

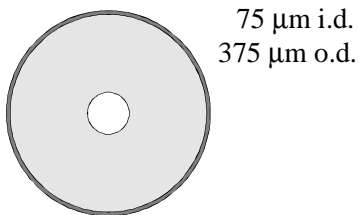
ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY

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

Kapilára z křemenného skla (fused silica) s vnější vrstvou polyimidu

vnitřní průměr : 50 , 75 nebo 100 μm

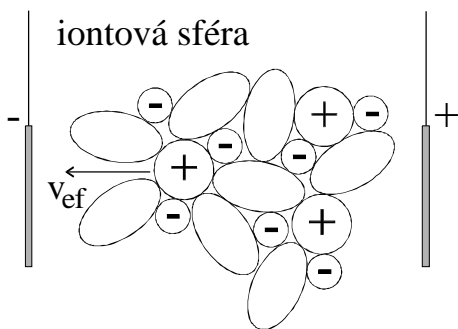
vnější průměr : 375 μm



Využití dvou transportních jevů :

1. **elektroforetická migrace iontů**
2. **elektroosmotický tok kapaliny**

ELEKTROFORETICKÁ MIGRACE



$$v_{ef,i} = m_{ef,i} \cdot E = m_{ef,i} \cdot \frac{U}{L}$$

elektroforetická rychlost : $v_{ef,i}$ [m/s]
 elektroforetická pohyblivost : $m_{ef,i}$ [m²/Vs]

$$F_{el,i} = Q_i \cdot E \quad F_{tr,i} = -6\pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_i$$

$$F_{el,i} = M_i \cdot a_i \quad F_{el,i} = -F_{tr,i}$$

$$m_{ef,i} = \frac{Q_i}{6\pi \cdot \eta \cdot r_i}$$

Iont	r_i [nm]	r_h [nm]	m_i [10 ⁻⁴ cm ² /Vs]
Li ⁺	0,152	0,380	4,01
Na ⁺	0,186	0,316	5,19
K ⁺	0,227	0,272	7,92
Rb ⁺	0,248	0,268	8,06
Cs ⁺	0,265	0,268	8,00

r_i iontový poloměr

r_h poloměr hydratovaného iontu

m_i limitní iontová pohyblivost

Iont	m_i [10 ⁻⁴ cm ² /Vs]
NO ₂ ⁻	-7,44
NO ₃ ⁻	-7,40
SO ₄ ²⁻	-8,29
HSO ₄ ²⁻	-5,18

m_i limitní iontová pohyblivost

elektroforetická pohyblivost

limitní iontová pohyblivost

- při nekonečném zředění, tj. při $I \rightarrow 0$

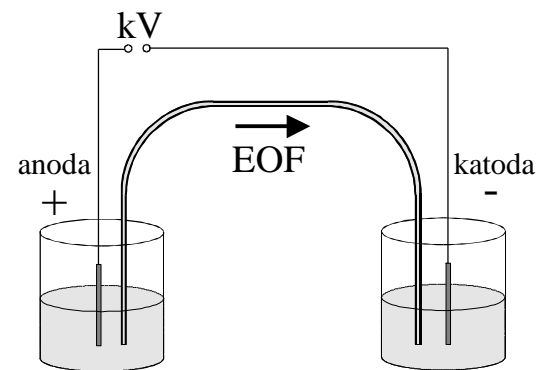
aktuální iontová pohyblivost

- při jisté koncentraci elektrolytů v roztoku, tj. při $I > 0$

efektivní poloměr iontu souvisí s hydratační sférou iontu

efektivní náboj iontu souvisí s iontovou silou roztoku, která se projevuje retardačním a relaxačním efektem

ELEKTROOSMOTICKÝ TOK (ELEKTROOSMÓZA)



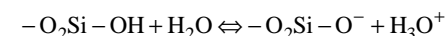
von Smoluchovského rovnice:

$$v_{eof} = m_{eof} \cdot E = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \cdot E$$

