

# **Kapilární Izotachoforéza**

$$\mathbf{v} = \mu \cdot \mathbf{E}$$

*v* - rychlost iontu v elektickém poli

*E* - intenzita elektrického pole

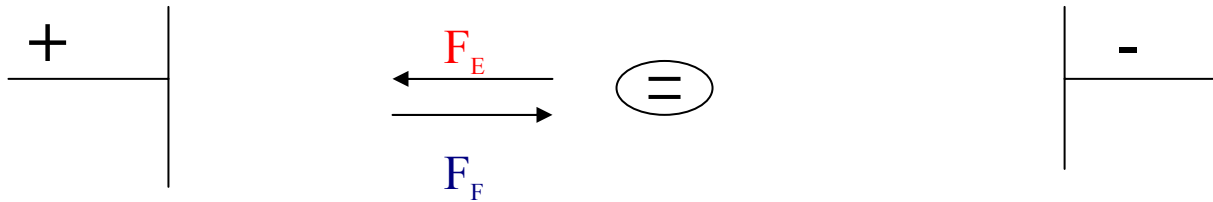
*μ* - elektroforetická pohyblivost

$$\mathbf{v} = \mu \cdot \mathbf{E}$$

$v$  - rychlost iontu v elektickém poli

$E$  - intenzita elektrického pole

$\mu$  - elektroforetická pohyblivost



$F_E$  - elektrická síla

$$\mathbf{F}_E = Q \times \mathbf{E}$$

$Q$  - náboj iontu

$E$  - intenzita elektrického pole

$F_F$  - frikční síla

$$\mathbf{F}_F = -6\pi\eta r \mathbf{v}$$

$\eta$  - viskozita roztoku

$r$  - poloměr iontu

$v$  - rychlost iontu

Během elfo se vytvoří ustálený stav, ustálí se rychlost iontu. Platí:

$$\mathbf{F}_E = \mathbf{F}_F \quad \text{při určité rychlosti}$$



$$Q \times E = 6\pi\eta r v$$

$$v = \mu \times E$$



$$\mu = Q/6\pi\eta r$$

# Elektroforetická pohyblivost

- vztažena vždy na prostředí, ve kterém se látka pohybuje

- jednotky  $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$

- hodnota pro většinu iontů  $\sim 10^{-8}$

- výjimky:	$\text{H}^+$	$362,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
	$\text{OH}^-$	$205,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$

## *Iontové pohyblivosti a $pK_a$ vybraných látek (25 °C)*

	<b>Iontová pohyblivost <math>\mu \cdot 10^{-9} \text{ (m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}</math></b>	<b><math>pK_a</math></b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	51,9	-
<b><math>\beta</math> - Alanin (+1)</b>	36,7	3,552
<b>Histidin (+1)</b>	29,6	6,04
<b>Tris</b>	29,5	8,076
<b>Cl<sup>-</sup></b>	-79,1	-
<b>kyselina octová</b>	-42,4	4,819
<b>Kyselina propionová</b>	-39,1	4,874
<b>Kyselina kapronová</b>	-30,2	4,857

- znaménko určuje směr pohybu iontu

pohyblivost kationtů - kladné znaménko

pohyblivost aniontů - záporné znaménko

# Získání údajů o pohyblivosti

## 1. literární prameny

### publikované obsáhlé tabulky

*Hirokawa T. and all. J. Chromatog. 271, D1 (1983)*

### přepočít z dostupnějších limitních iontových vodivostí

$$\mu = \frac{\lambda_{mol}}{F |z|}$$

$\lambda$  - molární iontová vodivost

F - Faradayova konstanta ( 96487 C mol<sup>-1</sup> )

|z| - počet elementárních nábojů nesených iontem

## 2. Empirické rovnice

Joklova: 
$$|\mu| = (|z| \frac{485}{\sqrt{M}} - 9,6) \cdot 10^{-9}$$

M - relativní iontová hmotnost

možnost korelací - u podobných iontů dosadit do rovnice a zjistit číselné konstanty

problém - u malých iontů (hlavně kovových) zůstává část hydratačního obalu, jehož velikost se těžko odhaduje

## Příklad použití Joklovy rovnice

Bez korelace:

$$|\mu| = \left( \frac{485}{\sqrt{60,05}} - 9,6 \right) \cdot 10^{-9}$$

$$\mu = -52,9 \cdot 10^{-9}$$

Korelace:

$$|37,1| = \left( \frac{X}{\sqrt{74,08}} - 9,6 \right) \cdot 10^{-9}$$

$$X = 401,94$$

$$|\mu| = \left( \frac{401,94}{\sqrt{60,05}} - 9,6 \right) \cdot 10^{-9}$$

$$\mu = -42,3 \cdot 10^{-9}$$

## Stanovení mobility kyseliny octové

Kyselina octová

$$M_r = 60,05$$

$$\mu = -42,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$$

Kyselina propionová

$$M_r = 74,08$$

$$\mu = -37,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$$

## Skutečná pohyblivost - vliv vnějšího prostředí

vliv iontové síly - Onsagerova rovnice

$$\mu = \left| \mu^0 \right| - \left( 0,23 \left| \mu^0 z z_R \right| + 31,3 \cdot 10^{-9} |z| \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}$$

- $|\mu|$  - iontová pohyblivost
- $|\mu^0|$  - limitní iontová pohyblivost
- $|z_R|$  - náboj protiontu
- $I$  - iontová síla



# Vliv teploty

$$\mu (T) = \mu (T_0) [ 1 + a (T - T_0) ]$$

$$a \approx 0,02$$

zvýšením teploty o 10 °C se zvýší pohyblivost přibližně o 20%

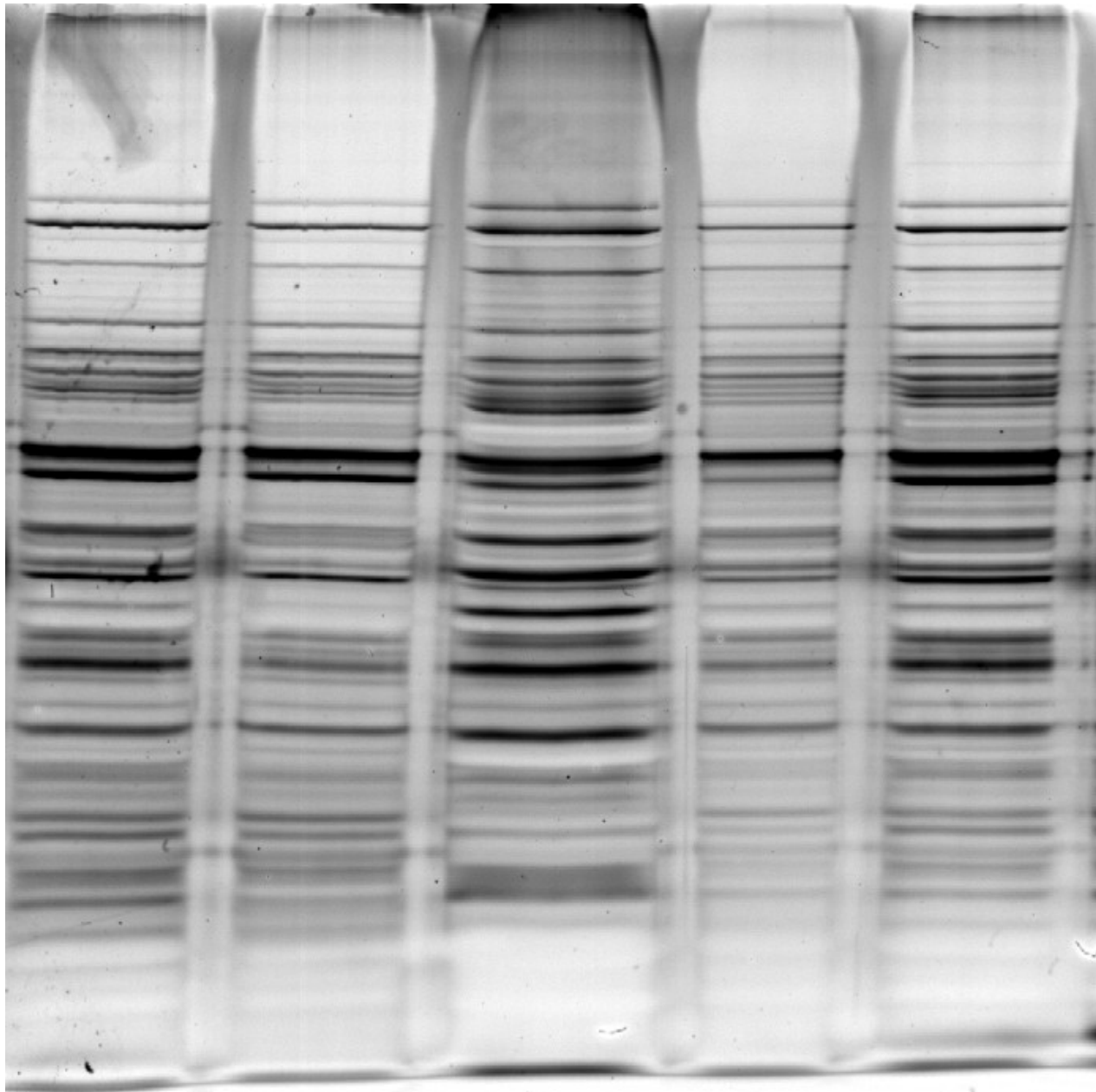
1

2

3

4

5



## Efektivní pohyblivost

vliv chemických rovnováh na pohyblivost iontů

Tiselius:

*Látka, přítomná v roztoku ve více formách, které jsou navzájem v rychlé dynamické rovnováze, migruje elektrickým polem jako jediná látka o určité efektivní pohyblivosti  $\mu$  :*

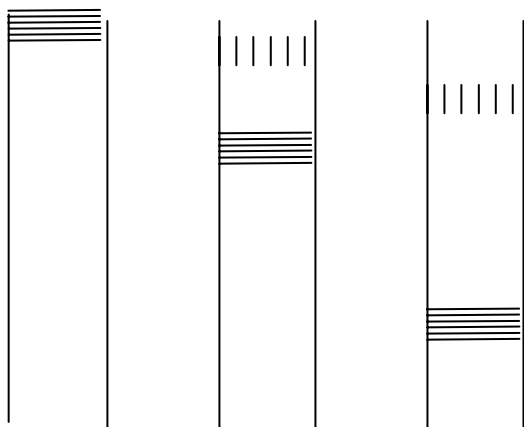
$$\bar{\mu} = \sum_i x_i \mu_i$$

$x_i$  - molární zlomky jednotlivých forem látky

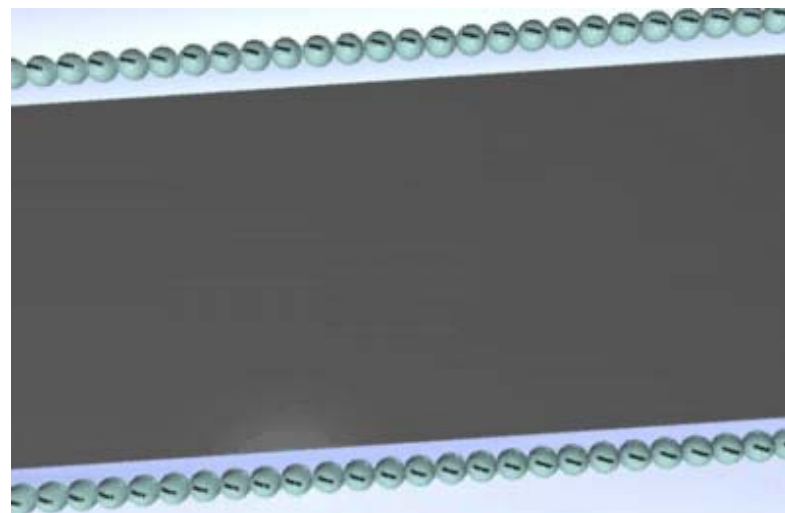
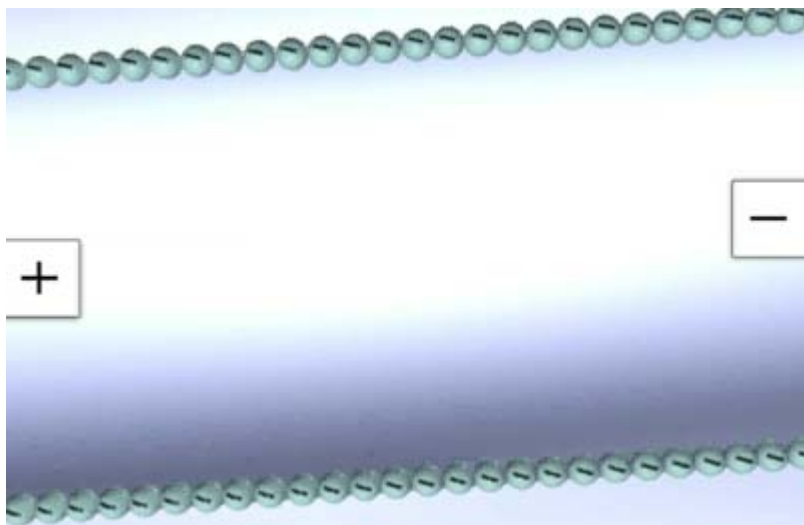
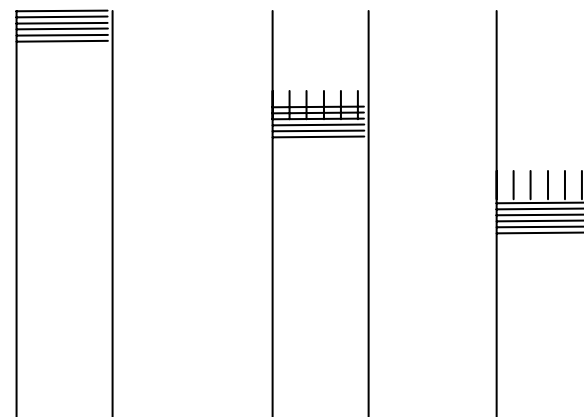
$\mu_i$  - iontové pohyblivosti jednotlivých forem látky

