

Automatizácia chemickej analýzy látok elektroforetickými technikami

Kajan Slavomír · Elektrotechnika, Prírodné vedy

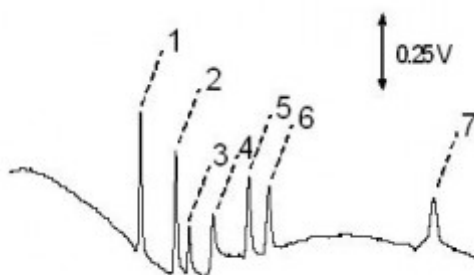
13.11.2009



Princíp elektroforetických techník: základom každej elektroforetickej techniky je prechod jednosmerného elektrického prúdu vhodným roztokom elektrolytu, v dôsledku čoho sa nainjektovaná zmes ionogénnych látok rozseparuje na samostatné zóny. Toto sa udeje v dôsledku rôznych pohyblivostí (rýchlostí pohybu) jednotlivých látok. Podľa signálov z vodivostných a UV detektorov sa dajú potom určiť jednotlivé zóny a z toho sa vyhodnocuje kvalitatívna (druh látky) a kvantitatívna (množstvo látky) informácia.

1 Kapilárna zónová elektroforéza

Pri technike kapilárnej zónovej elektroforézy (CZE) sa do nosného elektrolytu, ktorý vytvára homogénne jednosmerné elektrické pole, injektuje vzorka (rádovo stovky nanolitrov až mikrolitre) obsahujúca ióny látok, ktoré sa v tomto elektrolyte pohybujú k príslušným elektródam. Vzorka sa rozdelí na jednotlivé látky, ktoré sa pohybujú každá svojou rýchlosťou a postupne sa od seba vzdalujú.

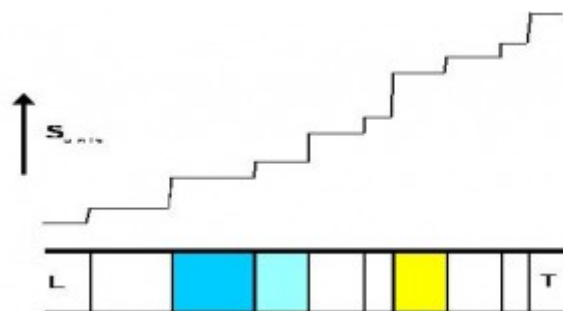


Obr.1 Signál nameraný kapilárnou zónovou elektroforézou

Potom na vodivostných detektoroch môžeme namerať signál v tvare pík (vrcholov), kde každý pík predstavuje (v ideálnom prípade) jednu látku. Čas objavenia sa maxima píku určuje kvalitatívnu informáciu (druh látky) a veľkosť píku (plocha alebo výška píku) určuje kvantitatívnu informáciu (množstvo látky) (Obr. 1).

2 Izotachoforéza

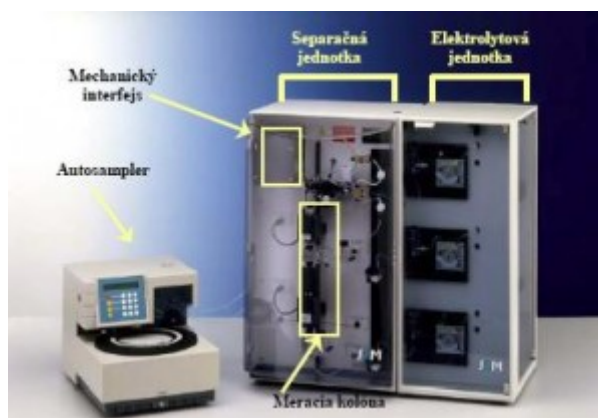
Samotné slovo izotachoforéza znamená pohybovať sa rovnakou rýchlosťou. V tejto metóde sa analyzovaná vzorka umiestni medzi dva rôzne elektrolyty (injektované množstvo je rádovo desiatky mikrolitrov) a nabité častice sa pohybujú v jednosmernom elektrickom poli k príslušným elektródam. Výhodou tejto metódy je to, že zóny jednotlivých látok sa pohybujú tesne za sebou a 2 susediace zóny sú od seba oddelené ostrou hranicou, ako aj fakt, že koncentrácia jednotlivých látok v príslušných zónach nezávisí od ich koncentrácie v injektovanej vzorke, čo sa dá s výhodou využiť pri analýzách vzoriek biologického a enviromentálneho charakteru. Výsledkom separačného procesu je schodovitý gradient jednotlivých pohyblivostí a látky sú usporiadané od najväčšej po najmenšiu pohyblivosť. Potom aj signál na vodivostnom (univerzálnom) detektore bude mať schodíkový tvar (Obr. 2.).



