

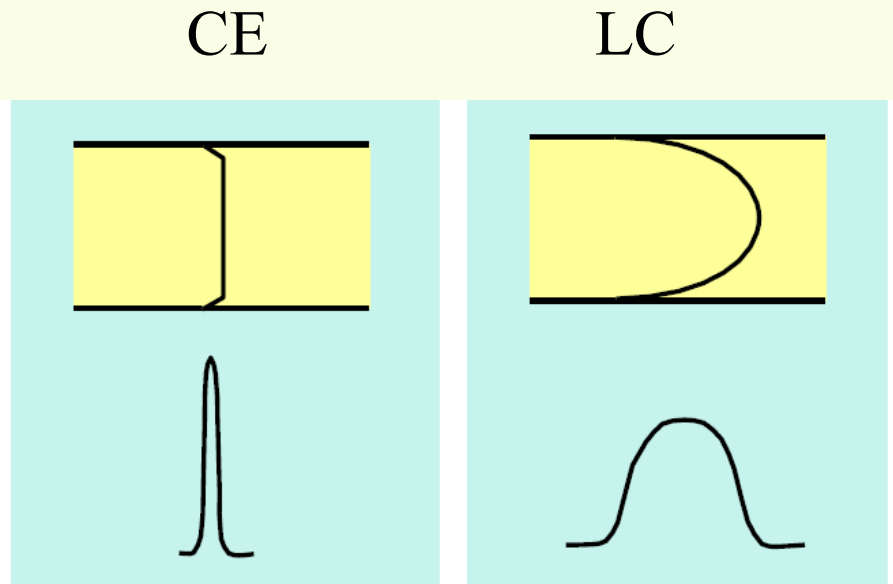
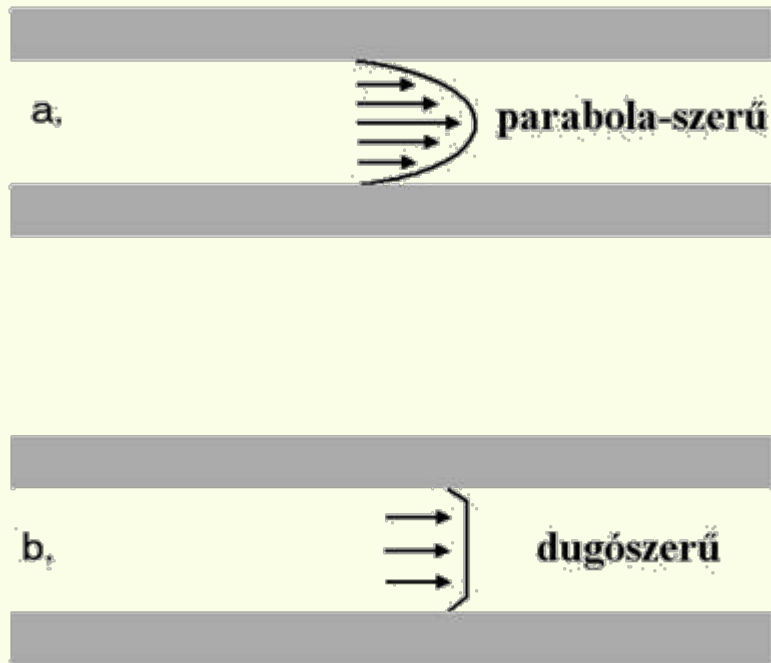
Kapilláris elektroforézis.

Elméleti alapok: elektroozmózis, eof meghatározása, szabályzása  
elválasztási hatékonyság, zónaszélesedés

