

ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

migrace elektricky nabitých částic v elektrickém poli

migrace + detekce + kvantifikace analytů

Druhy iontů: +, -, obojaké (zwitterion), vícenásobné (poměr +/-)

Typy migrace: a) přímá – migrují ionty analytů (a elektrolytu)

**b) nepřímá – migrují ionty elektrolytu
(analyty jsou unášeny)**



PŘEHLED ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD

	Rozdílná mobilita	Rozdílná afinita	Rozdílná hodnota pI	Separované látky
Zonální elektroforéza (ZE, CZE)	⊕	⊕	⊕	+ <i>nebo</i> -
Izoelektrická fokuzace (IEF, CIEF)	⊕	⊕	⊕	+ <i>nebo</i> -
Izotachoforéza (ITP, CITP)	⊕	⊕	⊕	+ <i>nebo</i> -
Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC, MECC)	⊕	⊕	⊕	neutrální
Kapilární elektrochromatografie (CEC)	⊕	⊕	⊕	neutrální



$$v = \mu_e E$$

v - rychlost iontu

μ_e - elektroforetická mobilita

E - aplikované elektrické pole

**Na částici působí: elektrická síla FE (electric force)
třecí síla FF (frictional force)**

$$F_E = qE$$

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

q - náboj iontu

η - viskozita roztoku

r - poloměr iontu

v - rychlost iontu

V ustáleném stavu jsou FE a FF v rovnováze, pak platí:

$$qE = 6\pi\eta r v$$

$$\mu_E = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

⇒ malé ionty s velkým nábojem - větší pohyblivost

⇒ velké ionty s malým nábojem - menší pohyblivost



ELEKTROOSMOTICKÝ TOK (EOF) - PRINCIP

$$v_{EOF} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E$$

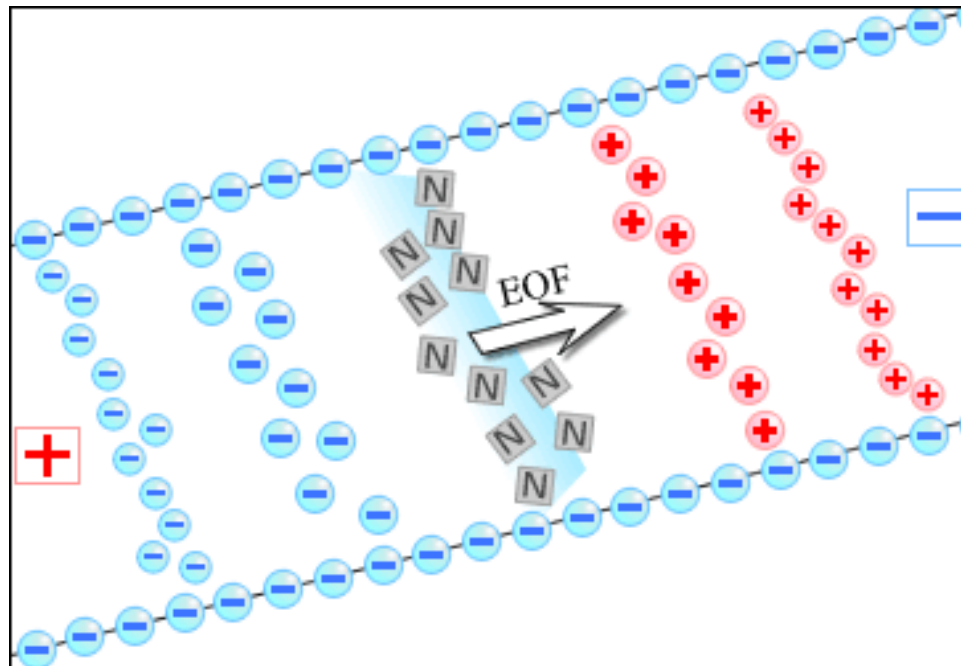
$$\mu_{EOF} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right)$$

v_{EOF} - rychlost

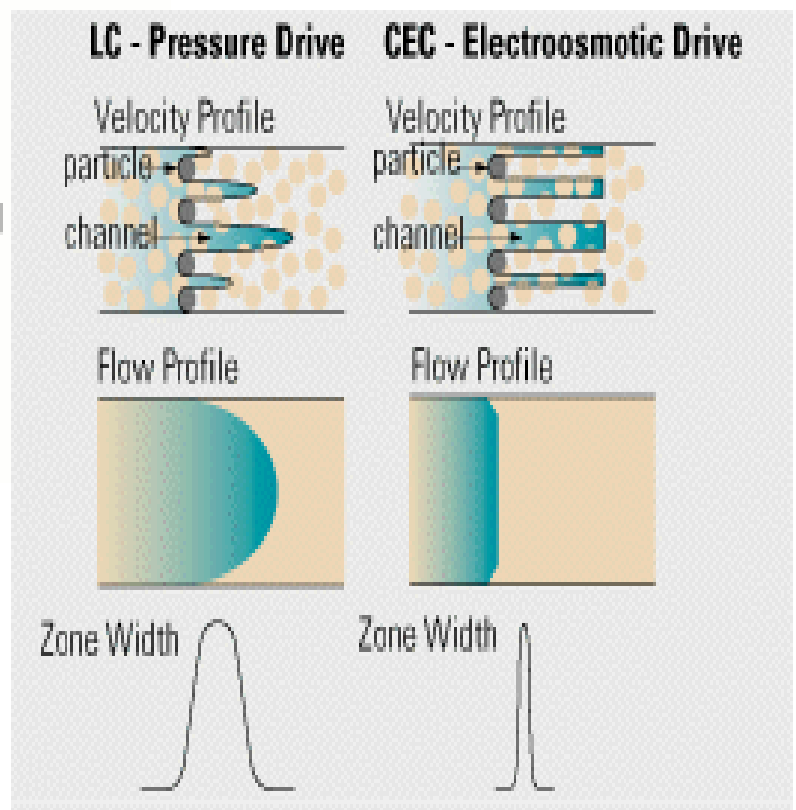
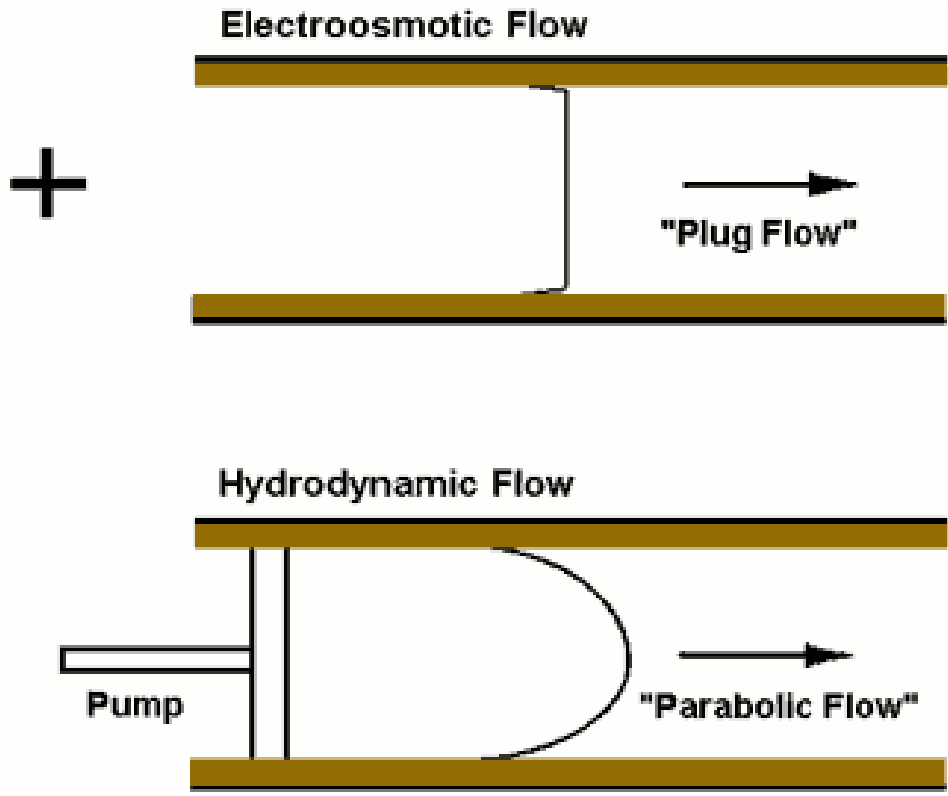
μ_{EOF} - EOF "mobilita"

