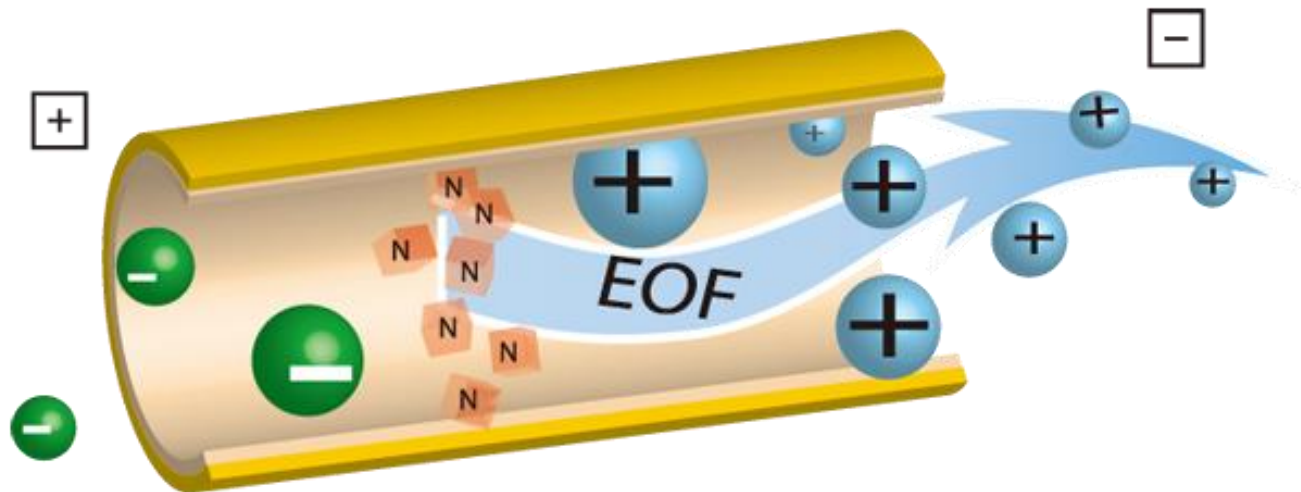


Kapilární elektroforéza a izotachoforéza



Elektromigrační metody

- = souhrnné označení pro skupinu analytických metod, u nichž dochází v roztoku k separaci látek (iontů) na základě jejich různé pohyblivosti vlivem působení stejnosměrného elektrického pole
- = jednotlivé techniky se liší principem, instrumentálním provedením, použitím pracovního elektrolytu apod.

Základní elektrokinetické jevy

Elektroforéza = ve stejnosměrném homogenním elektrickém poli putují nabitě částice v roztoku k opačně nabitým elektrodám a dochází k jejich rozdělení
= **nejvýznamnější elektrokinetický jev**

Elektroosmóza = pohyb kapaliny v křemenných kapilárách směrem k záporně nabitě elektrodě (ke katodě)
= **elektroosmotický tok**
- praktické využití například při odvodňování zeminy, domů apod.

Sedimentační potenciál = sedimentací elektricky nabitých částic ve sloupci kapaliny vzniká elektrický potenciálový rozdíl
- praktické využití tohoto jevu je téměř nulové

Potenciál proudění = rozdíl elektrických potenciálů v roztoku způsobený mechanickou silou (např. tlakem)
- podobný efekt lze pozorovat u vodopádů, kdy v místě s největší mechanickou silou může docházet k ionizaci vzduchu za vzniku ozónu nebo při proudění krve v kapilárách organismů, kde podmiňuje vznik jednoho z píků elektrokardiogramu

Elektromigrační metody

- = souhrnné označení pro skupinu analytických metod, u nichž dochází v roztoku k separaci látek (iontů) na základě jejich různé pohyblivosti vlivem působení stejnosměrného elektrického pole
- = jednotlivé techniky se liší principem, instrumentálním provedením, použitím pracovního elektrolytu apod.

Plošné techniky

papírové - nízká citlivost a reprodukovatelnost
(v závislosti na kvalitě papíru)

gelové - nejčastěji polyakrylamidový nebo agarózový gel
- analýza proteinů, DNA

Kapilární techniky

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární izotachoforéza (ITP)

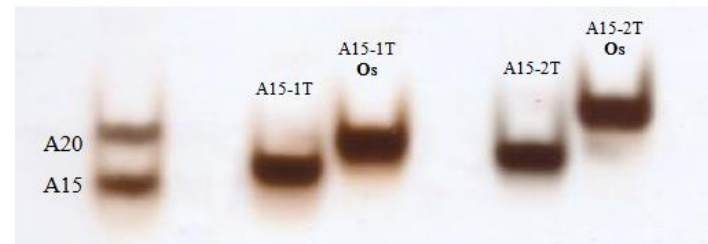
Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

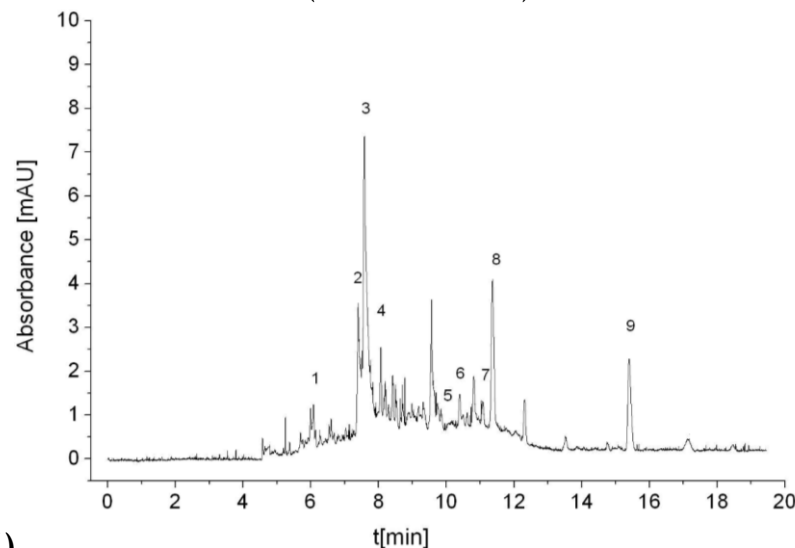
Kapilární kombinované techniky

Kapilární micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Kapilární elektrochromatografie (CEC)



Separace čistých a osmiem značených oligonukleotidů A15-1T a A15-2T na polyakrylamidovém gelu (barveno stříbrem)

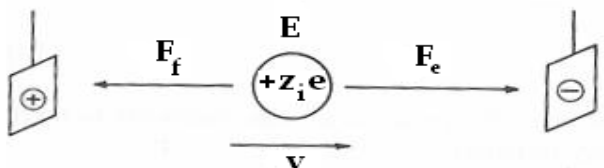


CZE analýza polyfenolických látek moučky hroznových semínek: 1 resveratrol, 2 katechin, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kyselina ferulová, 6 kyselina p-kumarová, 7 myricetin, 8 kvercetin, 9 kyselina galová

Elektromigrace

Na nabitou částici v roztoku působí 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. frikční (třecí) síla prostředí F_f

$$F_f = f * v$$

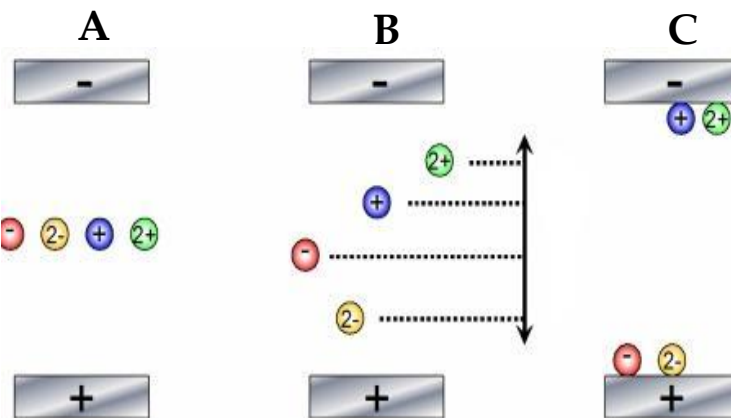
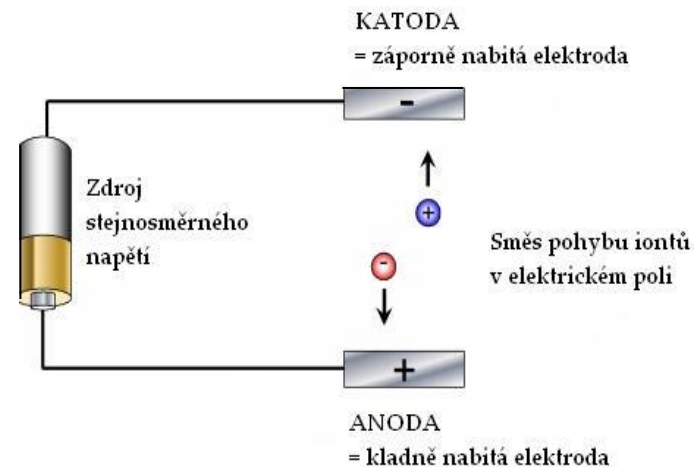
f - frikční koeficient

v - rychlost pohybu iontu

pro kulové částice je frikční 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]

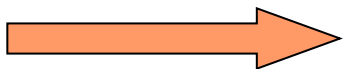
U - vložené napětí [V]

μ - elektroforetická mobilita [$m^2V^{-1}s^{-1}$]

l - velikost gradientu napětí [m]

- z rovnosti působících sil pak vyplývá ...

$$F_e = - F_f$$



$$v = \frac{E * Q}{6 * \pi * \eta * r}$$

Q - celkový 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 (při jednotkové intenzitě el. pole)

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

$$\mu_{eff} = \sum \mu_i * x_i$$

$$\mu_{eff,cit} = \mu_{H_3Cit} * x_{H_3Cit} + \mu_{H_2Cit} * x_{H_2Cit} + \mu_{HCit^{2-}} * x_{HCit^{2-}} + \mu_{Cit^{3-}} * x_{Cit^{3-}}$$



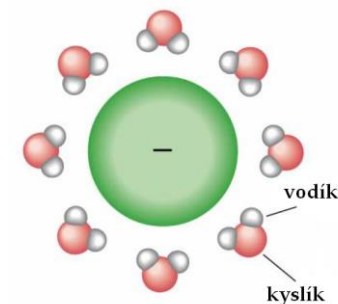
ovlivňování rovnovah vede k cíleným změnám v efektivních elektroforetických mobilitách

Elektroforetická rychlost a pohyblivost



S rostoucí koncentrací elektrolytu klesá elektroforetická pohyblivost iontu

Z Debye-Hückelovy teorie plyne, že kolem každého iontu v roztoku se vytváří iontová sféra, čímž dochází k pokles volných iontů.



Iontová síla I

= charakterizuje celkovou „koncentraci náboje“ jako sumu přes všechny ionty v roztoku, kdy pro zředěné roztoky platí:

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

Iontová pohyblivost μ_0 = elektroforetická pohyblivost extrapolovaná na nulovou iontovou sílu

- závislá pouze na teplotě a použitém rozpouštědle
- s rostoucí teplotou se iontová pohyblivost zvyšuje

Absolutní iontové pohyblivosti^{1, 10, 16} m^0 vybraných látek při 25 °C

Kation	$m^0 \cdot 10^9$ [$m^2 V^{-1} s^{-1}$]	Anion	$m^0 \cdot 10^9$ [$m^2 V^{-1} s^{-1}$]
H ₃ O ⁺	362,5	OH ⁻	-205,5
K ⁺	76,2	Cl ⁻	-79,1
NH ₄ ⁺	76,1	F ⁻	-57,4
Na ⁺	51,9	Br ⁻	-81,0
Li ⁺	38,7	HSO ₄ ⁻	-52,0
Mg ⁺⁺	53,0	SO ₄ ²⁻	-82,9
Ca ⁺⁺	59,3	NO ₃ ⁻	-74,1
Sr ⁺⁺	60,0	H ₂ PO ₄ ⁻	-35,1
Ba ⁺⁺	63,8	HPO ₄ ²⁻	-64,5

Změna vodivosti v důsledku ředění roztoku souvisí se změnami v disociaci molekul a se změnami interakcí mezi ionty a molekulami rozpouštědla, resp. elektrolytu.

Elektrolyty

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

V elektrolytech je přenos elektrického náboje zároveň přenosem hmoty



dochází k migraci látek



mění se složení elektrolytu v okolí elektrod
vlivem probíhajících chemických reakcí

Pufř = 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/amonná sůl apod.

