

Elektromigrační metody

Elektrický proud a přenos hmoty v elektrolytech

Elektrolyty = roztoky, které vedou elektrický proud
= roztoky solí, kyselin a zásad



Elektrolytická disociace = v látkách dochází k rozštěpení vazeb a ke vzniku iontů

Stupeň disociace α = udává míru disociace, leží v intervalu $0 < \alpha < 1$

α = $\frac{\text{počet disociovaných molekul}}{\text{celkový počet molekul v roztoku}}$ $\alpha > 30\%$ - silné elektrolyty
 $2\% < \alpha < 30\%$ - středně silné elektrolyty
 $\alpha < 2\%$ - slabé elektrolyty

Elektrický proud v kovech = pohyb elektronů

X

Elektrický proud v roztoku = usměrněný pohyb iontů



Elektrický proud a přenos hmoty v elektrolytech

V elektrolytech je přenos elektrického náboje zároveň přenosem hmoty.



- dochází k migraci látek - mění se složení elektrolytu, v okolí elektrod chemické reakce

Měrná vodivost κ - základní charakteristika elektrolytů, závislá na koncentraci všech iontů v roztoku - [S.cm⁻¹]

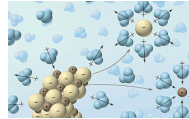
$$\kappa = \frac{1}{R} * \frac{L}{S}$$

R - odpor [Ω], 1/R = G - vodivost [S]
L, S - vzdálenost a plocha mezi elektrodami, L/S = konstanta vodivostní nádoby [m⁻¹]

Molární vodivost λ - měrná vodivost roztoku κ , v němž na jednotkový objem připadá jeden mol částic n , zodpovědných za vodivost, tj. nejběžnější je na molární koncentraci c - [S.m².mol⁻¹]

$$\lambda = \frac{\kappa}{c}$$

Vodivost je závislá na použitém rozpouštědle.



Elektrický proud a přenos hmoty v elektrolytech

Vodivost roztoku je dána koncentrací, nábojem, pohyblivostí iontů a teplotou.

Změna vodivosti v důsledku ředění souvisí - se změnami v disociaci molekul
- s interakcemi mezi ionty a molekulami rozpouštědla



s vyšší koncentrací roztoku klesá vodivost

Silné elektrolyty - zcela disociované, s vyšší koncentrací je menší schopnost pohybu iontů

- soli anorganických a organických kyselin, většina anorganických kyselin a zásad

$$\lambda = \lambda_{\infty} - k * \sqrt{c}$$

λ_{∞} - měrná vodivost roztoku při nekonečném zředění, zanedbává vzájemné interakce
k - empirická konstanta

Slabé elektrolyty - koncentrace iontů je dána stupněm disociace, změna koncentrace mění stupeň disociace α
- některé organické, anorganické kyseliny a zásady (kyselina mravenčí, octová, boritá, NH₃)

$$\lambda = \lambda_{\infty} * \alpha$$

λ_{∞} - měrná vodivost roztoku při nekonečném zředění, zanedbává vzájemné interakce
 α - stupeň disociace (str. 2)

Kohlrauschův zákon o nezávislé migraci iontů

- vyjadřuje, že jednotlivé ionty se v nekonečném zředěném roztoku neovlivňují

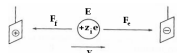
- molární vodivost je v nekonečném zředěném roztoku dána součtem na sobě nezávislých členů

$$\lambda_{\infty} = v_k * \lambda_{\infty k} + v_a * \lambda_{\infty a}$$

λ_{∞} - tabulkované molární vodivosti příslušných iontů
 v_k, v_a - počet kationtů a aniontů, tvořících molekulu elektrolytu

Elektromigrace = pohyb iontů a / nebo nabitých částic v roztoku působením elektrického pole

Na nabitou částici v roztoku mají vliv 2 opačně orientované síly:



$$F_e = - F_f$$

1. síla elektrického pole F_e

$$F_e = Q * E$$

Q - celkový náboj, součet nábojů na povrchu částice [C]

