

Trendy v analytické chemii

Pokročilé techniky kapilární elektroforézy – principy, trendy, detekční metody, aplikace v analýze reálných vzorků

Přednáška pro studenty MU v Brně, 8.10.2009

Pavel Kubáň (kuban@iach.cz)

Ústav Analytické Chemie Akademie Věd ČR

1. Historický přehled CE

2. Charakteristika a principy CE

3. Jednotlivé detekční metody v CE

4. Příklady použití CE v analýze reálných vzorků

Historie kapilární elektroforézy (HPCE)

Year	Technique	Detection	Other
1967	CZE in 3 mm i.d. rotating tubes (20)		
1971	CTTP (35)		
1974	CZE in 200–500 µm i.d. glass capillaries (21)		commercial instrumentation for CTPP
	Electroosmotic chromatography (36)		
1979	CZE in 200 µm i.d. teflon capillaries (22)		stacking (22)
1981	CZE in 75 µm i.d. capillaries (23)	fluorescence (23)	
1983	CBE (24)		
1984	MECC (26)	ultraviolet (27)	
1985	CEP (25)	laser fluorescence (28)	chiral recognition (28) coated capillaries (32) repulsion of proteins from capillary walls (33)
1986			
1987		mass spectrometry (29) electrochemistry (30)	
1988		indirect fluorescence(31)	commercial instrumentation for HPCE
1990			field-effect electroosmosis (34)

20 – Hjertén (rotující kapiláry (3 mm))

23 - Jorgenson a Lukacs (první skutečná HPCE separace)

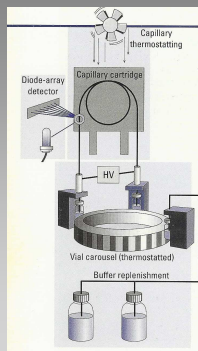
26 – Terabe (MEKC)

28 – Gassmann (LIF detekce, attomol konc.)

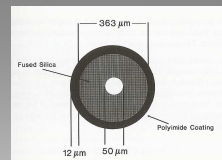
Kapilární elektroforéza vs. Chromatografie

Kapilární elektroforéza	Chromatografie
Elektroferogram	Chromatogram
Elektrické pole	Průtoková rychlost
Separací elektrolyt nebo pufr	Eluent nebo mobilní fáze
Dávkovací módy (hydrodynamický nebo elektromigrační)	Dávkovací ventil
Migrační čas	Retenční čas
Elektroretická mobilita	Kapacitní faktor
Elektroosmotický tok	-
Zdroj vysokého napětí	Vysokotlaká pumpa
Kapilára	Kolona

Schématické znázornění CE přístroje



Parametry separačních kapilár



Innendurchmesser [µm]	Injektionsvolumen (l mm Länge)	Kapillarsvolumen (l m Länge)	relativer Leitzwert	Oberfläche pro Microliter	Verhältnis Oberfläche/Volumen
250	49,4 nL	49,4 µL	625 %	785 mm ²	11 µm ⁻¹
160	20,1 nL	20,1 µL	256 %	502 mm ²	25 µm ⁻¹
100	7,9 nL	7,9 µL	100 %	314 mm ²	40 µm ⁻¹
75	4,4 nL	4,4 µL	56 %	236 mm ²	54 µm ⁻¹
50	2,0 nL	2,0 µL	25 %	157 mm ²	79 µm ⁻¹
25	0,5 nL	0,5 µL	6 %	79 mm ²	158 µm ⁻¹

Teorie

Rychlost částice

$$v = \mu E = \frac{L_{eff}}{t_m} \quad E = -grad\phi$$

μ - elektroforetická mobilita, L - Délka kapiláry, t - Migrační čas, E - Intenzita elektrického pole

Zrychlení částice

$$F_D = \frac{zFE}{N_A} \quad F_B = qE \quad e = \frac{F}{N_A} \quad q = ze = z \frac{F}{N_A}$$

F - Faradayova konst., E - Int. el. pole, N_A - Avogadrovo číslo, e - Elementární náboj

Zpomalení částice / Stokesův zákon

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

η - Dynamická viskozita, r - Stokesův rádius, 6 platí pro stérické částice

$$v = \frac{zFE}{6\pi\eta r N_A}$$

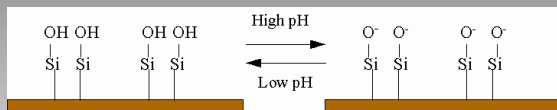
$$\mu = \frac{L_{eff}}{tE} = \frac{L}{tU} \frac{L}{l} \frac{zF}{6\pi\eta r N_A} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Limitní elektroforetické mobility vybraných iontů

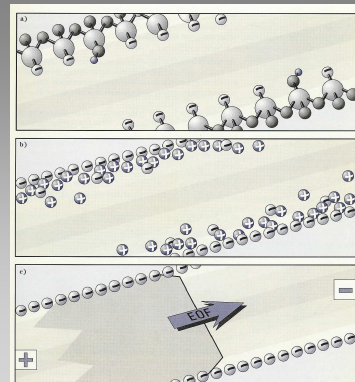
Kationen	Mobilitäten	Anionen	Mobilitäten
H ₃ O ⁺	362,5	OH ⁻	-205,5
Li ⁺	40,1	F ⁻	-57,4
Na ⁺	51,9	Cl ⁻	-79,1
K ⁺	76,0	NO ₃ ⁻	-74,1
NH ₄ ⁺	72,2	SO ₄ ²⁻	-82,9
Diethylammonium	37,9	Hepes	-21,8
Triethylammonium	53,1	Mops	-24,4
Ammediol	76,2	Mes	-26,8
Tris	29,5	Amp	-22,6
B-Alanin	37,5	Formiat	-56,6
Ethanolamin	44,3	Acetat	-42,4
Imidazol	52,0	Aces	-31,3
		Mopso	-23,8
		Bes	-24,0
		Tes	-22,4
		Hepps	-22,0

(Mobilitäten stellen die Grenzmobilitäten bei 25°C in 10⁻⁵, cm²V⁻¹s⁻¹ dar.)

