s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  je na obr. 3.8. Je vidět, ťe v kapiláře o efektivní délce 8 cm jsou vřechny testovan  aminokyseliny d bře rozděleny do 80 s. Při zkrácen  kapiláry jsou do 1 minuty d bře rozděleny histidin a jeho deriváty, avřak arginin se j ř od 1-methylhistidinu oddělí pouze částečně.



**Obr. 3.8. Elektroferogramy separace anorganických iontů a aminokyselin v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm (A) a 4 cm (B). Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 4 - Arg, 5 - 1-metylhistidin, 6 - His, 7 - 3-metylhistidin.**

Testována byla rovněž kapilára o celkové délce 6 cm a délce k detektoru 4 cm. Geometrické parametry této kapiláry jsou blízké separační dráze elektroforetického čipu. Elektroforegram separace derivátů histidinu je na obr. 3.9. Histidiny jsou v této kapiláře rozděleny během 30 s, anorganické ionty během 10 s.

Při dávkování aminokyselin samostatně, byla v této kapiláře proměřena kalibrační závislost pro histidin, arginin a rovněž i lysin (kalibrační závislosti pro deriváty histidinu nebyly proměřovány, protože pro jejich vysokou cenu bylo k dispozici pouze jejich malé množství vzorku). Kalibrační závislosti byly sestrojeny z pěti koncentrací z intervalu  $1 \times 10^{-3}$  -  $5 \times 10^{-5}$   $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Každá koncentrace byla proměřena třikrát. Kalibračními závislostmi bylo možno proložit regresní přímku. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulkách 3.10 a 3.11.



**Obr. 3.9.** Elektroferogram separace anorganických iontů a derivátů histidinu v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 6 cm a efektivní délce kapiláry 4 cm. Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 5 - 1-metylhistidin, 6 - His, 7 - 3-metylhistidin.

**Tabulka 3.10.** Parametry regresních přímek kalibračních závislostí, získané z ploch jednotlivých píků, pro His, Arg a Lys. Kapilára: délka 6 cm, k detektoru 4 cm.

| Parametr  | His                   | Lys                   | Arg                   |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Úsek, $\text{mV}\cdot\text{s}$  | $0,41 \pm 0,11$       | $1,66 \pm 0,34$       | $1,06 \pm 0,34$       |
| Směrnice,<br>$\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$ | $12\,342 \pm 207$     | $28\,277 \pm 666$     | $32\,421 \pm 665$     |
| Korelační koeficient  | 0,999                 | 0,999                 | 0,999                 |
| Počet kalibračních bodů   | 5                     | 5                     | 5                     |
| $s_r$ (%)   | 1,96 – 19,24          | 1,01 – 24,89          | 1,19 – 4,12           |
| LOD, $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$                                      | $3,96 \times 10^{-5}$ | $5,56 \times 10^{-5}$ | $4,84 \times 10^{-5}$ |



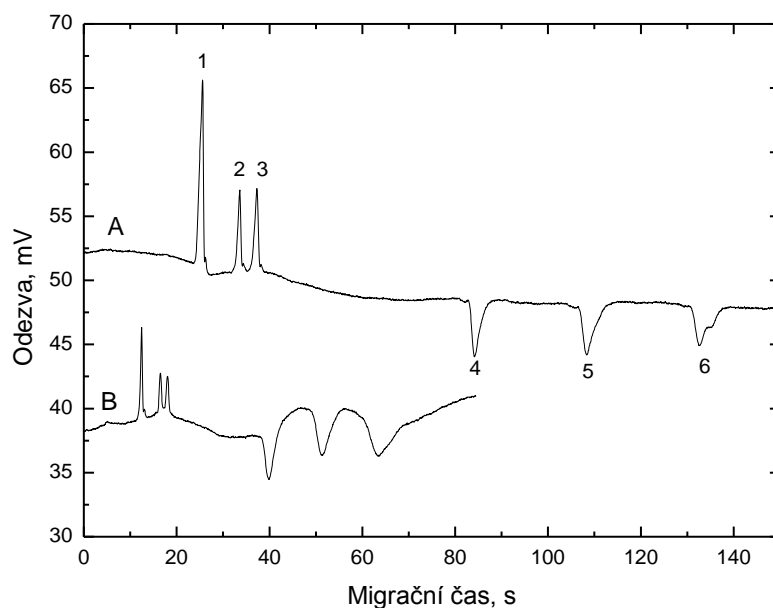
**Tabulka 3.11. Parametry regresních přímk kalibračních závislostí, získané z výšek jednotlivých píků, pro His, Arg a Lys. Kapilára: délka 6 cm, k detektoru 4 cm.**