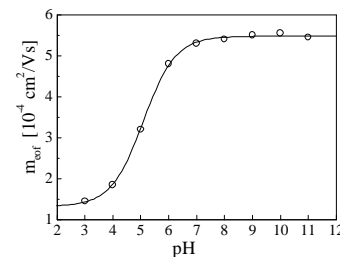
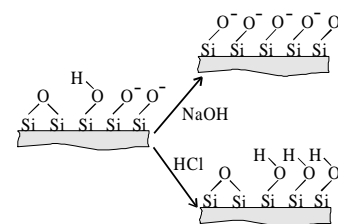
$L = 0,5$ m, $U = 30\,000$ V, $m_{eof} = 0,0005$ cm²/Vs

$\rightarrow v_{eof} = 3$ mm/s

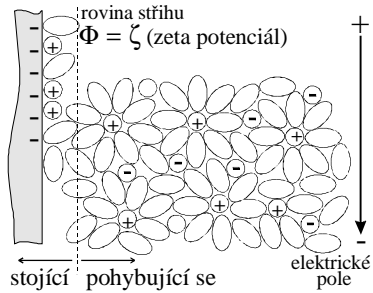
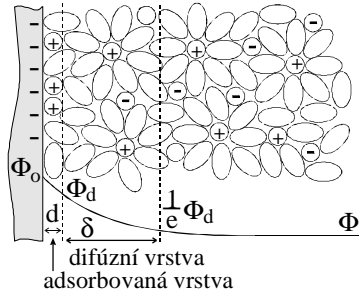
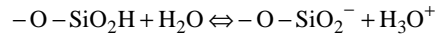
POVRCHOVÝ NÁBOJ



pK = 5,5

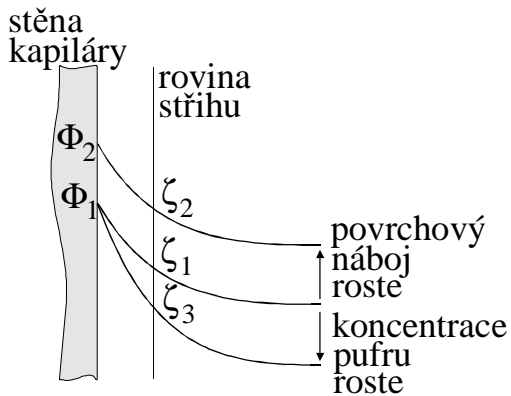


ELEKTRICKÁ DOJVRSTVA



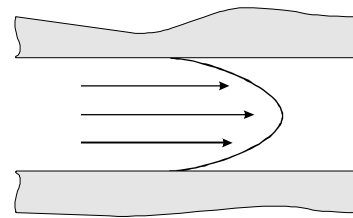
ZETA POTENCIÁL (ζ)

$$m_{\text{eof}} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_o \cdot \zeta}{\eta}$$



