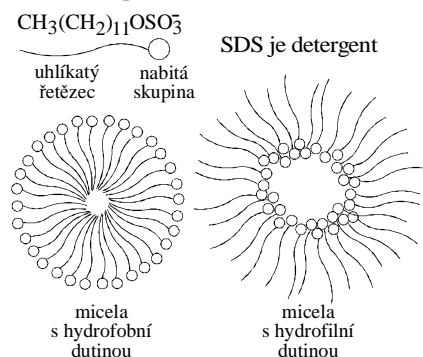


## Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC

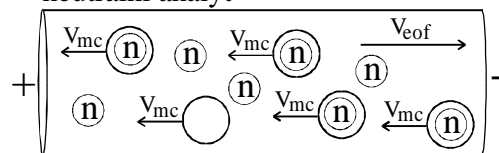
### MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRAFIE (MECC, MEKC)

Separáčnı pufr obsahuje povrchově aktivnı látku (detergent), která vytváří ve vodném pufru micely, které dobře rozpouštějí lipofilnı látky. Micely jsou pseudostacionární fáze s hydrofobnımi dutinami, které dobře rozpouštějí lipofilnı látky. Micely nesou na svém povrchu elektrický náboj a vykazují vlastní elektroforetickou migraci v elektrickém poli. Analyty s rozdílnou hydrofobitou podléhají rozdílné distribuci mezi vodnou a micelární fází. Více lipofilnı analyty jsou pohybující se pseudostacionární fází více rozpouštěny a rychleji unášeny. Rozdíly v rychlostech micelami rozpouštěných a unášených analytů vedou k jejich vzájemné separaci. Metoda je vhodná pro neutrálnı i nabitě analyty a nelze ji kombinovat s MS detekcí.

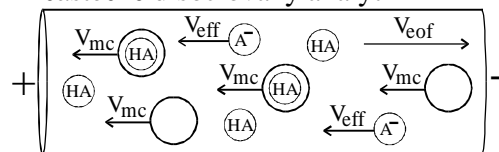
### MECC – separáčnı mechanismus



### neutrálnı analyt



### částečně disociovaný analyt



## DETERGENTY

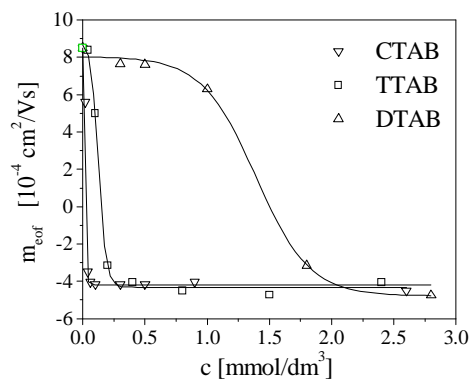
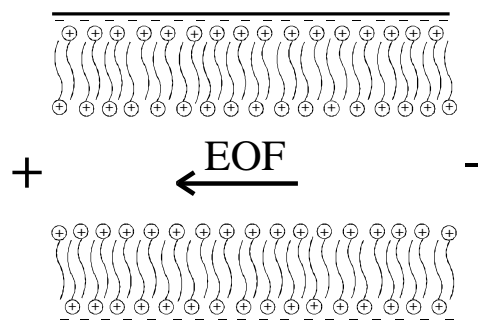
|  | CMC  | n   | MW    |
|--|------|-----|-------|
| <b>aniontové</b>                       |      |     |       |
| dodecylsírán sodný, SDS                | 8,3  | 62  | 18000 |
| dodecylsulfonan sodný                  | 9,8  | 54  | 15000 |
| kyselina cholová                       | 14,0 | 3   | 14000 |
| kyselina deoxycholová                  | 5,0  | 4   | 17000 |
| <b>kationtové</b>                      |      |     |       |
| dodecyltrimetylamoniumbromid, DTAB     | 14,6 | 61  | 19300 |
| tetradecyltrimetylamoniumbromid, TTAB  | 4,4  | 64  | 19000 |
| hexadecyltrimetylamoniumbromid, CTAB   | 0,9  | 78  | 28000 |
| <b>neiontové</b>                       |      |     |       |
| polyoxyethylen-23-laurylether, Brij 35 | 0,1  | 40  | 48000 |
| Triton X-100                           | 0,2  | 140 | 90000 |

