

# KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

## Zadání úlohy

Metodou kapilární zónové elektroforézy stanovte disociační konstantu *p*-nitrofenolu.

## Teoretický úvod

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

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

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

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

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

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

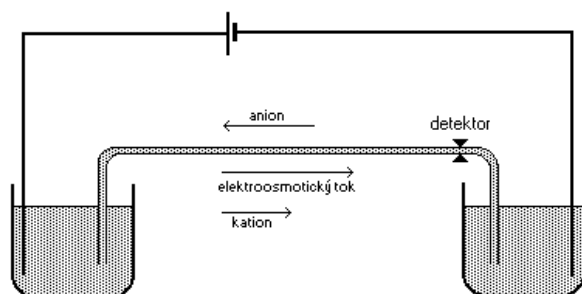
$$\mu_{ef} = \left| \frac{\sum_{i=1}^m c_i \mu_i \operatorname{sgn} z_i}{c} \right|, \quad (3)$$

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

$$\mu_{ef} = \mu_i \alpha, \quad (4)$$

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

Uspořádání experimentu je schematicky znázorněno na obr. 1.



Obr.1. Schéma CZE aparatury

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

vložení elektrického pole na daný systém dochází v kapiláře ke dvěma základním transportním jevům. Jedním je již zmíněná migrace iontů (ionty putují k opačně nabitě elektrodě), přičemž na základě rozdílné rychlosti migrace se ionty separují. Druhým jevem je elektroosmóza způsobující

tok celého roztoku, tzv. elektroosmotický tok (EOF – electroosmotic flow). Křemenné kapiláry obsahují povrchové silanolové skupiny  $-\text{SiOH}$ , které mohou být v roztoku disociovány na  $-\text{SiO}^-$  v závislosti na pH prostředí. Na rozhraní stěna kapiláry-roztok se pak vytváří elektrická dvojvrstva, kdy negativně nabitý povrch kapiláry (nepohyblivý) je v roztoku kompenzován volně pohyblivými kationty. V roztoku tedy převládají kladně nabití ionty a roztok jako celek je v elektrickém poli unášen směrem ke katodě. Rychlost elektroosmotického toku závisí na pH a iontové síle roztoku. Se zvyšujícím se pH a klesající iontovou silou se rychlost elektroosmotického toku zvyšuje. V křemenné kapiláře při  $\text{pH} > 2$  je rychlost EOF větší než rychlost migrace většiny iontů. Jestliže katoda je u výstupního konce kapiláry (uspořádání používané u této úlohy - viz obr.1.), lze v jednom experimentu analyzovat jak kationty, tak anionty. K detektoru nejprve doputují kationty s nejvyšší elektroforetickou pohyblivostí, následovány jsou kationty s nižší pohyblivostí. Všechny neutrální částice jsou unášeny k detektoru pouze elektroosmotickým tokem. Nelze je tedy separovat, ale využívá se jich jako tzv. značkovačů (markerů) k určení rychlosti EOF. Nakonec jsou k detektoru dopraveny též anionty, přičemž jako poslední budou detekovány ty, jejichž elektroforetická pohyblivost je nejvyšší.

#### Určení pohyblivosti z experimentálních dat

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

$$v_i = \frac{l_D}{t_i}. \quad (5)$$

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

$$v_{i,+} = v_{i,+,\text{mig}} + v_{\text{EOF}}. \quad (6)$$

Pro celkovou rychlost složky nesoucí záporný náboj pak platí analogicky

$$v_{i,-} = v_{\text{EOF}} - v_{i,-,\text{mig}}. \quad (7)$$

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

$$\mu_{i,+} = \frac{v_{i,+,\text{mig}}}{E} = \frac{l_D l_C}{U} \left( \frac{1}{t_{i,+}} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (8)$$

a

$$\mu_{i,-} = \frac{v_{i,-,\text{mig}}}{E} = \frac{l_D l_C}{U} \left( \frac{1}{t_{\text{EOF}}} - \frac{1}{t_{i,-}} \right). \quad (9)$$

#### Stanovení disociační konstanty metodou CZE

Disociační konstanta slabé jednosytné kyseliny HA je dána vztahem

$$K_A = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}}, \quad (10)$$

ve kterém  $a$  značí aktivity. Za předpokladu, že lze ztotožnit aktivitu a koncentraci neutrálních částic, můžeme tento vztah upravit na tvar

$$K_A = a_{\text{H}_3\text{O}^+} \gamma_- \frac{\alpha}{1 - \alpha}, \quad (11)$$

ve kterém  $\gamma_-$  představuje aktivitní koeficient aniontu  $\text{A}^-$ . Vyjádříme-li odtud  $\alpha$  a dosadíme jej do vztahu [4] dostaneme

$$\mu_{\text{ef}} = \frac{\mu_{\text{A}^-} K_{\text{A}}}{K_{\text{A}} + a_{\text{H}_3\text{O}^+} \gamma_-} \quad (12)$$