E - intenzita konstantního elektrického pole [V/m]

2. třikání (tření) síla prostředí F_f

$$F_f = f * v$$

f - třikání koeficient

v - rychlost pohybu iontu

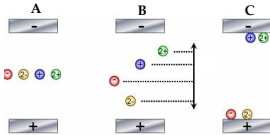
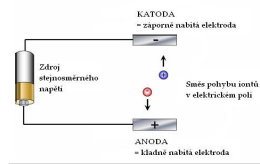
pro kulové částice je třikání síla dána Stokesovým zákonem

$$F_f = 6 * \pi * \eta * r * v$$

η - viskozita prostředí

r - poloměr kulové částice

v - rychlost pohybu iontu



Elektroforetická rychlost a pohyblivost

Elektroforetická rychlost v = rychlost pohybu iontu, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E
- směr pohybu je dán znaménkem jeho náboje a orientací elektrického pole

$$v = E * \mu = U/l * \mu$$

E - intenzita elektrického pole [V/m] μ - elektroforetická mobilita [m²V⁻¹s⁻¹]
U - vložené napětí [V] l - velikost gradientu napětí [m]

- z rovnosti působících sil

$$F_e = - F_f \quad \Rightarrow \quad v = \frac{E * Q}{6 * \pi * \eta * r}$$

Q - náboj
 η - viskozita prostředí
r - poloměr kulové částice
v - rychlost pohybu iontu



Elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ = kvalitativní veličina ionogenních látek, charakteristická pro dané prostředí a teplotu

Efektivní pohyblivost (mobilita) μ_{eff} = součet pohyblivostí jednotlivých iontových forem, vynásobených příslušným molárním zlomkem

$$\mu_{\text{eff}} = \sum \mu_i * x_i \quad \mu_{\text{eff, Cl}^-} = \mu_{\text{H}_3\text{Cl}^+} * x_{\text{H}_3\text{Cl}^+} + \mu_{\text{H}_2\text{Cl}^+} * x_{\text{H}_2\text{Cl}^+} + \mu_{\text{HCl}^+} * x_{\text{HCl}^+} + \mu_{\text{Cl}^0} * x_{\text{Cl}^0}$$

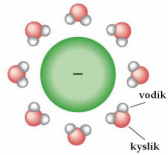
ovlivňování rovnováh \Rightarrow cílené změny v efektivních elektroforetických mobilitách

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Elektroforetická rychlost a pohyblivost

S rostoucí koncentrací elektrolytu klesá elektroforetická pohyblivost iontu.

- z Debye-Hückelovy teorie – kolem každého iontu v roztoku se vytváří iontová sféra
- asociace iontových párů, pokles volných iontů



Iontová síla I – charakterizuje celkovou „koncentraci náboje“
 – suma přes všechny ionty v roztoku
 – pro zředěné roztoky platí:

$$I = 0,5 \sum c_i \cdot z_i^2$$

z – relativní náboj iontu
 c – koncentrace jednotlivých iontů

Iontová pohyblivost μ_0 = elektroforetická pohyblivost extrapolovaná na nulovou iontovou sílu
 – s rostoucí teplotou se iontová pohyblivost zvyšuje

$$\mu_T = \mu_{T0} [1 + 0,02 (T - T_0)]$$

T – teplota pracovní [°C] T_0 – teplota standardní 25°C

7

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Elektroforetická rychlost a pohyblivost

Iontová pohyblivost μ_0 = pro některé ionty jsou hodnoty tabelované, jinak se pohyblivost odhaduje
 – někdy lze najít také označení limitní pohyblivost

Joklova rovnice = pro odhad iontových pohyblivostí malých molekul

$$|\mu_0| = |z| \cdot \frac{a}{\sqrt{M}} - b$$

z – relativní náboj iontu
 a – empirická konstanta, $a = 485 \cdot 10^9 \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 b – empirická konstanta, $b = 9,6 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 M – molekulová hmotnost látky