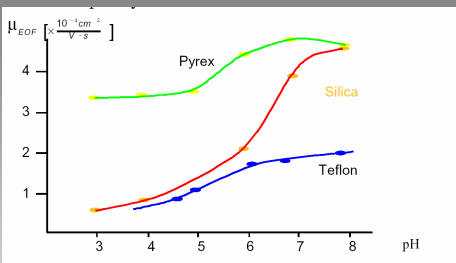
Povrch kapiláry/elektroosmotický tok



Vznik elektroosmotického toku

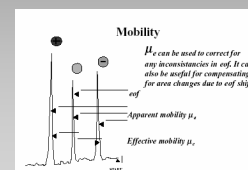
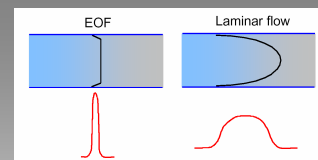


Vliv pH na EOF v kapilárách z různých materiálů

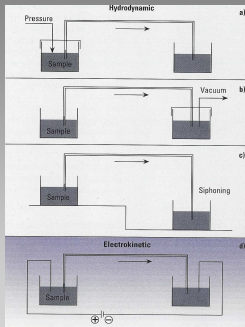


$$\mu_{EO} = \frac{lL}{t_{EO}V} \quad (\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1})$$

l = efektivní separační délka,
 L = celková délka,
 V = separační napětí



Dávkování vzorku



$$V = \frac{\Delta p d^4 \pi}{128 \eta L}$$

Δp - pressure difference across the capillary,
 d - capillary inside diameter, t - time, η - buffer viscosity,
 L - total length

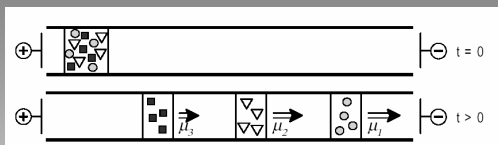
Siphoning Injection

$\Delta p = \rho g \Delta h$
 ρ - buffer density, g - gravitační mal constant,
 Δh - height differential of reservoirs

Dělicí techniky v CE

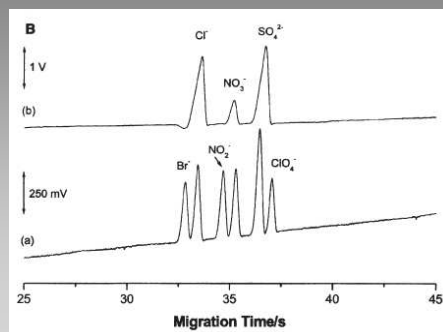
- CZE (kapilární zónová elektroforéza)
- ITP (kapilární izotachoforéza)
- MEKC (micelární elektrokinetická chromatografie)
- CEC (kapilární elektrochromatografie)
- CIEF (kapilární isoelektrofokusace)
- CGE (kapilární gelová elektroforéza)
- Separace enantiomerů

Princip kapilární zónové elektroforézy

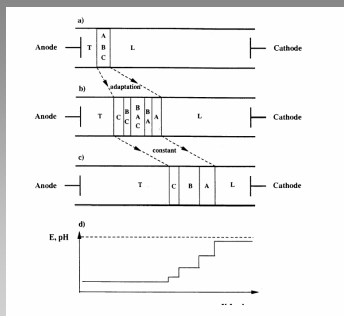


- Pufr, pH, elektrické pole jsou v celé separační kapiláře konstantní
- Vzorek se bude dělit na základě rozdílných elektroforetických mobilit analytů
- Vzorek bude nadávkován a migrovat jako zóna/zóny
- Doba analýzy = f(koncentrace pufru, délka kapiláry, napětí, aditiva)

CZE stanovení anorganických aniontů

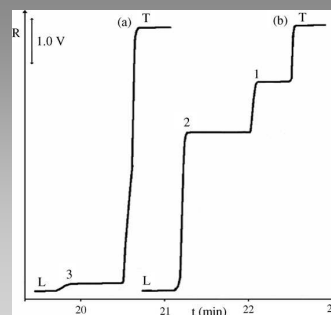


Princip kapilární izotachoforézy

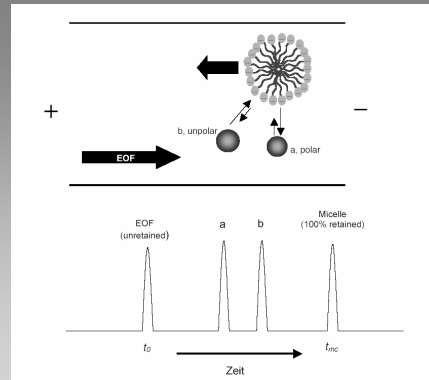
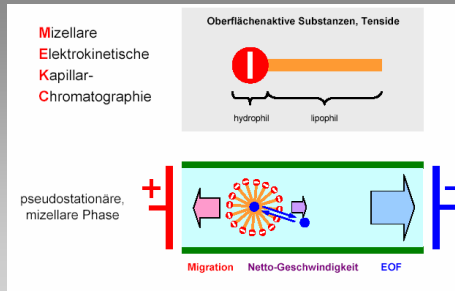


