

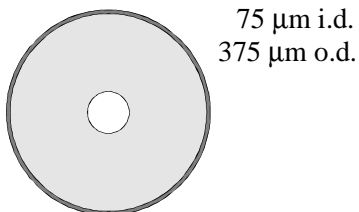
**ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY**

- 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

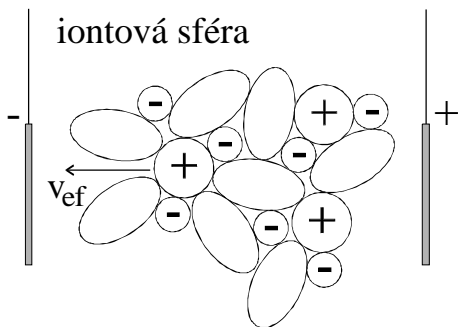
vnější průměr : 375 μm



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

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

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

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

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

$r_i$  iontový poloměr

$r_h$  poloměr hydratovaného iontu

$m_i$  limitní iontová pohyblivost

Ion	$m_i$ [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> /Vs]
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-7,44
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-7,40
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-8,29
HSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-5,18

$m_i$  limitní iontová pohyblivost

**elektroforetická pohyblivost**

limitní iontová pohyblivost

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

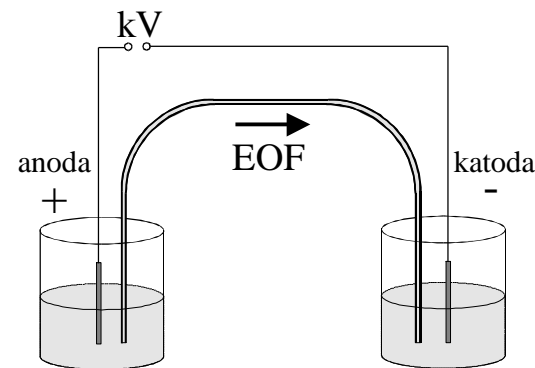
aktuální iontová pohyblivost

- 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)**



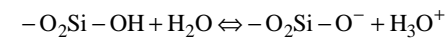
von Smoluchovského rovnice:

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

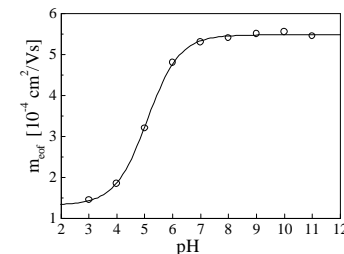
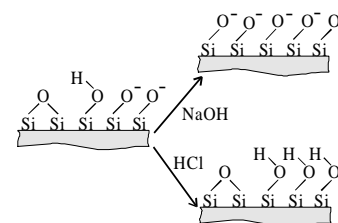
$L = 0,5$  m,  $U = 30\,000$  V,  $m_{eof} = 0,0005$  cm<sup>2</sup>/Vs

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

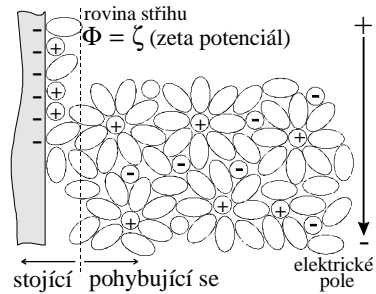
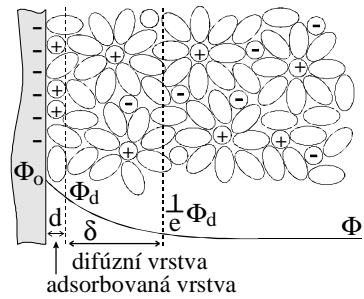
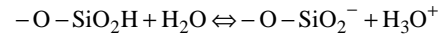
**POVRCHOVÝ NÁBOJ**



pK = 5,5

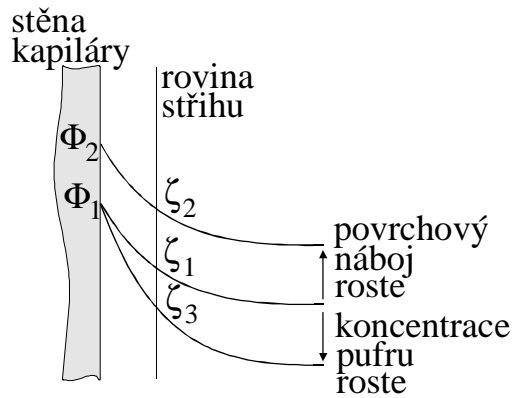


### ELEKTRICKÁ DVOJVRSTVA



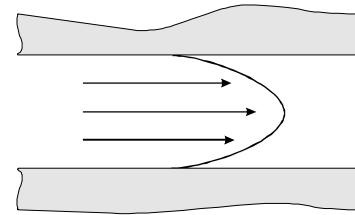
### ZETA POTENCIÁL (ζ)

