

Kapillarelektroforese

Kapillarelektroforese er ved at finde fodfæste i mange laboratorier. Det skyldes høj effektivitet samt hurtig og rationel metodeudvikling. Her gives en kort introduktion til metoden og forslag til standardbuffere som udgangspunkt for metodeudvikling

Af Jette Tjornelund, lektor, ph.d., Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi, DFH, jt@dfh.dk

Separationen i kapillarelektroforese (CE) i fri opløsning er en hastighedsproces baseret på forskelle i analytternes størrelsesladningsforhold. Separationen foregår typisk i et kvartskapillar (50 cm x 50 mm i.d) pålagt en spænding på 20–30 kV. Prøven injiceres ved tryk/vakuum eller ved at pålægge en spænding over kapillaret (elektrokinetisk injektion). Kapillaret er fyldt med en kørselsbuffer, og under kørslen er kapillarenderne neddyppet i bufferkar. Detektion foregår typisk ved måling af UV-absorbansen direkte på kapillaret ca. 5-10 cm fra katoden (figur 1).

Analytten skal være ladet, før den kan bevæge sig i fri opløsning. Det er indlysende, at kationer vil vandre mod katoden og detekteres, men måske knap så indlysende at anioner også vil kunne detekteres ved katoden. Forklaringen er, at der opstår et elektroosmotisk flow (EOF) i kapillaret rettet mod katoden, og at dette flow normalt har en sådan størrelse, at anioner vil føres mod katoden, selvom de vandrer mod anoden i det elektriske felt. EOF skyldes, at de hydratiserede kationer, der naturligt vil lægge sig nær de negativt ladede silanolgrupper på kvartskapillarets overflade, trækkes mod katoden (figur 1). EOF's størrelse er derfor afhængig af ladningen på kapillarets overflade og øges med stigende pH i intervallet fra pH 3 til 10. Under pH 3 har EOF ingen betydning.

Viden om analytternes struktur og pKa-værdier giver et rationelt grundlag for udvikling af en metode. Hvis analytten har basisk karakter, vil den være protoneret eller positiv ladet ved lavt pH. Tilsvarende vil stoffer med sur karakter være deprotonerede eller være negativt ladede ved høj pH. Zwitterioner kan analyseres i begge ender af pH-skalaen. Hvis stoffet ikke er ioniserbart, er det nødvendigt at benytte sig af teknikker som micellar elektrokinetisk chromatografi (MEKC) eller mikroemulsion elektrokinetisk chromatografi (MEEKC), hvor der indføres en

ladet pseudostationær fase i kørselsbufferen, hvortil der kan ske en fordeling af neutrale analytter. Stoffer, der har en lav opløselighed i vand, kan være svære at analysere i vandige CE-systemer. Løsningen på dette problem er tilsætning af organiske opløsningsmidler til kørselsbufferen eller brug af ikke-vandige CE-systemer, alternativt kan man forsøge sig med MEEKC. I tabel 1 (side 20) gives en oversigt over typiske standardbuffer og deres anvendelse.

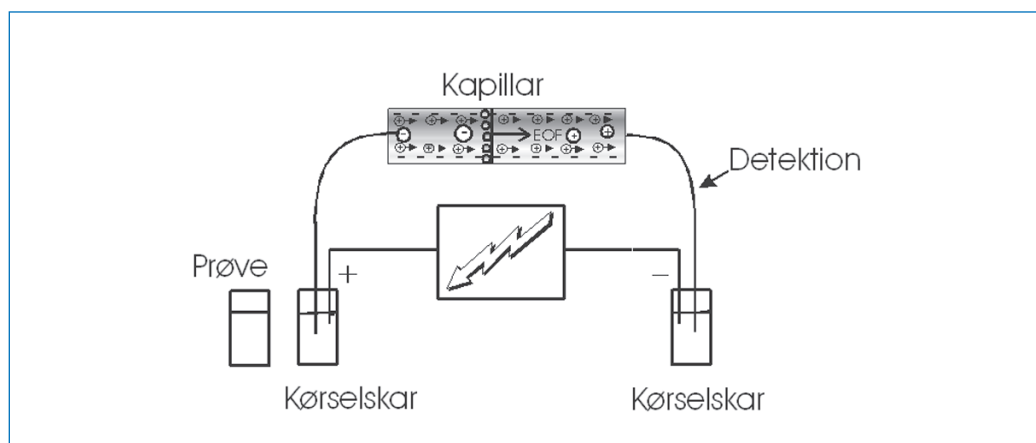
Lav pH i kørselsbufferen til basiske stoffer