- diskontinuální el. pole
- nutný je vedoucí a koncový elektrolyt
- jednotlivé sloučeniny ve vzorku putují kapilárou shodnou rychlostí

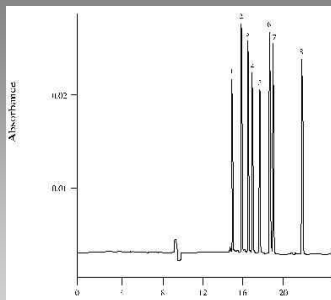
ITP stanovení anorganických aniontů



Princip MEKC

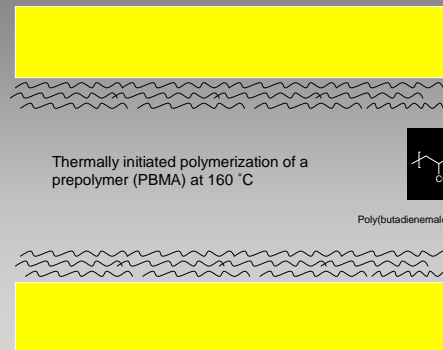


MECC stanovení steroidů

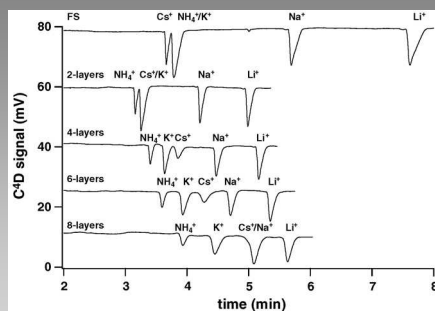


Separation of Corticosteroids by MECC. Buffer: 100 mM sodium cholate, 100 mM borate, pH 8.45. 1, triamcinolone; 2, hydrocortisone; 3, betamethasone; 4, hydrocortisone acetate; 5, dexamethasone acetate; 6, triamcinolone acetonide; 7, flucicortone acetate; 8, flucicortone

Princip kapilární elektrochromatografie



CEC stanovení monovalentních kationtů



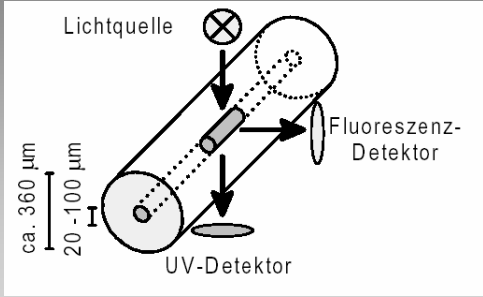
CEC conditions: separation capillary: 60/46cm total/effective length; 75/375 μm ID/OD
separation voltage: +15 kV; injection, hydrodynamic injection from a height of 15 cm for 15 s;
analyte concentration: 50 μM ; BGE solution: 200 mM acetic acid

Detekční módy

- On-column detekce
- End-column detekce
- Off-column detekce
- UV/VIS detekce
- Fluorescenční detekce
- Vodivostní detekce
- Elektrochemická detekce (amperometrická, potenciometrická)
- Hmotnostní spektrometrie
- Méně obvyklé typy detekce (refraktometrická, radioaktivní, termooptická, atd.)

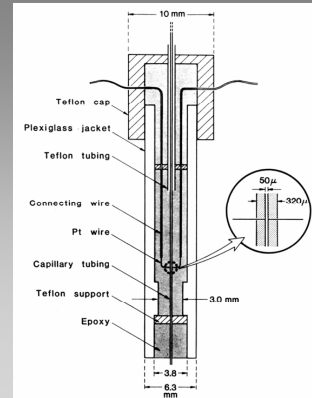
„On-column“-detekce

UV, fluorescenční

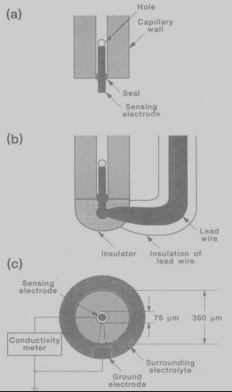


„On-column“-detekce

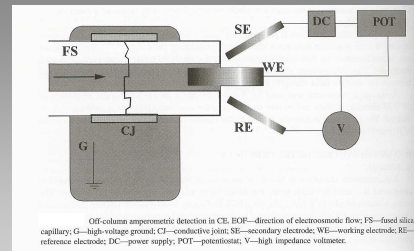
Vodivostní



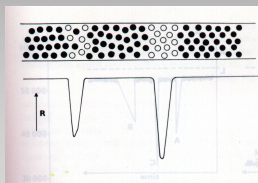
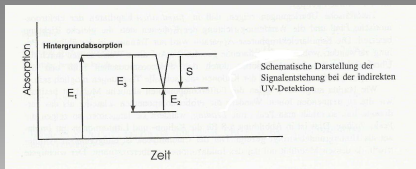
„End-column“-detekce