ζ - zeta potenciál

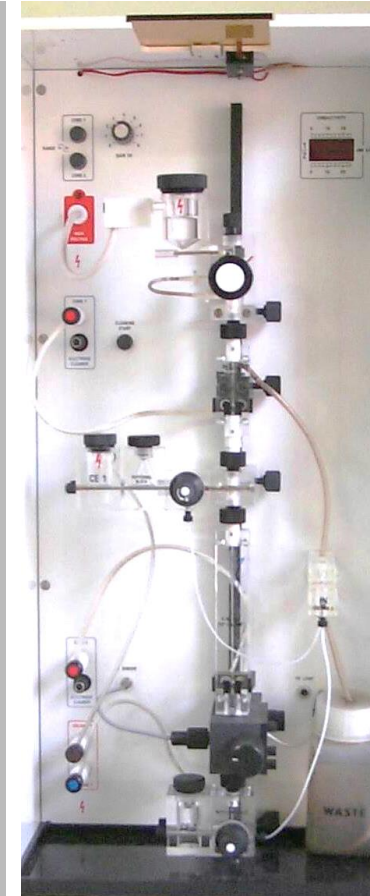
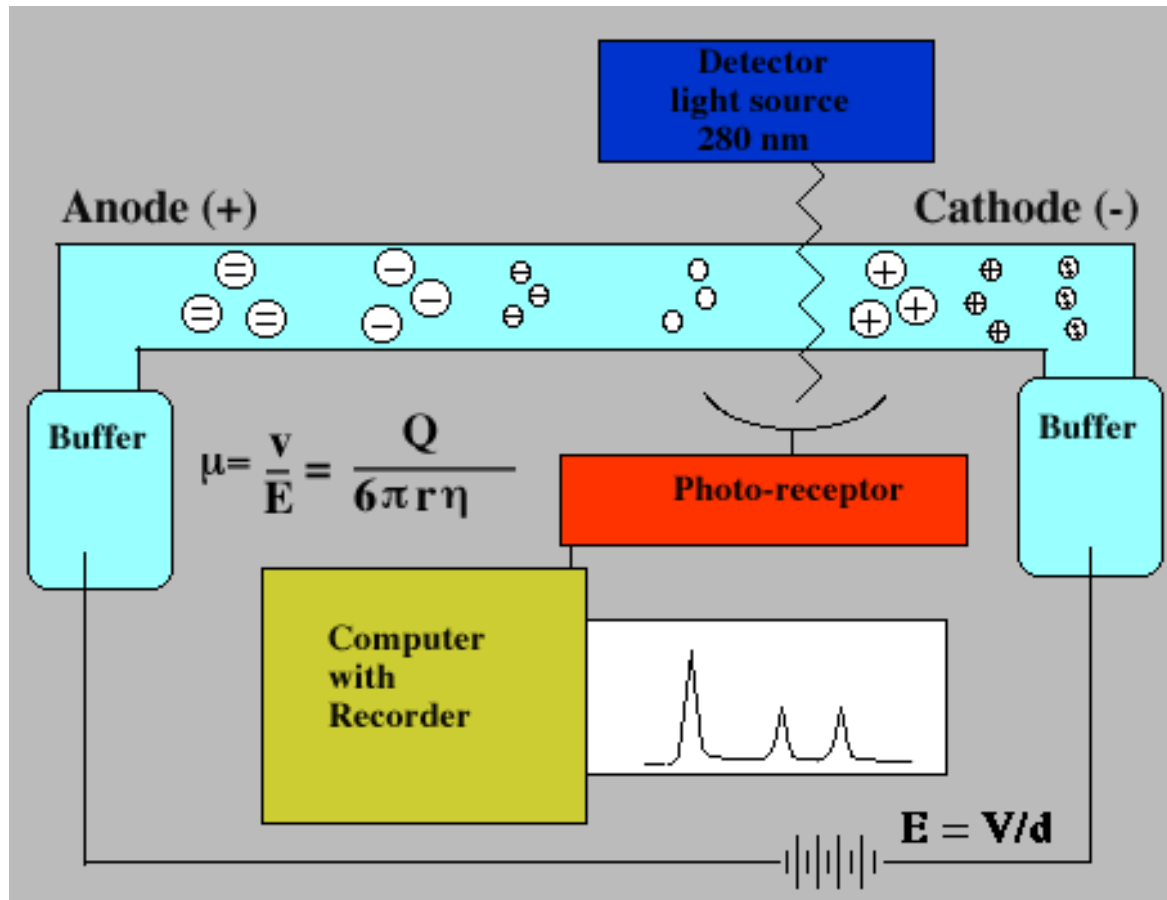
ϵ - dielektrická konstanta