En buffer med lavt pH er et passende udgangspunkt for mange basiske stoffer herunder proteiner, peptider og basiske lægemiddelforbindelser. Disse stoffer indeholder en aminogruppe, der protoneres ved tilstrækkelig lav pH. Det mest anvendte separationsmedium er en natriumphosphatbuffer med pH 2,5. Fordelen ved at anvende en fosfatbuffer er lav baggrunds-UV-absorbans og en god bufferkapacitet. Alternativer kan være citratbuffer, der ofte giver anledning til en anden selektivitet grundet interaktioner med analytterne eller acetatbuffer, der er anvendelig, hvis man ønsker massespektroskopisk detektion. Acetatbuffer har dog en dårlig bufferkapacitet ved pH 2,5.

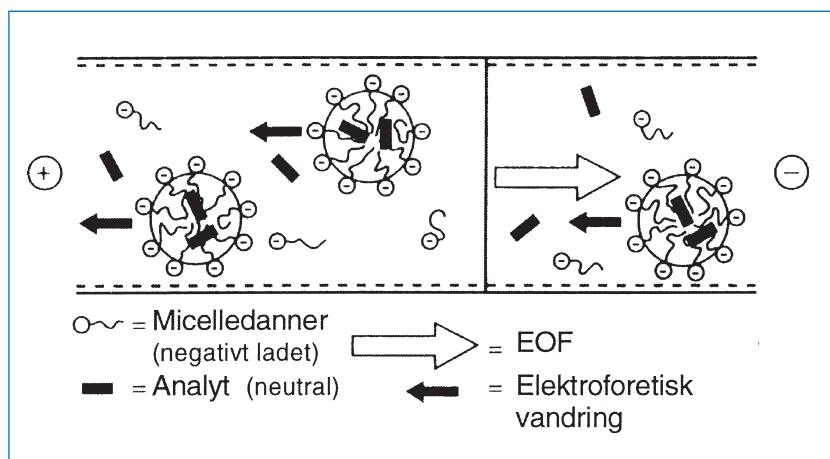
Det er en fordel at have lav ledningsevne i kørselsbufferen. For at reducere problemer med dannelse af varme i kapillaret under kørslen kan man med fordel vælge lithium-, ammonium- eller natriumsalte fremfor kaliumsalte. pH kan ofte med fordel hæves for at få en kortere analysetid qua en stigende EOF, hvis analytternes pKa-værdier er tilstrækkeligt høje. Ønsker man adskillelse af chirale basiske stoffer, er en fosfatbuffer med lav pH (2,5) tilsat 10 mM af en cyclodextrin et godt udgangspunkt. Herefter undersøges betydningen af pH i området fra 2 til 6, temperatur, art af cyclodextrin samt koncentration af cyclodextrin og buffer på systematisk vis. Kits til en sådan undersøgelse

Figur 1. Skitse af kapillarelektroforese-instrument.

CLAUSDAMM
4916 3388
Udstyr til:
* steril produktion
* bioteknologi
* forskning
www.clausdammm.dk



Figur 2. Micellar elektrokinetiske chromatografi (MEKC).



er kommercielt tilgængelige.

Høj pH i kørselsbufferen til organiske syrer

pK_a-værdierne for mange organiske syrer ligger i intervallet fra 3-6. Derfor benyttes kørselsbuffer i pH-intervallet fra 7 til 10 for at sikre, at syrerne er ioniserede. Phosphat- og boratbuffer er de mest anvendte. Boratbufferen har heller ikke UV-absorbans af betydning, og detektion kan da foregå ved 190-200 nm. Man kan optimere en chiral separation ved tilsætning af cyclodextrin ganske som ved separation af basiske stoffer, blot vælges pH-intervallet fra ca. 5 til 9.

