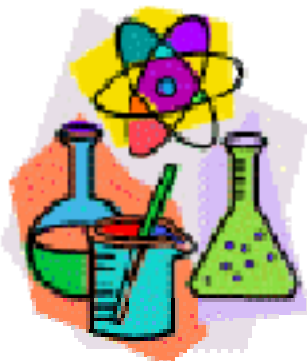


# Stanovení aminokyselin kapilární a mikročipovou elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí



**Petr Tůma**

**Ústav biochemie, molekulární a  
buněčné biologie 3.LF UK**

# Aminokyseliny

- biogenních AMK je známo cca 300
- 20 AMK proteinogenních (kódujících)
  - posttranslační úpravy: selenocystein, 4-hydroxyprolin a 3-hydroxyprolin, 5-hydroxylysin, 3-methylhistidin
- neproteinogenní: citrullin, ornithin, GABA,...
- AMK významný zdroj energie: 10 – 20%
- syntéza
  - biogenní aminy: dopamin, adrenalin, serotonin, histamin
  - kreatinin, kreatin

# Klinický význam aminokyselin

- proteiny nejsou stálé – denní turnover:
  - 10 % kosterní svalstvo
  - 40 % játra
  - 80 % sliznice střeva
- poruchy metabolismu AMK
  - fenylketonurie, argininémie, cutrulinemie, homocystinurie, choroba javorového sirupu, hypermethionémie, tyrosinemie, argininsukcinaturie
- novorozenecký screening
- arteriálně venózní difference
- marker odbourávání proteinů kosterního svalstva

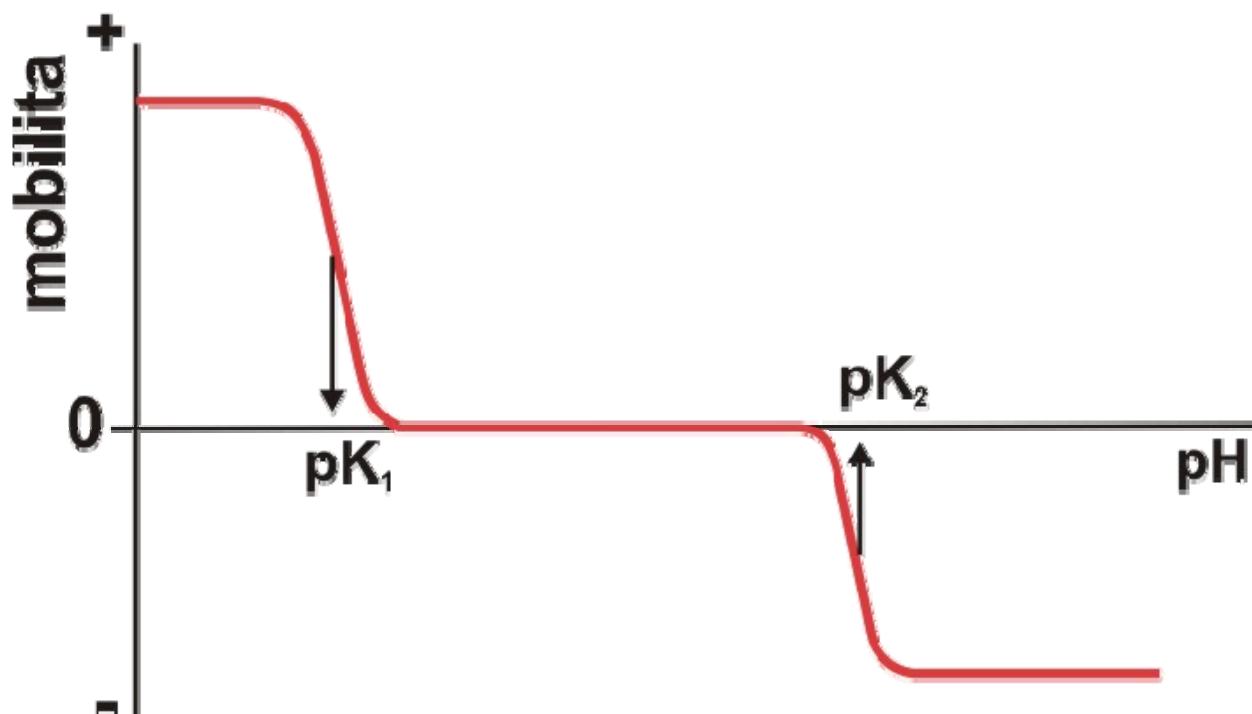
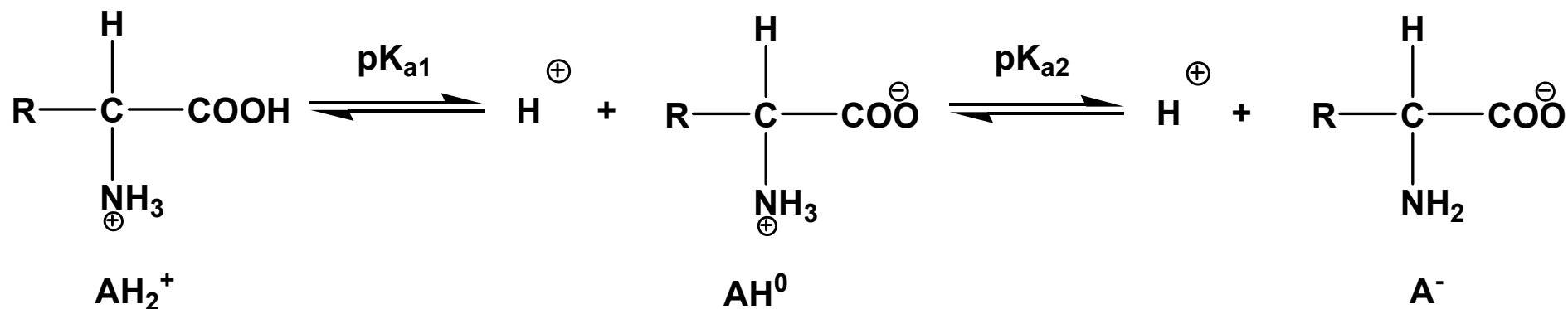
# Klinická analýza

- tělní tekutiny – složité matrice
  - makrokomponenty, mikrokomponenty
  - minerály, malé molekuly, makromolekuly
  - nestabilita za podmínek in vitro
  - vysoká salinita, proteiny

## nutnost separace

- vysoká variabilita
- objem vzorku (mikrodialyzáty, novorozenecká krev)

# Aminokyseliny a CE separace



# HPLC versus CE

	HPLC	CE
<b>vzorek</b>	1-50 $\mu\text{L}$	< 1-5 nL
<b>doba analýzy</b>	10-40 min	5-15 min
<b>počet teor.pater</b>	cca $10^4$	cca $10^5$
<b>LOD (UV)</b>	cca $10^{-7}$ - $10^{-9}$ mol/L	cca $10^{-5}$ - $10^{-7}$ mol/L
<b>cena kolony/kapiláry</b>	300 USD	10-15 USD
<b>objemový průtok</b>	0,1-2,0 mL/min	0,1-2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$
<b>reprodukovatelnost retenčních parametrů</b>	< 2%	< 5%
<b>přesnost a správnost stanovení</b>	cca 2%	cca 2-5%

# Úprava vzorku

## HPLC – kolony naplněné stacionární fází

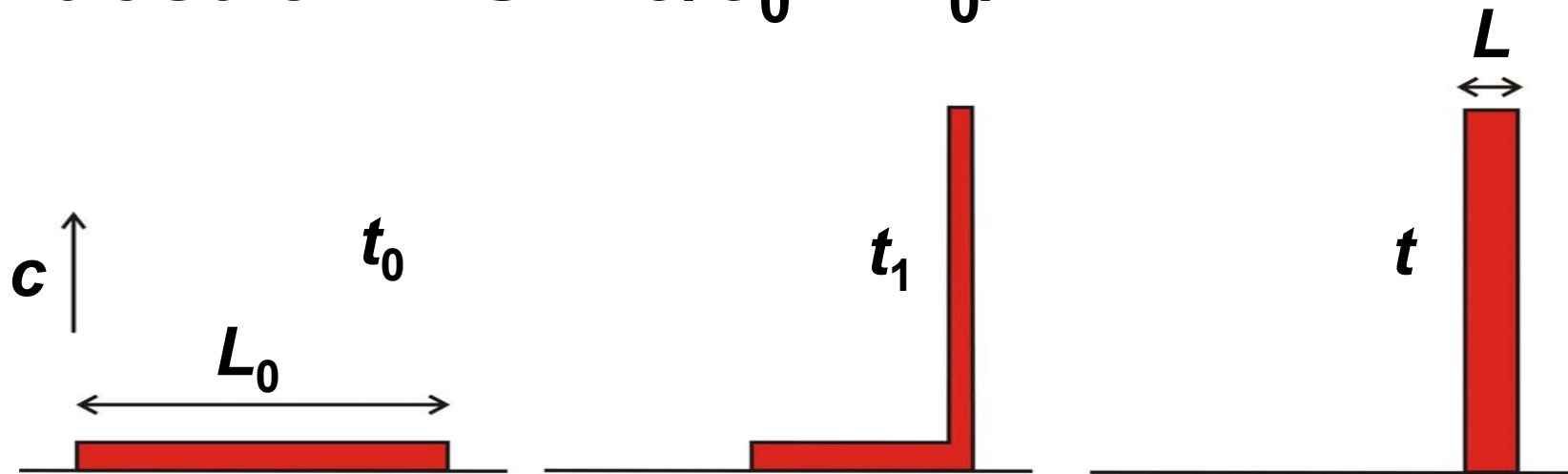
- filtrace – centrifugace
- deproteinizace – kys. chloristá, kys. sulfosalicylová
- extrakce – SPE, LLE
  - odstranění solí
  - prekoncentrace

## CE – otevřené kapiláry

- přímé dávkování biologického materiálu
  - analyt v nadbytku
  - analýza obsahu buňky
- adsorpce na stěnu kapiláry – promývání, přidavek povrchově aktivní látky
- vysoký obsah solí
- deproteinizace – organické rozpouštědlo

# On-line preconcentration v CE – sample stacking

- zaostření  $S = c/c_0 = L_0/L$



- Ohmův zákon

- $E_{\text{BGE}} \cdot G_{\text{BGE}} = E_{\text{S}} \cdot G_{\text{S}}$
- $G_{\text{S}} < G_{\text{BGE}}$
- vysoký obsah solí – přídavek org. rozpouštědla



# Stacking II

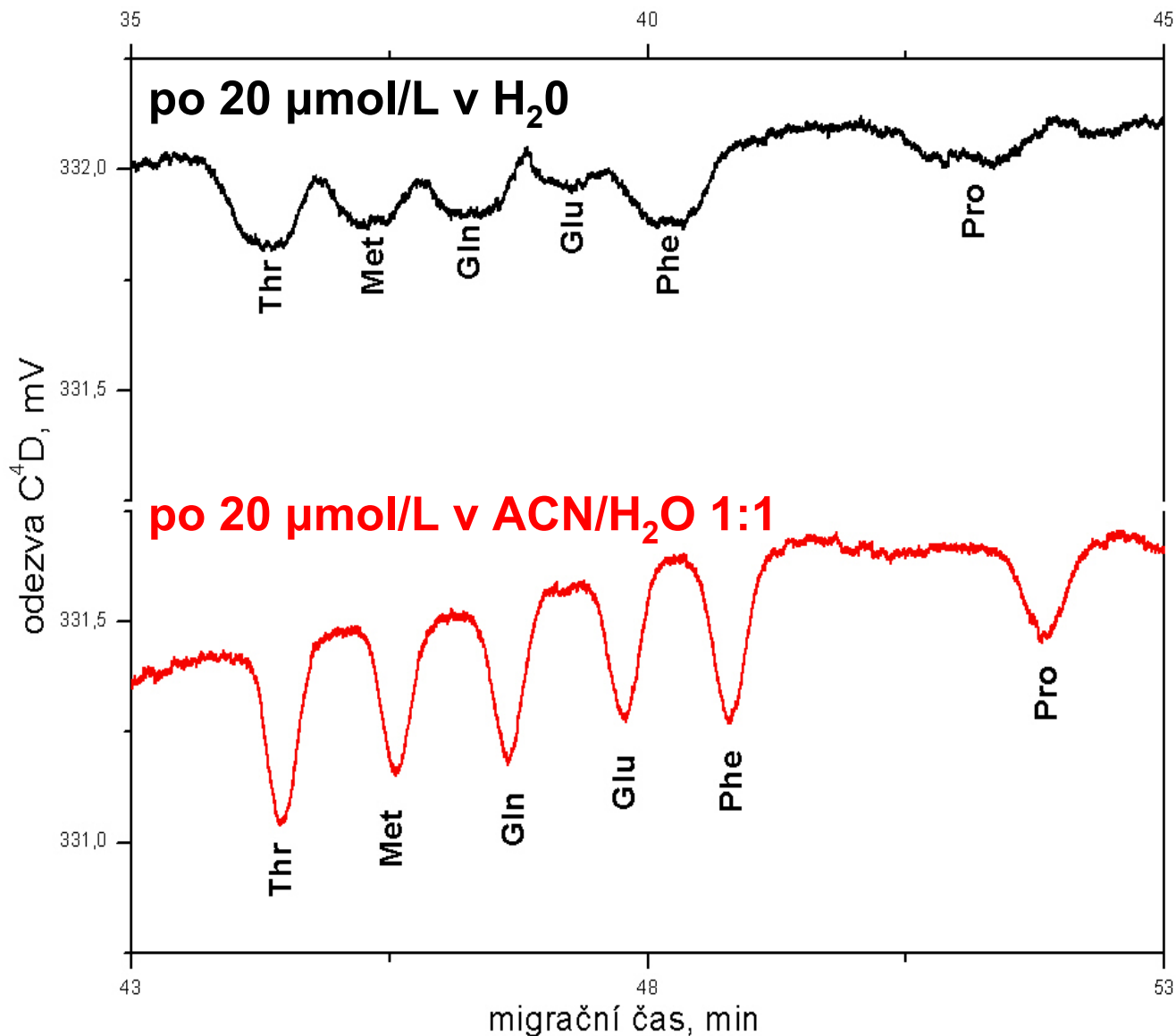
- **Kohlrauschova regulační funkce**

$$\omega = \sum_i \frac{c_i}{|u_i|}$$

- $\omega$  je nezávislá v čase
- elektroforetický proces se řídí počátečními podmínkami
- příklad: 3,0 mM KCl odpovídá 2,4 mM NaCl
- pro CE biologických vzorků vhodné pufrы o vysoké hodnotě  $\omega$