ELEKTROOSMOTICKÝ TOK (EOF) – PROFIL TOKU



ZONÁLNÍ ELEKTROFORÉZA - PRINCIP



ZONÁLNÍ ELEKTROFORÉZA - APLIKACE

1. V kapiláře - jednosměrná

2. Na tenké vrstvě (horizontální nebo vertikální)

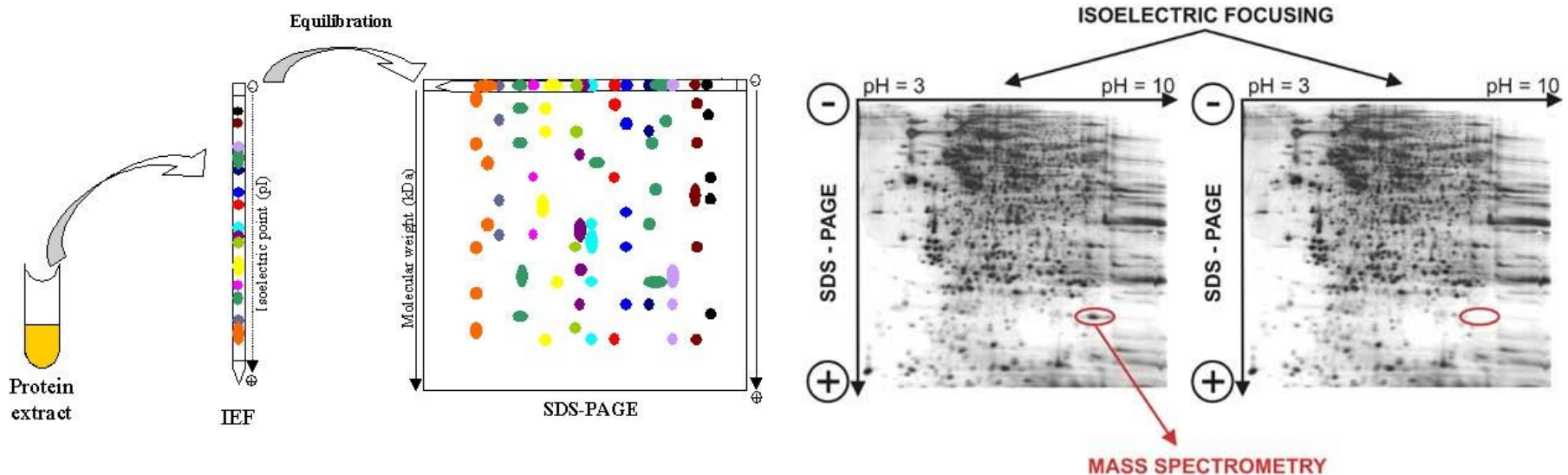
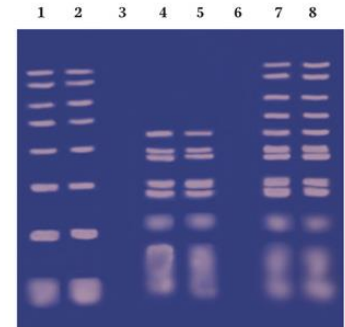
- papírová - 1D – jednosměrná nebo obě polarity ze středu

- gelová - 1D - např. agarózový gel

- 2D: separace podle pI a M_w

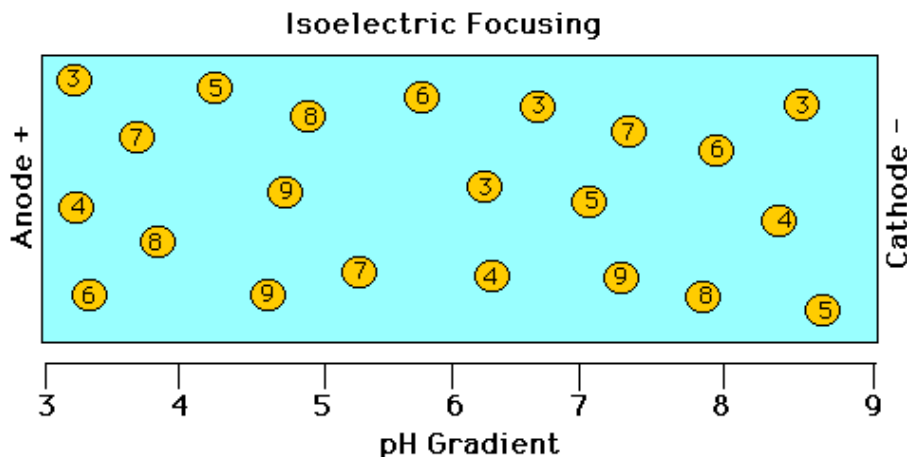
SDS-PAGE (sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel electrophoresis)