Onsagerova rovnice = iontová pohyblivost korigovaná na iontovou sílu (při teplotě 25°C)

$$|\mu| = |\mu_0| - (0,23 \cdot |\mu_0 z z_c| + 31,3 \cdot 10^{-9} |z|) \cdot (\sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}))$$

z – relativní náboj iontu
 I – iontová síla roztoku
 z_c – relativní náboj protioiontu

Cations	$ \mu^0 \cdot 10^9$ $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	Anions	$ \mu^0 \cdot 10^9$ $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
H ₃ O ⁺	362,5	OH ⁻	205,5
Li ⁺	40,1	F ⁻	57,4
Na ⁺	51,9	Cl ⁻	79,1
K ⁺	76,2	NO ₃ ⁻	74,1
Ammediol	29,5	SO ₄ ²⁻	82,9
Tris	29,5	HEPES	21,8
β-Alanine	36,7	MOPS	24,4
Ethanolamine	44,3	MES	26,8
Imidazole	52,0	AMP	22,6

8

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Elektrolyty v elektromigračních metodách

Pufr = tlumivý roztok = roztok, který přidáním kyseliny nebo zásady výrazně nezmění své pH
 – většinou roztoky konjugovaných acidobazických párů, slabých kyselin a bází
 – např. kyselina octová/octan, kyselina boritá/boritan, amoniak/amoniak sulfid apod.



Hlavní úlohou pufrů je: - umožnit průchod elektrického proudu
 - udržovat vhodné pH prostředí pro separaci

Pufráčká kapacita = množství silné kyseliny nebo báze, jejíž přidávek do 1 litru pufru vyvolá jednotkovou změnu pH
 – největší pufráčká kapacita při pH = pKa
 – mění se s ředěním, přidávkem soli a teplotou

Kritéria výběru vhodného pufru:

- > výběr podle pracovní oblasti pH
- > čistota a inertnost
- > iontová síla a rozpustnost
- > UV absorpce
- > toxicita, cena

rozsah pufru = pKa ± 1

Lakmusový papírek = orientační kontrola pH

9

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody



Elektrolyty v elektromigračních metodách

K nejběžnějším patří acetátový, citrátový, borátový a fosfátový pufr.

Buffer	Molecular Weight	pKa	ΔpKa/°C
Acetic Acid	60.05	4.8	-0.002
Boric Acid	61.83	9.23	-0.002
Citric Acid	192.1	6.4 (pK3)	0
Glycine	75.07	9.8	-0.03
MOPS	209.26	7.2	-0.006
Phosphoric Acid	98	7.2 (pK2)	-0.003
Taurine	125.1	9.1	-
Tricine	178.18	8.15	-0.021
Tris	121.1	8.06	-0.028

Příprava, skladování a zacházení s pufrům:

- výběr pufru, příprava roztoku o zvolené koncentraci a pH
- kontrola, případně úprava pH na kalibrovaném pH-metru
- použití čerstvých roztoků - hrozba mikrobiální kontaminace!
- možnost zmrazení – méně doporučována
- dodržovat sterilní podmínky - kontaminace odběrem – např. špičky

10

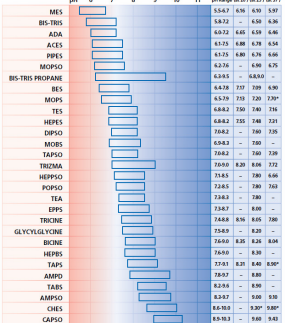
Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Elektrolyty v elektromigračních metodách

Biologické pufrů = zwitteriontové pufrů, označované jako „Good buffers“ (N. E. Good et al 1966)

- základem je N-substituovaný taurin nebo glycin
- rozsah použití pH 5 - 9
- inertní vůči enzymatickému působení
- netoxické vůči buňkám, nepropustují membránou
- neabsorbují v UV-Vis oblasti

Vybrané biologické pufrů



Směsné pufrů

- > TBE pH 8.3 – Tris, kyselina boritá, EDTA
- > TAE pH 8.3 – Tris, kyselina octová, EDTA
- > Britton-Robinsonův pufr - univerzální 2 - 12
 – kyselina boritá, octová, fosforečná + NaOH

11

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Elektromigrační metody

Trocha historie...