technika	účinnost zaostření	reprodukovatelnost
<b>FASS</b>	cca 1000	2 – 20 %
<b>LVSS</b>	cca 100	2 – 10 %
<b>t-ITP</b>	cca 100	1 – 2 %

# Stacking III – přídavek org. rozpouštědla

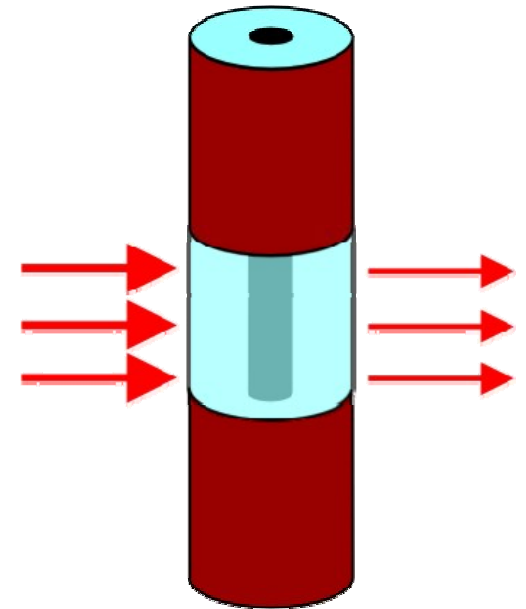


	N x 1000	h, mV
Thr	102 ± 1	0,39 ± 0,01
	19 ± 1	0,18 ± 0,00
Met	101 ± 6	0,34 ± 0,01
	26 ± 2	0,12 ± 0,01
Gln	101 ± 1	0,36 ± 0,00
	26 ± 2	0,12 ± 0,01
Glu	110 ± 3	0,34 ± 0,00
	21 ± 1	0,10 ± 0,00
Pro	84 ± 15	0,24 ± 0,00
	15 ± 0	0,10 ± 0,00

# Detekce aminokyselin I

## Spektrofotometrická v UV/VIS

- nejběžnější
- krátká optická dráha
- LOD  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  mol/L
- nedostatek vhodných chromoforů – Tyr, Trp, Phe, His
- derivatizace ninhydrinem
- nepřímá UV
  - málo koncentrované BGE
  - malé lineární dynamické rozsahy



# Selektivní detekce aminokyselin

## Fluorescenční

- vysoce citlivá LOD cca  $10^{-9}$  mol/L
  - pro biologické vzorky 10-100 nižší citlivost
- nedostatek přirozených fluoforů - Trp
- derivatizace – CBQCA, Dns, OPA, FITC, ...

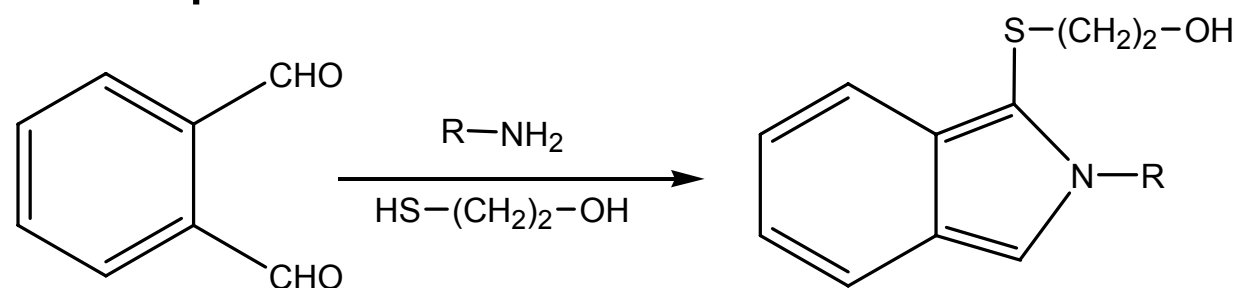
## Elektrochemická – ampérometrická

- citlivost  $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  mol/L
- AMK nejsou vhodnými analyty
- elektrody Au, Pt, C – Tyr, Trp, Cys, Met
  - elektroda Cu – tvorba komplexů, rozpouští se
- interference ED se separačním polem

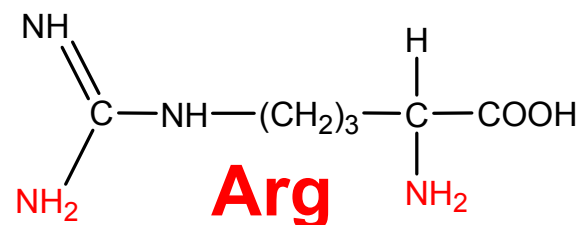
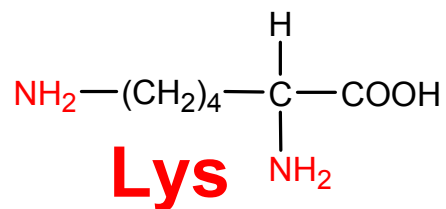
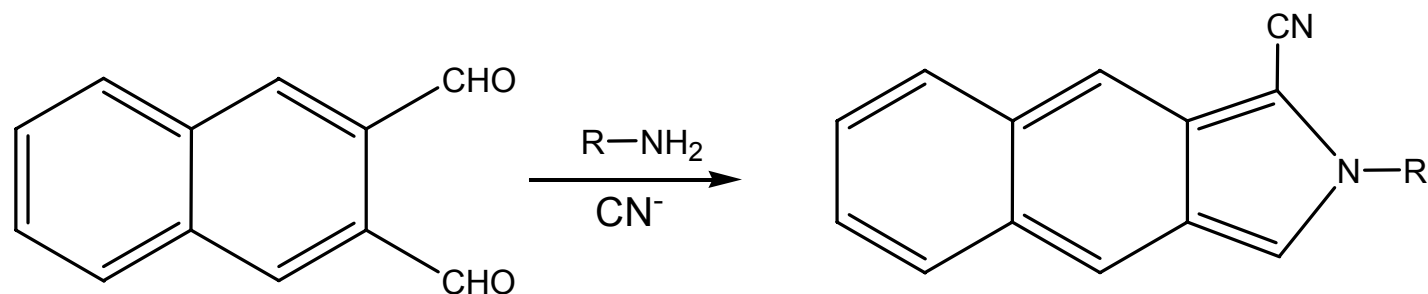
# Derivatizace

- náročná na úpravu vzorku
- z jedné AMK více produktů
- nestabilita produktů

**OPA**



**NDA**

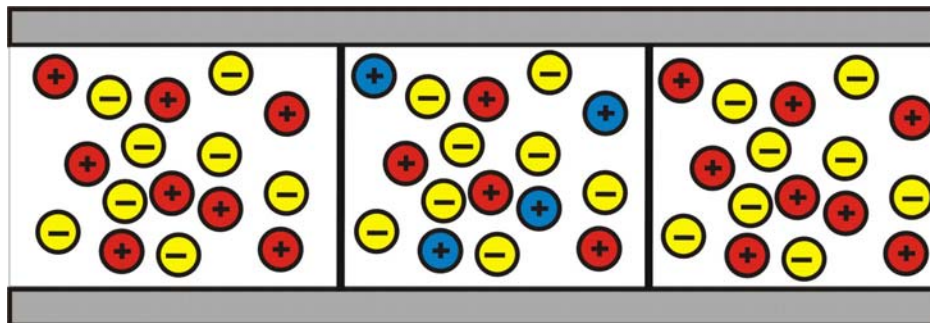


# Vodivostní detekce v CE

- univerzální detekční technika
- zóny v CE se liší distribucí iontů → vodivostí
- $\Delta G$  závislé na analytu i BGE

$$\Delta G = G_S - G_{BGE} = c_{anal} \frac{(u_{anal} - u_{co})(u_{anal} + u_{proti})}{u_{anal}} \cdot \frac{F}{10^{-3} K}$$

**zóna BGE    zóna vzorku    zóna BGE**

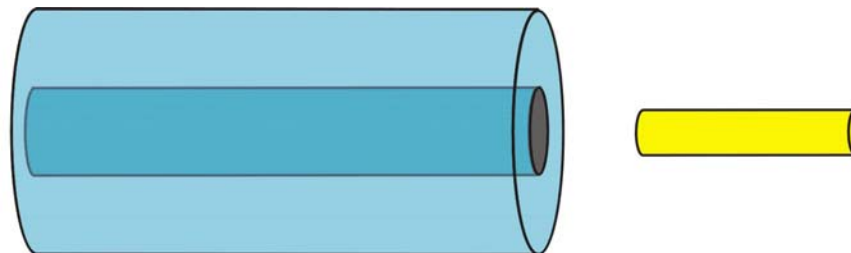


# Kontaktní elektrochemická detekce

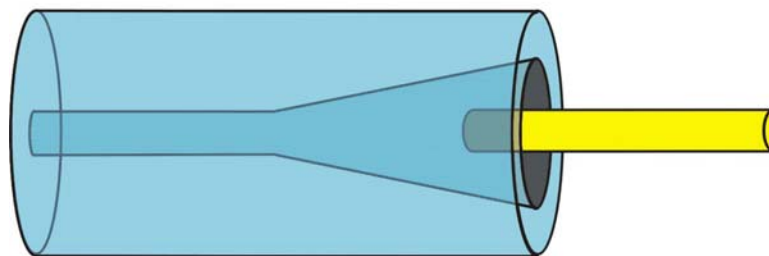
- elektrody v galvanickém spojení s měřeným roztokem
- obecný elektrochemický problém
  - změna povrchu elektrody v čase
  - nutnost obměny povrchu
- interference detektoru se separačním polem CE
  - potřeba izolace
  - různá řešení elektrochemických cel