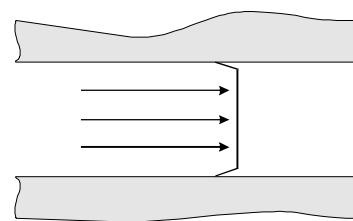
RYCHLOSTNÍ PROFIL

tlakem hnaná kapalina



parabolický profil

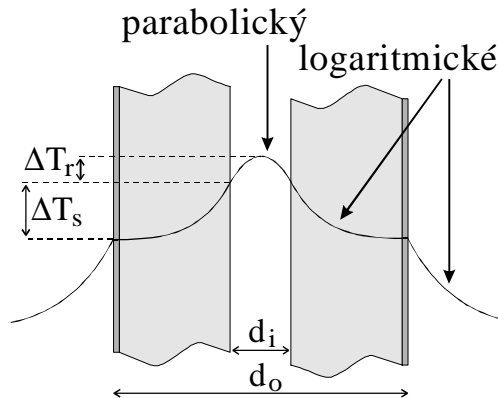
elektroosmoticky hnaná kapalina



rovný profil

TEPLOTNÍ PROFIL

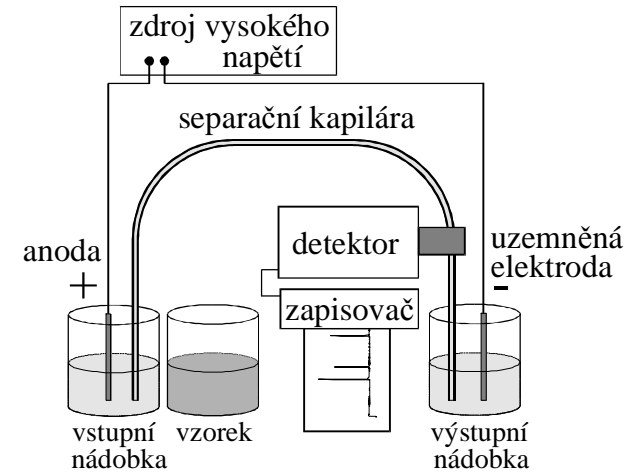
Jouleovo teplo : $Q = P = U \cdot J$



chlazení kapiláry :

- vzduchem
- kapalinou

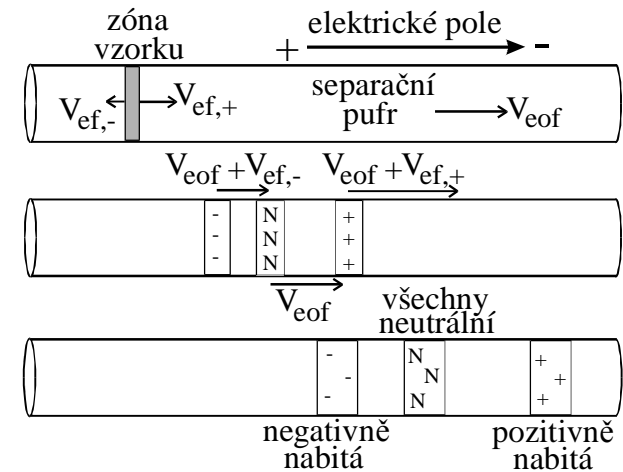
CZE - PŘÍSTROJ



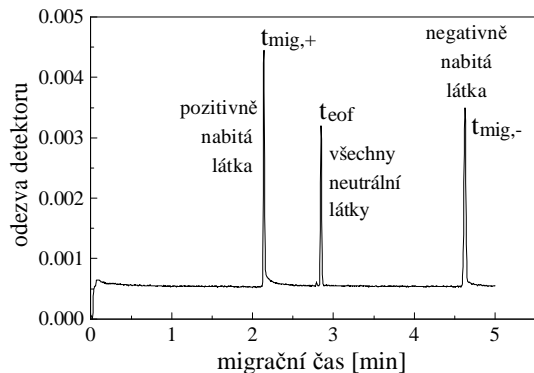
CZE - SEPARAČNÍ MECHANISMUS

rychlost zóny : $v_{\text{poz},i} = v_{\text{eof}} + v_{\text{ef},i}$

$v_{\text{eof}} > 0, v_{\text{ef},+} > 0, v_{\text{ef},-} < 0$



ELEKTROFEROGRAM



POČÍTÁNÍ POHYBLIVOSTÍ

$$t_{\text{mig},i}, t_{\text{eof}} \quad l_d, l_c, U, E = \frac{U}{l_c}$$

$$m_{\text{eof}} = \frac{v_{\text{eof}}}{E} = \frac{t_{\text{eof}}}{\frac{U}{l_c}} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{eof}} \cdot U}$$

$$m_{\text{poz},i} = m_{\text{eof}} + m_{\text{ef},i} = \frac{v_{\text{poz},i}}{E} = \frac{t_{\text{mig},i}}{\frac{U}{l_c}} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{mig},i} \cdot U}$$

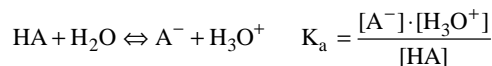
$$m_{\text{ef},i} = m_{\text{poz},i} - m_{\text{eof}}$$

$$m_{\text{ef},i} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{mig},i} \cdot U} - \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{eof}} \cdot U} = \left(\frac{1}{t_{\text{mig},i}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \cdot \frac{l_d \cdot l_c}{U}$$