Pro převrácenou hodnotu efektivní pohyblivosti dané slabé kyseliny pak získáme lineární závislost na aktivitě hydroxoniových iontů (za předpokladu, že iontová síla roztoků je konstantní), jak je patrné z rovnice

$$\frac{1}{\mu_{\text{ef}}} = \frac{1}{\mu_{\text{A}^-}} + \frac{\gamma_-}{\mu_{\text{A}^-} K_{\text{A}}} a_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (13)$$

Dále lze výpočtem ověřit, že při malých hodnotách iontové síly přibližně platí

$$\mu_{\text{A}^-} = \mu_{\text{A}^-, \infty} \gamma_-, \quad (14)$$

takže rovnice [13] se zjednoduší na tvar

$$\frac{1}{\mu_{\text{ef}}} = \frac{1}{\mu_{\text{A}^-}} + \frac{1}{\mu_{\text{A}^-, \infty} K_{\text{A}}} a_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (15)$$

Při výpočtu disociační konstanty ze směrnice přímky vystihující závislost  $1/\mu_{\text{ef}}$  na  $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$  tedy použijeme tabelovanou limitní pohyblivost aniontu dané slabé kyseliny.

### Základní informace o aparatuře *Agilent CE*

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

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

Tabulka 1.

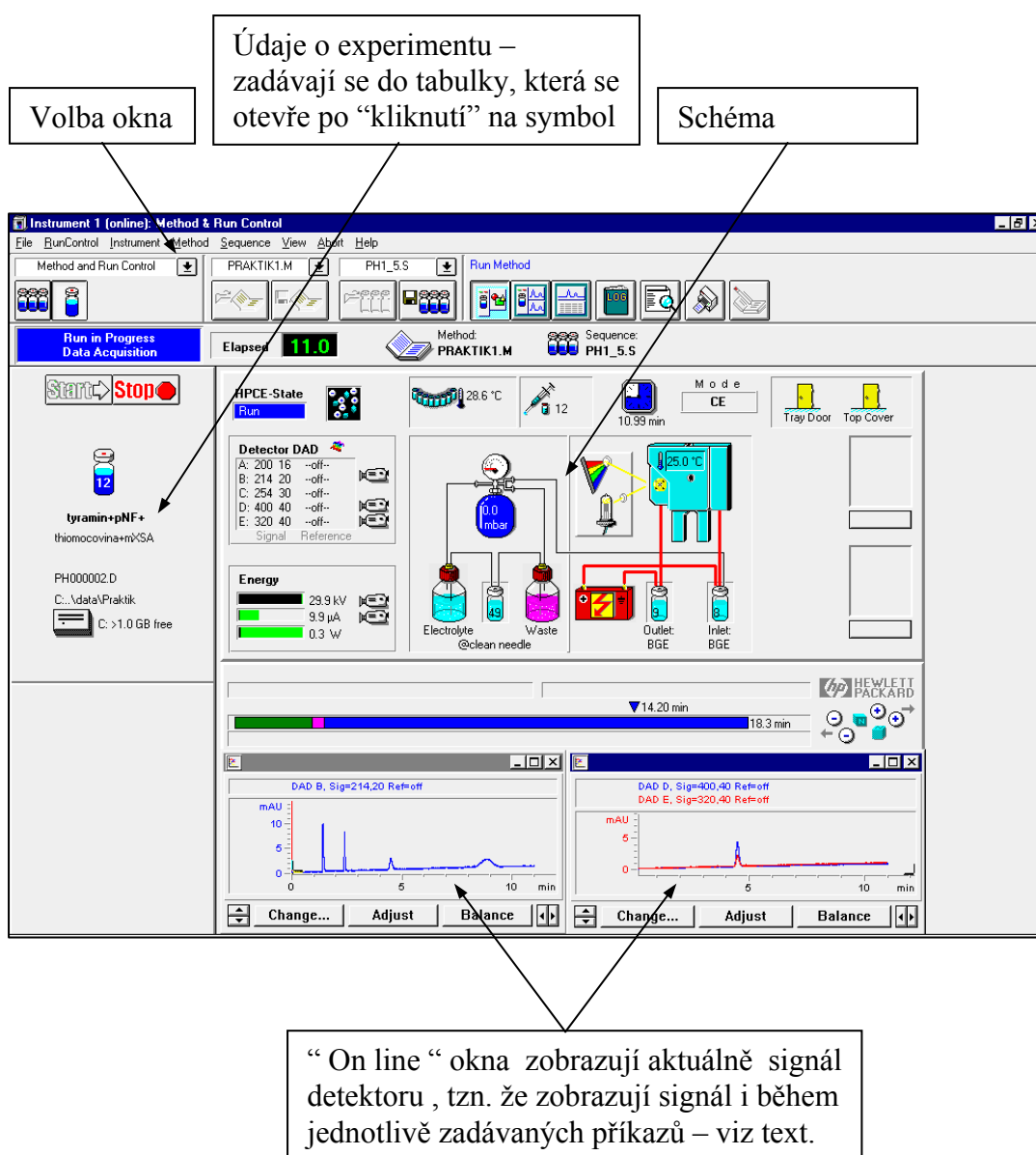
Parametry metody

Obecný popis	Hodnoty zvolené v metodě <i>Praktik</i>
Pozice vialek v karuselu obsahující BGE	8, 9
Teplota kazety s kapilárou	25°C
Vkládané napětí - polarita	+ - odpovídá obr.1.
- hodnota	30 kV
Dávkování vzorku - způsob	hydrodynamický
- tlak resp. $\Delta p$	10 mbar
- čas, po který je tlak aplikován	5 s
Vlnové délky, při kterých má být zaznamenán elektroferogram	214 nm, 320 nm, 400 nm
Proplachování kapiláry před experimentem	
- pozice vialek „z“ → „do“	1. krok 8 → 6    2. krok 8 → 9
- čas, po který je aplikován tlak 940 mbar	1. krok 1 min    2. krok 1 min
Čas, za který má být experiment ukončen	15 min

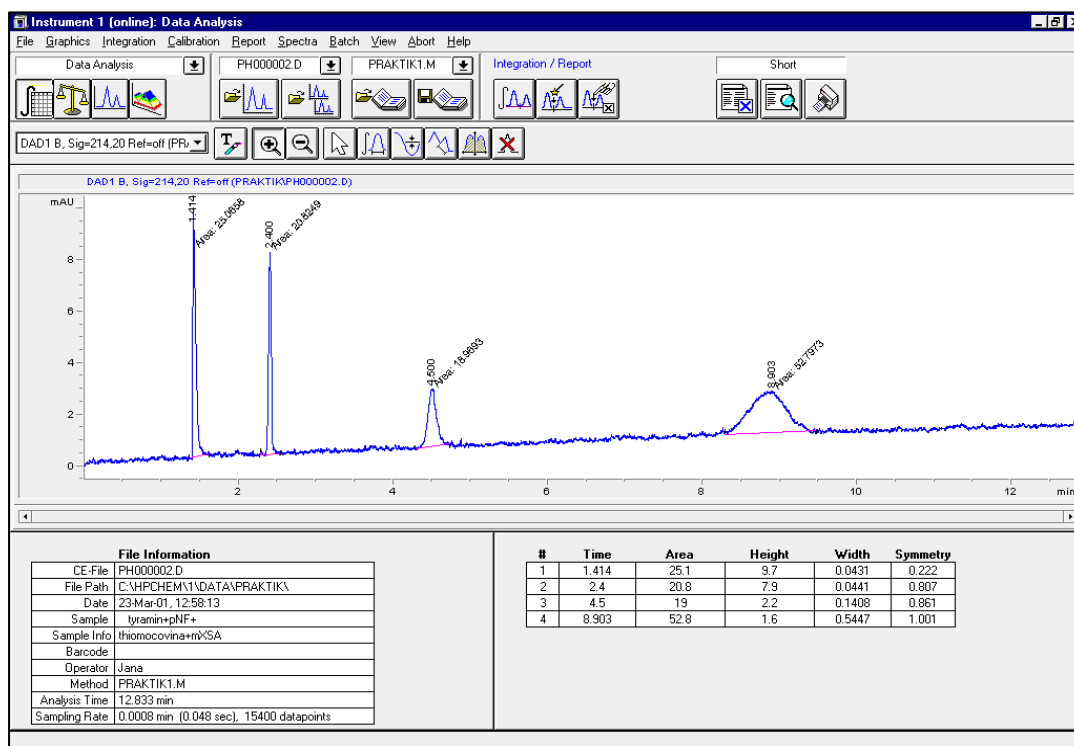
Dalšími nezbytnými údaji, které však nejsou součástí metody, jsou údaje o konkrétním experimentu. Musí být zadaná pozice vialky v karuselu, kde se nachází vzorek, a jméno souboru, do kterého budou uložena data z daného experimentu. Dále je vhodné zadat název vzorku a jméno operátora.