Hlavní úlohou pufřů je umožnit průchod elektrického proudu a udržovat vhodné pH prostředí pro separaci

Pufrační kapacita

= množství silné kyseliny nebo báze, jejíž přidavek do 1 litru pufřu vyvolá jednotkovou změnu pH

- největší pufrační kapacita při $\text{pH} = \text{pK}_a$
- mění se s ředěním, přidavkem soli a teplotou

rozsah pufřu = $\text{pK}_a \pm 1$

Kritéria výběru vhodného pufřu:

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



Elektrolyty

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

Mezi nejběžněji používané elektrolyty v elektromigračních metodách patří:

Buffer	pK _a	pH range
Phosphate (pK1)	2.1	1.1–3.1
Phosphate (pK2)	7.2	6.2–8.2
Phosphate (pK3)	12.3	11.3–13.3
Citrate (pK1)	3.1	2.1–4.1
Citrate (pK2)	4.7	3.7–5.7
Citrate (pK3)	5.4	4.4–6.4
Formate	3.8	2.8–4.8
Acetate	4.8	3.8–5.8
MES	6.15	5.5–6.7
TRIS	8.06	7.3–9.3
Borate	9.2	8.2–10.2
Diethylamine	10.5	9.5–11.5

Příprava, skladování a zacházení s pufrem:

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

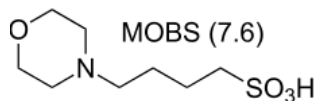
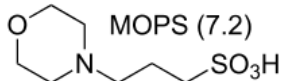
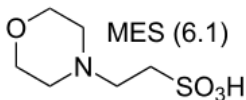


Elektrolyty

Biologické pufrы = zwitteriontové pufrы, 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, neprostupují membránou
- ✓ neabsorbují v UV-Vis oblasti



Směsné pufrы

- ✓ 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

	pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20°)	pKa (at 25°)	pKa (at 37°)
MES								5.5-6.7	6.16	6.10	5.97
BIS-TRIS								5.8-7.2	-	6.50	6.36
ADA								6.0-7.2	6.65	6.59	6.46
ACES								6.1-7.5	6.88	6.78	6.54
PIPES								6.1-7.5	6.80	6.76	6.66
MOPSO								6.2-7.6	-	6.90	6.75
BIS-TRIS PROPANE								6.3-9.5	-	6.8,9.0	-
BES								6.4-7.8	7.17	7.09	6.90
MOPS								6.5-7.9	7.13	7.20	7.70*
TES								6.8-8.2	7.50	7.40	7.16
HEPES								6.8-8.2	7.55	7.48	7.31
DIPSO								7.0-8.2	-	7.60	7.35
MOBS								6.9-8.3	-	7.60	-
TAPSO								7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA								7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO								7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO								7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA								7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS								7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE								7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE								7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE								7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS								7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS								7.7-9.1	8.31	8.40	8.90*
AMPD								7.8-9.7	-	8.80	-
TABS								8.2-9.6	-	8.90	-
AMPSO								8.3-9.7	-	9.00	9.10
CHES								8.6-10.0	-	9.30*	9.80*
CAPSO								8.9-10.3	-	9.60	9.43

Elektromigrační metody - vývoj

1936 - Arne Wilhelm Kaurin Tiselius - první elektroforetická separace proteinů krevního séra - Nobelova cena za chemii (1948)

1967 - Stellan Hjertén - sestrojil první plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu (kapilára s průměrem 1-3 mm)

1981 - James W. Jorgenson a Klynn D. Lukacs - první elektroforetická separace různých iontů (aminokyselin, dipeptidů, aminů) zónovou elektroforézou ve velmi tenké kapiláře o průměru 75 μm



A. Tiselius



S. Hjertén



J. Jorgenson



K. Lukacs

XLV. ELECTROPHORESIS OF SERUM GLOBULIN. I

By ARNE TISELIUS

From the Institute of Physical Chemistry, University of Upsala

(Received 2 December 1936)

DESPITE the very large amount of work done on serum globulin, comparatively few investigations have dealt with the electrophoretic properties of this important protein, although, as has been shown in several papers from this and other laboratories, migration data are of very great importance for characterization of proteins and biocolloids in general.

As far as the author has been able to find, the only quantitative investigation of the pH -mobility relationship for this protein so far has been made by Reiner [1927], using a U-tube apparatus with two stopcocks in each limb, by which arrangement samples could be taken out for analytical determination of the migration. A series of mobilities in buffer solutions of pH from 3.6 to 9.5 were obtained. The isoelectric point was at pH 5.4. In a previous work the author [1930] has measured the electrophoresis of serum "pseudo-" and "eu-globulin" as well as unfractionated globulin, but only at one single pH value of 7.22. All three preparations showed heterogeneous migration, and the mobilities were different.

In connexion with some research on proteins of immune sera, the author needed data on the mobility of normal serum globulin and its fractions. Therefore a new investigation was made, which gave results deviating in certain points from those obtained by Reiner.

The procedure for measurement of electrophoresis used in this work has been described in earlier papers [Tiselius, 1930; Pedersen, 1933]. The movement of the boundaries in the U tube is followed by ultraviolet photography, a method



Kapilární zónová elektroforéza

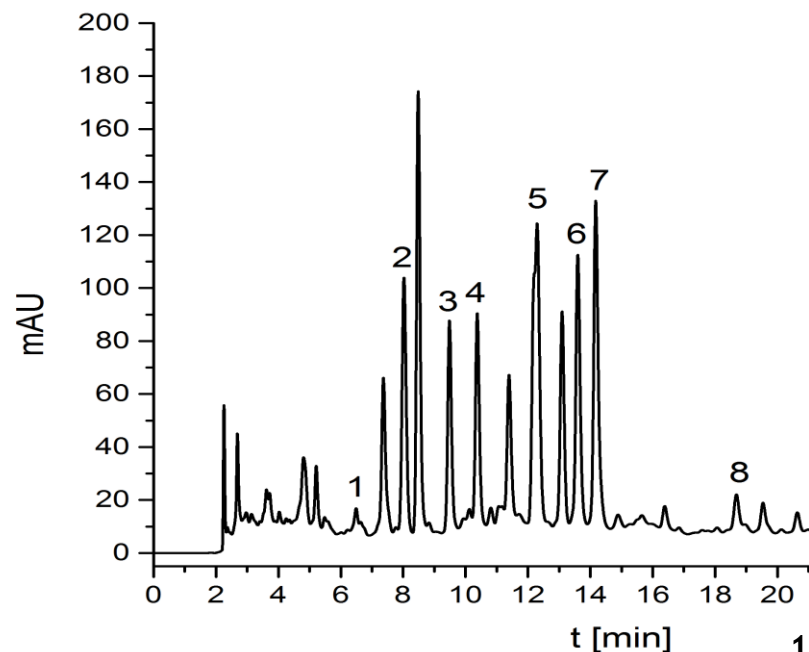
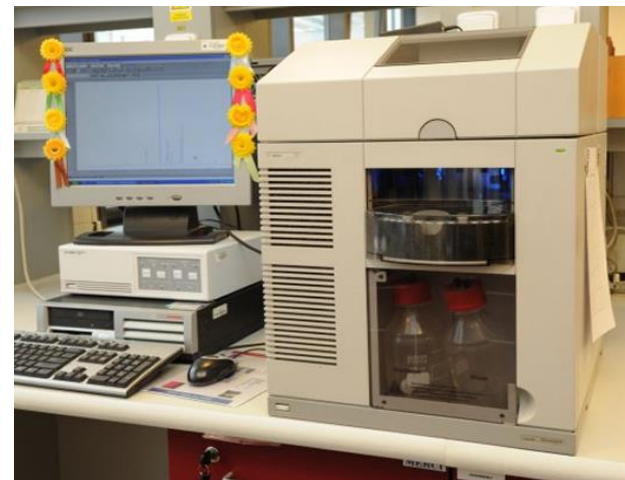
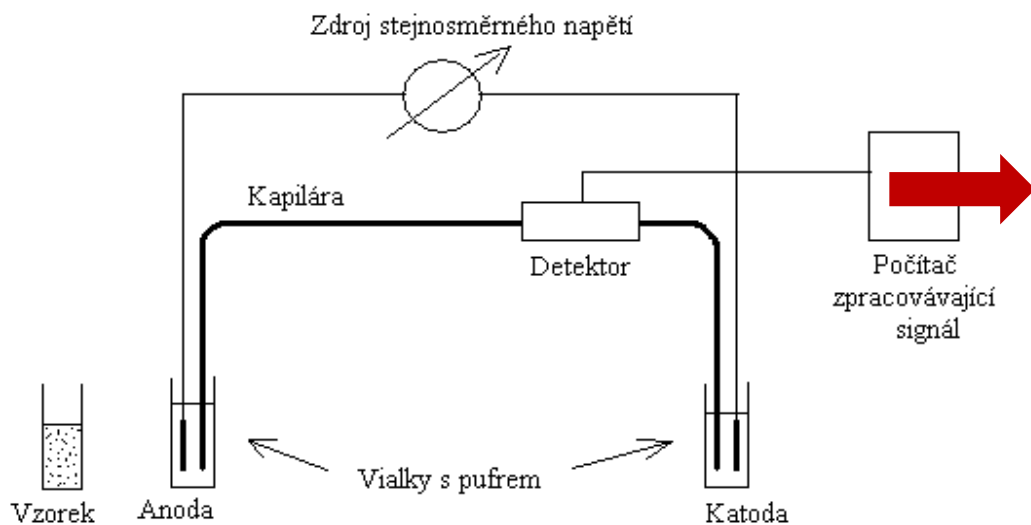
= moving boundary electrophoresis = technika pohyblivého rozhraní

- separace analytů v prostředí homogenního **jednoho** základního elektrolytu (*background electrolyte* - BGE) o konstantním složení

- separace probíhá za **konstantního napětí**

Instrumentace:

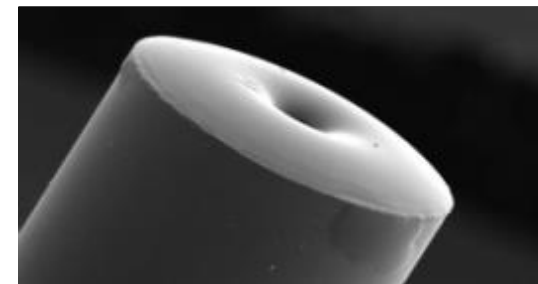
- ✓ separační kapilára
- ✓ zdroj separačního napětí
- ✓ vialky s pufrem, v nichž jsou elektrody a konce kapilár
- ✓ detektor



Elektroosmotický tok

Separční kapilára

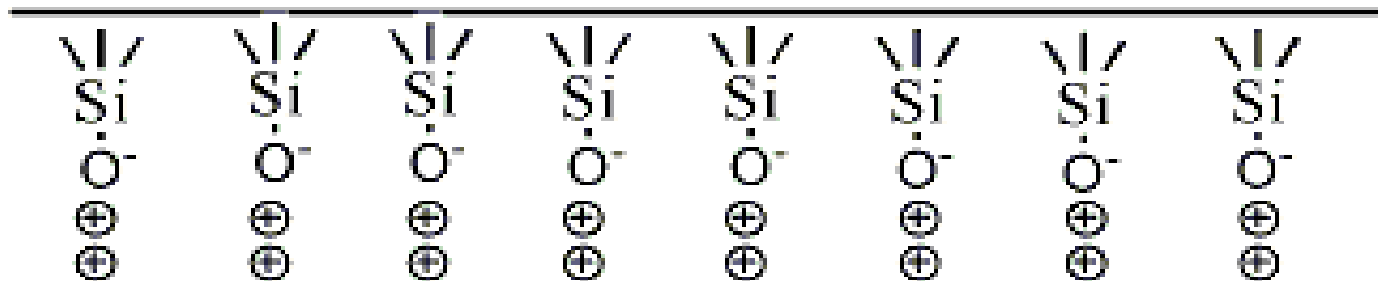
- vyrobená z taveného křemene (fused-silica capillary)
- vnitřní průměr 10 - 200 μm , vnější průměr 350 - 400 μm
- délka dle požadavků - 10 - 100 cm
- vnější vrstva polyimidu (15 μm) - chrání před mechanickým poškozením
- odstranění části polyimidu = detekční okénko pro UV-Vis detekci



Elektroosmotický tok

= *electroosmotic flow* - **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:

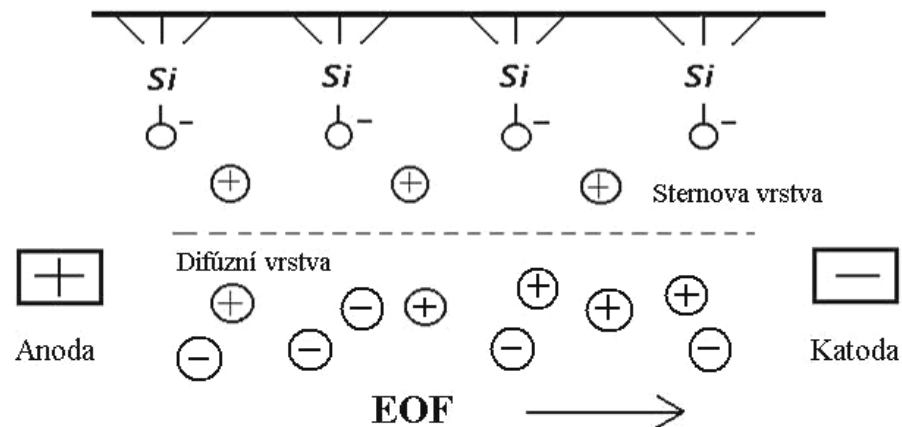
Sternova (Helmholtzova)

= částečně fixovaná ke stěně kapiláry

Gouy -Chapmanova

= difúzní, volná výměna s ostatními ionty roztoku

**Na rozhraní obou vrstev je vytvořen
elektrický zeta potenciál ζ**



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



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

Elektroosmotický tok

Elektroforetická mobilita EOF μ_{EOF}

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta * \varepsilon}{\eta}$$

ζ - elektrokinetický potenciál

ε - permitivita roztoku

η - viskozita roztoku

$$v_{EOF} = E * \mu_{EOF}$$

Experimentální zjištění EOF - pomocí neutrálního markeru - migrační čas ovlivňuje pouze elektroosmóza