# Kontaktní detekční cely

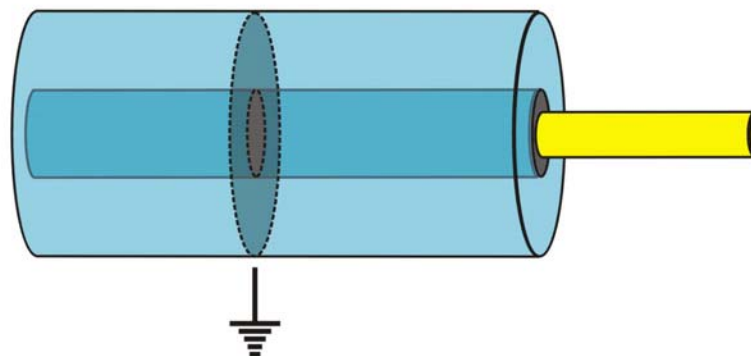
elektroda mimo  
ústí kapiláry



kapiláry o velmi  
malém I.D.  $< 10 \mu\text{m}$

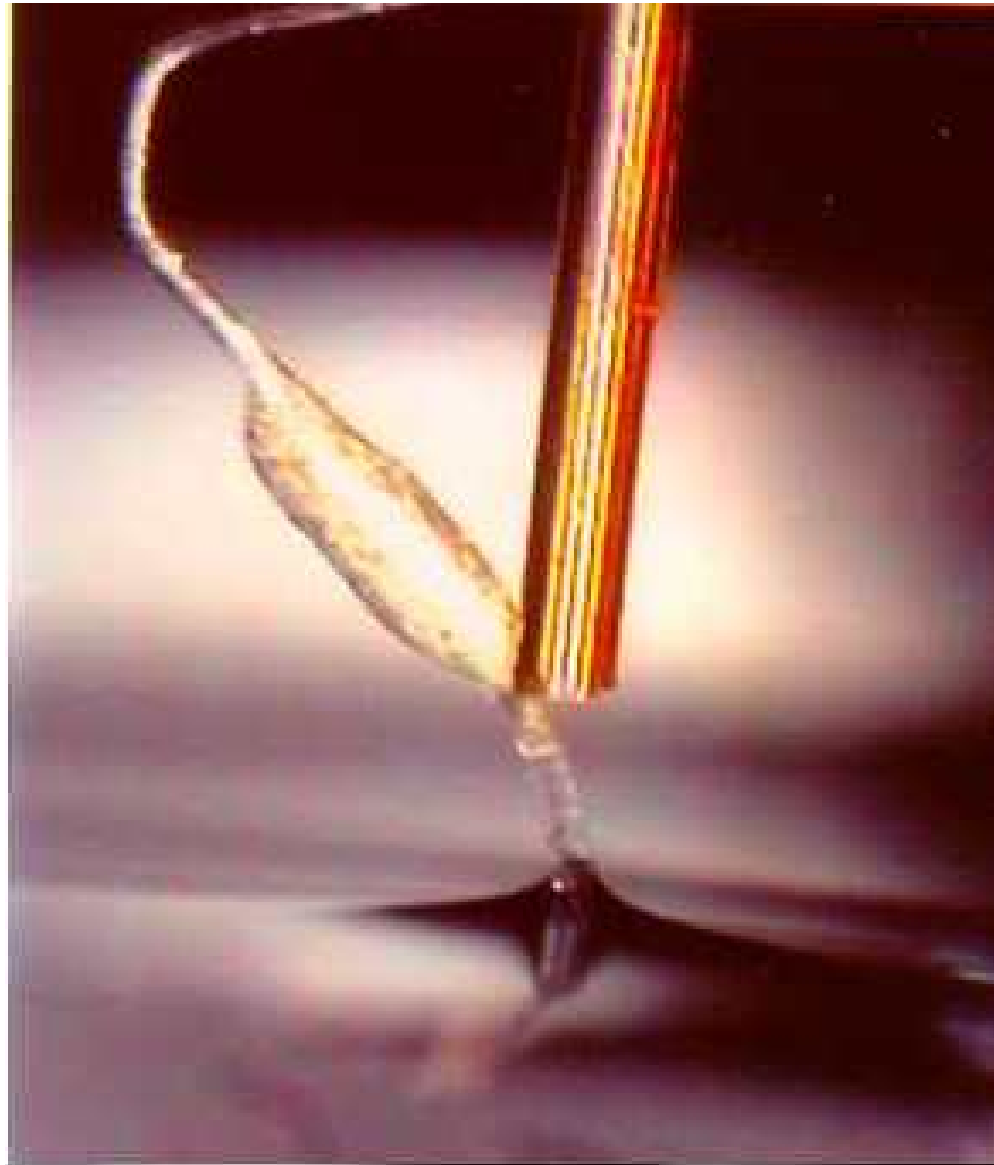


izolace separačního pole  
vytvořením zlomu před  
koncem kapiláry





# Izolace separačního pole – vláknový detektor



# Bezkontaktní vodivostní detekce

- měřicí elektrody nejsou v galvanickém kontaktu s měřeným roztokem
- nutnost měřit vodivost při vysokých frekvencích: 10 kHz – 10 MHz
- neměříme vodivost  $G$  ( $G=1/R$ ), ale impedanci  $Z$

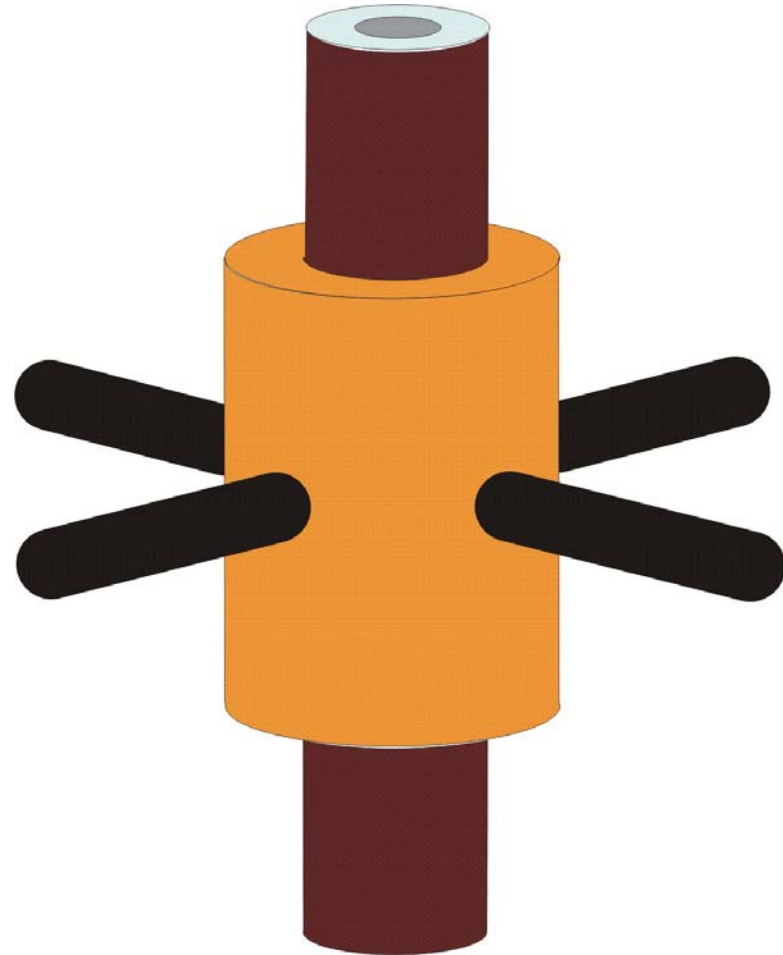
$$Z = R - j(2\pi f \cdot C)^{-1} + j2\pi f \cdot L$$

- roztok v detekční cele se projevuje:
  - vodivostí
  - permitivitou
  - složením rozhraní roztok/stěna kapiláry

	$\epsilon_r$
voda	79,0
vzduch	1,000
křemen	3,8
PMMA	2,8

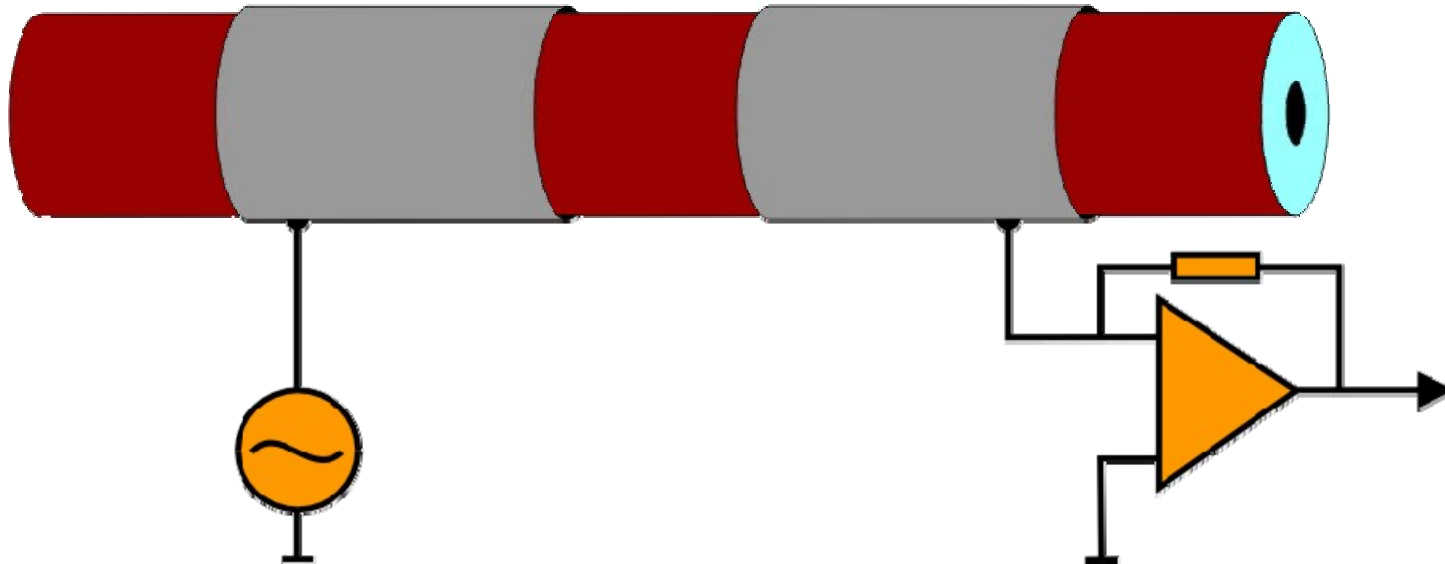
# Původní konstrukce pro ITP

- čtyřelektrodová konstrukce
- 1 – 10 MHz
- schopnost detekce na krátkém úseku kapiláry
- příčná detekční cela
- malá citlivost v CE



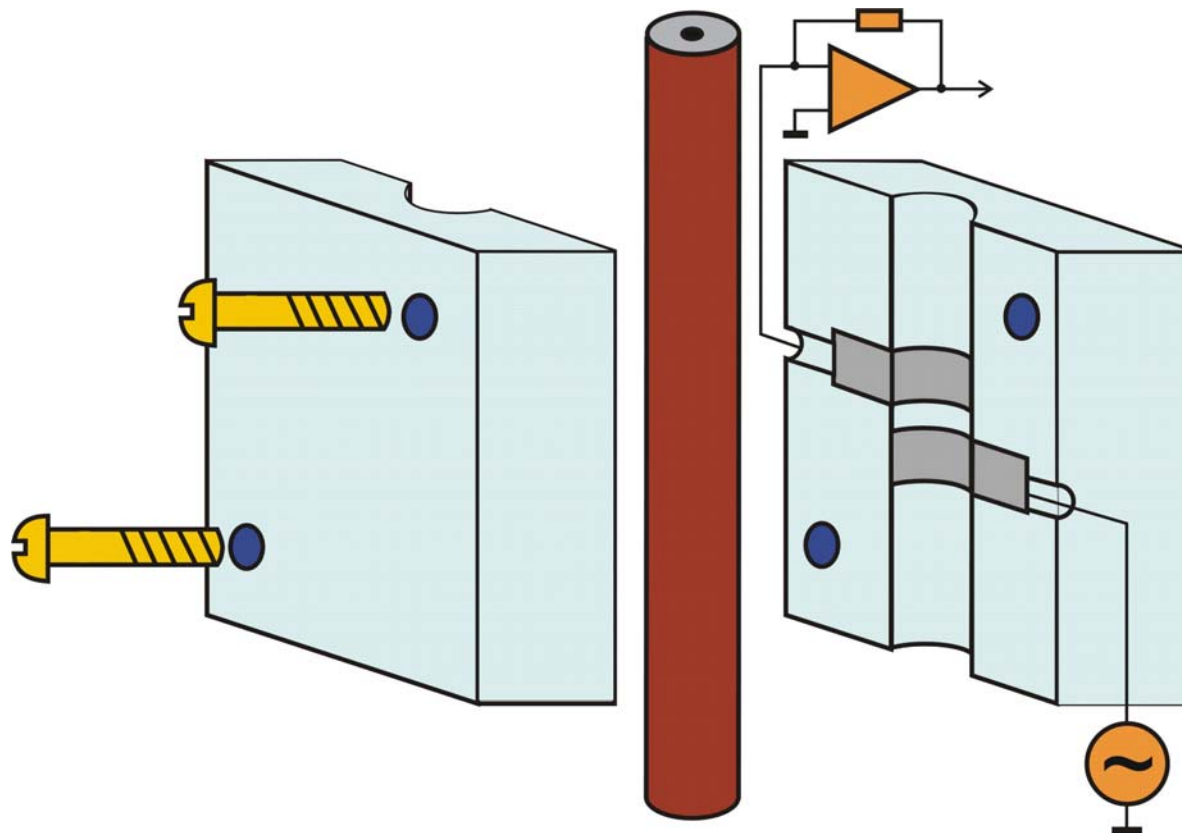
# Bezkontaktní vodivostní detektor s tubulárními elektrodami

- **capacitively coupled contactless conductivity detector – C<sup>4</sup>D**
- používané frekvence 10 kHz – 1,5 MHz
- podélná detekční cela
- LOD pro nízkomolekulární látky cca  $10^{-6}$  mol/L