kombinace IEF nebo IPG (imobilizovaný pH gradient) – 1.D a SDS-PAGE – 2.D

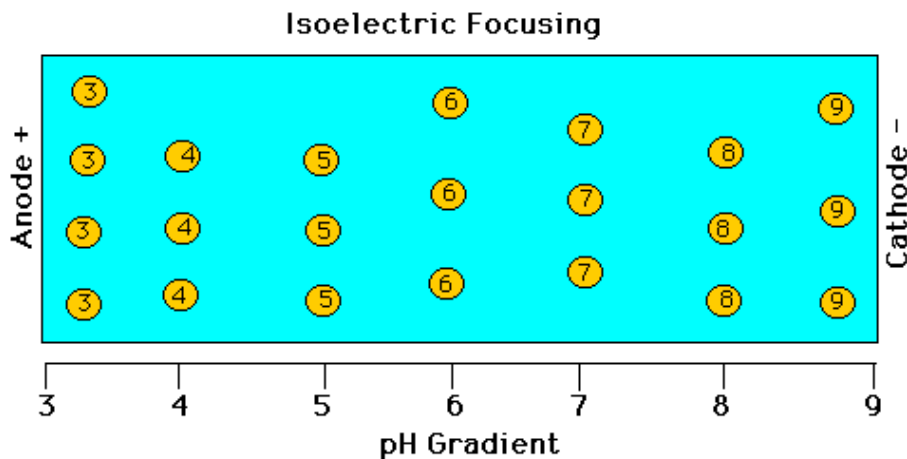


IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE - PRINCIP

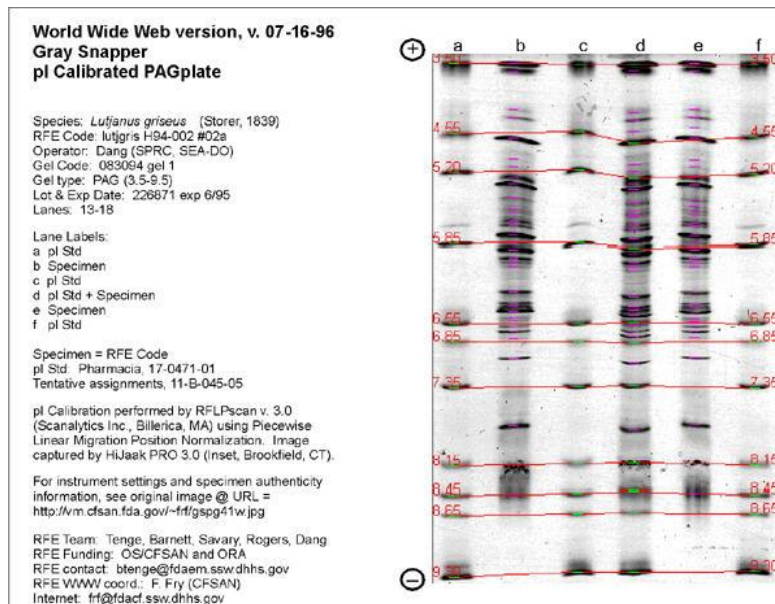
Stav před separací



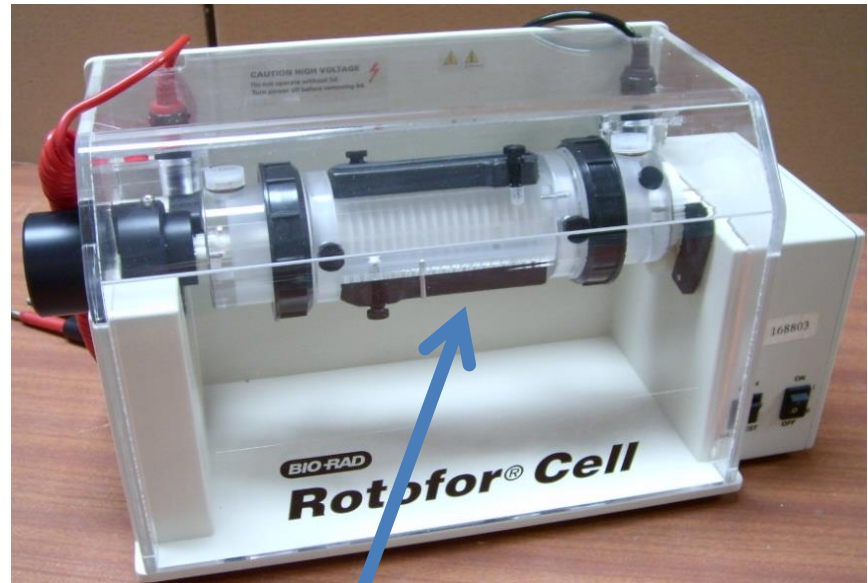
Látky separované podle pI



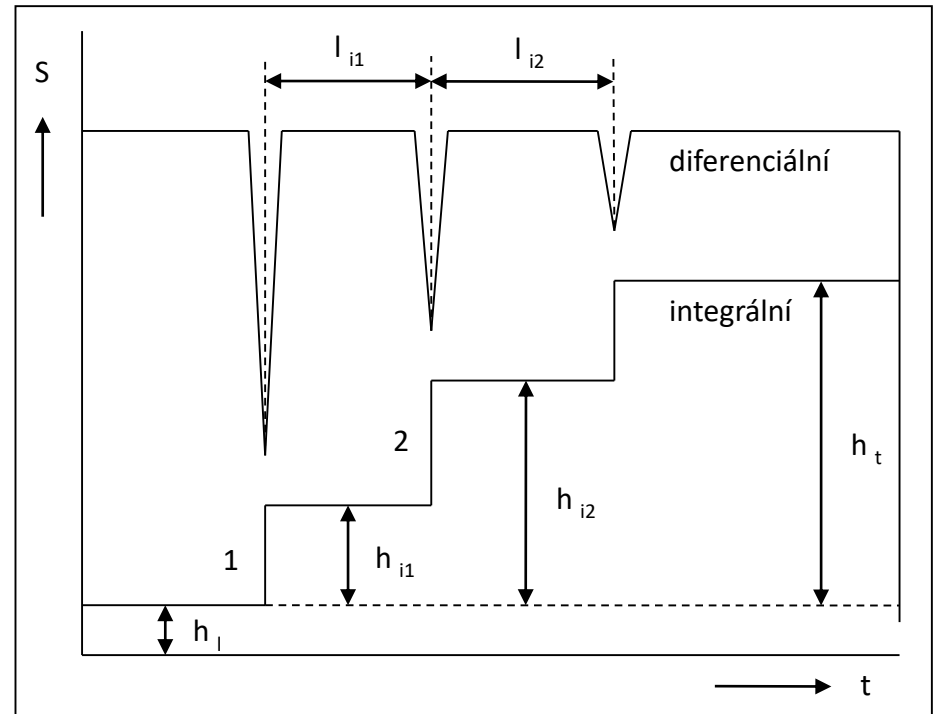
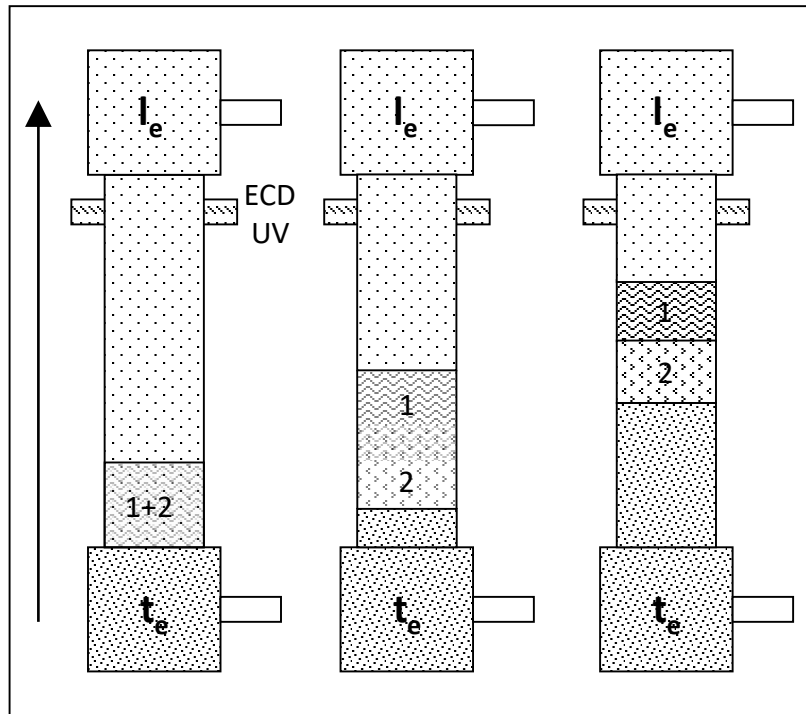
V gelu