CMC [mmol/dm<sup>3</sup>] = kritická micelární koncentrace

n = agregační číslo

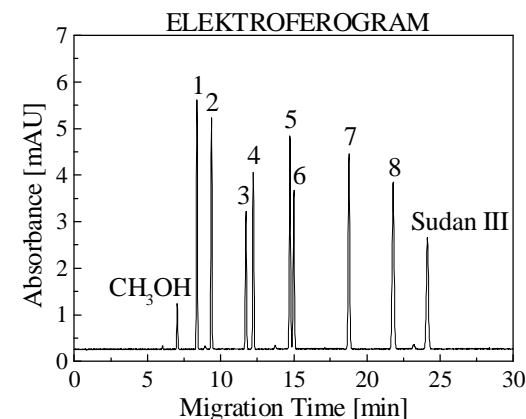
MW [g/mol] = micelární hmotnost

### OBRÁCENÍ EOF POMOCÍ DETERGENTU



## RETENČNÍ FAKTOR v MECC

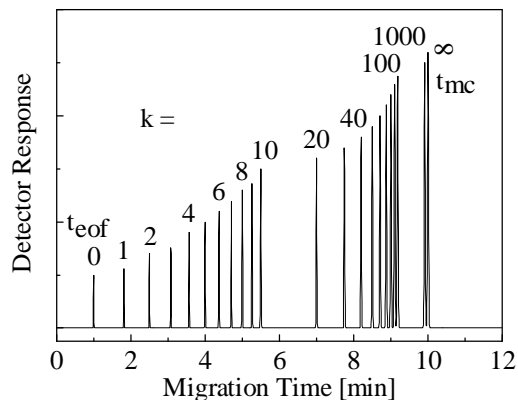
10 mM TRIS / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH= 8,5), 50 mM SDS



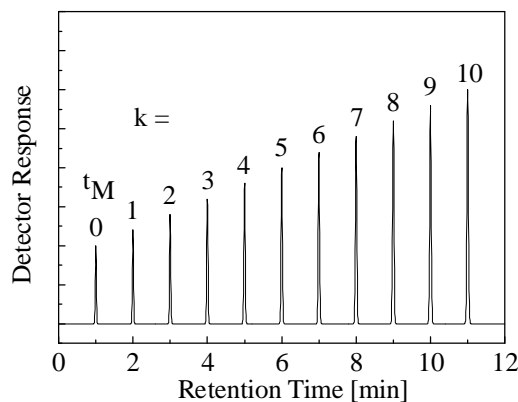
|                       | $t_{\text{mig}}$ [min] | k        |
|-----------------------|------------------------|----------|
| methanol              | 7,0                    | 0        |
| 1 1,3-dihydroxybenzen | 8,3                    | 0,27     |
| 2 fenol               | 9,4                    | 0,55     |
| 3 p-nitroanilin       | 11,6                   | 1,28     |
| 4 4-methylfenol       | 12,3                   | 1,54     |
| 5 2,6-dimethylfenol   | 14,8                   | 2,89     |
| 6 toluen              | 15,0                   | 3,06     |
| 7 1,2-dimethylbenzen  | 18,8                   | 7,70     |
| 8 propylbenzen        | 21,8                   | 23,17    |
| Sudan III             | 24,0                   | $\infty$ |

## ELUČNÍ OKNO v MECC a HPLC

### MECC



### HPLC



## DISTRIBUCE NEUTRÁLNÍCH LÁTEK v MECC

micelární fáze = pseudostacionární fáze = mc

vodná fáze = aq

$$\text{distribuční konstanta : } K_{D,i} = \frac{(c_i)_{mc}}{(c_i)_{aq}}$$

retenční faktor :

$$k_i = \frac{(n_i)_{mc}}{(n_i)_{aq}} = K_{D,i} \cdot \frac{V_{mc}}{V_{aq}} = K_{D,i} \cdot \frac{\bar{V}_{mc} \cdot (c_s - CMC)}{1 - \bar{V}_{mc} \cdot (c_s - CMC)}$$