„Off-column“-detekce



Nepřímá detekce



Nepřímá UV detekce kationtů

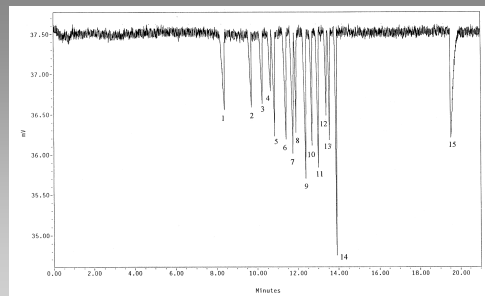
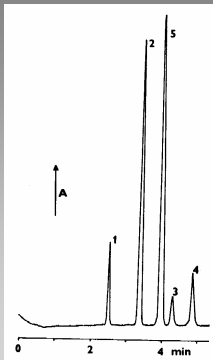


Fig. 2. Electrophoretic separation of 15 metal ions. Carrier electrolyte, 10 mM UV CAT-1-6.5 mM HIBA (pH 4.3); hydrostatic injection, 20 s from 10 cm height; voltage, 25 kV. Peaks according to the sequence: 1—K (0.4 ppm), 2—Ba (0.8 ppm), 3—Sr (0.8 ppm), 4—Ca (0.3 ppm), 5—Na (0.5 ppm), 6—Mg (0.6 ppm), 7—Mn (0.6 ppm), 8—Cl (0.8 ppm), 9—Cr (1.4 ppm), 10—Cu (1.0 ppm), 11—Li (0.8 ppm), 12—Pb (0.8 ppm), 13—Ni (1.0 ppm), 14—Zn (1.8 ppm), 15—Co (1.0 ppm).

Přímá UV detekce aromatických karboxylových kyselin

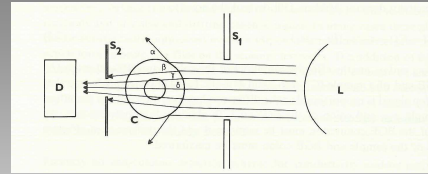


- 1 – kys. tereftalová
- 2 – kys. benzoová
- 3 – kys. 4-hydroxybenzoová
- 4 – kys. 4-hydroxy-3-methoxybenzoová
- 5 – kys. beta-naftylacetát

UV – 220 nm

BGE: Tris/acetát

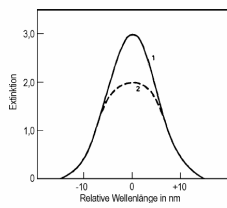
On-column absorpční spektrofotometrická detekce pro CZE



- L - lampa
- S - štěrba
- C - kapilára
- D - fotosenzor
- α, β, γ, δ – paprsky světelného zdroje

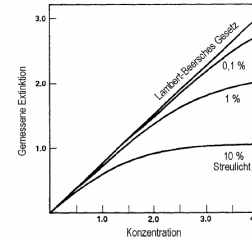
$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Vliv rozptylového světla



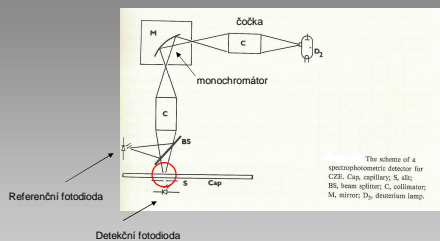
Streulicht begrenzt die maximal messbare Extinktion.
Kurve 1 beschreibt das wahre Absorptionsspektrum, Kurve 2 ist das beobachtete Absorptionsspektrum bei einem Streulichtanteil von 0,01 I₀.

Vliv rozptylového světla



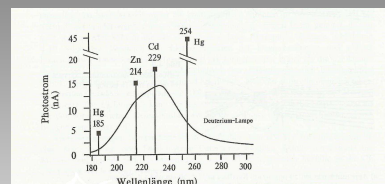
Streulicht bewirkt scheinbare negative Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz.

Schema UV spektrofotometrického detektoru



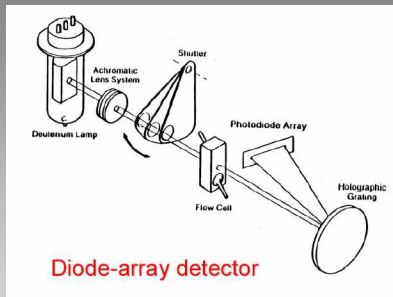
- Rtuťová lampa (254 nm)
- Kadmiová lampa (229nm, 326 nm)
- Zinková lampa (214 nm)
- Deuteriová, xenonová lampa (190-320 nm) – UV
- Wolframová lampa (300 – 700 nm) – Vis

Srovnání světelných intenzit kontinuálního světelného zdroje a čárových světelných zdrojů

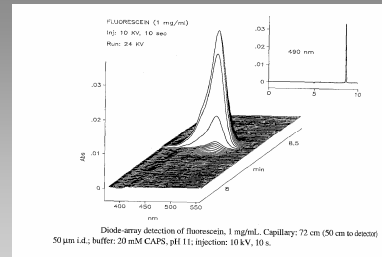


Vergleich der mittleren Lichtintensitäten (Lichtintensität gemessen mit einer Photozelle) einer Deuterium-, Quecksilberdampf- und Zinkdampflampe [23]