# Princip metody

## Zónová elektroforéza

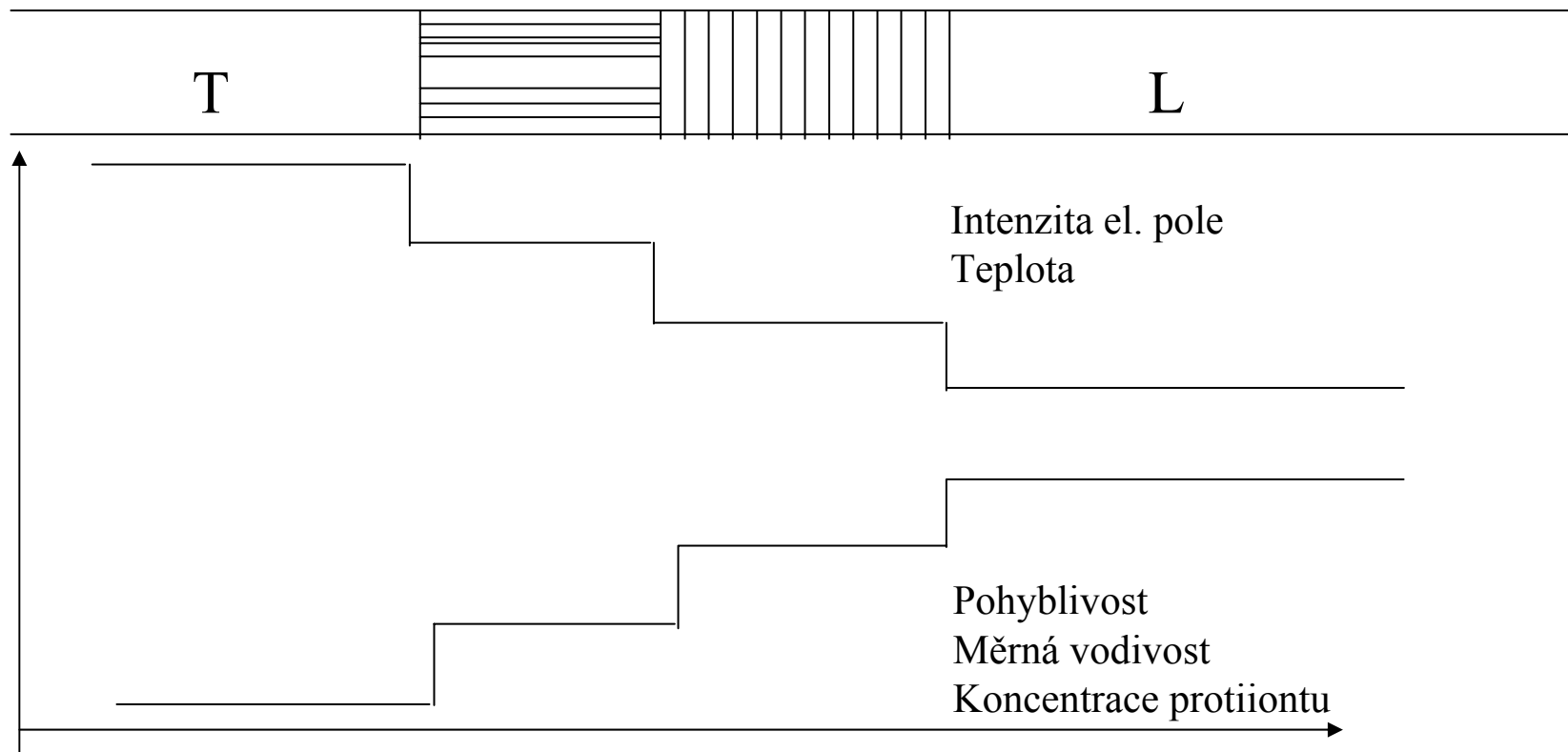


## Izotachoforéza



# Vlastnosti izotachoforetických zón

## 1. Samozaostřující efekt



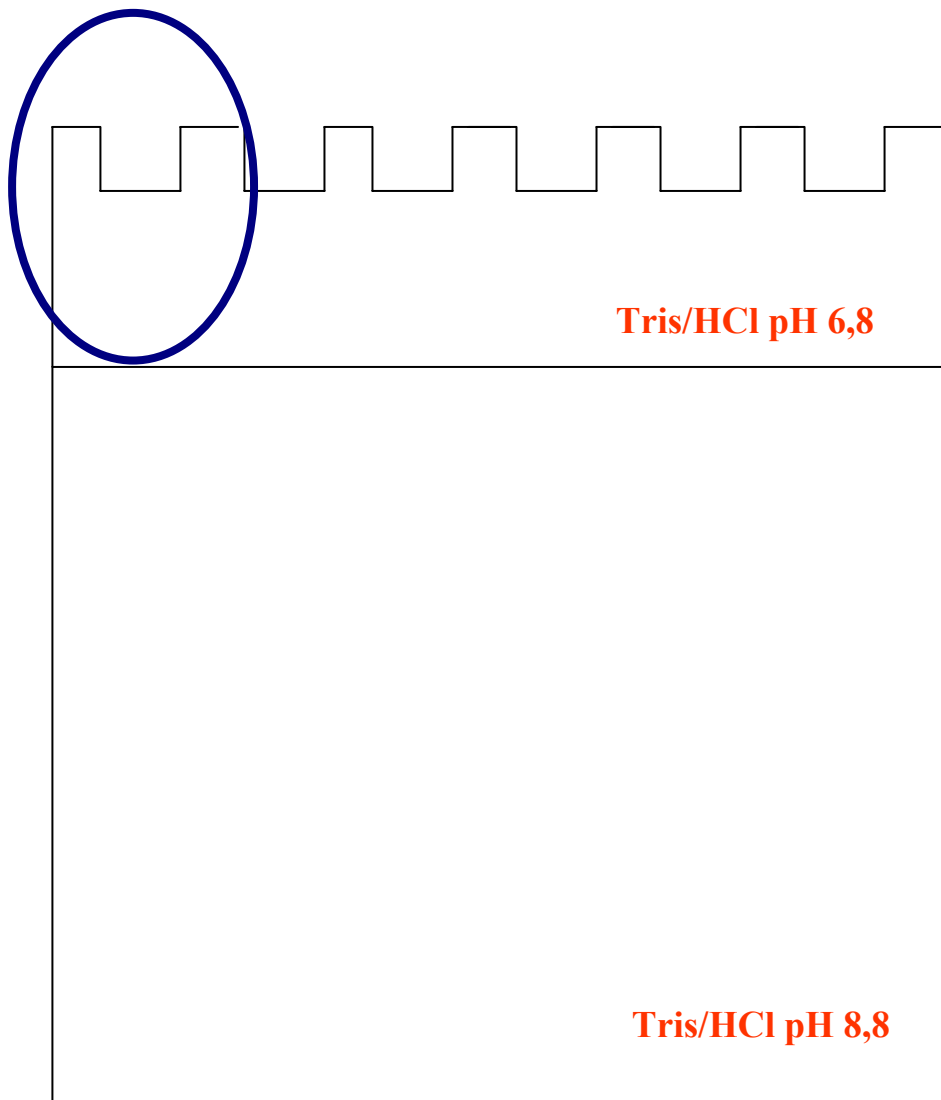
## 2. Koncentrace v izotachoforetických zónách

$$c_X = c_L \cdot \frac{\mu_X}{\mu_X + |\mu_R|} \cdot \frac{\mu_L + |\mu_R|}{\mu_L}$$

Při analýzách s neměnnou koncentrací vedoucího elektrolytu je koncentrace látek v zónách konstantní

- lze využít délku zóny pro kvantitativní vyhodnocení
- koncentrace látek v původním vzorku nemá žádný vliv na výslednou koncentraci látky v adjustované izotachoforetické zóně