- neutrální marker - mesityloxid, aceton, dimethylformamid, voda

Změna elektroosmotického toku

✓ změnou pH

- nízký EOF při kyselém pH

✓ změnou iontové síly pufru

- rostoucí iontová síla snižuje potenciál a tím i EOF **vs.** generace tepla

✓ modifikací vnitřního povrchu kapiláry

- potlačení nebo obrácení náboje pokrytím stěny kapiláry, tzv. coating

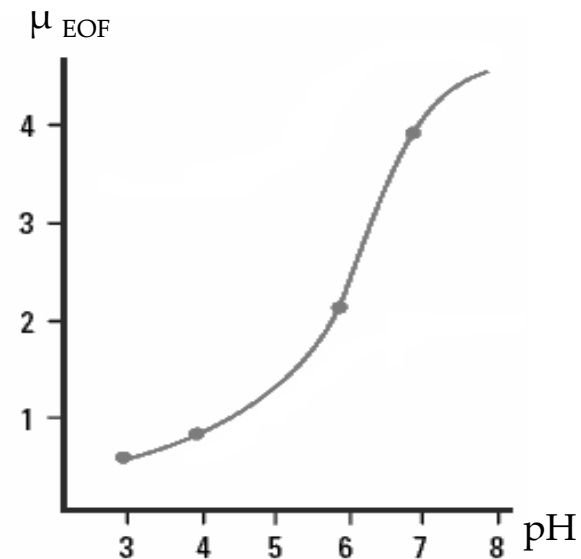
- permanentní modifikace - kovalentní vazba např. s polymerem

- dynamická modifikace - přidavek polymeru do pufru

✓ změnou elektrického pole

- nízké napětí, nízká selektivita **vs.** vysoké napětí, vyšší generace tepla

✓ změnou teploty - vyšší teplota, změna viskozity, vyšší EOF



Účinnost elektroforetické separace

Počet teoretických pater N = měřítko účinnosti

$$N = 5,54 * (t_R / w_{1/2})^2 = 16 * (t_R / w)^2$$

t_r - migrační čas píku

$w_{1/2}$ - šířka píku v polovině jeho výšky

w - šířka píku při jeho základně

Ekvivalent teoretického patra H = počet teoretických pater vztažený

$$H = l / N = \sigma^2 / l \quad \text{na délku kapiláry}$$

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



píky mají tvar Gaussovy křivky

σ = vzdálenost, kterou prodifunduje průměrný ion za dobu t

- vztah mezi difúzním koeficientem D a tzv. rozptylem σ^2 udává

Einstein-Smoluchowského rovnice

$$\sigma^2 = 2 * D * t$$

- účinnost separace je v omezeném rozsahu přímo úměrná vloženému napětí

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

μ - elektroforetická mobilita iontu

U - vložené separační napětí

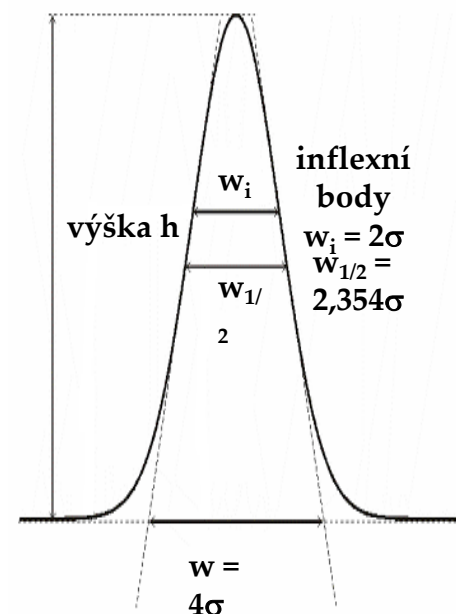
vyšší napětí



větší generované teplo



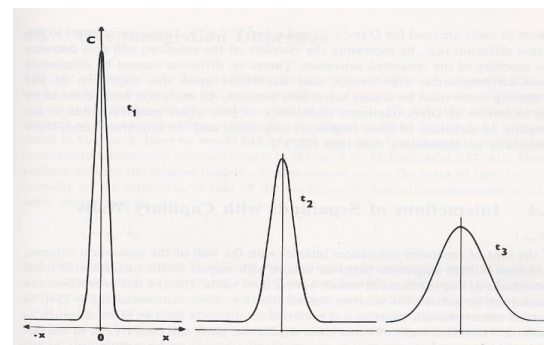
pokles účinnosti separace



Účinnost elektroforetické separace

V reálném experimentu však rozptyl σ^2 ovlivňuje řada vlivů:


- ✓ difúze
 - ✓ elektromigrační disperze
 - ✓ sorpce
 - ✓ Jouleovo teplo
- nástřik, detekce ... atd.




Difúze

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

Sorpce

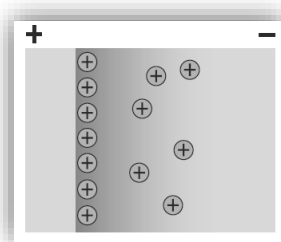
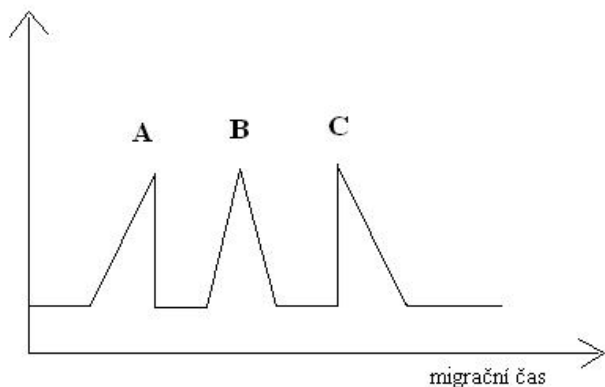
- interakce analytů s nábojem na stěně kapiláry
- vede k asymetrii píků, v horším případě ke ztrátě analytu  coating

Jouleovo teplo

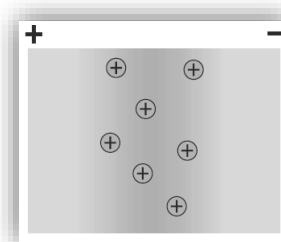
- způsobené průchodem elektrického proudu kapilárou  chlazení
- Ohmova závislost proudu na napětí - volba vhodného separačního napětí

Elektrodisperze

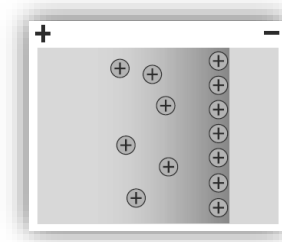
- rozdílná pohyblivost analytu a spoluiontu stejného náboje z elektrolytu
- minimalizace vlivu správnou volbou elektrolytu s co nejpodobnější pohyblivostí



A - frontování



B - symetrie



C - chvostování

Instrumentace

- 1988 - první komerční přístroj firmy Beckman Instruments



Agilent Technologies



Beckman Coulter



Prince Technologies



Recman

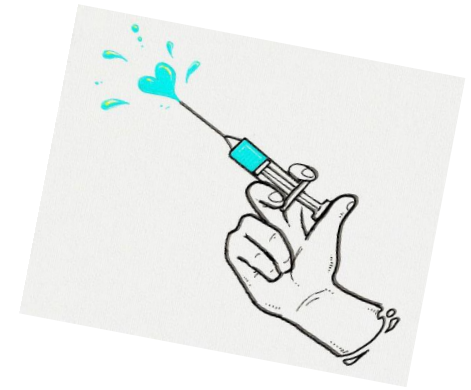


Villa Labeco

Instrumentace

Dávkování v CZE

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



Hydrodynamické dávkování

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

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

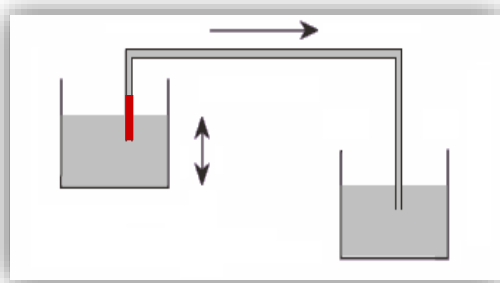
ΔP - tlakový spád na kapiláře

d - vnitřní průměr kapiláry

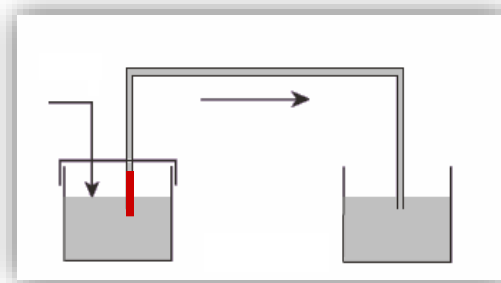
t_d - doba nástřiku

η - viskozita elektrolytu

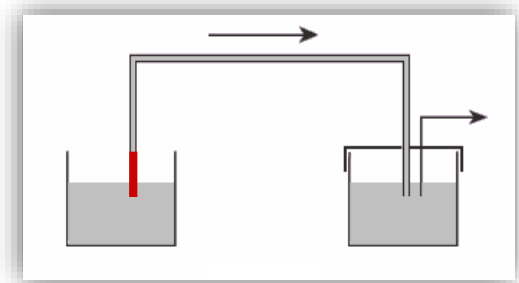
l_t - celková délka kapiláry



rozdíl hladin



přtlak



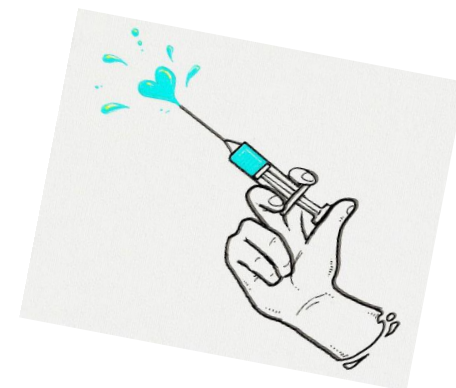
podtlak

Instrumentace

Dávkování v CZE

Elektrokinetické dávkování

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



Koncentrační poměr analytů 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

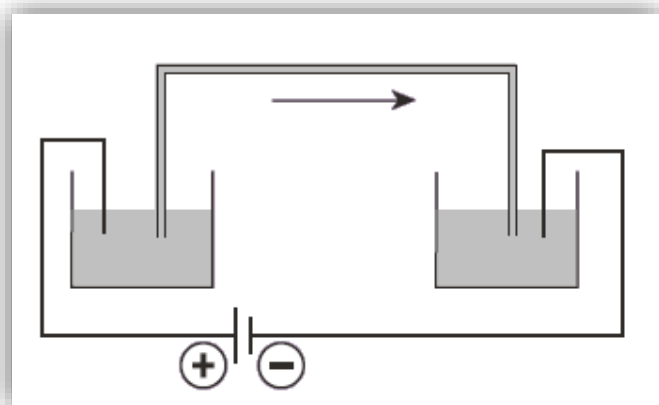
l_s - efektivní délka kapiláry

t_d - doba, po kterou bylo aplikováno napětí

t_0 - migrační čas EOF

U_d - napětí při dávkování

U_s - separační napětí



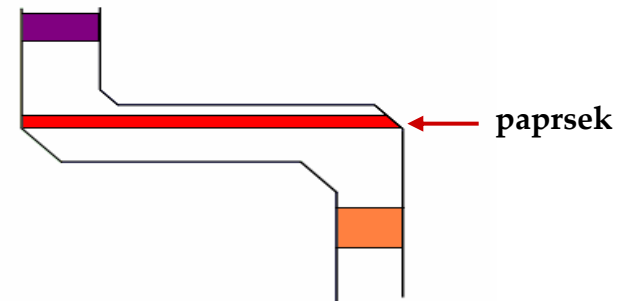
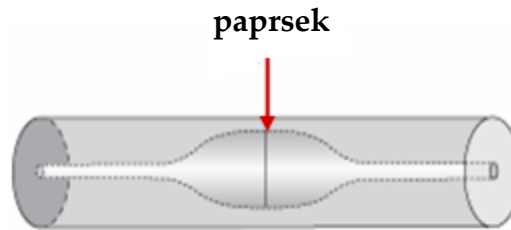
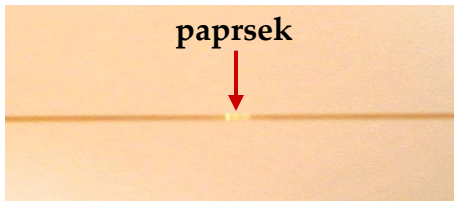
Instrumentace

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



Elektroferogram a jeho vyhodnocení

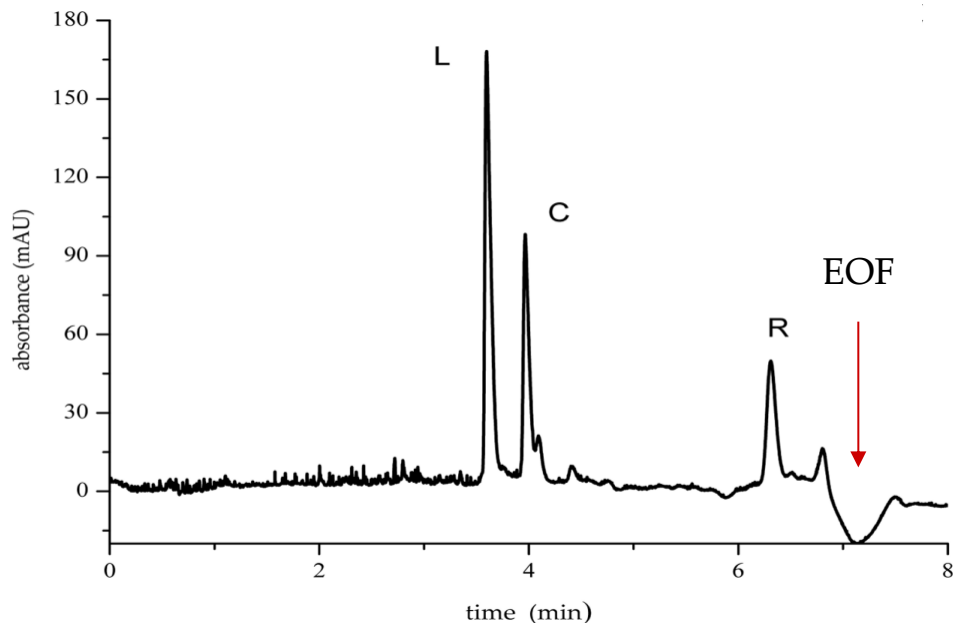
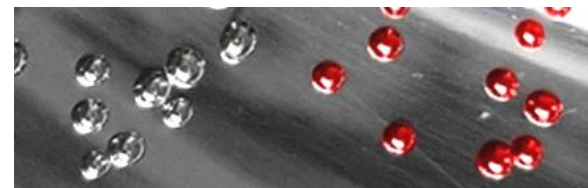
Elektroferogram = grafický záznam separace po zpracování signálu detektoru

- další uváděná označení *elektroforegram*, *elektroforetogram*, *elektroforeogram*...