| <b>parametr</b>                                    | <b>His</b>            | <b>Lys</b>            | <b>Arg</b>            |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Úsek, mV   | 0,32 ± 0,07           | 2,15 ± 0,53           | 1,84 ± 0,65           |
| Směrnice,<br>mV·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> | 11 952 ± 143          | 31 252 ± 1 028        | 31 675 ± 1 275        |
| Korelační koeficient                               | 0,999                 | 0,998                 | 0,998                 |
| Počet kalibračních bodů                            | 5                     | 5                     | 5                     |
| <i>s<sub>r</sub></i> (%)                           | 2,37 – 12,81          | 0,84 – 18,45          | 0,40 – 2,71           |
| LOD, mol·dm <sup>-3</sup>                          | 2,84×10 <sup>-5</sup> | 7,76×10 <sup>-5</sup> | 9,50×10 <sup>-5</sup> |

*Křemenná kapilára pokrytá PVA s vnitřním průměrem 50 μm*

Důsledkem pokrytí vnitřní stěny kapiláry polyvinylalkoholem je potlačení elektroosmotického toku. Prvním krokem měření v této kapiláře bylo proměření vzorku směsi anorganických iontů a vybraných bazických aminokyselin (Obr. 3.10). Histidiny i anorganické ionty jsou dobře rozdělené v 8 i 4 centimetrové efektivní délce kapiláry. Doba separace v delší kapiláře je 140 s, v kratší kapiláře 70 s.

Pokrytí kapiláry PVA a potlačení elektroosmotického toku má za následek prodloužení migračních časů. Aminokyseliny se podařilo rozdělit až na základní linii, ale dlouhá doba separace neodpovídá předem stanoveným požadavkům na rychlost separace v krátké kapiláře.

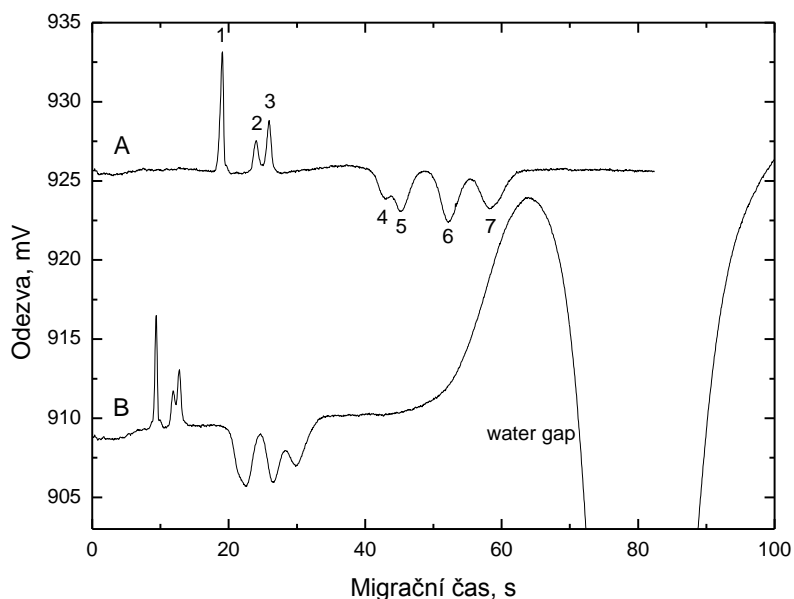


**Obr. 3.10. Elektroferogramy separace anorganických iontů a aminokyselin v křemenné kapiláře pokryté PVA o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm (A) a 4 cm (B). Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 4 - 1-methylhistidin, 5 - His, 6 - 3-methylhistidin.**

V průběhu měření se objevil elektroosmotický tok v podobě water gapu, což dokazuje nestabilitu pokrytí vnitřní stěny kapiláry PVA. Nebylo dosaženo opakovatelnosti výsledků z hlediska migračních časů. Migrační časy píků v po sobě jdoucích měření se výrazně zkracovaly. Z tohoto důvodu se s touto kapilárou nepokračovalo v dalších experimentech.

#### *PEEK kapilára s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$*

V kapiláře z materiálu PEEK byl proměřen vzorek anorganických iontů a aminokyselin při různých efektivních délkách kapiláry. V kapiláře o délce 8 cm trvala separace 60 s. Histidin a jeho deriváty byly dobře rozdělené, arginin a 1-methylhistidin jen částečně. V kapiláře s efektivní délkou 4 cm trvala doba separace 30 s a arginin s 1-methylhistidinem se nerozdělily vůbec. PEEK kapilára se osvědčila při experimentech s močí (viz kap 3.3), kdy byly získány elektroferogramy s nejlépe vyhodnotitelnými píky.