Ikke-vandig kørselsbuffer

Ikke-vandige kørselsbuffer er et godt alternativ i tilfælde, hvor analytterne har en lav opløselighed i vand, eller hvor de stoffer man ønsker at adskille, har samme eller næsten samme størrelses-/ladnings-forhold. Methanol-acetonitril-blandinger har vist sig meget anvendelige. Ammoniumacetat evt. i kombination med eddikesyre bruges for at styre surhedsgraden i kørselsbufferen. Denne kombination er især anvendelig til basiske stoffer.

Ammoniumacetat er meget brugt, da dette salt har en tilstrækkelig høj opløselighed i organiske opløsningsmidler. Ønsker man at gøre kørselsbufferen mere basisk, kan ammoniumacetat erstattes af natriumacetat, og eddikesyre kan udelades. Stofferne migrering kan også påvirkes ved at lave forskellige blandingsforhold af acetonitril og methanol.

MEKC eller MEEKC til ladede og neutrale stoffer

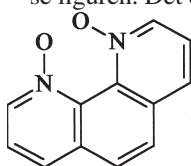
Begge disse teknikker er baseret på en fordeling af analytterne mellem miceller dannet i bufferen og den omgivende buffer samt elektroforetisk migrering (figur 2). Der tilsættes en ionisk micelledanner til kørselsbufferen i en koncentration, der overstiger den kritiske micellekoncentration (cmc). Mest anvendt er natriumdodecylsulfat (måske bedre kendt som SDS) i koncentrationer fra 10-100 mM. Herved dannes negativt ladede miceller. Brug af lithiumdodecylsulfat reducerer strømstyrken i kapillaret og dermed varmeudviklingen betragteligt og bør derfor foretrækkes. Hvis man har valgt en relativ høj pH-værdi, vil der ved pålægning af spænding genereres en kraftig EOF mod katoden. Den negativt ladede micelle vil forsøge at vandre mod

Nyt om helicener

Helicener er helixformede (og derved chirale) kondenserede polycykliske aromatiske eller heteroaromatiske stoffer.

I et halvt århundrede har man søgt at fremstille

1,10-phenanthrolin-*N,N'*-dioxid, se figuren. Det er nu lykkedes på universitetet i Tel Aviv for Samuel Rozen og Sharon Dayan, som oxiderede 1,10-phenanthrolin med HOF·CH₃CN oxofluorsyre—ethannitril (1/1), som de skriver er den bedste oxygendonor i organisk kemi.



Bos

1999, 6. december: After 50 years, a new type of helicene. *Chemical & Engineering News*: 29.

Få kontrol med vandets renhed!

Vandets renhed kan dokumenteres ved hjælp af sporbare målinger af vands ledningsevne.

Som det første nationale måletekniske institut udenfor USA, kan DFM nu levere certificerede standardopløsninger med ledningsevne fra 10 mS/m med en usikkerhed ned til 0,1%. Alle certificerede opløsninger leveres med certifikat.

DFM tilbyder også:

- DFM-GUM kalibreringssoftware
- Kompendium i måleusikkerhed med modeller for kemiske målinger
- Undervisning i god vejteknik og usikkerhedsberegning

DFM

DANSK INSTITUT FOR FUNDAMENTAL METROLOGI

Bygning 307 - Anker Engelds Vej 1, DK-2800 Lyngby - Tlf.: 4593 1144 - Telefax: 4593 1137
E-mail: info@dfm.dtu.dk - <http://www.dfm.dtu.dk>

anoden, men EOF vil bevirke, at micellen føres mod katoden. Analytter kan fordeles mellem den omgivende buffer og micellen. Jo større fordeling til micellen, des større forsinkelse. Det er således muligt at adskille neutrale stoffer. Fordelingsforholdet for stoffer med høj lipofil karakter vil være stærkt forskudt mod micellen. Hvis man ønsker at adskille to lipofile stoffer, er det derfor nødvendigt at forskyde ligevægte mod den omgivende buffer. Dette kan gøres ved at tilsætte f.eks. methanol, acetonitril, cyclodextriner eller urea til kørselsbufferen. Hvis fordampning af de organiske opløsningsmidler viser sig at være et problem, kan man enten vælge et af de andre additiver eller nedsætte fordampningen ved at placere et lag af paraffinolie øverst i bufferkarret.