$m_{\text{ef},i} > 0$ pro kationty
 $m_{\text{ef},i} < 0$ pro anionty

$m_{\text{poz},i} > 0$ pro oboje, pokud $|m_{\text{ef},i}| < |m_{\text{eof}}|$

SLABÉ ELEKTROLYTY (kyseliny)



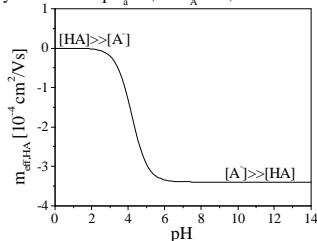
$$\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{10^{-\text{p}K_a}}{10^{-\text{p}K_a} + 10^{-\text{pH}}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}}$$

$$m_{\text{eff,HA}} = m_{\text{A}^-} \cdot \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = m_{\text{A}^-} \cdot \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}}$$

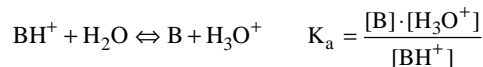
$m_{\text{eff,HA}}$ efektivní elektroforetická pohyblivost

m_{A^-} iontová pohyblivost

kys. benzoová $\text{p}K_a = 4,2$ $m_{\text{A}^-} = -3,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$



SLABÉ ELEKTROLYTY (zásady)



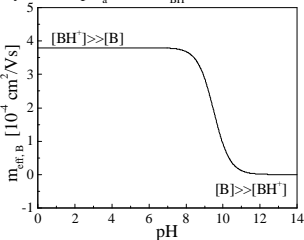
$$\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}] + [\text{BH}^+]} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{p}K_a}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}$$

$$m_{\text{eff,B}} = m_{\text{BH}^+} \cdot \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}] + [\text{BH}^+]} = m_{\text{BH}^+} \cdot \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}$$

$m_{\text{eff,B}}$ efektivní elektroforetická pohyblivost

m_{BH^+} iontová pohyblivost

tyramin $\text{p}K_a = 9,5$ $m_{\text{BH}^+} = 3,8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$



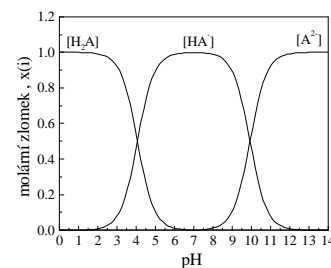
VÍCESYTNÉ ELEKTROLYTY

kyselina m-hydroxybenzoová

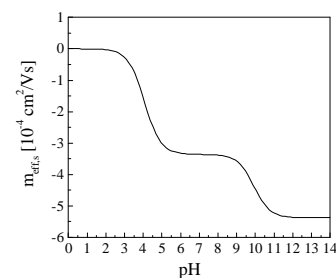
$\text{p}K_1 = 4,06$ $m_{\text{ef,HA}^-} = -3,36 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$

$\text{p}K_2 = 9,92$ $m_{\text{ef,A}^{2-}} = -5,38 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$

distribuční diagram



efektivní mobilita



$$m_{\text{eff,s}} = \frac{1}{c_s} \cdot \sum_{i=1}^f c_i \cdot m_{\text{ef},i} = \sum_{i=1}^f x_i \cdot m_{\text{ef},i}$$

PUFRY

tetraboritan sodný, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, $\text{p}K_a = 9,2$

kyselina fosforečná, fosforečnan, $\text{p}K_a = 2,1$, $m_i = -3,4$

kyselina fosforečná, fosforečnan, $\text{p}K_a = 7,2$, $m_i = -5,8$

kyselina fosforečná, fosforečnan, $\text{p}K_a = 12,7$, $m_i = -7,1$

kyselina octová, octan, CH_3COOH , $\text{p}K_a = 4,8$, $m_i = -4,2$

kyselina citronová, citrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $\text{p}K_a = 3,1$, $m_i = -3,1$

kyselina citronová, citrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $\text{p}K_a = 4,8$, $m_i = -5,4$

kyselina citronová, citrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $\text{p}K_a = 6,4$, $m_i = -7,0$

