

Metody chromatograficzne w chemii i  
biotechnologii, **wykład 6**

Elektroforeza kapilarna

# chromatografia

---



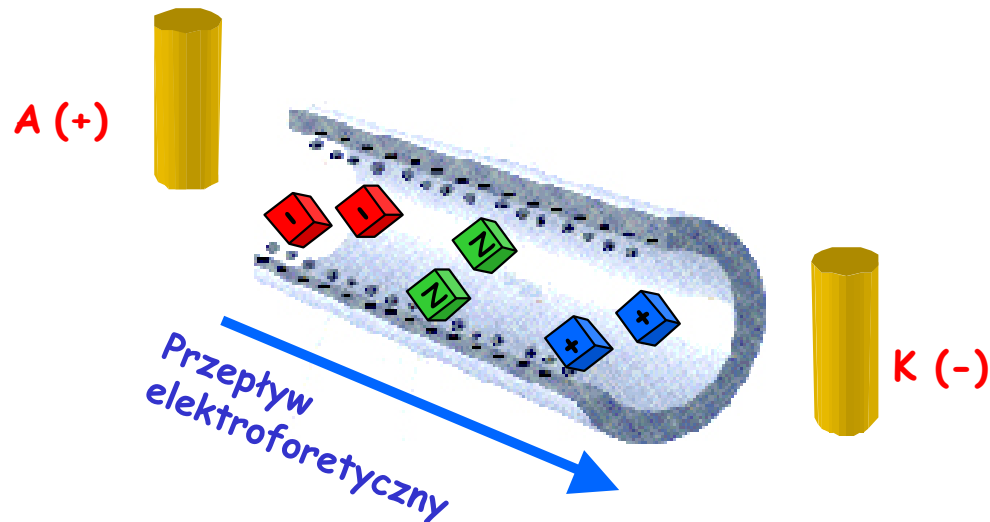
# Bohaterów prądem?!!



# Techniki elektromigracyjne

---

- ▶ **Elektroforeza** – technika analityczna polegająca na rozdzielaniu mieszanin związków przez wymuszenie wędrówki w **polu elektrycznym**
- ▶ Stosowana do analizy i oczyszczania:
  - Bardzo dużych cząstek (białka, kwasy nukleinowe)
  - Małych cząstek (proste jony, aminokwasy, peptydy)



# Techniki elektromigracyjne

---



Arne Wilhelm Kaurin Tiselius  
1902 -1971

- ▶ **1909** rok – Michaelis wprowadza pojęcie elektroforezy
- ▶ Twórcą elektroforezy był szwedzki uczyony Arne Tiselius
  - ▶ **1937 rok** - pierwszy eksperyment – rozdzielanie mieszaniny białek wchodzących w skład surowicy, (r-r białek umieszczano w U-rurkach. Ograniczony rozdział  
Problem z konwekcją i dyfuzją termiczną
  - ▶ Nagroda Nobla w dziedzinie chemii w 1948 roku za badania nad analizą elektroforetyczną i absorpcyjną
- ▶ Wprowadzenie środowiska antykonwekcyjnego – żele
- ▶ **1967** rok – zastosowanie przez Hjertena szklanych kapilar o średnicy wewnętrznej 3 mm – efektywniejsze ograniczenie konwekcji i dyfuzji termicznej
- ▶ **1981** rok – początek wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej



# Techniki elektromigracyjne

---

- ▶ **Podstawowe wymagania:**

- ▶ **Medium przewodzące (bufor)**

- ▶ **Pole elektryczne**

- ▶ **Podstawowa zasada:**

- ▶ Dodatnio naładowane cząsteczki przemieszczają się w kierunku katody (-)

- ▶ Ujemnie naładowane cząsteczki do anody (+)

- ▶ **Dwa typy:**

- ▶ Roztwór w kapilarze

- ▶ Matryca nieprzewodząca (agaroza, poliakrylamid)



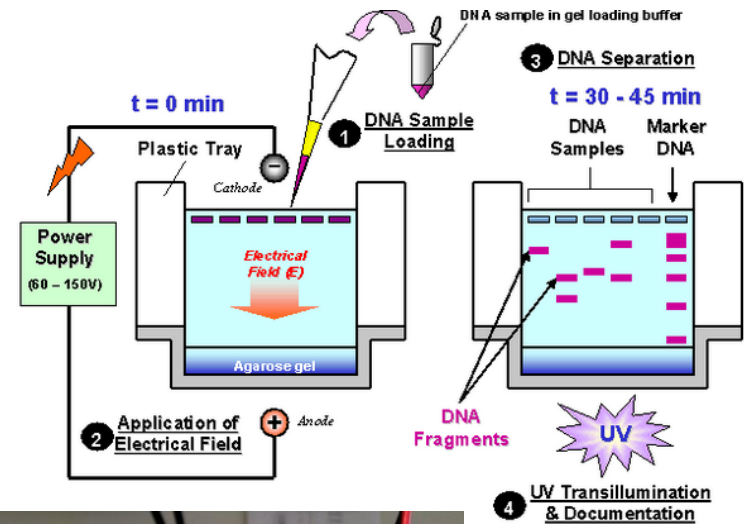
# Techniki elektromigracyjne

## ▶ Typy elektroforezy:

### ▶ planarna (żelowa)

- ▶ Żele: agarozą, poliakrylamid, agar
- ▶ O zdolności rozdzielczej żelu decyduje gęstość usieciowienia (wielkość porów)
- ▶ Małe cząsteczki migrują szybciej!

### ▶ kapilarna



# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

- ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**
  - ▶ **Kapilarna elektroforeza strefowa**
  - ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna
  - ▶ Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
  - ▶ Izotachoforeza kapilarna
- ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**
- ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**





# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Zalety:

- ▶ Szerokie zastosowanie
- ▶ Wysoka szybkość i sprawność rozdziału
- ▶ Stosowanie bardzo małych próbek (kilka nL)
- ▶ Niewielkie zużycie odczynników
- ▶ Trwałe kapilary
- ▶ Bez użycia pomp, przy niskim ciśnieniu i temperaturze pokojowej

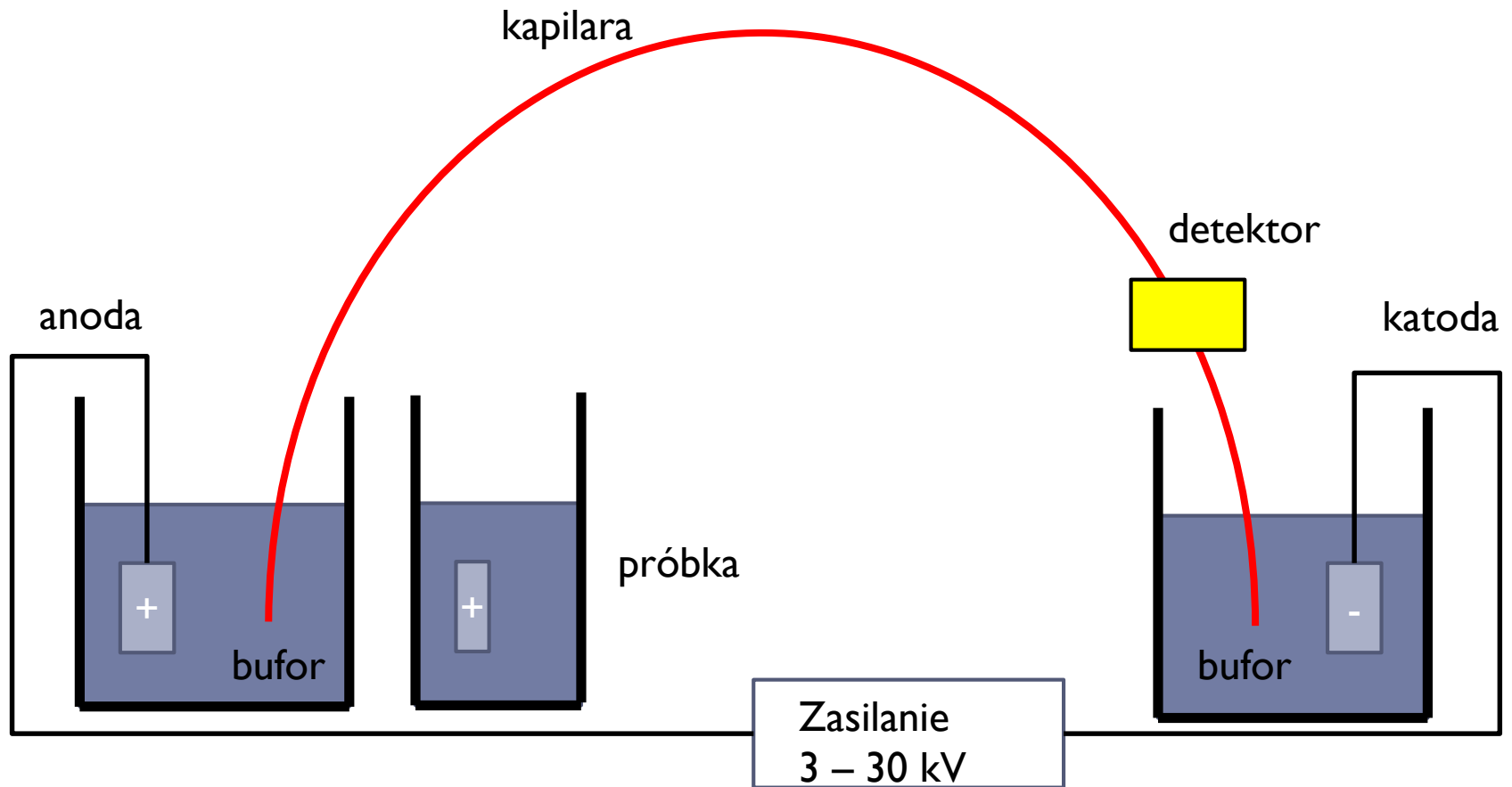
## ▶ Wady:

- ▶ Gorsza wykrywalność substancji w porównaniu do HPLC (10-100 razy)



# Elektroforeza kapilarna

---



# Elektroforeza kapilarna

---

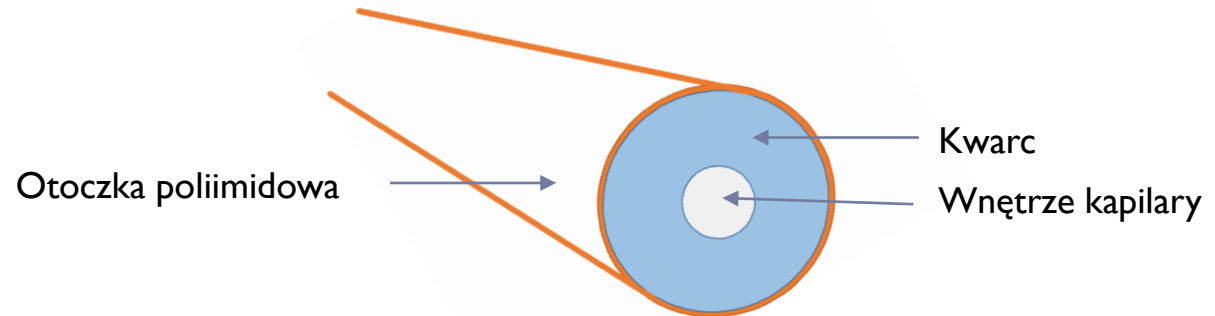


# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Kapilary

- ▶ Długość 20-100 cm (typowo 50 cm)
  - ▶ Średnica wewnętrzna 20 – 200  $\mu\text{m}$  (typowo 25 -75  $\mu\text{m}$ )
  - ▶ Wykonane z kwarcu
  - ▶ Z zewnątrz pokryte poliimidem
- ▶ Na kapilarach o większych średnicach może wydzielać się ciepło



# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Ogrzewanie się kapilary

- ▶ Wynika z przemieszczania się naładowanych cząsteczek w polu elektrycznym
- ▶ Gradient temperatury powoduje powstawanie konwekcji w elektrolicie
- ▶ Konwekcja powoduje poszerzanie się pików
- ▶ Dodatkowo podwyższona temperatura może powodować rozkład niektórych cząsteczek
- ▶ Zmniejszanie grzania się kapilary:
  - ▶ Zmniejszenie napięcia
  - ▶ Użycie kapilar o mniejszej średnicy (większy stosunek powierzchni do objętości)
  - ▶ Użycie buforów o mniejszej sile jonowej
  - ▶ Chłodzenie kapilar



# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Dozowanie próbki:

### ▶ Próbka powinna mieć objętość kilku do kilkudziesięciu nL

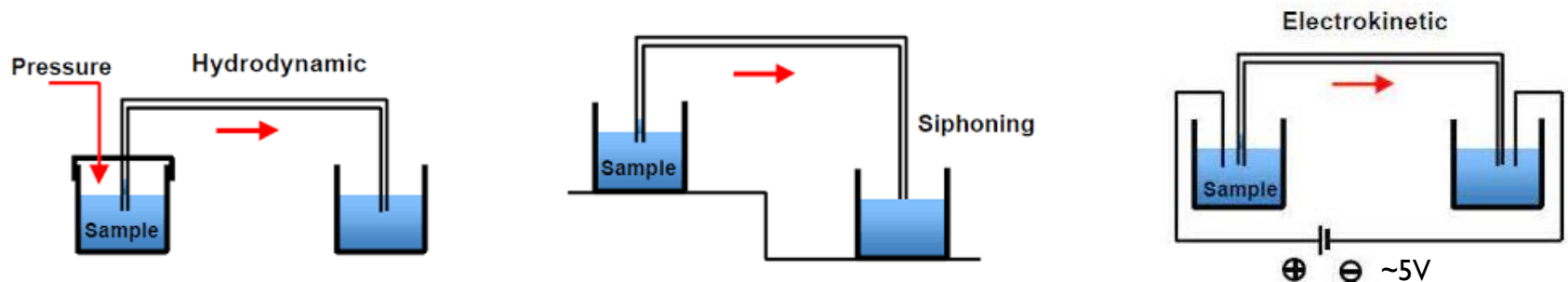
(~ 1-2% długości kapilary, stęż. ~100 razy mniejsze od stęż. buforu, rozpuszczona w buforze o mniejszej sile jonowej)

### ▶ Sposoby:

#### ▶ Ciśnieniowe

#### ▶ Syfonowe (grawitacyjne)

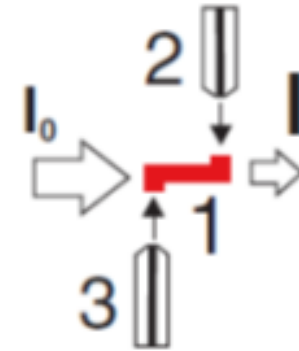
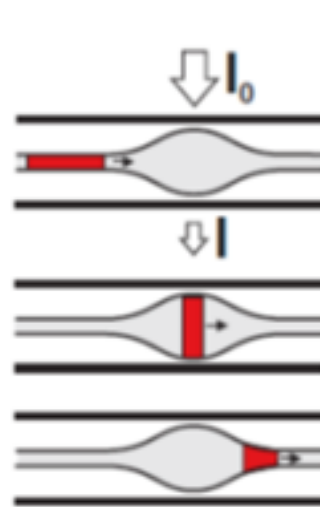
#### ▶ Elektrokinetyczne



# Elektroforeza kapilarna

## ▶ Detektory:

- ▶ UV-Vis
- ▶ Fluorescencji
- ▶ Przewodnictwa
- ▶ Elektrochemiczny



Kapilary szklane: transparentne dla promieniowania z zakresu UV-Vis → detektory UV i fluoroscencyjny i nie wymagają zastosowania komórki przepływowej.



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Detekcja pośrednia UV –

jony chromoforowe powinny mieć podobną ruchliwość elektroforetyczną do jonów rozdzielanych

- ▶ Aniony chromoforowe np. kwas piromelitowy, zieleń bromokrezolowa
- ▶ Kationy chromoforowe, np. chinina, zieleń malachitowa





# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Elektroforegram

- ▶ Charakterystyka rozdziału:

- ▶ Selektywność

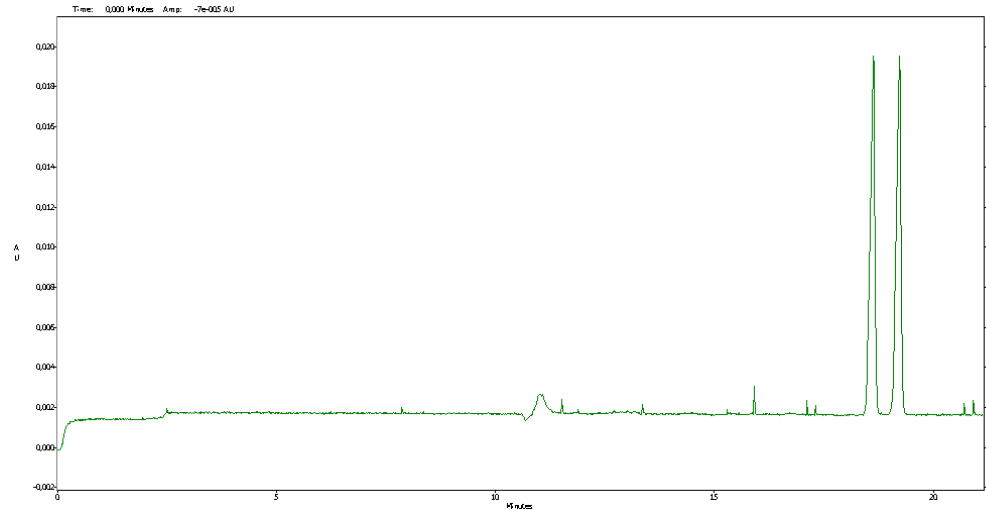
$$\alpha = (t_{m2} - t_0)/(t_{m1} - t_0)$$

$t_{m2}, t_{m1}$  – czasy migracji sąsiednich pików;  $t_0$  – czas migracji, której cząsteczki nie mają ładunku

- ▶ Rozdzielczość

$$R = \Delta t/w_{b\acute{s}r}$$

$\Delta t$  – różnica czasów migracji dwóch sąsiednich pików,  $w_{b\acute{s}r}$  – średnia szerokość podstaw tych pików



