

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

(úloha pro pokročilé praktikum)

Domácí příprava

1. Prostudujte si výpočet elektroosmotické mobility a efektivních elektroforetických mobilit z elektroferogramu.
2. Prostudujte si vliv pH na efektivní elektroforetickou mobilitu v CZE.
3. Prostudujte si vztahy, které používáme k výpočtu počtu teoretických pater, výškového ekvivalentu teoretického patra a rozlišení v chromatografii.
4. Prostudujte si přiloženou "Teorii k metodě standardního přídávku".
5. Přineste si s sebou počítačku.

Experimentální úkoly

1. Odpipetujte 100 μl vzorku do malé dávkovací zkumavky a zaznamenejte jeho elektroferogram.
2. Přiřaďte jednotlivé píky příslušným sloučeninám obsaženým ve vzorku, když víte, že vzorek obsahuje následující sloučeniny, které migrují v tomto pořadí: tyramin, thiomočovina, m-nitrofenol, kyselina benzoová a o-nitrofenol.
3. Ke 100 μl vzorku v malé dávkovací zkumavce přidejte 30 μl m-nitrofenolu o koncentraci 1,0 mg/ml (7,2 mmol/dm³) a po promíchání vzorku se standardním přídávkem zaznamenejte opět jeho elektroferogram.
4. Vytiskněte si oba dva elektroferogramy opatřené příslušnou tabulkou s integračními výsledky.

Experimentální podmínky

průměr kapiláry : 75 μm

délka vstup-detektor : uvedeno u přístroje

celková délka : uvedeno u přístroje

dávkování : hydrodynamické 10 mbar / 0,1 min

separační napětí : 30 kV (vstupní elektroda je anoda, výstupní katoda)

rampa : 6 kV/s

separační pufr : 20 mM tetraboritan sodný (pH = 9,1)

detekce : fotometrická (UV absorpční při 220 nm)

značkovač EOF : thiomochovina

separované látky : tyramin = 4-(2-aminoetyl)fenol

m-nitrofenol

kyselina benzoová

o-nitrofenol

Vyhodnocovací úkoly

1. Z prvního elektroferogramu vypočítejte elektroosmotickou mobilitu (m_{eof}) elektroosmotického toku a efektivní elektroforetické mobility tyraminu ($m_{\text{eff,T}}$) a kyseliny benzoové ($m_{\text{eff,B}}$) za daných experimentálních podmínek.
2. Z prvního elektroferogramu vypočítejte efektivní elektroforetické mobility o-nitrofenolu ($m_{\text{eff,O}}$) a m-nitrofenolu ($m_{\text{eff,M}}$) a elektroforetické (iontové) mobility o-nitrofenolátového ($m_{\text{O-}}$) a m-nitrofenolátového ($m_{\text{M-}}$) aniontu za daných experimentálních podmínek.
3. Z prvního elektroferogramu vypočítejte počet teoretických pater (n) a výškový ekvivalent teoretického patra (H) pro danou kolonu vzhledem k m-nitrofenolu a rozlišení ($R_{1,2}$) mezi píky kyseliny benzoové a o-nitrofenolu.
4. Vypočítejte koncentraci m-nitrofenolu ve vzorku z ploch píků m-nitrofenolu změřených před standardním přídatkem a po standardním přídatku (jednobodová metoda standardního přídatku).
5. Vypočítejte délku zóny a objem vzorku nadávkovaného do kapiláry a množství m-nitrofenolu v pmol a ng, které bylo nadávkováno v prvním experimentu. Kolikrát lze teoreticky nadávkovat ze 100 μl vzorku?

Teorie k metodě standardního přídávku

V HPLC, GC a CZE se běžně používá několik kvantitativních vyhodnocovacích metod: metoda vnitřní normalizace, metoda absolutní kalibrace, metoda vnitřního standardu a metoda standardního přídávku. Tato poslední kvantitativní vyhodnocovací metoda, tj. metoda standardního přídávku, umožňuje odstranit rušivý vliv matrice při kvantitativní analýze. Při této metodě změříme nejprve analytickou odezvu (tj. plochu píku) stanovované látky v původním vzorku, který je určen k analýze (první experiment). Ve druhém kroku přidáme k původnímu vzorku standardní přírůstek vlastní stanovované látky o známém množství a opět změříme analytickou odezvu (tj. plochu píku) stanovované látky v takto získaném vzorku se standardním přírůstkem (druhý experiment). Ze získaných ploch píků stanovované látky v původním vzorku a ve vzorku se standardním přírůstkem o známém množství stanovované látky jsme potom schopni vypočítat koncentraci (popř. množství) stanovované látky v původním vzorku.