# Alternativní konstrukce C<sup>4</sup>D

- poloválcové elektrody – hliníkové proužky
- elektrody těsně přiléhají k povrchu kapiláry
- snadná výměna separační kapiláry



# Optimalizace BGE pro C<sup>4</sup>D I.

$$\Delta G = c_{anal} \frac{(u_{anal} - u_{co})(u_{anal} + u_{proti})}{u_{anal}} \cdot \frac{F}{10^{-3} K}$$

• **pozitivní pík**  $u_{anal} > u_{co-ion}$

• **negativní pík**  $u_{anal} < u_{co-ion}$

• **příklad**

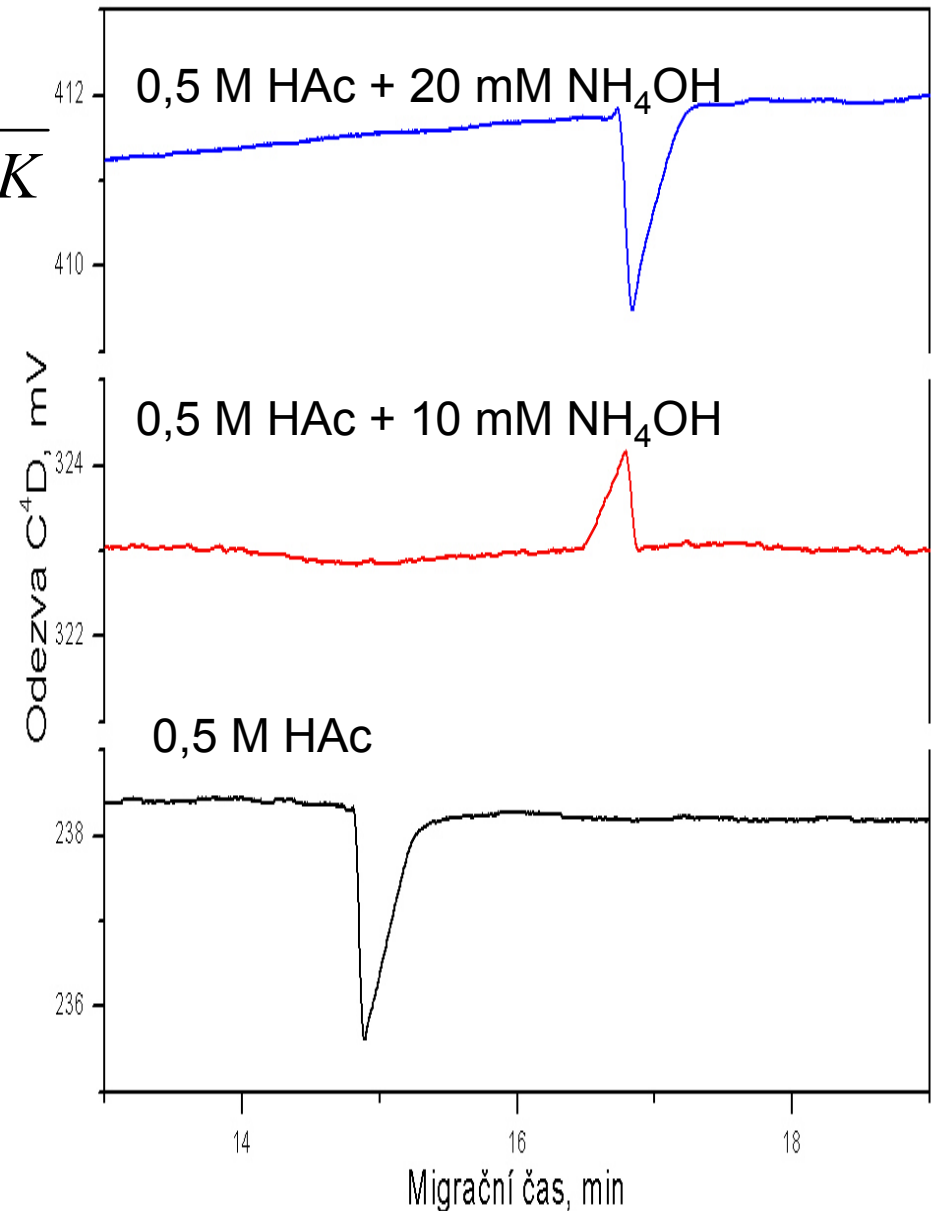
$$u(MH^{2+}) = 45 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$u(H_3O^+) = 362.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$u(NH_4^+) = 76 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$$

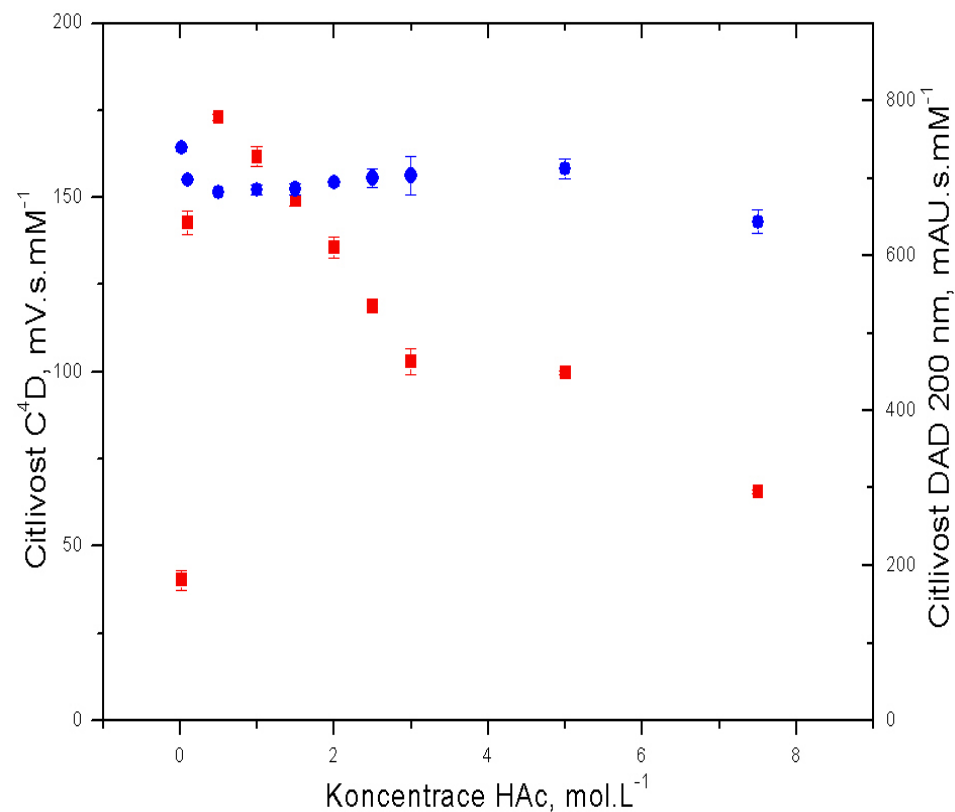
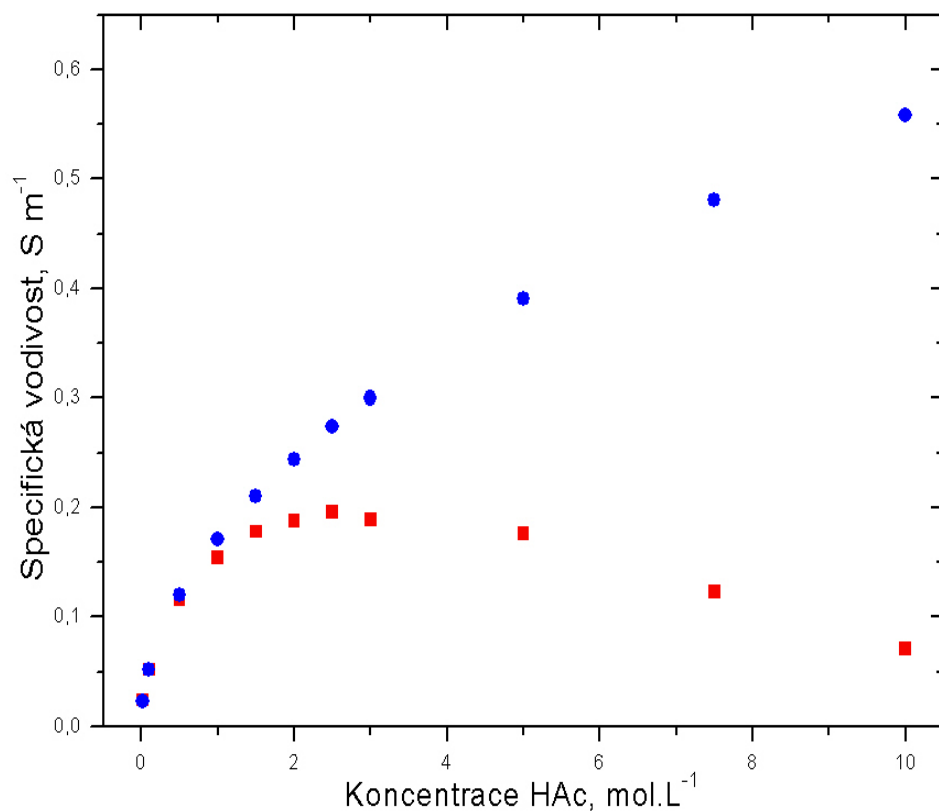
• **molární vodivostní odezva**

$$b_x = \lim_{c_x \rightarrow 0} \frac{d\kappa}{dc_x}$$



# Optimalizace BGE II.

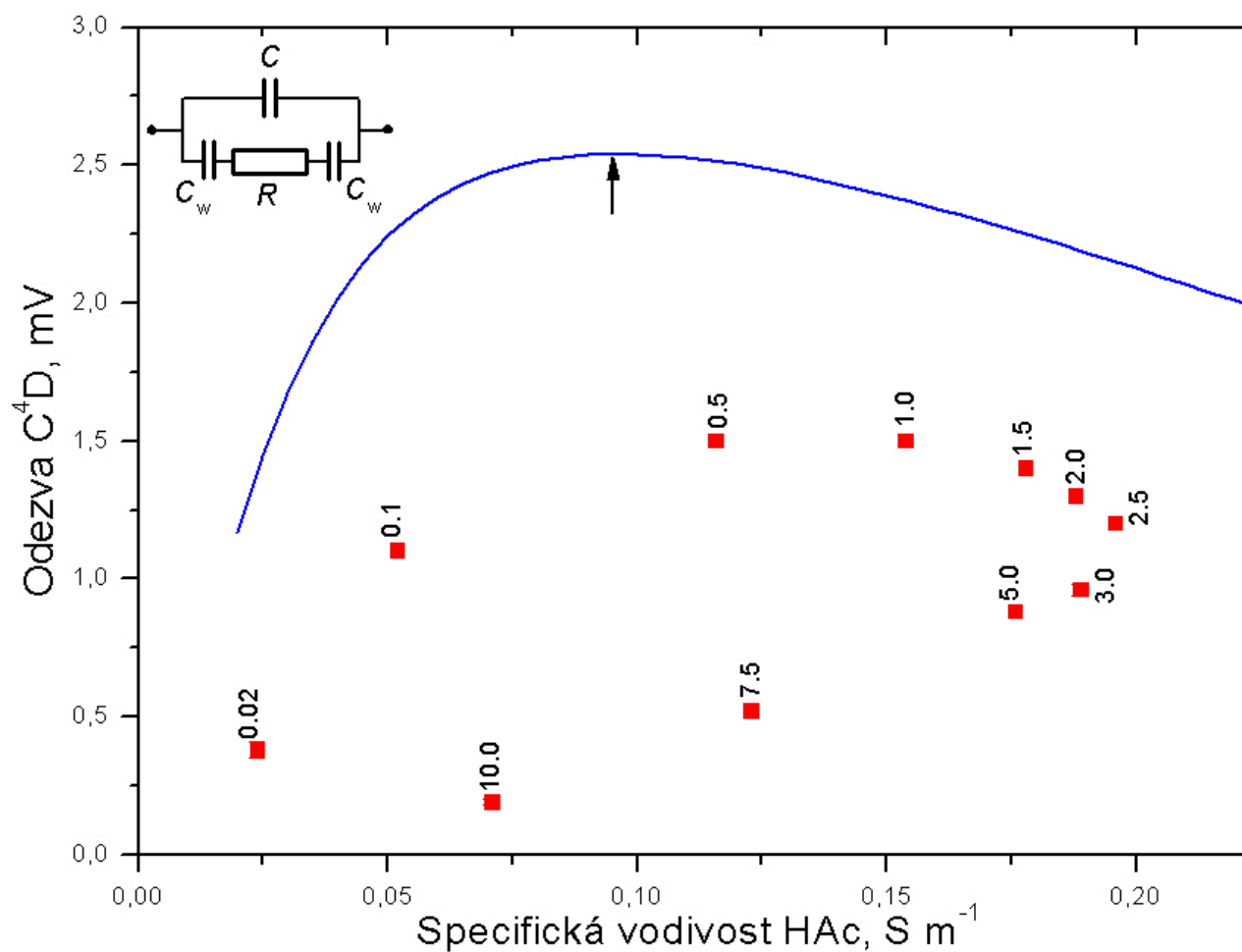
- roztoky kyseliny octové vhodné pro CE/C<sup>4</sup>D stanovení AMK
- AMK separovány jako kationty – co-iontem H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>
- široký rozsah použitelných koncentrací HAc