# Elektroforeza kapilarna

---

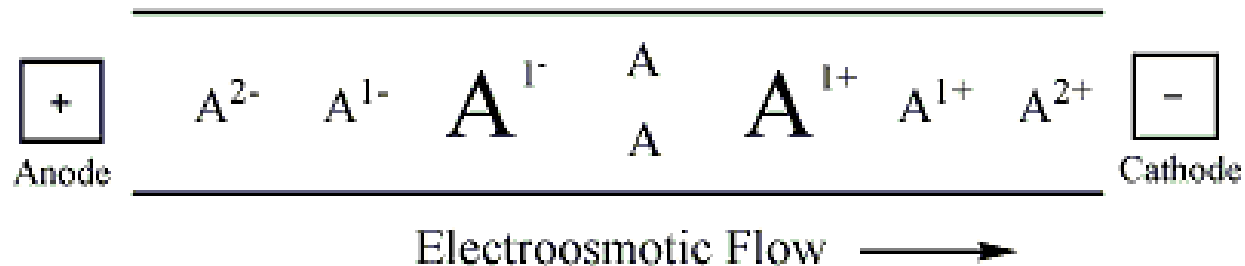
- ▶ **Elektroforeza – migracja jonów** pod wpływem przyłożonego napięcia
- ▶ **Elektroosmoza** – zjawisko związane z **przepływem buforu** w kapilarze pod wpływem przyłożonego napięcia



# Elektroforeza kapilarna

---

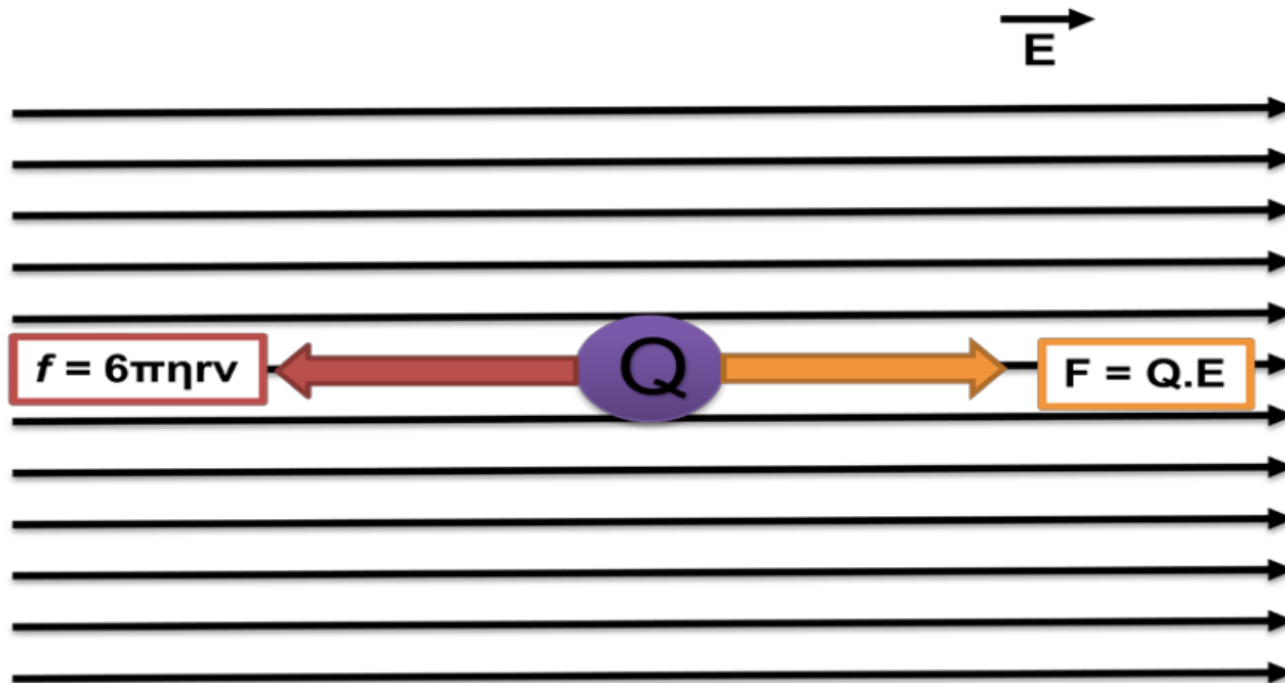
- ▶ Prędkość przepływu jonów (przepływ elektroforetyczny) jest proporcjonalna do ładunku i odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczki



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Siły powinny się równoważyć:
  - ▶ Siła oporu ( $f$ ) ciała w kształcie kuli poruszającego się w płynie (prawo Stokesa)
  - ▶ Siła ( $F$ ) działająca na ładunek w polu elektrycznym (siła Coulomba)



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Siły powinny się równoważyć
- ▶  $F = q * E$
- ▶  $F = 6\Pi\eta r v_{ep}$

$q$  – ładunek

$E$  – natężenie pola elektrycznego

$\eta$  – lepkość

$r$  – promień cząsteczki

$v_{ep}$  – prędkość elektroforetyczna



# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Prędkość elektroforetyczna

$$v_{ep} = \frac{q * E}{6\pi * \eta * r}$$

q – ładunek

E – natężenie pola elektrycznego

$\eta$  – lepkość

r – promień cząsteczki

$v_{ep}$  – prędkość elektroforetyczna



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Ruchliwość elektroforetyczna – wielkość charakterystyczna dla danej cząsteczki

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi * \eta * r}$$

q – ładunek

E – natężenie pola elektrycznego

$\eta$  – lepkość

r – średnica cząsteczki

$v_{ep}$  – prędkość elektroforetyczna

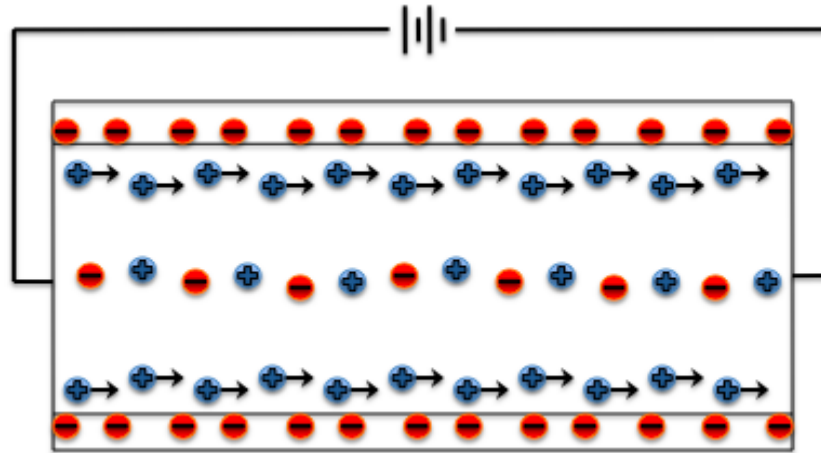
$\mu_{ep}$  – ruchliwość elektroforetyczna



# Elektroforeza kapilarna

---

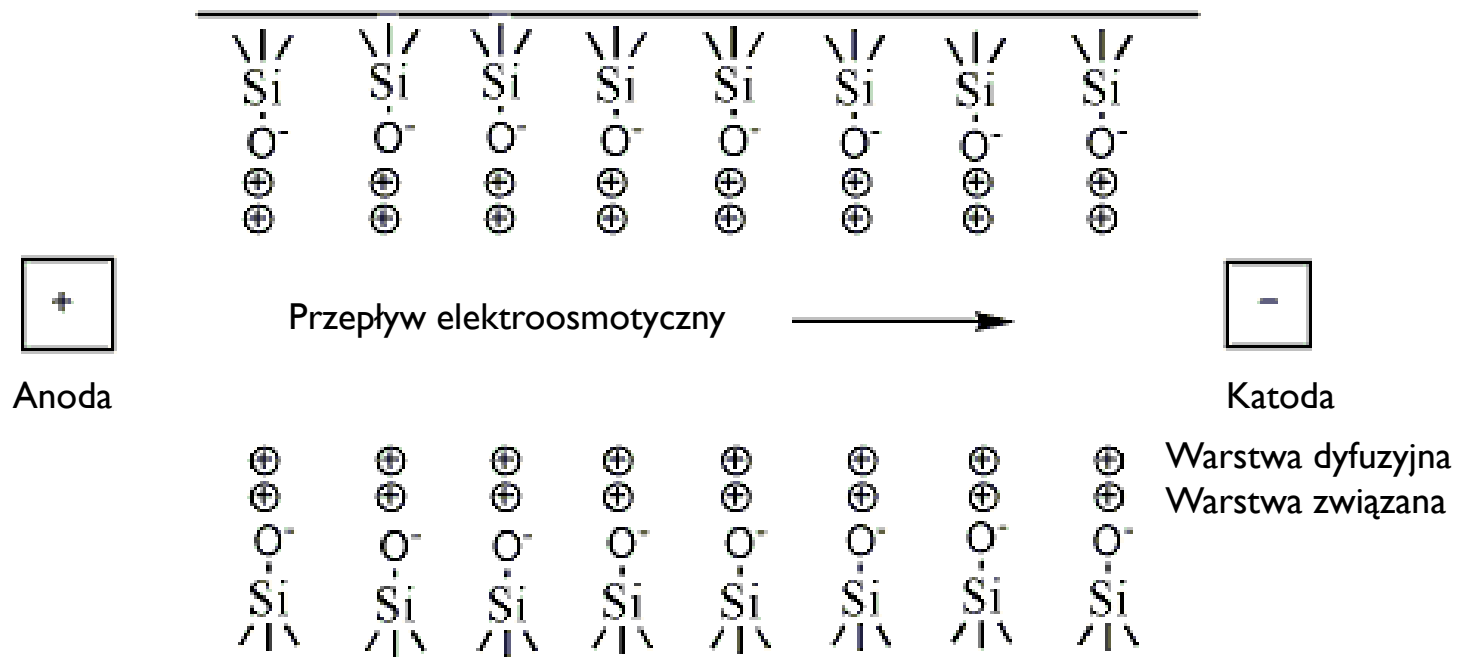
- ▶ Przepływ elektroosmotyczny (EOF)
  - ▶ Jest to migracja buforu w kierunku katody
  - ▶ Jest spowodowany tworzeniem się dwuwarstwy na ścianie kapilary
  - ▶ Grupy silanolowe są zdeprotonowane w  $\text{pH} > 2$