Výpočet elektroforetické pohyblivosti z migračního času analytu

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

l_t - 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

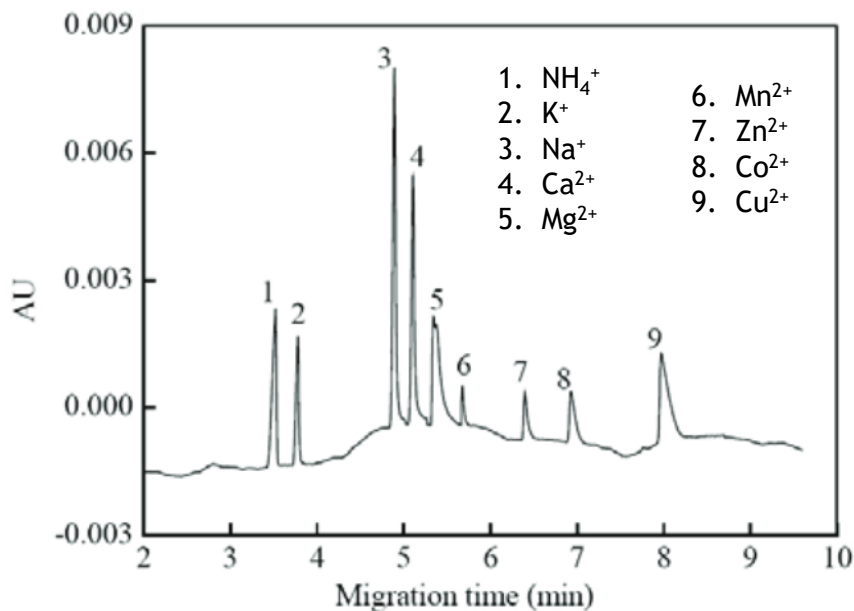
$$R_{L,C} = \frac{2 * (t_C - t_L)}{w_L + w_C}$$

t_C , t_L - migrační časy píků
 w_C , w_L - šířka píků u základny

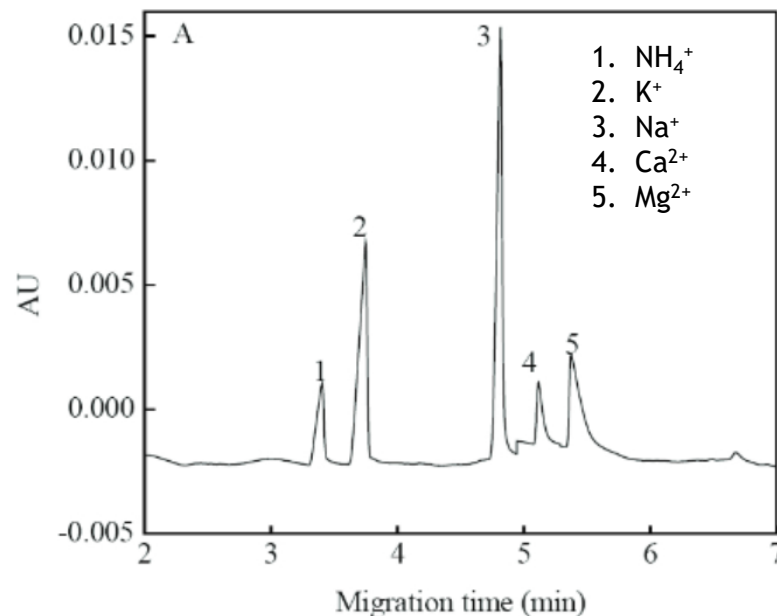
Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace anorganických kationtů

- fused silica capillary, 75 μm ID, 57 cm total / 50 cm effective length
- separation voltage 22 kV, injection 0.5 kV (6 sec), UV detection at 214 nm
- new capillary treatment = 0.1 M NaOH 5 min, Milli-Q water 5 min, separation buffer 10 min
- BGE: 12 mM imidazole, 5 mM malic acid, 1 mM 18-crown-6-ether, 20% D_2O ,
- pH 4.25 adjusted using acetic acid



Separace standardů



Analýza kokosového mléka

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

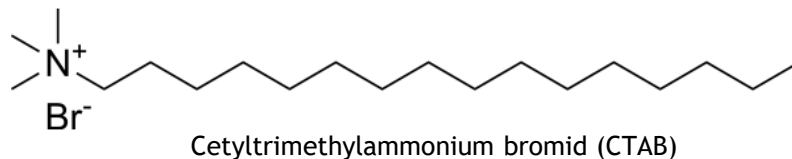
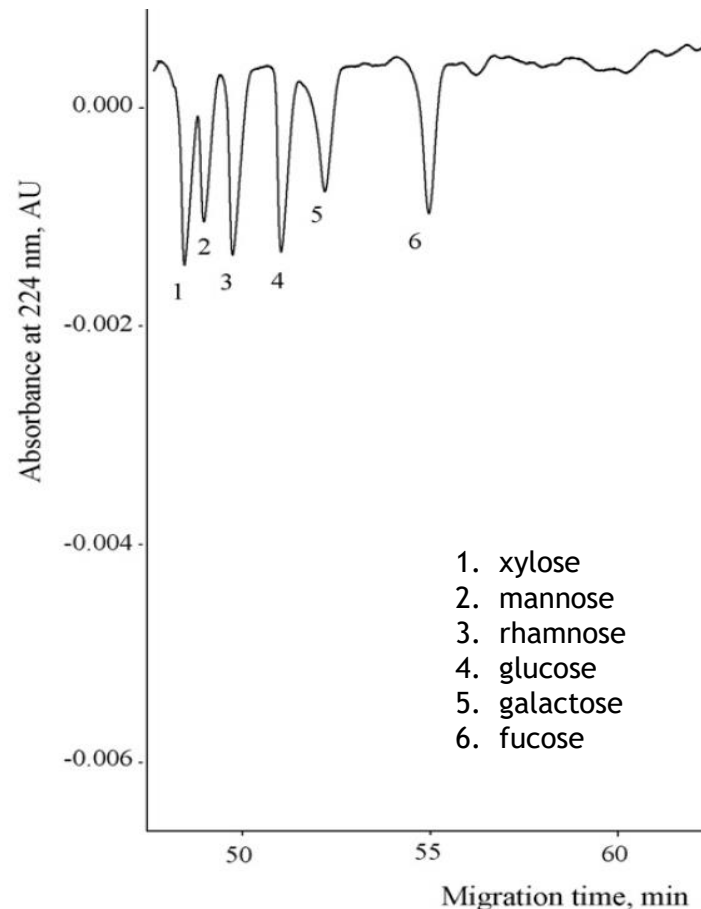
Separace monosacharidů po kyselé hydrolyze polysacharidů z mořských mikroorganismů

- fused silica capillary 75 μm ID, 105/115 cm
- voltage **-18 kV**, injection pressure 50 mbar for 1 s
- detection at 224 nm
- BGE: 8 mM dimethoxyphenol, 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

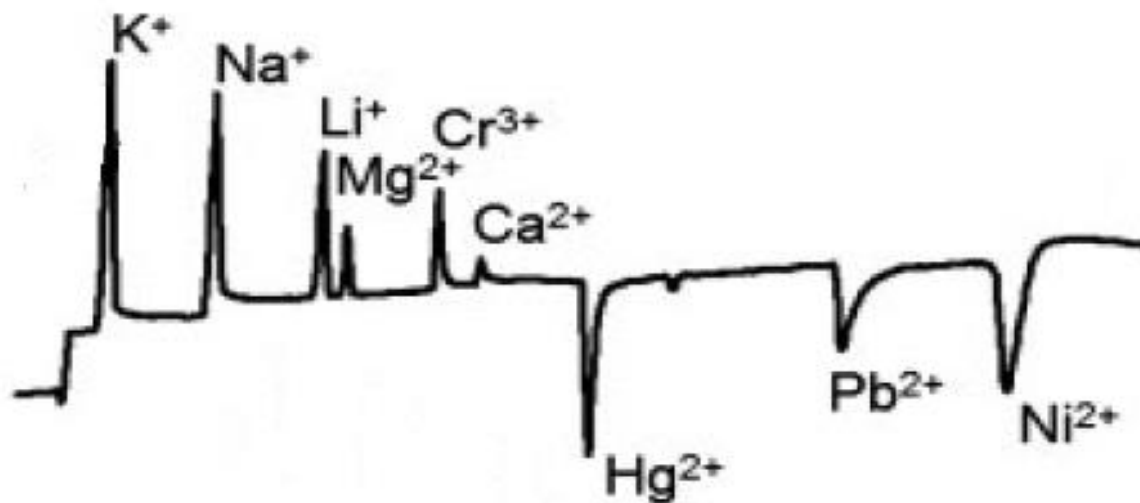
- vznikají při ní negativní píky
- má nižší citlivost než přímá detekce
- využívá se pro látky, které neobsahují ve své struktuře vhodné chromofory a používá se pro ní běžný UV detektor a silně absorbující základní elektrolyty



Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace iontů těžkých kovů v odpadních vodách

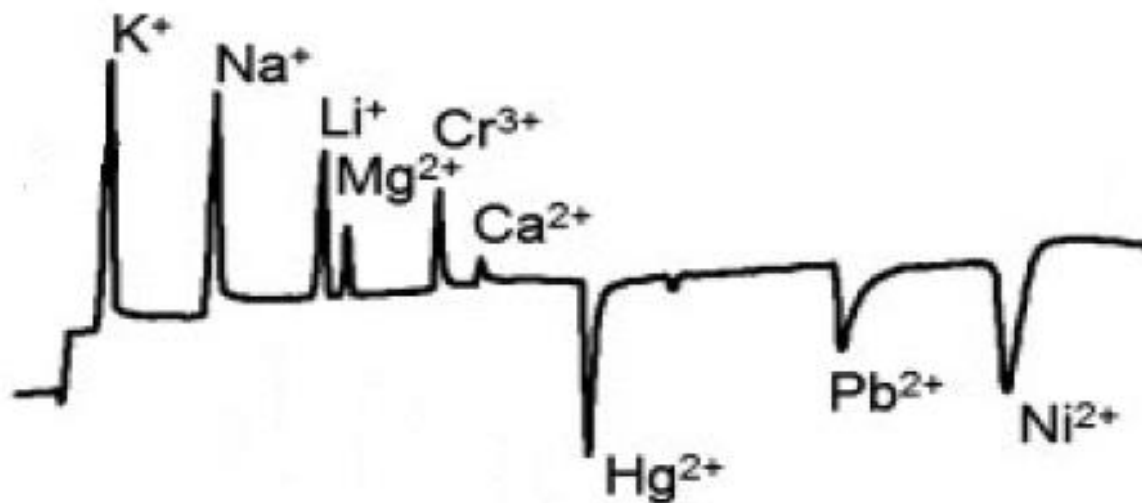
- fused silica capillary 50 μm ID, 40/48 cm
- BGE: 10 mM His and 4 mM tartrate, pH 5.5
- electrokinetic injection 3 kV/5 sec
- separation voltage +15 kV
- concentration of analytes: Cr^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} at 100 mg/L, Hg^{2+} at 400 mg/L



Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace iontů těžkých kovů v odpadních vodách

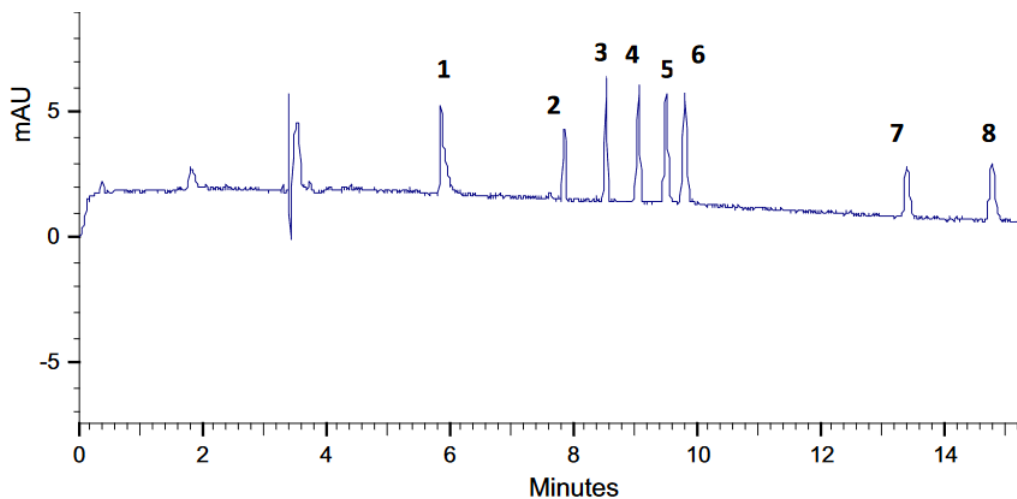
- fused silica capillary 50 μm ID, 40/48 cm
- BGE: 10 mM His and 4 mM tartrate, pH 5.5
- electrokinetic injection 3 kV/5 sec
- separation voltage +15 kV
- **contactless conductivity detector**
- concentration of analytes: Cr^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} at 100 mg/L, Hg^{2+} at 400 mg/L



Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

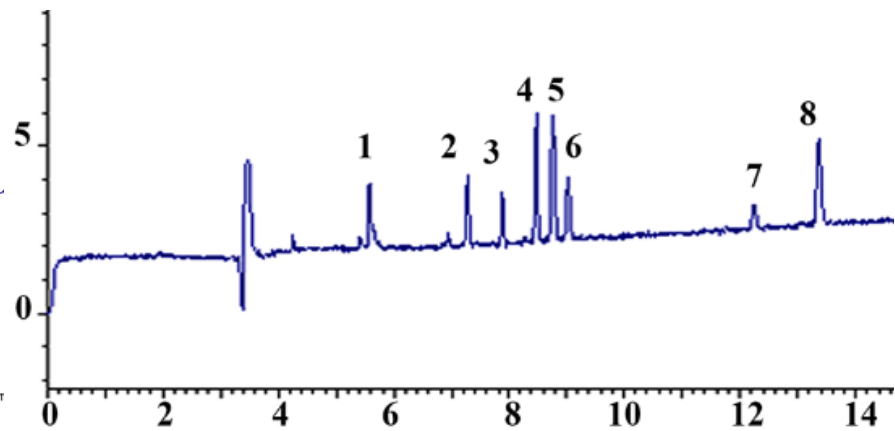
Separace polyfenolických látek ve vínech

- fused silica capillary 50 μm ID, 55 cm total / 45 cm effective length
- BGE: 40 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ adjusted to pH 8.9 with 0.5 M H_3BO_3
- pressure injection 10 psi/5 sec
- separation voltage +26 kV
- detection at 215 nm



Separace standardů

1. catechin
2. syringic acid
3. apigenin
4. myricetin



Analýza červeného vína

Cabernet Sauvignon

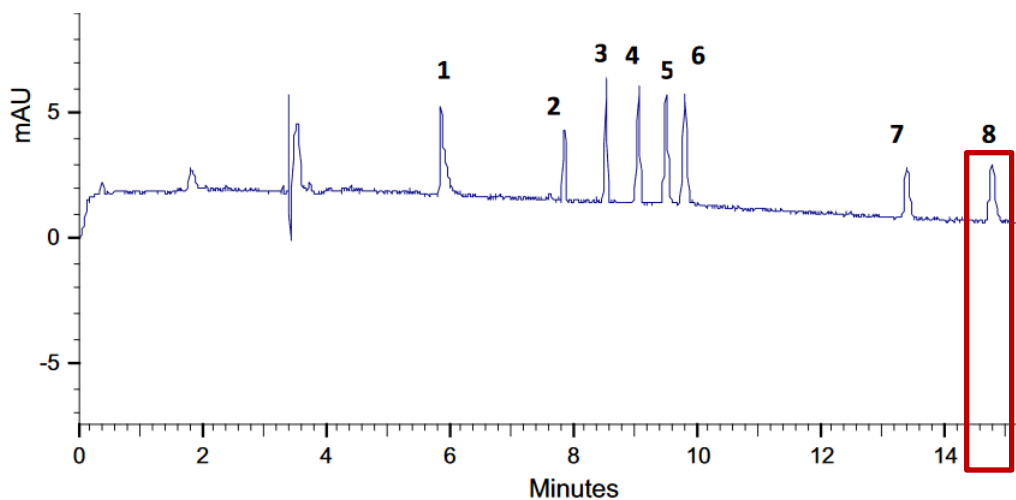
California

5. luteolin
6. quercetin
7. caffeic acid
8. gallic acid

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

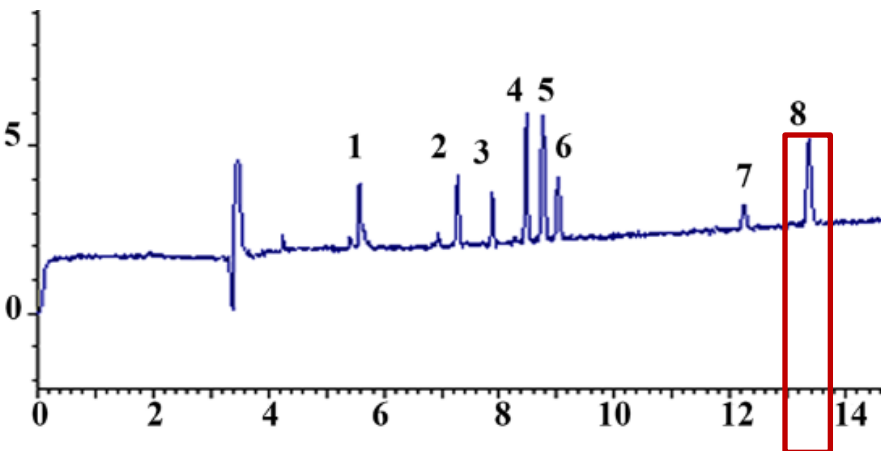
Separace polyfenolických látek ve vínech

- fused silica capillary 50 μm ID, 55 cm total / 45 cm effective length
- BGE: 40 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ adjusted to pH 8.9 with 0.5 M H_3BO_3
- pressure injection 10 psi/5 sec
- separation voltage +26 kV
- detection at 215 nm



Separace standardů

1. catechin
2. syringic acid
3. apigenin
4. myricetin



Analýza červeného vína

Cabernet Sauvignon
California

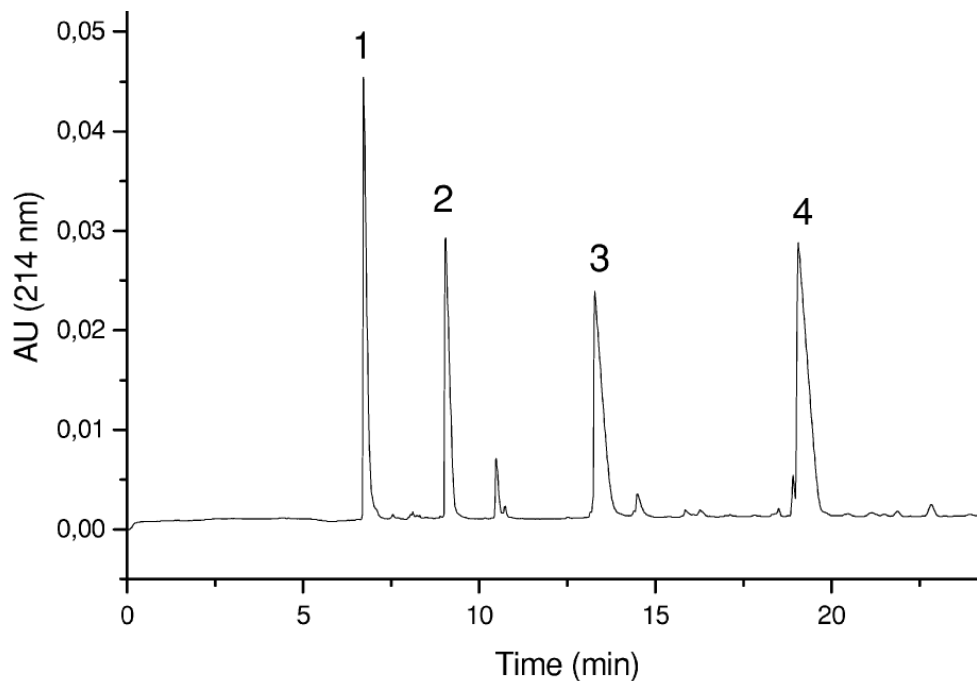
5. luteolin
6. quercetin
7. caffeic acid
8. gallic acid

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

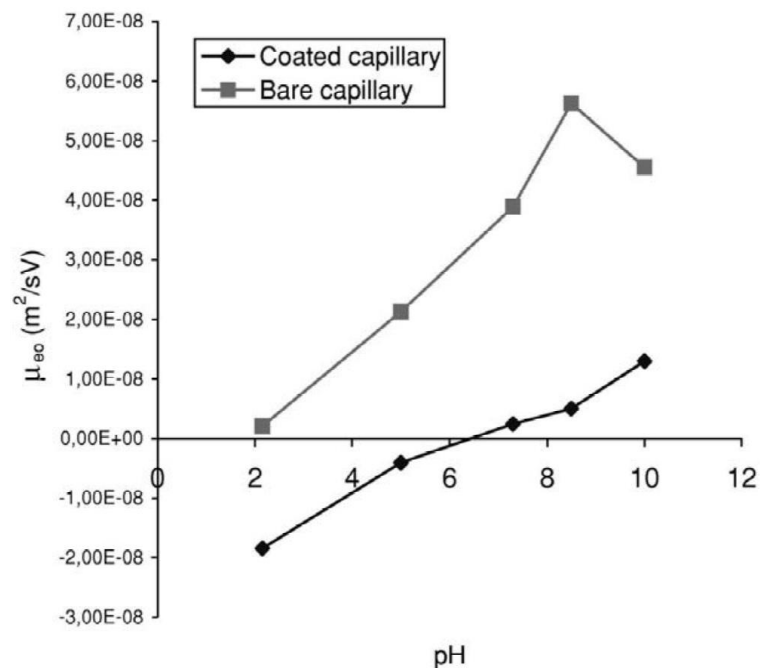
Separace proteinů

coating = navázání polymeru na vnitřní stěnu křemenné kapiláry a ovlivnění EOF

- DMA-EpyM coated capillary (*N,N*-dimethylacrylamide-ethylpyrrolidine methacrylate)
- 40/47 cm effective/total length, 50 μm ID, injection 3 kV/5 sec
- BGE - 100 mM sodium acetate pH 5, voltage + 25kV



1, lysozyme; 2, cytochrome c; 3, ribonuclease A; 4, α -chymotrypsinogen

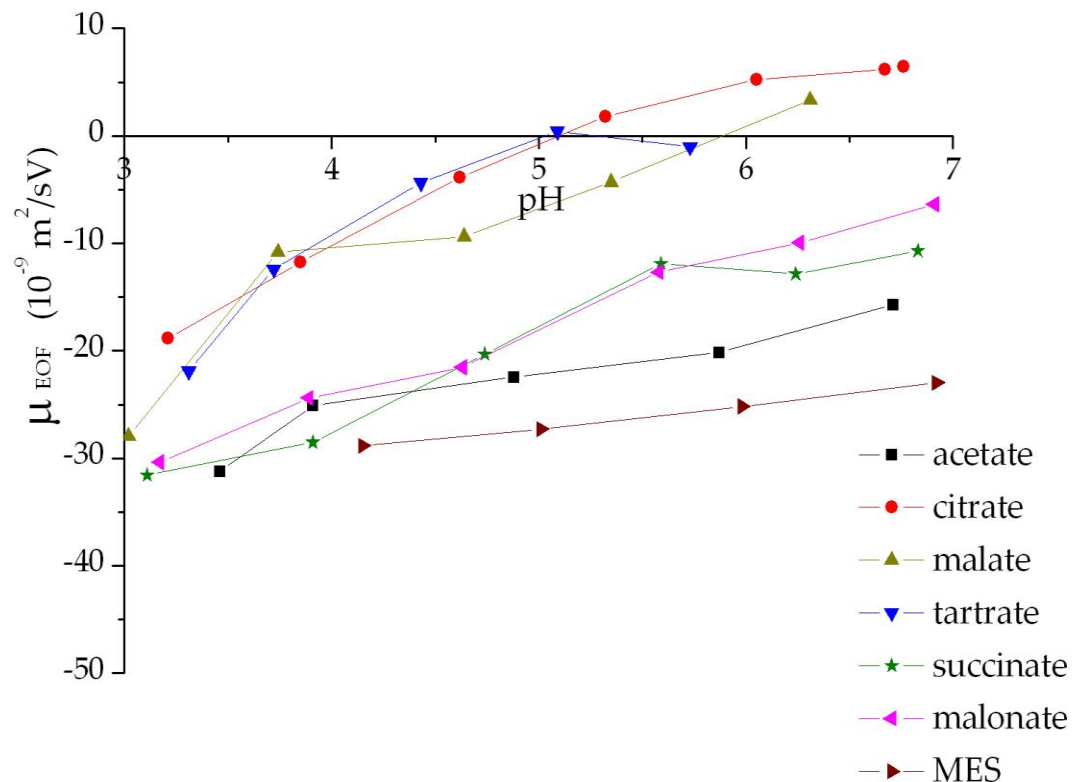
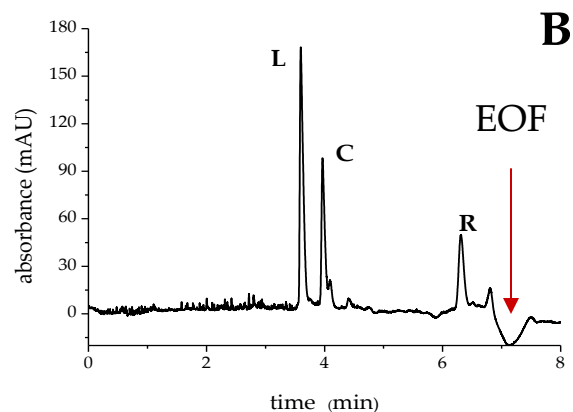
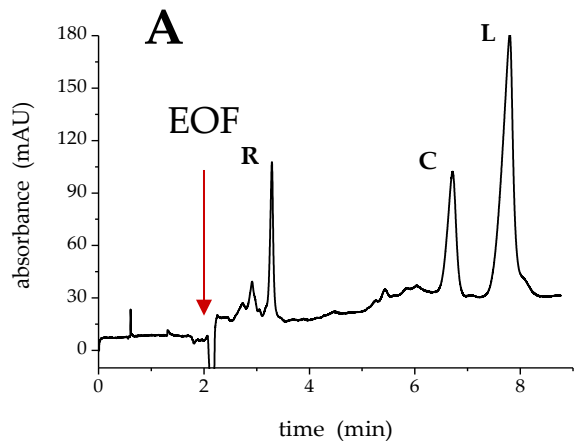


Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Separace proteinů

Vliv interakce složky základního elektrolytu s vnitřní stěnou kapiláry - změna pořadí separace analytů

PEI - polyethyleneimine coating



A - acetát pH 5.5

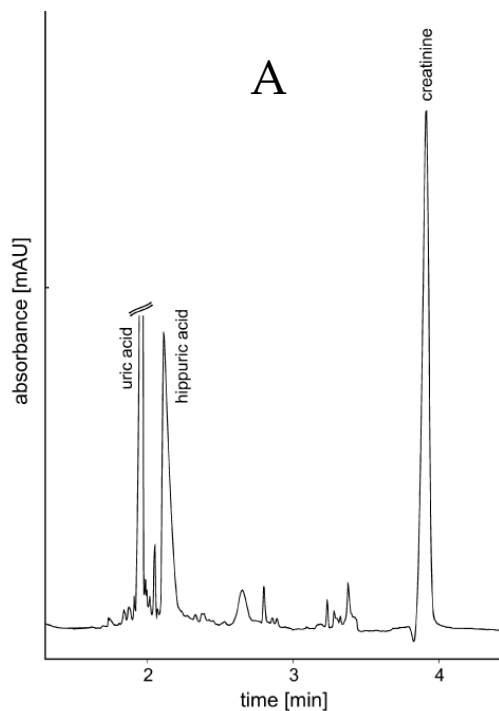
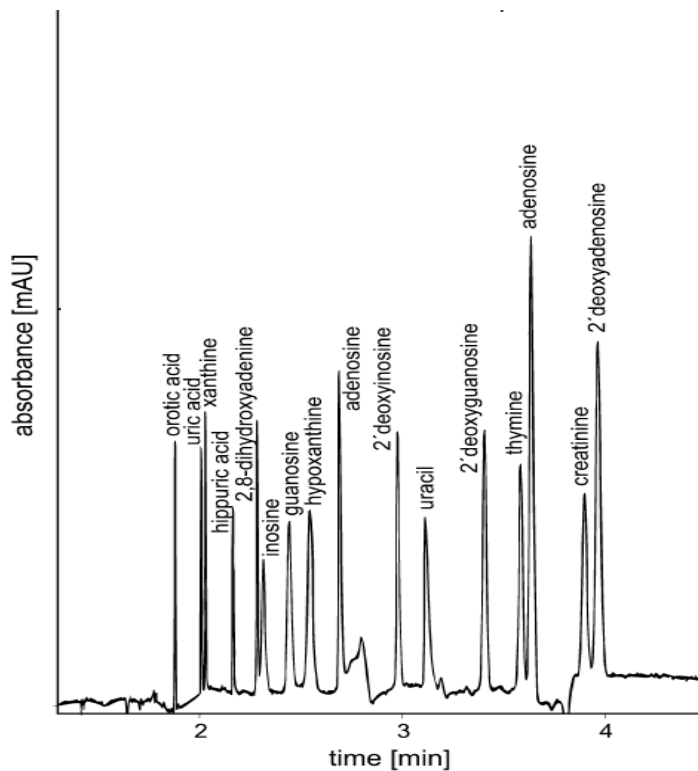
B - citrát pH 5.5

L - lysozym, C - cytochrom c, R - ribonukleáza

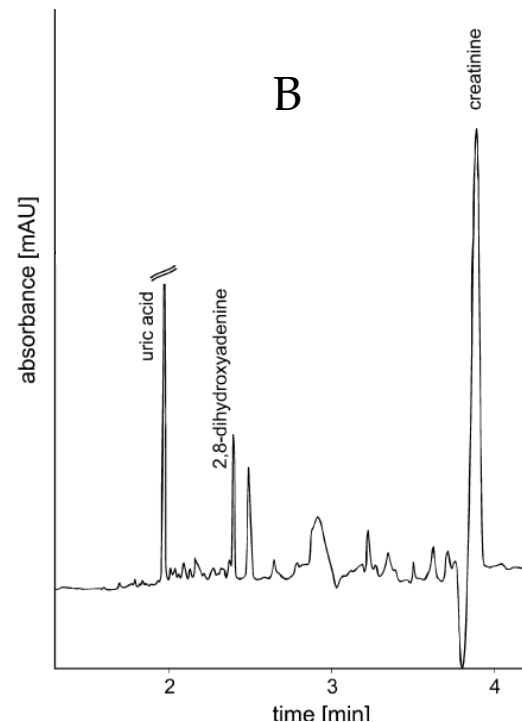
Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

Klinická chemie - diagnostika metabolických poruch

- deficit metabolických enzymů vede k hromadění purinových a/nebo pyrimidinových markerů v moči
- uncoated fused-silica capillary 40 / 47 cm, 50 μ m I.D.
- separation buffer - 45mM borate, 55 mM tricine, 10 mM tartrate, 1mM CTAB, 0.44% TBAH, Ampd (pH 8.6)



A - zdravý člověk



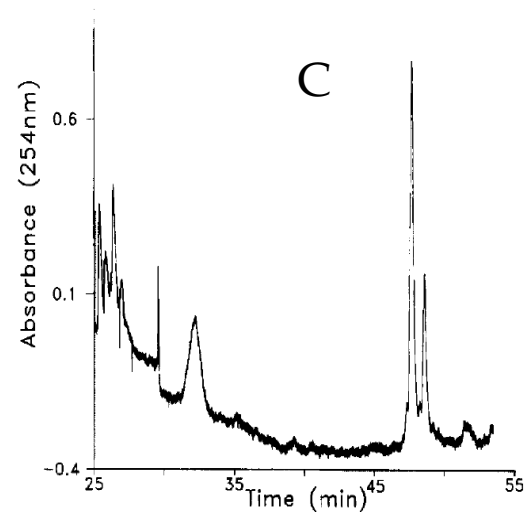
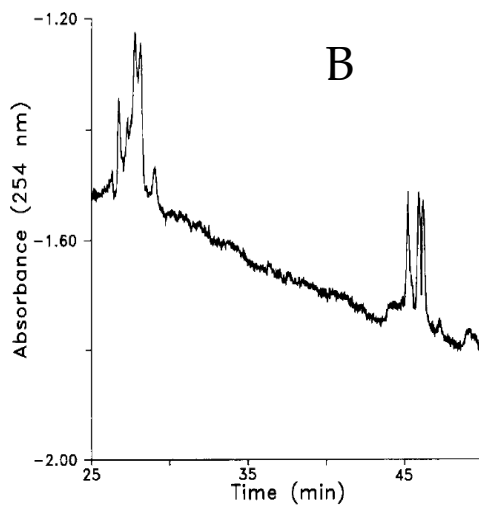
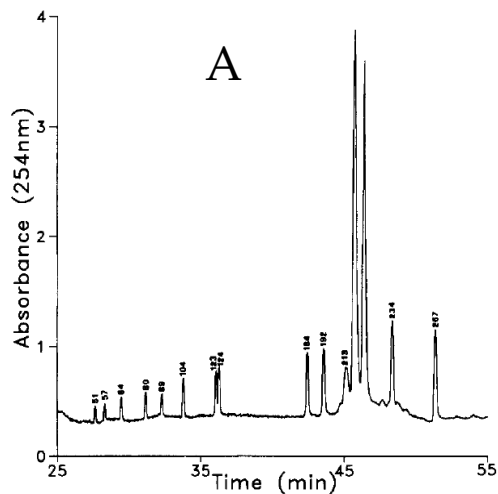
B - deficit adenin fosforibosyl transferázy

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 pík nebo 2 píky v poměru 1:1 - normální genotyp
 - 3 píky v poměru 1:1:1 (trisomie 21 .chromozomu) , 2 píky 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



A - zdravý člověk

B - trisomie 21.chromozomu - poměr píků 1:1:1

C - genotyp s vrozenou vadou - poměr píků 2:1

Vybrané aplikace kapilární zónové elektroforézy

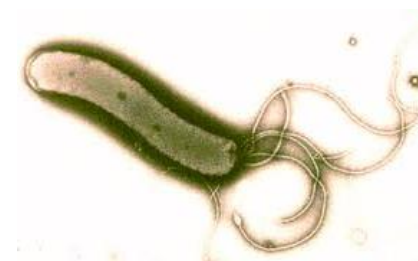
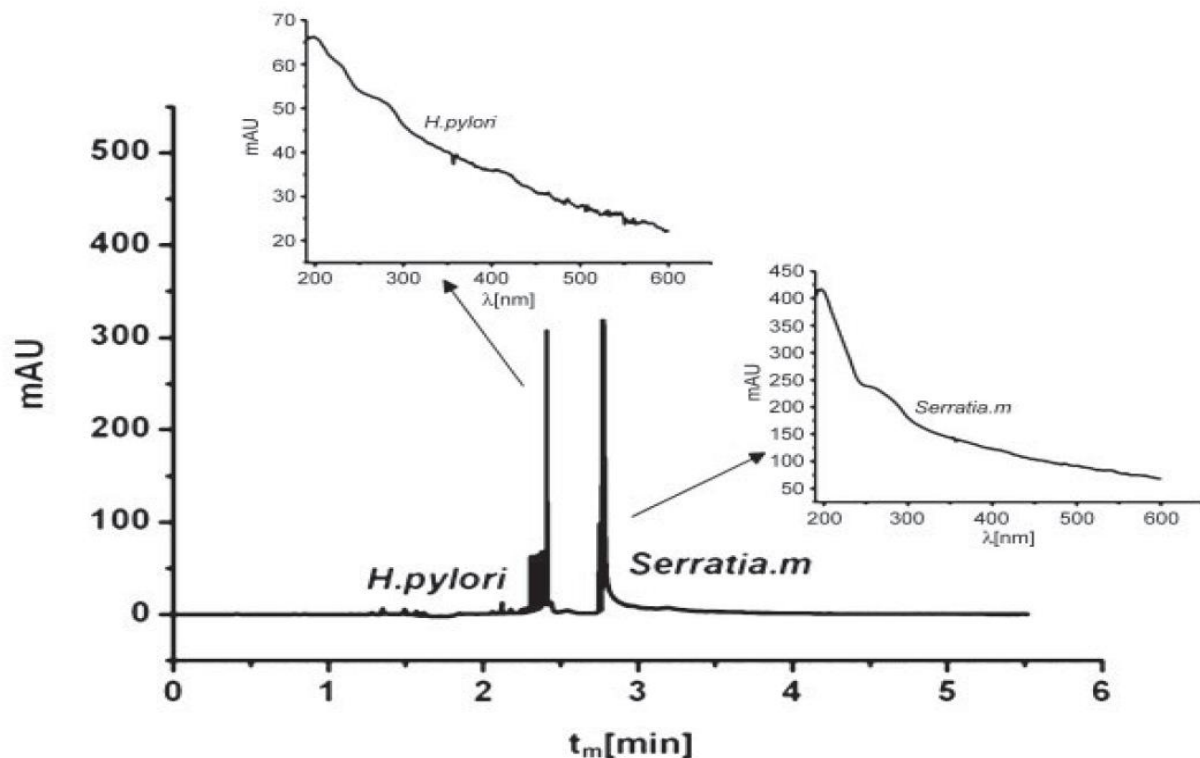
Separace mikroorganismů

buněčné stěny a membrány mají rozdílný obsah proteinů, lipidů a lipopolysacharidů → různý náboj

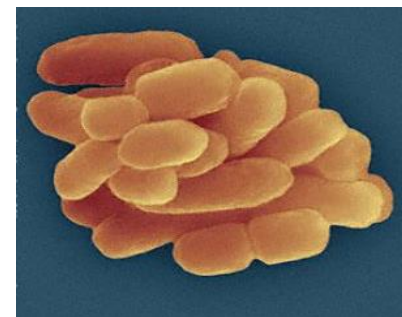
- fused silica ($L_{\text{eff}} = 25 \text{ cm}$, $L_{\text{tot}} = 33.5 \text{ cm}$)

- buffer was 0.0125% PEO dissolved in MES (2[-(N-morpholino)ethanesulfonic acid]), pH = 6.1

- detection at 214 nm, separation voltage +20 kV, pressure injection 200 mbar /s



Helicobacter pylori



Serratia marcescens

Souhrn aplikací kapilární zónové elektroforézy

✓ kontrola a čistota vzorků

- syntetické či přírodní vzorky - léčiva, barviva apod.

✓ analýza komplexních směsí

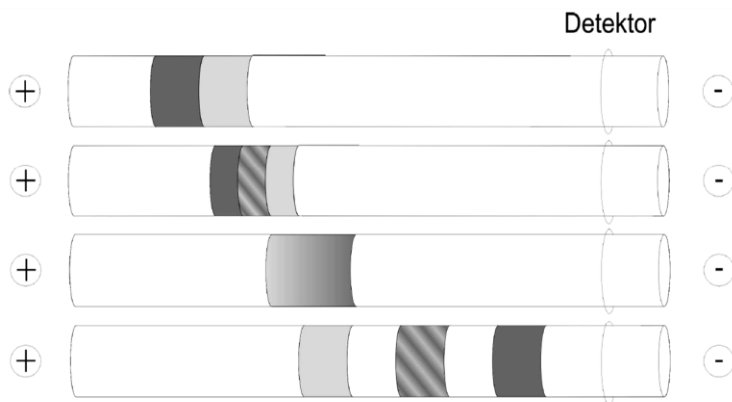
- analýza biologických tekutin, tkáňových extraktů, potravin, odpadních vod apod.