**Obr. 3.11. Elektroferogramy separace anorganických iontů a aminokyselin v PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm (A) a 4 cm (B). Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 4 - Arg, 5 - 1-metylhistidin, 6 - His, 7 - 3-metylhistidin.**

### 3.2.2 Porovnání separačních účinností kapilár s vnitřním průměrem 50 $\mu\text{m}$

Porovnání separačních účinností pro histidin při různých efektivních délkách kapiláry vypočtených z naměřených dat je uvedeno v následující tabulce 3.12. Obě kapiláry, křemenná a PEEK mají vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ . Z tabulky, kde jsou uvedeny vypočítané hodnoty počtu pater na metr a výškového ekvivalentu teoretického patra je patrné, že se hodnoty výrazně neliší a separační vlastnosti kapilár pro separaci His jsou srovnatelné. Velká hodnota intervalu spolehlivosti (především u počtu pater pro 6cm kapiláru) je zapříčiněna špatně měřitelnou šířkou píku v polovině jeho výšky. Malá změna tohoto parametru měřeného na setinu sekundy se projeví velkou změnou separační účinnosti. Pro separaci bazických aminokyselin argininu, histidinu a jeho derivátu je vhodnější klasická křemenná kapilára, jak je zřejmé z porovnání elektroferogramů na obr. 3.8 a 3.11.

**Tabulka 3.12. Separační účinnost pro histidin v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a PEEK kapiláře zjištěné pro kapiláry o různé efektivní délce**

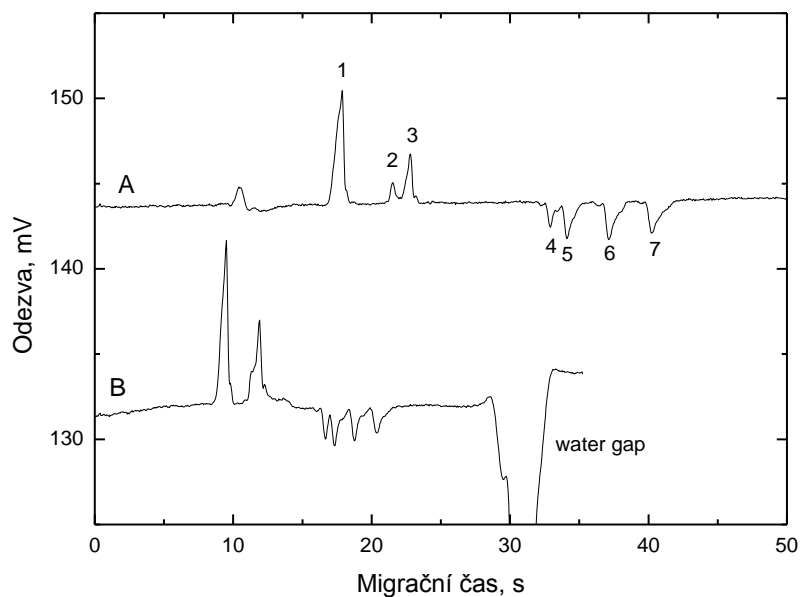
|                      | <b>křemenná kap.</b> | <b>peeková kap.</b> |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| <b>8 cm</b>          |                      |                     |
| <b>počet pater/m</b> | 36 075 ± 10 725      | 29 013 ± 6 110      |
| <b>H (μm)</b>        | 27,7 ± 8,8           | 34,5 ± 7,2          |
| <b>6 cm</b>          |                      |                     |
| <b>počet pater/m</b> | 36 650 ± 24 180      | 38 483 ± 6 868      |
| <b>H (μm)</b>        | 27,3 ± 17,4          | 26,0 ± 4,9          |
| <b>4 cm</b>          |                      |                     |
| <b>počet pater/m</b> | 21 075 ± 1 365       | 41 500              |
| <b>H (μm)</b>        | 47,5 ± 3,0           | 24,1                |

Vypočtená elektroforetická mobilita histidinu v křemenné kapiláře byla  $(1,74 \pm 0,04) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  a v kapiláře PEEK  $(1,84 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ .

### 3.2.3 Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 25 μm

V křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 25 μm byl proměřen základní vzorek anorganických iontů a aminokyselin. V kapiláře o efektivní délce 8 cm jsou všechny testované aminokyseliny rozdělené do 40 s, v kapiláře o efektivní délce 4 cm stačí na dobré rozdělení aminokyselin jen 20 s.

Počet pater a výškový ekvivalent teoretického patra jako parametry pro separační účinnost histidinu jsou uvedeny v tabulce 3.13. Jak lze očekávat, s klesajícím vnitřním průměrem kapiláry roste separační účinnost (viz data v tab. 3.12 a 3.13). V kapilárách o stejném vnějším průměru, ale o menším vnitřním průměru je rovněž lepší odvod Jouleova tepla generovaného průchodem proudu kapilárou, což snižuje rozmývání zón a přispívá k vyšší separační účinnosti. Separace aminokyselin v 25 μm kapiláře je velmi dobrá a díky citlivosti detekce jsou píky snadno vyhodnotitelné. Elektroforetická mobilita histidinu určená z dat získaných v této kapiláře je  $(1,77 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ .



**Obr. 3.12.** Elektroferogramy separace anorganických iontů a aminokyselin v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 25  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm (A) a 4 cm (B). Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 4 - Arg, 5 - 1-metylhistidin, 6 - His, 7 - 3-metylhistidin.

**Tabulka 3.13.** Separační účinnost zjištěná pro histidin v kapiláře o vnitřním průměru 25  $\mu\text{m}$

| His                 | 8 cm                 | 6 cm                 | 4 cm                  |
|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| počet pater/m       | 225 926 $\pm$ 93 713 | 291 683 $\pm$ 84 110 | 301 675 $\pm$ 201 565 |
| H ( $\mu\text{m}$ ) | 4,43 $\pm$ 1,89      | 3,43 $\pm$ 0,87      | 3,31 $\pm$ 2,12       |

Rozlišení argininu a 1–metylhistidinu při různých délkách k detektoru je uvedeno v tabulce 3.14. Prakticky zcela separované píky mají hodnotu rozlišení 1,5, tedy překrytí 0,1 %. Toho je dosaženo u kapiláry o efektivní délce 8 cm. Kapiláry o efektivních délkách 6 a 4 cm vykazují hodnotu rozlišení do 1,2, což představuje překrytí 0,125 %. Nejlepší separace je tedy dosaženo v kapiláře o efektivní délce 8 cm.

**Tabulka 3.14.** Rozlišení Arg a 1MH

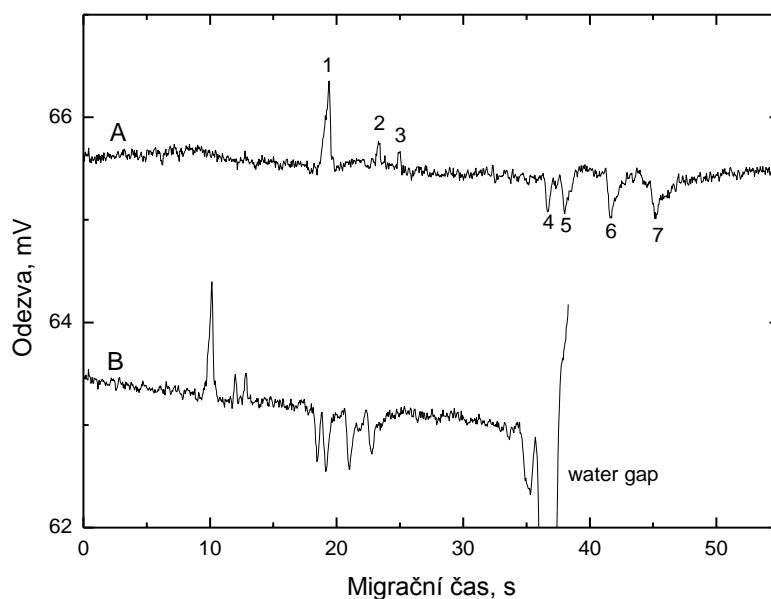
| l (cm) | R (50 $\mu\text{m}$ ) | R (25 $\mu\text{m}$ ) | R (10 $\mu\text{m}$ ) |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 4      | -                     | 1,20 $\pm$ 0,13       | 2,12 $\pm$ 0,55       |
| 6      | 1,12 $\pm$ 0,03       | 1,28 $\pm$ 0,22       | 2,63 $\pm$ 1,13       |
| 8      | 1,23 $\pm$ 0,03       | 1,50 $\pm$ 0,03       | 2,95 $\pm$ 0,38       |