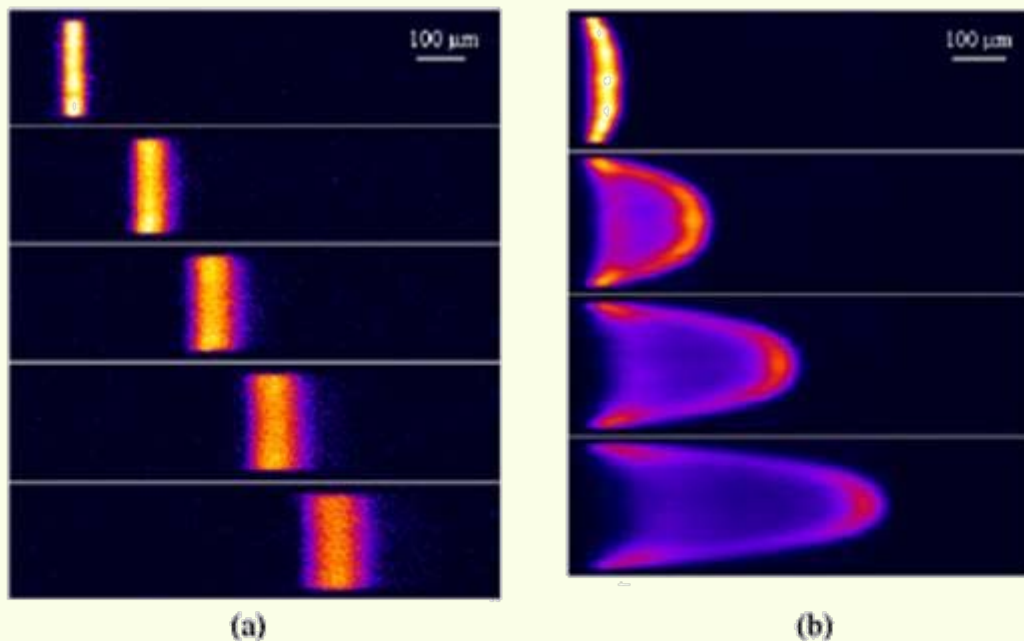
A **kapilláris elektroforézis (CE)** a jelenlegi legnagyobb teljesítőképességű, napjainkban is dinamikusán fejlődő elválasztástechnikai módszer. Számos előnye közé tartozik a könnyű automatizálhatóság, a minimális mintamennyiség (1-10 nl), a magas elméleti tányérszám, a rövid analízisidő, és a jól tervezhető körülmények az optimális elválasztáshoz.

