

Aplikační list přístroje Lumex CAPEL 205

Stanovení oxalátů a citrátů v moči technikou vysokoúčinné kapilární elektroforézy (HPCE) s nepřímou UV detekcí

Úvodem

Vedle mnoha jiných oborů je kapilární elektroforéza (CE) stále častěji využívána také v klinické analytické chemii. A to jak ve spojení s detekcí spektrometrickou - nejčastěji UV/VIS - tak v poslední době též s detekcí hmotnostní (MS). Porovnává-li se CE s kapalinovou chromatografií (LC), která je zde alternativním separačním postupem, v mnoha případech padne volba na CE. Důvody jsou zřejmé: CE je v laboratorním provozu oproti LC velmi nenáročná ohledně nákladů a poskytuje často i lepší a rychlejší separaci. Kapiláru lze u aplikací CE s neplněnou kapilárou snadno a rychle tlakově proplachovat, po průchodu stanovovaných analytů detektorem je možno zbylé komponenty vzorku rychle vymýt. Uživatel CE neriskuje ztrátu drahé LC kolony ani častou výměnu chránících předkolonek! Zpracování biologických vzorků může tak být jednodušší a rychlejší. A jak spotřeba tak i cena používaných chemikálií při provozu CE je oproti LC řádově nižší, především u spojení CE-UV/VIS.

Citace: Vávrová J., Friedecký B., Kovařík J., Palička V.: Stanovení koncentrace oxalátů a citrátů v moči metodou vysokoúčinné kapilární elektroforézy, Klin. Biochem. Metab, 7 (28), 1999, No.1. p. 18-22

"Vzhledem k tomu, že HPCE technika je automatizovatelná, velmi citlivá a vysoce účinná, je schopna spolehlivě odlišit a kvantifikovat majoritní a minoritní píky. To je jedna z důležitých předností pro stanovení oxalátů v moči, kde ostatní anionty (chloridy, sulfáty a fosfáty) jsou zastoupeny v koncentracích vyšších o jeden a více řádů."

S ohledem na nízké koncentrace oxalátů v moči, je jejich detekční limit kritickým místem všech metodik a zásadním požadavkem na použitou instrumentaci. Zde je nutno zdůraznit, jak výrazně negativní vliv může mít při UV detekci photobleaching. V případě analýzy oxalátů a citrátů se využívá nepřímá UV detekce, kdy je použit chromátový elektrolyt s tetradecyltrimethylammonium bromidem – TTAB. Vzhledem k tomu, že separace v tomto případě trvá déle jak 5 minut, může docházet k rozkladu elektrolytu vlivem působení UV záření (photobleachingu) a tím k významnému zhoršení detekčních limitů a fluktuaci nulové linie. Tento negativní efekt se v podstatně větší míře uplatňuje u detektorů s diodovým polem (DAD), kde je veškeré záření deuteriové výbojky nejprve fokusováno na kapiláru a až následně vedeno do spektrometru s diodovým polem. Elektrolyt nebo vlastní vzorek je tak zatížen vysokým zářivým tokem a snadno může dojít k jeho degradaci. Podstatně výhodnější situace je u rychle skenujících UV detektorů, kde záření z výbojky nejprve vstupuje do mřížkového spektrometru a z jeho výstupní štěrbiny je teprve přiváděno na kapiláru. Vzorek je tak ozařován pouze velmi úzkým spektrálním oknem (dáno šířkou štěrbiny monochromátoru), záření dopadající na kapiláru tak má řádově nižší intenzitu než v případě diode array detektorů. U kvalitních skenujících detektorů je tak prakticky zcela eliminováno riziko photobleachingu. V případě analýzy oxalátů byly často reportovány zásadní problémy při použití diode array detektorů, příčinou je v tomto případě právě photobleaching používaného pufru, ten ve většině případů zcela znemožňuje validaci metody a dosažení dlouhodobě stabilních výsledků. V níže uvedené metodice je použit přístroj CAPEL 205, který používá skenující UV detektor s patentovanou optikou pro měření absorpce světla ve vlastní kapiláře. Přístroj tak dosahuje cca 10x lepších mezí detekce než běžné komerční CE systémy s diode array detekcí, současně je

také eliminováno riziko spojené s photobleachingem. Přístroj navíc používá kapalinové termostatování kapiláry a dosahuje tak i vynikající reprodukovatelnosti elektromigračních časů i reprodukovatelnosti kvantitativní analýzy, a to i bez použití metody vnitřního standardu. Více podrobností o přístroji CAPEL 205 a jeho využití při klasické aniontové analýze bylo uvedeno v našich Analytických novinkách č. 50 (jsou ke stažení v našem archivu zde: http://www.rmi.cz/download.php?group=stranky3_soubory&id=2329)

Instrumentace - CE Lumex model CAPEL-205

Detekce skenující UV-VIS s rozsahem 190 – 400 nm, světelný zdroj: deuteriová lamp.

Rozsah napětí od -30 kV do +30 kV s krokem 1 kV a elektronickým přepínáním polarity, rozsah proudu 0 až 300 μ A

Programovatelné změny vlnové délky, tlaku a napětí během analýz, možnost skenu spektra.

Rozsah tlaku pro vnášení vzorku a analýzu od -100 do +100 mbar, programovatelné s krokem 1 mbar.

Rozsah tlaku pro výplach a plnění kapiláry 500 až 2000 mbar s krokem 1 mbar.

Délka kapilár od 30 do 120 cm, vnitřní průměr standardně 50 nebo 75 μ m.

Termostatování kapiláry integrovaným kapalinovým termostatem plněným destilovanou vodou od -10 do +30 °C od okolní teploty s přesností $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Autosampler pro 59 vialek (standard Eppendorf® - typ 1.5 ml), vialky lze vkládat uzavřené - přístroj je otevírá až před měřením - ochrana před kontaminací i odpařováním vzorku.