1937 – Arne Wilhelm Kaurin Tiselius – první elektroforetická separace proteinů, Nobelova cena za chemii (1948)

1967 – Stellan Hjertén – sestrojil první plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu

1981 – James W. Jorgenson a Kryn S. Lukacs – první elektroforetická separace v kapiláře o průměru 75 μm







12

Elektromigrační metody

- = založené na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v roztoku vlivem působení stejnosměrného elektrického pole
- separace probíhá na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti částic směrem k opačně nabitým elektrodám
- jednotlivé techniky se liší jak principem, tak instrumentálním provedením, použitím pracovního elektrolytu apod.

Plošné techniky

- papírová – nízká citlivost a reprodukovatelnost v závislosti na kvalitě papíru
- gelová – na polyakrylamidovém gelu (PAGE), na agarózovém gelu – analýza bílkovin, DNA

Kapilární techniky

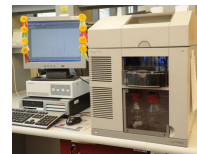
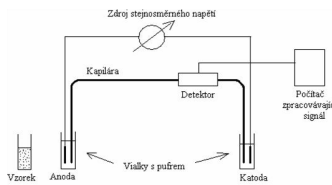
- Zónová elektroforéza (CZE)
- Izotachofóza (CITP)
- Gelová elektroforéza (CGE)
- Izoelektrická fokusace (CIEF)
- Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- Elektrochromatografie (CEC)
- Afinitní elektroforéza (ACE)

WEB OF KNOWLEDGE[®] THOMSON REUTERS

CZE - 13575 publikací
CGE - 4581 publikací
CITP - 1957 publikací

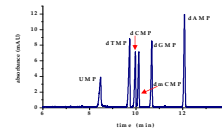
Kapilární zónová elektroforéza

- = moving boundary electrophoresis – technika pohyblivého rozhraní
- separace analytů v prostředí homogenního **jednoho** základního elektrolytu (BGE) o konstantním složení



Instrumentace:

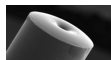
- separační kapilára
- zdroj separačního napětí
- vialky s pufrům, v nichž jsou elektrody a konce kapilár
- detektor
- vyhodnocovací systém



Elektroosmotický tok

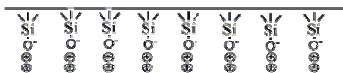
Křemenná separační kapilára

- vyrobena z taveného křemene (fused-silica capillary)
- vnitřní průměr 10 – 200 μm, vnější průměr 350 – 400 μm
- délka dle požadavků - 10 – 100 cm
- vnější vrstva polyimidu (15 μm) – chrání před mechanickým poškozením
- odstranění části polyimidu vzniká detekční okénko pro UV-Vis detekci



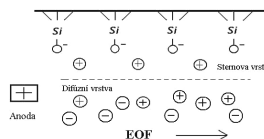
Elektroosmotický tok (EOF)

- je důsledkem náboje vnitřního povrchu křemenných kapilár
- disociace silanolových skupin na stěně kapiláry jí uděluje záporný náboj
- po sepnutí elektrického pole dochází k pohybu nabitých částic a tím i k pohybu celé kapaliny



Elektroosmotický tok

- Silanolové skupiny přitahují kationty elektrolytu a vzniká elektrická dvojvrstva, kterou tvoří vrstva Sternova (Helmholtzova) – částečně fixovaná ke stěně kapiláry
- Gouy –Chapmanova – difúzní, volná výměna s ostatními ionty roztoku
- na rozhraní vrstev je vytvořen elektrický potenciál ζ