MEEKC er et alternativ til MEKC. Grundlæggende er princippet det samme; fordelingen af analyt sker blot til en oliedråbe i micellen. Man danner en mikroemulsion ved at ultralydsbehandle en blanding af f.eks. octan-1-butanol-SDS-10 mM natriumborat (0,81:6,61:3,31:89,27 w/w/w/w). MEEKC er ikke så vel undersøgt som MEKC, men de første resultater tyder på, at teknikken er meget anvendelig, hvis man ønsker at adskille stoffer, der er meget forskellige med hensyn til lipofilitet og ladning. Stoffer, der normalt ikke kan analyseres grundet en lav opløselighed i vand, synes at kunne analyseres i disse systemer.

Indirekte UV-detektion til simple organiske syrer, uorganiske anioner og uorganiske kationer

Indirekte UV-detektion gør det muligt at detektere ioner, der ikke selv har nogen chromoforgruppe. Der tilsættes et stof til kørselsbufferen, der har en stærk UV-absorption. Når analytten passerer detektoren, nedsættes UV-signalet, hvilket giver anledning til en negativ top på elektroferogrammet. Den tilsatte chromofor skal derfor have samme ladning, som den analyt man ønsker at bestemme. Stoffet med chromoforen skal vælges såle-

des, at mobiliteten passer med analytternes mobilitet. Chromat er hyppigt anvendt som chromofor i forbindelse med separation af uorganiske anioner, mens phtalat ofte anvendes til organiske syrer. For at opnå separation af organiske syrer vælges pH nær disses pKa-værdi. En 4-morpholinethansulfonsyre-buffer pH 5,2 har været anvendt til dette formål. Borat vælges typisk som buffersubstans til separation af de uorganiske anioner.

Der tilsættes ofte en kvaternær ammoniumforbindelse som tetradecyltrimethylammoniumbromid til bufferen i forbindelse med analyse af anioner. Kvaternære ammoniumforbindelser har en stærk affinitet til silanolgrupperne på kapillarets indre overflade. Ved tilsætning af tilstrækkelig høj koncentration vil der kunne dannes et dobbeltlag, som resulterer i, at kapillærvæggen bliver positiv ladet. EOF vil således være rettet mod anoden, og analysetiden for anioner vil afkortes. Man skal være opmærksom på, at polariteten af den pålagte spænding også skal vendes, når retningen af EOF vendes, således at detektoren nu sidder ved anoden og ikke som vanligt ved katoden.

For at opnå indirekte detektion af uorganiske kationer er det nødvendigt at tilsætte en kationisk chromofor til separationsbufferen. N,N-dimethylbenzylamin og imidazol har været de mest anvendte til dette formål. Mobilitet af ammonium- og kaliumionen har næsten samme størrelse, og separationen af disse to ioner er derfor vanskelig, medmindre der tilsættes chelatdannere som hydroxyisomørsyre, citronsyre eller myresyre.

Praktiske råd

For at sikre sig et stabilt system er det vigtigt jævnlige at rense CE-instrumentet for støv og snavs – især omkring elektroder, optiske slits og detektionsvinduet på kapillaret. Kapillaret skal skæres med plane og jævne ender, da ujævne snit vil genere injektionen og kan give anledning til drift på basislinjen. For at