✓ sledování chemických přeměn

- studium chemických a enzymatických reakcí, sledování kinetiky reakcí apod.

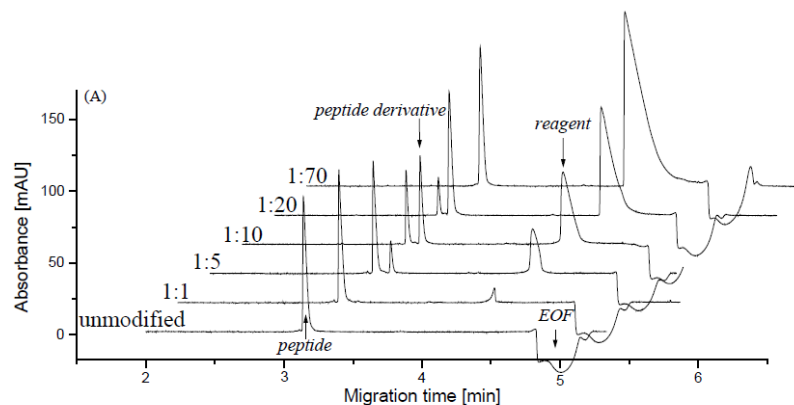
✓ fyzikálně - chemická charakterizace analytů

- stanovení elektroforetické pohyblivosti, efektivních nábojů, disociačních konstant, difúzních koeficientů apod.



EMMA - electrophoretically mediated microanalysis

Glatz Z. et. al., J. Chromatogr B, 814 (2006) 23.



Derivatisation of peptide - OsO_4 , bipy reagent

Šedo O. et. al., Anal Chim Acta, 515 (2004) 261.

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

CZE-MS analýza

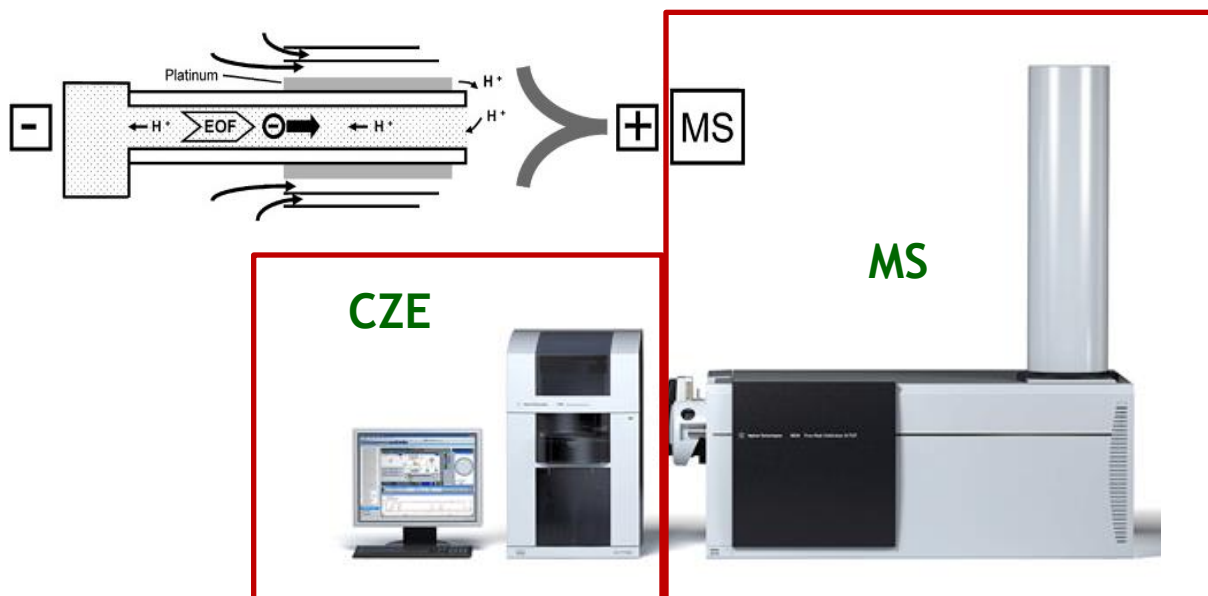
- spojení obou technik zvyšuje potenciál v separaci, identifikaci i kvantifikaci látek



- ✓ látky se stejnou molekulovou hmotností nelze stanovit na MS, ale po předchozí separaci ano
- ✓ a obráceně - komigrující látky v jednom píku CZE lze odlišit na MS spektrech
- ✓ vhodné při analýze komplexních vzorků - vysoká účinnost, rychlost
- ✓ nízká spotřeba vzorků a médií, možnost využití online prekoncentrace



- ✓ potřeba vytvořit uzavřený elektrický okruh s vysokým napětím přes separační kapiláru
- ✓ vhodný výběr elektrolytu - předejít zanášení zdroje a ucpání kapilár, interferencím apod.



Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Iontové zdroje pro CE-MS

ESI - pro polární látky, první použitý zdroj (*Olivares a kol. Anal.Chem. 59 (1987) 1230*)

typické základní elektrolyty - kys. octová, mravenčí, uhličitan amonný + přídavek org. rozpouštědel

APPI/APCI - pro málo polární a nepolární látky, lepší kompatibilita s netěkavými složkami elektrolytu

MALDI - off-line spojení - sběr frakcí z CE, přímé nanášení separace z kapiláry na MALDI destičku apod.



vše záleží na konstrukci iontového zdroje, geometrii a způsobu zapojení

Aplikace CE-MS

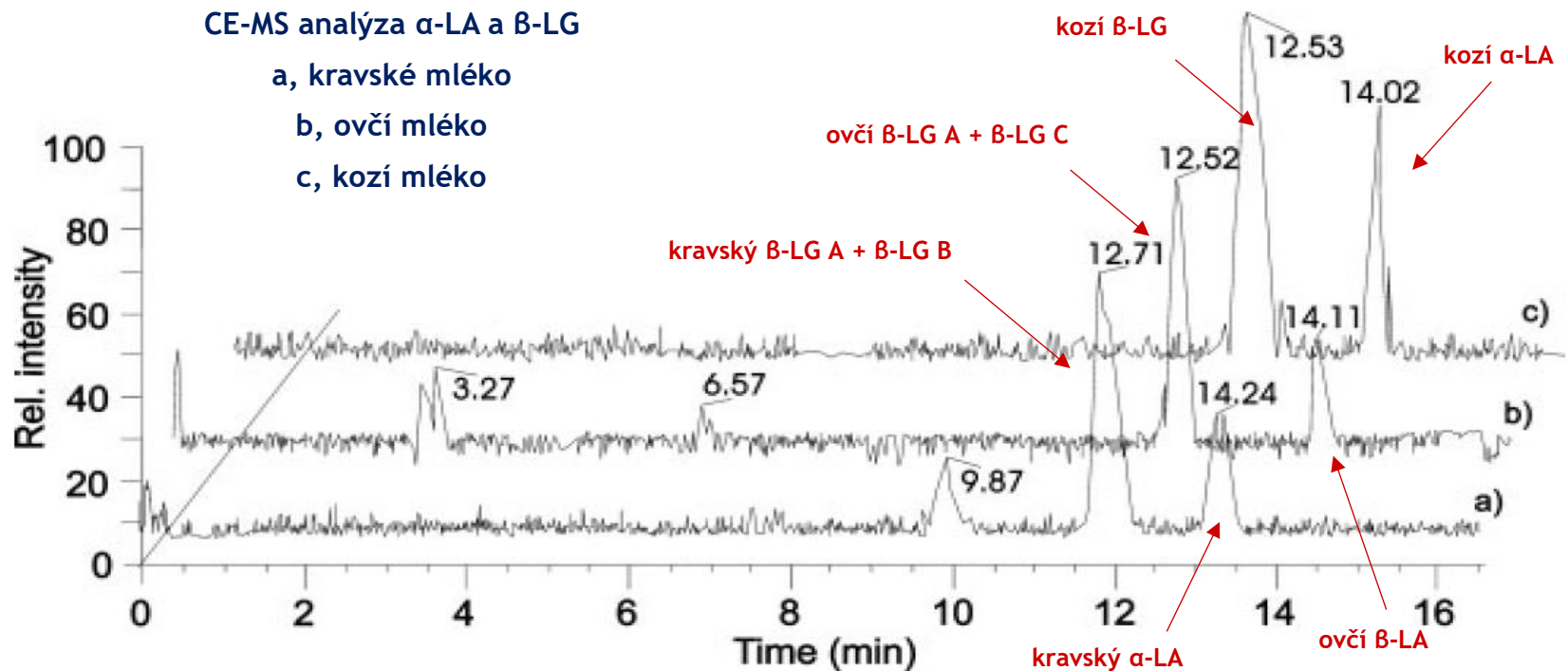
- klinická biochemie a diagnostika - analýza tělních tekutin (komplexní vzorky)
potřeba automatizovaného vyhodnocení MS spekter
- analýza životního prostředí a potravin - hodnocení kvality a kontrola bezpečnosti

Výhody: vysoká rychlost (high-throughput , příznivý poměr cena/výkon (vs. LC/MS))
vysoká selektivita a citlivost
aplikovatelnost jedné metody na více typů vzorků (= tolerance k interferentům)

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Separace β -laktoglobulinů v mléce

- sledování autenticity mléka - „pančování“ ovčího a kozího mléka mlékem kravským
- srovnání výskytu vybraných β -laktoglobulinů ve vzorku
- CE-ESI-MS analýza, BGE - 1M kyselina mravenčí pH=1.9,
- sheath liquid: voda, methanol, k. mravenčí (78:20:2 v/v), 1 μ l/min

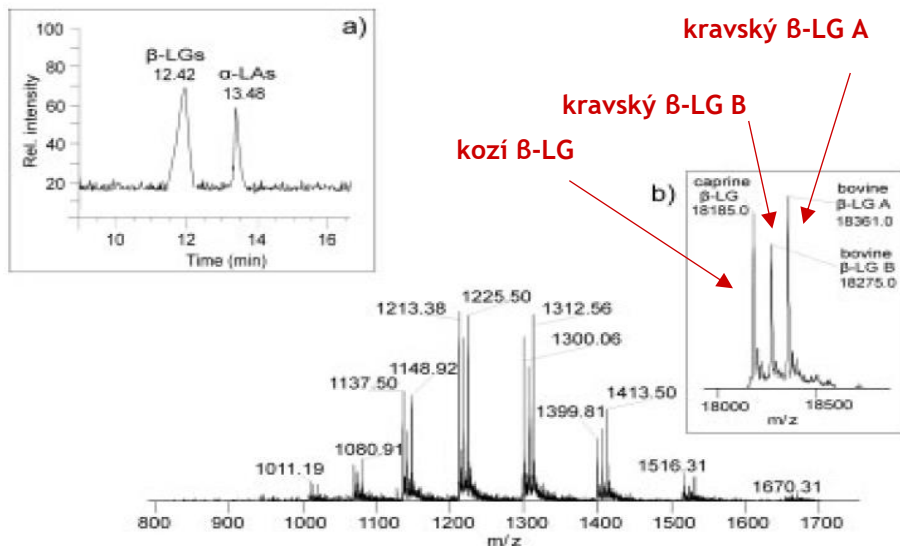


Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

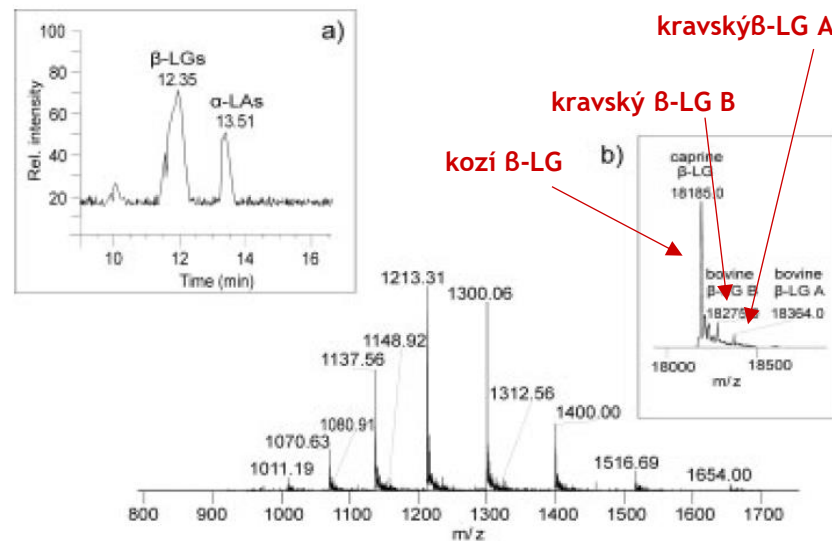


Separace β -laktoglobulinů v mléce

- sledování autenticity mléka - „pančování“ ovčího a koziho mléka mlékem kravským
- srovnání výskytu vybraných β -laktoglobulinů ve vzorku
- CE-ESI-MS analýza, BGE - 1M kyselina mravenčí pH=1.9,
- sheath liquid: voda, methanol, k. mravenčí (78:20:2 v/v), 1 μ l/min



směs mléka kravské:kozí 50:50



směs mléka kravské:kozí 10:90

Elektroforetická analýza na čípech

μ -TAS - micro total analysis system



lab on a chip

- miniaturizace - všechny kroky analýzy v jednom
- vyleptaná soustava kanálků - plastické hmoty, křemen, sklo - obsahují děliče toku kapaliny, ventily apod.
- nejčastěji v oblasti analýzy biologicky významných látek - nukleové kyseliny a proteiny