Elektroforetická rychlost EOF μ_{EOF}

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{\eta}$$

ζ – elektrokinetický potenciál
ε – permitivita roztoku
η – viskozita roztoku

$$V_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF}$$

Rychlostní profil EOF = téměř pravoúhlý

- ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je zanedbatelný příspěvek k celkové disperzi zóny



- Experimentální zjištění EOF – pomocí neutrálního markeru - migrační čas ovlivňuje pouze elektroosmóza
- neutrální marker – metyloxid, aceton, dimethylformamid, voda

Elektroosmotický tok



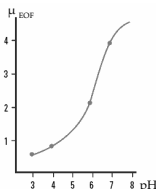
- díky EOF lze stanovit kationty i anionty v jedné analýze
- slouží k mobilizaci zón zakonzentrovávaných izoelektrickou fokusací



- vysoká rychlost EOF může zapříčinit nedostatečnou separaci kationtů
- nízká rychlost EOF umožní interakce kationtů se stěnou kapiláry – absorpce, nesymetrie pík
- opačně orientovaný EOF může zneškodnit detekci analytů

Změna elektroosmotického toku

- změnou pH
 - nízký EOF při kyselém pH
- změnou iontové síly pufru
 - rostoucí iontová síla snižuje potenciál a tím i EOF
 - X generace tepla
- modifikací vnitřního povrchu kapiláry
 - potlačení nebo obrácení náboje pokrytými stěny kapiláry, tzv. coating
 - permanentní modifikace – kovalentní vazba např. s polymerem
 - dynamická modifikace – přidavek polymeru do pufru
- změnou elektrického pole
 - nízké napětí, nízká selektivita X vysoké napětí, vyšší generace tepla
- změnou teploty – vyšší teplota, změna viskozity, vyšší EOF



Účinnost elektroforetické separace

Počet teoretických pater N = měřítko účinnosti elektroforetické separace

$$N = 5,54 \cdot (t_R / W_{0,5})^2 = 16 \cdot (t_R / w)^2$$

- při elektroforéze dochází k migraci iontů a současně k rozmývání zón difúzí

➔ píky tvaru Gaussovy křivky

- σ = vzdálenost, kterou prodifunduje průměrný ion za dobu t
- vztah mezi difúzním koeficientem D a tzv. rozptylem σ² udává

Einstein-Smoluchowského rovnice $\sigma^2 = 2 \cdot D \cdot t$

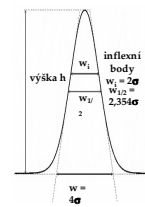
- účinnost separace je v omezeném rozsahu přímo úměrná vloženému napětí

$$N = \mu \cdot U / 2 \cdot D$$

- vyšší napětí ➔ větší generované teplot ➔ pokles separace

Ekvivalent počtu teoretického patra H = počet teoretických pater vztahovaný na délku kapiláry l

$$H = l / N = \sigma^2 / l$$



Účinnost elektroforetické separace

V reálném experimentu však rozptyl σ ovlivňuje řada vlivů:

- difúze
- elektrografiční disperze
- sorpce
- Jouleovo teplo
- nástřik, detekce ... atd.

Difúze

- nelze odstranit, pouze ovlivnit např. snížením teploty, zvýšením viskozity apod.
- nízký difúzní koeficient – úzké píky

Sorpce

- interakce analytů s nábojem na stěně kapiláry
- vede k asymetrii píků, v horším případě ke ztrátě analytu

Jouleovo teplo

- způsobené průchodem elektrického proudu kapilárou
- Ohmova závislost proudu na napětí – volba vhodného separačního napětí

Elektrodisperze

- rozdílná pohyblivost analytu a spoluiontu stejného náboje z elektrolytu
- minimalizace vlivu správnou volbou elektrolytu s co nejpodobnější pohyblivostí

A - frontování B - symetrie C - chvostování

19

Instrumentace

Dávkování v CZE

- dávkovaný objem v jednotkách nanolitů – otázka reprodukovatelnosti
- nepraktičnost při využití dávkovacích kohoutů či jiných injektorů