### 3.2.4 Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 10 μm

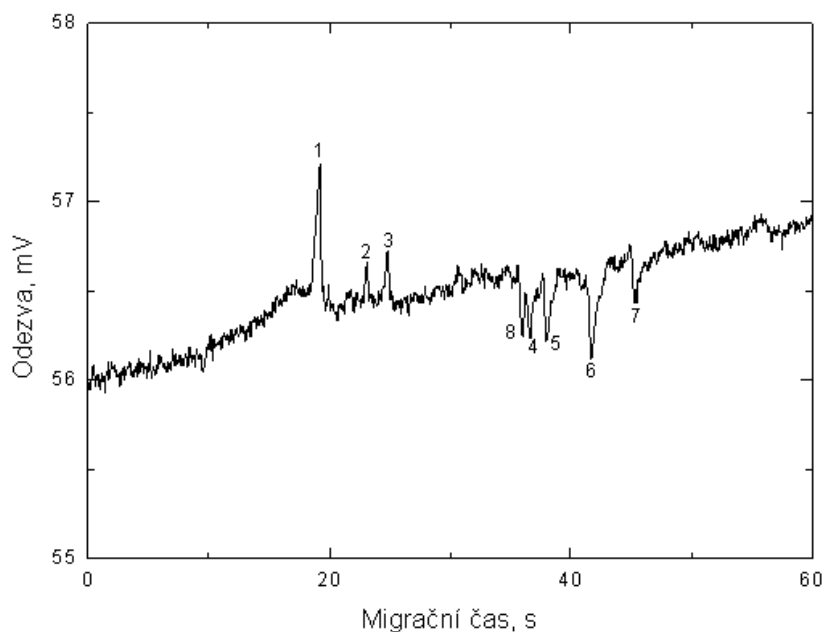
Elektroferogram základního vzorku anorganických iontů a bazických aminokyselin je na obr. 3.13. V kapiláře o vnitřním průměru 10 μm se jako v jediné testované kapiláře podařilo rozdělit aminokyseliny lysin a arginin, obr. 3.14. V ostatních použitých typech kapilár nebylo dosaženo rozdělení těchto dvou aminokyselin. Většinou tyto aminokyseliny migrovaly v jedné zóně. Pro dokonalou separaci všech aminokyselin stačí v 8cm kapiláře 45 s, ve 4cm kapiláře 25 s.

Separační účinnost pro histidin v křemenné 10μm kapiláře o celkové délce 10 cm jsou uvedeny v tabulce 3.15. Elektroforetická mobilita pro histidin určená z dat získaných v této kapiláře je  $(1,65 \pm 0,04) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ .

V tabulce 3.14 je uvedeno rozlišení argininu a 1-metylhistidinu v kapiláře o vnitřním průměru 10 μm. Hodnoty rozlišení v rozmezí 2,12 – 2,95 poukazují na dobře rozdělené píky. V 10μm křemenné kapiláře, v důsledku jejímu velmi malému průměru už není detekce citlivá a také se do ní nadávkuje malé množství vzorku. Za používaných experimentálních podmínek jsou píky malé a nelze už je tak snadno rozeznat od šumu (na rozdíl od kapiláry o vnitřním průměru větším, už od 25 μm).



**Obr. 3.13. Elektroferogramy separace anorganických iontů a aminokyselin v kapiláře o vnitřním průměru 10 μm, celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm (A) a 4 cm (B). Identifikace píků: 1-K<sup>+</sup>, 2-Ca<sup>2+</sup>, 3-Na<sup>+</sup>, 4-Arg, 5-1-metylhistidin, 6-His, 7-3-metylhistidin.**



**Obr 3.14.** Elektroferogram separace anorganických iontů a aminokyselin v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 10  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce kapiláry 8 cm. Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Na}^+$ , 4 - Arg, 5 - 1-methylhistidin, 6 - His, 7 - 3-methylhistidin, 8 – Lys.

**Tabulka 3.15.** Separační účinnost pro histidin určená v kapiláře o vnitřním průměru 10  $\mu\text{m}$

| His                   | 8 cm                  | 6 cm                  | 4 cm                  |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| počet pater/m         | 337 371 $\pm$ 244 600 | 255 050 $\pm$ 116 003 | 301 900 $\pm$ 101 888 |
| $H$ ( $\mu\text{m}$ ) | 2,96 $\pm$ 2,86       | 3,92 $\pm$ 1,78       | 3,31 $\pm$ 0,88       |

### 3.3 Separace histidinu a jeho derivátů v moči

Další součástí experimentů bylo stanovení histidinu a jeho derivátů v reálném vzorku – moči. Histidin a jeho deriváty jsou důležitým ukazatelem metabolismu svalstva a jejich stanovení je součástí klinické praxe.

