

Capillary Zone Electrophoresis, CZE

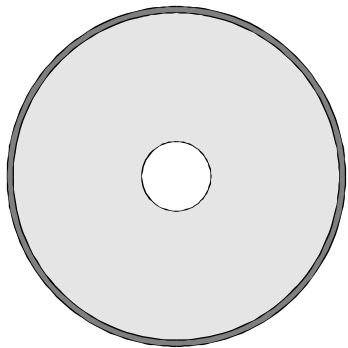
ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY

- 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

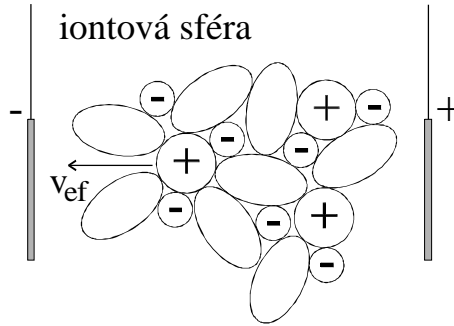


75 μm i.d.  
375 μm o.d.

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]

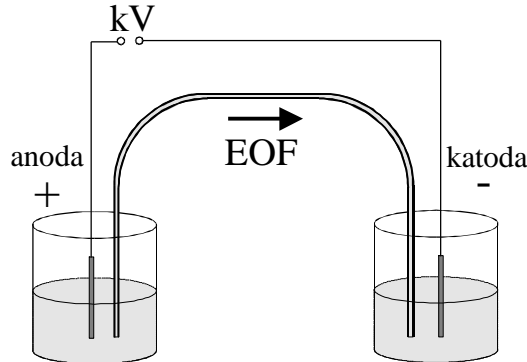
elektroforetická pohyblivost :  $m_{ef,i}$  [m<sup>2</sup>/Vs]

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

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

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

ELEKTROOSMOTICKÝ TOK (ELEKTROOSMÓZA)



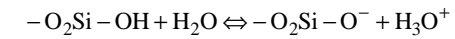
von Smoluchovského rovnice:

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

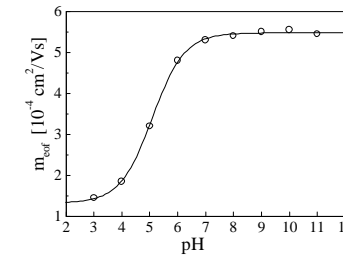
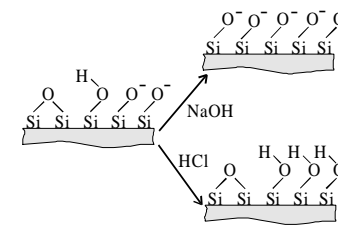
L = 0,5 m, U = 30 000 V,  $m_{eof} = 0,0005 \text{ cm}^2/\text{Vs}$

→  $v_{eof} = 3 \text{ mm/s}$

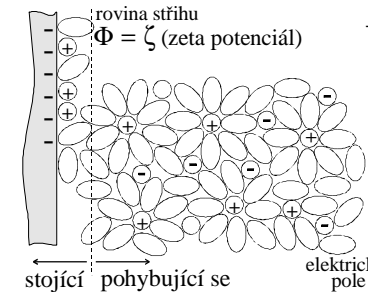
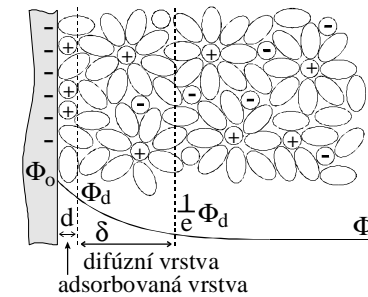
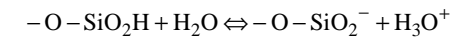
POVRCHOVÝ NÁBOJ



pK = 5,5

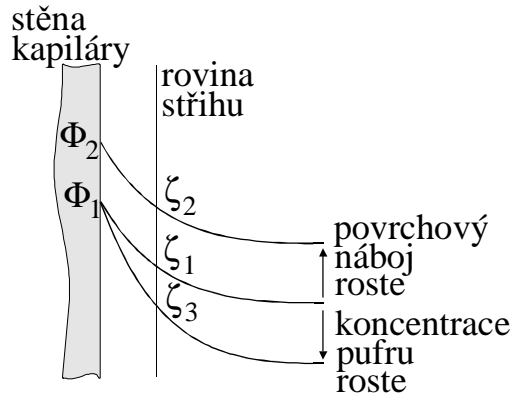


ELEKTRICKÁ DVOJVRSŤVA



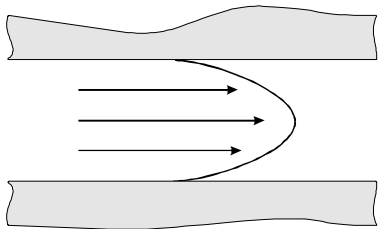
ZETA POTENCIÁL ( $\zeta$ )