$$\mu_i^0 = \frac{v_i^0}{E} = \frac{z_i \cdot e}{6\pi\eta r_i}$$

**elektroozmózis (elektroendozmózis):** kulcsfontosságú, csak kapilláris rendszerekben fellépő jelenség

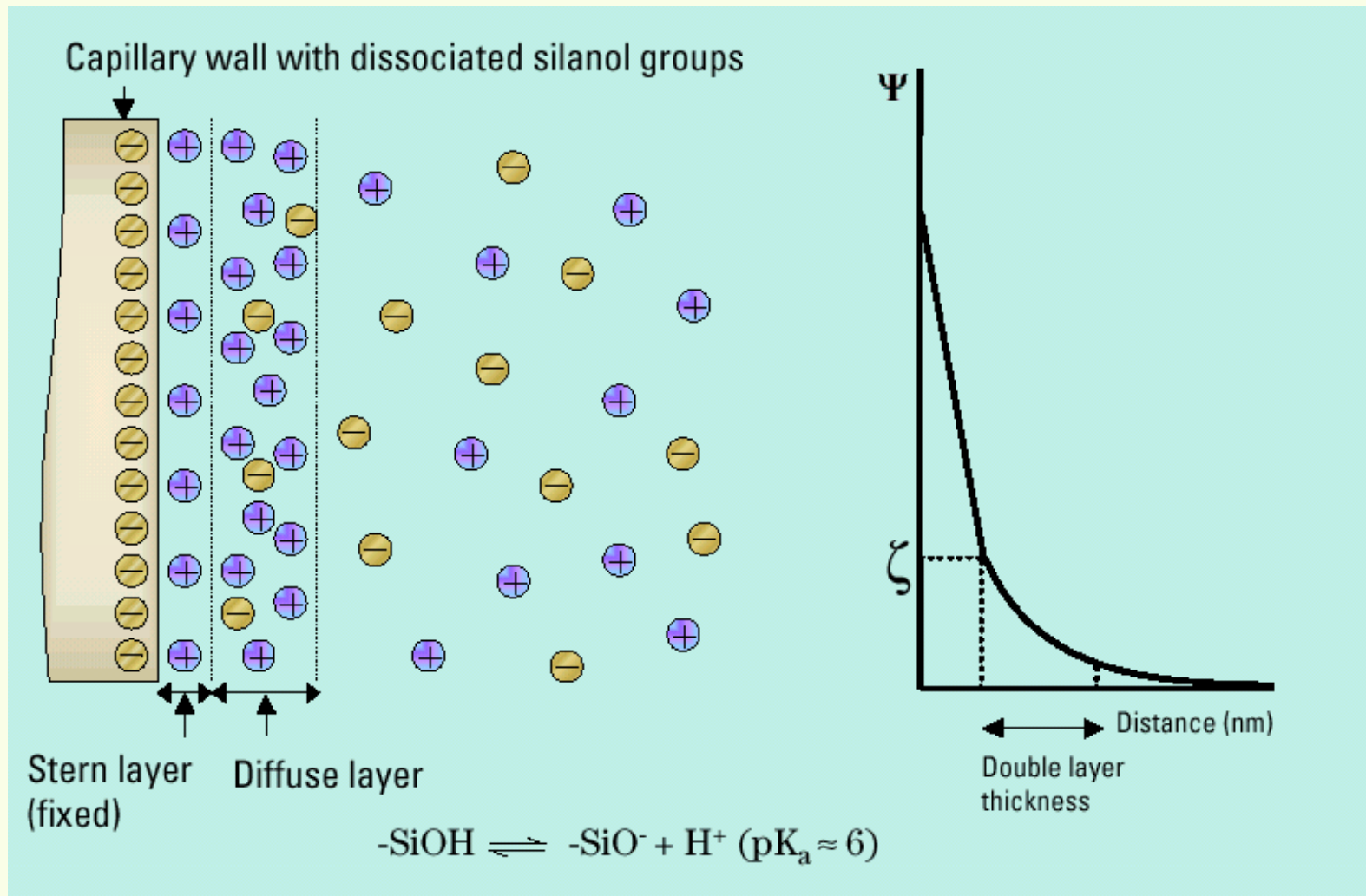


Nyomás (a), illetve elektromos térerősség (b) segítségével előállított folyadékáramok áramlási profiljai. A nyilak az áramlás sebességvektorait jelölik



**Figure 3.1:** These images show a fundamental difference in the dynamics of sample dispersion between electroosmotically-driven and pressure-driven flows. This visualization was performed using a molecular tagging technique (caged fluorescence visualization described later on in the chapter) and shows the reduced sample dispersion for (a) electroosmotic flow (in a capillary with a rectangular cross section 200 μm wide and 9 μm deep) as compared to (b) pressure-driven flow (rectangular cross-section 250 μm wide and 70 μm deep). The images are adapted from recent work by Molhó.<sup>1</sup>

# Kettős ionréteg



$$\beta = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 kT}{2N_A e^2 I}}$$

$\epsilon_r$  a relatív dielektromos állandó

$\epsilon_0$  a vákuum dielektromos állandója [ $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$ ]

$k$  a Boltzman állandó [ $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ]

$T$  a hőmérséklet [K]

$N_A$  az Avogadro állandó [ $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ]

$e$  az elektron töltése [ $-1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ]

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

$c_i$  az  $i$  komponens (ion) koncentrációja [M]

$z_i$  az  $i$  komponens (ion) töltésszám

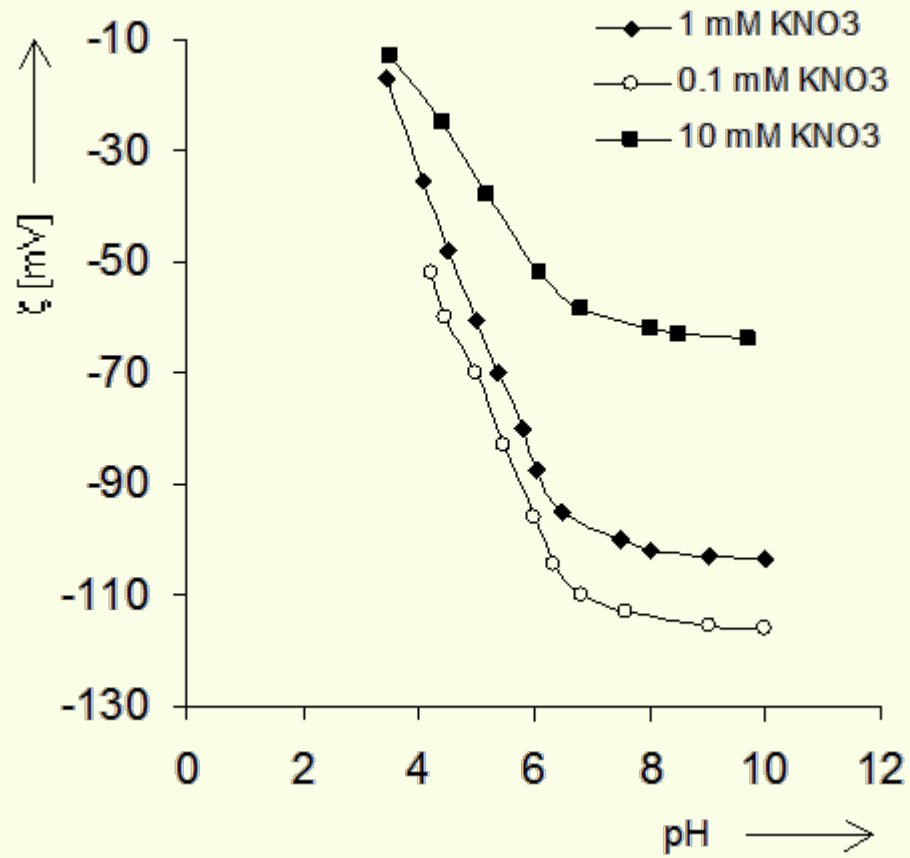
Vizes oldatoknál 298 K hőmérsékleten és  $\epsilon_r=78,30$  esetén:

$$\beta = \frac{3 \cdot 10^{-8}}{\sqrt{I}}$$

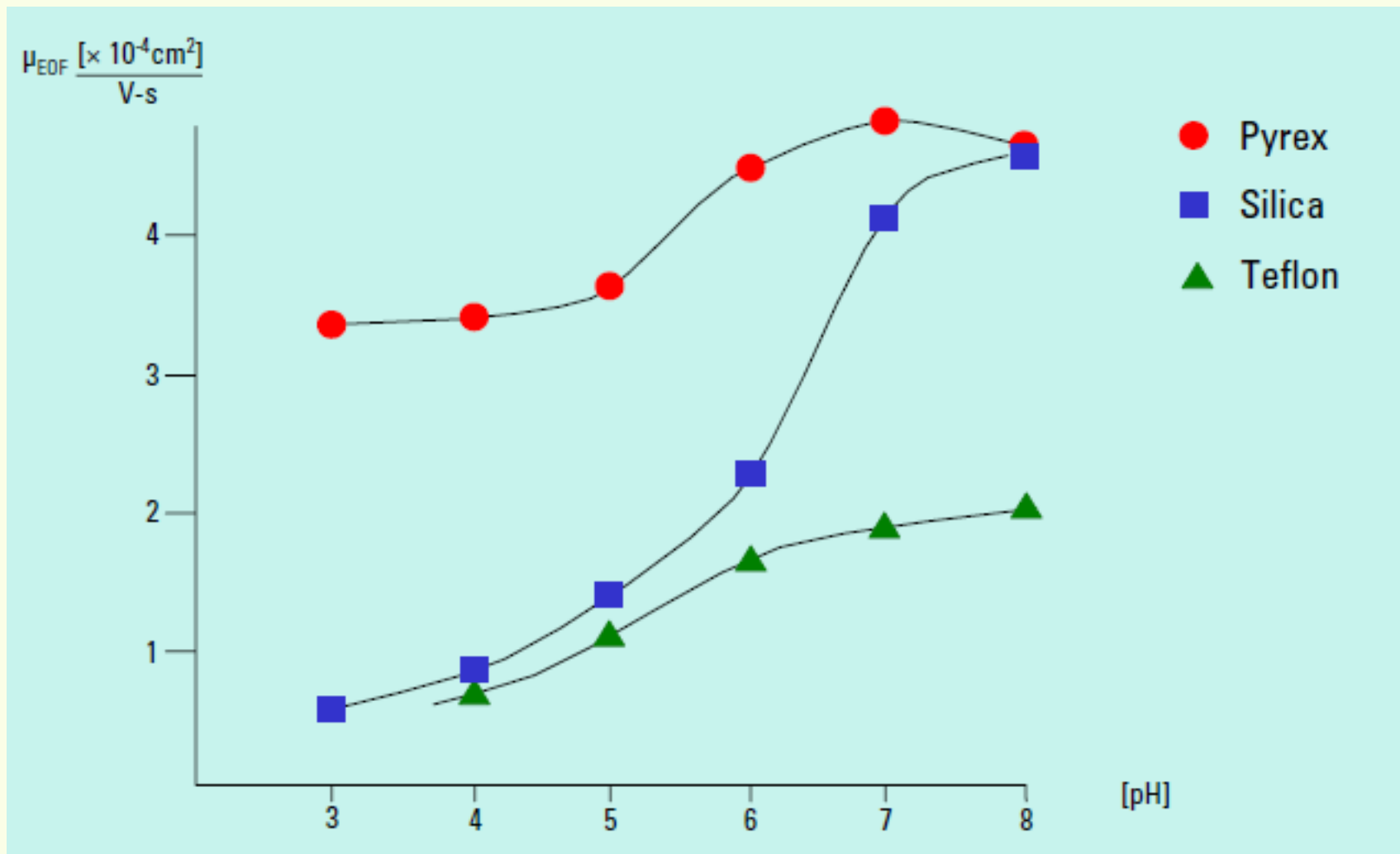
$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E$$