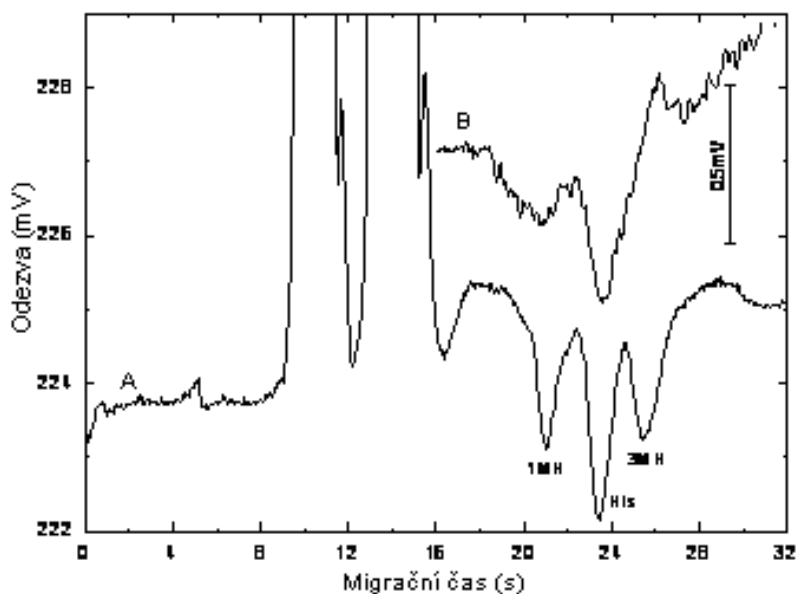
Pracovní postup:

Ranní moč se zředila v poměru 1 : 9 a 1 : 1 vodou nebo acetonitrilem. Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídávku, přídavek byl  $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  histidinu a jeho derivátů. Poté byl vzorek přefiltrován přes filtr o velikosti pórů  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$  a proměřen. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při ředění 1 : 9 deionizovanou vodou.

Pro stanovení aminokyselin v moči se nejlépe osvědčila kapilára PEEK a křemenná kapilára o vnitřním průměru  $25 \text{ } \mu\text{m}$ . V ostatních typech kapilár docházelo ke „ztrácení“ histidinu a jeho derivátů, to znamená, že při nadávkování zředěného vzorku moči se píky aminokyselin neobjevily vůbec, nebo byly velmi nepatrné. Důvod není jasný, zřejmě dochází k adsorpci aminokyselin na stěnách kapilár v přítomnosti látek obsažených v moči. Až při experimentech s kapilárou PEEK byly píky histidinu vyhodnotitelné.

Na obr. 3.15 je elektroferogram moči v kapiláře PEEK. Vyhodnotitelný byl pouze pík His, koncentrace jeho derivátů byla za daných podmínek pod limitem stanovitelnosti, tzn., že byly píky špatně rozlišitelné od šumu.





**Obr 3.15. Elektroferogram moči v kapiláře PEEK o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce 4 cm. A – moč + voda 1:10 + 100  $\mu\text{M}$  histidiny, B – moč + voda 1:10**

Vyhodnocením plochy píku bylo spočítáno, že ranní moč obsahovala 481  $\mu\text{M}$  histidinu. Dle stanovení histidinu ve stejném vzorku moči [61] ve standardní kapiláře o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ , celkové délce 65 cm a efektivní délce 58 cm, je obsah His v moči 469  $\mu\text{M}$ . Shoda je dobrá. Stanovení histidinu v reálném vzorku bylo pouze informativní, šlo o to zjistit, zda v krátké kapiláře lze separovat deriváty histidinu v moči podobně jako na elektroforetickém čipu [49].

## 4. Závěr

Elektroforetická aparatura sestavená pro krátkou kapiláru byla použita k separaci vybraných anorganických iontů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) a bazických aminokyselin (Arg, Lys, His a jeho deriváty 1-MH a 3-MH) ve vodných roztocích. Separace byly prováděny v křemenných kapilárách o různých vnitřních průměrech a v kapiláře z materiálu PEEK. Souhrn některých parametrů separace bazických aminokyselin v křemenných kapilárách je uveden v tabulce 4.1.