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



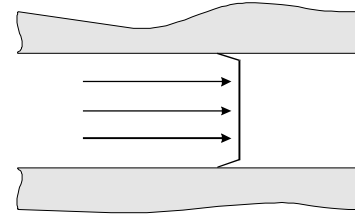
### RYCHLOSTNÍ PROFIL

tlakem hnaná kapalina



parabolický profil

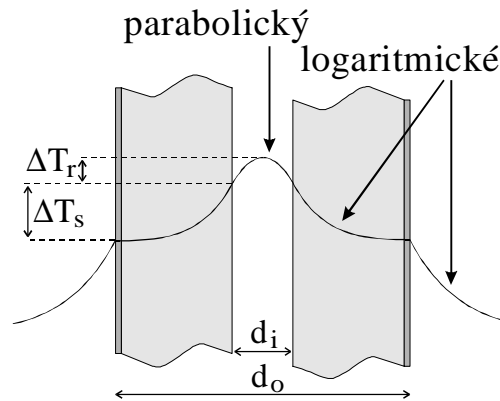
elektroosmoticky hnaná kapalina



rovný profil

### TEPLOTNÍ PROFIL

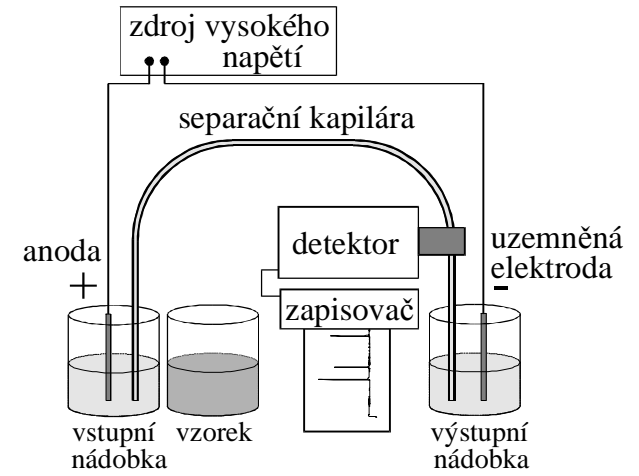
$$\text{Jouleovo teplo : } Q = P = U \cdot J$$



chlazení kapiláry :