Obr.2. Signál nameraný izotachoforetickou technikou univerzálnym detektorom

Meracie zariadenie - hardvérové vybavenie

Meracie zariadenie sa skladá z troch navzájom komunikujúcich zariadení (Obr. 3): autosamplera, separačnej jednotky, elektrolytovej jednotky.



Obr.3. Meracie zariadenie

Autosampler je zariadenie, ktoré zabezpečuje transport vzorky do injekčného priestoru separačnej jednotky. Na kruhovej doske sú vytvorené očíslované diery, do ktorých sa uložia skúmavky so vzorkou, ktorá sa má analyzovať. Keď sa odštartuje meranie, separačná jednotka sa pomocou interfejsu spojí s autosamplerom a vyčistia sa hadičky od zvyškov vzorky z predchádzajúceho merania. Potom sa otočením taniera nájde želaná skúmavka a výsuvnou ihlou sa naberie vzorka do slučky autosamplera. Pomocou pumpičiek a hadičiek sa analyzovaná látka dostane do injekčnej slučky separačnej jednotky.

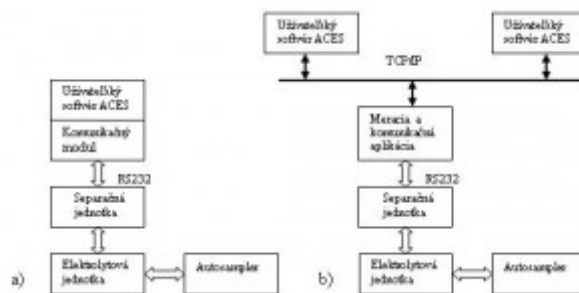
Separacia jednotka má za úlohu vplyvom jednosmerného vysokého napätia a elektrického prúdu (rádovo stovky μA) navodiť separáciu látok v analyzovanej zmesi

a zaznamenať tento stav pomocou signálov z detektorov v separačnom priestore. Separačný priestor pozostáva z hornej a dolnej kolóny, v ktorej sa nachádzajú kapiláry dlhé približne 14 cm-ov s priemerom 0,8 mm (horná kolóna) a 0,3 mm (dolná kolóna). V kolónach na kapilárach sú zapojené detektory, kde v hornej kolóne je zapojený jeden vodivostný detektor, v dolnej kolóne je zapojený jeden vodivostný detektor a UV detektor. Separačná jednotka ďalej obsahuje vysokonapäťový prúdový zdroj, ktorý umožňuje dosiahnuť max. jednosmerné napätie 20kV a max. jednosmerný prúd 500 μ A, pričom zdroj je riaditeľný cez jeho I/O signály z riadiacej dosky. Riadenie činnosti separačnej jednotky zabezpečuje riadiaca doska s mikroprocesorom, EPROM pamäťou, A/D a D/A prevodníkmi, ktorá má za úlohu riadenie všetkých častí zariadenia, spracovanie meraných vzoriek z detektorov, komunikáciu s počítačom a zariadeniami cez komunikačnú jednotku. Komunikácia medzi autosamplerom, elektrolytovou jednotkou a PC prebieha cez sériovú linku RS 232, kde sériovou linkou sa posielajú parametre merania a merané údaje prostredníctvom presne definovaného protokolu.

Elektrolytová jednotka je samostatné zariadenie s mikroprocesorom a EPROM pamäťou, ktoré má za úlohu riadenie chodu pumpičiek, ventilov a systému kontroly hladín vo fľaškách, spracovanie signálu z LED diód na meranie výšky hladiny, komunikácia so separačnou jednotkou a autosamplerom. Pumpovací systém pozostáva z ventilov, flaštičiek, spojovacích hadičiek a troch pumpičiek, ktoré sú poháňané s jednosmernými motormi. Pumpičky zabezpečujú naplnenie vodiaceho a zakončujúceho elektrolytu, čistenie trubičiek, premiestnenie vzorky do meracej jednotky. Systém na kontrolu hladín vo fľaškách pozostáva z LED diód, fotodetektorov a optických vlákien.