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



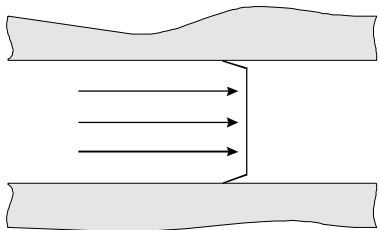
RYCHLOSTNÍ PROFIL

tlakem hnaná kapalina



parabolický profil

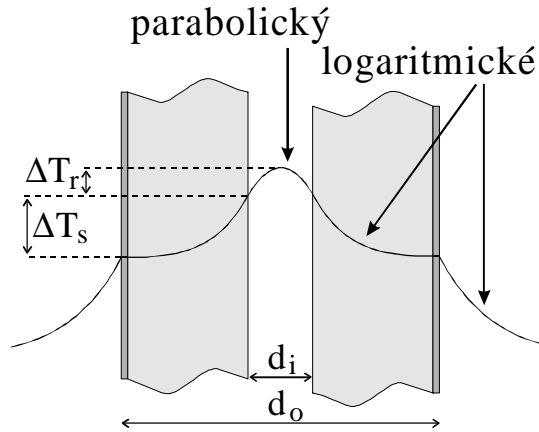
elektroosmoticky hnaná kapalina



rovný profil

TEPLOTNÍ PROFIL

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



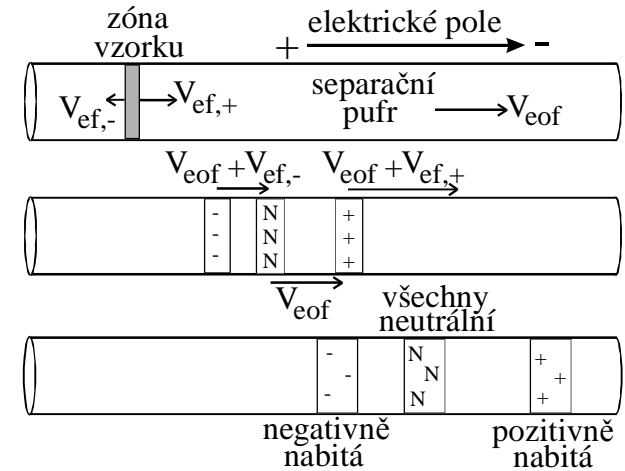
chlazení kapiláry :

- a) vzduchem
- b) kapalinou

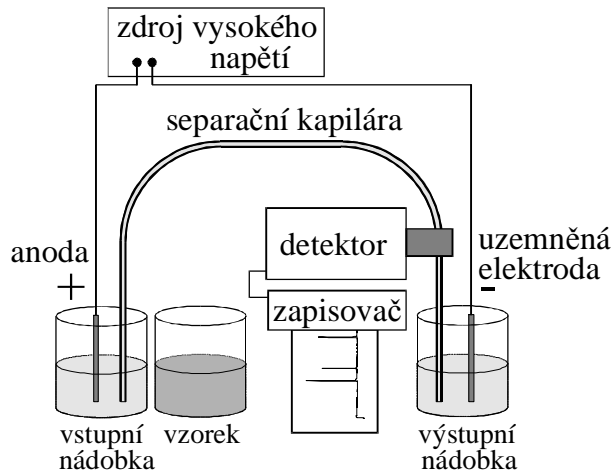
CZE - SEPARAČNÍ MECHANISMUS

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

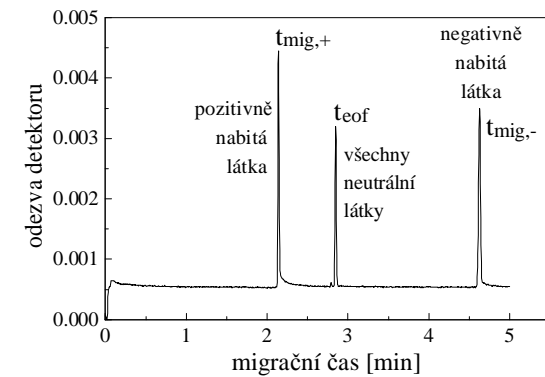
$v_{eof} > 0, v_{ef,+} > 0, v_{ef,-} < 0$



CZE - PŘÍSTROJ



ELEKTROFEROGRAM



## POČÍTÁNÍ POHYBLIVOSTÍ

$$t_{\text{mig},i}, t_{\text{eof}} \quad I_d, I_c, U, E = \frac{U}{I_c}$$

$$m_{\text{eof}} = \frac{v_{\text{eof}}}{E} = \frac{t_{\text{eof}}}{U} = \frac{I_d \cdot I_c}{t_{\text{eof}} \cdot U}$$

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

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

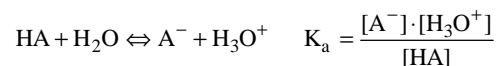
$$m_{\text{ef},i} = \frac{I_d \cdot I_c}{t_{\text{mig},i} \cdot U} - \frac{I_d \cdot I_c}{t_{\text{eof}} \cdot U} = \left( \frac{1}{t_{\text{mig},i}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \cdot \frac{I_d \cdot I_c}{U}$$

$m_{\text{ef},i} > 0$  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)



