

Kapilární elektroforéza

Interaktivní návod

doc. Ing. J. Fischer, CSc.

Ing. P. Česla, Ph.D.

Kapilární elektroforéza → CE

Interaktivní návod

1. Princip separace

Separace iontových a neutrálních látek

2. Základy instrumentace pro CE

Schéma přístroje, dávkování vzorků, možnosti detekce

3. Příprava k separaci

Příprava separační kapiláry, kazety

4. Laboratorní návody – literatura v IS STAG

Stanovení iontů CZE, stanovení kofeinu MEKC

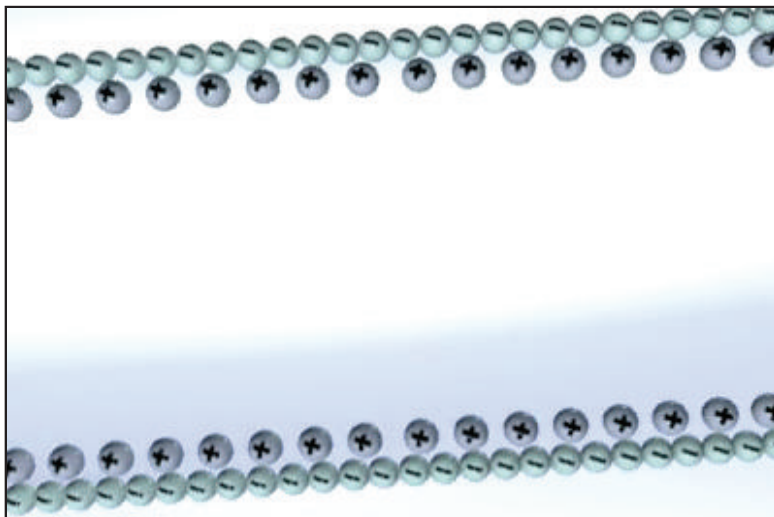
Princip separace

- Rozdílná rychlost migrace nabitých látek v elektrickém poli → kapilární zónová elektroforéza
- Při separaci se uplatňují dva jevy → **elektroforéza a elektroosmóza**
- Výsledný pohyb iontů je dán **vektorovým součtem** migrace a elektroosmózy