Hydrodynamické dávkování

- nejjednodušší, využití sifonového efektu - rozdíl hladin (ruční dávkování)
- využití přetlaku či podtlaku (komerční přístroje)
- pro výpočet dávkovaného objemu slouží Hagen-Poiseuilleova rovnice

$$V_d = \frac{\Delta P * d^4 * \pi * t_d}{128 * \eta * l_c}$$

ΔP – tlakový spád na kapiláře
 d – vnitřní průměr kapiláry
 t_d – doba nástřiku
 η – viskozita elektrolytu
 l_c – celková délka kapiláry

rozdíl hladin přetlak podtlak

20

Instrumentace

Elektrokinetické dávkování

- v některých případech jediný možný postup – kapilární gelová elektroforéza
- dávkovací napětí bývá obvykle nižší než separační

– koncentrační poměr ve vzorku nemusí odpovídat poměru v nadávkované zóně

- výpočet nadávkovaného objemu

$$V_d = \pi * r^2 * l_s * \frac{t_d * U_d}{t_0 * U_s}$$

r – vnitřní poloměr kapiláry
 l_s – efektivní délka kapiláry
 t_d – doba, po kterou bylo aplikováno napětí
 t_0 – migrační čas EOF
 U_d – napětí při dávkování
 U_s – napětí separační

21

Instrumentace

Detekce v CZE

- online detekce přímo v kapiláře X sběr frakcí a offline detekce
- různá citlivost jednotlivých detektorů
- možnost derivatizace analytů pro lepší detekovatelnost

Nejběžnější detektory:

- absorpční fotometrický, s diodovým polem
- fluorescenční
- konduktometrický
- ampérometrický
- hmotnostně-spektrometrický

detekční okénko bublinková cela Z-cela

22

Elektroforetogram a jeho vyhodnocení

Elektroforetogram = grafický záznam separace po zpracování signálu detektoru

- další sporná označení elektroforegram, elektroforeogram, elektroferogram
- separace probíhá za konstantního napětí

Výpočet elektroforetické pohyblivosti z migračního času analytu

$$\mu = \frac{l_c * l_s}{U} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right)$$

l_c – celková délka kapiláry
 l_s – efektivní délka kapiláry
 U – separační napětí
 t_m – migrační čas analytu
 t_0 – migrační čas EOF

Rozlišení píků L a C

$$R_{LC} = \frac{2 * (t_c - t_l)}{w_L + w_C}$$

t_c, t_l – migrační časy píků
 w_C, w_L – šířka píků u základny

23

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace organických a anorganických iontů ve vině

Informace z publikace:

- uncoated fused silica capillary 50 μ m ID, 50/60 cm
- separation voltage +15 / -15kV, injection 0,5 psi/5 sec, detection at 270 nm
- new capillary – 0,1 M NaOH 20 min, Milli-Q water 5 min, electrolyte solution 5 min
- BGE = 9mM pyridine, 12 mM glycolic acid, 5 mM 18-crown-6-ether, pH 3.6

R. Stetla et al. Food chemistry, 124 (2011) 1194.

24

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace polysacharidů v mořské vodě

- capillary 75 μm , 115 cm, 105 cm to the detector
- voltage -18 kV, injection pressure (50 mbar) for 1 s
- detection at 224 nm
- BGE: 8 mM DMP, 1.5 mM CTAB, pH 12.00

Nepřímá UV-Vis detekce:
= pracovní elektrolyt absorbuje v dané oblasti a průchod analytu detektorem se zaznamená poklesem absorbance – negativní pik

G. Quijo et al., *Analitica Chimica Acta*, 662 (2010) 193.

(1) xylose; (2) mannose; (3) rhamnose; (4) glucose;
(5) galactose; (6) fructose; (7)

25

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace iontů těžkých kovů v odpadních vodách

- capillary 50 μm id, 40/48 cm length
- running buffer 10 mM His/ 4 mM Tart, pH 5.5
- injection 3 kV/5 sec,
- separation voltage - positive 15 kV

H.F.Lau et al., *Electrophoresis*, 32 (2011) 1190.