MES, $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{H}$, $\text{p}K_a = 6,1$, $m_i = -2,7$

MOPS, $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$, $\text{p}K_a = 7,2$, $m_i = -2,4$

TRIS, $(\text{HOCH}_2)_3\text{C}-\text{NH}_2$, $\text{p}K_a = 8,1$, $m_i = 2,9$

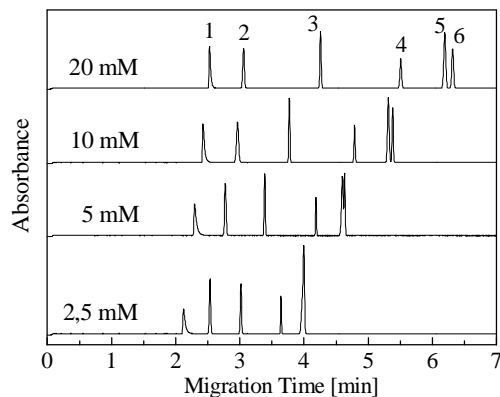
CHES, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{H}$, $\text{p}K_a = 9,5$

CAPS, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$, $\text{p}K_a = 10,4$

m_i [$10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$] iontová mobilita

VLIV KONCENTRACE PUFRU

1 tyramin, 2 thiomochovina, 3 uracil, 4 m-nitrofenol,
5 kyselina benzoová, 6 o-nitrofenol



Na ₂ B ₄ O ₇	meof[cm ² /Vs]	R _{5,6}
20mM	8,08·10 ⁻⁴	2,24
10mM	8,33·10 ⁻⁴	1,49
5mM	8,90·10 ⁻⁴	0,85
2,5mM	9,74·10 ⁻⁴	0

VODIVOST ELEKTROLYTU a MOBILITA

$$\text{specifická vodivost : } \kappa = \frac{J \cdot l_c}{A \cdot U} = \frac{j}{E} \quad [\Omega^{-1} \text{m}^{-1}]$$

$$\text{molární vodivost : } \Lambda = \frac{\kappa}{c} = \frac{j}{E \cdot c} \quad [\text{m}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}]$$

$$BY = (B^{z_B})_b (Y^{z_Y})_y$$

$$j_B = z_B \cdot F \cdot b \cdot c_{BY} \cdot v_{ef,B} = z_B \cdot F \cdot b \cdot c_{BY} \cdot m_{ef,B} \cdot E$$

$$j_Y = z_Y \cdot F \cdot y \cdot c_{BY} \cdot v_{ef,Y} = z_Y \cdot F \cdot y \cdot c_{BY} \cdot m_{ef,Y} \cdot E$$

$$j_{BY} = |j_B| + |j_Y| = F \cdot c_{BY} \cdot E \cdot |z_Y| \cdot y \cdot (|m_{ef,B}| + |m_{ef,Y}|)$$

$$|z_Y| \cdot y = z_B \cdot b$$

molární vodivost :

$$\Lambda_{BY} = \frac{j_{BY}}{E \cdot c_{BY}} = F \cdot z_B \cdot b \cdot (|m_{ef,B}| + |m_{ef,Y}|)$$

ekvivalentová vodivost :

$$\Lambda_{eqv,BY} = \frac{\Lambda_{BY}}{z_B \cdot b} = \frac{\Lambda_{BY}}{|z_Y| \cdot y} = F \cdot (|m_{ef,B}| + |m_{ef,Y}|)$$

$$\Lambda_{eqv,i} = \frac{\Lambda_i}{|z_i|} = F \cdot |m_{ef,i}|$$

$$m_{eff,s} = \frac{1}{c_s} \cdot \sum_{i=1}^f c_i \cdot m_{ef,i} = \frac{f}{\sum_{i=1}^f x_i} \cdot m_{ef,i}$$