# Optimalizace BGE III.

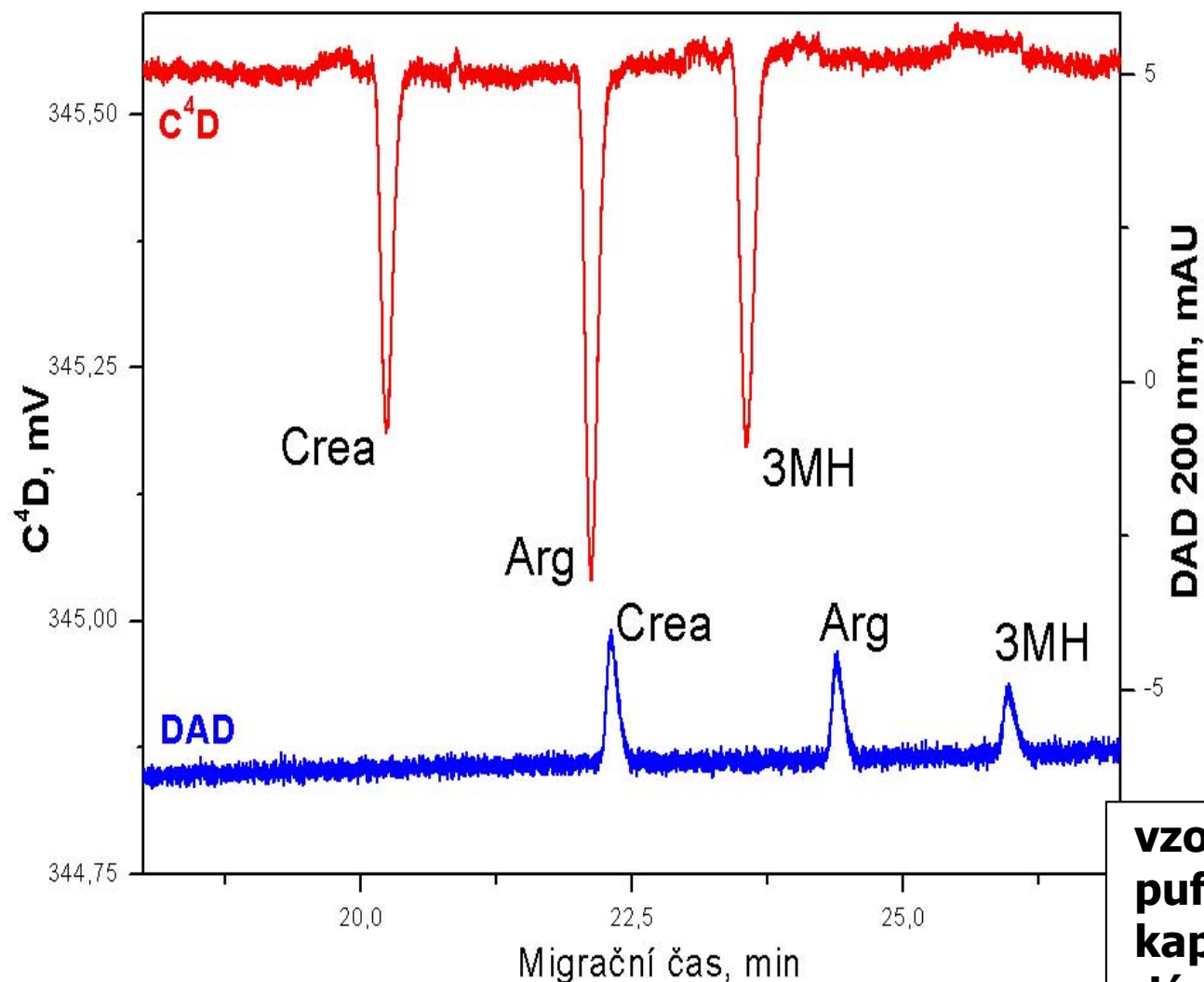
Odezva  $C^4D$  závisí na:

- vodivosti
- permitivitě
- složení rozhraní roztok/kapilára





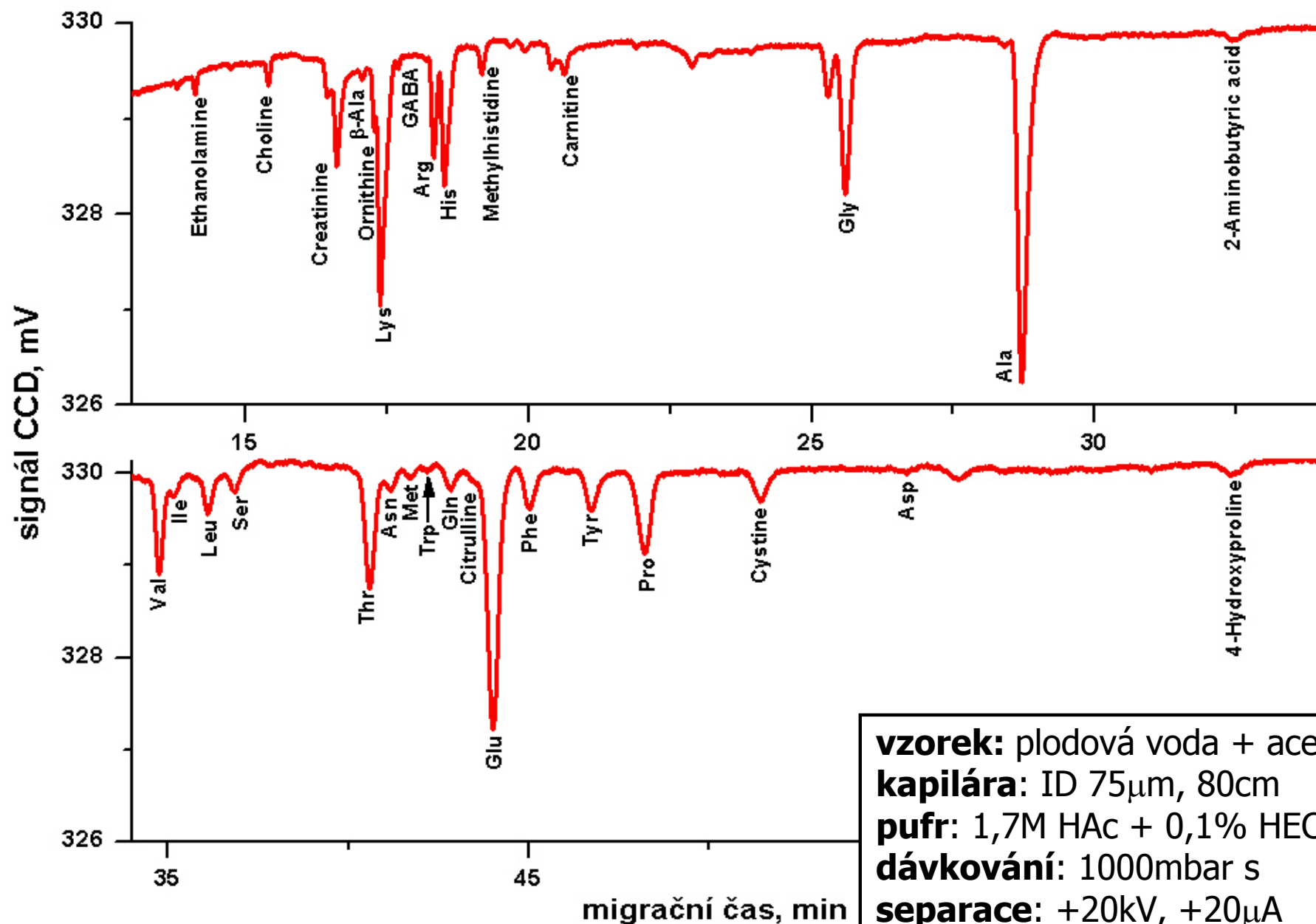
# Porovnání C<sup>4</sup>D / UV



	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	C <sup>4</sup> D	UV
Crea	3,6	15,0
Arg	2,6	19,2
3MH	3,1	28,3

**vzorek:** modelová směs 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   
**pufr:** 2,5 M HAc + 0,1% HEC, pH 2,1  
**kapilára:** ID 75  $\mu\text{m}$ , 80 cm  
**dávkování:** 500 mbar.s  
**separace:** +20kV, +20 $\mu\text{A}$

# CE/CCD elektroferogram plodové vody



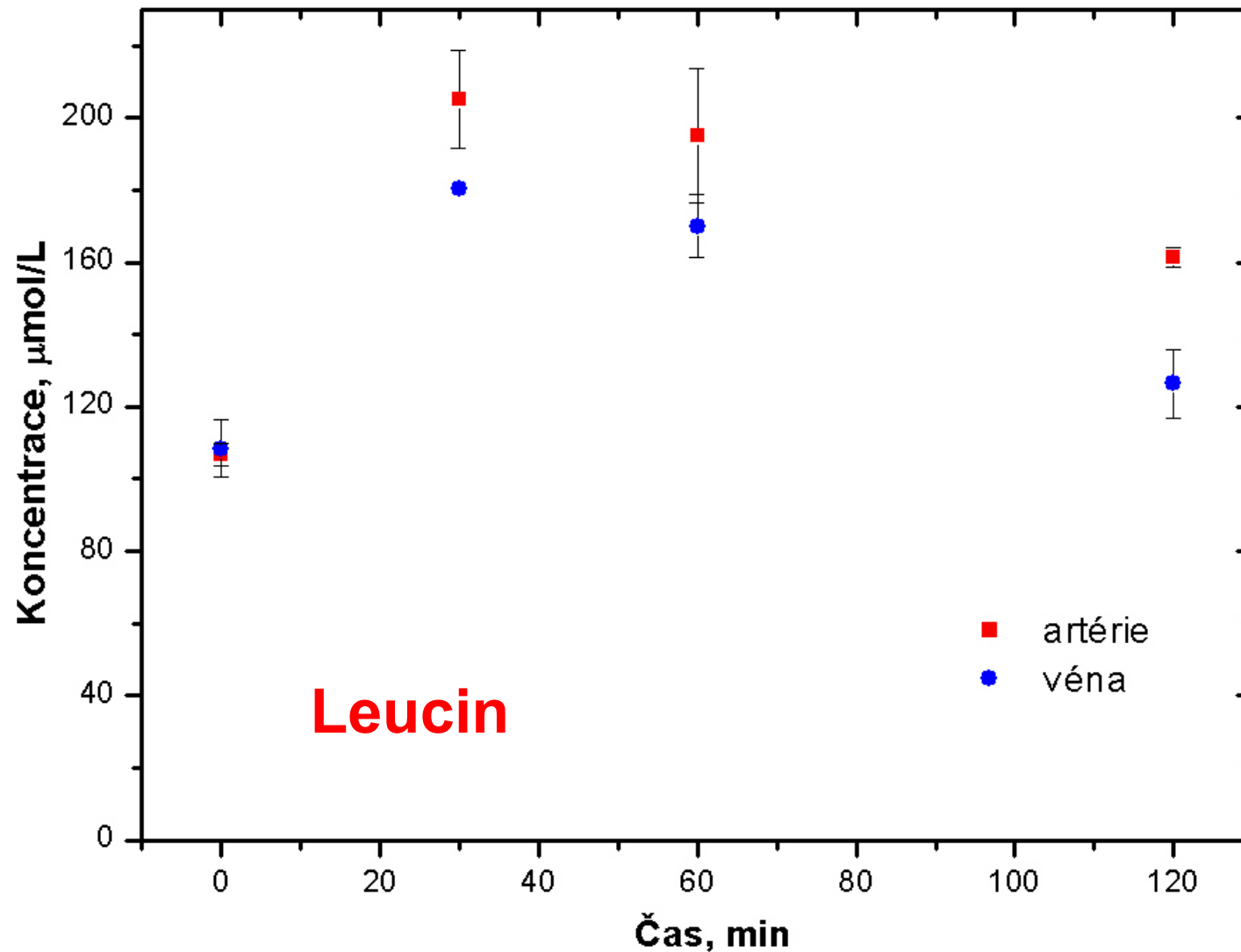
**vzorek:** plodová voda + acetonitril 1:1  
**kapilára:** ID 75 $\mu$ m, 80cm  
**pufr:** 1,7M HAc + 0,1% HEC, pH 2,15  
**dávkování:** 1000mbar s  
**separace:** +20kV, +20 $\mu$ A