Separations type	Kørselsbuffer	EOF	Anvendelse	Reference
CE	25 mM natriumphosphat buffer pH 2,5	Ingen	Basiske stoffer	1
CE	10 mM natriumtetraborat	Mod katode	Sure stoffer	1
CE	25 mM ammoniumacetat, 1 M eddikesyre i methanol-acetonitril (50:50 v/v)	Mod katode	Basiske stoffer der ikke er letopløselige i vand eller ikke adskilles i vandige systemer	2
CE	25 mM natriumacetat i methanol-acetonitril (50:50 v/v)	Mod katode	Sure stoffer der ikke er letopløselige i vand eller ikke adskilles i vandige systemer	2
CE	4 mM myresyre, 6 mM imidazol	Mod katode	Uorganiske kationer uden egen absorbans	1
MEKC	75 mM lithium dodecylsulfat, 10 mM borat, 15 mM β -cyclodextrin	Mod katode	Ladede og neutrale stoffer	1
CE	5 mM chromate, 0,5 mM tetradecyltrimethyl-ammoniumbromid, 5 mM borat	Mod anode	Uorganiske anioner uden egen UV-absorbans	1
CE	0,5 mM tetradecyltrimethylammoniumbromid, 5 mM phtalat, 50 mM 4-morpholin-ethansulfonsyre pH 5,2	Mod anode	Organiske syrer med lav egen UV-absorbans	1
MEEKC	Octan-1-butanol-SDS-10 mM natriumtetraborat (0,81:6,61:3,31:89,27 v/v/v/v)	Mod katode	Ladede og neutrale stoffer	1

Tabel 1. Typiske standardbuffer og deres anvendelse.

sikre sig at kvartskapillarets overflade har tilgængelige silanol-grupper, konditioneres nye kapillarer inden brug f.eks. ved at skylle med 1M NaOH i en time, 0,1 M NaOH i 20 min, vand i 15 min og derefter kørselsbuffer i 10 min. Hvert kapillar bør dedikeres til en metode, og man bør termostatere kapillaret under kørslen, hvis man ønsker en høj reproducerbarhed. Kapillaret skylles med kørselsbufferen i 1-2 min mellem hver injektion, og bufferen udskiftes i kørselskaret efter 1-10 injektioner afhængig af metoden, da bufferen i både inlet og outlet kan ændre sammensætning grundet vandring af bufferioner i det elektriske felt samt elektrodeprocesser. Inden opbevaring renses kapillaret med base for at ætse urenheder af kapillaroverfladen, efterfulgt af vand, og det tilsluttes luft for at undgå udfældning af buffer under opbevaring.

Prøven bør have en væsentlig lavere ionstyrke end kørselsbufferen for at opnå koncentrering af prøvezone (stacking), og det er derfor vigtigt at fjerne salte under prøveoprensningproceduren. Der bør ikke injiceres mere end 1-2% af kapillarets volumen, hvis man vil have en effektiv separation.

Konklusion

CE er en teknik, der anvendes til separation af mange stoftyper. Separationsmekanismerne er simple, og en rationel indgang til metodeudvikling er derfor mulig. Det reducerer den tid, der går med metodeudvikling. De fleste standardbuffer og flere kits er kommercielt tilgængelige hos instrumentfirmaerne der kan findes via Internettet

(<http://www.ceandcec.com>), så døren er åbnet for nye brugere.

Referencer

1. Kevin D. Altria, Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, Chromatographia CE Series, Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1998.
2. Inga Björnsdóttir, Jette Tjørnelund, Steen Honoré Hansen, Non-aqueous Capillary Electrophoresis - its applicability in the analysis of food, pharmaceuticals and biological fluids, Electrophoresis, 19 (1998)2179.

Redaktionen henviser også til artiklen »Anvendelse af kapillarelektroforese til udvikling af nye lægemidler« i nr. 4, 1999.



VANDT TECHMEDIA- BILEN

Næsten 20.000 kuponer blev det til i TechMedias store konkurrence, hvor præmien var en KIA Sportage firehjulstrækker med masser af ekstraudstyr.

Vinderkuponen blev udtrukket ved et stort Åbent hus arrangement i TechMedias nye kontorhus i Glostrup, og den heldige er allerede underrettet.

Vinderen blev: **Ingeniør Ove Jensen fra Rødovre**, som siden 1993 har været fast abonnent på **Teknisk Nyt** og **Maskin Aktuelt** fra TechMedia.

VI ØNSKER OVE JENSEN
TILLYKKE OG GOD
FORNØJELSE MED DEN
DEJLIGE GEVINST!



TechMedias revisor Hanne Brødsgaard trækker vinderen blandt næsten 20.000 indsendte kuponer.