# Diskontinuální elektroforéza



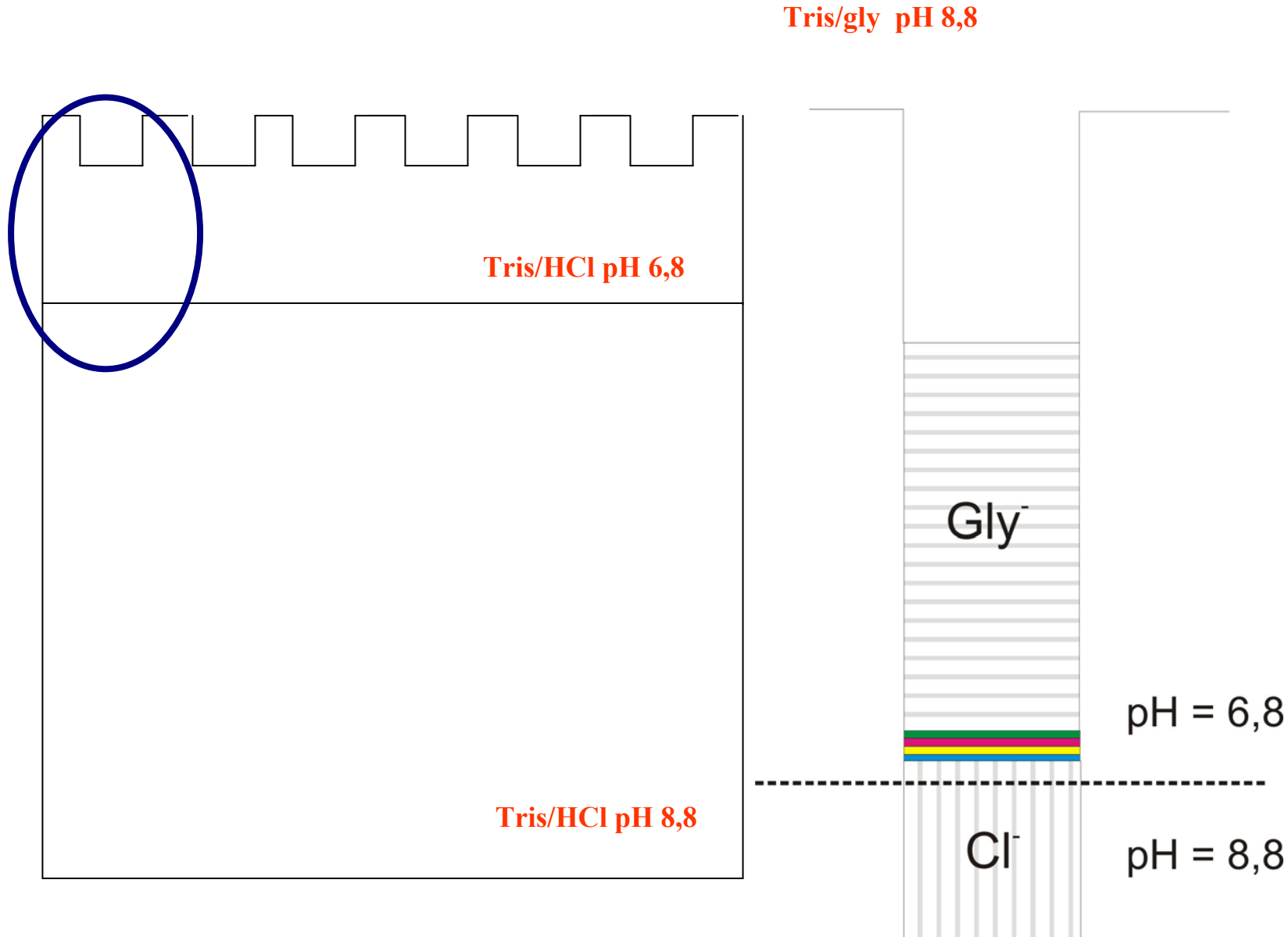
**Tris/gly pH 8,8**



**Tris/HCl pH 6,8**

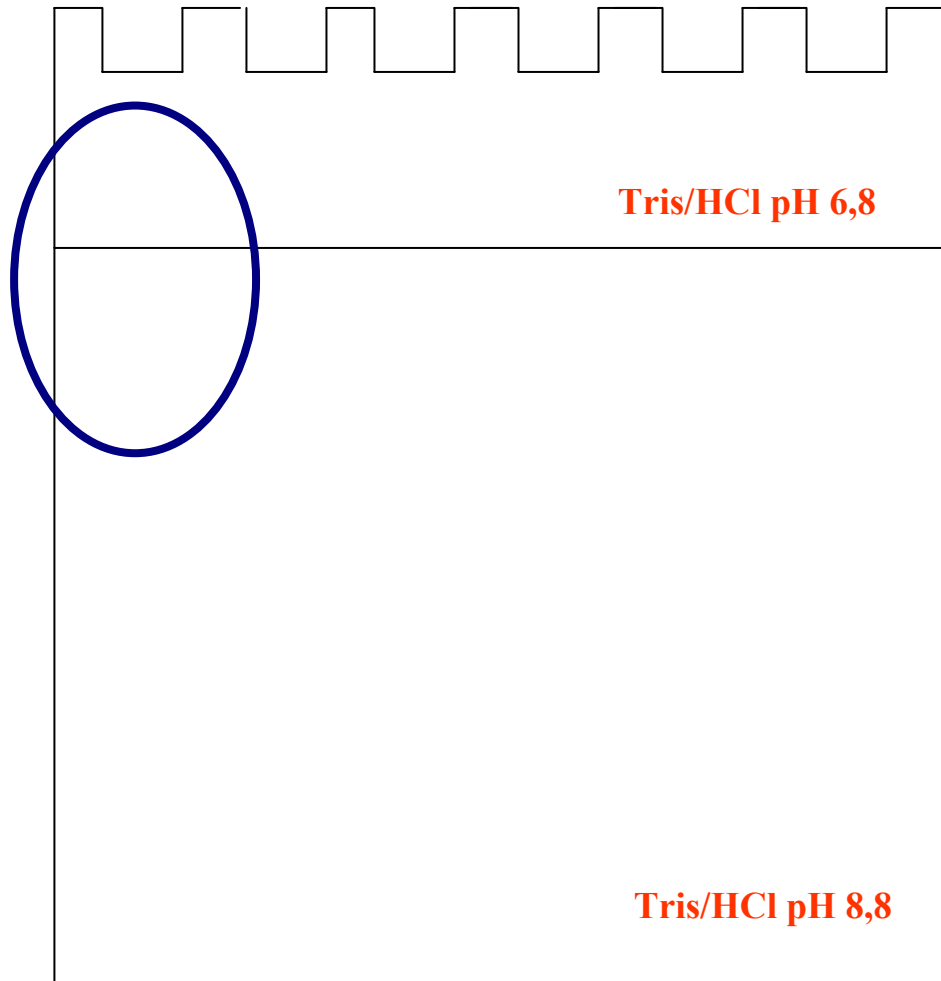
**Tris/gly pH 8,8**

# Diskontinuální elektroforéza

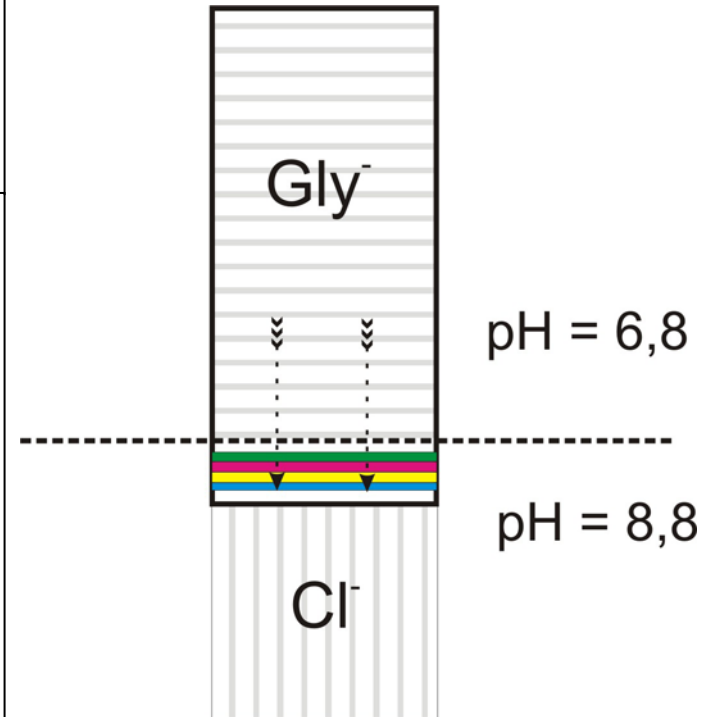




# Diskontinuální elektroforéza

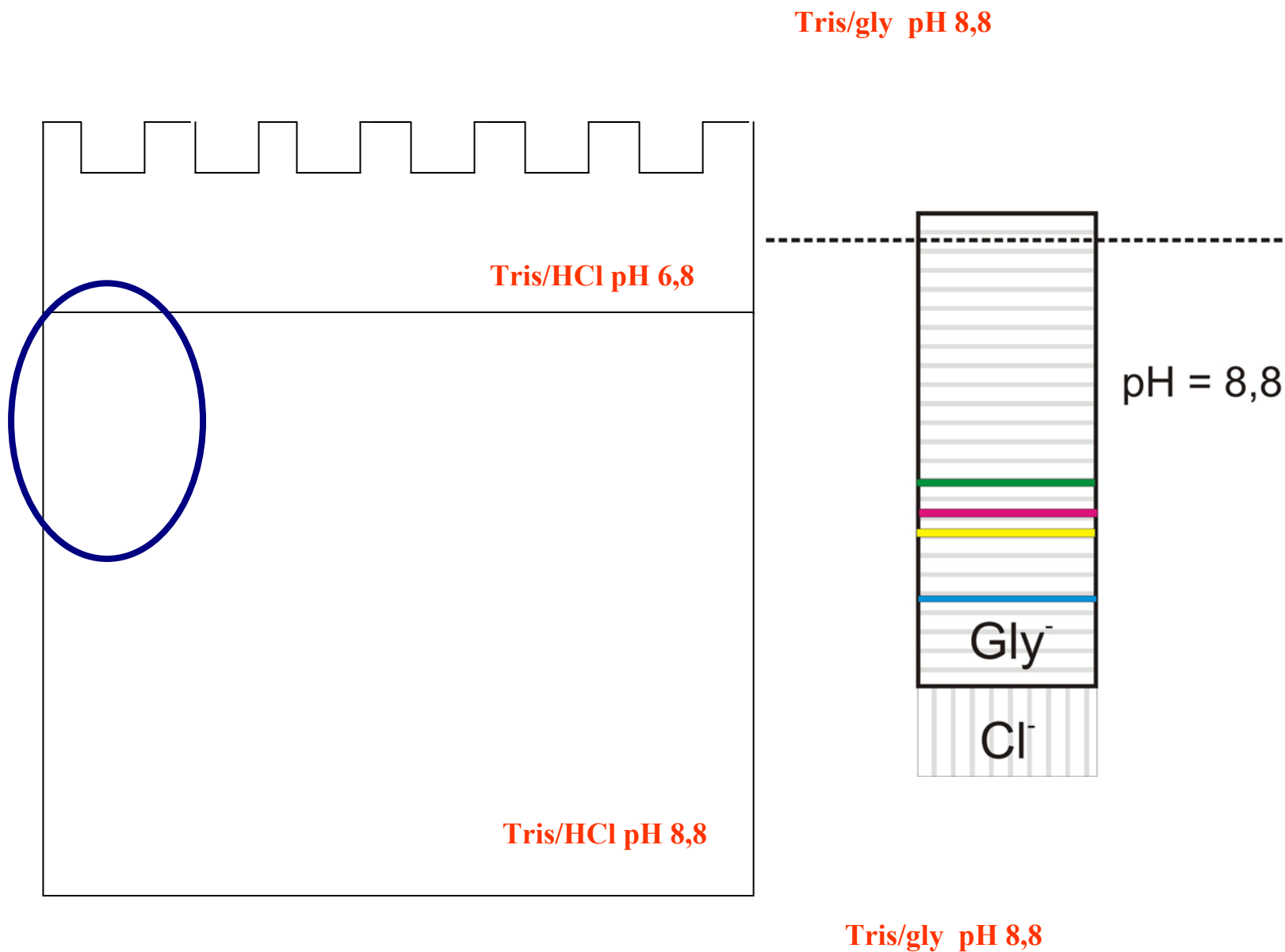


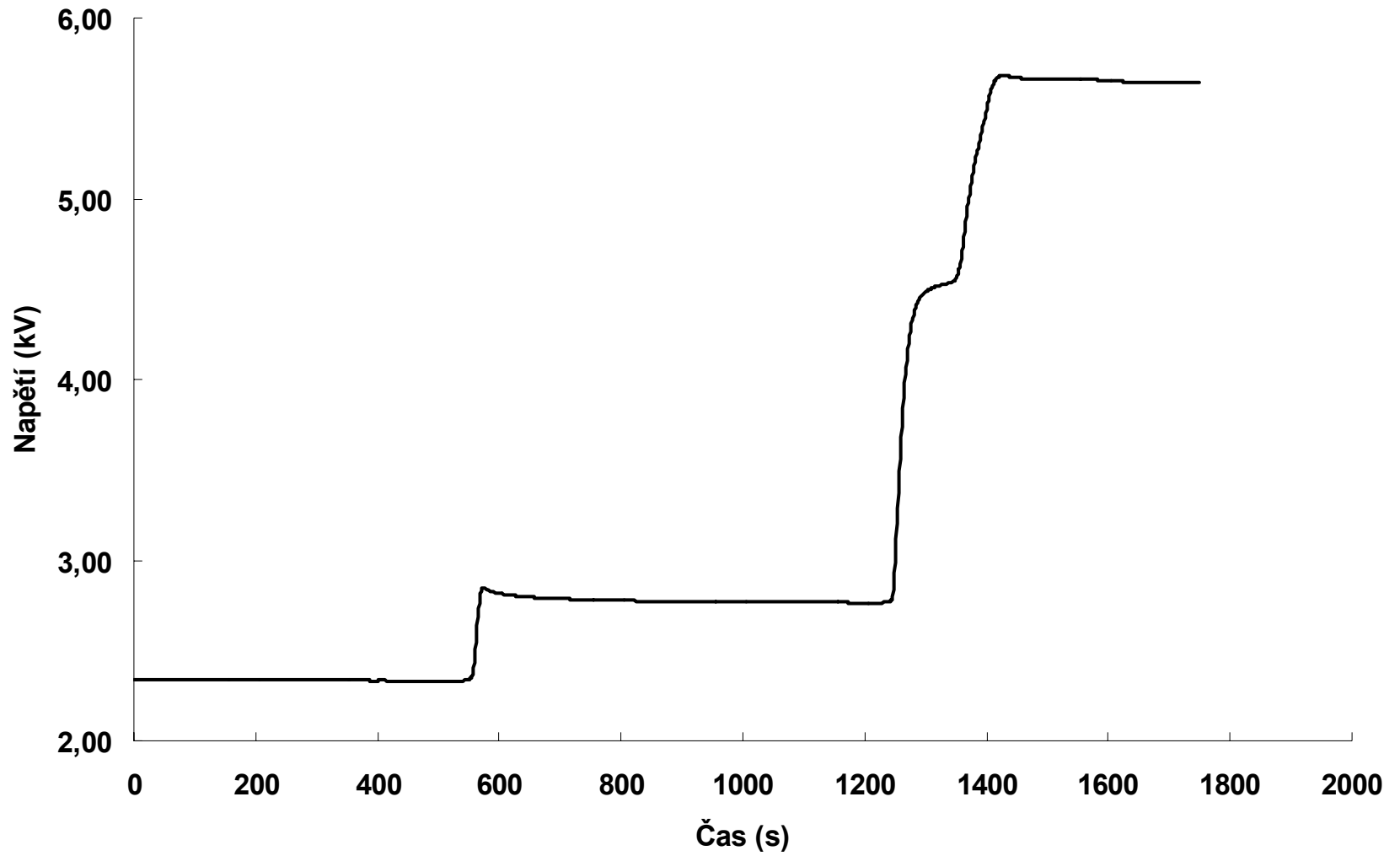
**Tris/gly pH 8,8**



**Tris/gly pH 8,8**

# Diskontinuální elektroforéza





# Historie

1897 – *Kohlrausch* - teoretické základy metody

1923 – *Kendall* - první pokusy separace látek na izotachoforetickém principu

1953 – *Longsworth* – demonstrována možnost užití izotachoforézy jako analytické kapilární separační metody

1963 – *Konstantinov a Ošurkovová* – separace kationtů kovů v tenkostěnné skleněné kapiláře

1967 – popis prvního izotachforeografu

1970 – začal se používat název izotachoforéza

## Komerční přístroje

1974 – **Tachophor 2127 LKB**, Bromma, Švédsko

1975 – **IP-1B** (následovaly **IP-2A** a **IP-3A**), Shimadzu, Kyoto, Japonsko

1983 – **CS Isotachophoretic Analyser**, Villa LABECO,

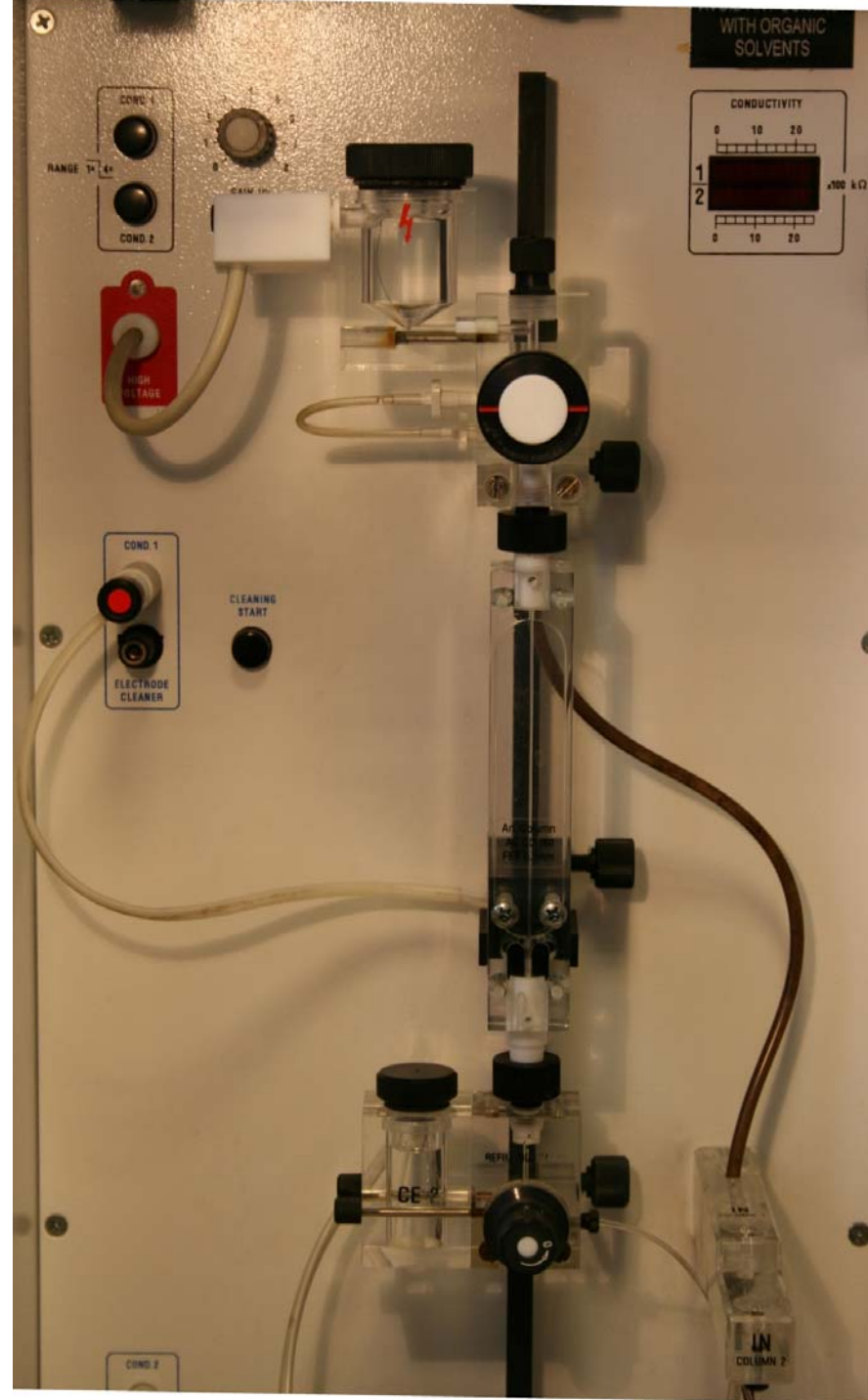
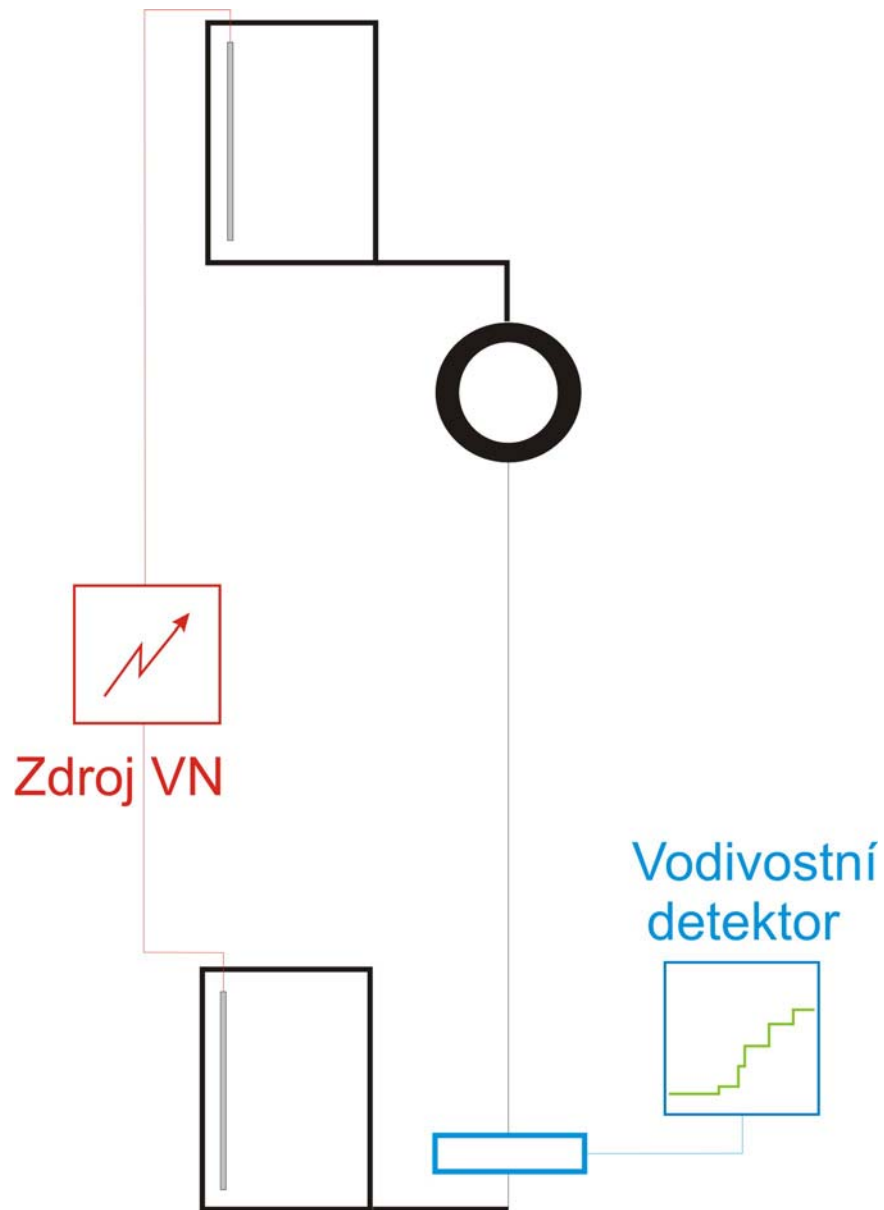
Spišská Nová Ves, Slovensko