# Arteriální hladiny aminokyselin

	naměřené hodnoty, $\mu\text{M}$	fyziologické hladiny, $\mu\text{M}$
<b>Ala</b>	$226,2 \pm 67,4$	200 - 500
<b>Arg</b>	$47,8 \pm 4,2$	30 - 140
<b>Asn</b>	$30,4 \pm 10,6$	40 - 80
<b>Cit</b>	$16,0 \pm 6,8$	10 - 60
<b>Crea</b>	$58,2 \pm 2,0$	
<b>Gln</b>	$512,5 \pm 16,2$	450 – 760
<b>Glu</b>	$86,0 \pm 6,8$	30 – 90
<b>Gly</b>	$172,8 \pm 26,0$	120 - 400
<b>His</b>	$78,2 \pm 4,8$	30 - 120
<b>Ile</b>	$58,0 \pm 4,4$	35 - 100

	naměřené hodnoty, $\mu\text{M}$	fyziologické hladiny, $\mu\text{M}$
<b>Leu</b>	$106,8 \pm 3,0$	70 - 190
<b>Lys</b>	$101,6 \pm 6,4$	80 - 260
<b>Met</b>	$17,0 \pm 4,0$	6 - 40
<b>Orn</b>	$51,4 \pm 0,0$	30 - 115
<b>Phe</b>	$54,0 \pm 3,2$	40 - 115
<b>Pro</b>	$153,0 \pm 15,4$	90 - 350
<b>Ser</b>	$75,0 \pm 6,6$	70 - 190
<b>Thr</b>	$90,0 \pm 8,2$	75 - 195
<b>Trp</b>	$53,0 \pm 3,8$	
<b>Tyr</b>	$59,6 \pm 10,8$	20 - 110
<b>Val</b>	$169,6 \pm 6,4$	115 - 320

# Měření arteriálně venózních diferencí



# TAS – Total Analytical System

- **system plně automatizované analýzy**
  - dávkování
  - úprava vzorku
  - chemické reakce (derivatizace)
  - separace
  - detekce
  - analýza dat
- **miniaturizace toku analytu**
  - snížená spotřeba činidel
  - vyšší separační účinnost
  - redukce doby analýzy

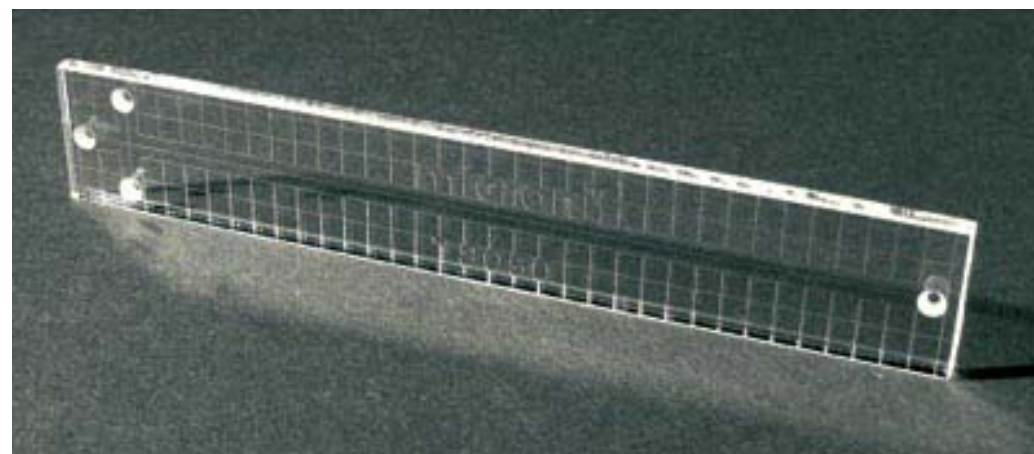
# Nový směr analytické chemie – analýza na čipu

**Elektroforetický přístroj  
Agilent technologies**



100 cm

**Mikrofluidní  
polymerní čip**



8 cm

# Nanotechnologie

- Richard Feynman, Pasadena, 1959: *„Dole je hodně místa“*
- Mooreův zákon, 1965: *„Složitost integrovaných obvodů se každý rok zdvojnásobí při zachování stejné ceny.“*  
Gordon Moore – zakladatel společnosti  
INTEL

# Fotolitografický proces

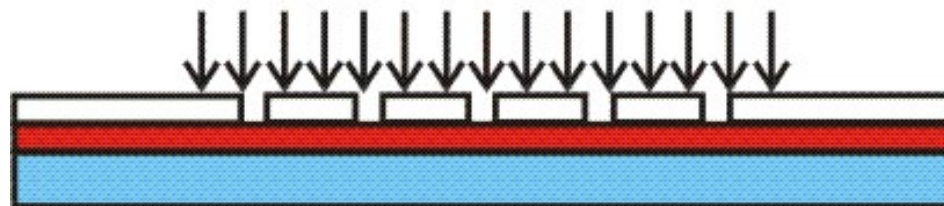
Si substrát



nanesení fotorezistu



expozice přes masku



odstranění naexponovaného  
fotorezistu



leptání substrátu



odstranění fotorezistu

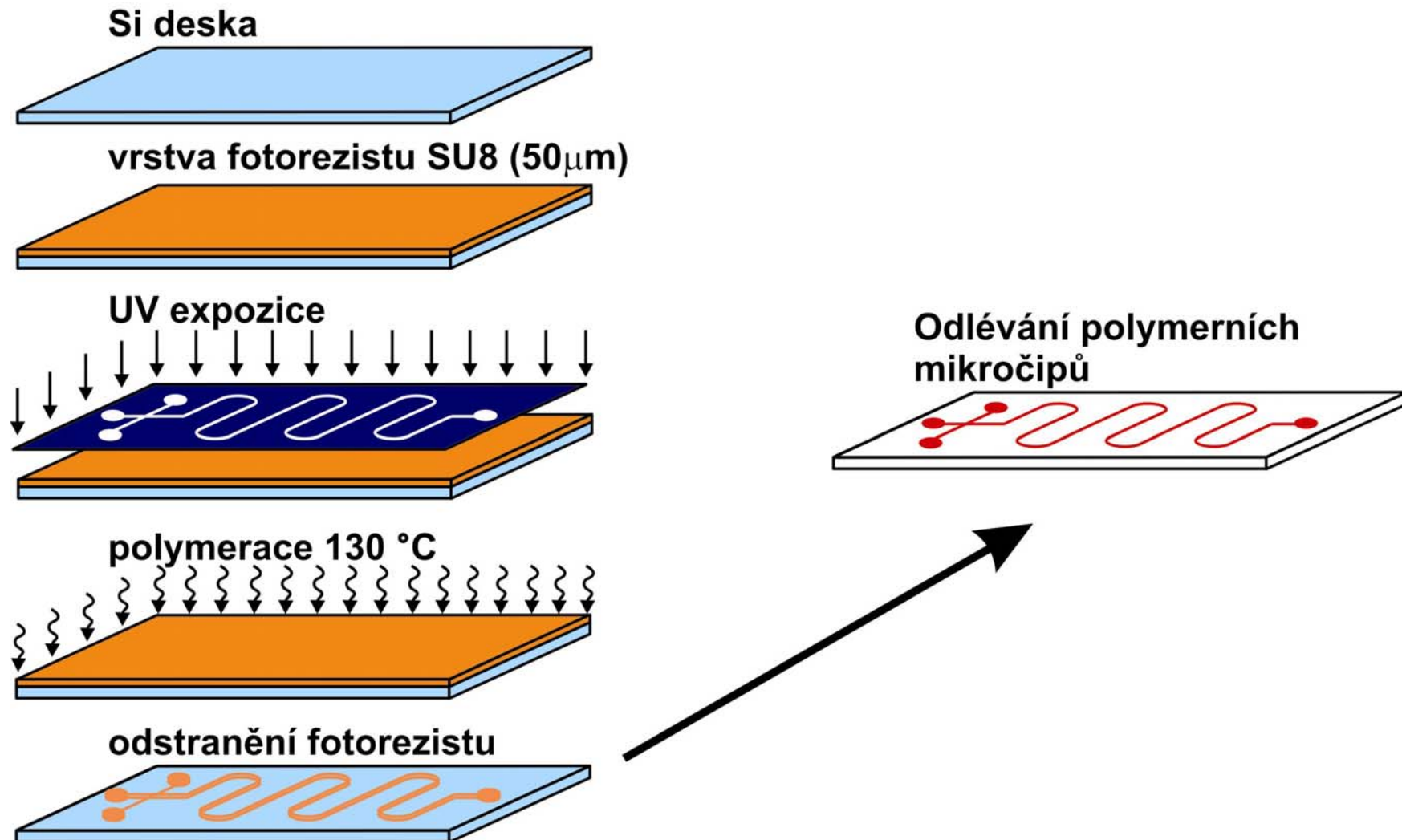


uzavření čipu

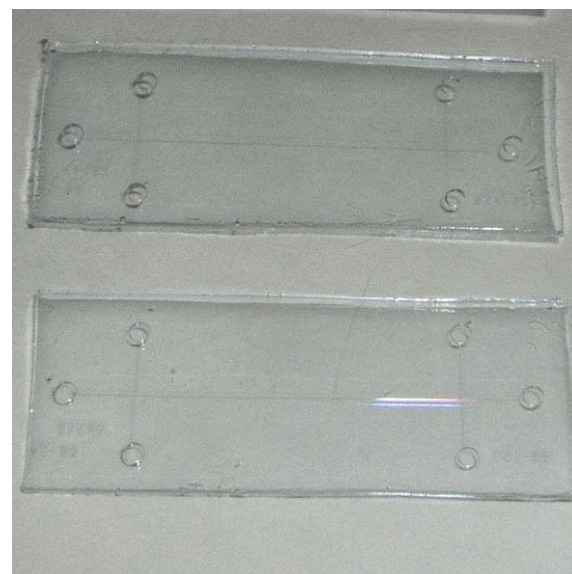
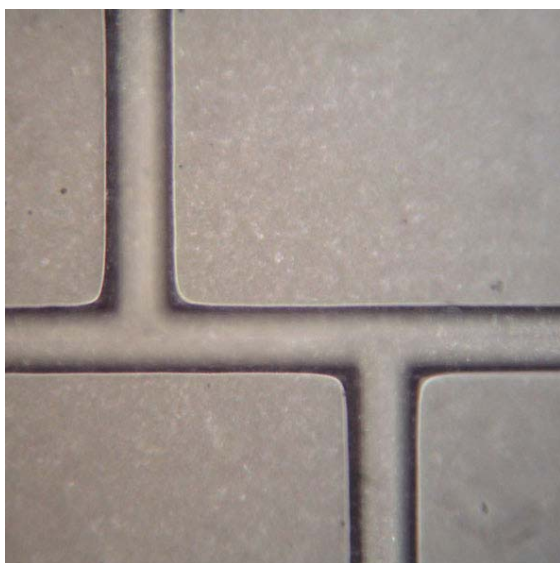
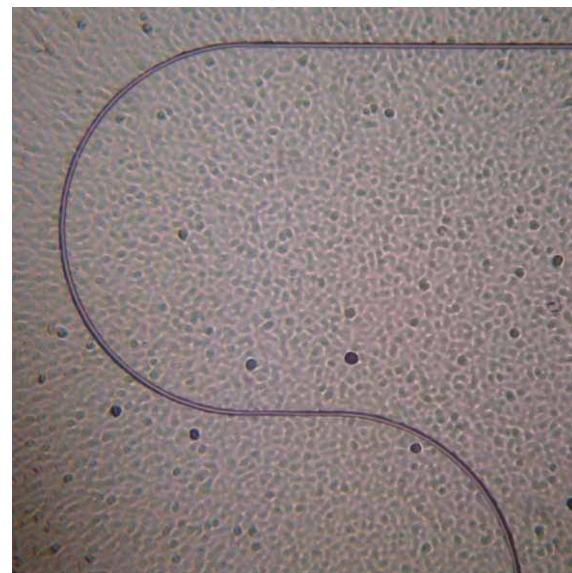
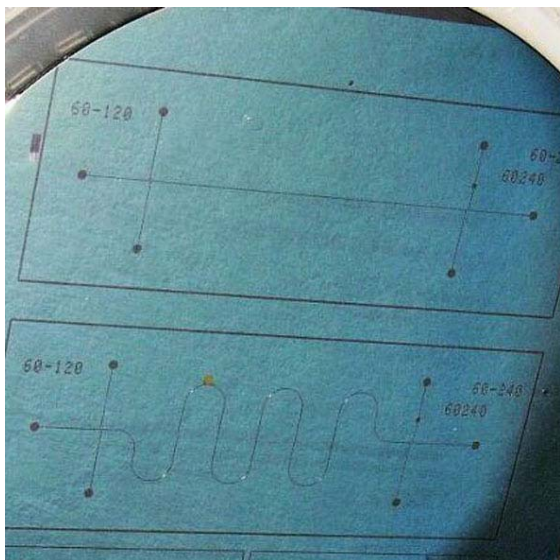