Diode-Array detektor

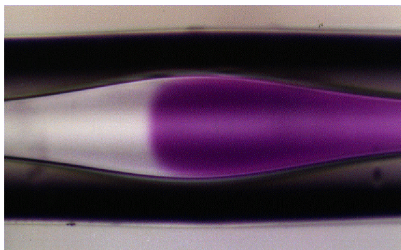


DAD detekce



Kapiláry s prodlouženou optickou dráhou světelného paprsku

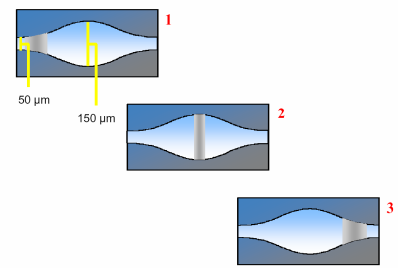
Extended Light Path Capillaries



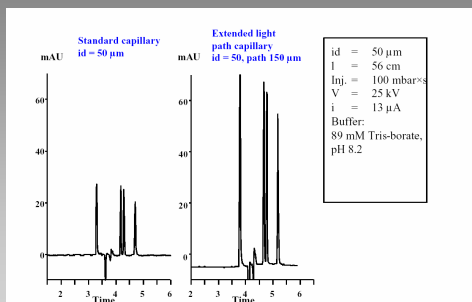
Photograph of a dye front passing through the extended light path capillary detection region

Princip kapiláry s prodlouženou optickou dráhou světelného paprsku

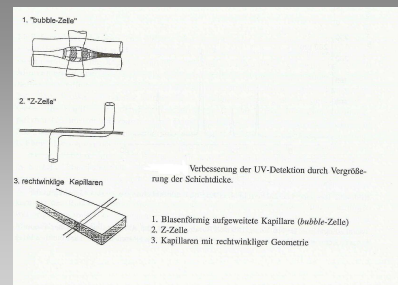
HP Extended Light Path Capillary



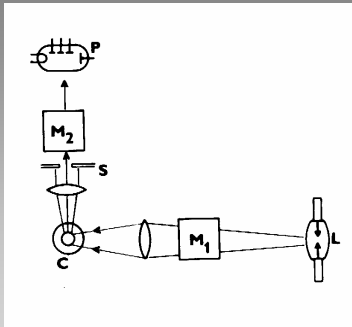
Vliv delší optické dráhy světelného paprsku na citlivost UV detekce



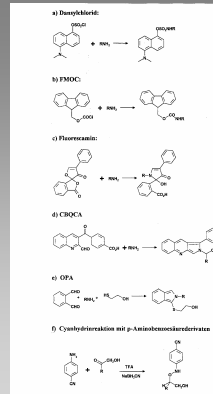
Zlepšení citlivosti UV-detekce prostřednictvím delší optické dráhy světelného paprsku - příklady



Fluorescenční detekce



- L – vysokoenergetický světelný zdroj
- M1, M2 – monochromátory
- C – kapilára
- S – štěrba
- P – fotomultiplikátor



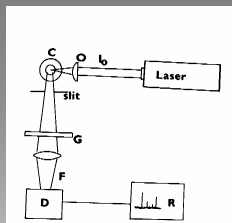
Derivizační reakce

- Chromofor
- Vložení náboje

Metody:

- Post-kolonová derivatizace
- EMMA (electrophoretically mediated microanalysis)

FMOC - Fluorenylmethoxycarbonylchloride
 CBQCA - 3-(4-carboxybenzoyl)-quinoline-2-carboxaldehyde
 OPA - Orthophthalaldehyde

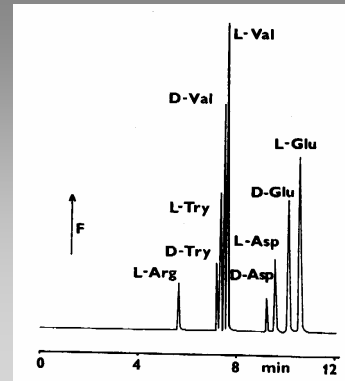


- O – objektiv
- I₀ – paralelní prasek laseru
- C – kapilára
- G – absorpční skleněný filtr
- F – emitovaná fluorescence
- D – detektor
- R – záznamník

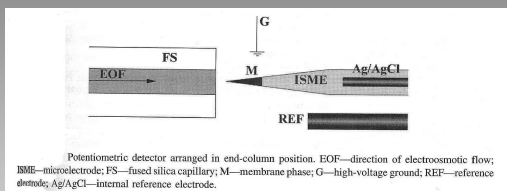
Laserem indukovaná fluorescence

- Advantages
 - Great improvements in sensitivity (down to 10⁻¹² M)
 - Specificity
 - High sensitivity competitive immunoassays (do not require fluorescent sample)
- Disadvantages
 - Needs a separate laser for each wavelength
 - Wavelengths limited at the moment
 - Usually requires derivatisation of analyte

Stanovení derivatizovaných aminokyselin (derivatizace dansylchloridem) pomocí CZE s LIF

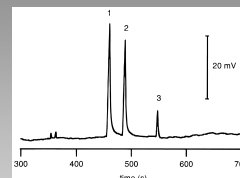


Potenciometrická detekce

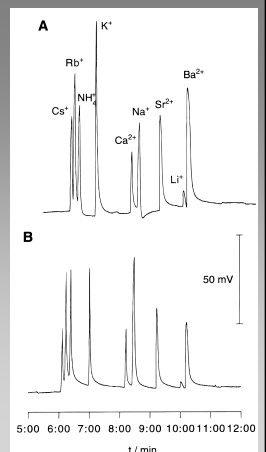


Potentiometric detector arranged in end-column position. EOF—direction of electroosmotic flow; ISME—microelectrode; FS—fused silica capillary; M—membrane phase; G—high-voltage ground; REF—reference electrode; Ag/AgCl—internal reference electrode.