- vzduchem
- kapalinou

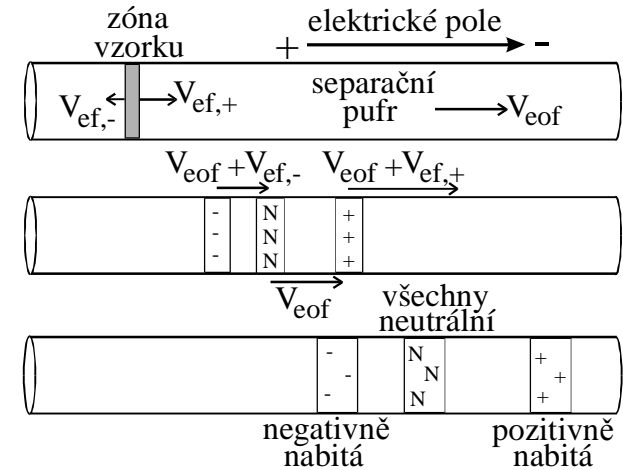
### CZE - PŘÍSTROJ



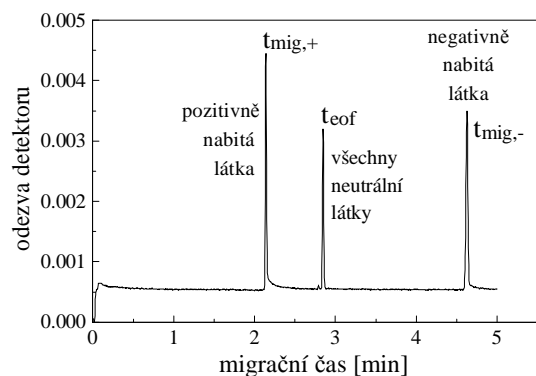
### CZE - SEPARAČNÍ MECHANISMUS

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

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



## ELEKTROFEROGRAM



## POČÍTÁNÍ POHYBLIVOSTÍ

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

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

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

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

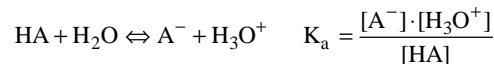
$$m_{\text{ef},i} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{mig},i} \cdot U} - \frac{l_d \cdot l_c}{t_{\text{eof}} \cdot U} = \left( \frac{1}{t_{\text{mig},i}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \cdot \frac{l_d \cdot l_c}{U}$$

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



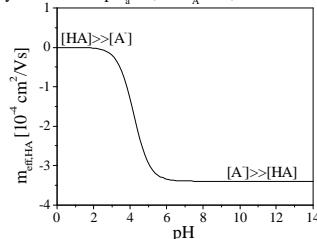
$$\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{10^{-\text{p}K_a}}{10^{-\text{p}K_a} + 10^{-\text{pH}}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}}$$

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

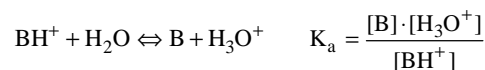
$m_{\text{eff,HA}}$  efektivní elektroforetická pohyblivost

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



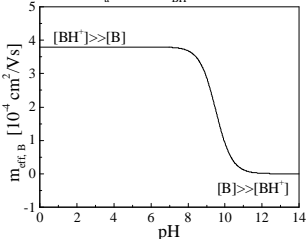
$$\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}] + [\text{BH}^+]} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{p}K_a}} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}$$

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

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

$m_{\text{BH}^+}$  iontová pohyblivost

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



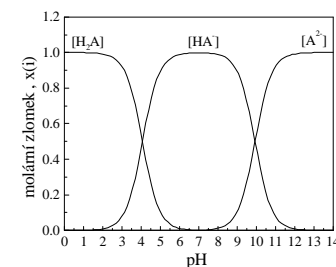
## VÍCESYTNÉ ELEKTROLYTY

kyselina m-hydroxybenzoová

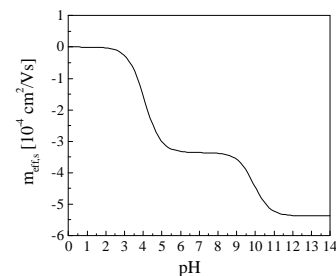
$\text{p}K_1 = 4,06$   $m_{\text{ef,HA}^-} = -3,36 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$

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

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,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{p}K_a = 4,8$ ,  $m_i = -4,2$

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

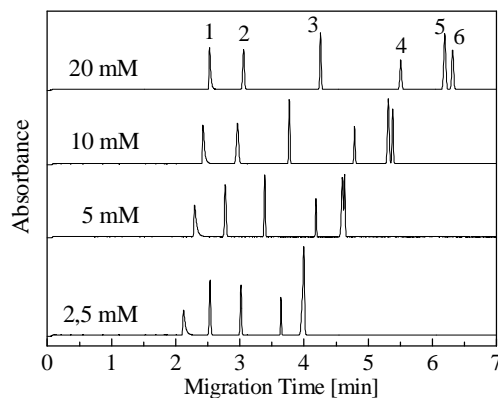
CHES,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{p}K_a = 9,5$

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 <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	meof[cm <sup>2</sup> /Vs]	R <sub>5,6</sub>
20mM	8,08·10 <sup>-4</sup>	2,24
10mM	8,33·10 <sup>-4</sup>	1,49
5mM	8,90·10 <sup>-4</sup>	0,85
2,5mM	9,74·10 <sup>-4</sup>	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 :

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

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

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

## ÚČINNOST SEPARACE

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

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

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

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

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

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:

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

## ROZLIŠENÍ

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

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

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

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

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

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

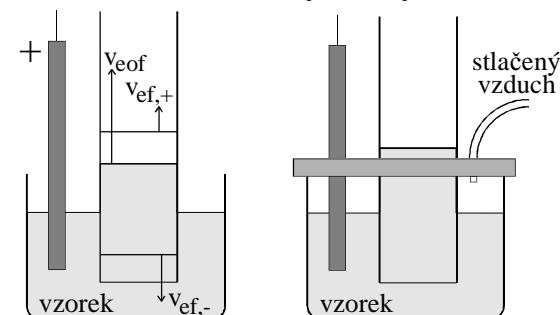
$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta m}{\bar{m}_{poz}}$$