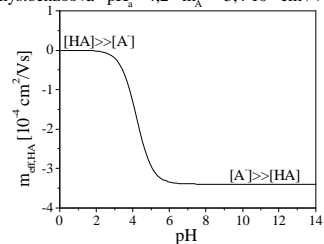
$$\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{10^{-\text{p}K_a}}{10^{-\text{p}K_a} + 10^{-\text{pH}}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}}$$

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

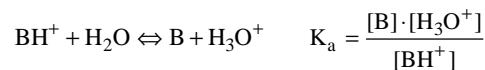
$m_{\text{eff,HA}}$  efektivní elektroforetická pohyblivost

$m_{\text{A}^-}$  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)

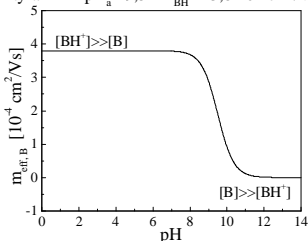


$$\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}] + [\text{BH}^+]} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{p}K_a}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}$$

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

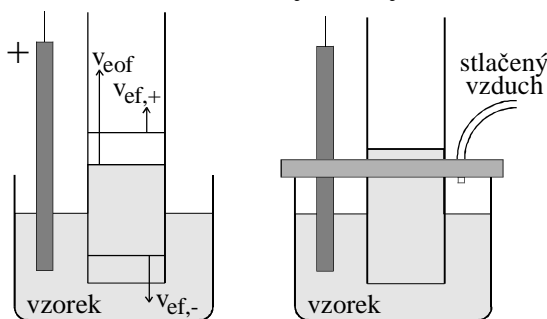
$m_{\text{eff,B}}$  efektivní elektroforetická pohyblivost  
 $m_{\text{BH}^+}$  iontová pohyblivost

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



## 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

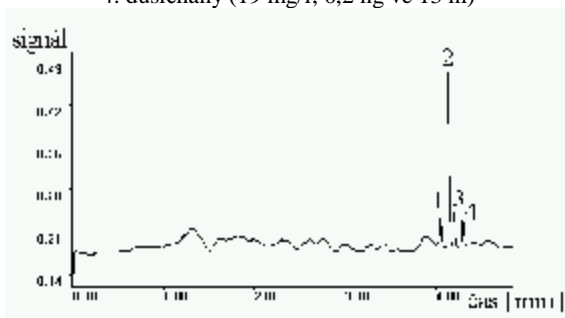
b) metoda standardního přídávku

c) metoda vnitřního standardu

### CZE ANORGANICKÝCH ANIONTŮ

kapilára : 75 µm i.d., 61 cm, 72 cm  
separační pufr : 5 mM K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> + 0,5 mM TTAB (pH = 8,0)  
separační napětí : -15 kV (15 µA)  
dávkování vzorku : 20 mBar / 6 s (≈ 13 nl)  
nepřímá fotometrická detekce při 254 nm

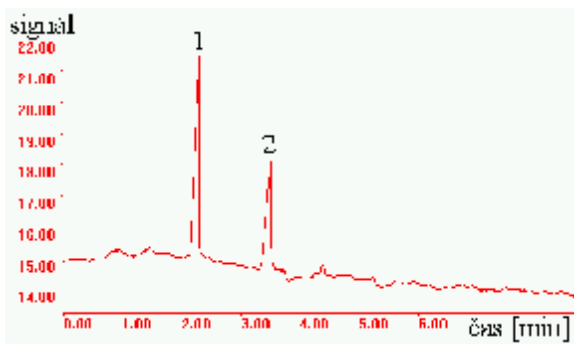
- píky :
1. chloridy (18 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)
  2. sírany (69 mg/l; 0,9 ng ve 13 nl)
  3. dusitany (20 mg/l; 0,3 ng ve 13 nl)
  4. dusičnany (19 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)



### 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 (≈ 9 nl)  
vodivostní detekce

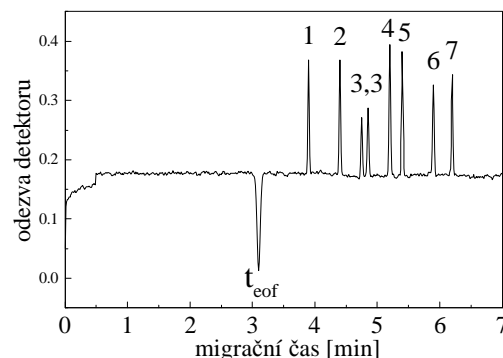
- píky :
1. K<sup>+</sup> (195 mg/l; 2 ng v 9 nl)
  2. Na<sup>+</sup> (115 mg/l; 1 ng v 9 nl)



### 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 (≈ 4,5 nl)  
přímá UV fotometrická detekce při 200 nm

- píky:
1. 4-(2,4-dichlorfenoxy)máselná kyselina
  2. 4-(4-chlor-2-metylfenoxy)máselná 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 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> + 30 mM MgSO<sub>4</sub> (pH = 8,7) s 20% CH<sub>3</sub>CN  
separační napětí : 30 kV (33 µA)  
dávkování vzorku : 11 nl (2 mg/ml)  
přímá UV fotometrická detekce při 254 nm