Další výrobci:

ITABA, Švédsko (**Tachophor Delta**)

JZD Odra Krmelín (**Agrofor**)

# EA 100



## Villa LABECO, Spišská nová ves, Slovensko

Detektory

Vodivostní

Rozsah 30 k $\Omega$  - 20 M  $\Omega$

Detekční limit 1 x 10<sup>-10</sup> M

Fotometrický

254, 289 nm (405)

detekční limit 5 x 10<sup>-12</sup> M (kyselina pikrová)

Předseparační kolony

Délka 90 a 160 mm

Průměr 0.8 mm

Separační kolony

Délka 90 a 160 mm

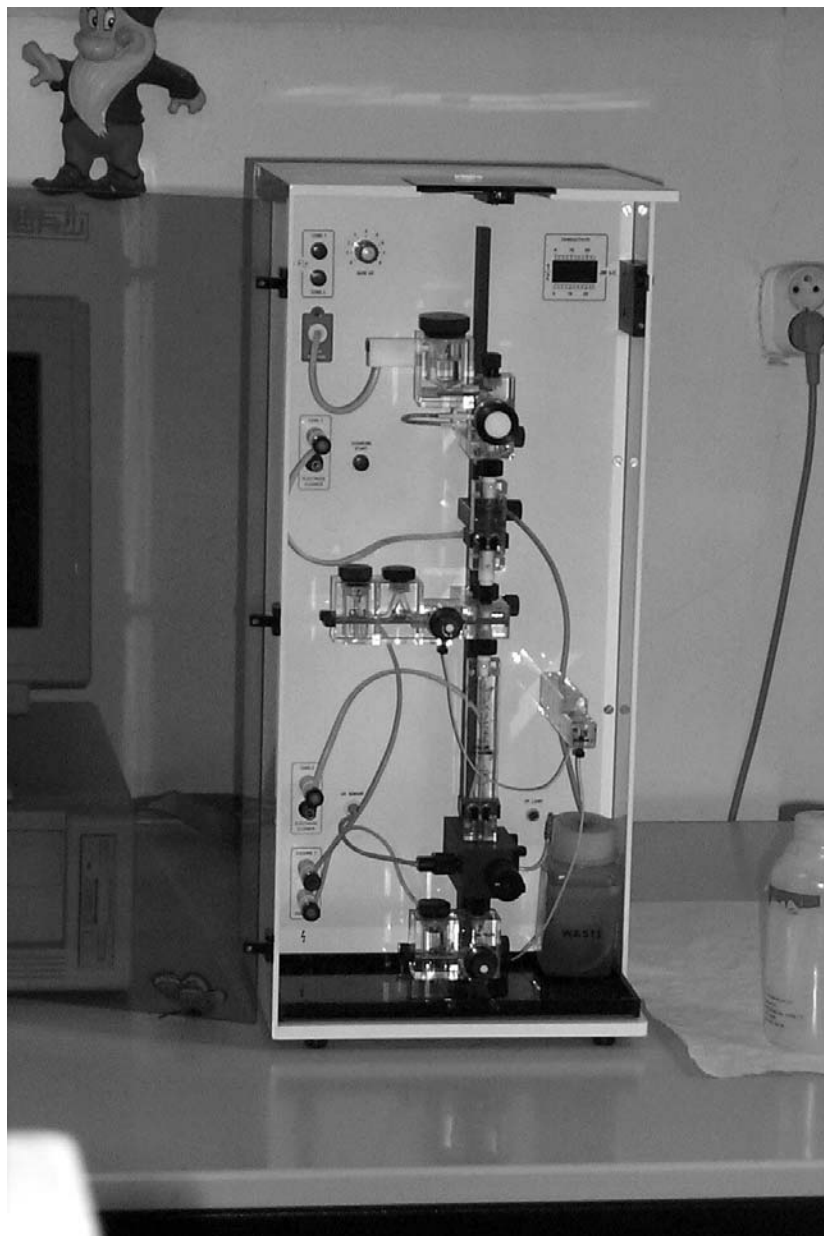
Průměr 0.3 mm

Dávkování vzorku mikrostříkačkou  
nebo dávkovacím kohoutem (30 $\mu$ l)

Možnost práce v roztocích s metanolem (do 30%)

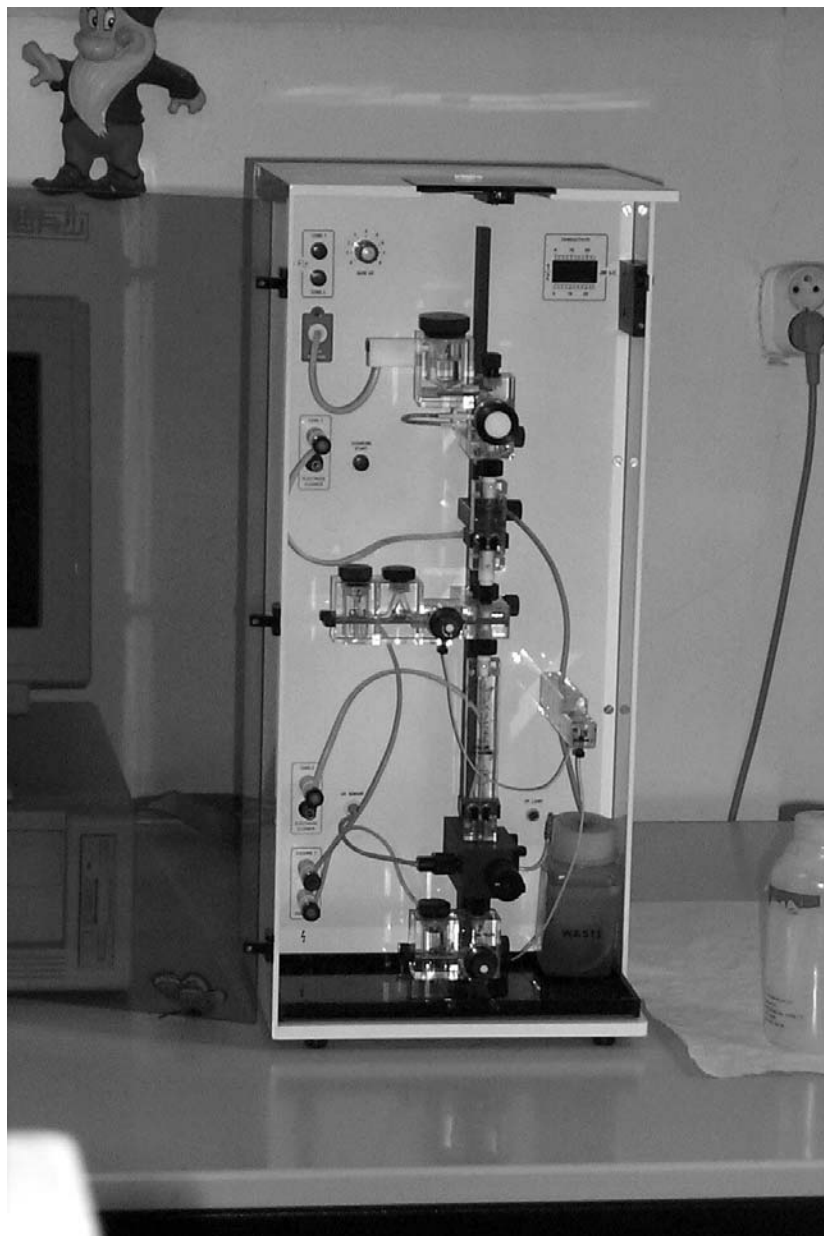
Maximální napětí 15 KV

Maximální proud 500  $\mu$ A



## Promytí systému vodícím ellytem



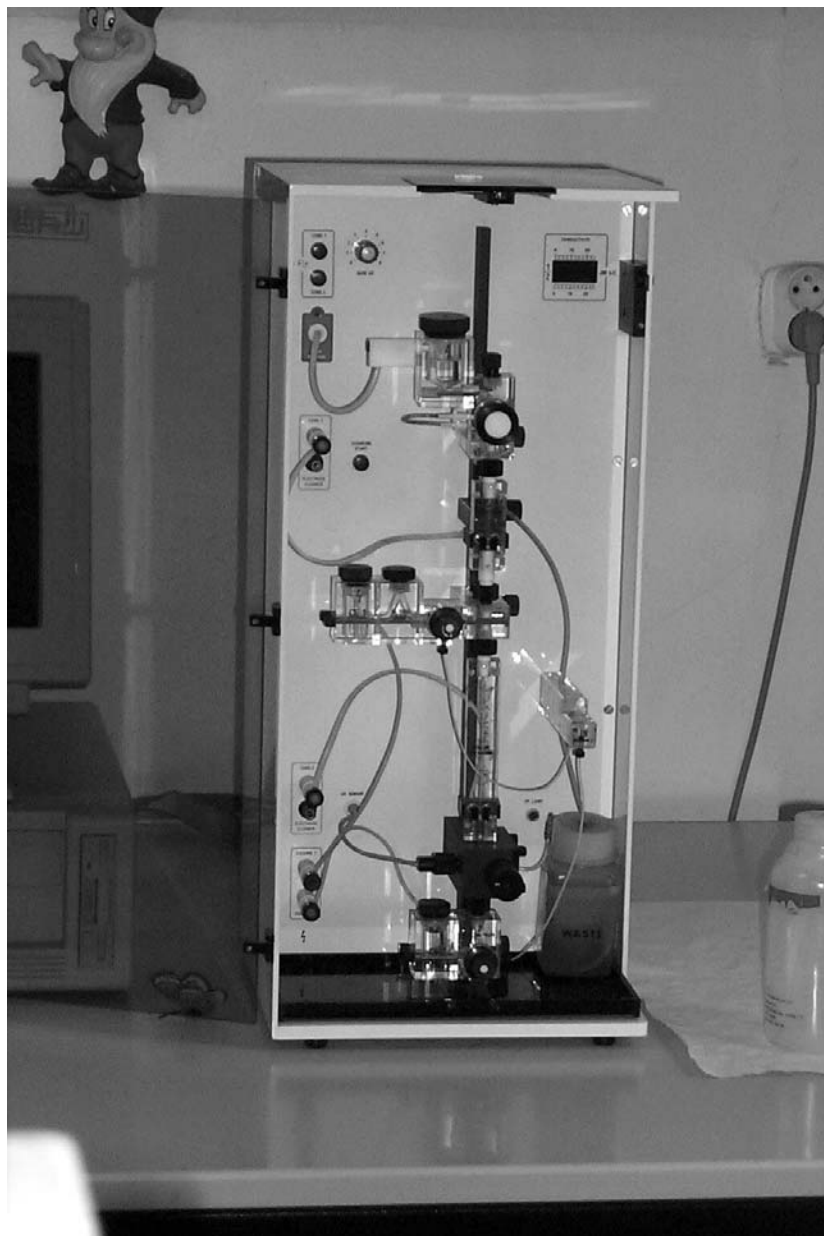


**Promytí systému vodícím ellytem**

**Promytí nanášecího ventilu a prostoru pro koncový ellyt**





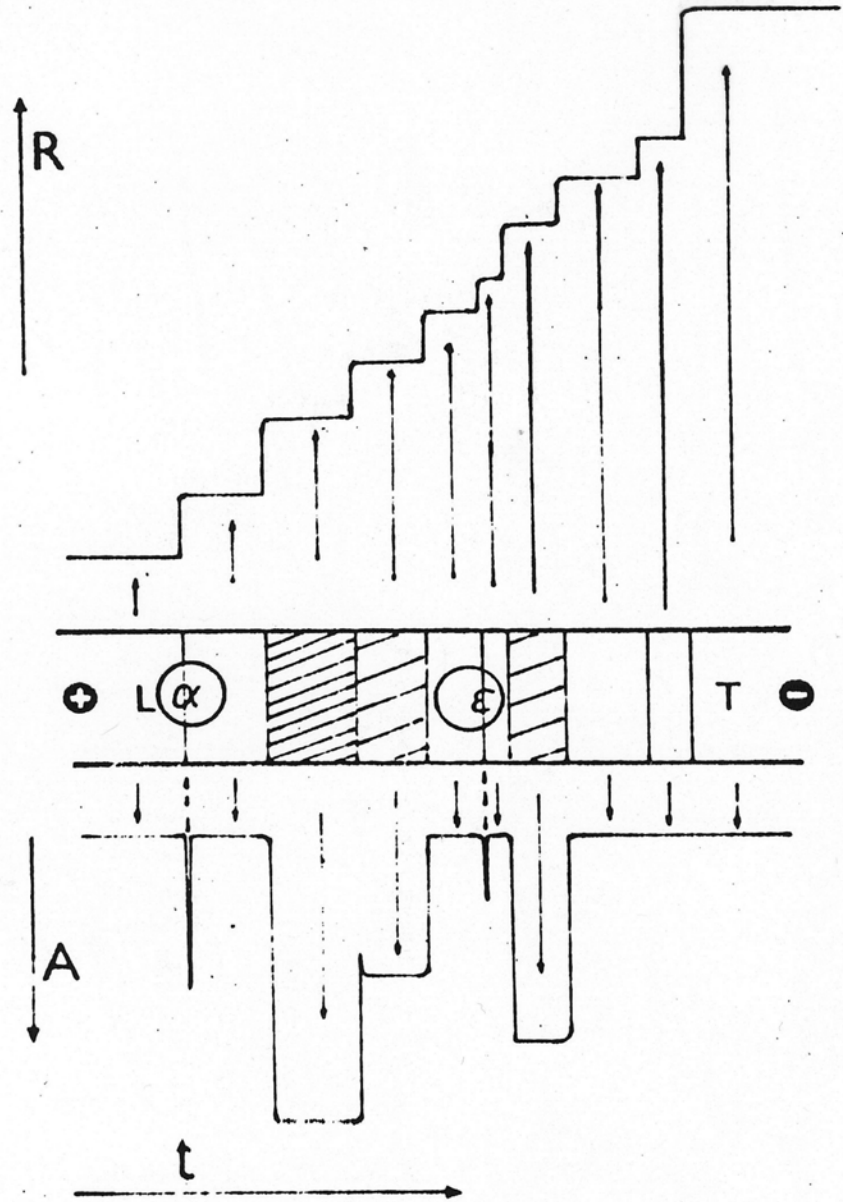
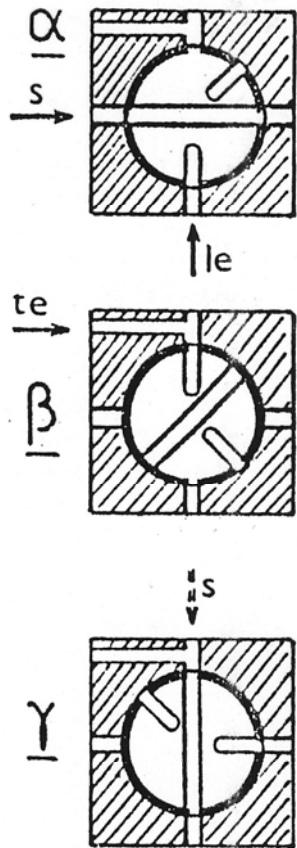
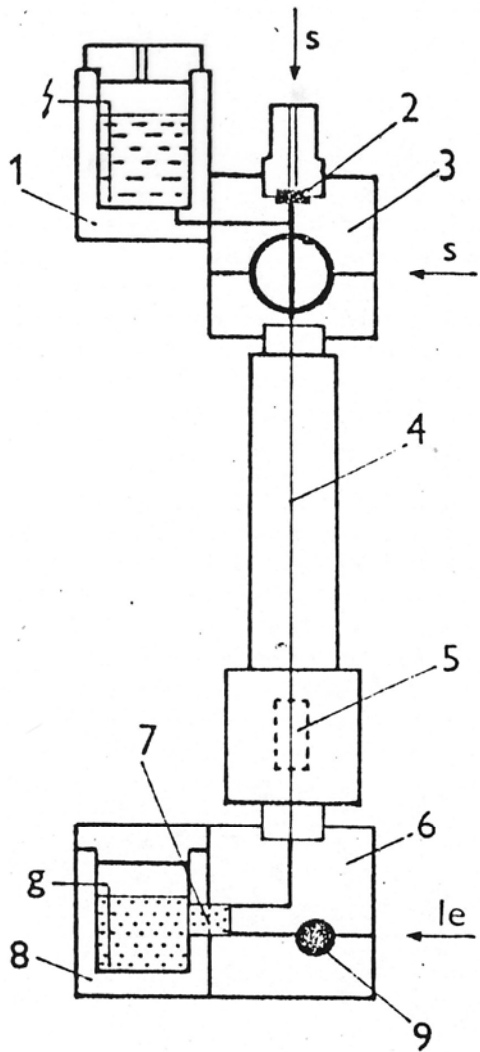


**Promytí systému vodícím ellytem**

**Promytí nanášecího ventilu a prostoru pro koncový ellyt**

**Nanesení vzorku**





# Volba elektrodového systému

- rozpustnost (vyšší mastné kyseliny-často nutno používat směsná rozpouštědla jako voda-metanol)
- chemická stabilita (oxidace či redukce v elektrolytu, srážení iontů z roztoku např  $\text{Pb}^{2+}$  či  $\text{Ag}^+$  x  $\text{Cl}^-$ )
- ionizace analyzovaných látek (velmi důležité kritérium pro všechny elektromigrační metody)

V případě slabých kyselin a bází je stupeň jejich ionizace závislý na pH prostředí (v ITP na pH dané zóny)

# Jednosytná slabá kyselina (HA)

Disociační konstanta je rovna:

$$K_{HA} = \frac{c_{H^+} \cdot c_{A^-}}{c_{HA}}$$

Disociační stupeň pak:

$$\alpha_A = \frac{c_{A^-}}{c_A} = \frac{K_{HA}}{K_{HA} + c_{H^+}}$$

Pro efektivní pohyblivost platí:

$$\overline{\mu}_A = \mu_A \cdot \alpha_A$$

$$\overline{\mu}_A = \mu_A \cdot \frac{K_{HA}}{K_{HA} + c_{H^+}}$$

## Ostwaldův zředovací zákon:



$$c_{H^+} = \alpha \cdot c$$

$$c_{A^-} = \alpha \cdot c$$

$$c_{HA} = (1 - \alpha) \cdot c$$

$$K_{HA} = \frac{\alpha \cdot c \cdot \alpha \cdot c}{(1 - \alpha) \cdot c} = \frac{\alpha^2 \cdot c}{(1 - \alpha)}$$

Z toho  $\alpha$ :

$$K_{HA} = \frac{\alpha^2 \cdot c_{H^+} / \alpha}{(1 - \alpha)}$$

$$\alpha = \frac{K_{HA}}{K_{HA} + c_{H^+}}$$

Slabá kyselina je disociována z 50% při  $pH = pK_{HA}$ , tedy:

$$\alpha_A = \frac{\overline{\mu}_A}{\mu_A} = 0,5$$

Pro  $pH \geq pK_{HA} - 1$  je disociace větší než 10% což už je podmínka pro migraci analyticky využitelnou

$$\alpha_A = \frac{\overline{\mu}_A}{\mu_A} = 0,1$$

$$0.1 = \frac{K_{HA}}{K_{HA} + c_{H^+}}$$

$$0.1 c_{H^+} = 0.9 K_{HA}$$

$$-1 - pH = -0.045 - pK_{HA}$$

Analogická situace je u slabých bází:

$$\overline{\mu}_B = \mu_B \cdot \frac{c_{H^+}}{K_{BH} + c_{H^+}}$$

$$pH \leq pK_{BH} + 1$$

	Kationtová ITP	Aniontová ITP
vedoucí ion	$K^+, NH_4^+, Na^+$	$Cl^-$
terminátor	Slabá báze	Slabá kyselina
Protiion	Slabá kyselina	<b>Slabá báze</b>
Podmínka ionizace analyzovaných látek	$pH \leq pK_{BH} + 1$	$pH \geq pK_{HA} - 1$

## Kationty

Vedoucí elektrolyt: 5 – 50 mM KOH + protiion

protiion	pH	Koncový elektrolyt
Kyselina octová	4,2 – 5,2	GABA
Kyselina propionová	4,4 – 5,4	Kreatinin
MES	5,7 – 6,7	Histidin, imidazol
veronal	6,9 – 7,9	Imidazol, triethylendiamin
asparagin	8,3 – 9,3	Triethanolamin, Tris
glycin	9,1 – 10,1	Triethanolamin, NH <sub>3</sub>
β -alanin	9,8 – 10,8	NH <sub>3</sub> , ethanolamin

## Anionty

**Vedoucí elektrolyt: 2 – 20 mM HCl + protiion + aditivum (0,05 – 0,2% polyvinylalkohol, 0,05 – 0,5% hydroxyetyl celuloza, 0,05 – 0,5% Triton X-100)**

protiion	pH	Koncový elektrolyt
β - Alanin	3,1 – 4,1	Kyselina glutamová Kyselina propionová Kyselina kapronová
EACA	4,1 – 5,1	Kyselina glutamová Kyselina propionová Kyselina pivalová
Kreatinin	4,5 – 5,5	Kyselina pivalová MES
Histidin	5,5 – 6,5	MES, HEPES
Imidazol	6,6 – 7,6	MES, veronal
Tris	7,6 – 8,6	Glycin + Ba(OH) <sub>2</sub> Asparagin + Ba(OH) <sub>2</sub>
Ammediol	8,3 – 9,3	Glycin + Ba(OH) <sub>2</sub> EACA + Ba(OH) <sub>2</sub>
ethanolamin	9,0 – 10,0	EACA + Ba(OH) <sub>2</sub>

Jevy provázející separaci

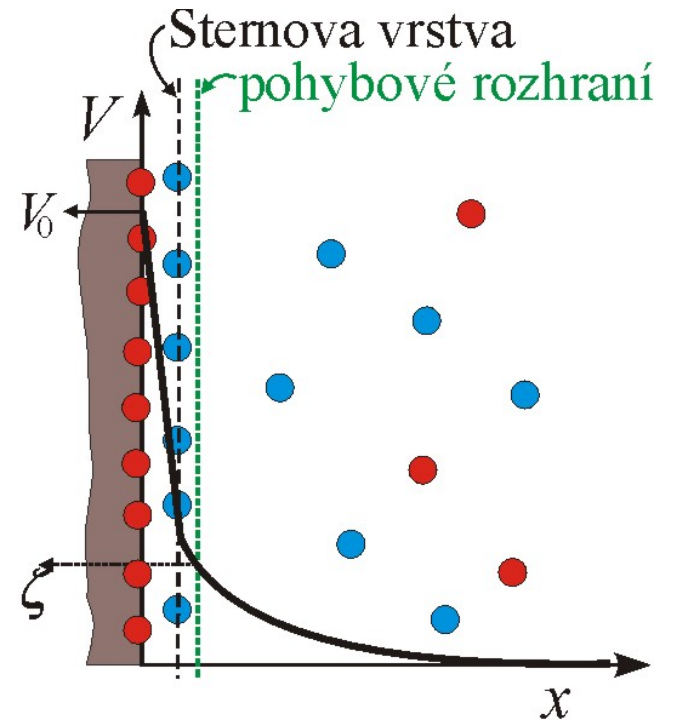
Elektroosmotický tok

$$v = \frac{\varepsilon \xi E}{\eta}$$

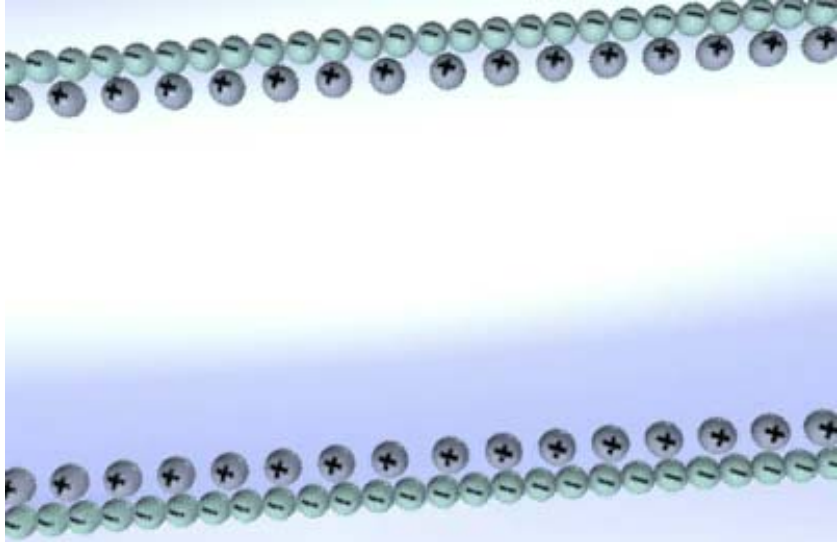
$\varepsilon$  - permitivita roztoku

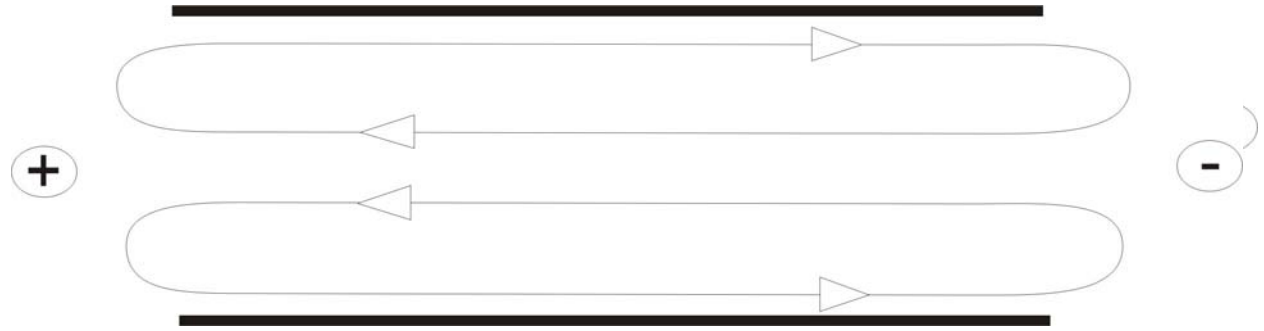
$\eta$  - viskozita roztoku

$\xi$  - elektrokinetický potenciál ( zeta potenciál )









$$v = \frac{\varepsilon \xi E}{\eta}$$

možnosti řešení:

- zvýšení viskozity roztoku přidavkem 0,05 – 0,3 % derivátu celulosy (hydroxypropyl-, hydroxyethyl-, hydroxypropylmethyl-) do vedoucího elektrolytu
- obrácení znaménka elektrokinetického potenciálu přidavkem kationogenního smáčedla (např. 1mM cetyltrimethylamonium bromid) do vedoucího elektrolytu
- snížení elektrokinetického potenciálu přidavkem 0,05 – 0,2% neionogenních smáčedel (Triton X-100, polyetylen glykol, polyvinylalkohol) do vedoucího elektrolytu

# Jouleovo teplo

- elektrický ohřev je hlavním limitujícím faktorem velikosti hnacího proudu
- výrazně jsou ovlivňovány iontové pohyblivosti separovaných látek
- vznikají teplotní gradienty a tedy další nehomogenity
- ohřev ovlivňuje disociaci slabých kyselin a zásad
- může docházet k destrukci termolabilních látek

**Největší problém u krátkých zón, které předcházející zóna ovlivňuje**

*příklad: vodící ion 5mM NaBr*

*terminál jodičnan*

*50  $\mu$ A*

*je třeba 10 mm, aby teplota v zóně dosáhla ustálené hodnoty*

Kapiláry:

FEP – kopolymer perfluorovaného polyetylenu a polypropylenu

PTFE – Teflon (polytetrafluoroetylen)

- nevhodný kruhový průřez, špatná tepelnou vodivost
- dobrá chemická a mechanická odolnost, malý elektroosmotický tok a snadno se vyrábějí

## *Účinnost termostatování:*

$$\overline{T} = T_0 + \overline{q} E$$

*T – střední teplota zóny*

*T<sub>0</sub> – termostatovací teplota*

*Kvocient q se stanovuje experimentálně tak, že při různých termostatovacích teplotách měříme proud protékající kapilárou (např. 1 mol/l KCl) v závislosti na vloženém napětí.*

*Ideálně  $q = 0$*

*Tachofor (0,8 mm)  $q = 1,36 \text{ KmW}^{-1}$*

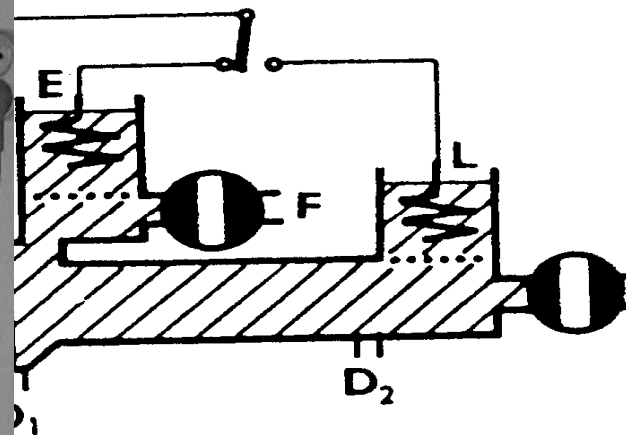
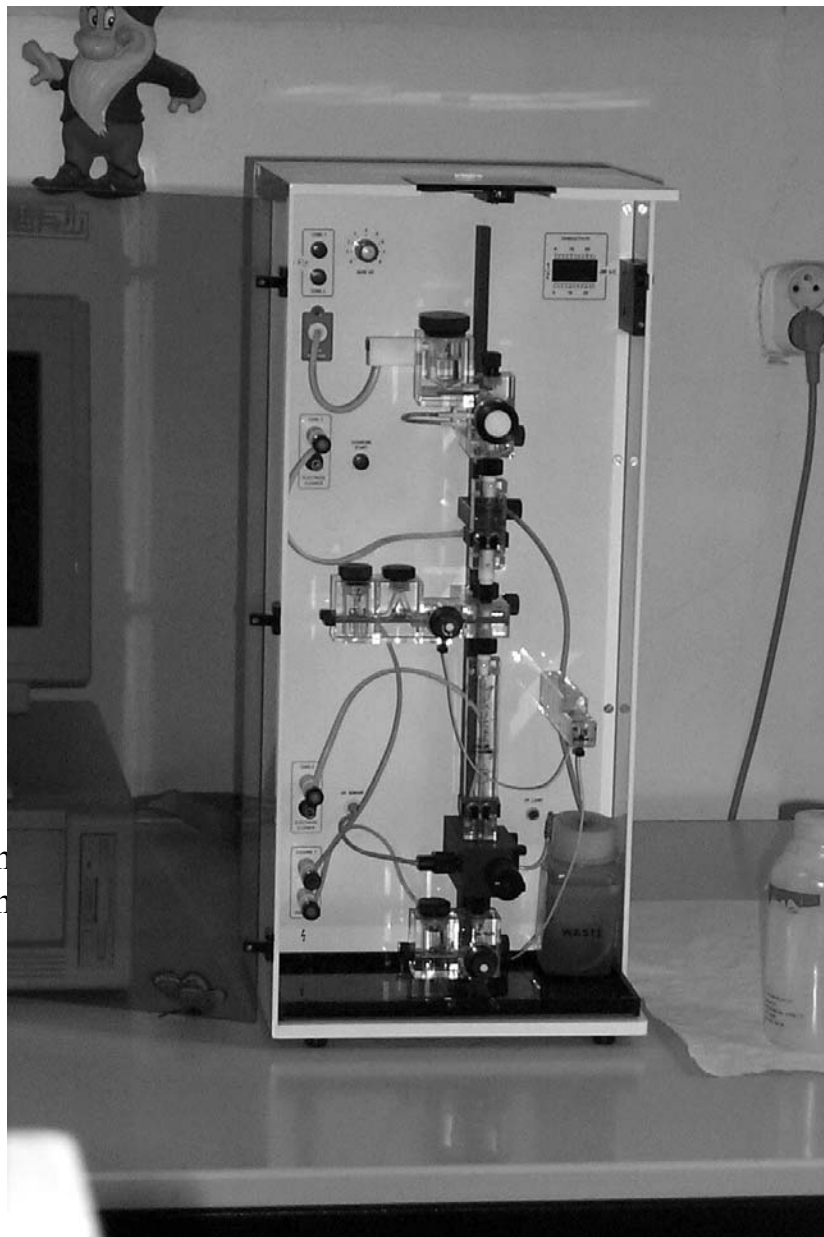
# Gravitace

**Rozdílná hustota ITP zón vede k deformaci rozhraní**  
možnosti řešení:

- separace v inertních nosičích a gelech
- hustotní gradient neionogenní látky
- podmínky nulové gravitace
- stabilizace zón gravitací

**tenké kapiláry**

## *řívání kolon*



*Villa LABECO:*

*Předseparační kolona*

*Délka 90 a 160 mm*

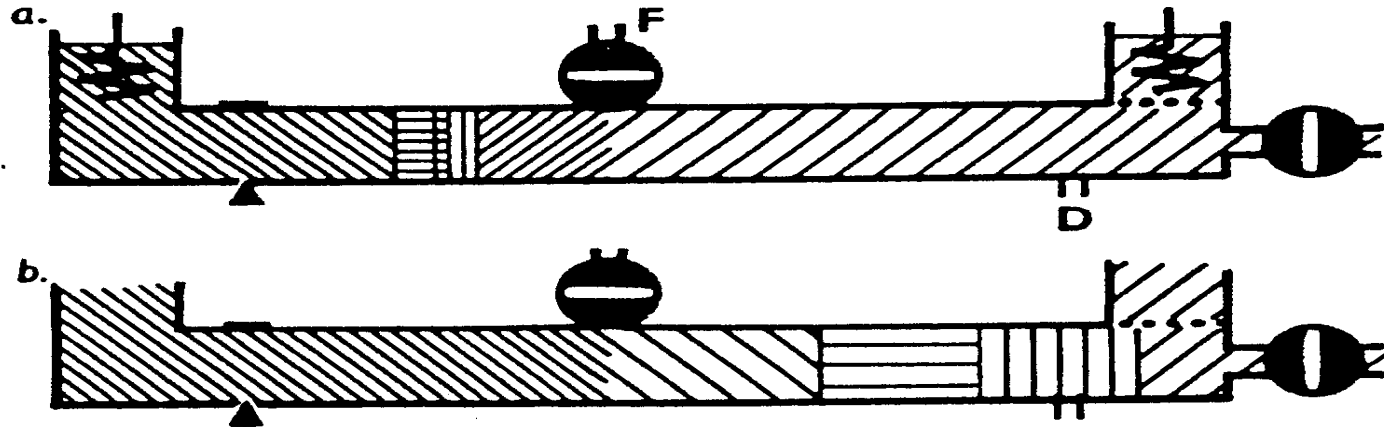
*Průměr 0.8 mm*

*Separační kolona*

*Délka 90 a 160 mm*

*Průměr 0.3 mm*

# *Koncentrační kaskáda*



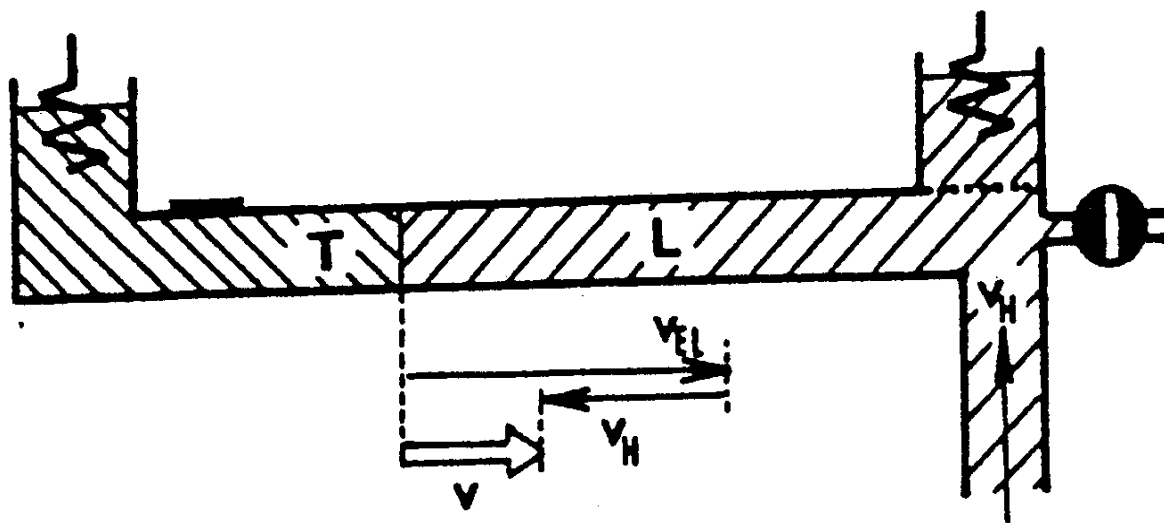
$$c_X = c_L \cdot \frac{\mu_X}{\mu_X + |\mu_R|} \cdot \frac{\mu_L + |\mu_R|}{\mu_L}$$

první část kapiláry naplněna koncentrovaným roztokem vedoucího elektrolytu (vyšší separační kapacita x nižší citlivost [kratší zóna])

druhá část kapiláry naplněna vedoucím elektrolytem o nižší koncentraci



## *Izotachoforesa s protiproudem vedoucího elektrolytu*

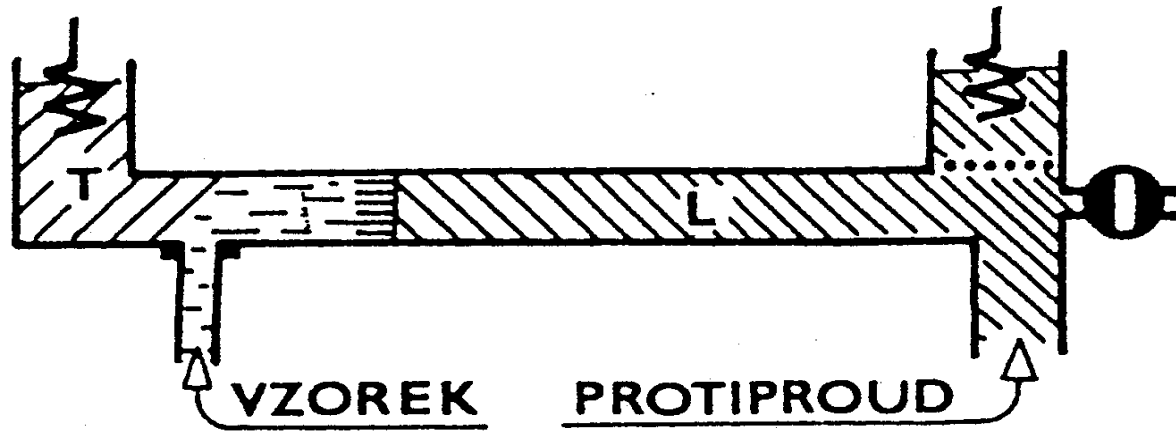


původní rychlost  $v_{EL}$  se snižuje o rychlost toku protiproudu  $v_H$  na rychlost  $v$

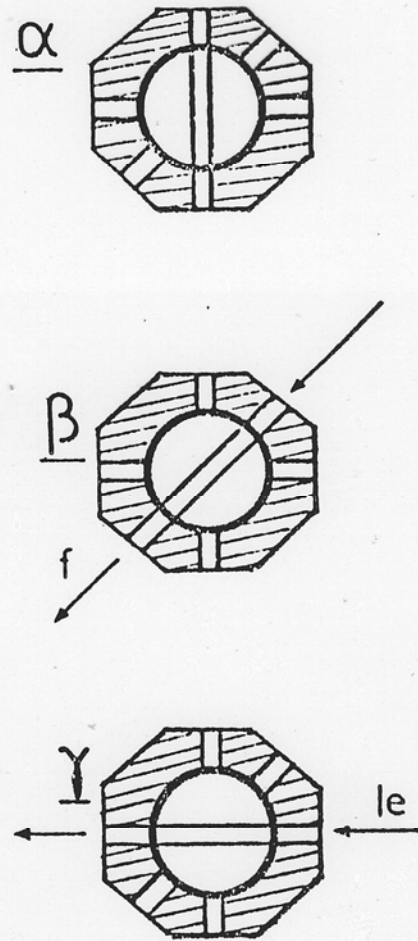
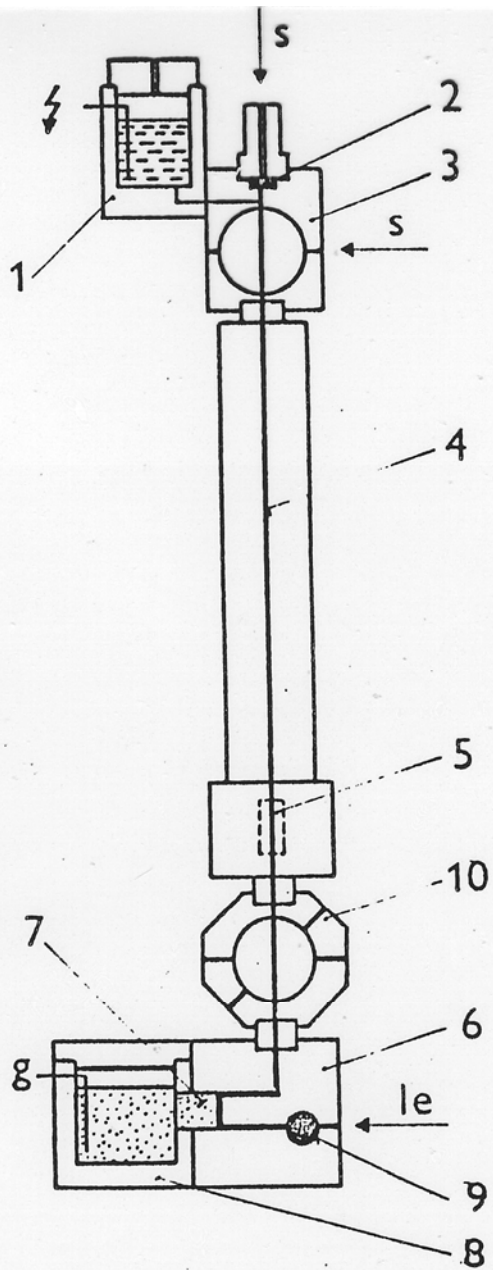
metoda zvyšuje migrační dráhu zón (separační kapacitu)

migrační rychlost můžeme snížit max. o 30% ( jinak dochází k narušení ostrosti zónových rozhraní)

# *Technika kontinuálního dávkování*



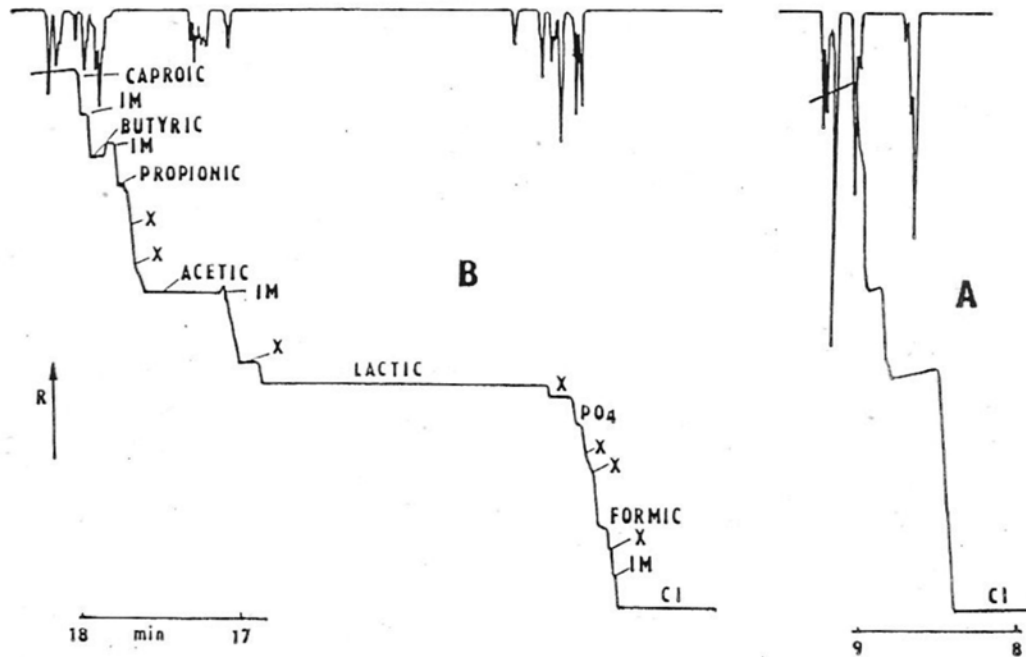
protiproud nastaven tak, aby vykompenzoval elektromigrační pohyb zón  
metoda slouží k zakoncentrování velkých objemů naředěných vzorků  
vlastní separace pak probíhá bez protiproudu



# DETERMINATION of ORGANIC ACIDS in SILAGE

## MAIN FEATURES :

Aliphatic organic acids are usually the major fermentation products present in silage, therefore their content is a main criterion of quality of the silage. Isotachopheresis is a suitable method for their determination because in 10 - 15 minutes it is possible to analyse the main components ( formic, acetic, lactic, propionic, butyric acid,  $PO_4$  or other interesting components). Reproducibility of the method is approximately 2% and pre-treatment of the sample is very simple (dilution). A similar result can be obtained in the analysis of rumen liquids.



Isotachophoreogram of silage extract

A - record from preseparation column /  $I_1 = 250 \mu A$  /

B - record from analytical column /  $I_2 = 50 \mu A$  /

X - unidentified zones, NR - impurities from solution

Determined concentration / % / :

formic - 0,07;  $PO_4$  - 0,20; lactic - 2,10; acetic - 0,89; propionic - 0,05; butyric - 0,19

## Operational conditions :

### leading electrolyte :

$10^{-2}$  M HCl +  $2,2 \cdot 10^{-2}$  M  $\epsilon$ -aminocaproic acid + 0,1% methylhydroxyethylcellulose /MHEC/

### terminating electrolyte :

$5 \cdot 10^{-3}$  M caproic acid

Sample : 100 g of silage extracted in 900 ml of water / 16 hour /, diluted 1: 250

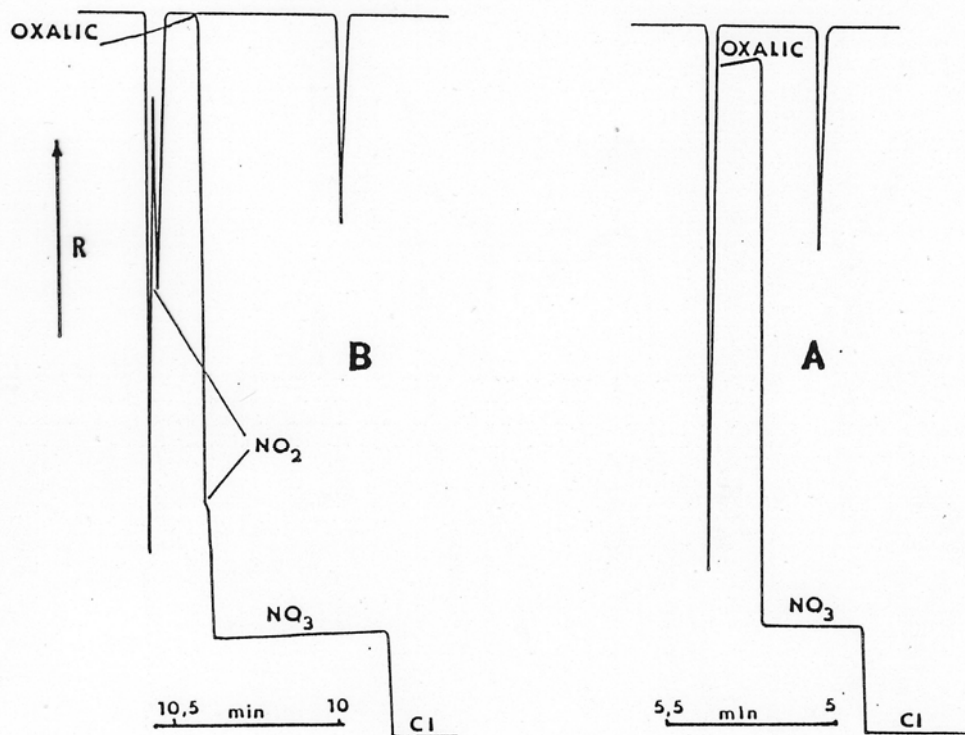
V =  $30 \mu l$

# DETERMINATION of NITRATES and NITRITES in VEGETABLES

## MAIN FEATURES :

Isotachopheresis is a very simple and reliable method for determination of nitrates and nitrites in vegetables. Only a very simple sample pre-treatment is needed: homogenization and extraction in water. Practically no interference of constituents can disturb the analysis. The results were compared with more tedious spectrometric methods.

To achieve lower detection limits, the leading electrolyte, with a lower concentration of leading ion, was used in analytical column.



Isotachophoreogram of radish extract (10 g in 100 ml water)  
Determined concentrations: 2100 mg  $\text{NaNO}_3$  and 3.7 mg  $\text{NaNO}_2$  in 1 kg of the sample  
A - pre-separation column      B - analytical column

## Operational conditions :

### leading electrolyte :

pre-separation column :  $8 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cl}^-$  +  $1.5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Ba}^{2+}$  +  $\beta$ -alanine + 0.1% HEC ; pH = 4.0  
analytical column :  $4 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cl}^-$  +  $1 \times 10^{-3}$  M  $\text{Ba}^{2+}$  +  $\beta$ -alanine ; pH=4.0

### terminating electrolyte :

$10^{-3}$  M oxalic acid ( citric acid ) + TRIS

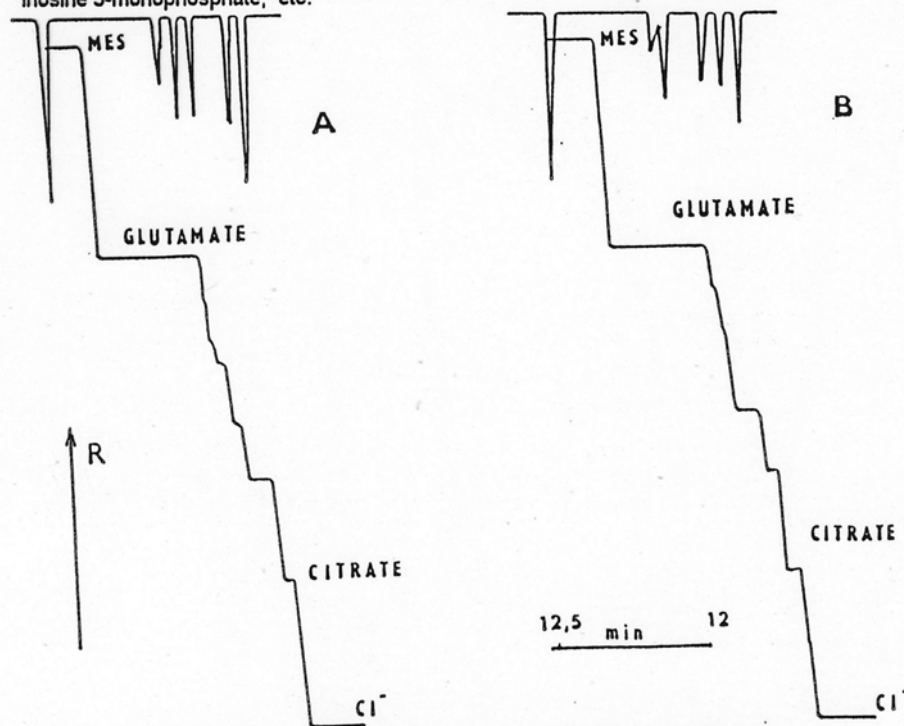
$V = 30 \mu\text{l}$  ;  $I_1 = 200 \mu\text{A}$  ;  $I_2 = 15 \mu\text{A}$

# DETERMINATION of GLUTAMATE in FOOD

## MAIN FEATURES :

Today the glutamate is the most widely used food additive for taste intensification, mainly in soups and sauces. Only extraction of the sample with water and simple filtration are needed in a pre-treatment step. High speed and precision and no interferences are typical features of this determination.

ITP allows the simultaneous determination of other anion substances such as 5-monophosphate, citrate, inosine 5-monophosphate, etc.



Isotachophoregrams of glutamate determination in soup (A) and sauce (B).

## Operational conditions :

### leading electrolyte :

$10^{-2}$  M Cl<sup>-</sup> +  $2 \cdot 10^{-2}$  M histidine + 0.1 % methylhydroxyethylcellulose / MHEC /; pH = 6.0

### terminating electrolyte :

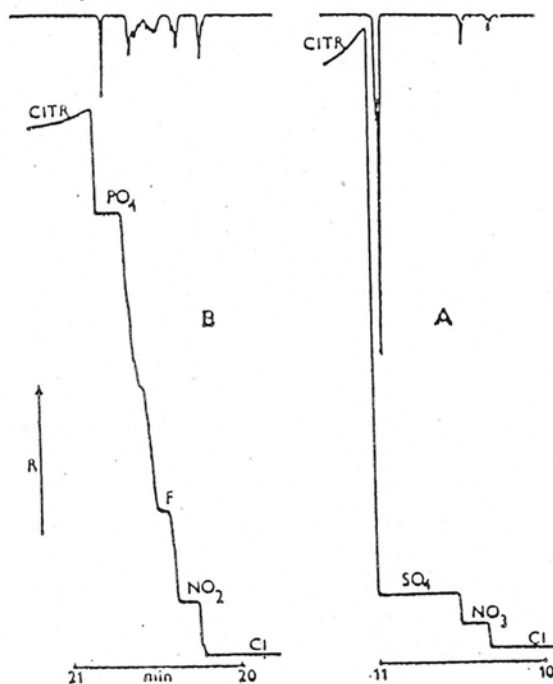
$5 \cdot 10^{-3}$  M morpholinethanesulfonic acid

V = 30  $\mu$ l

# ANALYSIS of DRINKING and SURFACE WATER

## MAIN FEATURES :

Isotachopheresis was applied to identify and quantify simultaneously the most frequently determined macrocomponents ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) and microcomponents ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in water. It is possible to determine another ionogenic components. Precision and accuracy of results are better than classical methods.