# Elektroforeza kapilarna

- ▶ Przepływ elektroosmotyczny (EOF)
  - ▶ Kationy dwuwarstwy po przyłożeniu pola elektrycznego są przyciągana do katody (-) i ciągną rozpuszczalnik razem z nimi



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Przepływ elektroosmotyczny (EOF)
- ▶ Prędkość elektroosmotyczna

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon * \zeta * E}{4 * \pi * \eta}$$

$\varepsilon$  – stała dielektryczna buforu

$\zeta$  – potencjał elektrokinetyczny (Zeta; proporcjonalny do grubości warstwy dyfuzyjnej)

$E$  – natężenie pola elektrycznego

$\eta$  – lepkość

$v_{EOF}$  – prędkość elektroosmotyczna

---



# Elektroforeza kapilarna

---

▶ Prędkość elektroosmotyczna

$$v_{ep} = \frac{l}{t_m}$$

$l$  – długość kapilary od wlotu do detektora

$t_m$  – czas migracji znacznika

**Znacznik** – związek chemiczny obojętny w pH buforu nośnego i nie oddziałuje ze ściankami kapilary (np. benzen, fenol, pirydyna)

---



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Przepływ elektroosmotyczny (EOF)
- ▶ Ruchliwość elektroosmotyczna

$$\mu_{EOF} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{\varepsilon * \zeta}{4 * \pi * \eta}$$

$\varepsilon$  – stała dielektryczna buforu

$\zeta$  – potencjał elektrokinetyczny (Zeta)

$E$  – natężenie pola elektrycznego

$\eta$  – lepkość

$v_{EOF}$  – prędkość elektroosmotyczna

$\mu_{EOF}$  – ruchliwość elektroosmotyczna

---

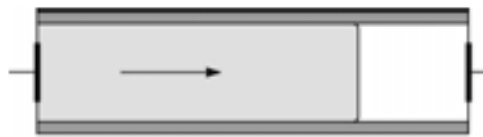


# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ Przepływ elektroosmotyczny (EOF)
  - ▶ EOF jest proporcjonalny do natężenia pola elektrycznego,
  - ▶ EOF jest praktycznie jednakowy w całym przekroju kapilary (małe rozmycie pików)

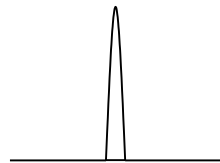
Płaski profil przepływu



(a)

© 2007 Thomson Higher Education

EOF

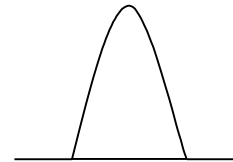


Laminarny profil przepływu



(b)

HPLC flow

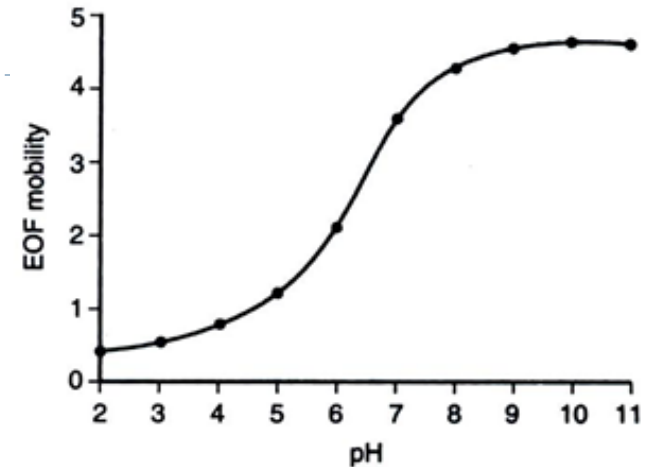


# Elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Kontrola EOF:

- ▶ Zmiana pH (niskie pH, niski EOF)



- ▶ Zmiana stężenia lub siły jonowej buforu (małe stężenie, mała siła jonowa duży EOF)
- ▶ Dodatek rozpuszczalnika organicznego do buforu (mniejszy EOF)
- ▶ Powlekanie ścian kapilary (zmniejszenie lub eliminacja EOF)
  - ▶ Warstwa polimerowa pokrywająca wnętrze kapilary
  - ▶ Reakcja z trimetylochlorosilanem (niski EOF)
  - ▶ Reakcja z pochodnymi sulfonowymi - większy EOF



# Elektroforeza kapilarna

---

- ▶ **Efektywność rozdziału i rozdzielczość** zależą zarówno od przepływu elektroforetycznego jak i elektroosmotycznego
- ▶ Obserwowana mobilność jest sumą obu efektów

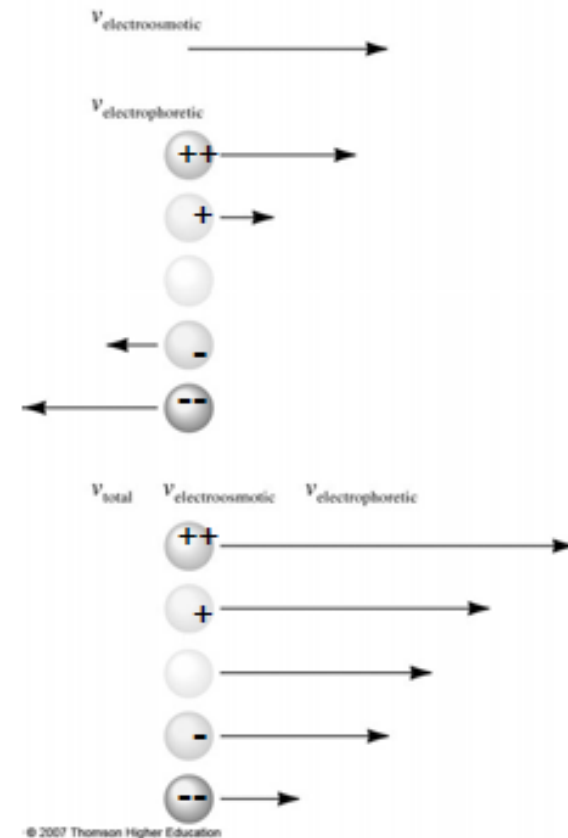
$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{EOF}}$$

- ▶ Typowo, EOF dominuje i wszystkie cząsteczki przemieszczają się w kierunku katody (-)



# Strefowa Elektroforeza kapilarna

- ▶ EOF może być większy niż przepływ elektroforetyczny i wszystkie anality kierują się w stronę katody (-)
- ▶ środowisko zasadowe i obojętne – EOF większy od elektroforetycznego
- ▶ środowisko kwaśne - EOF mniejszy od elektroforetycznego