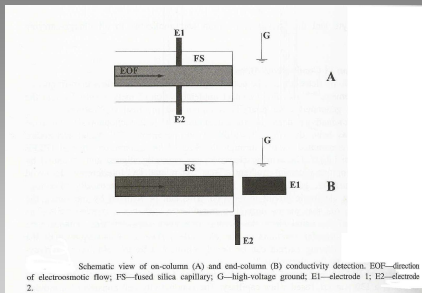
Potenciometrická detekce organických a anorganických iontů



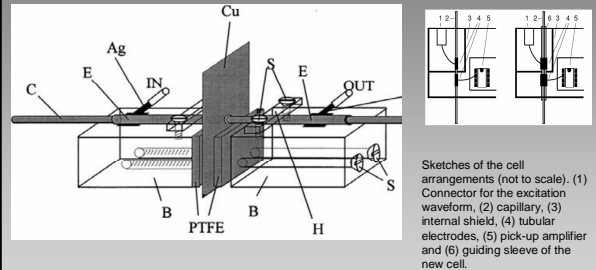
Elektroferogram směsi 1-undecansulfonové kys. (1), 1-heptansulfonové kys. (2), and 1-propanosulfonové kys. (3)



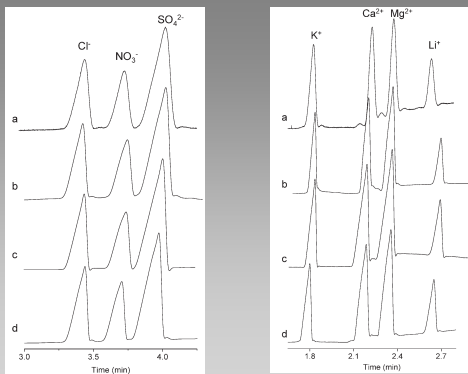
Vodivostní detekce



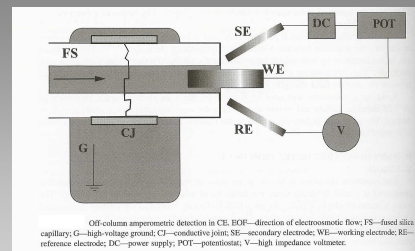
Bezkontaktní vodivostní detekce



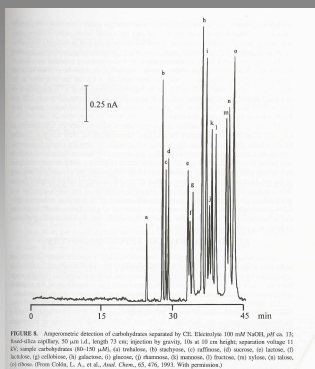
Srovnání home-made a komerčního detektoru



Amperometrická detekce



Amperometrická detekce karbohydrátů



Komponenty hmotnostního spektrometru

Ionový zdroj → Hmotnostní analyzátor → Detektor → Počítač

Typy ionizace

- nárazem elektronů (EI)
- působením elektrostatického pole (FI, FD)
- chemickou ionizací (CI)
- nárazem rychlými atomy nebo ionty (FAB)
- ionizací fotonů
- ionizací ²⁵²Cf
- elektrosprejem, termosprejem (ESI)
- ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI)

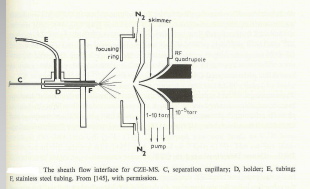
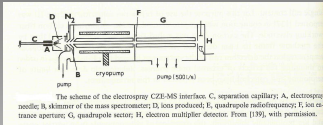
Hmotnostní analyzátoři

- kvadrupolový analyzátor
- iontová past
- průletový analyzátor (TOF)
- hybridní (Q-TOF, Q-trap, TOF-TOF, trap-TOF, trap-ICR, ...)
- FT-MS (ICP-MS)

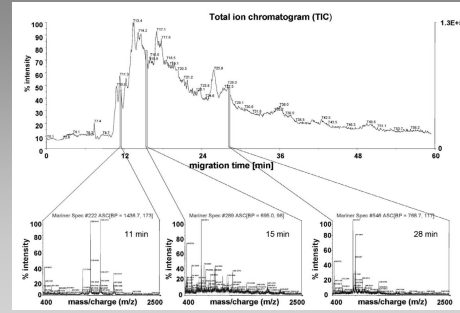
Detektory

1. Detektory pro přímá měření detekují el. proud vznikající přímým dopadem stanovených iontů (měření izotopového zastoupení prvků při zjišťování stáří hornin)
2. Násobičové detektory využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů (nejčastěji používané detektory v MS, poskytují měřitelný signál pro jednotlivé ionty)

