

KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY

- 1) Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- 2) Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- 3) Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)
- 4) Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (EC, CEC)
- 5) Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF)
- 6) Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vhodná pro separaci molekul s nábojem (iontů) lišících se svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem.

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) umožňuje dělení vysokomolekulárních biologicky aktivních látek, jako peptidů, bílkovin, štěpů DNA a RNA.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC, MEKC) využívající micel vytvářených povrchově aktivními látkami (detergenty), se s výhodou používá pro separaci neutrálních molekul i iontů.

Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (EC, CEC) kombinuje elektroforetický a chromatografický separační mechanismus a umožňuje dělení neutrálních i nabitých molekul.

Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF) dělí látky amfolytické povahy (tj. látky, které mohou nést kladný, záporný nebo žádný náboj podle pH okolního prostředí) v lineárním pH gradientu.

Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP) separuje ionty podle rozdílných elektroforetických mobilit.

Elektromigrační separační metody využívají dvou transportních jevů, elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou.

Elektroforetickou migraci iontů rozumíme pohyb iontů v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. Ionty různých poloměru nesoucí různé náboje se v homogenním elektrickém poli pohybují konstantní elektroforetickou rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a velikosti náboje iontu a nepřímo úměrná jeho poloměru.

Elektroosmotický tok (elektroosmóza, EOF) je tok kapaliny kapilárou, v níž je vytvořeno elektrické pole vložením napětí desítek kilovoltů mezi elektrody na koncích kapiláry. Naplníme-li kapiláru z taveného křemene roztokem nějakého elektrolytu, dochází k disociaci křemičitanových skupin na vnitřní stěně kapiláry. Vnitřní povrch kapiláry tak získává negativní náboj a uvolňované vodíkové protony vytvářejí pozitivně nabitou vrstvu v roztoku přilehlém k vnitřní stěně kapiláry. Po vložení elektrického napětí mezi elektrody na koncích kapiláry dochází k pohybu hydratovaných vodíkových protonů ve vzniklém elektrickém poli směrem ke katodě. Tyto vodíkové protony obalené molekulami vody strhávají veškerý roztok uvnitř kapiláry s sebou směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok. Lineární rychlost elektroosmotického toku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a závisí na velikosti negativního náboje, který nese vnitřní stěna kapiláry. Čím je vyšší pH roztoku uvnitř kapiláry, tím větší negativní náboj je rozprostřen po vnitřní stěně a tím rychlejší elektroosmotický tok pozorujeme. Elektroosmotický tok vykazuje téměř rovinný rychlostní profil, který vede k velmi

malému rozmývání zón separovaných látek, a proto se v elektromigračních separačních metodách setkáváme s mnohem užšími píky než v HPLC.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE = Capillary Zone Electrophoresis) dělí molekuly s nábojem (ionty) na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř kapiláry unáší kladné i záporné ionty k detektoru a tyto ionty navíc migrují svými rozdílnými elektroforetickými rychlostmi uvnitř pufru, a tím se vzájemně dělí. Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat oba dva druhy iontů (kladné i záporné). Kapilární zónová elektroforéza je použitelná pouze pro nabitě molekuly (ionty).

Kapilární gelová elektroforéza (CGE = Capillary Gel Electrophoresis) dělí velké molekuly s nábojem (ionty) na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Kapilára je naplněna gelem, který zvyšuje rozdíly mezi elektroforetickými rychlostmi velkých iontů různých tvarů, jež jsou nuceny migrovat póry gelu. Přítomnost gelu zabraňuje vzniku elektroosmotického toku, a tak pouze jeden druh iontů (kladné nebo záporné) se pohybuje směrem k detektoru a mohou být separovány a detekovány během jednoho experimentu. Kapilární gelová elektroforéza je použitelná pouze pro ionty a využívá se zejména pro velké ionty jako peptidy, bílkoviny, sacharidy, štěpy DNA a RNA.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC, MEKC = Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography) dělí nabitě a především neutrální (hydrofobní a hydrofilní) molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodní a micelární fázi. Do vodního pufru (vodná fáze) je přidána povrchově aktivní látka (detergent, např. SDS = sodium dodecylsulphate = dodecylsírán sodný), který vytváří v pufru micely tzv. micelární, pseudostacionární fázi. Povrchově nabitě micely migrují uvnitř pufru vlastní elektroforetickou rychlostí a unáší molekuly a ionty separovaných sloučenin, které jsou více či méně přítomny uvnitř hydrofobních dutin (tj. prostůrků, interiérů popř. kavít) micel. Všechny micely migrují stejnou rychlostí, ale stupeň solvatace molekul micelami udává rychlost unášení těchto molekul micelami. Elektroosmotický tok pufru unáší micely a molekuly/ionty všech separovaných látek směrem k detektoru. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie je použitelná pro neutrální molekuly a ionty.

Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CE, CEC = Capillary Electrochromatography) dělí nabitě i neutrální molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je hnána pomocí elektroosmotického toku ložem stacionární fáze v naplněné kapiláře. Molekuly dělených látek jsou unášeny mobilní fázi k detektoru a zároveň zpožděny interakcí se stacionární fázi. Tato technika je modifikací mikrokapalinové chromatografie (mikro HPLC, CLC) a je vhodná pro neutrální molekuly i ionty.

Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF = Capillary Isoelectric Focusing) dělí molekuly mající amfolytickou povahu na základě jejich rozdílných isoelektrických bodů pI (tj. pH, při kterém má molekula celkový náboj roven nule). Dělicí kapilára se naplní roztokem dělených amfolytických látek a pomocného amfolytu, který je schopen pufrvat celý rozsah pH. Z opačných konců migrují do kapiláry OH⁻ a H⁺ ionty, které v ní vytvářejí spojitý lineární

pH gradient. Dělené molekuly (ionty) putují roztokem dokud nedosáhnou pH, které se rovná jejich pI. V tomto místě kapiláry (pH = pI) se stanou neutrální, zastaví se a vytvoří úzkou zónu (fokusují). Po fokusaci se zóny mobilizují (vedou do pohybu), aby prošly detektorem a byly detekovány. Kapilární izoelektrické fokusování je použitelné pouze pro amfolytické molekuly (tj. molekuly, které mohou mít kladný, záporný anebo žádný celkový náboj podle pH okolního prostředí).

Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP =Capillary Isotachopheresis) dělí ionty na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. Roztok dělených iontů je dávkován jako rozhraní dvou rozdílných pufrů. První pufr před vzorkem se nazývá vedoucí (leading) a obsahuje iont mající náboj stejného znaménka ale větší elektroforetickou pohyblivost než všechny separované ionty. Druhý pufr za vzorkem se nazývá uzavírající (terminating) a obsahuje iont stejného znaménka jako dělené ionty, ale má menší elektroforetickou pohyblivost než všechny dělené ionty. Každý separovaný iont vytváří během analýzy svoji vlastní zónu. Zóny všech dělených iontů jsou uzavřeny mezi vedoucí a uzavírající elektrolyt (pufr) a jsou seřazeny bezprostředně za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti dělených iontů. Kapilární izotachoforéza je použitelná pouze pro molekuly s nábojem (ionty). Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat pouze jeden druh iontů (kladné nebo záporné).

HISTORIE

první experimenty v U trubicích: **F. von Reuss** (1808), **G. Wiedeman** (1856), **H. Buff** (1858), **O. Lodge** (1886), **W. Whetham** (1893)

1897 **F. Kohlrausch** odvodil rovnici pro migraci iontů v roztoku elektrolytu

1. pol. 20. stol. gelová elektroforéza a isoelektrické fokusování na gelových deskách

1958 **S. Hjertén** ZE v rotujících trubicích 1-3 mm

1965 **A. Tiselius** ZE v 3 mm trubicích

1970 **F. Everaerts** ITP na vlastním přístroji

1974 **R. Virtanen** CZE v 200-500 µm skleněných kap.

1974 **V. Pretorius** EOF mobilní fáze sorbentem

1979 **F. Mikkers** CZE v 200 µm teflonových kapilár.

1981 **J. Jorgenson, K. Lukacs** CZE v 75 µm kapilárách

1983 **S. Hjertén** CGE pro biologické látky

1984 **S. Terabe** MEKC pro neutrální látky

1985 **S. Hjertén** CIEF pro biologické látky

1987 **J. Knox, I. Grant** CEC v 50 µm kapilárách s ODS

1987 **B. Karger, A. Cohen** vysoká účinnost CGE pro DNA

1988 dostupnost prvního komerčního přístroje (Beckman Instruments)

NÁZVOSLOVÍ

ACE	affinity capillary electrophoresis
CAE	capillary affinity electrophoresis
CD-MEKC	cyclodextrin micellar electrokinetic chromatography
CE	capillary electrophoresis
CEC	capillary electrochromatography
CES	capillary electroseparation
CGE	capillary gel electrophoresis
CIEF	capillary isoelectric focusing
CITP	capillary isotachopheresis
CMEC	capillary micellar electrokinetic chromatography
CZE	capillary zone electrophoresis
EC	electrochromatography
EKC	electrokinetic chromatography
FSCE	free solution capillary electrophoresis
FZE	free zone electrophoresis
HPCE	high performance capillary electrophoresis
HPE	high performance electrophoresis
HPZE	high performance zone electrophoresis
MEC	micellar electrokinetic chromatography
MECC	micellar electrokinetic capillary chromatography
MEEKC	microemulsion electrokinetic chromatography
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
OTEC	open tubular electrochromatography
SEKC	suspension electrokinetic chromatography

OPTIMALIZACE SEPARACE

CZE	pH druh a koncentrace pufru komplexační činidla organická rozpouštědla Mg ²⁺ , Ca ²⁺ chirální činidla
MECC	druh a koncentrace detergentu pH druh a koncentrace pufru organická rozpouštědla
CEC	druh stacionární fáze druh organického rozpouštědla koncentrace organického rozpouštědla pH chirální činidla