**Tabulka 4.1. Parametry separace bazických aminokyselin v křemenných kapilárách o různém vnitřním průměru a efektivní délce 4 cm.**

| Vnitřní průměr kapiláry ( $\mu\text{m}$ ) | $H$ ( $\mu\text{m}$ ) | $R$ (Arg/1MH)   | $t_{migr}$ 1MH (s) | $t_{migr}$ His (s) | $t_{migr}$ 3MH (s) |
|---|-----------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 50  | $47,5 \pm 3,00$       | -               | $32,65 \pm 0,53$   | $39,45 \pm 0,34$   | $46,86 \pm 0,87$   |
| 25  | $3,31 \pm 2,12$       | $1,20 \pm 0,13$ | $17,30 \pm 0,05$   | $18,70 \pm 0,12$   | $20,35 \pm 0,05$   |
| 10  | $3,31 \pm 0,88$       | $2,12 \pm 0,55$ | $19,14 \pm 0,07$   | $21,00 \pm 0,07$   | $22,70 \pm 0,13$   |

Separace probíhala bez problémů ve všech typech křemenných kapilár. Nejlépe se osvědčila křemenná kapilára o vnitřním průměru 25  $\mu\text{m}$ , kde rozdělení bazických aminokyselin trvalo necelých 25 s a dobrá byla i její separační účinnost. Zkracování efektivní délky kapiláry vede ke zkracování migračních časů. Tím pádem lze dosáhnout miniaturizace srovnatelné s čipovou analýzou.

Novou možností v kapilární elektroforéze spojené s bezkontaktní vodivostní detekcí je využití kapilár z materiálu PEEK.

**Závěrem lze říci, že cíl práce byl splněn. Aparatura pro separaci v krátkých kapilárách byla optimalizována při separaci anorganických iontů. Bazické aminokyseliny byly separovány v křemenných kapilárách o různých vnitřních průměrech a v kapiláře z materiálu PEEK. V diplomové práci bylo ukázáno, že testované typy kapilár jsou vhodné pro separaci bazických aminokyselin. Nakonec byl stanoven histidin v reálném vzorku, v moči.**

## Použitá literatura

1. Gaš, B.: *Vesmír* **80**, 370 (2001)
2. Tiselius, A.: *Trans. Faraday. Soc.* **33**, 524 (1937)
3. Hjertén, S.: *Chromatographic Reviews* **9**, 122 (1967)
4. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D.: *Clin. Chem.* **27**, 1551 (1981)
5. Kašička, V.: *Chem. Listy* **91**, 320 (1997)
6. <[http://placek.lukas.sweb.cz/pdf\\_soubory/CEzakl.pdf](http://placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf)> [cit. 7.3.2011]
7. <<http://vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>> [cit. 8.3.2001]
8. <[http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_47.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm)> [cit. 8.3.2011]
9. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Cramers, C.A., *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 325 (1994)
10. Tanyanyiwa, J., Leuthardt, S., Hauser, P. C.: *J. of Chromatogr. A* **978**, 205 (2002)
11. Horák, Z., Pokorný, D., Fulín, P., Šlouf, M., Jahoda, D., Sosna, A.: *Acta Chir. Orthop. Traum. Čech.* **77**, 463 (2010)
12. Bruin, G. J. M.: *Electrophoresis* **21**, 3931 (2000)
13. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Cramers, C.A.: *J. High Resol. Chromatogr.* **17**, 325 (1994)
14. Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K.: *Anal. Chem.* **70**, 563 (1998)
15. Fracassi da Silva, J. A., do Lago, C.: *Anal. Chem.* **70**, 4339 (1998)
16. Zemann, J. Andreas: *Electrophoresis* **24**, 2125 (2003)
17. Šolínová, V., Opekar, F., Jelínek, I., Kašička, V.: *Chem. Listy* **98**, 191 (2004)
18. Opekar, F., Štulík, K.: *Chem. Listy* **104**, 1148 (2010)
19. Tanyanyiwa, J., Abad – Villar, E. M., Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **25**, 903 (2004)
20. Zítka, O., Křížková, S., Adam, V., Horna, A., Kukačka, J., Průša, R., Žížková, V., Kizek, R.: *Chem. Listy* **104**, 197 (2010)
21. Manz, A., Harrison, D.J., Verpoorte, E.M.J., Fettinger, J.C., Paulus, A., Ludi, H., Widmer, M.: *J. Chromatogr. A* **593**, 253 (1992)
22. Harrison, D.J., Manz, A., Fan, Z.H., Liidi, H., Widmer, M.: *Anal. Chem.* **64**, 1926 (1992)