26

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace proteinů

- cross-linked PVA coated capillary
- 40/48.5 cm effective/total length, 50 m ID
- BGE – 40 mM sodium phosphate pH 3
- + 15kV, injection 3 kV/5 sec

Zesílovaný polyvinylalkohol – potlačený EOF

1, cytochrome c; 2, lysozyme; 3, trypsinogen; 4, -chymotrypsinogen

D.Bédel et al., *Electrophoresis*, 22 (2001) 3813.

27

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Prenatální diagnostika vrozených vad – Downův syndrom

- odběr plodové vody v 15.týdnu těhotenství
- separace markerů Downova syndromu –STR oblasti na chromozómu 21
 - 1 pik nebo 2 piky v poměru 1:1 – normální genotyp
 - 3 piky v poměru 1:1:1 (trisomie 21. chromozomu), 2 piky v poměru 2:1 – genotyp s vrozenou vadou
- poly(N-acryloyl amino ethoxy ethanol) coated capillary
- BGE = TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) pH 8.3, 2.5 μM ethidium bromid, 8% PVA

C. Gelfi et al., *Journal of Chromatography A*, 718 (1995) 405.

28

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace mikroorganismů

- buněčné stěny a membrány mají rozdílný obsah proteinů, lipidů a lipopolysacharidů → různý náboj
- fused silica ($L_{\text{eff}} = 25$ cm, $L_{\text{tot}} = 33.5$ cm)
- buffer was 0.0125% PEO dissolved in MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), pH = 6.1
- detection at 214 nm, $U = 20$ kV, injection 200 mbar /s

B. Buszewski et al., *Biomed Chromatogr*, 21 (2007) 116.

29

Metody chemického výzkumu - elektroforézní metody

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Elektroforétycky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)

= electrophoretically mediated microanalysis

- analýza enzymových aktivit, zjištění koncentrace substrátů, inhibičních konstant apod.

Detektor

Z. Glätz et al., *Journal of Chromatography B*, 814 (2006) 23.

30

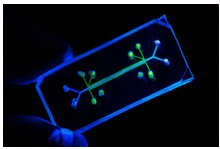
Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

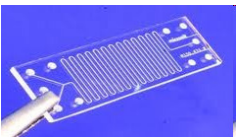
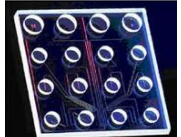
Elektroforetická analýza na čípech

- miniaturizace - všechny kroky analýzy v jednom
- plastické hmoty, křemen nebo sklo - vyleptaná soustava kanálků
- obsahují děliče toku kapalin, ventily apod.

- + - malá spotřeba vzorku (pL - nL)
- předúprava vzorku přímo na čipu
- přenosnost

- - problematická výroba - technologie
- cena



31

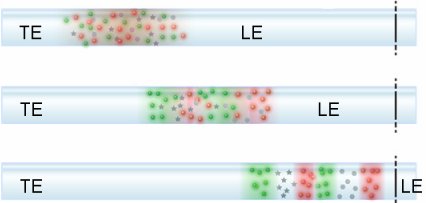
Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Kapilární izotachoforéza

- dva základní elektrolyty - LEADING = vedoucí elektrolyt - největší pohyblivost v systému
- TERMINATING = koncový elektrolyt - nejmenší pohyblivost v systému

$$\mu_{TE} < \mu_{analytů} < \mu_{LE}$$

- separace probíhá za konstantního proudu - vytvoření potenciálového gradientu
- po dosažení ustáleného stavu se zóny pohybují stejnou rychlostí
- lze v jedné analýze separovat pouze anionty nebo kationty



32

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Kapilární izotachoforéza

V každém místě separačního prostoru musí být platit:

- podmínka elektroneutrálnosti - součet nábojů kationtů a aniontů musí být v každém makroskopickém objemu stejný

$$\sum c_i \cdot z_i = 0$$

- podmínka kontinuity - popisující časové změny koncentrace jednotlivých iontů v daném místě

