

# Kapilární elektroforéza

## Stacking

On-line zakoncentrování vzorku přímo v kapiláře, tzv. „stacking“, hraje důležitou roli při stanovení velmi zředěných analytů. Během stacking procesu dochází k zakoncentrování vzorku, kdy nadávkovaná dlouhá zóna s nízkou koncentrací vzorku je fokusována do zóny krátké o koncentraci podstatně vyšší. Pak následuje separace individuálních zón a jejich detekce.

Stacking proces může být založen na různých principech, v tomto cvičení se seznámíme se základním principem, kde v každém bodě kapiláry platí Kohlrauschova regulační funkce

$$\sum c_i/\mu_i = \text{konst.}$$

kde  $c_i$  je analytická koncentrace a  $\mu_i$  iontová mobilita komponenty  $i$ .

Po nástřiku dlouhé zředěné zóny o nízké koncentraci vzorku a tudíž o nízké vodivosti dané zóny a vložení separačního napětí na kapiláru, je intenzita elektrického pole na této zóně mnohem vyšší než na zbytku kapiláry. Tam je vodivost dána složením základního elektrolytu (BGE) a je podstatně vyšší. Vlivem vyšší intenzity elektrického pole nadávkované zóny migrují ionty analytu rychleji, než by migrovaly v základním elektrolytu až k rozhraní analyt-základní elektrolyt, kde jsou po průchodu rozhraním vlivem nižší intenzity el. pole v BGE zpomaleny a zakoncentrovány v úzkou zónu a dále migrují a separují se dle principů klasické zónové elektroforézy.

Tento proces budeme sledovat a) na počítači pomocí simulačního programu Simul 5

b) při analýze na komerčním přístroji BioFocus 3000 fy BioRad

## A) Simulace pomocí programu Simul 5

Simulační program SIMUL 5 (prof. Gaš, [www.natur.cuni.cz/gas](http://www.natur.cuni.cz/gas)) umožňuje sledování koncentračního profilu každé ze složek zvoleného elektrolytového systému (BGE i vzorek), pH a vodivosti v každém bodě migrační dráhy v závislosti na čase. Na základě toho lze předpovědět průběh reálné analýzy a zvolit její optimální podmínky.

1. Seznámení s programem, parametry důležité pro výpočty – **iontová mobilita, disociační konstanta**, koncentrace, délka kapiláry, délka nástřiku, separační napětí
2. Simulace pro systém : vzorek – kyselina benzoová + kyselina salicylová  
BGE – 0.05M kyselina octová + Na<sup>+</sup>, pH=5

Úkol : popište a srovnajte průběh některých z provedených simulací a přiložte vybrané záznamy

## B) Analýza směsi kyseliny benzoové a pikrové

Podmínky : měření budou prováděna na komerčním přístroji BioFocus 3000 fy BioRad s absorbančním detektorem umožňujícím práci s jednou vlnovou délkou nebo snímat současně celé spektrum v rozmezí 190-300nm. Separační křemenná kapilára ( celková délka 24.6cm, 20cm k detektoru, vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ ) je umístěna v termostátované kartridži a její vnitřní povrch je modifikován vrstvičkou polyakrylamidu pro eliminaci elektroosmózy.

Vzorek bude dávkován tlakem.

BGE – 0.05M kyselina octová + Na<sup>+</sup>, pH=5

Úkol

- 1) Podle spekter vyberte nejvhodnější vlnovou délku pro analýzu
  - 2) Ze zásobního roztoku připravte vzorky směsí kyselina benzoová + kyselina salicylová o konc.  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M
  - 3) Provedte analýzy a optimalizujte dobu nástřiku a separační napětí
  - 4) Vypočítejte separační účinnost kapiláry pro vybrané měření vyjádřenou v počtu teoretických pater  $N = 5.54 (t/w_{1/2})^2$
- kde  $t$  = doba migrace,  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky
- 5) K protokolu přiložte popsané elektroferogramy