23. Peng, Y.Y., Pallandre, A., Tran, N.T., Taverna, M.: *Electrophoresis* **29**, 157 (2008)
24. Sinville, R., Soper, S.A.: *J. Sep. Sci.* **30**, 1714 (2007)
25. Escarpa, A., Gonzalez, M.C., Crevillen, A.G., Blasco, A.J.: *Electrophoresis* **28**, 1002 (2007)
26. Li, S.F.Y., Kricka, L.J.: *Clin. Chem.* **52**, 37 (2006)
27. Zemann, A. J.: *J. Chromatogr. A* **787**, 243 (1997)
28. Yang, W., Zhang, Z.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **82**, 353 (2002)
29. Yin, X., Kang, J., Fang, L., Yang, X., Wang, E.: *J. Chromatogr. A* **1055**, 223 (2004)
30. Fan, Y., Gan, X., Li, S., Qin, W.: *Electrophoresis* **28**, 4101 (2007)
31. Klepárník, K., Malá, Z., Haváč, Z., Blažková, M., Hollá, L., Boček, P.: *Electrophoresis* **19**, 249 (1998)
32. Malá, Z., Klepárník, K., Boček, P.: *J. Chromatogr. A* **853**, 371 (1999)
33. Klepárník, K., Malá, Z., Příbyla, L., Blažková, M., Vašků, A., Boček, P.: *Electrophoresis* **21**, 238 (2000)
34. Klepárník, K., Malá, Z., Boček, P.: *Electrophoresis* **22**, 783 (2001)
35. Opekar, F., Coufal, P., Štulík, K.: *Chem. Rev.* **109**, 4487 (2009)
36. Voet, D., Voetová, J.G.: *Biochemie*, Victoria Publishing a.s., Praha (1995)
37. Košťíř, J.: *Biochemie*, AVICENUM, Praha (1974)
38. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill (2003)
39. Myint, T., Fraser, G.E., Lindsted, K.D., Knutsen, S.F., Hubbard, R.W., Bennett, H.W.: *Am. J. Epidemiol.* **152**, 752 (2000)
40. Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H.: *Anal. Chem.* **30**, 1185 (1958)
41. Smith, J.T.: *Electrophoresis* **20**, 3078 (1999)
42. Poinot, V., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G., Feurer, B., Couderc, F.: *Electrophoresis* **27**, 176 (2006)
43. Bruin, G.J.M., van Asten, A.C., Xu, X., Poppe, H.: *J. Chromatogr. A* **608**, 97 (1992)
44. Carvalho, A.Z., da Silva, J.A.F., do Lago, C.L.: *Electrophoresis* **24**, 2138 (2003)

45. Baltussen, E., Guijt, R.M., van der Steen, R., Laugere, F., Baltussen, S., van Dedem, G.W.K.: *Electrophoresis* **23**, 2888 (2002)
46. Tůma, P., Samcová, E.: *Chem. Listy* **101**, 202 (2007)
47. Tůma, P., Samcová, E.: *Electroanalysis* **18**, 152 (2006)
48. Coufal, P., Zuska, J., van der Goor, T., Smith, V., Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 671 (2003)
49. Tůma, P., Samcová, E., Opekar, F., Jurka, V., Štulík, K.: *Electrophoresis* **28**, 2174 (2007)
50. Tůma, P., Samcová, E., Balínová, P.: *J. Chromatogr. B* **821**, 53 (2005)
51. Tůma, P., Samcová, E., Andělová, K.: *J. Chromatogr. B* **839**, 12 (2006)
52. Caussé, E., Siri, N., Arnal, J.F., Bayle, C., Malatray, P., Valdiguié, P., Salvayre, R., Couderc, F.: *J. Chromatogr. B* **741**, 77 (2000)
53. Petříková, M.: *Diplomová práce* (2008)
54. Tůma, P., Opekar, F., Jelínek, I.: *J. Chromatogr. A* **883**, 223 (2000)
55. Novotný, M., Opekar, F., Jelínek, I.: *Chem. Listy* **99**, 132 (2005)
56. < <http://www.alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/72720/MAXIM/MAX038.html> > [cit. 20.4.2011]
57. Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha (2005)
58. *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press (2006)
59. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D.: *Anal. Chem.* **53**, 1298 (1981)
60. Giddings, J.C., *J. Sep. Sci.* **4**, 181 (1969)
61. Doc. RNDr. Ing. Petr Tůma PhD. - 3. LF UK - soukromé sdělení