Koncentrace stanovované látky v původním vzorku : c_x [mol/dm³]

Objem původního vzorku : V [μl]

Plocha píku stanovované látky v původním vzorku : A_1 [Vs]

Objem standardního přídávku : V_{sp} [μl]

Koncentrace stanovované látky ve standardním přírůstku : c_{sp} [mol/dm³]

Plocha píku stanovované látky ve vzorku se standardním přírůstkem : A_2 [Vs]

Neznámou veličinou je c_x a výchozími známými veličinami jsou V , A_1 , V_{sp} , c_{sp} a A_2 .

Původní vzorek obsahuje látkové množství stanovované látky $n_1 = c_x \cdot V$ [μmol] a

standardní přírůstek obsahuje látkové množství stanovované látky $n_{sp} = c_{sp} \cdot V_{sp}$ [μmol].

Vzorek se standardním přírůstkem obsahuje tedy celkové látkové množství stanovované látky $n_1 + n_{sp}$, jeho celkový objem je $V + V_{sp}$ a tudíž koncentrace stanovované látky v tomto vzorku je rovna

$$c_2 = \frac{n_1 + n_{sp}}{V + V_{sp}} = \frac{c_x \cdot V + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V + V_{sp}} \quad [\mu\text{mol}/\mu\text{l} \text{ nebo mol}/\text{dm}^3].$$

Při analýze je do přístroje v prvním experimentu dávkována část původního vzorku o objemu V_d [μ l] (tzv. dávkovaný objem) a stejný objem vzorku se standardním přídatkem je do přístroje dávkován ve druhém experimentu. Látkové množství stanovované látky dávkované do přístroje v prvním experimentu je tedy $n_{d,1} = c_x \cdot V_d$ [μ mol] a látkové množství stanovované látky dávkované do přístroje ve druhém experimentu je rovno

$$n_{d,2} = c_2 \cdot V_d = \frac{n_1 + n_{sp}}{V + V_{sp}} \cdot V_d = \frac{c_x \cdot V + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V + V_{sp}} \cdot V_d \quad [\mu\text{mol}] .$$

Analytická odezva přístroje (tj. plocha píku) pozorovaná v prvním experimentu je přímo úměrná látkovému množství stanovované látky dávkované do přístroje v prvním experimentu $A_1 = \text{RF} \cdot n_{d,1} = \text{RF} \cdot c_x \cdot V_d$, kde RF je tzv. faktor odezvy (response faktor) příslušného detektoru pro stanovovanou látku a říká, jak velkou analytickou odezvu (v našem případě plochu píku) poskytuje jednotkové látkové množství příslušné stanovované látky. Analytická odezva přístroje (plocha píku) pozorovaná ve druhém experimentu je také přímo úměrná látkovému množství stanovované látky dávkované do přístroje ve druhém experimentu a konstantou úměrnosti je stejný faktor odezvy, neboť se jedná o stejnou látku (tj. stanovovanou látku)

$$A_2 = \text{RF} \cdot n_{d,2} = \text{RF} \cdot c_2 \cdot V_d = \text{RF} \cdot \frac{n_1 + n_{sp}}{V + V_{sp}} \cdot V_d = \text{RF} \cdot \frac{c_x \cdot V + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V + V_{sp}} \cdot V_d .$$

Dáme-li obě změřené plochy píků stanovované látky do poměru, vykrátí se nám parametry, které nabývají v obou dvou experimentech týchž hodnot (tj. RF a V_d)

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{\text{RF} \cdot \frac{c_x \cdot V + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V + V_{sp}} \cdot V_d}{\text{RF} \cdot c_x \cdot V_d} = \frac{c_x \cdot V + c_{sp} \cdot V_{sp}}{c_x \cdot (V + V_{sp})} .$$

Osamostatněním koncentrace c_x z předcházející rovnice získáme vztah pro výpočet koncentrace stanovované látky v původním vzorku z výchozích známých veličin metody standardního přídatku

$$c_x = c_{sp} \cdot \frac{A_1 \cdot V_{sp}}{A_2 \cdot (V_1 + V_{sp}) - A_1 \cdot V_1}$$

Pokud vyjádříme koncentraci stanovované látky ve standardním přídávku (tj. c_{sp}) v jiných jednotkách (např. v mg/ml), lze použít stejný vztah pro výpočet koncentrace stanovované látky v původním vzorku (tj. c_x), avšak tato koncentrace vyjde ve stejných jednotkách, v jakých byla vyjádřena koncentrace stanovované látky ve standardním přídávku (tedy např. v mg/ml).