$\bar{V}_{mc}$  parciální molární objem micel

pro malé koncentrace detergentu :

$$k_i \cong K_{D,i} \cdot \bar{V}_{mc} \cdot (c_s - CMC)$$

$$\bar{V}_{SDS, 23^\circ C} = 0,25 \text{ dm}^3 / \text{mol}$$

$$CMC_{SDS} = 8,3 \text{ mmol} / \text{dm}^3$$

## POZOROVANÁ RYCHLOST NEUTRÁLNÍCH LÁTEK v MECC

$$v_{eof} = m_{eof} \cdot E \quad v_{mc} = m_{mc} \cdot E$$

$m_{mc}$  efektivní mobilita micel

$$v_{poz,mc} = v_{eof} + v_{mc} = (m_{mc} + m_{eof}) \cdot E$$

$$v_{poz,i} = \frac{(n_i)_{aq}}{(n_i)_{aq} + (n_i)_{mc}} \cdot v_{eof} + \frac{(n_i)_{mc}}{(n_i)_{aq} + (n_i)_{mc}} \cdot v_{poz,mc}$$

$$\frac{(n_i)_{aq}}{(n_i)_{aq} + (n_i)_{mc}} = \frac{1}{1 + k_i}$$

$$\frac{(n_i)_{mc}}{(n_i)_{aq} + (n_i)_{mc}} = \frac{k_i}{1 + k_i}$$

$$v_{poz,i} = \frac{1}{1 + k_i} \cdot m_{eof} \cdot E + \frac{k_i}{1 + k_i} \cdot (m_{mc} + m_{eof}) \cdot E$$

$$v_{poz,i} = (m_{eof} + \frac{k_i}{1 + k_i} \cdot m_{mc}) \cdot E$$

z elektroferogramu :  $t_{eof}, t_{mig,i}, t_{mc}$

$$k_i = \frac{t_{mig,i} - t_{eof}}{t_{eof} \cdot \left(1 - \frac{t_{mig,i}}{t_{mc}}\right)}$$

PSEUDOEFektivní MOBILITA NEUTRÁLNÍCH LÁTEK v MECC

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

$m_{\text{eff},i}^{\text{ps}}$  pseudo-efektivní mobilita

z elektroferogramu :  $t_{\text{mig},i}$ ,  $t_{\text{eof}}$   
(nepotřebujeme znát  $t_{\text{mc}}$ )

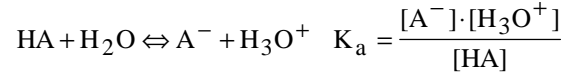
$$m_{\text{eff},i}^{\text{ps}} = \frac{I_d \cdot I_c}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_{\text{mig},i}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right)$$

$$m_{\text{eff},i}^{\text{ps}} = \frac{k_i}{1+k_i} \cdot m_{\text{mc}}$$

$$k_i = \frac{m_{\text{eff},i}^{\text{ps}}}{m_{\text{mc}} - m_{\text{eff},i}^{\text{ps}}}$$

$$0 \leq k_i \leq \infty \quad 0 \leq \left| m_{\text{eff},i}^{\text{ps}} \right| \leq \left| m_{\text{mc}} \right|$$

DISTRIBUCE NABITÝCH LÁTEK v MECC



$$K_{D,\text{HA}} = \frac{(c_{\text{HA}})_{\text{mc}}}{(c_{\text{HA}})_{\text{aq}}} \quad K_{D,\text{A}^-} = \frac{(c_{\text{A}^-})_{\text{mc}}}{(c_{\text{A}^-})_{\text{aq}}}$$

$$k_i = k_{\text{HA},\text{A}^-} = \frac{(n_i)_{\text{mc}}}{(n_i)_{\text{aq}}}$$

$$k_i = \frac{[\text{HA}]_{\text{aq}}}{[\text{HA}]_{\text{aq}} + [\text{A}^-]_{\text{aq}}} \cdot k_{\text{HA}} + \frac{[\text{A}^-]_{\text{aq}}}{[\text{HA}]_{\text{aq}} + [\text{A}^-]_{\text{aq}}} \cdot k_{\text{A}^-}$$

$$k_i = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{aq}} \cdot k_{\text{HA}} + K_a \cdot k_{\text{A}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{aq}} + K_a} = \frac{10^{-\text{pH}} \cdot k_{\text{HA}} + 10^{-\text{p}K_a} \cdot k_{\text{A}^-}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{p}K_a}}$$

$$k_i = \frac{k_{\text{HA}} + k_{\text{A}^-} \cdot 10^{(\text{pH}-\text{p}K_a)}}{1 + 10^{(\text{pH}-\text{p}K_a)}} = \frac{k_{\text{A}^-} + k_{\text{HA}} \cdot 10^{(\text{p}K_a-\text{pH})}}{1 + 10^{(\text{p}K_a-\text{pH})}}$$

z elektroferogramu : **nelze použít následující rovnici**

$$k_i = \frac{t_{\text{mig},i} - t_{\text{eof}}}{t_{\text{eof}} \cdot \left( 1 - \frac{t_{\text{mig},i}}{t_{\text{mc}}} \right)}$$