ÚČINNOST SEPARACE

$$\sigma_L^2 = H \cdot l_d$$

$$N = \frac{l_d}{H}$$

rozmývání zón difúzí : $\sigma_{L,i}^2 = 2 \cdot D_i \cdot t_{mig,i}$

$$H_i = \frac{\sigma_{L,i}^2}{l_d} = \frac{2 \cdot D_i \cdot t_{mig,i}}{l_d} = \frac{2 \cdot D_i}{v_{poz,i} \cdot (m_{eff,i} + m_{eof}) \cdot E}$$

$$N_i = \frac{l_d}{H_i} = \frac{l_d \cdot E}{2 \cdot D_i} \cdot (m_{eff,i} + m_{eof})$$

z elektroferogramu :

$$N_i = 16 \cdot \frac{t_{mig,i}^2}{w_t^2} = 5,54 \cdot \frac{t_{mig,i}^2}{w_{t,1/2}^2}$$

$$H_i = \frac{l_d}{N_i}$$

celkové H:

$$H = H_{dávkování} + H_{difúze} + H_{adsorpce} + H_{Jouleovo teplo} + H_{elektrokinetická\ disperse} + H_{detekce}$$

ROZLIŠENÍ

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{mig,2} - t_{mig,1})}{w_{t,1} + w_{t,2}}$$

$$t_{mig,i} = \frac{l_d}{v_{poz,i}} = \frac{l_d}{(m_{eff,i} + m_{eof}) \cdot E}$$

$$w_{t,i} = \frac{4 \cdot l_d}{\sqrt{N} \cdot (m_{eff,i} + m_{eof}) \cdot E}$$

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{m_{eff,1} - m_{eff,2}}{(m_{eff,1} + m_{eof}) + (m_{eff,2} + m_{eof})}$$

$$\Delta m = m_{eff,1} - m_{eff,2}$$

$$\bar{m}_{poz} = \bar{m}_{eff} + m_{eof} = \frac{m_{eff,1} + m_{eff,2}}{2} + m_{eof}$$

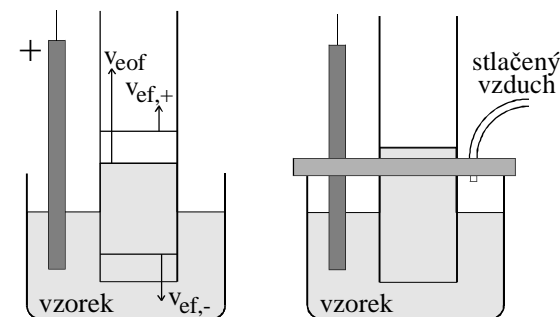
$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta m}{\bar{m}_{poz}}$$

$$R_{1,2} = \frac{1}{4\sqrt{2}} \cdot \Delta m \cdot \sqrt{\frac{E \cdot l_d}{D \cdot \bar{m}_{poz}}}$$

$$R_{1,2} = \frac{1}{4\sqrt{2}} \cdot \Delta m \cdot \sqrt{\frac{E \cdot l_d}{D \cdot (m_{eff} + m_{eof})}}$$

DÁVKOVÁNÍ VZORKU

elektrokinetické hydrodynamické



DETEKCE v CZE

1. absorpční fotometrický detektor (UV, VIS)
přímá a nepřímá detekce
2. fluorimetrický detektor
3. vodivostní detektor
4. amperometrický detektor
5. detektor s diodovým polem (DAD)
6. hmotnostní spektrometr jako detektor

ANALYTICKÁ INFORMACE Z ELEKTROFEROGRAMU

RESULTS

Peak	RT(min)	Height	Area	W50%
1	3.422	0.329	0.633	0.029
2	4.203	2.669	8.885	0.054
3	7.115	3.791	9.256	0.039
4	7.942	0.463	1.156	0.042
5	8.072	1.077	2.949	0.044

kvalitativní informace :

poloha píku – migrační čas

→ elektroforetická pohyblivost - druh látky

(metoda standardů)

kvantitativní informace :