Ovládací a vyhodnocovací software ELFORUN™



Experimentální část

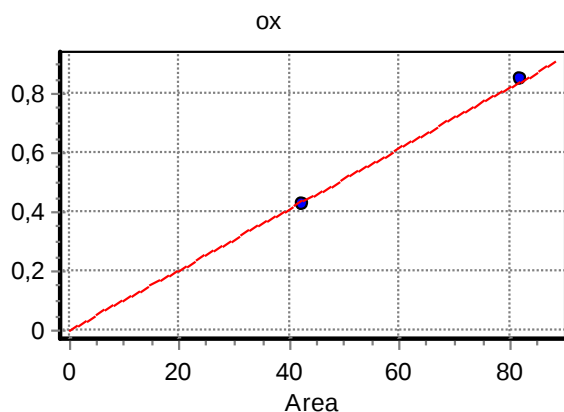
Příprava vzorku

Okyselení vzorku moči přídatkem H_3PO_4 na hodnotu pH 2 až 2,5, vzorek byl před analýzou zahříván 30 minut na 55 °C pro rozpuštění případné sraženiny. Pro analýzu byl následně 50x naředěn deionizovanou vodou.

Podmínky a výsledky měření

Kapilára 75 μ m/60 cm, základní elektrolyt chromátový s tetradecyltrimethylammonium bromidem - TTAB, teplota termostatování kapiláry 20 °C, konstantní napětí - 14kV, detekce UV 375 nm, doba analýzy 7 min.

Kalibrace oxaláty:



N	Area	Concentration, mmol/L
1	81.95	0.8470
2	42.30	0.4240

Calibration type: Absolute calibration

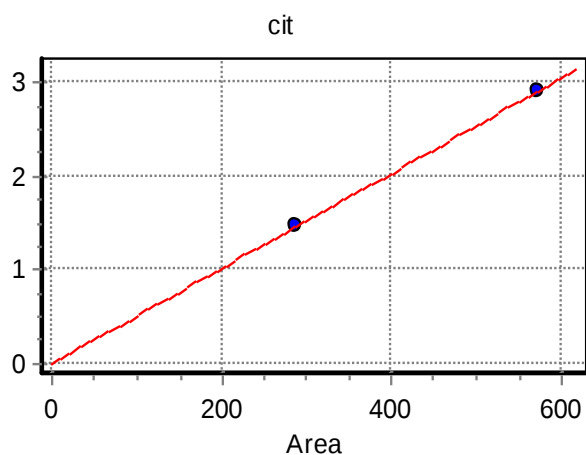
Function type : $y=k_1 \cdot x$

$k_0 = 0.0000$ $k_1 = 0.0103$ **KK = 0.9999**

SD : 0.0000

Response function : Area

Kalibrace citráty:



N	Area	Concentration, mmol/L
1	572.9	2.915
2	288.8	1.457

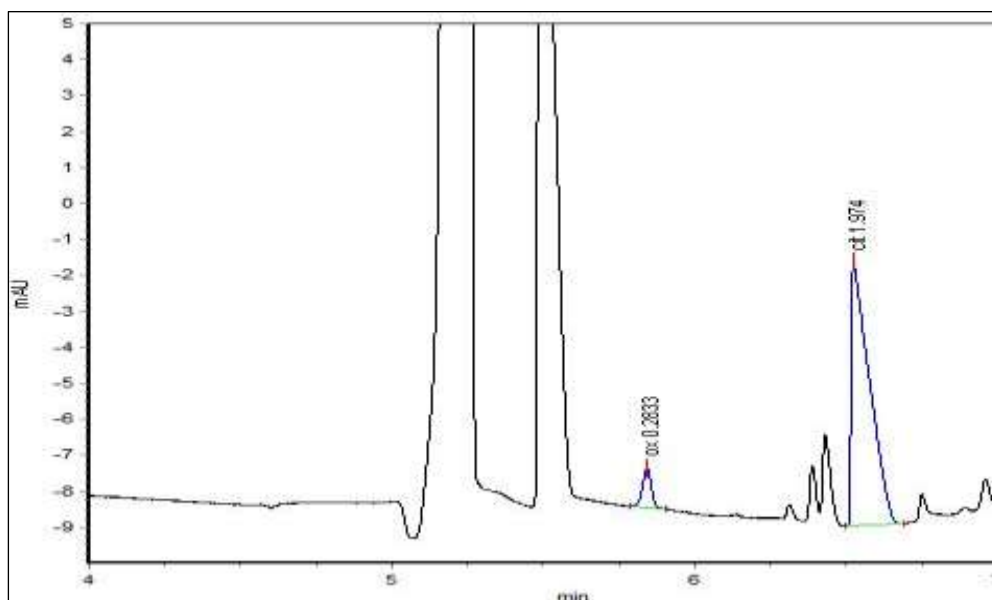
Calibration type: Absolute calibration

Function type : $y=k_1 \cdot x$

$k_0 = 0.0000$ $k_1 = 0.0051$ **$KK = 1.0000$**

SD : 0.0000

Response function : Area



Elektroforegram moči – koncentrace oxalátů 0,28 mmol/l, citrátů 1,97 mmol/l

Speciální poděkování:

Děkujeme pracovníkům Úseku speciálních analýz ÚKBD FN v Hradci Králové za spolupráci při odlaďování uvedené aplikace.



RMI, s.r.o.

Pernštýnská 116

533 41 Lázně ohdaneč

tel.: 466 921 885, 466 921 404

e-mail: sale@rmi.cz

www.rmi.cz