CELKOVÁ MOBILITA NABITÝCH LÁTEK v MECC

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

$m_{\text{eff},i}^{\text{ov}}$  celková (overall) efektivní mobilita

z elektroferogramu :  $t_{\text{mig},i}$ ,  $t_{\text{eof}}$   
(nepotřebujeme znát  $t_{\text{mc}}$ )

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

$$m_{\text{eff},i}^{\text{ov}} = \frac{1}{1+k_i} \cdot (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}} + \frac{k_i}{1+k_i} \cdot m_{\text{mc}}$$

$$k_i = \frac{m_{\text{eff},i}^{\text{ov}} - (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}}}{m_{\text{mc}} - m_{\text{eff},i}^{\text{ov}}}$$

$$0 \leq k_i \leq \infty$$

$$\left| (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}} \right| \leq \left| m_{\text{mc}} \right| \quad \text{pak} \quad \left| (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}} \right| \leq \left| m_{\text{eff},i}^{\text{ov}} \right| \leq \left| m_{\text{mc}} \right|$$

$$\left| (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}} \right| \geq \left| m_{\text{mc}} \right| \quad \text{pak} \quad \left| (m_{\text{eff},i})_{\text{aq}} \right| \geq \left| m_{\text{eff},i}^{\text{ov}} \right| \geq \left| m_{\text{mc}} \right|$$

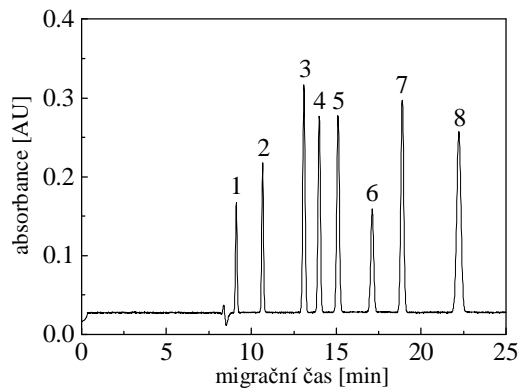
### MECC : VITAMÍNY

*J.Chromatogr., 447(1988)133-140*

100  $\mu\text{m}$  I.D., 50 cm, 80 cm  
20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH = 9,0), 50 mM SDS  
15 kV (100  $\mu\text{A}$ ), UV detekce při 254 nm

píky :

1 nikotinamid ( $\text{B}_3$ ), 2 pyridoxin ( $\text{B}_6$ ), 3 kyanokobalamin ( $\text{B}_{12}$ ),  
4 kyselina askorbová (C), 5 riboflavin ( $\text{B}_2$ ), 6 kyselina  
nikotinová, 7 ethyl-p-aminobenzoát (vnitřní standard), 8  
thiamin ( $\text{B}_1$ )

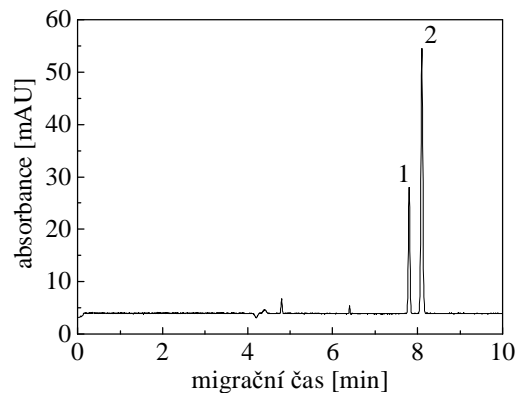


### MECC : TONIC

75  $\mu\text{m}$  I.D., 61 cm, 72 cm  
25 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH = 9,2), 25 mM SDS  
20 mbar / 0,10 min ( $\approx 13$  nl)  
20 kV (76  $\mu\text{A}$ )  
UV detekce při 254 nm

píky :

1 kyselina askorbová (68 mg/l; 0,9 ng ve 13 nl)  
2 kyselina sorbová (174 mg/l; 2,3 ng ve 13 nl)



### MECC : karboxylové kyseliny

*J. Chromatogr., 608 (1992) 403-411*

50  $\mu\text{m}$  I.D., 44,5 cm, 65,7 cm  
18 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  + 30 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 50 mM CTAB  
Separace : -20 kV  
Detekce : UV při 280 nm