# Strefowa Elektroforeza Kapilarna

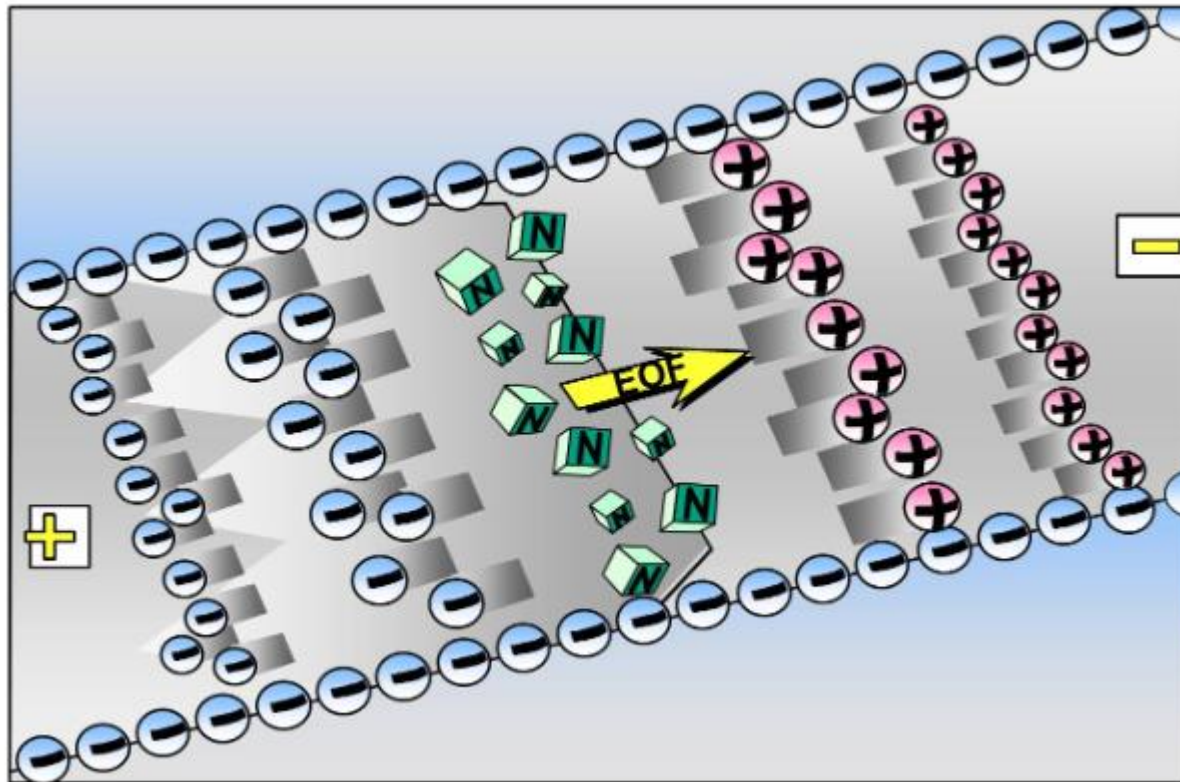
---

- ▶ Najczęściej stosowany typ Elektroforezy
- ▶ Stosowana do analizy małych i dużych cząsteczek
- ▶ Kapilara wypełniona buforem
- ▶ Rozdział substancji bazuje na różnicy w prędkościach poszczególnych komponentów
- ▶ Umożliwia jednoczesną analizę anionów i kationów
- ▶ Cząsteczki obojętne nie mogą być rozdzielane, ponieważ migrują z prędkością przepływu elektroosmotycznego



# Strefowa Elektroforeza kapilarna

- ▶ Pod wpływem tego napięcia w kapilarze tworzą się strefy utworzone w wyniku różnicy ruchliwości elektroforetycznej składników mieszaniny



# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

## ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**

- ▶ Kapilarna elektroforeza strefowa
- ▶ **Żelowa elektroforeza kapilarna**
- ▶ Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
- ▶ Izotachoforeza kapilarna

## ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**

## ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**

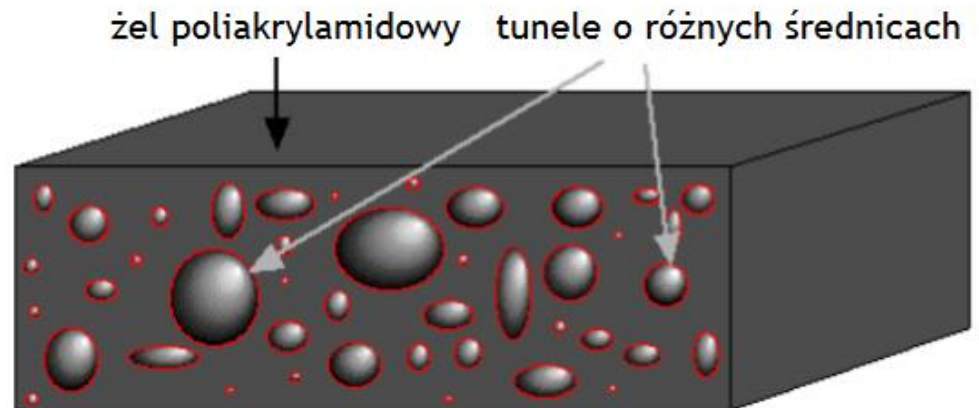


# Żelowa elektroforeza kapilarna

---

## ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna

- ▶ Kapilara jest wypełniona żelem
- ▶ Stosuje się głównie dla makrocząsteczek (cząsteczek, które znacznie różnią się rozmiarem), szczególnie użyteczna do DNA
- ▶ Lepszy rozdział w krótszym czasie w porównaniu do elektroforezy żelowej planarnej
- ▶ Najczęściej stosuje się poliakrylamid
- ▶ EOF jest tłumiony



# Żelowa elektroforeza kapilarna

---

## ▶ **Żelowa elektroforeza kapilarna**

- ▶ Makromolekuły charakteryzują się zbliżoną ruchliwością elektroforetyczną w buforze
- ▶ Podczas elektroforezy, przyłożone pole elektryczne wymusza ruch makromolekuł poprzez pory w żelu
- ▶ Makromolekuły migrują z różną prędkością zależną głównie od promienia cząsteczki
- ▶ Małe cząsteczki migrują szybciej niż duże



# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

## ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**

- ▶ Kapilarna elektroforeza strefowa
- ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna
- ▶ **Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne**
- ▶ Izotachoforeza kapilarna

## ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**

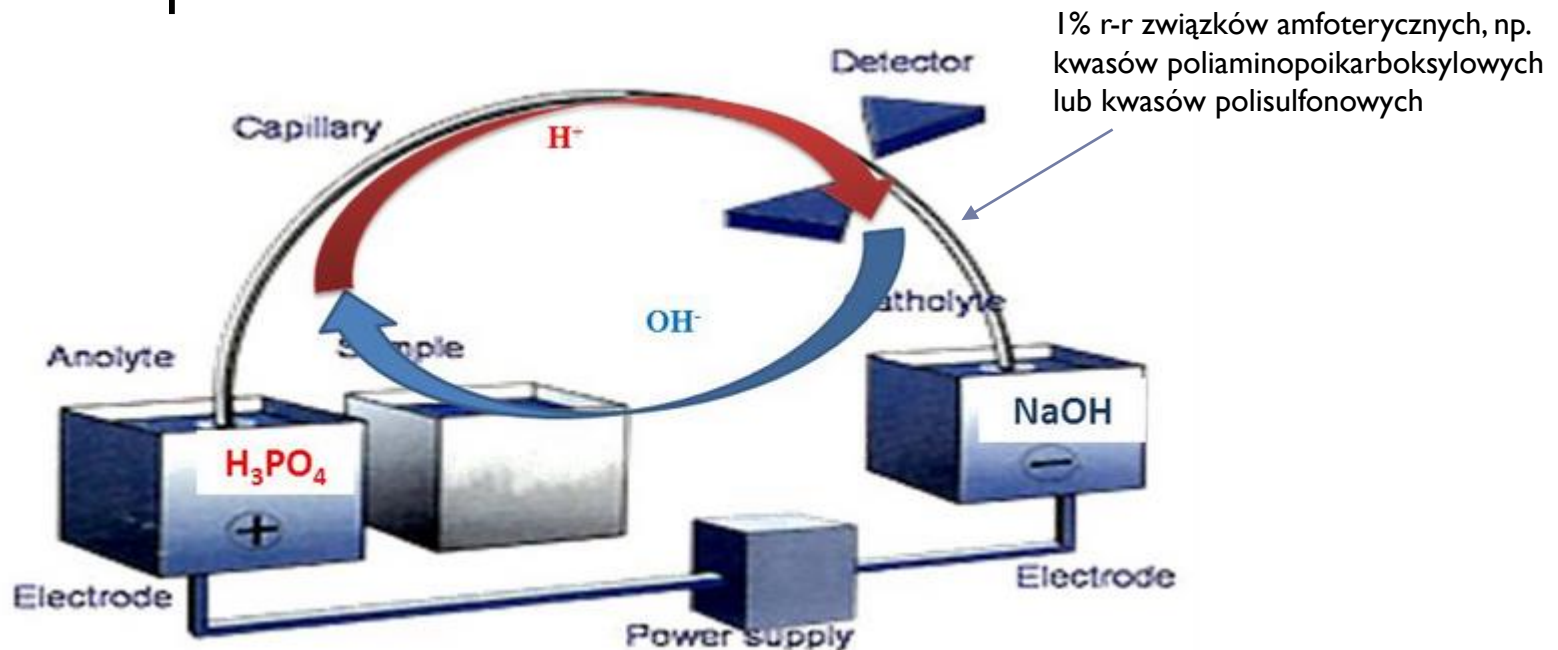
## ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**