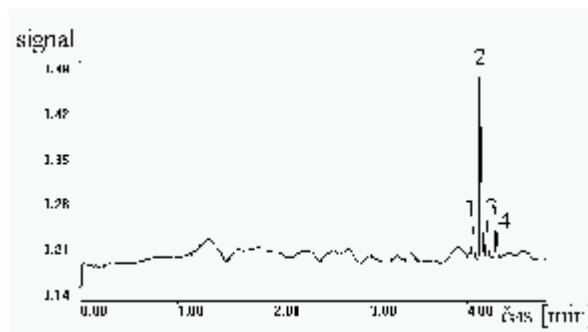
plocha píku → množství, koncentrace látky

- a) metoda kalibrační přímky
- b) metoda standardního přídatku
- c) metoda vnitřního standardu

CZE ANORGANICKÝCH ANIONTŮ

kapilára : 75 μm i.d., 61 cm, 72 cm
separační pufr : 5 mM K_2CrO_4 + 0,5 mM TTAB (pH = 8,0)
separační napětí : -15 kV (15 μA)
dávkování vzorku : 20 mBar / 6 s (\approx 13 nl)
nepřímá fotometrická detekce při 254 nm

- píky :
1. chloridy (18 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)
 2. sírany (69 mg/l; 0,9 ng ve 13 nl)
 3. dusitany (20 mg/l; 0,3 ng ve 13 nl)
 4. dusičnany (19 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)

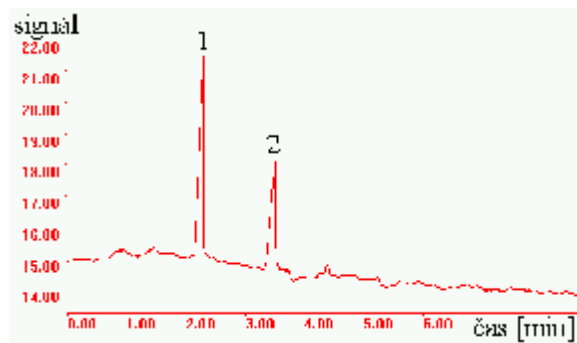


CZE ANORGANICKÝCH KATIONTŮ

kapilára : 75 μm i.d., 51 cm, 51 cm
separační pufr : 20 mM kyselina citronová + 10 mM LiOH
(pH = 2,8)

separační napětí : 30 kV (13 μA)
dávkování vzorku : 10 mBar / 6 s (\approx 9 nl)
vodivostní detekce

- píky :
1. K^+ (195 mg/l; 2 ng v 9 nl)
 2. Na^+ (115 mg/l; 1 ng v 9 nl)



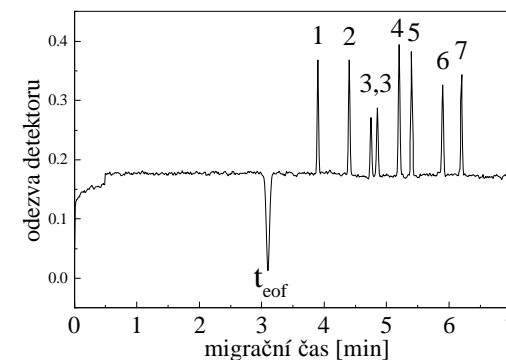
CZE HERBICIDŮ

kapilára : 50 μm i.d., 40 cm, 47 cm
separační pufr : 20 mM fosforečnan (pH = 5,6)
+ 2 mM α -cyclodextrin

separační napětí : 25 kV
dávkování vzorku : 35 mBar / 4 s (\approx 4,5 nl)
přímá UV fotometrická detekce při 200 nm

píky:

1. 4-(2,4-dichlorfenoxy)másečná kyselina
2. 4-(4-chlor-2-metylfenoxymásečná kyselina
3. 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová kyselina
4. 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
5. 4-chlor-2-metylfenoxyoctová kyselina
6. 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propionová kys.
7. 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina



CZE ROPINIROLU A JEHO NEČISTOT

kapilára : 50 μm i.d., 40 cm, 47 cm

separační pufr : 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + 30 mM MgSO_4

(pH = 8,7) s 20% CH_3CN

separační napětí : 30 kV (33 μA)

dávkování vzorku : 11 nl (2 mg/ml)

přímá UV fotometrická detekce při 254 nm