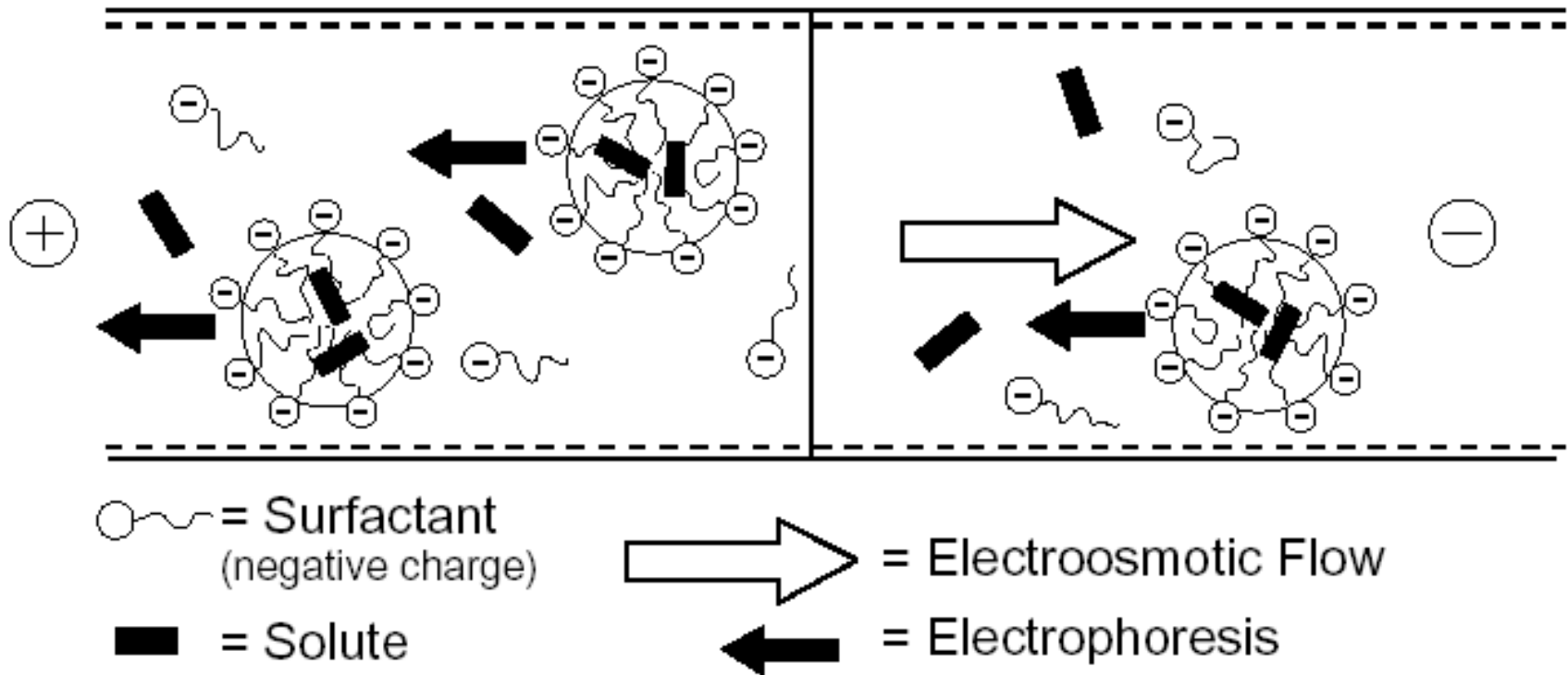
IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE - REALIZACE



IZOTACHOFORÉZA - PRINCIP



MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE



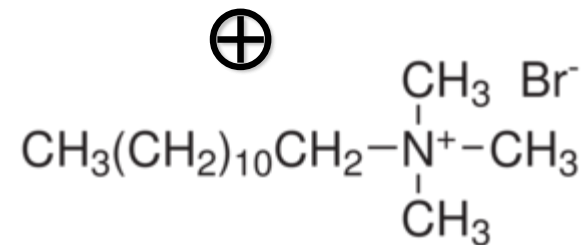
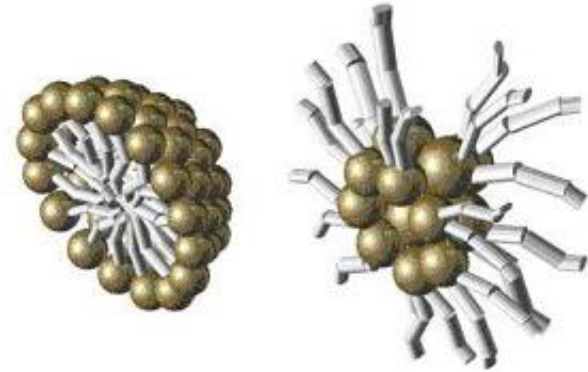
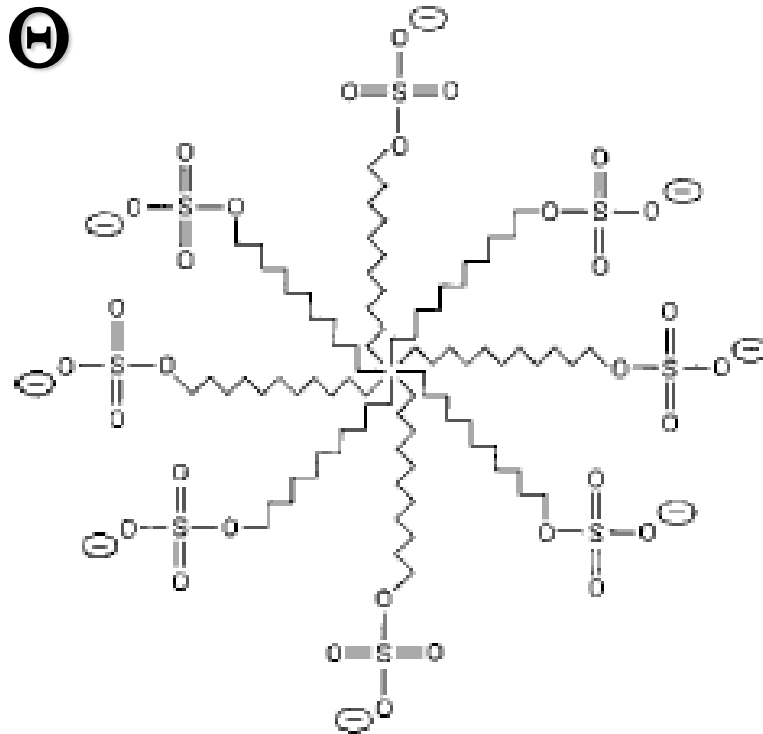
Kritická micelární koncentrace (CMC) - koncentrace tenzidu, při které začíná docházet k tvorbě micel