---



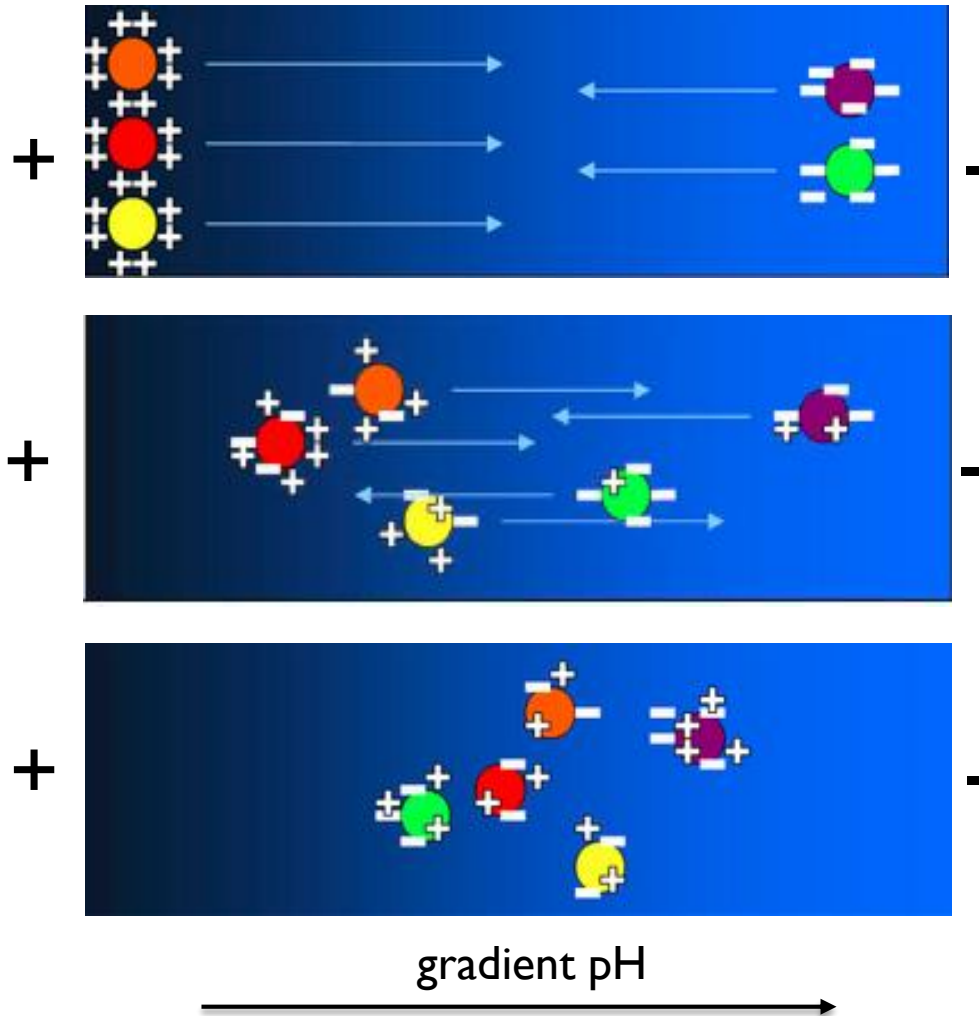
# Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne

- ▶ Technika analityczna pozwalająca na rozdział związków różniących się punktem izoelektrycznym
- ▶ Elektroforezę wykonuje się w kapilarze z zablokowanym przepływem elektroosmotycznym i zawierającej bufor z gradientem pH



# Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne

---





# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

## ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**

- ▶ Kapilarna elektroforeza strefowa
- ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna
- ▶ Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
- ▶ **Izotachoforeza kapilarna**

## ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**

## ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**

---



# Izotachoforeza kapilarna

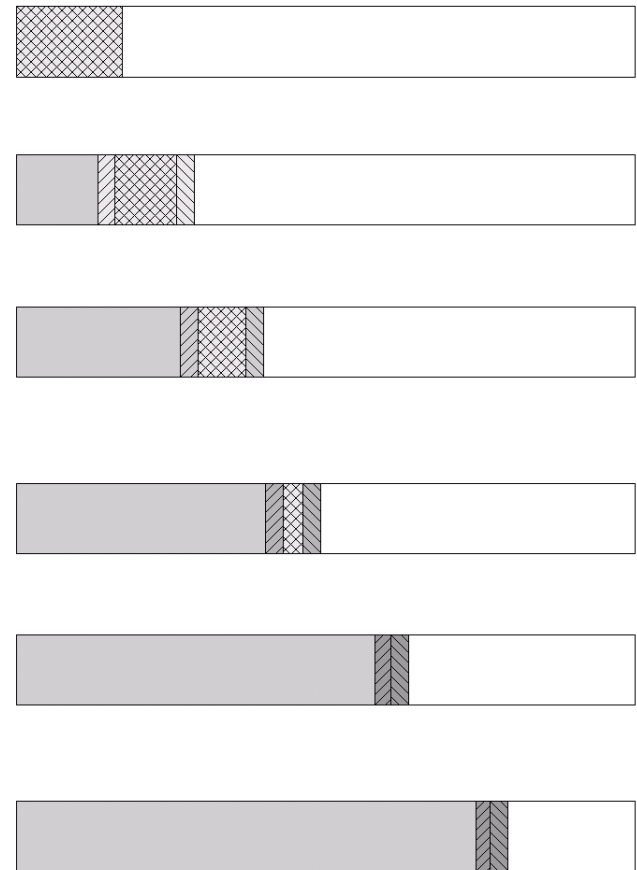
---

- ▶ Izotachoforeza kapilarna
- ▶ *iso* – taka sama
- ▶ *tacho* – prędkość
- ▶ *phoresis* – migracja
  
- ▶ Jednoczenie można analizować tylko aniony lub tylko kationy
- ▶ Rozdzielane makrojonny ustawiają się według malejącej ruchliwości
- ▶ Frakcje poruszają się przez kapilarę z tą samą prędkością
- ▶ Efekt samozateżenia



# Izotachoforeza kapilarna

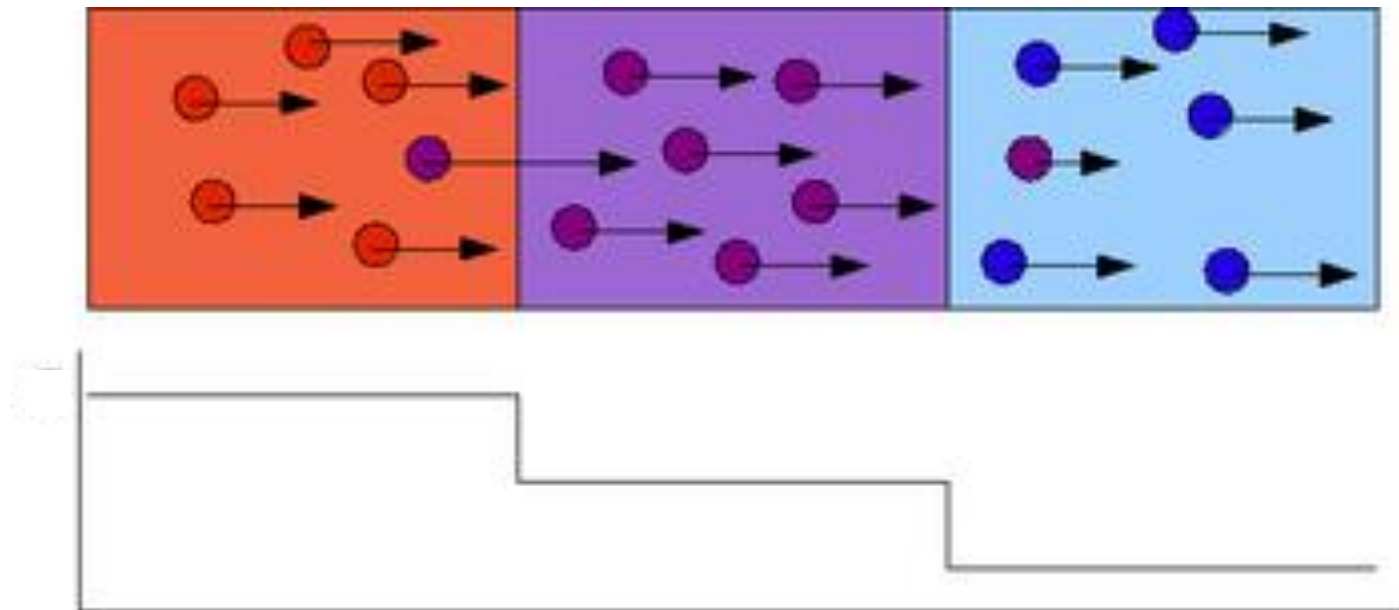
- ▶ Próbkę nakłada się pomiędzy bufor wiodący i zakańczający
- ▶ W buforze wiodącym aniony mają większą ruchliwość niż w próbce
- ▶ W buforze zakańczającym mają mniejsza ruchliwość niż w próbce
- ▶ Wszystkie strefy migrują ze stałą prędkością
- ▶ Wytwarza się gradient potencjału, który jest wynikiem zmniejszających się ruchliwości jonów w kolejnych strefach (maleje przewodnictwo stref)
- ▶ Proces prowadzi się przy stałym natężeniu



# Izotachoforeza kapilarna

---

- ▶ Efekt samoząęzania
- ▶ Detektor przewodnościowy (opornościowy)
- ▶ Izotachoforegram ma postać schodkową – długości schodków są proporcjonalne do ilości substancji



# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

## ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**

- ▶ Kapilarna elektroforeza strefowa
- ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna
- ▶ Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
- ▶ Izotachoforeza kapilarna

## ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**

## ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**



# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

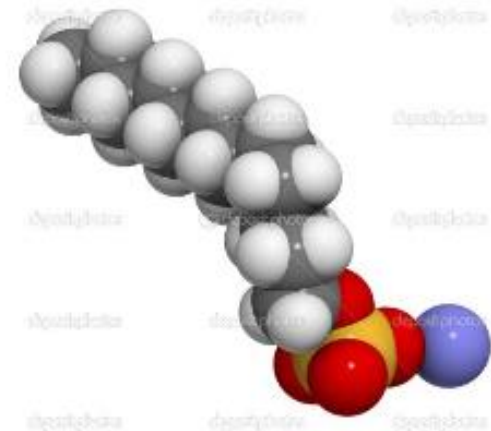
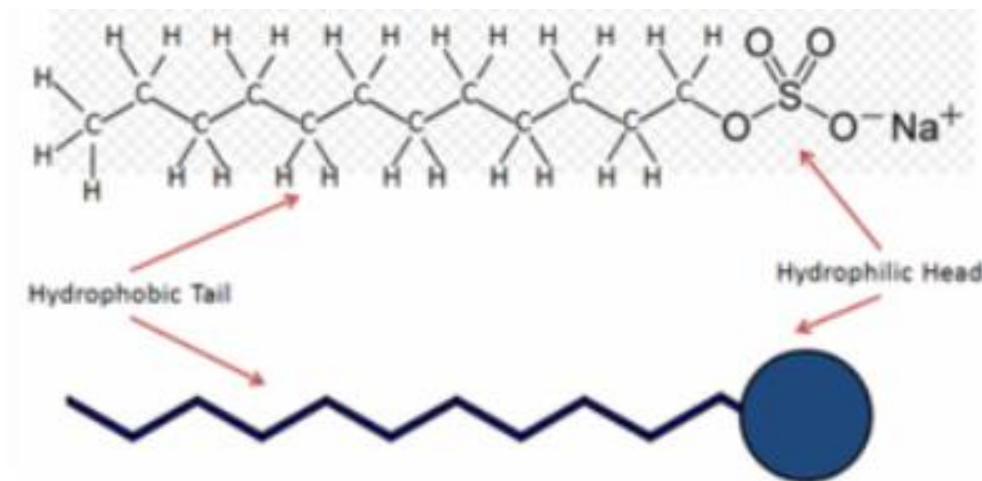
---

- ▶ Anality są rozdzielane ze względu na podział pomiędzy micide i bufor
- ▶ Możliwość oddziaływania z fazą micelarną wszystkich składników próbki, zarówno obojętnych jak i obdarzonych ładunkiem
- ▶ Jest to rodzaj chromatografii gdzie fazą stacjonarną są micide



# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

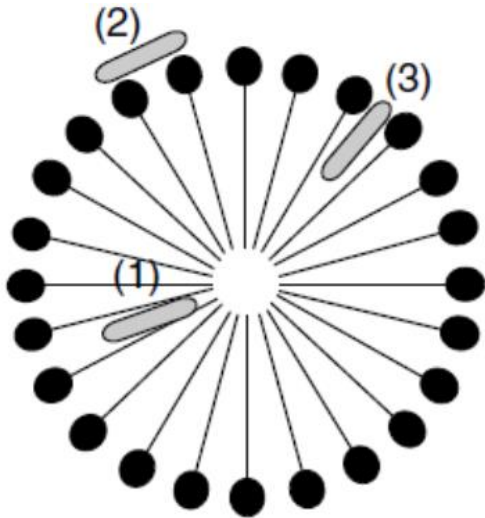
- ▶ Surfaktanty są zwykle związkami jonowymi, w zależności od rodzaju ładunku wędrują więc zgodnie lub przeciwnie do kierunku przepływu elektroosmotycznego
- ▶ Anionowe środki powierzchniowo czynne dodecylsulfan sodu (SDS)



# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

---

- ▶ Micele – twory dynamiczne, posiadają duży ładunek ujemny



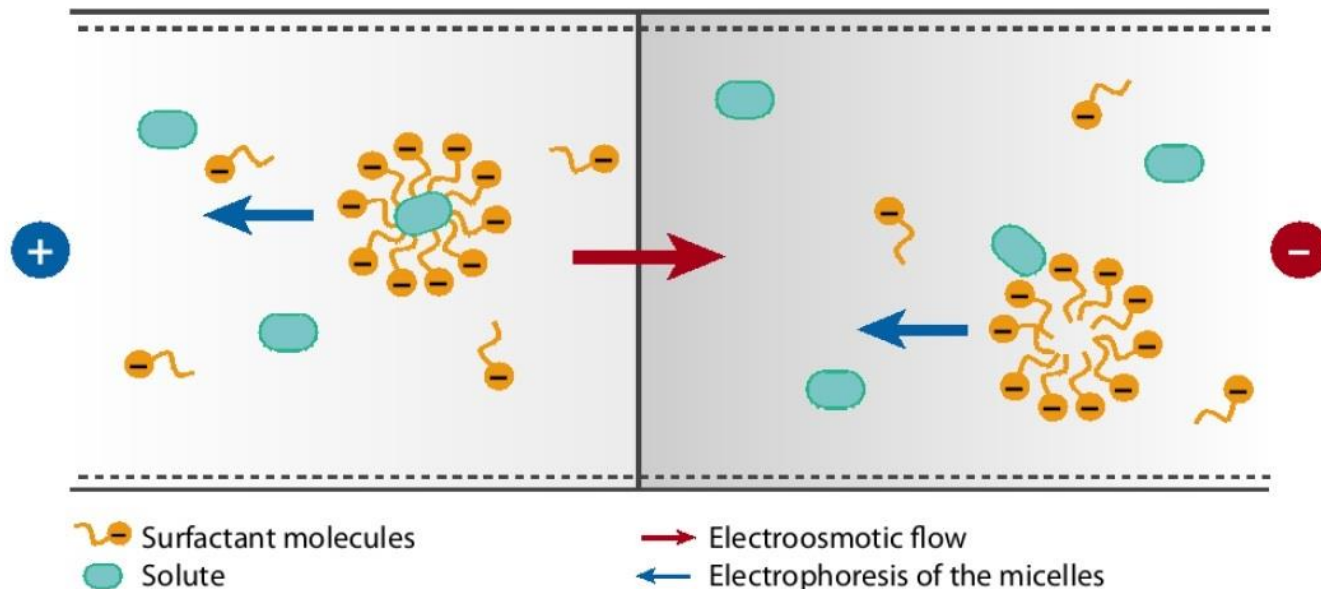
- ▶ Trzy rodzaje mechanizmu oddziaływania analitu z micelą
  - ▶ Włączenie analitu do hydrofobowego rdzenia
  - ▶ Adsorpcja analitu na powierzchni
  - ▶ Włączenie analitu w charakterze kosurfaktanta





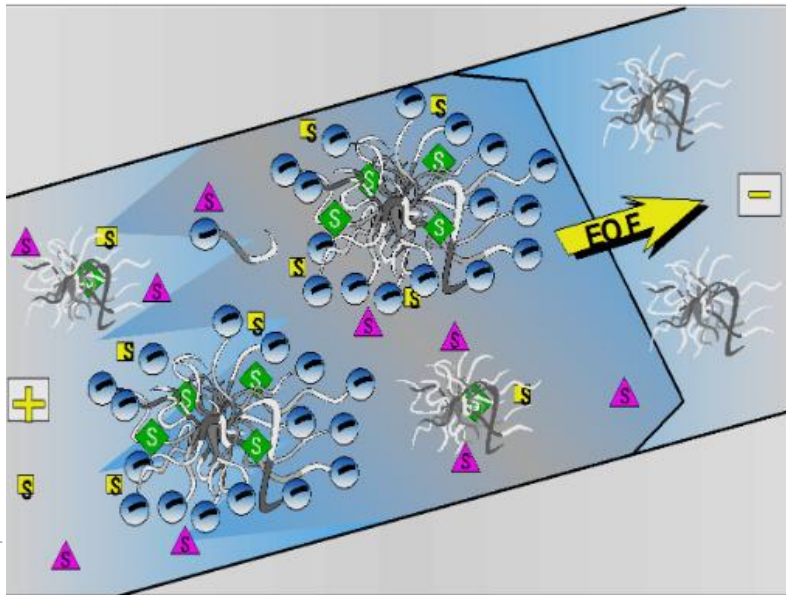
# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

- ▶ Rozdział wykonuje się w warunkach zasadowych, gdzie przepływ elektroosmotyczny jest wysoki
- ▶ Ponieważ prędkość elektroforetyczna jest o przeciwnym zwrocie do prędkości elektroosmotycznej to micelle poruszają się wolno w kierunku katody(-)



# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

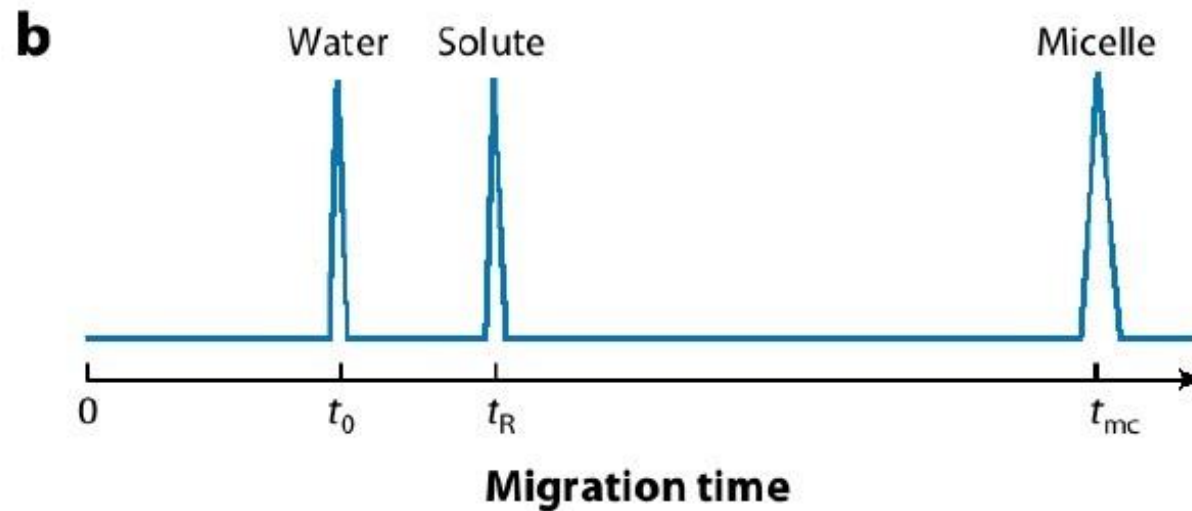
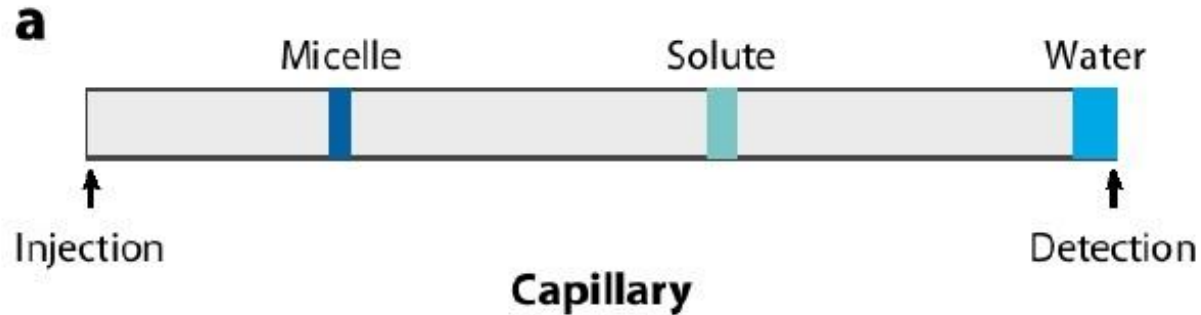
- ▶ Obojętne składniki mieszaniny ulegają podziałowi między dwie fazy: micelarna i bufor, w zależności od ich hydrofobowego charakteru
- ▶ Im bardziej hydrofobowa substancja, tym silniej oddziałuje z micelami i migruje wolniej niż substancje o charakterze bardziej hydrofilowym, które pozostają w roztworze
- ▶ Obojętne cząsteczki, które nie oddziałują z micelami poruszają się z EOF



SDS + zasadowy odczyn buforu

# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

---



# Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

---

## ▶ marker EOF

- ▶ Neutralny analit nie oddziałujący z micelami
  - ▶ Taka sama prędkość jak EOF
  - ▶ Wyznacza  $t_0$
  - ▶ metanol

## ▶ Marker miceli

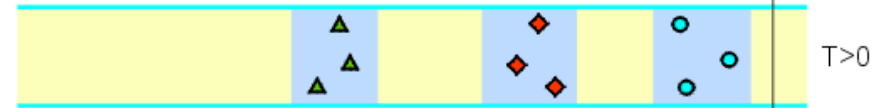
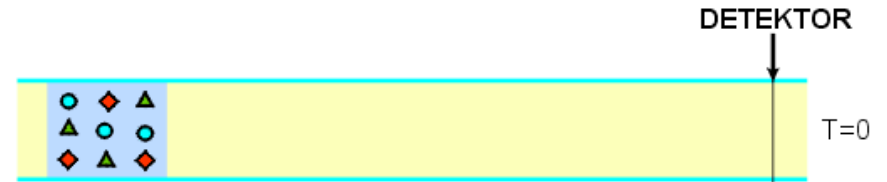
- ▶ Analit w pełni oddziałujący z micelami
  - ▶ Taka sama prędkość jak micelle
  - ▶ Wyznacza  $t_{mc}$
  - ▶ Sudan III (pigment)



# Elektroforeza kapilarna

Strefowa elektroforeza kapilarna

**A**  
CZE



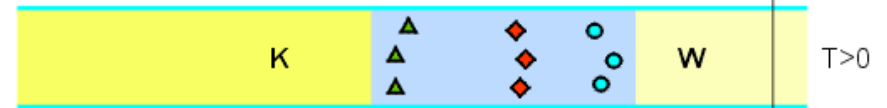
Micelarna chromatografia elektrokinetyczna

**B**  
MEKC



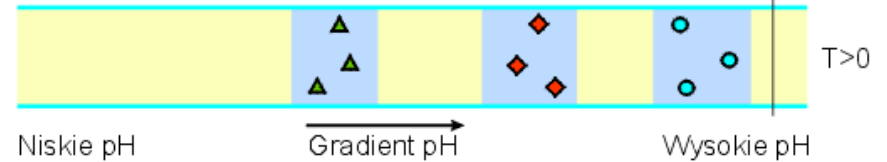
Izotachoforeza kapilarna

**C**  
CITP



Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne

**D**  
CIEF



# Kapilarne techniki elektromigracyjne

---

## ▶ **Techniki elektroforezy kapilarnej:**

- ▶ Kapilarna elektroforeza strefowa
- ▶ Żelowa elektroforeza kapilarna
- ▶ Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
- ▶ Izotachoforeza kapilarna

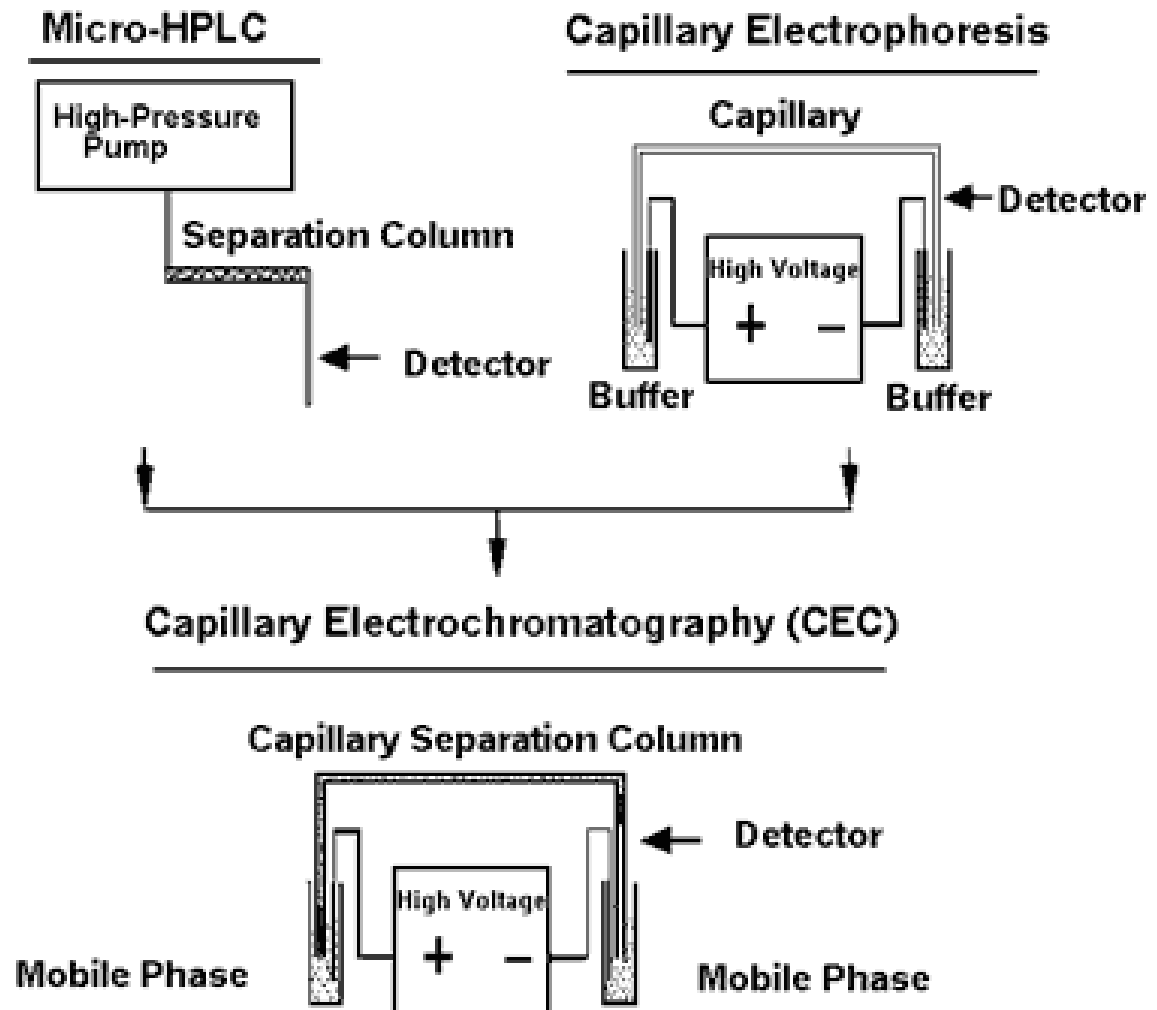
## ▶ **Micelarna chromatografia elektrokinetyczna**

## ▶ **Elektrochromatografia kapilarna**



# Elektrochromatografia kapilarna

- ▶ Kolumny podobne do tych w mikro-HPLC
- ▶ Faza ruchoma jest przemieszczana za pomocą pola elektrycznego podobnie jak w CE
- ▶ Rozdział substancji jest wynikiem kombinacji oddziaływania z fazą stacjonarną i migracji elektroforetycznej
- ▶ Może być wykonane na aparacie do CE z kolumną mikro-HPLC



# Podsumowanie

---

- ▶ Elektroforeza kapilarna daje duże możliwości rozdzielenia substancji
- ▶ Jest wiele technik elektromigracyjnych