$\mu_{\text{EOF}}$  az elektroosmotikus mozgékonyság

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{4\pi\eta}$$

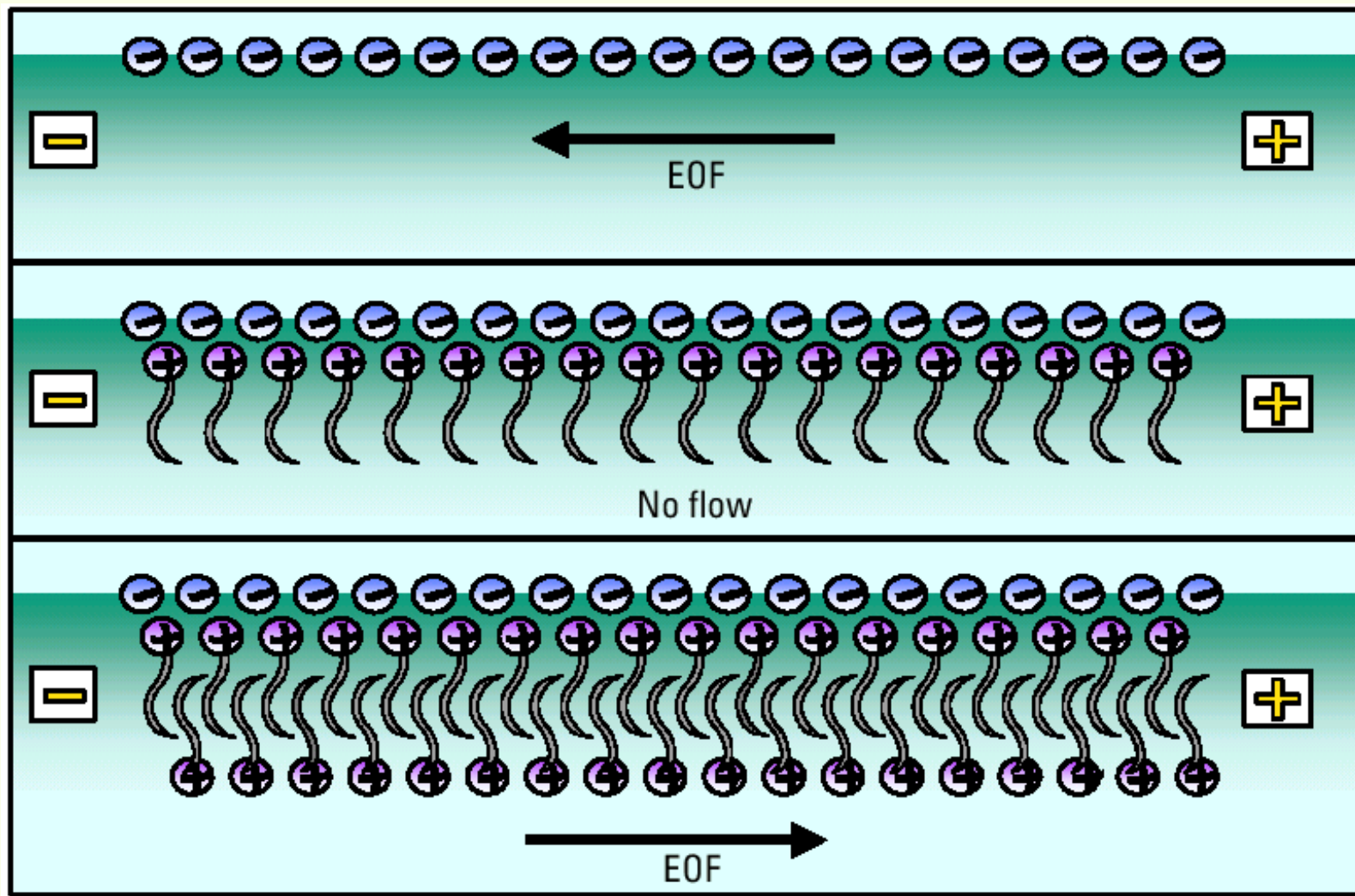
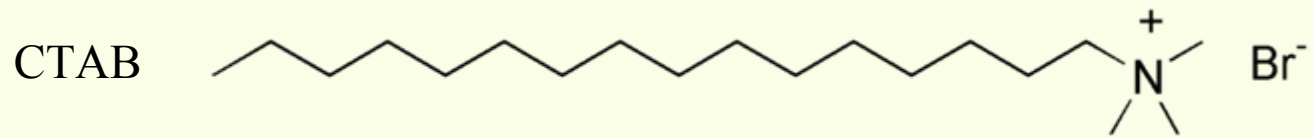