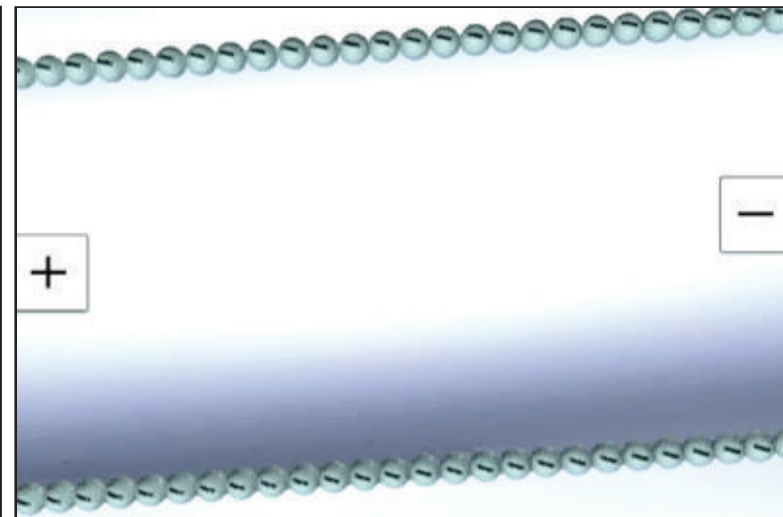


Klikni na
video pro
přehrání

Elektroosmóza



Kapilární zónová elektroforéza



Zdroj: Agilent Technologies, www.agilent.com

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

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 fázi

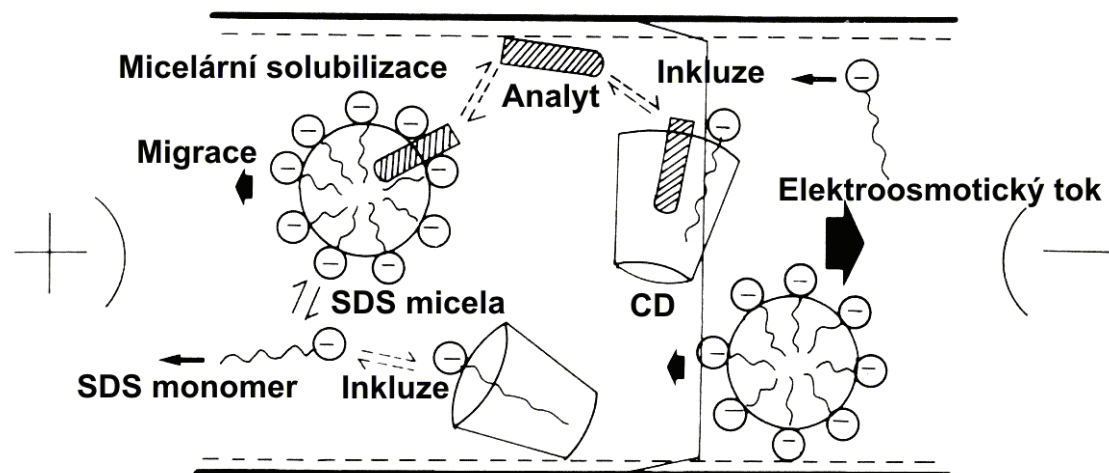
[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Separace neutrálních látek pomocí CE

- kombinace kapilární elektroforézy (elektroforéza, elektroosmóza) a chemické rovnováhy (distribuce, iontová výměna, tvorba komplexů)
- interakce analyzovaných látek s tzv. pseudostacionární fází (PS)

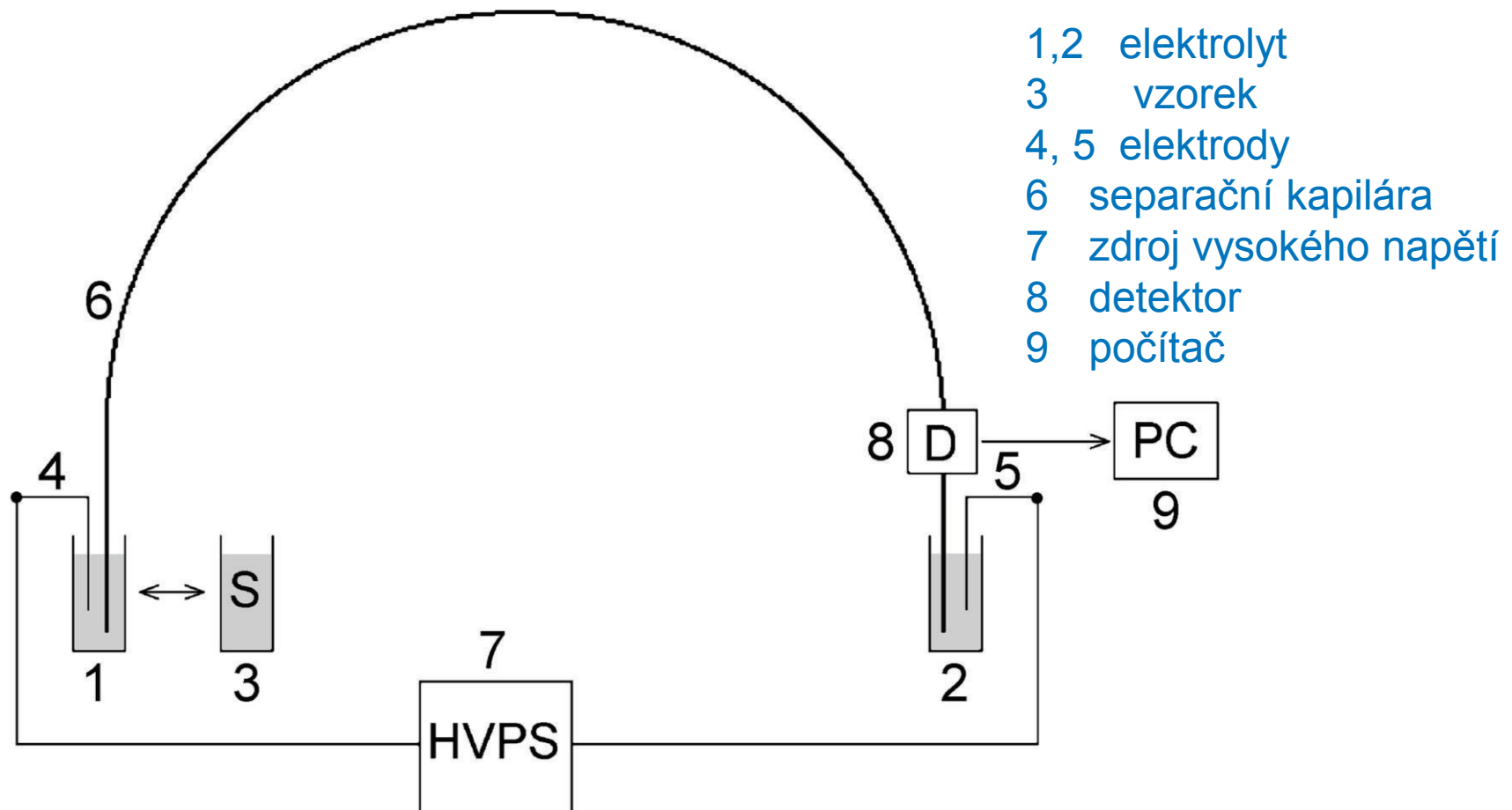
Typ EKC	Pseudostacionární fáze
micelární EKC (MEKC)	micelární pseudofáze → aniontový, kationtový nebo neionický tenzid
mikroemulzní EKC (MEEKC)	kapky nepolárního rozpouštědla v mikroemulzi
cyklodextrinová EKC, CD-MEKC	neutrální nebo nabité cyklodextriny



Zdroj:
Foret F., Křivánková L.,
Boček P., *Capillary Zone
Electrophoresis*, Wiley,
1993.

Základy instrumentace pro CE

- Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu



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

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Příklad přístroje pro kapilární elektroforézu

- Celkový pohled na přístroj pro kapilární elektroforézu Beckmann P/ACE 2100 s řídicím počítačem

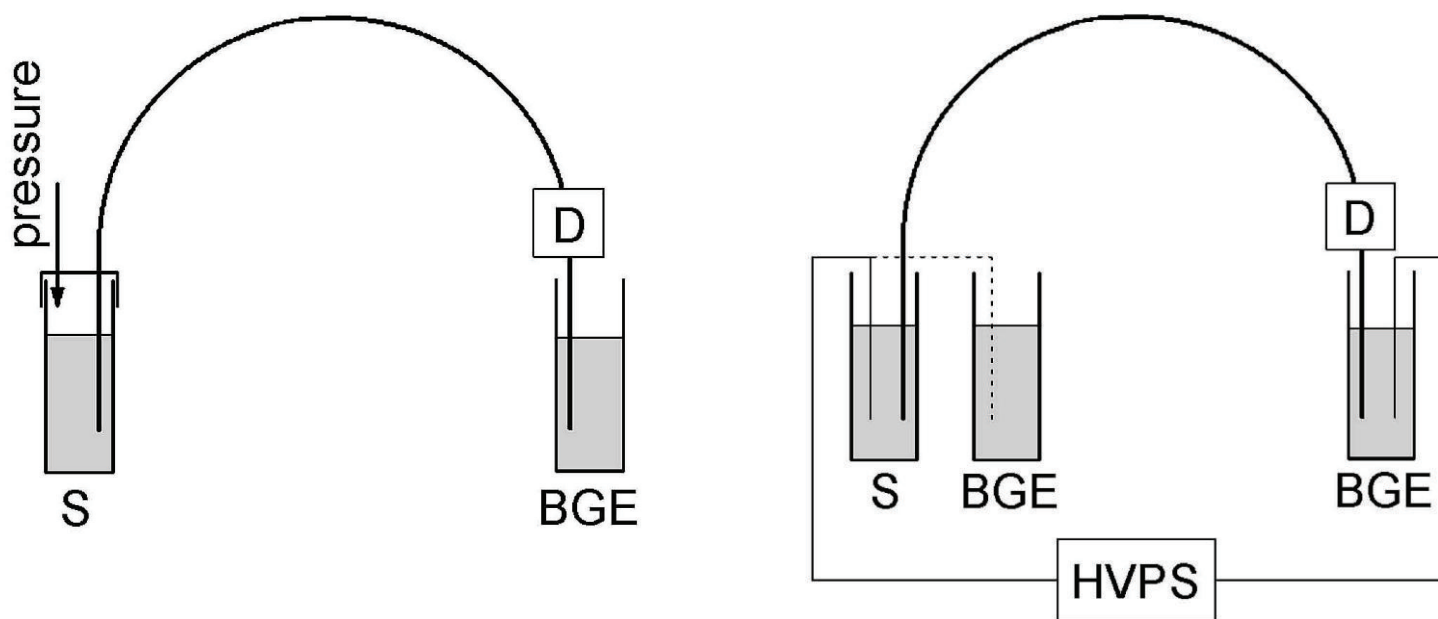


[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Dávkování vzorků do CE kapiláry

- Dávkované objemy řádově v nl
- Hydrodynamické – aplikace tlaku po dobu několika sekund
- Elektromigrační dávkování



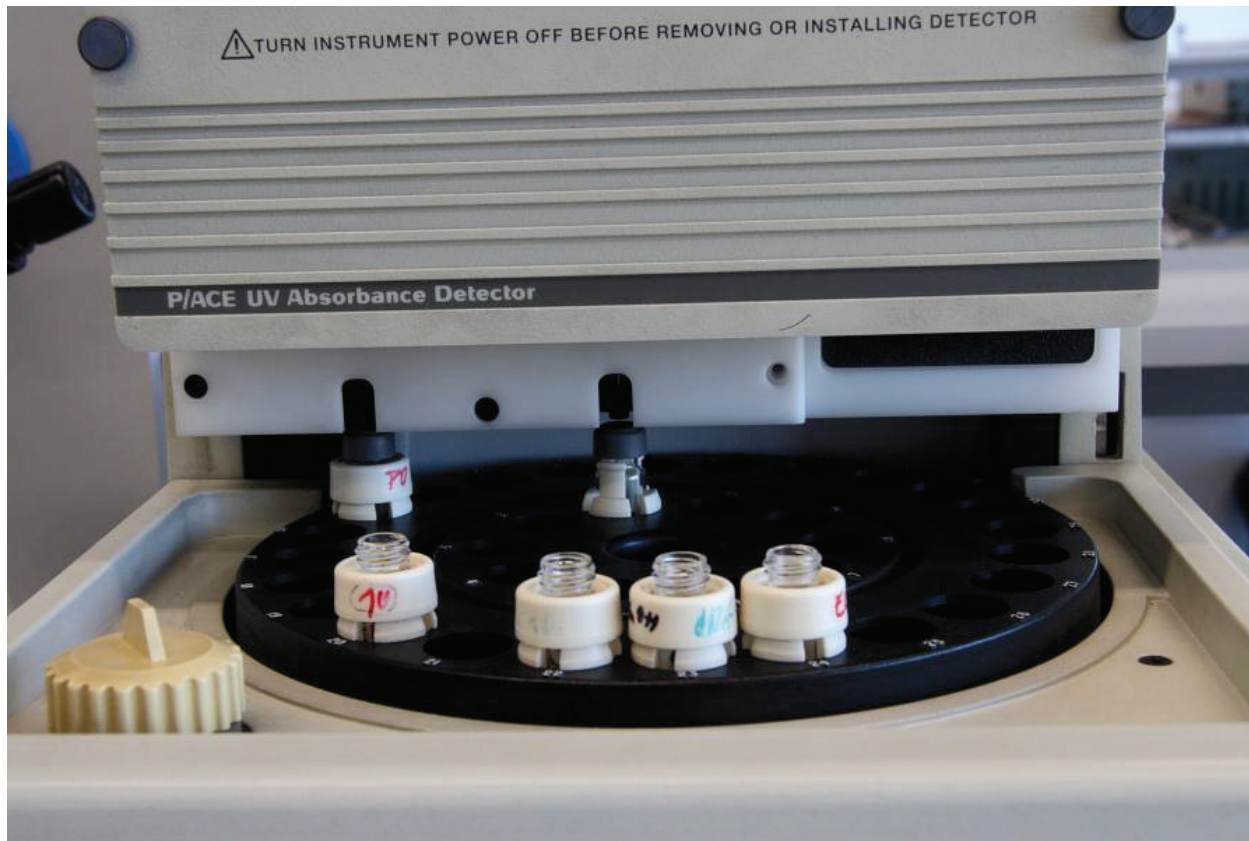
Zdroj: Fischer J., Jandera P. in *Electrokinetic chromatography* (Pyell U. ed.), Wiley, 2006.

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Autosampler kapilární elektroforézy

- Detail karuselu autosampleru přístroje pro kapilární elektroforézu s nádobkami pro elektrolyty a vzorky



[Další snímek](#)

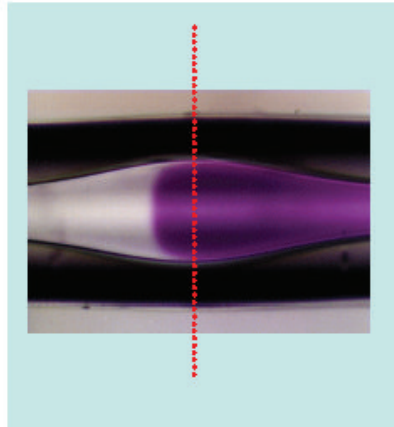
[Návrat do menu](#)

Možnosti detekce v kapilární elektroforéze

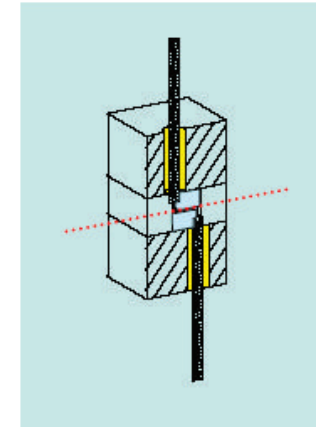
- **Spektrofotometrický v UV a viditelné oblasti**, vodivostní, fluorescenční, hmotnostní spektrometr
- On-column, případně end-column detektory
- Zvýšení citlivosti detekce → prodloužení optické dráhy = bublinková cela, Z-cela



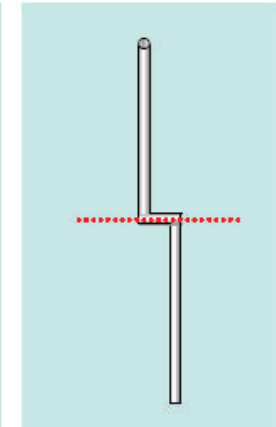
Bubble Cell



High-Sensitivity Cell



Z-Cell



Zdroj: Agilent Technologies, www.agilent.com

Deuteriová výbojka používaná jako zdroj UV záření ve spektrofotometrických detektorech pro kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu

Příprava k separaci

- Příprava k analýzám kapilární elektroforézou zahrnuje **přípravu separační kapiláry**, její **instalaci do kazety**, volbu a přípravu základního elektrolytu a přípravu vzorků
- Volba základního elektrolytu a úprava vzorků záleží na konkrétním případě analýzy – viz. laboratorní návody

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Postup přípravy separační kapiláry



*Klikni na
video pro
přehrání*



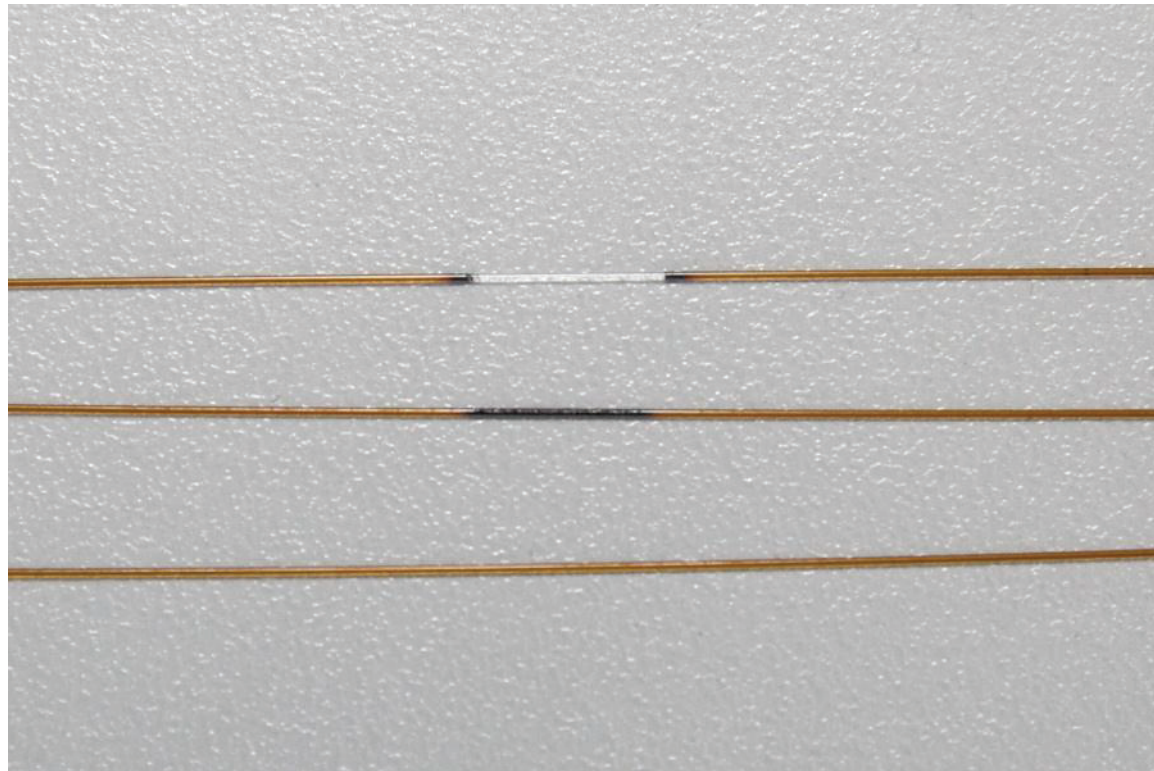
1. Naměření potřebné délky kapiláry, označení detekčního okénka
2. Řezání kapiláry keramickým nožem (diamantovým nožem)
3. Odstranění polyimidu v místě detekčního okénka (opálení, odleptání)
4. Očištění kapiláry v místě detekčního okénka

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Detekční okénko na separační kapiláře

- **Dole:** křemenná kapilára s neporušeným ochranným polyimidovým povlakem
- **Uprostřed:** opálený polyimidový povlak v místě detekčního okénka
- **Nahoře:** vytvořené detekční okénko po omytí opáleného polyimidu ethanolem



[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Instalace separační kapiláry do kazety

