

Základy elektromigračních separačních metod



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Cíle přednášky

- Základní princip separace – elektroforéza, elektroosmotický tok
- Rozdělení elektroforetických metod – kapilární zónová elektroforéza, kapilární izotachoforéza
- Základy instrumentace – schéma, dávkování vzorku, separační kapiláry, detekce
- Využití elektromigračních metod v analytické chemii

Doporučená literatura

- Churáček J. a kol: Analytická separace látek, 1990, SNTL, Praha.
- Churáček J. a kol: Moderní trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, 1993, Academia, Praha.
- Štulík K. a kol: Analytické separační metody, 2004, Karolinum, Praha.

Historický vývoj

- První pokusy v 30. letech 20. století



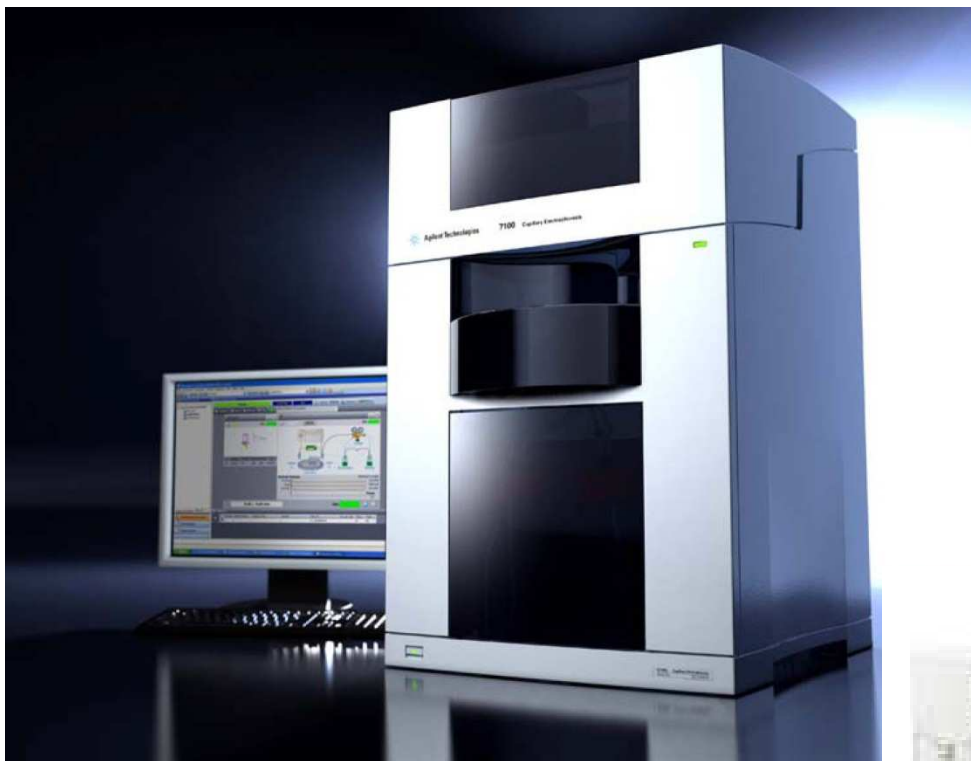
Arne Wilhelm Kaurin Tiselius
Nobelova cena v roce 1948

Zdroj: www.nobelprize.org

- Elektroforéza v podélné rotující trubici (Hjerten, 1967)
- 80. léta 20. století – vyřešení problémů s instrumentací (Jorgenson a kol.)
- Rozvoj elektroforetických metod (první komerčně dodávaný systém 1985-současnost) → automatizace, výpočetní technika



Stellan Hjerten, 1967



Zdroj: Agilent Technologies
www.agilent.com

Zdroj: Beckman Coulter,
www.beckmancoulter.com



Současnost, komerční přístroje

Elektromigrační separační metody

- Označení pro metody založené na rozdílné rychlosti migrace nabitých látek v elektrickém poli → kapilární elektroforéza (**Capillary Electrophoresis, CE**)
- Při separaci se uplatňují dva jevy → **elektroforéza a elektroosmóza**
- Výsledný pohyb iontů je dán **vektorovým součtem** migrace a elektroosmózy

Pohyb nabité částice v elektrickém poli

Elektrická síla $\times$ třecí síla (odpor prostředí)

$$v = \mu \cdot E = \mu \cdot \frac{U}{l_{tot}}$$

Iontová pohyblivost (mobilita)

$$\mu = \frac{q}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

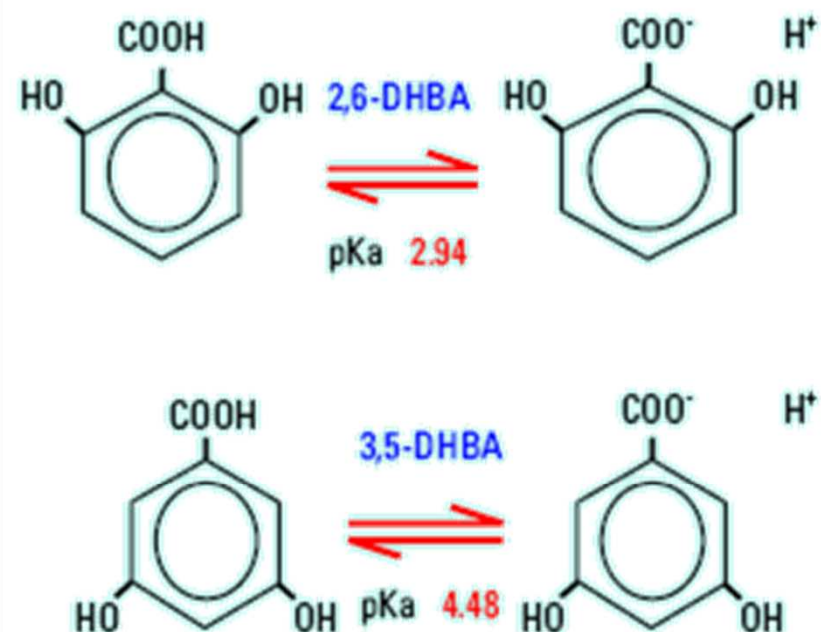
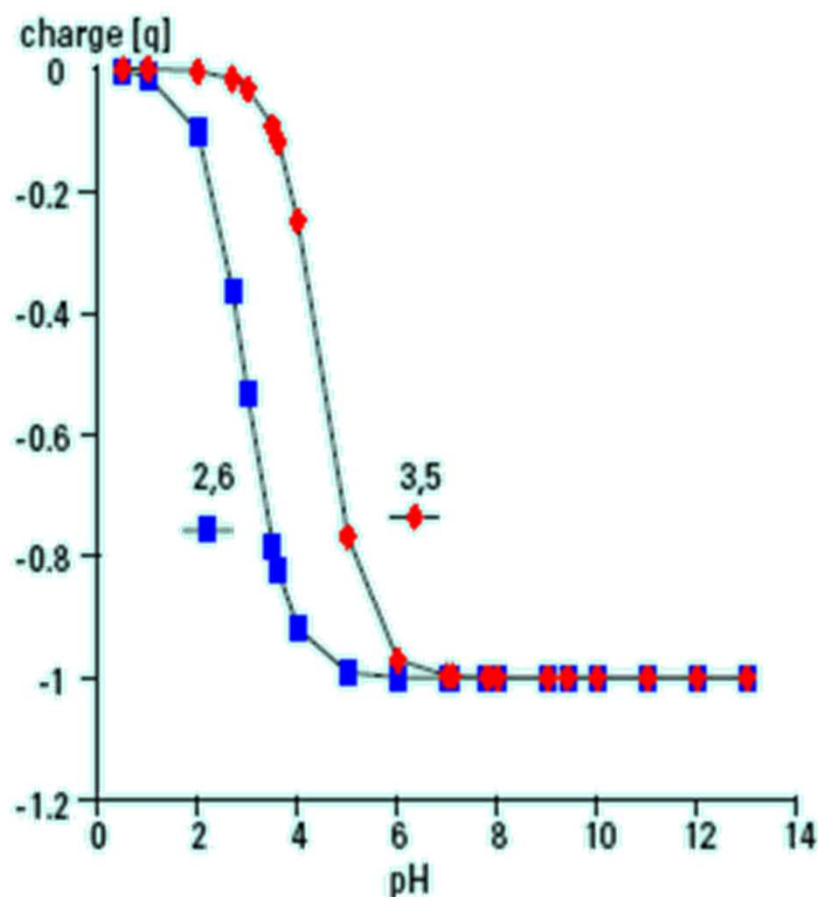
náboj iontu: silný $\times$ slabý elektrolyt

viskozita prostředí

objem iontu:
ovlivnění protiiontem,
komplexační činidla

Efektivní mobilita, migrační čas

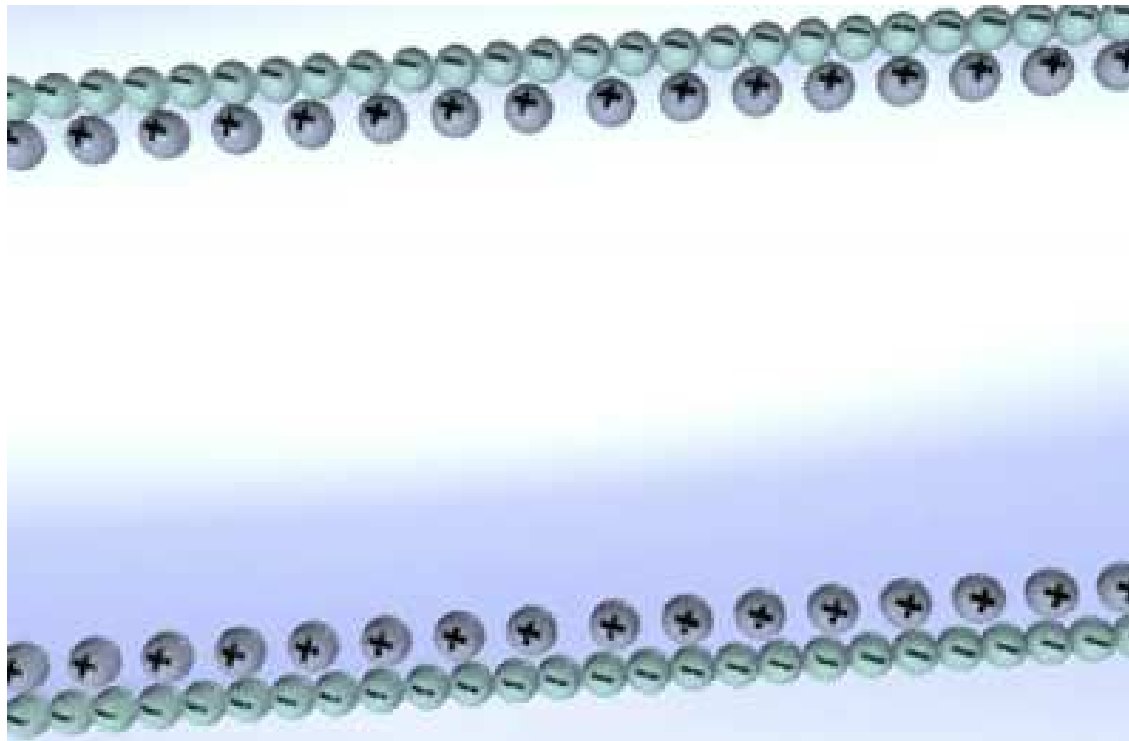
- Rovnováha mezi jednotlivými iontovými formami látek probíhá rychleji než elektromigrace – výsledkem jedna „průměrná zóna“



Zdroj: Agilent Technologies, www.agilent.com

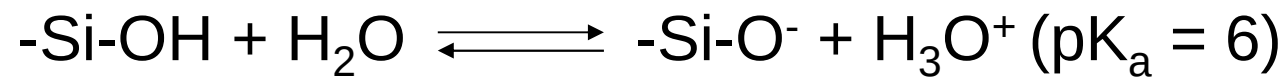
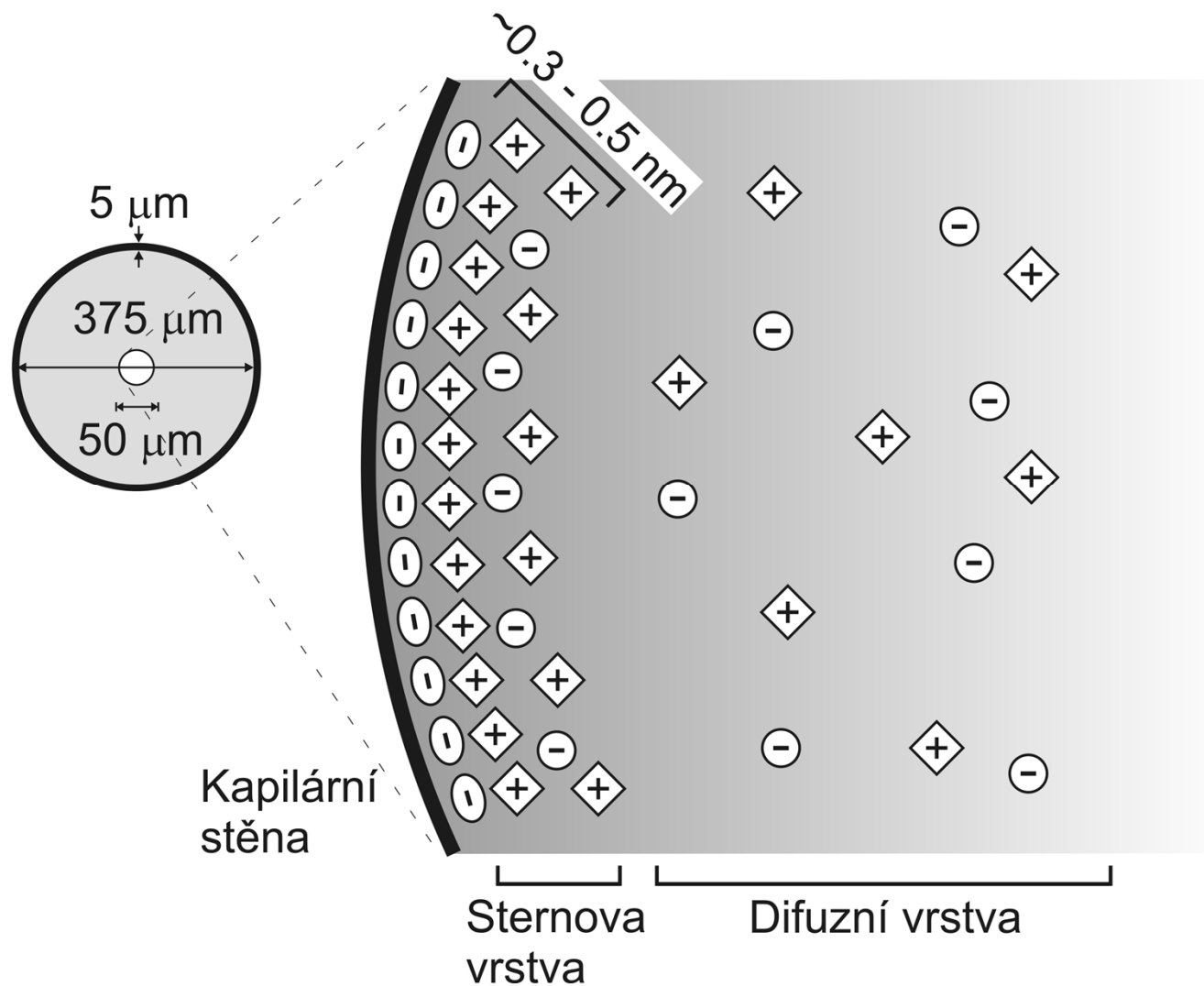
Elektroosmotický tok (EOF)

- Vytvoření elektrické dvojvrstvy u stěny kapiláry, po připojení napětí na konce kapiláry se celý roztok pohybuje směrem ke katodě (záporný pól zdroje)

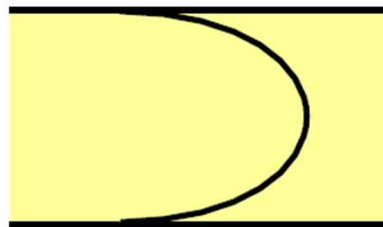
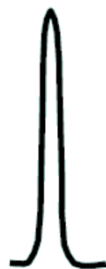
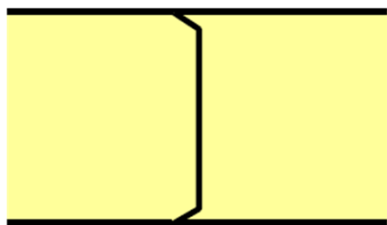


Zdroj: Agilent Technologies
www.agilent.com

Elektroosmotický tok (EOF)



Rychlostní profil elektroosmotického toku



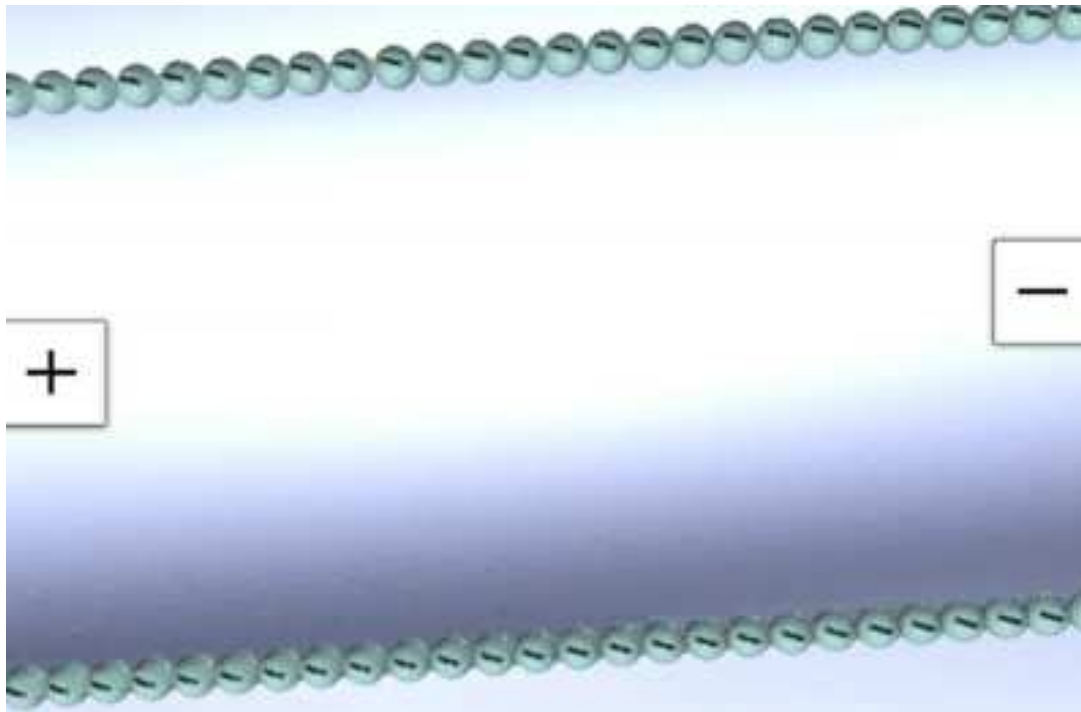
- závisí na vzdálenosti od stěny, avšak ve více než 90 % průřezu kapiláry je konstantní
- lze měřit pomocí vhodné neiontové látky (absorpce UV záření pro UV detekci)
- závisí na materiálu stěny kapiláry a na typu a pH základního elektrolytu
- klesá s rostoucí koncentrací a viskozitou elektrolytu

Rozdělení elektromigračních metod

Metoda	Mechanismus separace
Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	Elektroforetická pohyblivost
Kapilární izotachoforéza (CITP)	Elektroforetická pohyblivost
Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)	Hydrofilní a iontové interakce s micelami
Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	Sítový efekt – rozdíly v molekulové hmotnosti
Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)	Izoelektrický bod, pI
Kapilární elektrochromatografie (CEC)	Rozdělování mezi stacionární a mobilní fází

Kapilární zónová elektroforéza

- Vzorek se dávkuje do elektrolytu, který je stejný v celé kapiláře a má přibližně stejnou vodivost jako vzorek
- Látky se dělí podle rychlosti migrace dané vektorovým součtem pohyblivosti a elektroosmózy

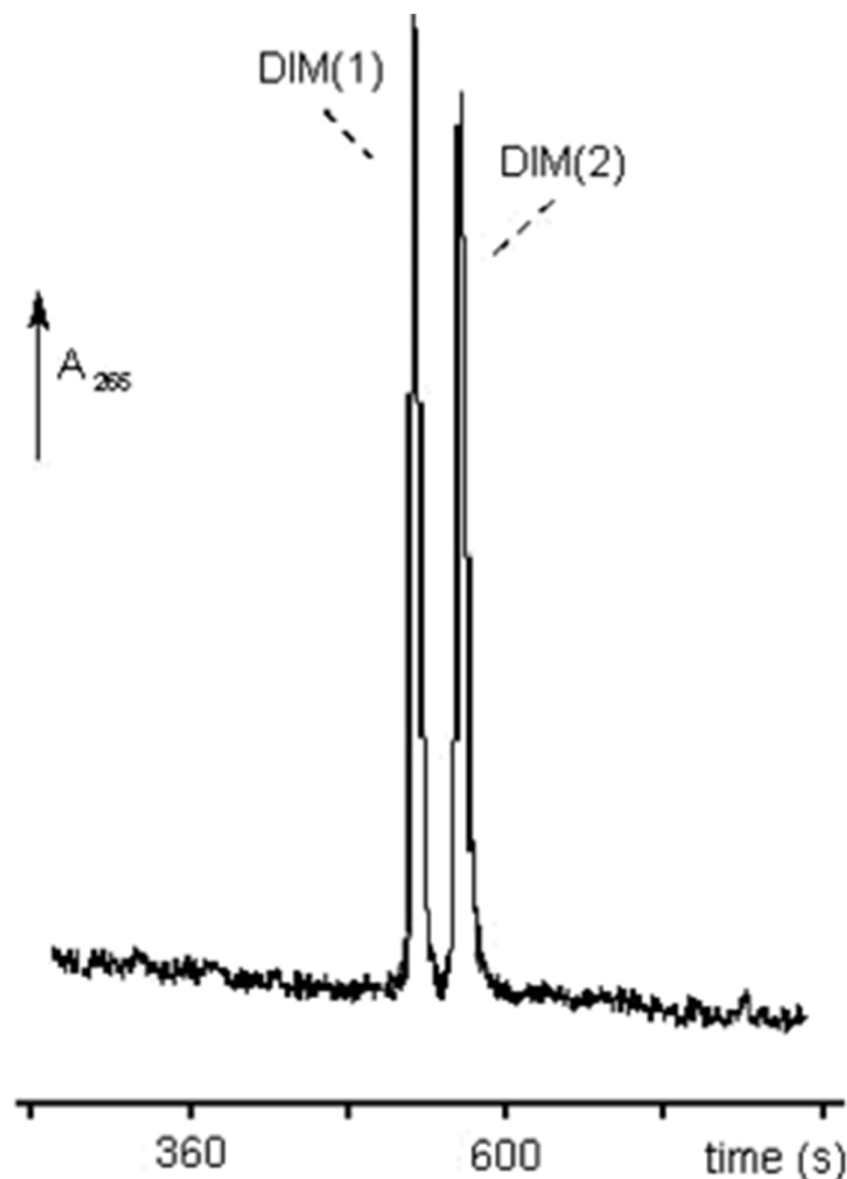


Zdroj: Agilent Technologies
www.agilent.com

Kapilární zónová elektroforéza

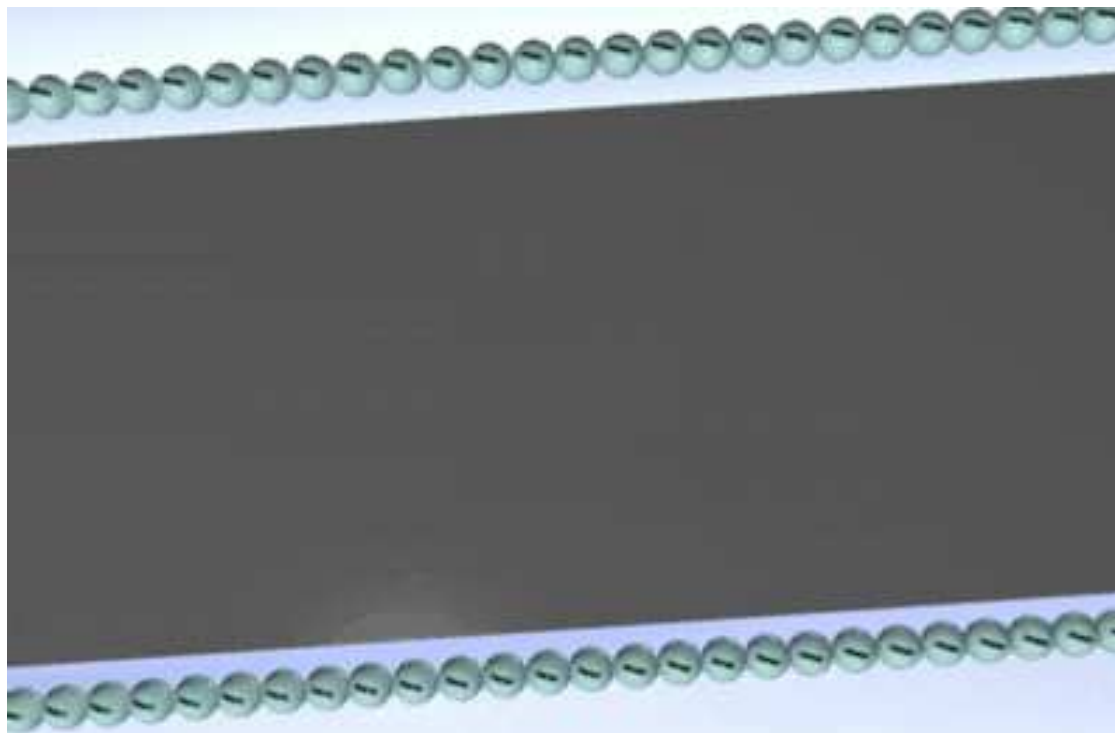
- Výstupem z detektoru je závislost měřené veličiny na čase, látky jsou zobrazeny ve formě píků
- Kvalitativní údaj – migrační čas, kvantitativní údaj – plocha píku

Zdroj: Mikus P. a kol, Methods
Find Exp Clin Pharmacol
2006, 28(9): 595..



Kapilární izotachoforéza

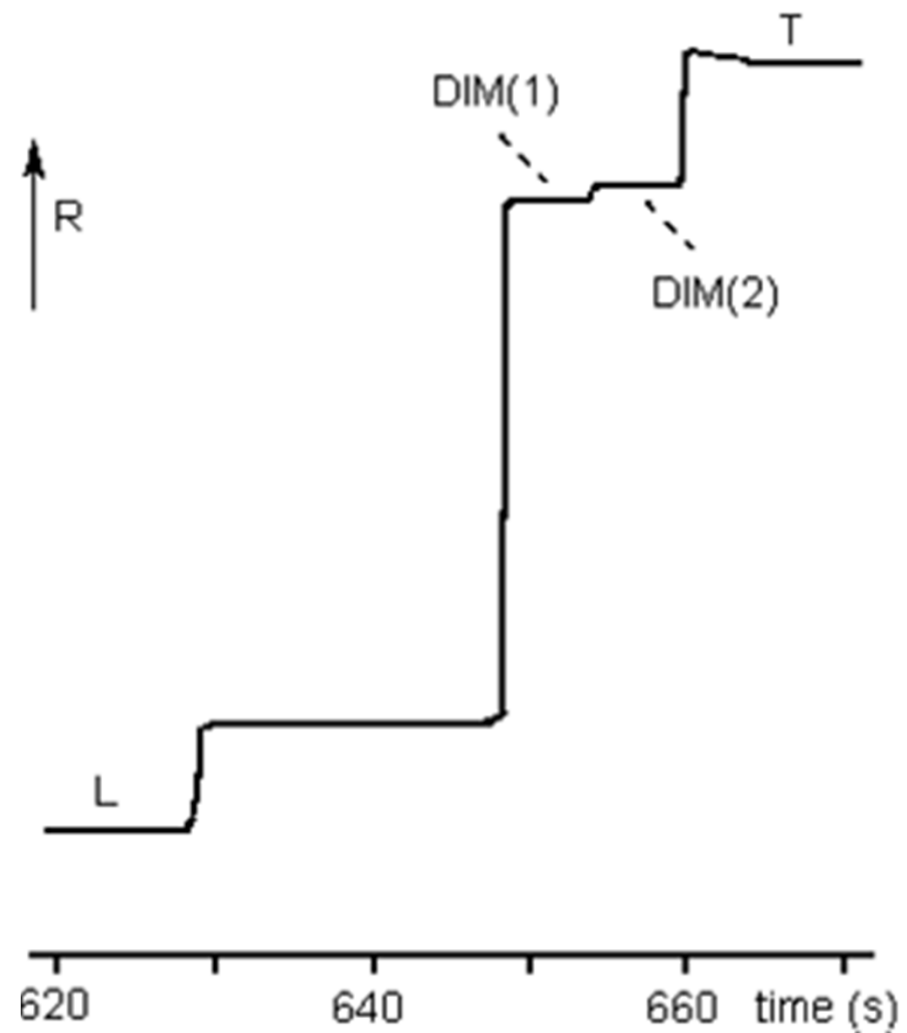
- Vzorek se dávkuje mezi vedoucí (leading, L) a koncový elektrolyt (terminator, T)
- Látky se dělí podle mobilit: $L > \text{látka A} > \text{látka B} \dots > T$



Zdroj: Agilent Technologies
www.agilent.com

Kapilární izotachoforéza

- Výstupem je závislost měřené veličiny na čase, záznam má charakter „schodů“
- Kvalitativní údaj – výška zóny, kvantitativní údaj – délka zóny

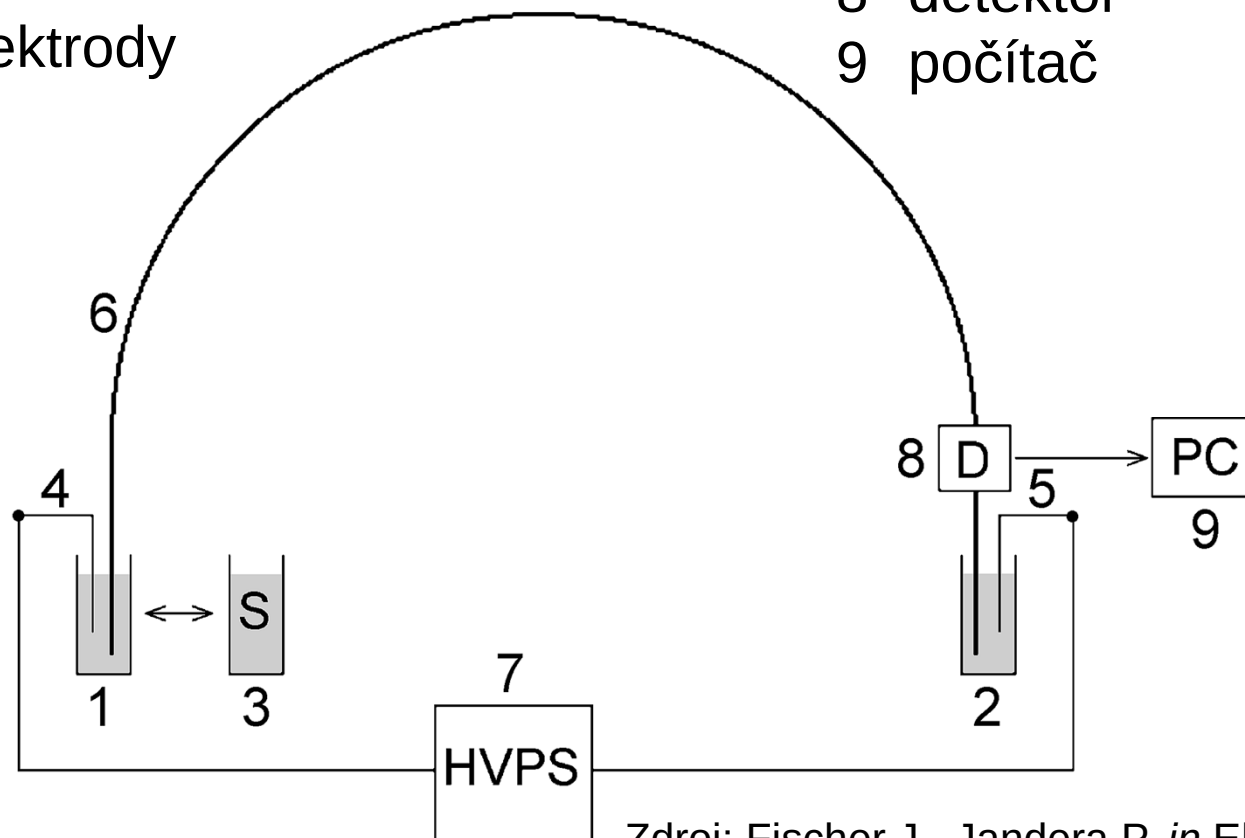


Zdroj: Mikus P. a kol, Methods
Find Exp Clin Pharmacol
2006, 28(9): 595.

Základní schéma přístroje

1,2 elektrolyt
3 vzorek
4, 5 elektrody

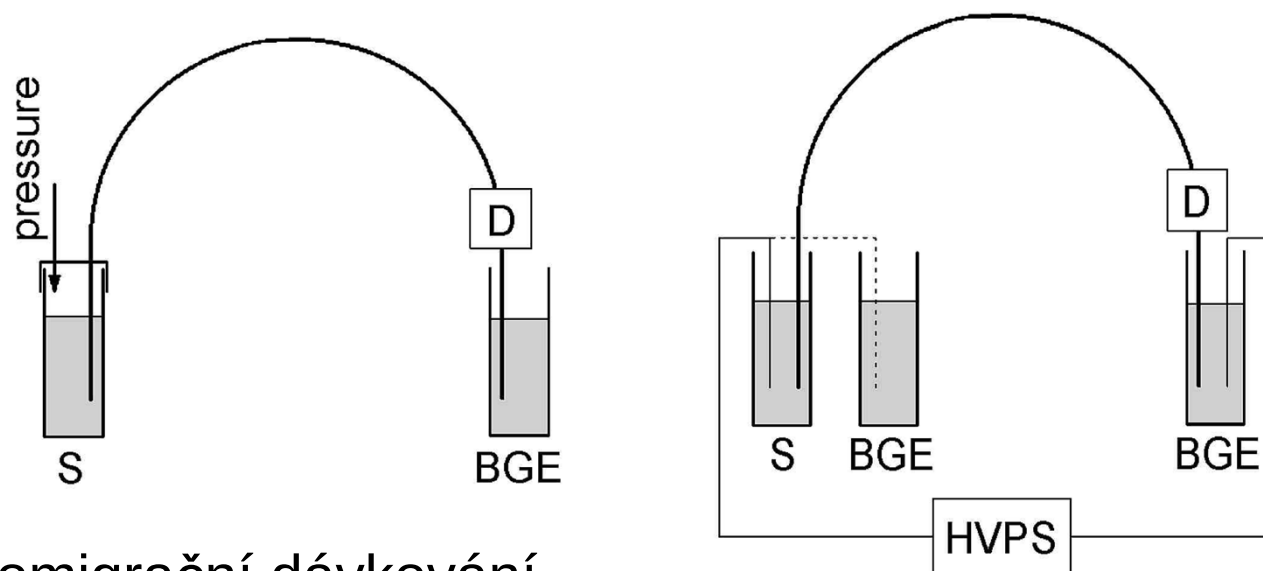
6 separační kapilára
7 zdroj vysokého napětí
8 detektor
9 počítač



Zdroj: Fischer J., Jandera P. *in* Electrokinetic chromatography (Pyell U. ed.), Wiley, 2006.

Instrumentace – dávkování vzorku

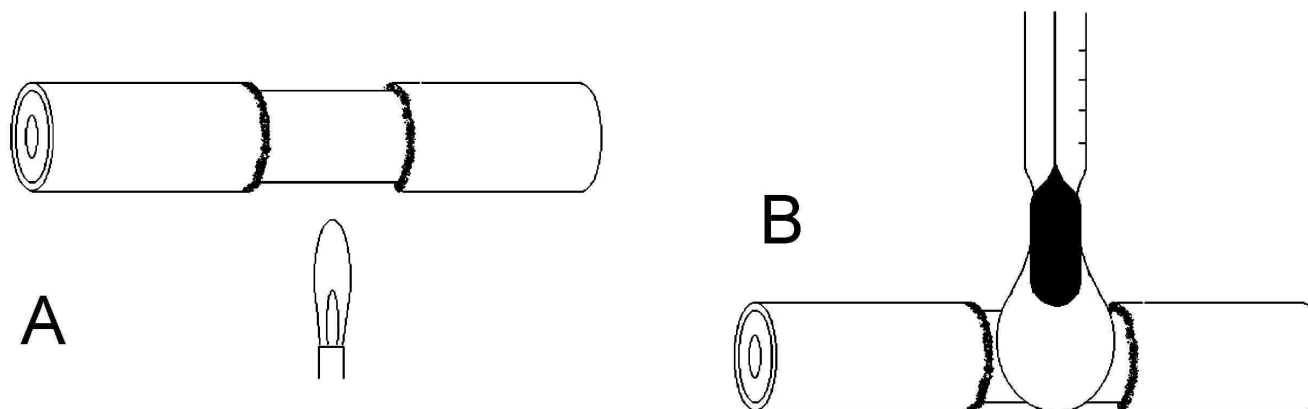
- dávkované objemy řádově v nl – nelze použít dávkovací ventily jako v HPLC
- hydrodynamické – aplikace tlaku po dobu několika sekund



- elektromigrační dávkování
 - dávkování pouze jednoho typu vzorků (anionty nebo kationty)
 - možnost diskriminace látek s malou mobilitou
- zakoncentrování zředěných vzorků

Instrumentace - separační kapiláry

- chemicky a elektricky inertní, propustná pro UV záření (detekce), ohebná, pevná, levná
- nejčastěji tavený křemen s ochranným polyimidovým povlakem, zřídka teflon
- 25 – 100 μm , vnější průměr 365 μm , délka 10 – 100 cm
- kruhový profil
- detekční cela je zpravidla součástí separační kapiláry



Zdroj: Fischer J., Jandera P. *in* Electrokinetic chromatography (Pyell U. ed.), Wiley, 2006.

Instrumentace - detekce

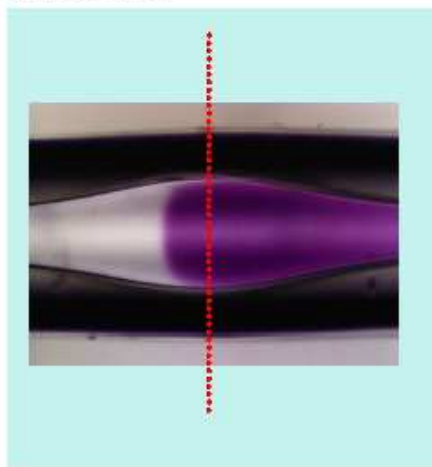
- problém s velikostí detekční cely – objemy v nl a méně
- on-column, případně end-column detektory

Detektory

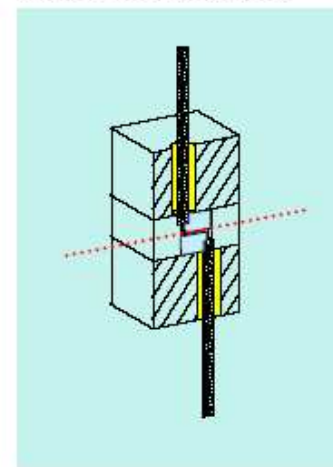
- spektrofotometrický v UV a viditelné oblasti
- vodivostní
- fluorescenční
- hmotnostní spektrometr

Zdroj: Agilent Technologies
www.agilent.com

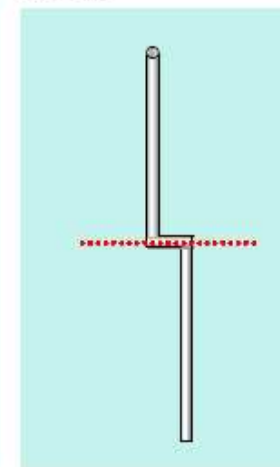
Bubble Cell



High-Sensitivity Cell



Z-Cell

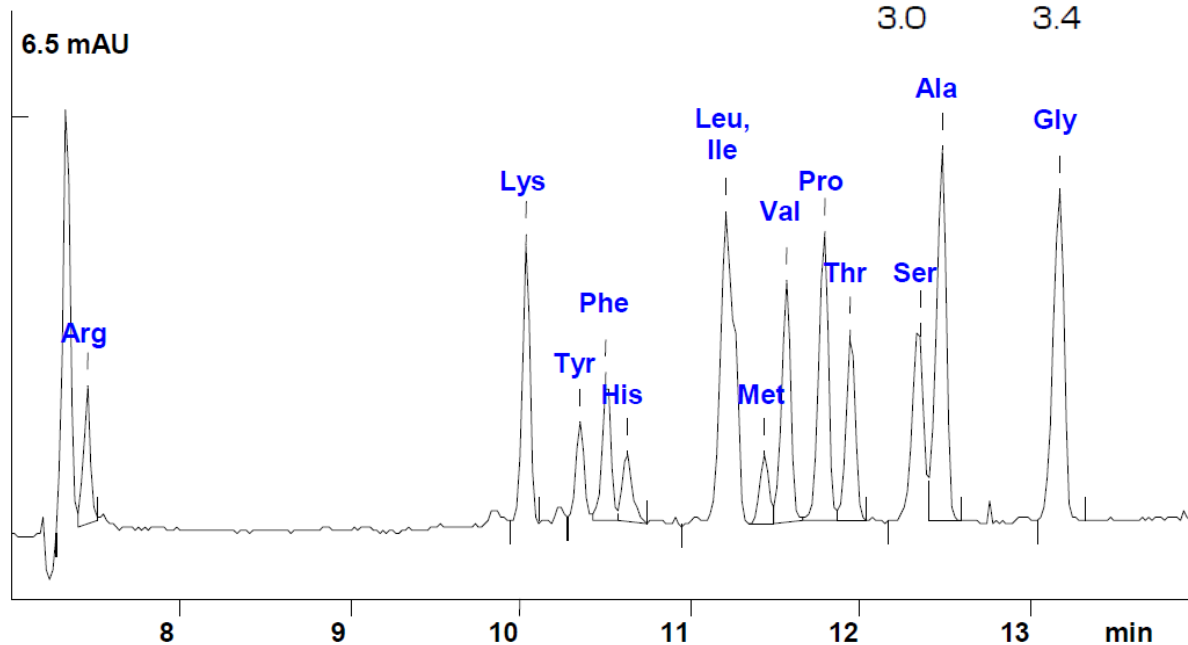
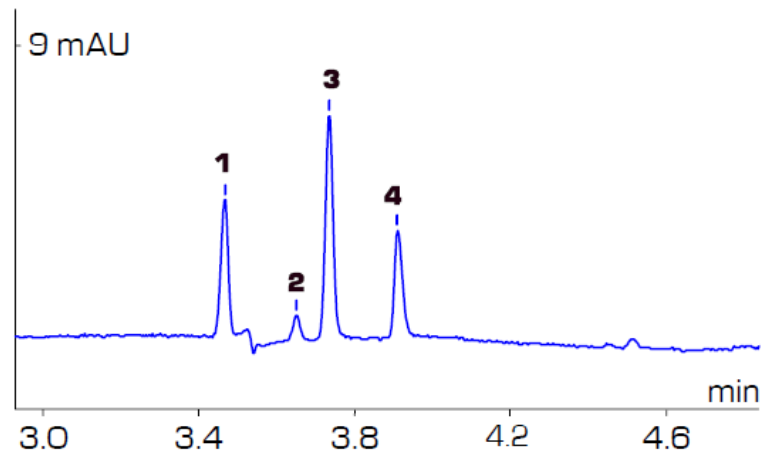


Porovnání elektromigračních metod s HPLC

HPLC	CZE
Čerpadlo mobilní fáze, 0,1 - 5 ml/min, max. tlak 40 MPa	Zdroj vysokého napětí do 30 kV, proud max. 200 μ A
Dávkování vzorku o objemu 1 - 50 μ l	Dávkování vzorku o objemu 1 - 50 nl
Separační kolona, průměr 2 - 4,6 mm, délka 3-25 cm, velikost částic 1,7 - 10 μ m	Separační křemenná kapilára, průměr 25 - 100 μ m, délka 30 - 100 cm
Detekce za kolonou, velikost cely 1 - 10 μ l	Detekce na kapiláře, výjimečně za kapilárou
Účinnost separace 30 000 – 100 000 pater/m	Účinnost separace 100 000 - 1 000 000 pater/m

Využití elektromigračních metod

- Kvalitativní a kvantitativní analýza převážně iontových látek
 - Separace anorganických iontů, aminokyselin



Zdroj: Lumex & RMI
www.rmi.cz

Využití elektromigračních metod

- Separace organických kyselin, proteinů, peptidů, fragmentů DNA, farmaceutické analýzy, stanovení polutantů životního prostředí a další

Zdroj: Lumex & RMI, www.rmi.cz

- 1** – 2,4-dichlorophenoxybutyric acid
- 2** – 2,4-dichlorophenoxypropionic acid
- 3** – 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
- 4** – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
- 5** – 2,4-dichlorophenol
- 6** – phenoxyacetic acid