# Výroba polymerního čipu pomocí litografie

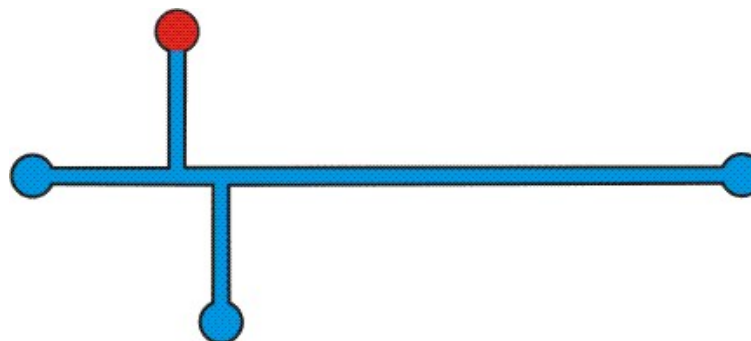


# Ukázky přípravy čipů

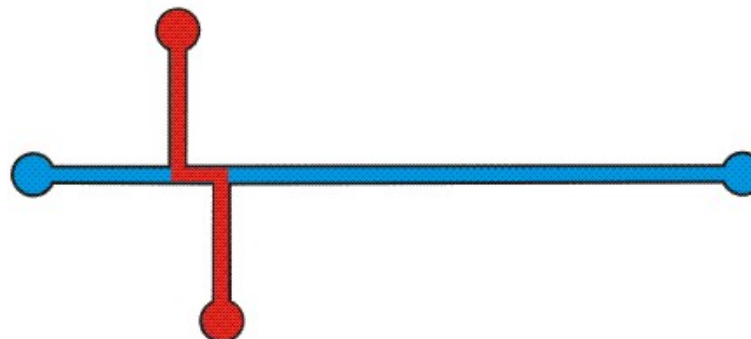


# Dávkování a separace na čipu

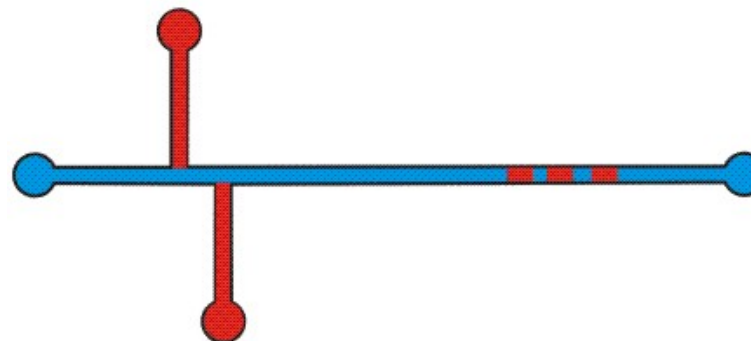
**výchozí stav**



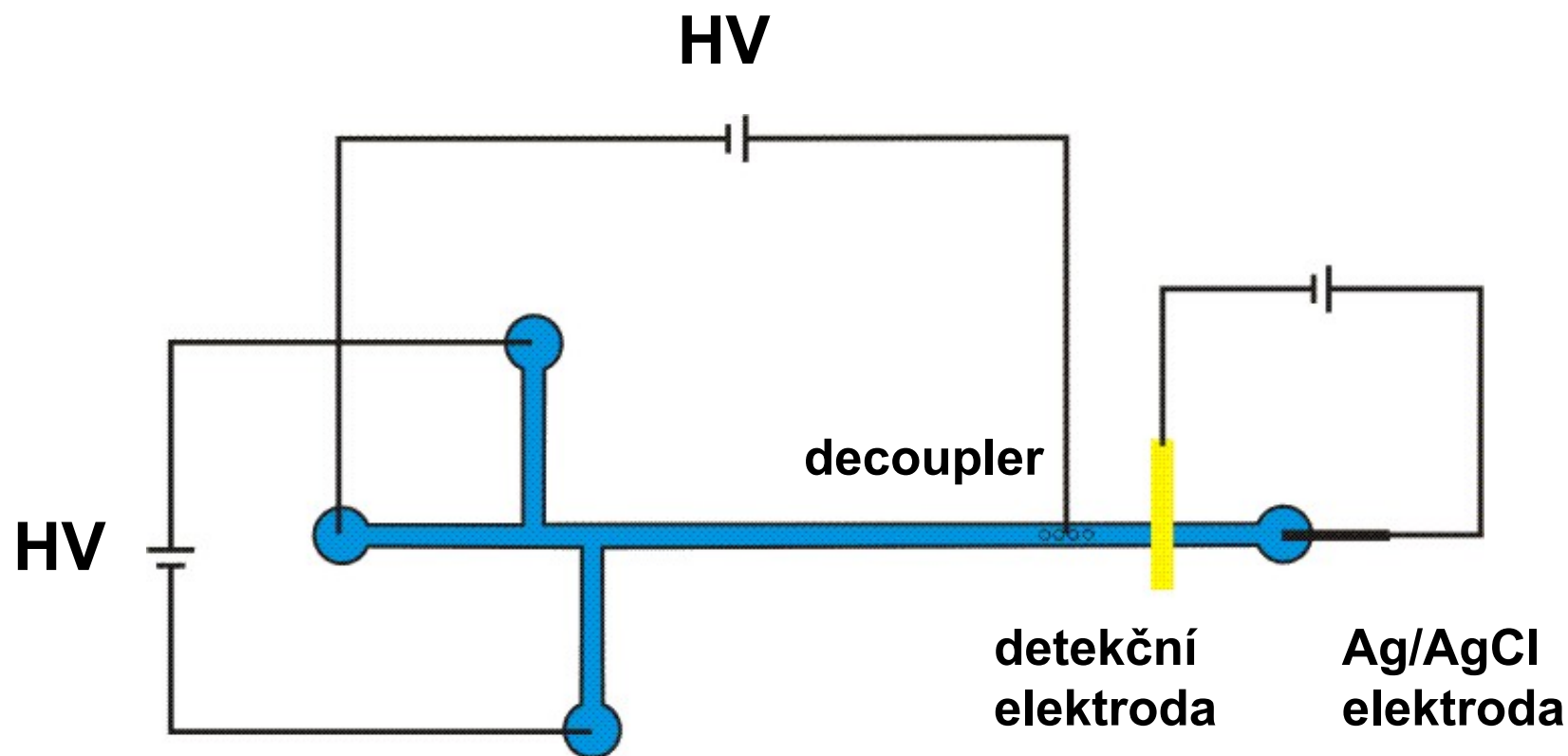
**dávkování**



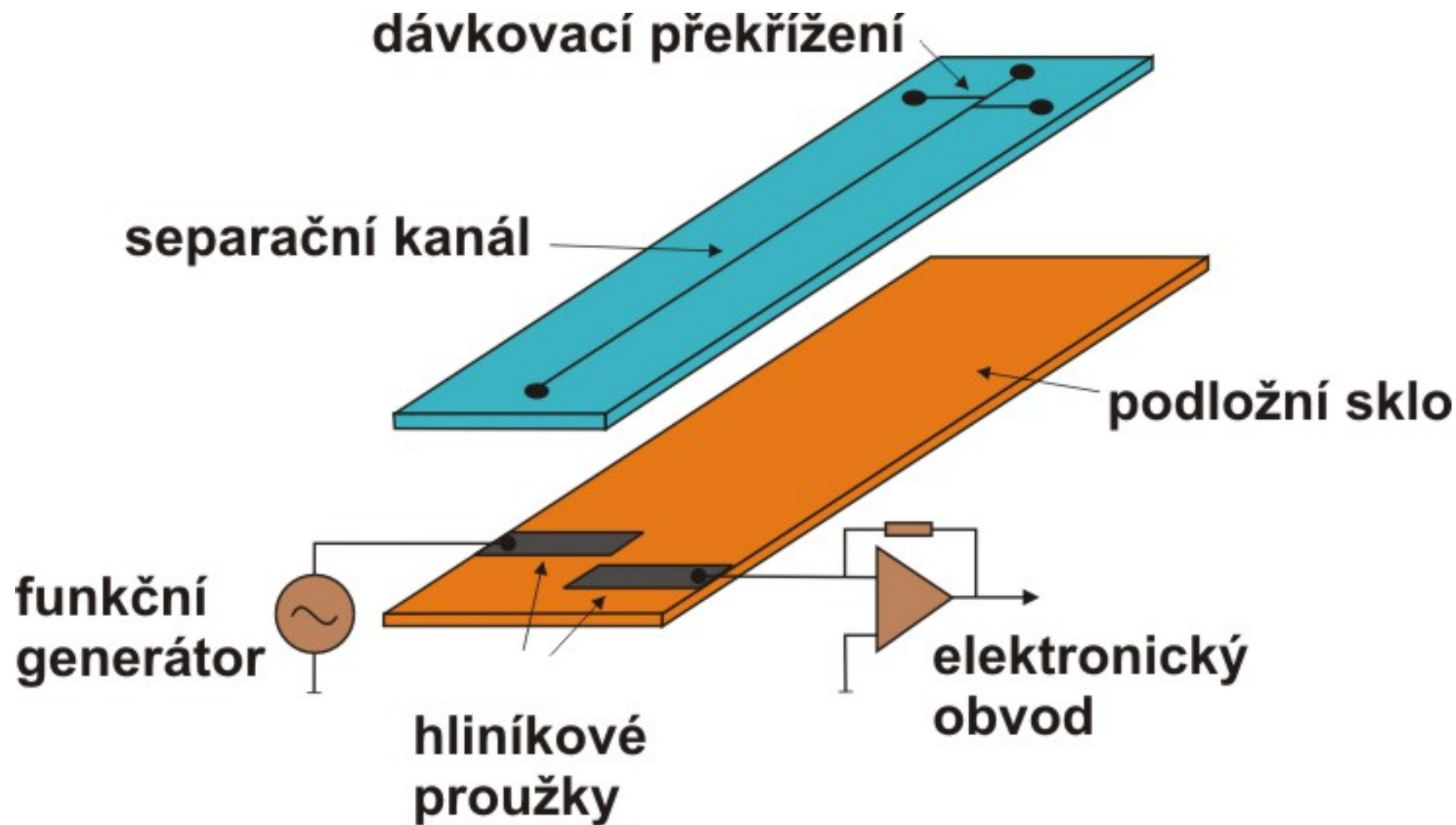
**separace**



# Spojení mikročipu s ampérometrickým detektorem

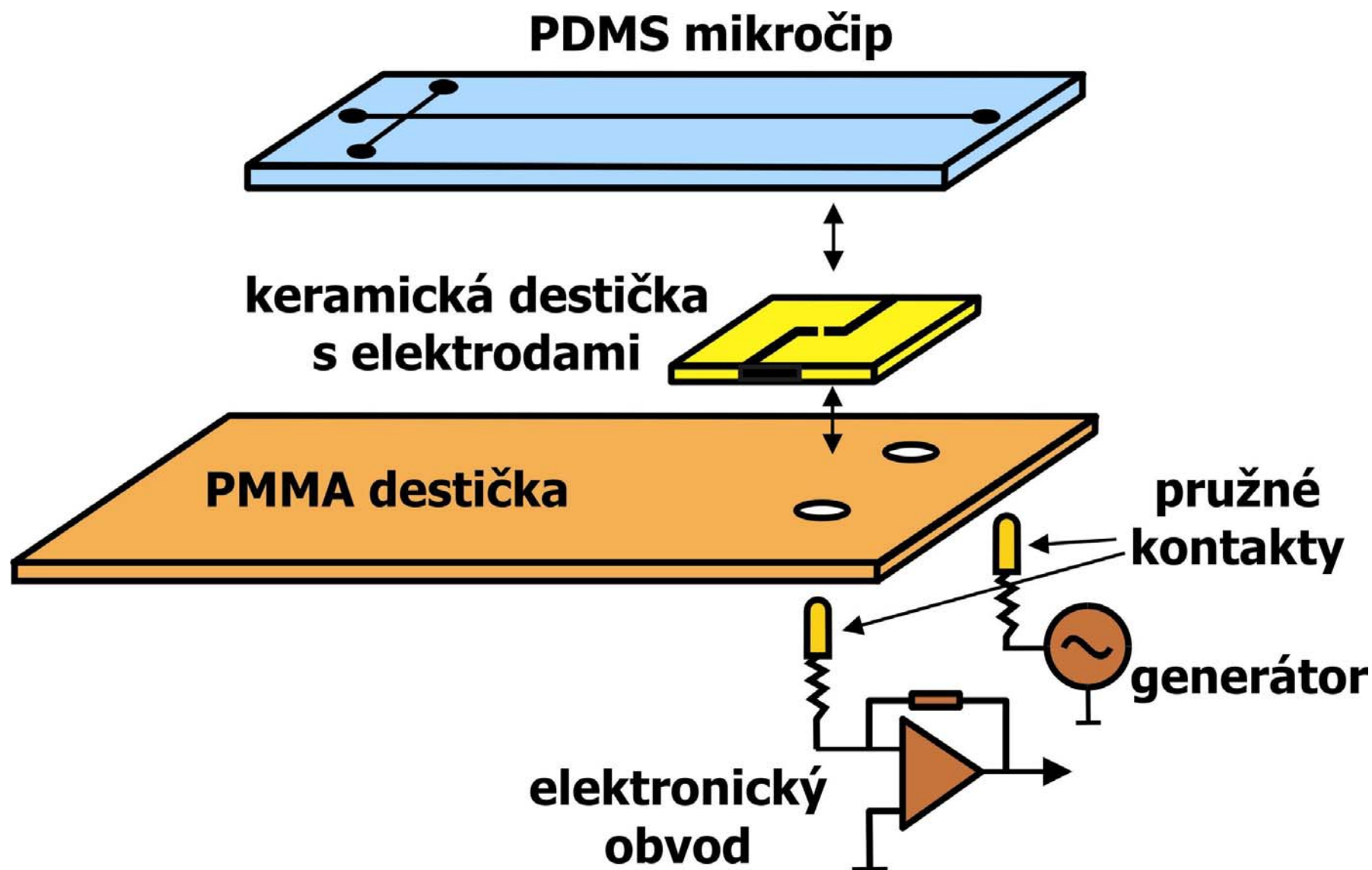


# C<sup>4</sup>D se širokými elektrodami

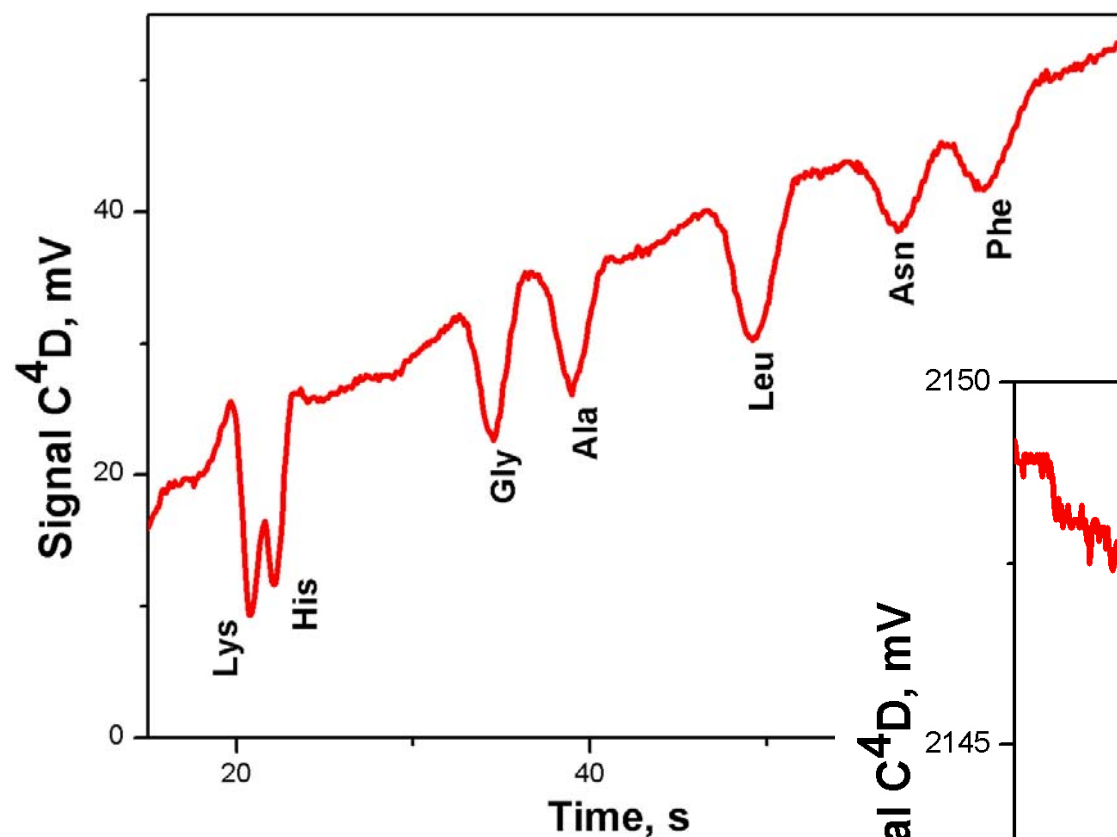




# C<sup>4</sup>D s úzkými elektrodami



# Separace směsi aminokyselin



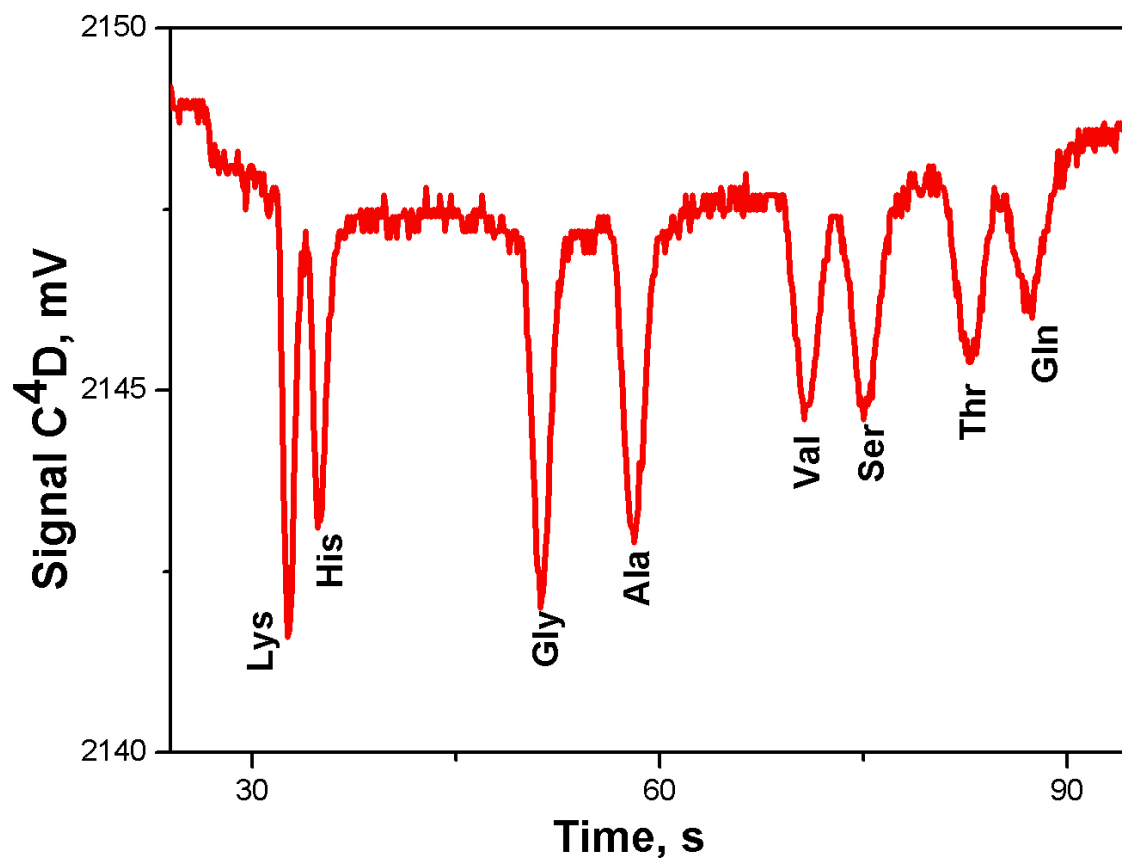
**PDMS čip:** efektivní délka 38mm

**pufr:** 1,7M kyselina octová +  
0,1%HEC, pH 2,2

**vzorek:** směs aminokyselin po 50mg/L

**dávkování:** 1,0kV 30s

**separace:** 2,5kV 18μA



# Separační účinnost

## Počet teoretických pater

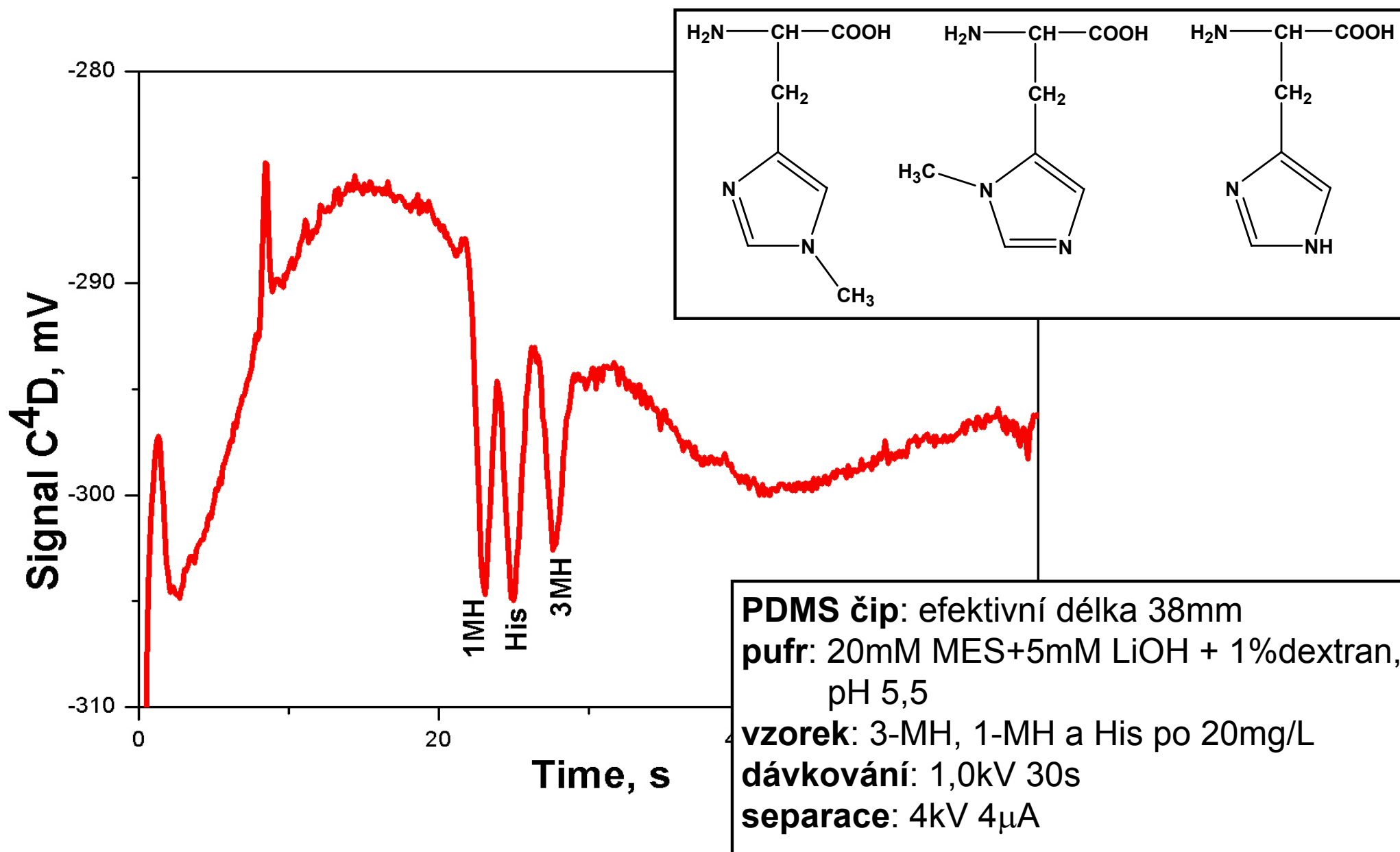
Analyt	široké elektrody	úzké elektrody
Lys	1280	7600
His	1660	6700
Gly	2280	7560
Ala	2740	6630

## Rozlišení

Lys/His	0,50	1,20
---------	------	------



# Separace methylhistidinů



# Srovnání konvenční CE a mikročipové elektroforézy

	Konvenční CE	Mikročipová
Dávkování	hydrodynamické, elektrokinetické	elektrokinetické
Detekce	UV, FD, ED, C <sup>4</sup> D, MS	LIF, MS, ED
Materiál	křemen	sklo, polymery
Rychlost	minuty	sekundy
Separační kapacita	hodně píků – dlouhé kapiláry	málo píků – krátké kanálky
Integrace a automatizace	obtížná	snadná
Množství vzorku	nL - $\mu$ L	nL – $\mu$ L
Potenciál rozvoje	dosáhl maxima	nové technologie výroby + nové aplikace

# Poděkování

**Děkuji vám všem za pozornost  
a GAČR za finanční podporu  
výzkumu.**