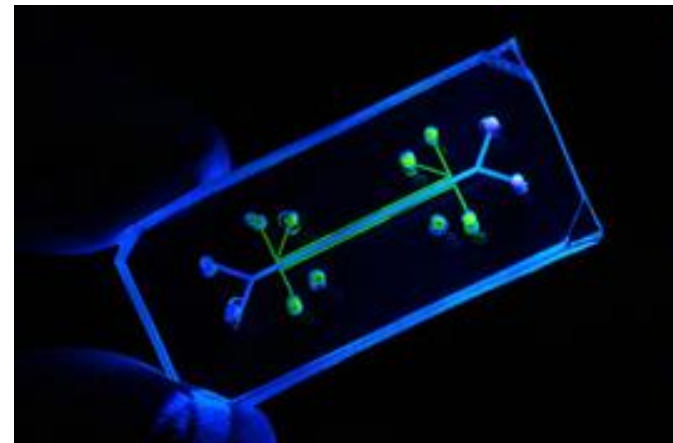
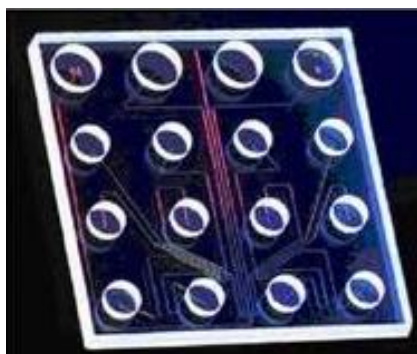
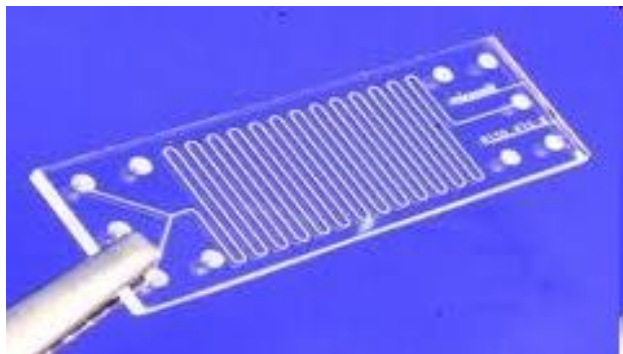
Hlavní cíl = vyvinout jednotku, která by dokázala zachytit požadovanou buňku a analyzovat její genomický, proteomický, metabolomický, glykomický či jiný profil



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



- ✓ problematická výroba - technologie
- ✓ cena



Závěrem...

Kapilární zónová elektroforéza

- ✓ umožňuje separace od iontů po celé biomolekuly až buňky
- ✓ spolu s chromatografickými metodami má největší význam v separačních analýzách
- ✓ má široké uplatnění v rozličných odvětvích vědy a aplikovaného výzkumu
- ✓ díky miniaturizaci a vývoji nových detekčních technik skrývá obrovský budoucí potenciál

Kapilární elektroforéza vs. kapalinová chromatografie

- ✓ z podstaty separace

HPLC - afinita analytu ke stacionární či mobilní fázi

CZE - vliv velikosti a náboje analytu při pohybu v elektrickém poli

- ✓ hlediska reprodukovatelnosti stanovení, náročnosti na vybavení, chemikálie, množství vzorku

HPLC - citlivější metoda s vyšší reprodukovatelností, avšak časově náročnější

- vysoká spotřeba organických rozpouštědel, vyšší objemy vzorků (μl)

CZE - nižší opakovatelnost a reprodukovatelnost (vzhledem k přítomnosti EOF)

- dávkování nl vzorku, rychlejší, menší finanční náročnost



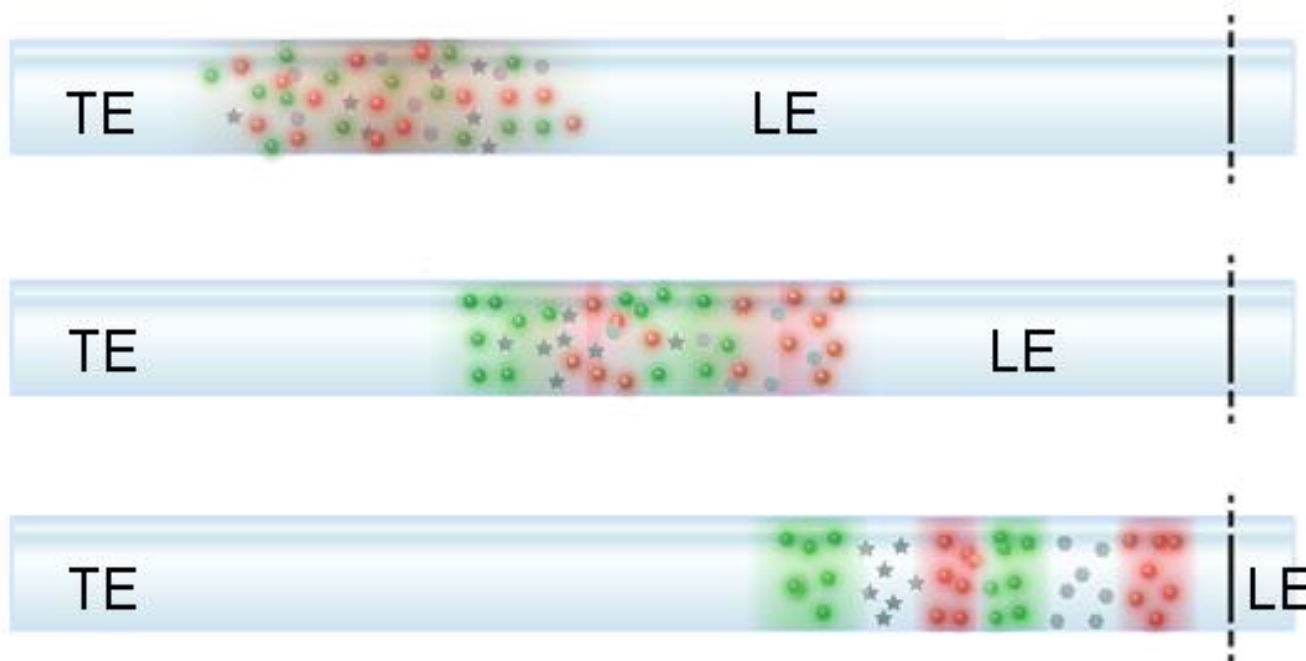
Kapilární izotachoforéza

Používá dva základní elektrolyty **LEADING** = vedoucí elektrolyt - největší pohyblivost v systému

TERMINATING = koncový elektrolyt - nejmenší pohyblivost v systému

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

- ✓ separace probíhá za konstantního proudu - vytvoření potenciálového gradientu
- ✓ po dosažení ustáleného stavu se zóny pohybují stejnou rychlostí
- ✓ zóny na sebe těsně navazují a nerozmývají se
- ✓ lze v jedné analýze separovat pouze anionty nebo kationty



Kapilární izotachoforéza

V každém místě separačního prostoru musí být platit:

- ✓ **podmínka elektroneutrality** - 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 je 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

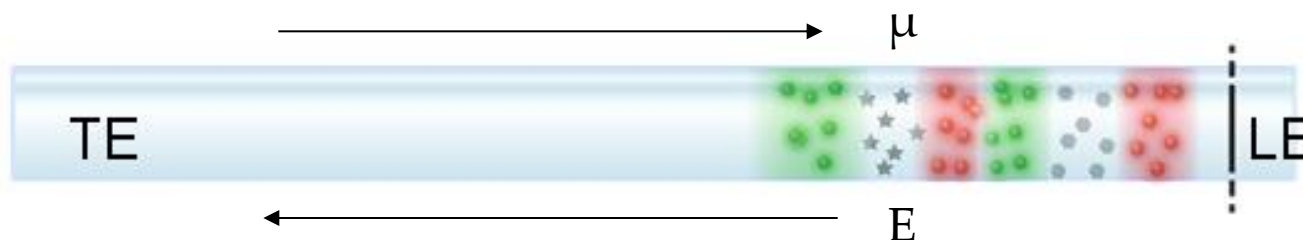
c_L - koncentrace vedoucího iontu ve vedoucí zóně

μ_x - efektivní pohyblivost látky x

μ_L - efektivní pohyblivost vedoucího iontu L

μ_c - efektivní pohyblivost protiiontu C

Kapilární izotachoforéza



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

Samozaostřovací efekt

= vlastnosti mezi zónami se mění skokem

1, kation chce přejít do zóny před sebou

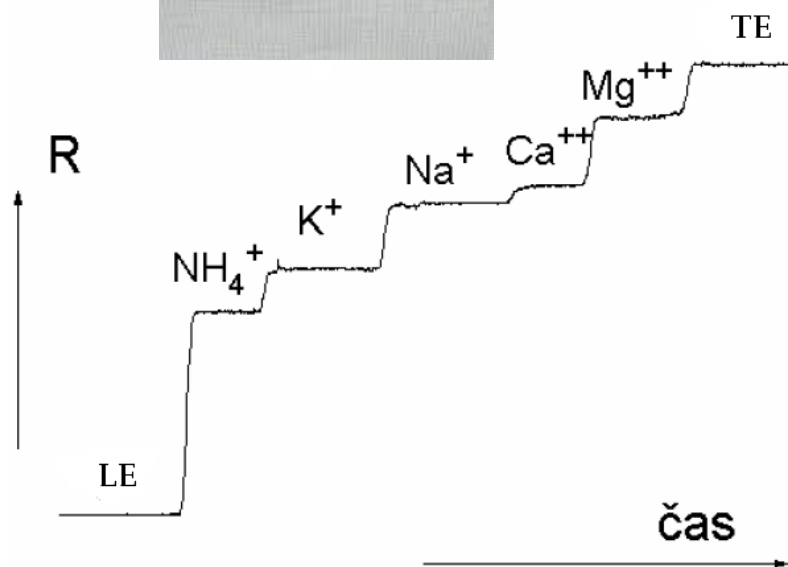
→ zóna nižšího potenciálu → snížení hnací síly → návrat zpět

2, kation chce přejít do zóny za sebou

→ zóna vyššího potenciálu → zvýšení hnací síly → návrat zpět

Kapilární izotachoforéza

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



Zásobník na
koncový elektrolyt
(„terminating
electrolyte“)

Analytická kolona
0,3 mm; 90 mm

UV-VIS detektor

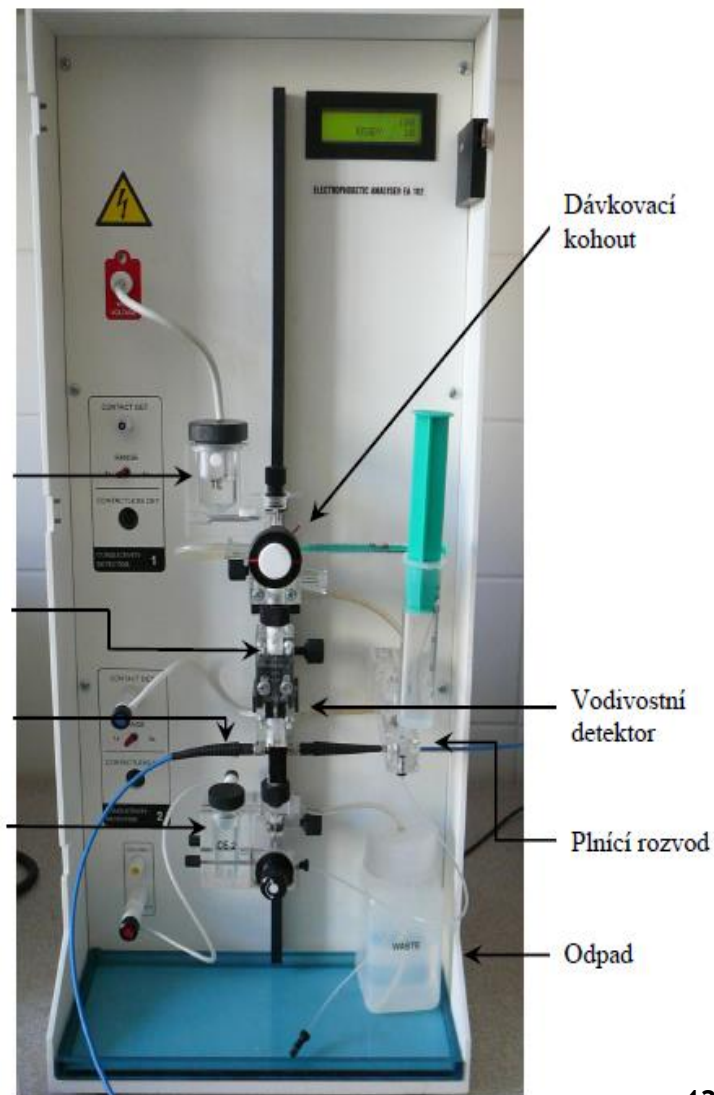
Zásobník na
vedoucí elektrolyt
(„leading
electrolyte“)

Dávkovací
kohout

Vodivostní
detektor

Plnicí rozvod

Odpad



Literatura

Foret, F., Křivánková, L., Boček, P.: Capillary Zone Electrophoresis, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1993.

Dolník, V., Úvod do kapilární elektroforézy, Brno, 1994.

High Performance Capillary Electrophoresis. A primer. Revised edition by H.H. Lauer and G. P. Rozing, Agilent Technologies, Germany 2009.

L. Kvítek, A. Panáček - Základy koloidní chemie, UP Olomouc 2007.

Odborné časopisy:

