

4. Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. V prostředí obsahujícím roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy stýkající se s roztokem, které mohou nést elektrické náboje (stěny kapiláry, povrchy přítomných částic), se vytvářejí elektrické dvojvrstvy. Časem vzniká určité rovnovážné rozdělení nábojů. V elektromigračních separačních metodách je na toto prostředí připojeno stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb.

- *Elektroforéza* – po aplikaci napětí se nabitě částičky pohybují k opačně nabitě elektrodě.
- *Elektroosmóza* – po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě.

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Elektromigrační separační metody mají celou řadu modifikací, v nichž se může používat jak samotné elektroforézy a její kombinace s elektroosmózou, tak i dalších separačních principů, které doplňují využití odlišných elektroforetických pohyblivostí o další rozdíly v chování analytů v daném prostředí (např. molekulově síťový efekt, rozdělávání a adsorpce).

4.1 Princip elektroforézy

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V *zónové elektroforéze* je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Vzorek je dávkován do určitého místa tohoto systému. Kationty migrují k zápornému pólu, anionty ke kladnému pólu a neutrální molekuly či částice se nepohybují. Vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku se v průběhu separace vytvářejí oddělené zóny jednotlivých složek. Velikost nabitých částic vzorku může být různá, od jednoduchých iontů až po makromolekuly.

Elektroforetická pohyblivost μ_e určité nabitě částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost, a opoždějí se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k jejich oddělení.

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly: elektrická síla F_1 , která ji uvádí do pohybu, a odpor viskózního prostředí F_2 , který ji brzdí.

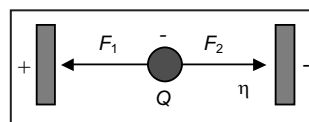
$$F_1 = QE \quad \text{rovnice 4-1}$$

$$F_2 = k\nu \quad \text{rovnice 4-2}$$

Koeficient k závisí na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí η .

Je-li v počátečním okamžiku rychlost ν nulová, částice uvede síla F_1 do zrychleného pohybu. S rostoucí rychlostí ν se zvětšuje síla F_2 , dokud se nevyrovná síle F_1 . Nastane stacionární stav, ve kterém se nabitě částice pohybují stálou rychlostí.

$$F_1 = F_2 \Rightarrow QE = k\nu \quad \text{rovnice 4-3}$$



Obrázek 42: Síly působící na nabitou částici

Pro elektroforetickou pohyblivost částice vychází vztah:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k}$$

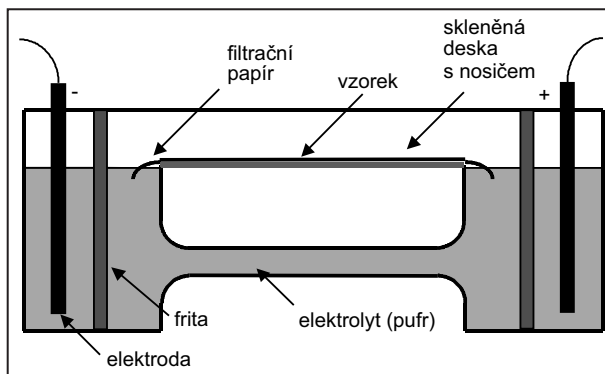
rovnice 4-4

V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované (nabitě) a nedisociované (nenabitě) molekuly. Podíl nabitých částic je určen stupněm disociace α . Molekula takového elektrolytu proto vykazuje *efektivní elektroforetickou pohyblivost* danou součinem $\alpha \cdot \mu_e$. Disociaci slabých kyselin a zásad lze měnit volbou pH prostředí, a tím také ovlivňovat separaci těchto látek.

Pokud budeme provádět zónovou elektroforézu ve volném roztoku, naše úsilí o oddělení zón bude mařit difuze, kterou se snaží roztok vyrovnávat v celém objemu koncentrace složek. Proto je třeba složky během separace fixovat a elektroforézu provádět ve vhodném separačním loži. Jeho uspořádání je plošné nebo kapilární.

Elektroforéza v plošném uspořádání

Plošný nosič je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře nasycené parami rozpouštědla. Vzorek nanášíme zpravidla do středu nosiče. Po vložení napětí se oddělí zóny obsahující jednotlivé složky. Zóny se pohybují různou rychlostí. Podobně jako u papírové nebo tenkovrstvé chromatografie separaci zakončíme dříve, než dorazí první zóny ke konci, nebo dříve, než dojde k jejich přílišnému rozšíření. Zóny se po vysušení detekují a elektroforegram se vyhodnotí. Po-



Obrázek 43: Zařízení pro zónovou papírovou nebo gelovou elektroforézu

loha zóny souvisí s kvalitou, tedy s druhem nabitých částic. Kvantitativní vyhodnocení se provede jako u tenkovrstvé chromatografie. Elektrody jsou od nosiče odděleny porézní přepážkou, která brání proniknutí produktů elektrolyzy do nosiče.

V nejjednodušším případě lze jako nosiče použít filtrační papír, který je dvěma konci ponořen v pufru a těmito konci je napojen na zdroj stejnosměrného napětí. Hojně se používají jako nosiče tenké vrstvy gelu na skleněných deskách (gelová elektroforéza). Elektrody se připojují na konce desek přes filtrační papír ponořený do pufru nebo přes gelové mosty napuštěné pufrům. V gelové elektroforéze se při separaci uplatňuje vedle elektroforetické pohyblivosti molekulově síťový efekt.

Toto provedení je manipulačně i časově náročné. Zóny se detekují a vyhodnocují až po separaci. Separaci nelze urychlit použitím vyšších hodnot napětí, protože vznikající Jouleovo teplo by mohlo způsobit chemické změny a ohrozit separaci.

4. 2 Kapilární elektroforéza

Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor, obvykle fotometrický (sledování absorpce ultrafialového záření). Záznam

závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram. Elektroforegram je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu.

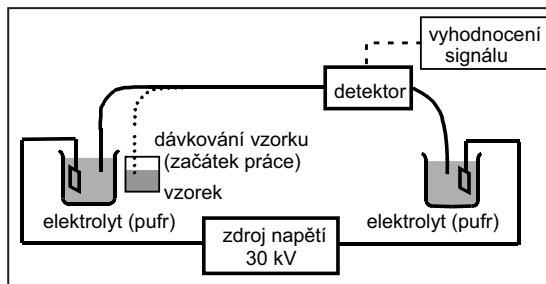
Kapilární elektroforéza nabízí možnost počítačového řízení a zpracování analýzy. Doba analýzy v kapiláře se oproti plošnému uspořádání zkracuje zejména z těchto důvodů:

- Teplo tvořené uvnitř kapiláry je účinně odváděno jejími stěnami, proto lze použít vysokých napětí.
- Kapilára prochází detektorem a je prováděna on-line detekce zón a počítačové vyhodnocování píků.
- Elektroforézu doplňuje elektroosmóza. Elektroosmotický tok (EOF) má za následek pohyb roztoku kapilárou k detektoru. Snižuje analytické časy a k detektoru unáší i částice elektroforeticky migrující opačným směrem. Podstata EOF je vysvětlena dále.

Je vypracována celá řada separačních technik, které doplňují prostou kapilární zónovou elektroforézu o další možnosti.

- *Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis – CZE)* neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku (*Free Solution Capillary Electrophoresis – FSCE*) je separace založená na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře.
- *Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography – MECC)* se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.
- *Kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis – CGE)* využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- *Kapilární izoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric Focusing – CIEF)* slouží k separaci amfolytů v gradientu pH.
- *Kapilární elektrochromatografie (Capillary ElectroChromatography – CEC)* využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako stacionární fázi. Separační selektivita v CEC je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu.

Nejvíce používané separační techniky v kapilární elektroforéze jsou FSCE a MECC. CGE a CIEF jsou důležité pro separaci biomolekul jako DNA a proteinů a rostle jejich význam v rozvoji biotechnologií léčiv. Všeobecně je kapilární elektroforéza využitelná pro vodné i nevodné roztoky.



Obrázek 44: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu

Instrumentace

Kapiláry

Kapiláry jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyimidový povlak (kapilára je křehká). V místě detekce je malý podíl povlaku odstraněn. Kapilára je běžně 25 – 100 cm dlouhá a nejčastěji používané vnitřní průměry jsou 50 a 75 μm . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, např. ke snížení adsorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na kapilární stěně.

Regulace teploty

Regulací teploty kolem kapiláry se zajišťují stálé podmínky separace. Teplota může být regulována vzduchem nebo kapalnou chladicí směsí.

Dávkování vzorku

Roztok vzorku je dávkován do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. Zpravidla jde o množství 10 – 100 nl a zóna vzorku tvoří asi 1 – 2 % celkové délky kapiláry. Dávkování lze provádět několika způsoby:

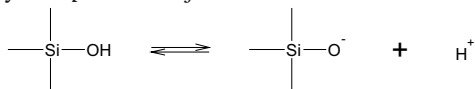
- **Dávkování tlakem** patří k nejběžnějším. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je aplikován zvýšený tlak.
- **Dávkování rozdílem hladin** je založeno na principu spojených nádob.
- **Elektrokinetické dávkování** je méně používané. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je přivedeno napětí. Nevýhodou je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením po dávkování, protože do kapiláry migruje více pohyblivějších částic než méně pohyblivých.

Detektory

Detektory musí být velmi citlivé, protože průměr kapiláry je malý. Nejpoužívanější detektory jsou založeny na sledování absorpce ultrafialového záření a většinou využívají diodového pole. Citlivost je nižší (10^{-6} mol dm^{-3}). Další typy detektorů využívají fluorescenci, velmi citlivý je detektor s laserem indukovanou fluorescencí (*Laser Induced Fluorescence* – LIF), je však drahý. V poslední době se často využívá spojení kapilární elektroforézy a hmotnostního spektrometru (MS), které umožňuje snadnou identifikaci analytu a poskytuje informace o struktuře analyzovaných látek.

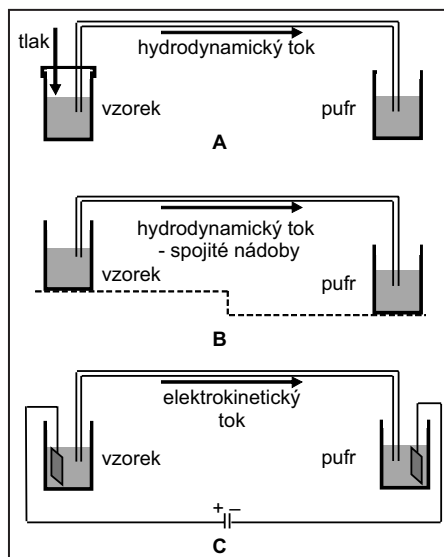
Elektroosmotický tok

Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují:



Disociací se vytváří záporný náboj stěny. Ke stěně je přitažena vrstva kovových iontů základního elektrolytu a vzniká stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty blíže středu kapiláry tvoří tzv. difuzní vrstvu. Je-li zavedeno napětí, tyto kationty migrují ke katodě. Kationty H^+ bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku k detektoru umístěnému před katodou. Jev se nazývá elektroosmóza a tok se označuje jako elektroosmotický tok (*ElectroOsmotic Flow* – EOF). Tok je tak silný, že nese ke katodě i anionty. Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku, nabitě částice rychleji (kationty) nebo pomaleji (anionty) v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti.

Ustavením Sternovy a difuzní vrstvy se vytvářejí potenciálové rozdíly. Difuzní vrstvě přísluší potenciálový rozdíl, který se nazývá elektrokinetický potenciál neboli zeta potenciál ζ . Úroveň



Obrázek 45: Dávkování vzorku v kapilární elektroforéze
A – dávkování tlakem
B – dávkování rozdílem hladin
C – dávkování elektrokinetické

EOF je velmi závislá na pH základního elektrolytu, protože zeta potenciál roste s disociací kyselých silanolů na povrchu kapilární stěny. Pod pH 4 je disociace malá a EOF není významný, nad pH 9 jsou silanolové skupiny plně disociovány a EOF je nejsilnější. Úroveň EOF klesá s rostoucí koncentrací základního elektrolytu, protože se snižuje zeta potenciál.

Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit rovnicí:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta r}$$

rovnice 4-5

μ_{eo} pohyblivost EOF
 ε permitivita základního elektrolytu
 η dynamická viskozita
 ζ zeta potenciál
 r poloměr kapiláry

Z rovnice je zřejmé, že EOF ovlivňují nejen vlastnosti základního elektrolytu, ale i poloměr kapiláry. Jako jev se uplatňuje u kapilár s poloměrem do 100 μm .

Lineární rychlost elektroosmotického toku určíme z napětí a délky kapiláry:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \mu_{eo} \frac{U}{l}$$

rovnice 4-6

Nabitě částice mají za účasti elektroosmotického toku zdánlivou pohyblivost μ_z , která je součtem pohyblivosti elektroforetické a pohyblivosti EOF. Elektroforetická pohyblivost, která má stejný směr jako EOF, má kladné znaménko (kationty), elektroforetická pohyblivost, která má opačný směr jako EOF, má záporné znaménko (anionty).

$$\mu_z = \mu_e + \mu_{eo}$$

rovnice 4-7

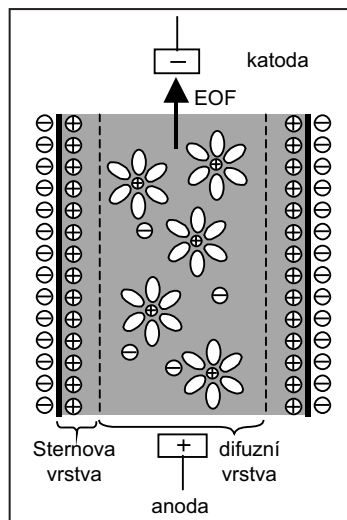
Účinnost separace v kapilární elektroforéze

Odpor proti převodu hmoty

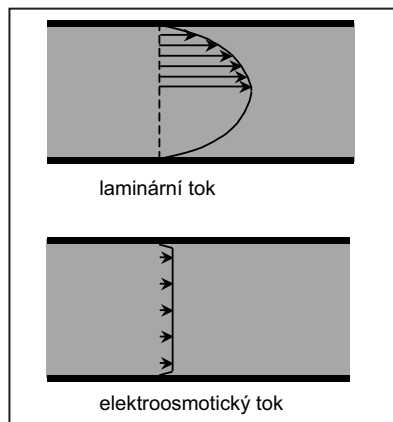
Povšimněme si rozšiřování zón způsobeného odporem proti převodu hmoty v kapalně fázi a porovnejme jeho důsledky pro účinnost kapilární elektroforézy a vysoce účinné kapalinové chromatografie. Molekuly složky se difuzí dostávají do různých vzdáleností od středu kapiláry. Liší-li se rychlost v různých místech profilu kapiláry, molekuly se od sebe vzdalují.

Protože elektroosmotický tok je generován po celé délce kapiláry, je výsledkem stálý průtok v jejím libovolném místě. Rychlostní profil je pístový a složky roztoku jsou nesené stejnou rychlostí během transportu celou kapilárou s minimálním rozšiřováním zóny.

Laminární tok vyvolaný čerpadlem v HPLC má rychlostní profil parabolický. Roztok se v HPLC na okrajích kolony pohybuje nejpomaleji a ve středu kolony nejrychleji. Mole-



Obrázek 46: Vznik elektroosmotického toku



Obrázek 47: Rychlostní profily laminárního a elektroosmotického toku

kuly složky mají různé rychlosti v profilu kolony a laminární tok rozšiřuje píky podstatně více než tok elektroosmotický.

Molekulární difuze

Hlavní příčinou rozšiřování zón je molekulární difuze rozpuštěných složek při postupu kapilárou. Tato difuze je nejmenší u velkých molekul (např. proteinů a oligonukleotidů), protože mají malé difuzní koeficienty. Pro tyto látky je možné dosahovat počtu teoretických pater (N) v řádu milionů, pro menší molekuly v řádu set tisíc. Počet teoretických pater vypočítáme:

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{eo})U}{2D} = \frac{\mu_z U}{2D} \quad \text{rovnice 4-8}$$

D je difuzní koeficient složky.

Rozšíření zón způsobené dávkováním

Druhým hlavní faktorem nepříznivě ovlivňujícím účinnost v kapilární elektroforéze je dávkování vzorku, které může vytvořit startovní zónu analytů dosahující několika mm délky kapiláry. Délka startovní zóny může být snížena využitím tzv. „stacking“ efektu (z angl. *stack* – hromadit). „Stacking“ efekt nastává, je-li vzorek rozpuštěn v roztoku nižší iontové síly než má elektrolyt použitý k separaci. Za těchto okolností je elektrické pole silnější ve startovní zóně než ve zbytku kapiláry vyplněné základním elektrolytem. Kationty vzorku se pohybují ve své zóně rychle vpřed, dokud nenařazují na rozhraní se základním elektrolytem, kde je však intenzita elektrického pole menší, což jejich rychlost snižuje. Tak se startovní zóna vzorku i více než desetinásobně zaostrí. Tento efekt se výrazně uplatní tehdy, když je vzorek rozpuštěn v čisté vodě nebo je alespoň desetkrát zředěnější než základní elektrolyt.

Kapilární elektroforéza ve volném roztoku

Separace iontů ve volném roztoku je nejjednodušší formou kapilární elektroforézy (FSCE). Rozpuštěné složky se disociují v závislosti na pH základního elektrolytu. Ionty disociovaných složek jsou separovány v důsledku rozdílných poměrů náboje ku hmotnosti. Ve FSCE všechny neutrální sloučeniny přicházejí k detektoru společně. (Pro separaci těchto neutrálních látek je používána micelární elektrokinetická kapilární chromatografie – MECC).

Rychlost toku iontů je určena jejich zdánlivou pohyblivostí (rovnice 4-7). Složka elektroforetické pohyblivosti je řízena velikostí a nábojem iontů. Menší molekuly s větším nábojem se pohybují rychleji než větší molekuly s menším nábojem. Celková rychlost pohybu částice je součtem lineární rychlosti elektroosmotického toku a elektroforetické rychlosti částice $\mu_{eo} + \mu_e$. Účast elektroosmotického toku na separaci dovoluje separaci a detekci kationtů i aniontů jedinou analýzou, protože EOF je při vyšších pH natolik silný, že nese anionty ke katodě bez ohledu na jejich náboj.

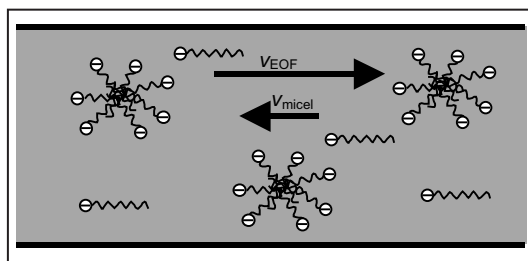
Čas potřebný k migraci částice k detektoru vzdálenému o délku kapiláry l je:

$$t = \frac{l}{v_e + v_{eo}} \quad \text{rovnice 4-9}$$

Rychlé separace dosáhneme s vysokým napětím v krátké kapiláře. Migrační rychlost je závislá na teplotě (ovlivnění viskozity). Při vyšších teplotách je roztok pufru méně viskózní a klade menší odpor proti pohybu iontů. Pohyblivost složek můžeme změnit navázáním iontů do komplexů.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie MECC byla původně vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které se nedělí užitím kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Separace se provádí za použití základního elektrolytu s vysokým pH, který obsahuje relativně vysokou hladinu povrchově aktivních látek (surfaktantů), např. dodecylsírany sodného (*Sodium Dodecyl Sulphate* – SDS). Nad určitou mezní koncentrací povrchově aktivní látky (tzv. kritická micelární koncentrace) začnou spolu molekuly povrchově aktivní látky agregovat a vytvářejí micely. V micelách jsou hydrofilní hlavičky umístěny ve vnější vrstvě a hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro, které může rozpouštět složky vzorku. Nepolární jádra vytvářejí tzv. *pseudostacionární fázi*.



Obrázek 48: Princip MECC

Micely SDS mají záporný náboj a migrují proti elektroosmotickému toku, který je dostatečně silný na to, aby je unášel k detektoru. Složky vzorku se rozdělují mezi pseudostacionární fázi v micelách a vodný pufr jako mobilní fázi. Nastává jejich retenční obdobně jako v HPLC. Retence se liší v důsledku rozdílných rozdělovacích koeficientů složek, což vede k jejich separaci.

Retenční čas t_r pro neutrální složky se vždy nachází mezi hodnotami t_0 a t_{mc} , kde t_0 retenční čas neutrálního inerty, který není zadržován pseudostacionární fází, t_{mc} retenční čas micel.

Látky více zadržované micelami mají delší retenční časy a naopak. Extrémně hydrofobní sloučeniny mohou být zcela zahrnuty do micel a mohou být detekovány při t_{mc} . Takovou látkou je *Sudan III*, který je používán ke značkování retenčního času micel t_{mc} .

Vedle nejhojněji využívané aniontové povrchově aktivní látky dodecylsírany sodného jsou využívány cetyltrimethylamoniumbromid (kationtová povrchově aktivní látka), žlučové soli (aniontové povrchově aktivní látky) a další. Separace pokaždé probíhají při vysokém pH, zajišťujícím dostatečný EOF. Do pufru mohou být také přidána organická rozpouštědla podobně jako v HPLC na obrácených fázích.

MECC je zvláště užitečná pro separaci ve vodě nerozpustných sloučenin jako např. steroidů.

MECC je technika blízká chromatografii na obrácených fázích. Avšak rozdělování složek je v MECC a HPLC rozdílné, což dává rozdílnou posloupnost pík. Jestliže složky nesou náboj, potom v MECC se uplatní jak jejich elektroforetická pohyblivost, tak rozdělování. Dalším rysem MECC je to, že všechny složky dávkované do kapiláry, jsou-li všechny rozpustné v elektrolytu, migrují mezi t_0 a t_{mc} . To je rozdílné od HPLC, kde některé složky mohou být nevratně vázány na stacionární fázi. MECC separace jsou prováděny v tomtéž zařízení jako FSCE a využívají kapilár podobných dimenzí.

Modifikací MECC je mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie (*MicroEmulsion ElectroKinetic capillary Chromatography* – MEEKC). Separacním prostředím je mikroemulze olejových kapiček v pufru obsahujícím povrchově aktivní látku. Olejové kapičky tvoří jádra micel. Obvykle používáme borátový pufr o vysokém pH, SDS a oktán. Ke stabilizaci emulze je často používán butan-1-ol. Separace v MEEKC jsou podobné jako v MECC a pro neutrální analyty jsou založeny na rozpustnosti a rozdělování.

Kapilární gelová elektroforéza

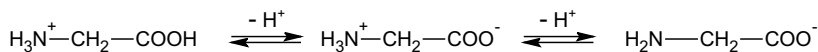
Velké biomolekuly (např. DNA) mohou mít podobné elektroforetické pohyblivosti, protože mají velmi blízký poměr náboje k hmotnosti. Elektroforéza ve volné kapiláře často pro dobré rozlišení nedostačuje. V tomto případě se separace provádí v kapilárách naplněných roztokem gelu. V kapilární gelové elektroforéze CGE se uplatňuje molekulově síťový efekt, který rozděljuje molekuly unášené přes gel k detektoru podobně jako v gelové permeační chromatografii.

Zpočátku byly v CGE používány polyakrylamidy kovalentně vázané na kapilární stěnu. Tyto fixované gely přinášely problémy s ucpáváním nebo ničením kapiláry kontaminovanou matricí vzorku, a proto měly krátkou životnost. Proto se dnes aplikují roztoky s gelem, kterými se plní kapilára až před separací. Tyto plnitelné gely používají derivatizované celulosy rozpuštěné v pufru. Užití kapalných gelů dovoluje jejich výměnu v kapiláře mezi jednotlivými dávkováními vzorků.

Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace CIEF je užívána pro separaci amfolytů. Při separaci se uplatňuje kromě elektroforetické pohyblivosti iontů i gradient pH prostředí elektrického pole.

Amfolyty obsahují kladnou i zápornou skupinu. Jejich molekula může existovat ve formě kladné, záporné i neutrální částice. Na to, v jaké podobě se nachází, má zásadní vliv pH prostředí. Typickými příklady amfolytů jsou aminokyseliny, peptidy a proteiny. Například glycin se v roztoku nachází v těchto formách:



Prostředí, ve kterém je amfolyt v elektricky neutrální formě, má právě určité pH. Toto pH se rovná izoelektrickému bodu pI příslušného amfolytu (pro uvedený glycin je pI = 6,064 při 20 °C). Jestliže je pH prostředí vyšší než izoelektrický bod, převládá záporná forma amfolytu, jestliže je nižší, převládá jeho kladná forma.

Původně byla používána izoelektrická fokusace v plošném uspořádání (IEF). Vzorek se zde aplikuje na skleněnou desku pokrytou akrylamidovou pryskyřicí nebo agarem. Tato vrstva je napuštěna soustavou pufrů tak, aby se pH na desce měnilo rovnoměrně od jednoho konce na druhý. Kladný pól se připojí na konec desky s nižším pH. Při elektroforéze se mohou pohybovat pouze nabitě částice. Amfolyt migruje tak dlouho, pokud je v nabitě formě a dokud nedosáhne místa, kde pH = pI. V tomto místě se jeho molekula stává elektroneutrální. Tak má každý amfolyt již předem vyhrazeno daným pH své konečné místo, ke kterému bude během elektroforézy směřovat, kde se nakonec zkoncentruje a po té detekuje.

V CIEF je kapilára naplněna pufrů s pH gradientem, který je stálý během separace. Vzorek je dávkován na konec kapiláry s nízkým pH a na tento konec je zapojen kladný pól. Kladně nabitě ionty putují podél kapiláry k detektoru. Když složka dosáhne pozice, kde pH = pI, ztrácí náboj a zastaví svou migraci. Různé složky si najdou své pozice v kapiláře. Jakmile jsou zóny zaostřeny, je aplikován do kapiláry tlak. Tím je obsah kapiláry posouván přes detektor, který detekuje separované zóny.

4. 3 Kapilární elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (*Capillary ElectroChromatography* – CEC) je rychle se rozvíjející technika, která kombinuje principy kapilární elektroforézy a HPLC. Jako kolony jsou používány kapiláry plněné mikročásticemi stacionární fáze o rozměrech 1,5 – 5 μm. K plnění kolon se používá rozličných technik, např. tlakového plnění suspenzí mikročástic v organickém rozpouš-

tědle nebo v nadkritickém oxidu uhličitým, aplikace EOF apod. Jde o náročnou operaci, při které nesmí vznikat bublinky ani být poškozena křehká kapilára. Jindy může být náplň vytvořena polymerací přímo v koloně.

Jsou používány náplňové kolony, které jsou rozměry samy o sobě kapilárami, i kapilární kolony, u nichž je stacionární fáze na vnitřním povrchu kapiláry (analogie podobných kapilárních kolon z plynové chromatografie).

Pro posun mobilní fáze kolonou není používáno čerpadlo jako v HPLC, ale aplikace stejnosměrného napětí a vyvolání elektroosmotického toku. V koloně nastává separace složek na stejných principech jako v HPLC (separace na obrácených fázích, na normálních fázích, gelová permeační chromatografie nebo iontově-výměnná chromatografie). Pro účinnost separace je velkou výhodou píستový profil EOF.

CEC je nová separační metoda využitelná pro neutrální, ale i nabitě látky nejrůznější chemické povahy od jednoduchých molekul po makromolekuly. Její vysoká účinnost a použitelnost pro nepatrná množství vzorků je předpokladem pro aplikace v biochemii, farmakologii, chemii životního prostředí atp.

4. 4 Izotachoforéza

Princip metody

Vzorek se vnáší mezi dva elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Separují se buď jenom kationty, nebo jenom anionty.

Separujeme-li kationty (pro separaci aniontů je postup analogický), vzorek se vnáší mezi vedoucí elektrolyt, jehož kationty mají vyšší pohyblivost, a koncový elektrolyt, jehož kationty mají nižší pohyblivost než kterýkoliv kation vzorku. Vedoucí elektrolyt je na začátku izotachoforézy obsažen v katodovém prostoru a v koloně, koncový elektrolyt v anodovém prostoru. Kromě separovaných kationtů jsou vždy obsaženy i opačně nabitě protiionty, jejichž přítomnost je podmínkou zachování elektroneutrálnosti v zónách. Je vhodné, aby protiionty ve všech elektrolytech (vedoucím, separovaném i koncovém) byly stejné.

Po připojení stejnosměrného napětí se udržuje konstantní proud řádově $10^2 \mu\text{A}$ a vzorek se začne dělit podle pohyblivosti svých složek. Rychlejší kationty se dostávají dopředu a pomalejší se opoždují. Po jisté době se ustaví stacionární stav. V něm tvoří jednotlivé kationty zóny seřazené za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti kationtů. Ve stacionárním stavu se zóny pohybují stálou a všechny stejnou rychlostí. Koncentrace iontu uvnitř zóny je konstantní. Závisí na jeho elektroforetické pohyblivosti a na koncentraci a druhu vedoucího elektrolytu. Obsahuje-li vzorek více určitých kationtů, vytvoří širší zónu. O koncentraci v zóně dané látky vždy rozhoduje koncentrace látky v předcházející zóně, počínaje vedoucím elektrolytem podle Kohlrauschovy regulační funkce:

$$c_{B,2} = c_{A,1} \frac{\mu_{eB} (\mu_{eA} + \mu_{eQ})}{\mu_{eA} (\mu_{eB} + \mu_{eQ})} \quad \text{rovnice 4-10}$$

A, B jsou ionty, 1, 2 pořadové číslo zóny a μ_{eQ} elektroforetická pohyblivost protiiontu.

To, že se méně pohyblivé ionty ve stacionárním stavu pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější, je způsobeno tím, že v každé zóně je jiný gradient potenciálu (potenciálový spád). Gradient potenciálu se vytváří tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí. Proto na méně pohyblivé ionty působí větší hnací síla.

Jednotlivé zóny jsou ve stacionárním stavu velmi ostré, protože zde působí samozaostřující efekt. Opustí-li kation vlivem difuze svou zónu a dostane se do zóny méně pohyblivých kationtů, kde na něj působí větší gradient potenciálu, je zvýšením hnací síly kation popoháněn zpět do své zóny (vzpomeňme na „stacking“ efekt v kap. 4.2). Opačným vlivem působí pokles gradientu potenciálu, a tím i hnací síly, když se náhodou kation dostane do zóny pohyblivějších kationtů.

Základní rozdíly proti elektroforéze jsou tyto:

- Pracujeme s konstantním proudem (u elektroforézy s konstantním napětím).
- Jednotlivé zóny se liší potenciálovým spádem, který silně závisí na pohyblivosti daných iontů (u elektroforézy byl potenciálový spád po délce kapiláry nebo desky rovnoměrný).
- Rychlost pohybu zón je ve stacionárním stavu konstantní (u elektroforézy se pohybují různými rychlostmi).
- Zóny v izotachoforéze na sebe navazují, v elektroforéze jsou odděleny.
- Nehrozí promísení zón díky samozaostřujícímu efektu (u elektroforézy se zóny molekulární difúzí rozšiřují).

Experimentální uspořádání

K separaci dochází v teflonové kapiláře vnitřního průměru asi 0,5 mm a délky asi 50 cm. Zařízení obsahuje zásobníky na vedoucí a koncový elektrolyt a vzorek. Dávkovat je možno podle potřeby u anodového nebo katodového prostoru. Elektroodové prostory jsou odděleny fritou, která brání proniknutí produktů elektrolyzy do kapiláry.

Detektory

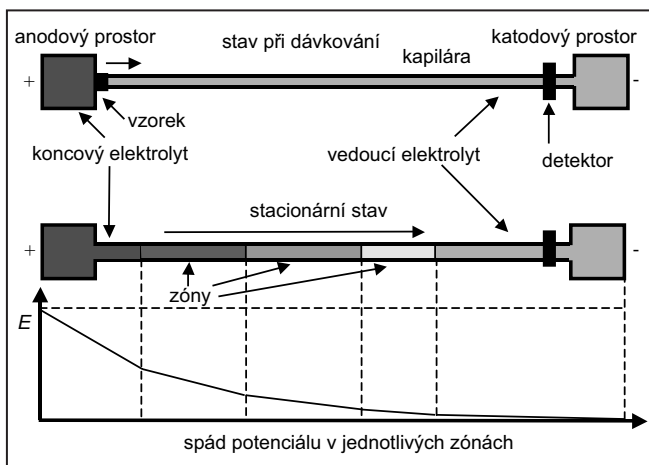
Detektory pro izotachoforézu se dělí na dvě skupiny:

- *Univerzální detektory*, jejichž odezva je určena pohyblivostí iontů v zóně:
 - Vodivostní detektory* měří vodivost zóny procházející přes detektor. Čidlem u kontaktních detektorů jsou dva platinové drátky vzdálené ve směru osy kapiláry asi 0,1 mm. Napětí mezi těmito drátky je úměrné gradientu potenciálu zóny.
 - Teplotní detektory* (termočlánky, termistory) měří teplotu v určitém místě kapiláry. Zóny, ve kterých je větší potenciálový spád, mají vyšší teplotu, protože v nich vzniká vyšší Jouleovo teplo (pro malou citlivost se již nepoužívají).
- *Specifické detektory*, jejichž odezva je určena jinými vlastnostmi látky v zóně než elektroforetickou pohyblivostí. Zejména je využíván *fotometrický detektor* sledující absorpci ultrafialového záření.

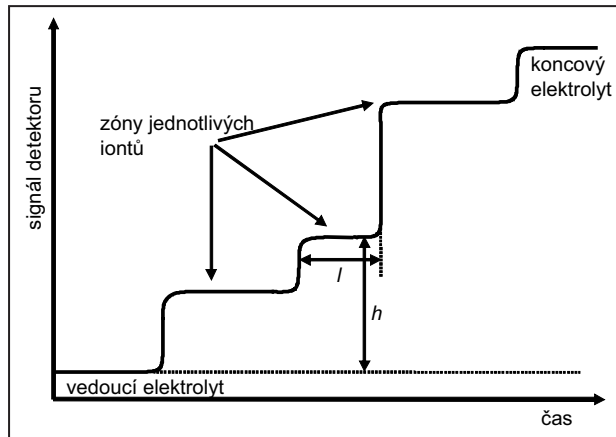
Izotachoforegram poskytnutý univerzálním detektorem má charakteristický průběh:

Informaci o kvalitě poskytuje výška zóny h a o kvantitě šířka zóny l . Zóna dané složky má za daných podmínek právě určitou koncentraci. Proto, když je obsah této složky ve vzorku vyšší, je zóna širší.

Izotachoforéza má využití všude tam, kde potřebujeme zjistit obsahy nepříliš složitých směsí iontů – v půdě, ve vodě, nápojích, hnojivech i vzorcích biologického původu.



Obrázek 49: Schéma izotachoforézy a průběh potenciálu v zónách



Obrázek 50: Izotachoforegram a jeho vyhodnocování

Cvičení

- 85) Co je společným principem elektromigračních separačních metod? Charakterizujte elektrokinetické jevy.
- 86) Co je to elektroforetická pohyblivost iontu? V jakých jednotkách se vyjadřuje?
- 87) Zvolte v uvedených tvrzeních správnou variantu z výběru:
- Rychleji se při elektroforéze pohybují ionty, které mají *menší* – *větší* elektroforetickou pohyblivost.
 - Před dosažením stacionárního stavu je odpor viskózního prostředí *větší* – *menší* než elektrická síla působící na nabitou částici.
 - S rostoucí rychlostí pohybu částice odpor viskózního prostředí působící proti jejímu pohybu *roste* – *klesá*.
 - Ve stacionárním stavu se nabitě částice pohybují *rovnoměrně zrychleným* – *přímočarým* pohybem.
- 88) Vyjádřete vztahy:
- pro sílu působící proti pohybu nabitě částice,
 - pro rychlost nabitě částice v pomoci intenzity elektrického pole E a náboje částice Q ,
 - pro elektroforetickou pohyblivost částice μ_e pomocí rychlosti pohybu částice v .
- 89) Při separaci látek v plošné zónové elektroforéze dochází ke vzniku zón. Jak je zabráněno jejich opětovnému promíchání? Jak se zóny detekují?
- 90) O čem vypovídá analytickému chemikovi poloha zóny v zónové elektroforéze?
- 91) Elektroforetická pohyblivost aniontu A^- je μ_e . Anion je součástí slabé kyseliny HA , která je za daných podmínek disociována ze 45 %. Jakou hodnotu bude mít efektivní pohyblivost aniontu A^- ?
- 92) Při separaci slabých elektrolytů elektroforézou se uplatňuje efektivní pohyblivost iontů určená stupněm disociace slabého elektrolytu.
- Vyjádřete stupeň disociace benzoové kyseliny z její disociační konstanty ($pK_A=4,2$).
 - Vypočítejte stupeň disociace benzoové kyseliny v % při hodnotách pH základního elektrolytu 2, 3, 4, 5 a 6. Při které z uvedených hodnot pH bude putovat zóna benzoové kyseliny nejrychleji?
- 93) Načrtněte a vysvětlete součásti zařízení pro kapilární elektroforézu.
- 94) Jaké jsou hlavní výhody kapilární elektroforézy ve srovnání s elektroforézou v plošném uspořádání?
- 95) Jaké způsoby dávkování v kapilární elektroforéze znáte? Srovnajte jejich výhody a nevýhody.
- 96) Vysvětlete podstatu a uplatnění elektroosmotického toku v kapilární elektroforéze ve volném roztoku.
- 97) Srovnajte účinnost separace v kapilární elektroforéze a ve vysoce účinné kapalinové chromatografii.

- 98) Výsledkem kapilární elektroforézy je elektroforegram. Popište jeho průběh.
- 99) Vysvětlete principy:
- micelární elektrokinetické kapilární chromatografie,
 - mikroemulzní elektrokinetické kapilární chromatografie,
 - kapilární gelové elektroforézy,
 - kapilární izoelektrické fokusace,
 - kapilární elektrochromatografie.
- 100) Definujte pojem amfolyt. Co udává hodnota izoelektrického bodu pro daný amfolyt?
- 101) Uvedte, v jakých formách se může objevovat v roztoku alanin (2-aminopropanová kyselina).
- Která forma bude převládat v kyselém prostředí?
 - Která forma bude převládat v zásaditém prostředí?
- 102) Popište, jaké vlastnosti musí mít prostředí, v němž se provádí izoelektrická fokusace? Na kterém místě se soustředí po ukončení fokusace daný amfolyt?
- 103) V kapiláře z taveného křemene je v neutrálním prostředí prováděna zónová kapilární elektroforéza. Vyberte správné odpovědi:
- Kapilára má vnitřní průměr v intervalu 10 – 100 μm .
 - Malý vnitřní průměr kapiláry brání difuzi a promísení separovaných částic.
 - Částice bez elektrického náboje se nepohybují.
 - Kationty se pohybují ke katodě a anionty k anodě.
- 104) Izotachoforézou budeme separovat anionty vzorku. Odpovězte na otázky týkající se stavu před spuštěním izotachoforézy:
- Jaký anion musí obsahovat vedoucí elektrolyt?
 - Jaký anion musí obsahovat koncový elektrolyt?
 - Na které místo kapiláry se dává vzorek?
 - Čím je vyplněna kapilára?
- 105) Označte správná a chybná tvrzení:
- Při izotachoforéze udržujeme konstantní napětí.
 - Při izotachoforéze udržujeme stálý elektrický proud.
 - Jednotlivé zóny ve stacionárním stavu jsou při izotachoforéze odděleny koncovým elektrolytem.
 - Koncentrace iontu je ve všech místech dané zóny konstantní.
 - Koncentrace iontu v zóně je určena jen druhem iontu a velikostí proudu. Nezávisí na koncentraci iontů v předcházejících zónách.
 - Zóna daného iontu bude mít jinou koncentraci, když bude mít jinou koncentraci vedoucí elektrolyt.
 - Všechny zóny se ve stacionárním stavu pohybují stejnou rychlostí.
- 106) Vyberte správné varianty pro izotachoforézu:
- Méně pohyblivé ionty se ve stacionárním stavu pohybují stejně rychle jako pohyblivější, protože je v jejich zóně *větší elektrický proud – spád elektrického potenciálu*.
 - Gradient potenciálu v zóně je tím vyšší, čím se v ní nachází *více pohyblivé – méně pohyblivé* ionty.
- 107) Popište a zdůvodněte, co se bude dít v izotachoforéze s iontem, který vlivem difuze pronikl do zóny:
- méně pohyblivých iontů;
 - pohyblivějších iontů.
- 108) Srovnajte separaci v zónové elektroforéze a izotachoforéze.
- 109) Charakterizujte detektory v izotachoforéze.
- 110) Načrtněte izotachoforegram se třemi ionty A, B a C, kde pohyblivost iontů klesá od A k C. Jakým způsobem se tento záznam vyhodnocuje?