- Kazety se separačními kapilárami pro různé přístroje pro kapilární elektroforézu:

Vlevo: kazeta pro Capel 105 (Lumex)

Uprostřed: kazeta pro P/ACE 2100 (Beckman-Coulter)

Vpravo: kazeta pro ³DCE (Agilent)



Klikni na obrázek

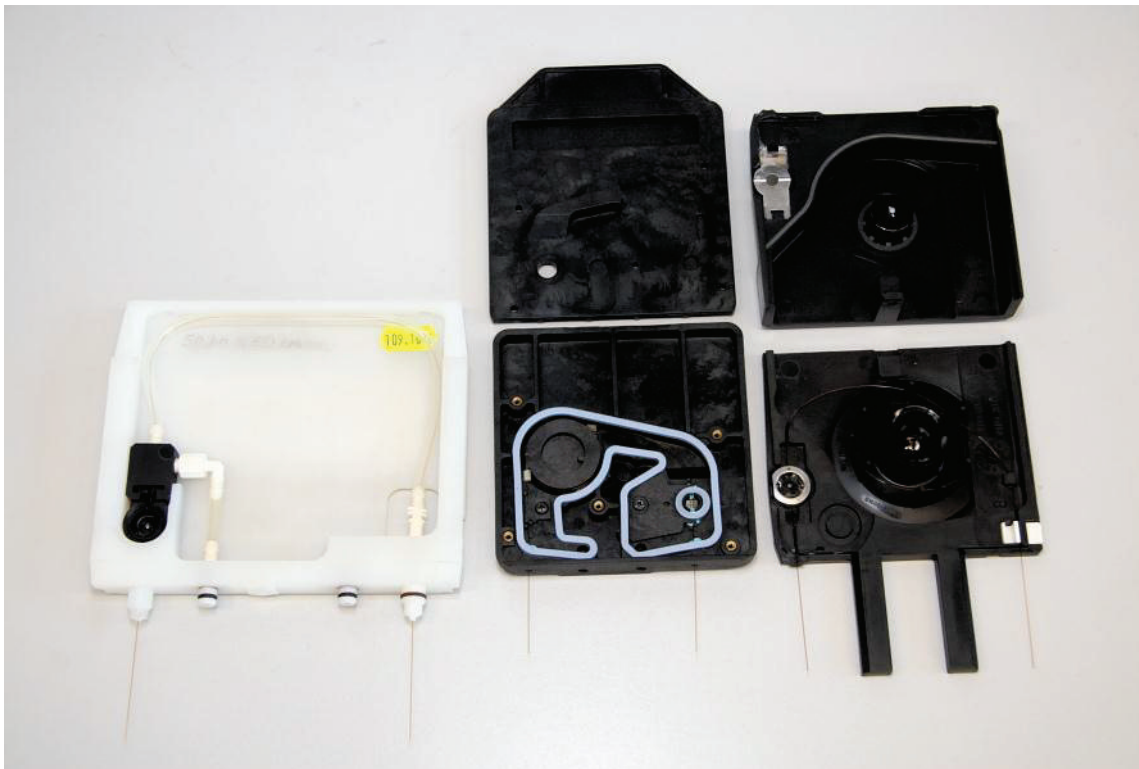
Instalace separační kapiláry do kazety

- Kazety se separačními kapilárami pro různé přístroje pro kapilární elektroforézu:

Vlevo: Kapilára je umístěna uvnitř plastové hadičky, ve které proudí chladící kapalina

Uprostřed: Kazeta s kapalinovým chlazením (prostor s chladící kapalinou vymezen modrým těsněním), separační kapilára je navinuta na bubínku v levé části kazety.

Vpravo: Kazeta s vzduchovým chlazením, separační kapilára je navinuta na bubínku uprostřed.



Na všech obrázcích jsou dobře patrné přípravky (alignmenty) k zajištění přesné polohy detekčního okénka na separační kapiláře v detektoru.

Klikni na obrázek