Isotachophoreograms of Danube water / Šúrsky kanál.

A - record of macrocomponents in preseparation column /  $I_1 = 250 \mu\text{A}$  /

B - record of macrocomponents in analytical column /  $I_2 = 7.5 \mu\text{A}$  /

Determined concentrations / in mg/l / :  $\text{Cl}^-$  - 41,9;  $\text{NO}_3^-$  - 38,7;  $\text{SO}_4^{2-}$  - 93,7  
 $\text{NO}_2^-$  - 0,89;  $\text{F}^-$  - 0,16;  $\text{PO}_4^{3-}$  - 1,01

## Conditions : leading electrolyte :

preseparation column :  $8 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Cl}^-$  +  $3 \cdot 10^{-3}$  M BISTRIS propane +  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M  $\beta$ -alanine  
+ 0,1 % hydroxyethylcellulose / HEC /, pH = 3,68

analytical column :  $2 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Cl}^-$  +  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M  $\beta$ -alanine + 0,1 % HEC, pH = 3,54

## terminating electrolyte :

$5 \cdot 10^{-3}$  M citric acid  
 $V = 30 \mu\text{l}$

# DETERMINATION of ALKALINE METALS and ALKALINE EARTH METALS

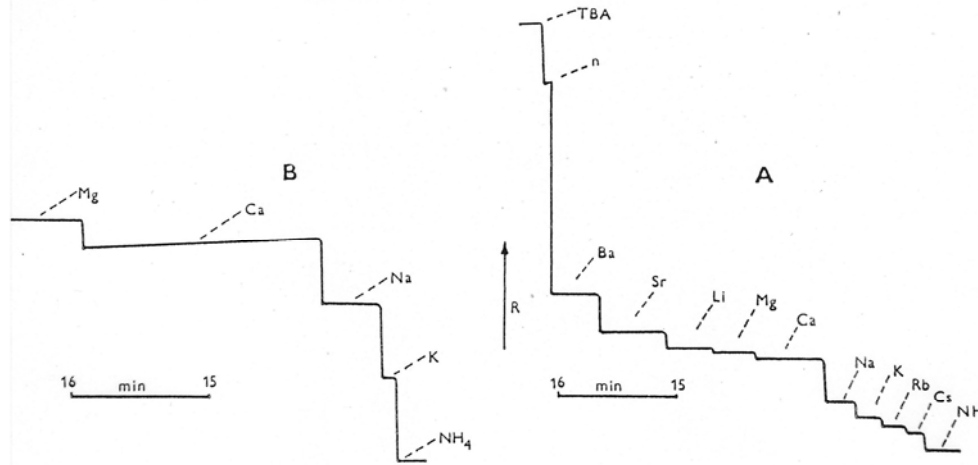


Fig. 1. Isotachophoreograms of analysis from analytical column :  
 A - model mixture / concentration cca  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l /  
 B - analysis of drinking water diluted 1 : 4 / determined concentration in mg/l /  
 K = 4,5; Na = 8; Ca = 67; Mg = 15 /

Conditions : leading electrolyte :  
 $10^{-2}$  M  $\text{NH}_4^+$  + acetic acid, pH=5; dissolution :  $\text{H}_2\text{O}$  : PEG 55 : 45 /vol./ + 0,2% HEC  
terminating electrolyte :  
 $3 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{TBAClO}_4$ , dissolution :  $\text{H}_2\text{O}$ , resp. /B/  $3 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{TEAClO}_4$ , dissolution :  $\text{H}_2\text{O}$   
 $I_1 = 250 \mu\text{A}$ ,  $I_2 = 50 \mu\text{A}$ ,  $V = 30 \mu\text{l}$

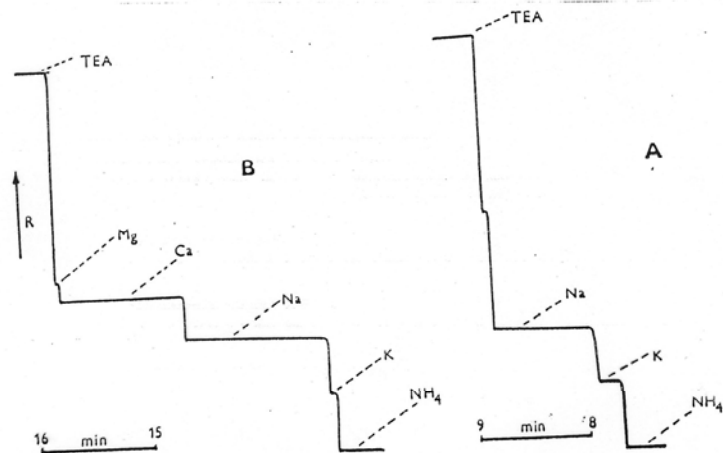


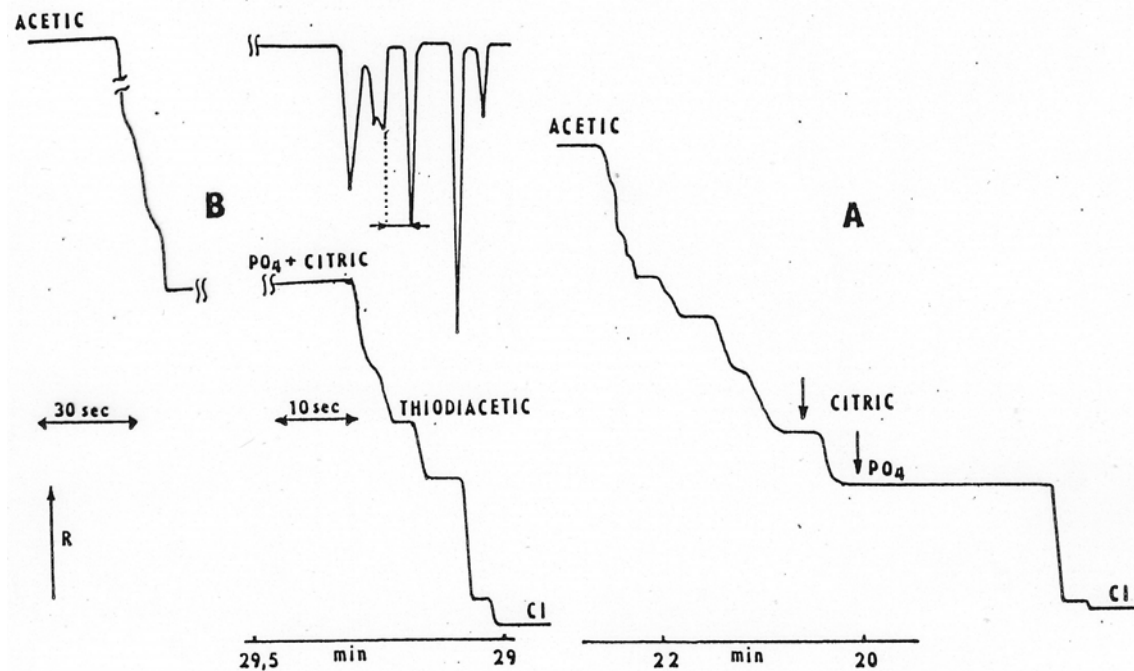
Fig. 2. Isotachophoreogram of urine analysis :  
 A - pre-separation column : evaluated macrocomponents



# DETERMINATION of THIODIACETIC ACID in URINE

## MAIN FEATURES :

Thiodiacetic acid is one of the metabolites of carcinogenic vinyl chloride. A direct correlation has been established between the amount of thiodiacetic acid in urine and the exposure of the organism. At present, mostly GS -method is used for this purpose. But this method is laborious and time-consuming because extraction and derivation steps are needed.



Isotachophoreograms of urine from person exposed to vinyl chloride :

A - record from preseparation column /  $I_1 = 200 \mu A$  /

B - record from analytical column ( only part between arrows was analysed,  $I_2 = 50 \mu A$  )

Determined concentration :  $9,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  ( 0,46 nmol )

## Operational conditions :

### leading electrolyte :

Preseparation column :  $10^{-2} \text{ M Cl} + \beta\text{-alanine} + 0,2 \text{ \% hydroxypropylcellulose /HPC/}$ , pH=3,4

Analytical column :  $10^{-2} \text{ M Cl} + \beta\text{-alanine} + 0,2 \text{ \% HPC}$ , pH=4,3

### terminating electrolyte :

$5 \cdot 10^{-2} \text{ M acetic acid}$

$V = 5 \mu\text{l}$  ( urine )

## Elektrokinetický potenciál

Elektrická dvojvrstva na rozhraní s tuhou fází může vzniknout různými mechanismy: adsorpcí iontů z roztoku (zvláště pokud jde o iont, který je sám součástí mřížky), ionizací povrchových skupin, substitucí za iont podobné velikosti ale jiné valence, rozštěpením krystalu. Kolem tuhé fáze se shromáždí ionty opačného náboje. Nejbližše povrchu je Sternova vrstva, složená výhradně z opačně nabitých iontů, vázaných elektrostatickými i adsorpčními silami. Pro úplnou neutralizaci povrchového náboje se protionty shromáždí i v difúzní vrstvě, kde jsou udržovány výhradně elektrostatickými silami. Elektrický potenciál mezi povrchem a objemovou fází klesá lineárně ve Sternově vrstvě a nelineárně (limitně k nule) v difúzní vrstvě. Průběh potenciálu v difúzní vrstvě popisuje Gouyho-Chapmanova teorie

$$E = E_0 \exp(x/l)$$

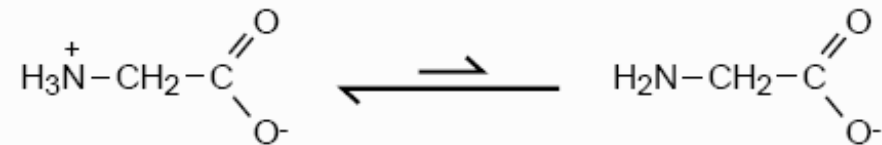
$$l = \left( \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T}{e^2 1000 N_A \sum (c_i z_i^2)} \right)^{1/2} = \left( \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T}{e^2 2000 N_A} \right)^{1/2} I^{-1/2}$$

$l$  je efektivní tloušťka dvojvrstvy,  $E_0$  potenciál Sternovy vrstvy,  $e = 1,602 \cdot 10^{-19}$  J je elementární náboj,  $z_i$  náboj příslušného iontu,  $c_i$  jeho (molární) koncentrace,  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K Boltzmannova konstanta,  $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$  Avogadrova konstanta,  $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$  permitivita vakua,  $\varepsilon_r$  relativní permitivita (pro vodu a zředěné vodné roztoky při 25°C  $\varepsilon_r = 78,5$ ). S rostoucí koncentrací elektrolytu se difúzní vrstva stlačuje až do vymizení (Sternova vrstva je pak nábojem ekvivalentní nabitému povrchu a označuje se jako Helmholtzova vrstva).

Pokud se elektrická dvojvrstva a roztok vůči sobě pohybují, je část difúzní vrstvy strhávána proudící kapalinou. Potenciál mezi roztokem a pohybující se dvojvrstvou je elektrokinetický potenciál ( **$\zeta$ -potenciál**), který závisí na uspořádání fázového rozhraní (na jeho velikosti a tvaru relativně ke směru proudění).

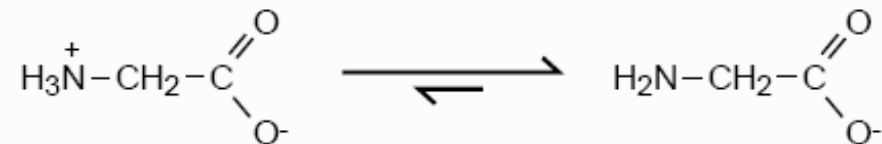
## Glycin a jeho iontové rovnováhy

- In stacking gel, pH 6.8:



- Negatively charged form is disfavored.
- Average electrophoretic mobility is very low.

- In separating gel, pH 8.8



- Negatively charged form is favored.
- Average electrophoretic mobility much higher.

## Jednosytná slabá báze (BH)

Disociační konstanta je rovna:

$$K_{BH} = \frac{c_{H^+} \cdot c_B}{c_{BH^+}}$$

Disociační stupeň pak:

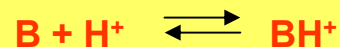
$$\alpha_A = \frac{c_{BH^+}}{c_{BH}} = \frac{c_{H^+}}{K_{BH} + c_{H^+}}$$

Pro efektivní pohyblivost platí:

$$\overline{\mu}_A = \mu_A \cdot \alpha_A$$

$$\overline{\mu}_A = \mu_A \cdot \frac{c_{H^+}}{K_{BH} + c_{H^+}}$$

**Ostwaldův zřed'ovací zákon:**



$$c_{BH^+} = \alpha \cdot c$$

$$c_B = (1 - \alpha) \cdot c$$

$$c_{H^+} = (1 - \alpha) \cdot c$$

$$K_{BH} = \frac{(1 - \alpha) \cdot c \cdot (1 - \alpha) \cdot c}{\alpha \cdot c} = \frac{(1 - \alpha)^2 \cdot c}{\alpha}$$

**Z toho  $\alpha$ :**

$$K_{BH} = \frac{(1 - \alpha)^2 \cdot c_{H^+} / (1 - \alpha)}{\alpha}$$

$$\alpha = \frac{c_{H^+}}{K_{BH} + c_{H^+}}$$

Slabá báze je disociována z 50% při  $pH = pK_{BH}$ , tedy:

$$\alpha_A = \frac{\overline{\mu}_A}{\mu_A} = 0,5$$

Pro  $pH \leq pK_{BH} + 1$  je disociace větší než 10% což už je podmínka pro migraci analytický vyžitelnou

$$\alpha_A = \frac{\overline{\mu}_A}{\mu_A} = 0,1$$

$$0,1 = \frac{c_{H^+}}{K_{BH} + c_{H^+}}$$

$$0,1 K_{HA} = 0,9 c_{H^+}$$

$$-1 - pK_{BH} = -0,045 - pH$$