Agregační číslo (n) - počet molekul tenzidu podílejících se na struktuře micely

Micelární hmotnost (M_w) - hmotnost jednoho molu micel

MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE

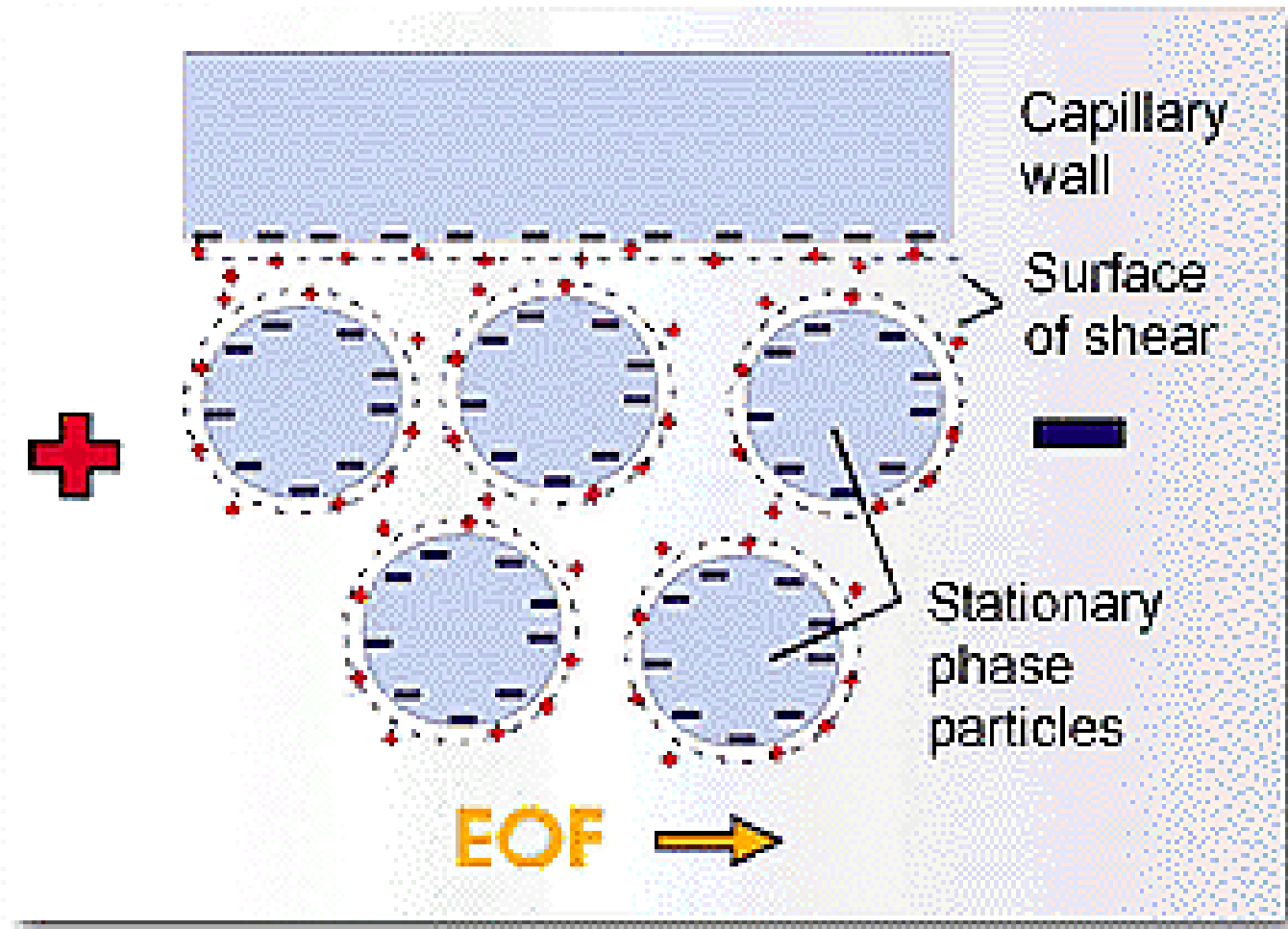
Sodium dodecylsulfátová (SDS) micela



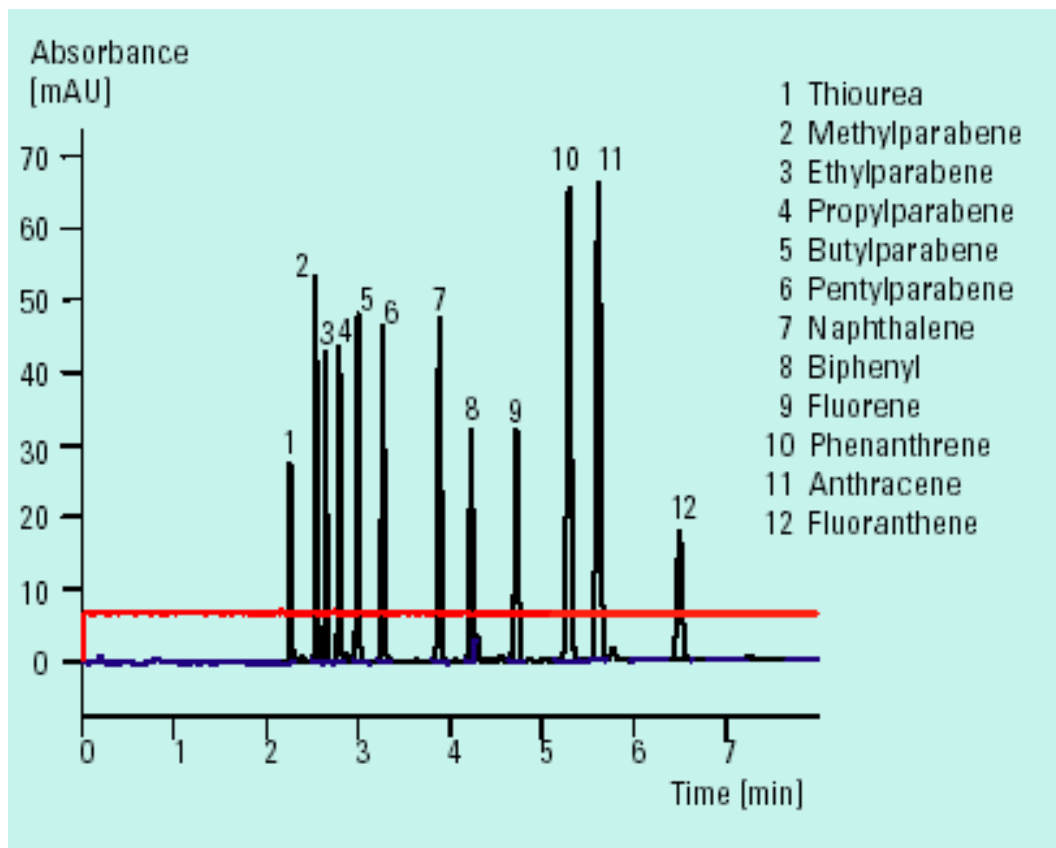
Dodecyltrimethylamoniumbromid (DTAB)



KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE



KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE



Column:
CEC Hypersil C18, 3 μ m
250 (350) \times 0.1 mm

Mobile Phase:
80/20 ACN/MES
25 mM, pH 6

Voltage:
25 kV

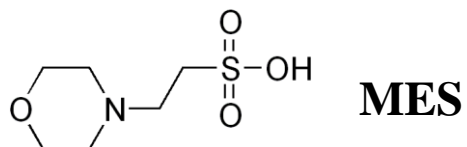
Injection:
5 kV, 3 s

Pressure:
10 bar both sides

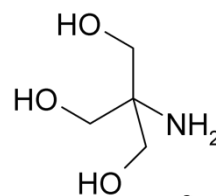
Temperature:
20 $^{\circ}$ C

Plate Number:
65,000 – 80,000

Symmetry:
0.93 – 0.98



2-(*N*-morpholino)ethansulfonová k.



Tris = trishydroxymethylaminomethan
2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

Analýza „malých“ iontů – kapaliny, výluhy

Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny

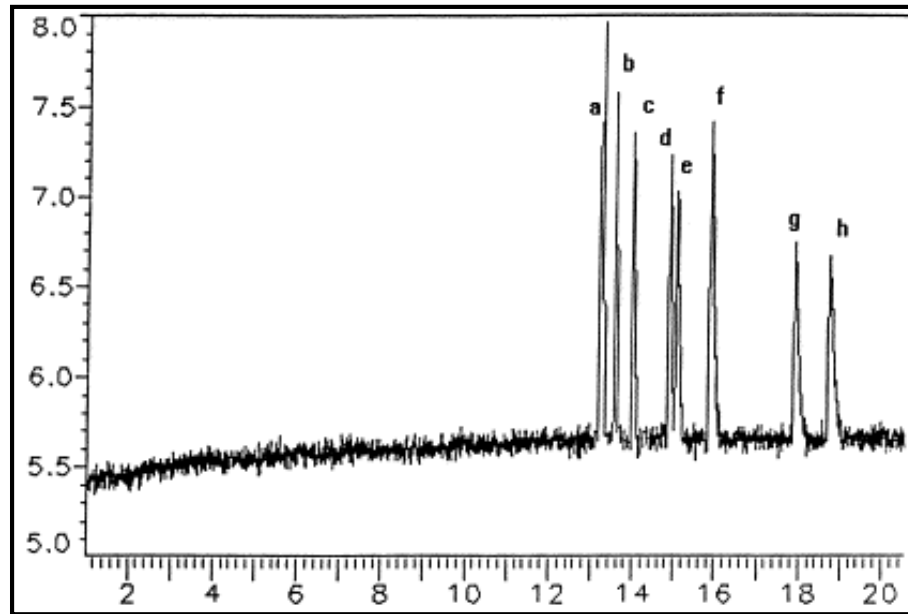
Organické kyseliny, aminy

Farmaka

Omamné látky – narkotika

Organické kontaminanty

Příklad č. 1

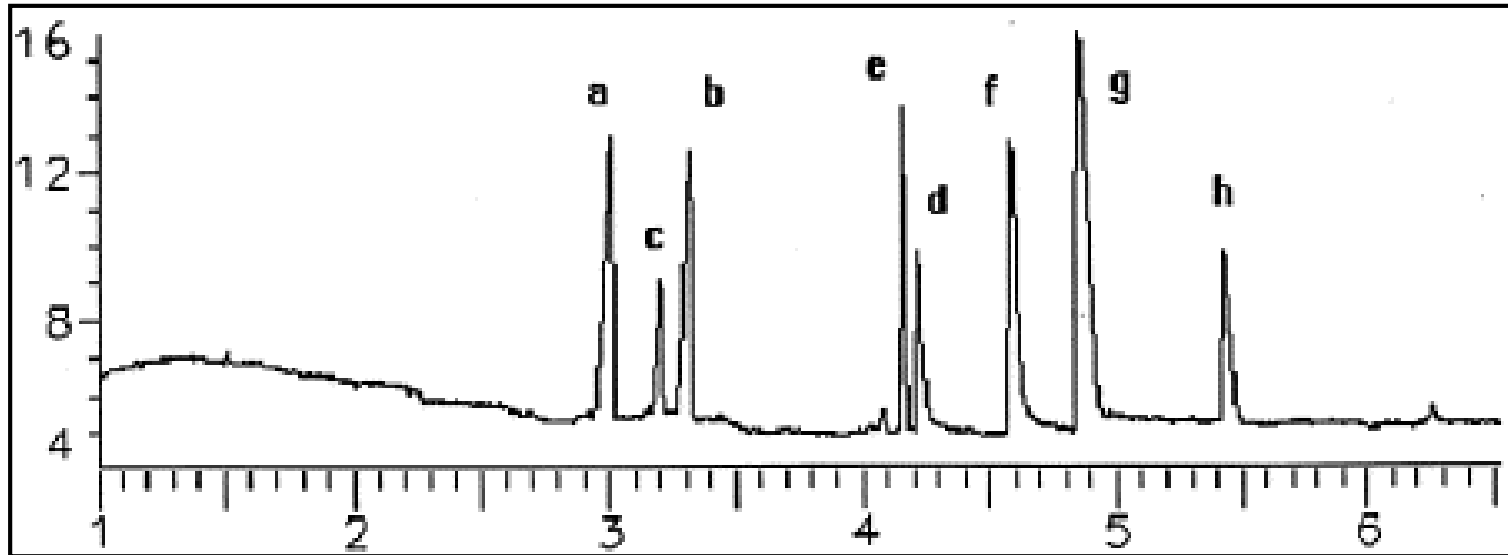


Elektrofoerogram sekundárních aminů (směs standardů).

Podmínky: 1,2% methanol, 98,8% 5 mM DM- β -CD a 1 mM β -CD-SBE(IV), 25 mM tris- H_3PO_4 , pH 2,45. Kapilára 82 cm (60 cm efektivní délka) \times 50 μ m id; napětí 30 kV; detekce, UV 210 nm; teplota 30 °C.

(a) (+)methcathinon, (b) (-)methcathinon, (c) (-)-pseudoephedrin, (d) (-)-ephedrin, (e) (+)-ephedrin, (f) (+)-pseudoephedrin, (g) (-)-methamphetamin, (h) (+)-methamphetamin.