CE – hmotnostní spektrometrie



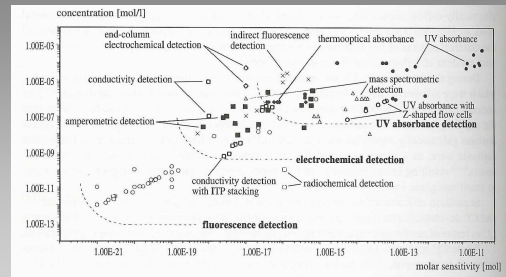
Příklady CE - MS



Netradiční detekční metody v kapilární elektroforéze

- Refrakční detekce (stanovení sacharidů)
- Radioaktivní detekce (stanovení radionuklidů, ^{32}P , ^{36}Cl)
- Termooptická detekce (podobný princip jako LIF, bioanalýzy)
- Ramanova detekce (na bázi laseru, měřeno rozptýlené světlo)

Obecně jsou to velmi málo využívané detekční techniky a jsou používány jako náhražka klasických detekčních metod v případě analýzy specifických analytů.



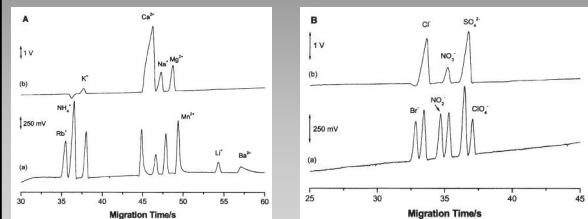
Method	Mass detection limit (molar)	Concentration limit (molar)	Advantages/ disadvantages
UV-Vis absorbance	10^{-6} - 10^{-8}	10^{-1} - 10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Universal Diode array offers spectra information
Fluorescence	10^{-6} - 10^{-11}	10^{-1} - 10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Sensitive Usually requires sample derivatization
Laser-induced fluorescence	10^{-6} - 10^{-10}	10^{-1} - 10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Extremely sensitive Usually requires sample derivatization Expensive
Amperometry	10^{-11} - 10^{-12}	10^{-6} - 10^{-7}	<ul style="list-style-type: none"> Sensitive Detection box useful only for electroactive analytes Requires special electronics and capillary modification
Conductivity	10^{-11} - 10^{-12}	10^{-1} - 10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Universal Requires special electronics and capillary modification
Mass spectrometry	10^{-12} - 10^{-13}	10^{-1} - 10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Structure and offers structural information Interface between CE and MS complicated
Indirect UV fluorescence, amperometry	10^{-10} - 10^{-11}	—	<ul style="list-style-type: none"> Universal Lower sensitivity than direct methods

Notes: Reductivity, thermal lens, refractive index, circular dichroism, Raman
*Assumes 10 μ l injection volume

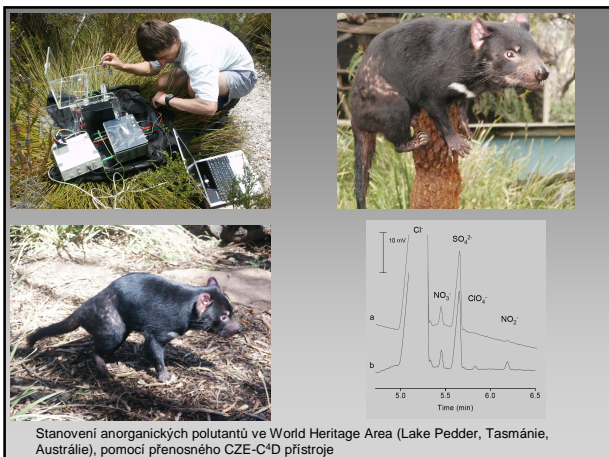
Reálné aplikace různých detekčních metod v kapilární elektroforéze

Environmentální analýzy

CZE-C4D

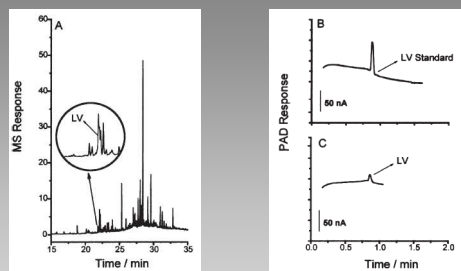


Anorganické kationty a anionty ve řece Rýn (Basilej, Švýcarsko), ultratrátá CE kapilára, detekční ceta upravena pro minimální detekční objem.



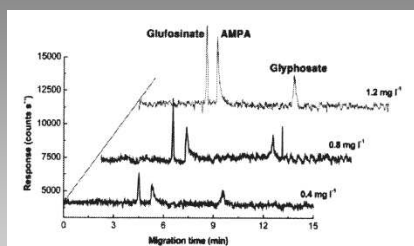
Stanovení anorganických polutantů ve World Heritage Area (Lake Pedder, Tasmánie, Austrálie), pomocí přenosného CZE-C'D přístroje

MCZE-Amperometrická detekce



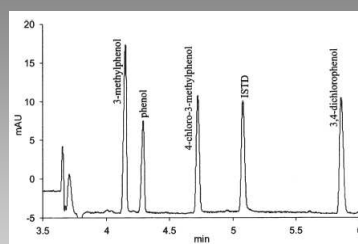
Srovnání referenční metody (GC-MS) a CE-micročipové metody pro stanovení levoglukosanu ve vzorcích ovzduší.