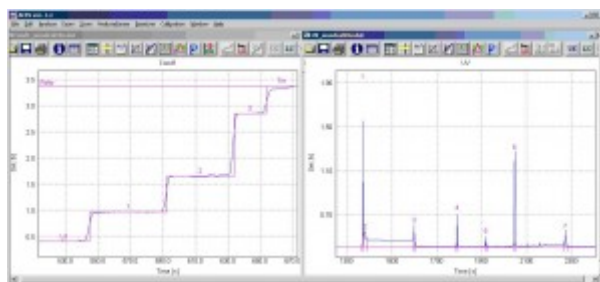
3. Merací proces

Meranie sa začne naplnením jednotlivých roztokov elektrolytov do kolón v separačnom priestore. Najprv sa dáva vodiaci elektrolyt, potom samotná vzorka a na koniec zakončujúci elektrolyt – ak ide o meranie v ITP móde. Pri meraní v CZE móde hovoríme len o nosnom elektrolyte, ktorý sa dáva aj pred aj po vzorke. Ak je takto pripravené meranie, potom je zapnutý zdroj jednosmerného prúdu. Jednotlivé zložky vzorky sa od seba jednoznačne oddelia a pohybujú sa cez kapiláry smerom dole. Detektory v kolónach merajú určitú charakteristiku látky (napríklad odpor) a zároveň aj čas trvania, pokým jeden typ látky prechádza cez snímaný prierez detektora. UV detektor vysiela UV žiarenie a meria absorbančiu fotónov, teda množstvo fotónov, ktoré daná látka nepohltila a ktoré prešli detekčnou celou. Ovládanie procesu merania ako aj jeho vyhodnocovanie je realizované z PC pomocou užívateľského softvéru ACES (Advanced Capillary Electrophoresis Software). Program ACES môže byť v prevedení na jedno PC (obr. 4a), alebo aplikácia je rozdelená na meráciu a užívateľskú časť (obr. 4b), kde meracia aplikácia je na PC pripojená k meraciemu zariadeniu cez RS232 a užívateľská aplikácia ACES (klient aplikácia) môže byť na viacerých PC pripojená sieťou cez TCP/IP protokol na meráciu aplikáciu (server aplikácia). Vďaka automatizácii meracieho procesu je možné po príprave meracieho zariadenia a nastavenia parametrov meracieho procesu vykonať merania automaticky bez potreby ľudskej obsluhy. V prípade výskytu chyby sa systém snaží chybu odstrániť a zopakovať analýzu, pokiaľ je k dispozícii potrebné množstvo vzorky.



Obr.4. Prevedenie užívateľského softvéru a) na jedno PC b) sieťová aplikácia

Po ukončení merania sa údaje z detektorov uložia do súboru, odkiaľ je následne možné vykonať vyhodnotenie merania. Cieľom vyhodnotenia signálov z detektorov je určiť aké druhy látok (kvalitatívna informácia) a o akej koncentrácii (kvantitatívna informácia) sa v danej vzorke nachádzajú na základe už nameraných kalibračných dát sledovaných látok. Vyhodnocovanie je realizované pomocou užívateľskej aplikácie ACES, kde na základe nastavených parametrov sa namerané údaje vyhodnotia buď automaticky alebo manuálne, kedy užívateľ pomocou zmien parametrov (Obr. 5) nájde ich optimálnu kombináciu. Pri automatickom vyhodnotení nameraných signálov program na základe inflexných bodov prvej derivácie nájde jednotlivé zóny, ktorým prislúchajú určité látky. V závislosti od parametrov týchto zón program z kalibračných údajov priradí prislúchajúcu látku a vypočíta jej koncentráciu vo vzorke. Pre každé meranie je možné vygenerovať vyhodnocovací report s vhodným a užívateľsky definovaným obsahom.



Obr.5. Užívateľská aplikácia ACES pri vyhodnotení signálov z vodivostného a UV detektora

Záver

Automatizovaním meracieho a vyhodnocovacieho procesu pri chemickej analýze látok s využitím elektroforetických techník sa podarilo zrýchliť, skvalitniť a zobjektivizovať analýzu a vyhodnocovanie najmä veľkých sérií vzoriek. Efektivita práce v chemickom laboratóriu sa takisto zvýšila, pretože merací a vyhodnocovací proces sa môže vykonávať automaticky bez potreby ľudskej obsluhy.

1. Landers, J.P.: Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC, Boca Raton, 1997.
2. Nagyová, M.: Program na chemickú analýzu látok z meraných údajov vodivostných a UV detektorov, Diplomová práca, FEI STU, Bratislava, 2003

Spoluautormi tohto článku sú J. Marák, D. Kaniansky, F. Iványi, Prírodovedecká fakulta Univerzita Komenského v Bratislave, Katedra analytickej chémie, Článok vznikol na Ústave riadenia a priemyselnej informatiky, Slovenská technická

univerzita v Bratislave, Fakulta elektrotechniky a informatiky