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

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

## 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 :

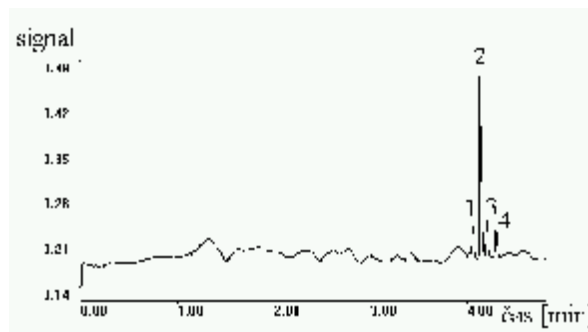
plocha píku → množství, koncentrace látky

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

## CZE ANORGANICKÝCH ANIONTŮ

kapilára : 75  $\mu\text{m}$  i.d., 61 cm, 72 cm  
separační pufr : 5 mM  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  + 0,5 mM TTAB (pH = 8,0)  
separační napětí : -15 kV (15  $\mu\text{A}$ )  
dávkování vzorku : 20 mBar / 6 s ( $\approx$  13 nl)  
nepřímá fotometrická detekce při 254 nm

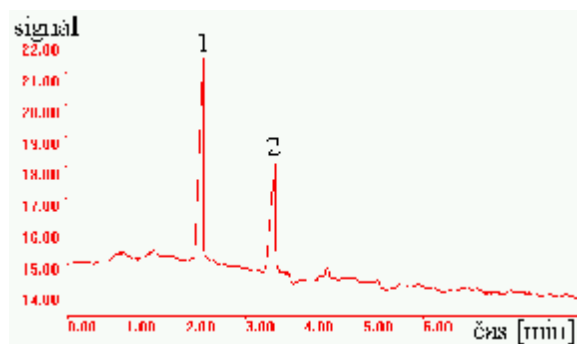
- píky :
1. chloridy (18 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)
  2. sírany (69 mg/l; 0,9 ng ve 13 nl)
  3. dusitany (20 mg/l; 0,3 ng ve 13 nl)
  4. dusičnany (19 mg/l; 0,2 ng ve 13 nl)



## CZE ANORGANICKÝCH KATIONTŮ

kapilára : 75  $\mu\text{m}$  i.d., 51 cm, 51 cm  
separační pufr : 20 mM kyselina citronová + 10 mM LiOH  
(pH = 2,8)  
separační napětí : 30 kV (13  $\mu\text{A}$ )  
dávkování vzorku : 10 mBar / 6 s ( $\approx$  9 nl)  
vodivostní detekce

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

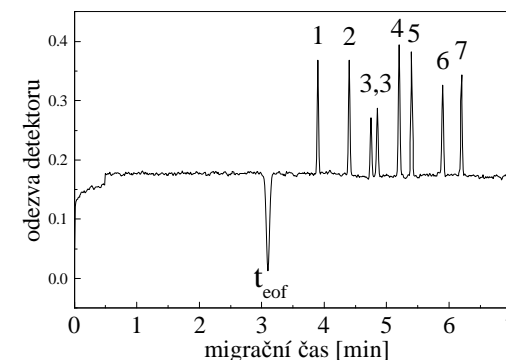


## CZE HERBICIDŮ

kapilára : 50  $\mu\text{m}$  i.d., 40 cm, 47 cm  
separační pufr : 20 mM fosforečnan (pH = 5,6)  
+ 2 mM  $\alpha$ -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)máslná kyselina
2. 4-(4-chlor-2-metylfenoxymáslná kyselina
3. 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová kyselina
4. 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
5. 4-chlor-2-metylfenoxycetová kyselina
6. 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propionová kys.
7. 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina



## CZE ROPINIROLU A JEHO NEČISTOT

kapilára : 50  $\mu\text{m}$  i.d., 40 cm, 47 cm

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

(pH = 8,7) s 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$

separační napětí : 30 kV (33  $\mu\text{A}$ )

dávkování vzorku : 11 nl ( 2 mg/ml )

přímá UV fotometrická detekce při 254 nm