CZE-MS



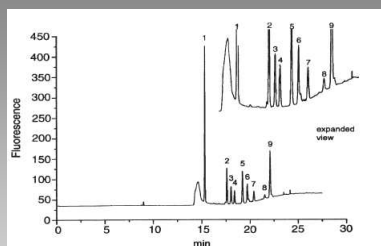
Stanovení organofosforečných pesticidů v přírodních vzorcích vod. Stanovení pomocí CZE-ICP-MS techniky.

CZE-UV



Stanovení fenolických sloučenin ve vodném extraktu znečištěné půdy.

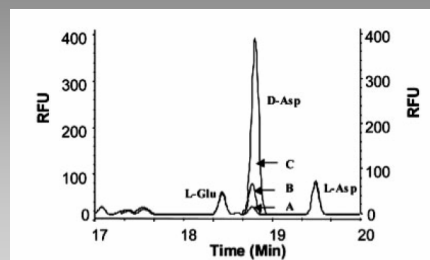
CZE-FD



Stanovení fluorochinolonů v povrchové vodě (po přečištění, prekoncentraci a SPE extrakci).

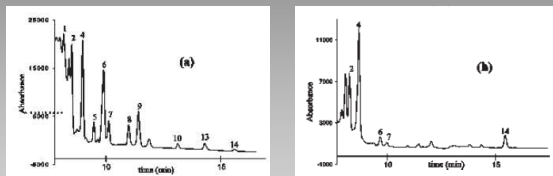
Analýzy potravin

CZE-LIF



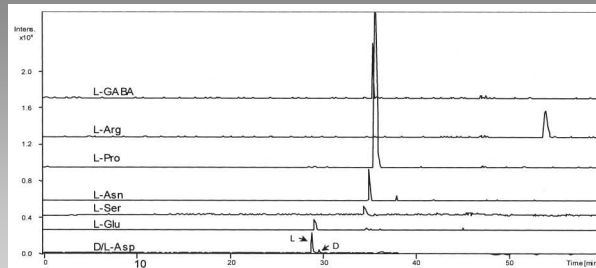
Stanovení chirálních aminokyselin ve vzorcích octu.

CZE-UV



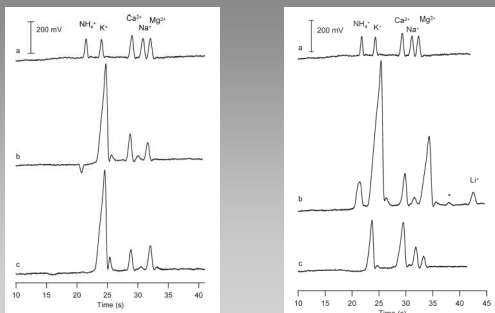
Stanovení fenolických sloučenin v různých vzorcích olivového oleje.

CZE-MS



Stanovení aminokyselin ve vzorku pomerančového džusu.

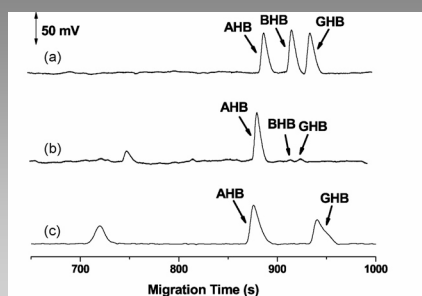
MCZE-C4D



Stanovení anorganických kationtů ve vzorcích ovocných džusů, piva a mléka pomocí mikročipové elektroforézy.

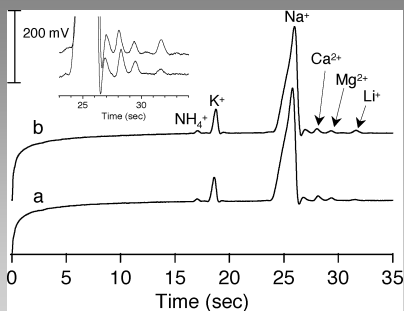
Forenzní a klinické analýzy

CZE-C4D



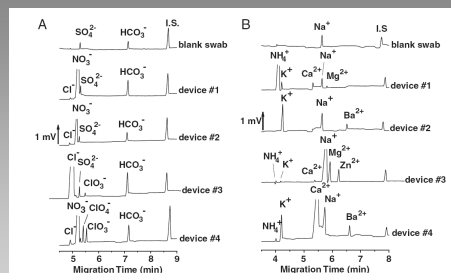
Stanovení psychotropních látek ve vzorcích moči, krevní plazmy atd.

MCZE-C4D



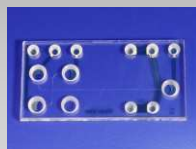
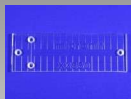
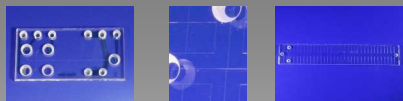
Stanovení Li⁺ a ostatních anorganických kationtů ve vzorcích krevního séra

CZE-C4D



Stanovení anorganických iontů ve vzorcích po explozi výbušnin – určení jaký druh výbuštiny byl při bombovém útoku použit

Mikročipová elektroforéza



Product:	Micronit CE chips
Product Code:	T21E
Chip Dimensions:	30 x 15 x 1.5 mm
Length to Cross:	21, 4.8, 4.3, 4.8 mm
Separation length:	21 mm
Injection Type:	double T