Kohlrauschova regulační funkce ω - vystihující existenci diskontinuit, v průběhu separace se migrující zóny vzorku musí koncentračně přizpůsobit původní hodnotě ω funkce v zóně vedoucího elektrolytu, dokud není dosaženo rovnovážného stavu

$$\omega(x) = \sum \frac{c_i(x) \cdot z_i}{m_i}$$

= koncentrace látek v zónách konstantní a daná neměnnou koncentrací vedoucího elektrolytu
 = koncentrace látek v původním vzorku nemá vliv na výslednou koncentraci látky v izotachoforetické zóně

$$c_x = c_L \cdot \frac{\mu_x}{\mu_x - \mu_C} \cdot \frac{\mu_L - \mu_C}{\mu_L}$$

c_x - koncentrace látky x v zóně

c_L - koncentrace vedoucího iontu ve vedoucí zóně

μ_x - efektivní pohyblivost látky x

μ_L - efektivní pohyblivost vedoucího iontu L

μ_C - efektivní pohyblivost protiiontu C

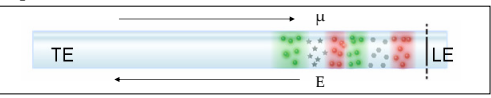
- Ohmův zákon - proudová hustota je konstantní pro daný separační prostor o průřezu S a hnačím proudem I.

$$E \cdot \kappa = I/S$$

33

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Kapilární izotachoforéza



- každá zóna obsahuje pouze 1 druh iontů
- v každé zóně je přítomen také protiion vedoucího elektrolytu
- koncentrace v zóně je konstantní, mimo ni nulová
- pořadí zón podle klesající efektivní elektroforetické pohyblivosti

Samozaostřovací efekt

- vlastnosti se mezi zónami mění skokem
- kation chce přejít do zóny před sebou

→ zóna nižšího potenciálu

→ snížení hnačící síly

→ návrat zpět

- kation chce přejít do zóny za sebou

→ zóna vyššího potenciálu

→ zvýšení hnačící síly


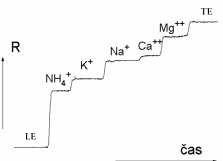
→ návrat zpět

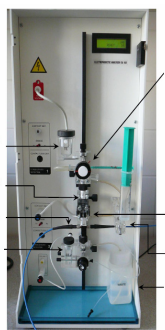
34

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Izotachoforéza

- zakoncentrování stopových koncentrací analytů až o několik řádů
- využití prekoncepce před kapilární zónovou elektroforézou



Diferenciální kolona
 Zložebník na koncový elektrolyt (Laminating elektrolyt)
 Analytická kolona 0,3 mm, 90 mm
 UV-VIS detektor
 Zložebník na vedoucí elektrolyt (Leading elektrolyt)
 Vodivostní detektor
 Pláničkový rezistor
 Odpad

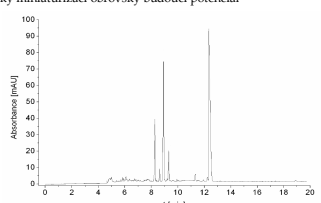
35

Metody chemického výzkumu - elektromigrační metody

Závěrem...

Elektromigrační metody

- separace od iontů po celé biomolekuly až buňky
- spolu s chromatografickými metodami největší význam v separačních analýzách
- široké uplatnění nejen ve výzkumu, ale také v klinické medicíně
- díky miniaturizaci obrovský budoucí potenciál



Literatura:

Foret, F., Křivánková, L., Boček, P.: Capillary Zone Electrophoresis, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1993.
 Dolník, V.: Úvod do kapilární elektroforézy, Brno, 1994.
 Moore, V. J.: Fyzikální chemie, 4. vydání, Praha, 1981.

Odborné časopisy:
 Journal of Separation Science, Electrophoresis, Analytica Chimica Acta, Lab on Chip, apod.

36