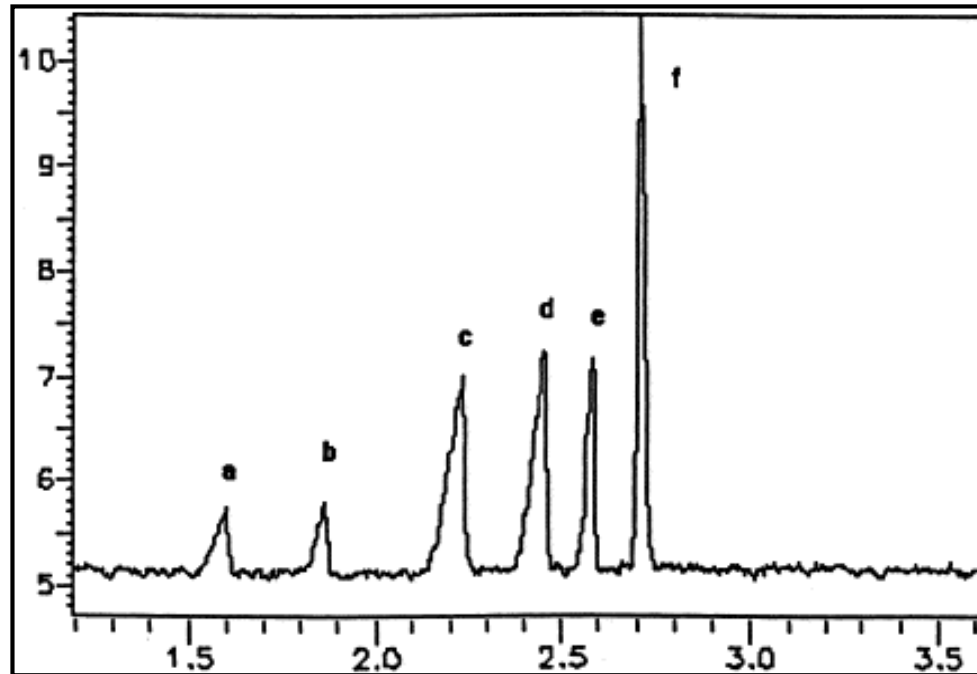
Příklad č. 2



Elektroforeogram aniontů (směs standardů).

Podmínky: kapilára 72 cm (50 cm efektivní délka) × 50 μm id; podtlakový nástřik - 4 s; napětí 30 kV; teplota 30 °C; pufr, Anitron (Perkin–Elmer); detekce UV 230 nm. (a) chlorid (9 μg/ml), (b) sulfát (8 μg/ml), (c) nitrát (11 μg/ml) - vnitřní standard, (d) citrát (10 μg/ml), (e) tartrát (10 μg/ml), (f) fosfát (11 μg/ml), (g) karbonát (7.0 μg/ml), (h) acetát (10 μg/ml)

Příklad č. 3

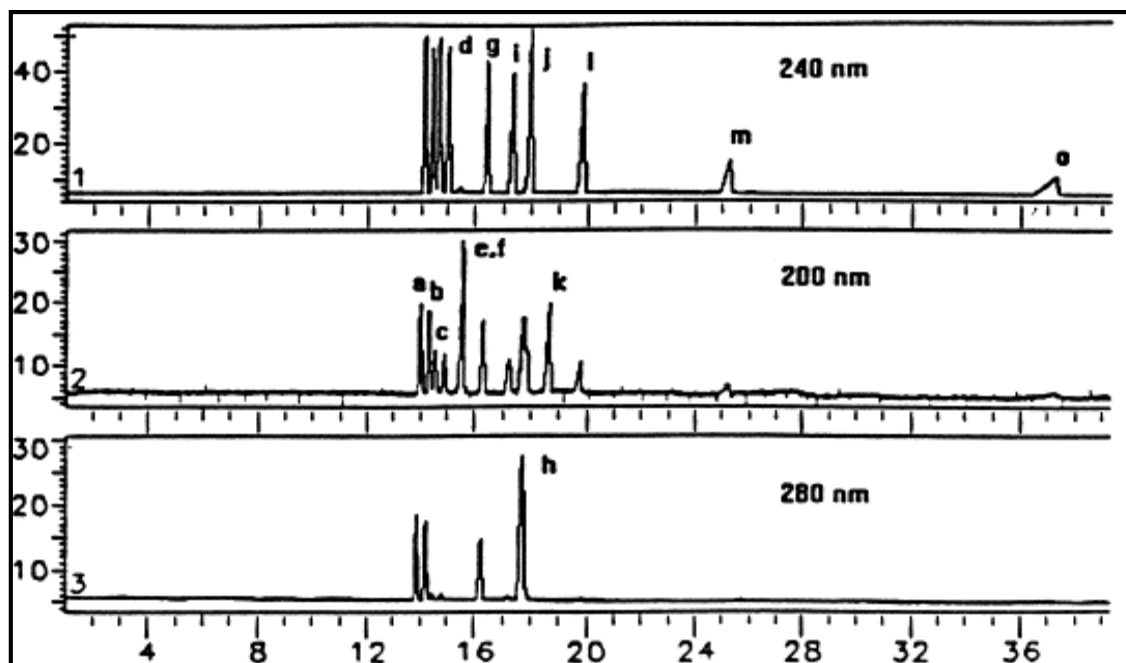


Elektroforeogram kationtů (směs standardů).

Podmínky: kapilára 48 cm (26 cm efektivní délka) × 50 μm id; podtlakový nástřik - 4 s; napětí 20 kV; teplota 30 °C; pufr Ion Phor Cation CU (Dionex); detekce UV 210 nm.

(a) ammonium (2 μg/ml), (b) draslík (2 μg/ml), (c) sodík (5 μg/ml), (d) vápník (3 μg/ml), (e) hořčík (1 μg/ml), (f) lithium (1 μg/ml) - vnitřní standard.

Příklad č. 4



MECC elektroforeogram směsi anabolických steroidů.

Podmínky: kapilára 72 cm (50 cm efektivní délka) × 50 μm id, teplota 30 °C, napětí 25 kV, pufr acetonitril/sodium dodecyl sulfát (SDS) - roztok 2:3, SDS roztok 75 mM SDS v 10 mM fosfatovém/10 mM borátovém pufru - pH 9.0.

(a) boldenon, (b) methandrostenolon, (c) testosteron, (d) methyltestosteron; (e) methadriol, (f) stanolon, (g) boldenon acetát, (h) danazol, (i) testosteron acetát, (j) nandrolon propionát, (k) methadriol-3-acetát, (l) testosteron isobutyrylát, (m) testosteron cypionát, (o) testosteron undekanoát