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

Zadávání parametrů metody a údajů o experimentu, spouštění experimentů a provádění samostatných příkazů je přístupné z okna obrazovky *Method and Run Control*, které je znázorněno na obr.2. K prohlížení a dalšímu zpracování naměřených elektroferogramů slouží okno obrazovky *Data Analysis*. Ukázka tohoto okna je na obr. 3.



Obr. 2 Okno *Method and Run Control* programu *Agilent Capillary Electrophoresis (on line)*.



Obr. 3 Okno *Data Analysis* programu *Agilent Capillary Electrophoresis (on line)*.

## Postup práce

- Příprava základních elektrolytů

Cílem je připravit řadu pěti pufrů, jejichž pH leží v okolí  $pK_A$  p-nitrofenolu, aktivita hydroxoniových iontů se v nich mění přibližně ekvidistantně a všechny roztoky mají nízkou a přibližně stejnou iontovou sílu.

Ze zásobních roztoků 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  připravte do 25 ml odměrných baněk pět pufrů podle tabulky 2. Odměrné baňky doplňte deionizovanou vodou. Změřte pH těchto pufrů. Naměřené hodnoty porovnejte s hodnotami vypočtenými, které jsou uvedeny v tabulce 2. Posuďte, zda vámi připravené pufrы vyhovují výše uvedeným požadavkům. Nevyhovující pufrы připravte znovu.

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

### Tabulka 2.

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

Pufr č.	V[ml]		pH	I[mmol.dm <sup>-3</sup> ]
	0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$		
1	4	1,25	6,63	3,1
2	3,75	1,5	6,73	3,3
3	3,25	1,75	6,90	3,4
4	2,25	2	7,08	3,3
5	1	2,5	7,53	3,4

- Příprava vzorku

K demonstraci základních jevů uplatňujících se v CZE bude vámi analyzovaný vzorek obsahovat kromě p-nitrofenolu a thiomocoviny jako značkovače EOF dále ještě tyramin (4-(2-aminoethyl)fenol), který se v dané oblasti pH chová jako silná zásada, a m-xylen-4-sulfonovou kyselinu, která patří mezi silné kyseliny.

K dispozici máte zásobní roztoky 0,01 M tyraminu, 0,0025 M thiomocoviny, 0,0025 M p-nitrofenolu a 0,0025 M kyseliny m-xylen-4-sulfonové. Do 4 ml lahvičky připravte vzorek smíšením těchto komponent v objemových poměrech 1:2:2:1 podle uvedeného pořadí. 300  $\mu$ l této směsi odpipetujte do vialky.

- Příprava aparatury k měření

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

- Vlastní měření

Proměřte elektroferogramy vzorku v připravených pufrech. Nezapomeňte zadat parametry pro jednotlivé experimenty (viz obr. 2).

- Ukončení experimentální práce

Kapiláru propláchněte vodou - z každé vialky vždy po dobu 2 minut. Vyprázdněte odpadní vialku. Vodu ve vialkách vyměňte a proplachování zopakujte. Nakonec vysušte kapiláru proudem vzduchu – 1 minutu „proplachujte“ z prázdné vialky. Použité nádoby pečlivě vymyjte deionizovanou vodou.

## Vyhodnocení experimentů

- Záznamy z experimentů vytiskněte ve formě *Report*. Jednotlivé píky na elektroferogramech přiřaďte příslušným látkám ze vzorku a přiřazení zdůvodněte. K identifikaci zóny p-nitrofenolu využijte znalostí ze základního praktika.
- Vypočítejte pohyblivost elektroosmotického toku (rychlost EOF vztažená na jednotkovou intenzitu elektrického pole) a aktuální resp. efektivní pohyblivosti separovaných látek. Hodnoty uspořádejte do tabulky a ty, u nichž to má smysl, statisticky zpracujte ( $\bar{\mu}$ ,  $\sigma_{n-1}$ ).
- Stanovte disociační konstantu p-nitrofenolu.
- Určete dávkovaná látková množství sloučenin ve vzorku. Dále vypočítejte, kolikrát se vymění objem kapiláry při proplachování po dobu jedné minuty.

Parametry použité kapiláry nezbytné k výpočtům jsou uvedeny na kazetě.