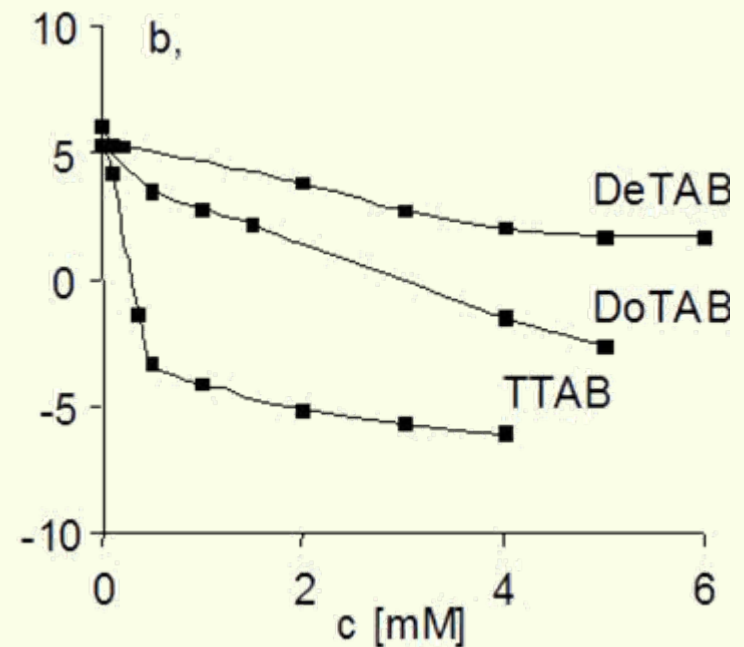
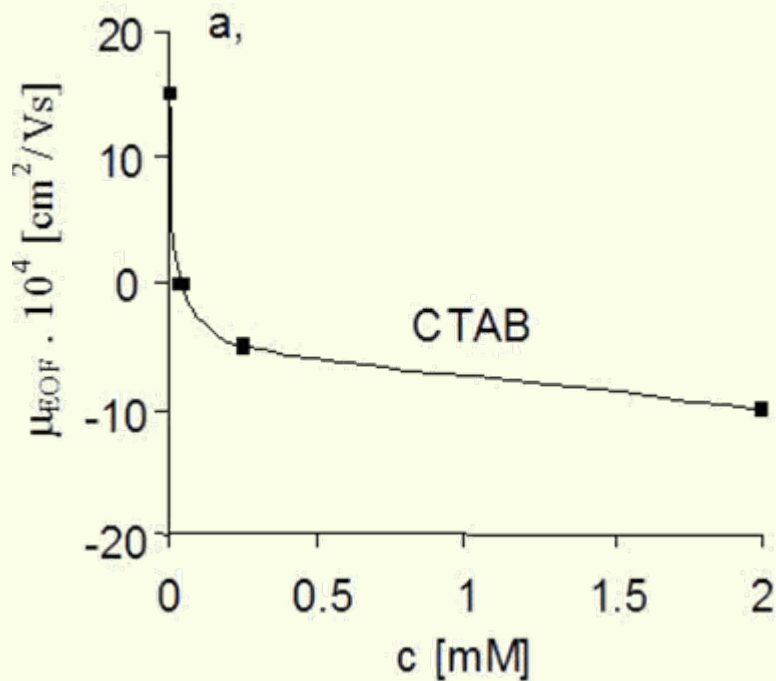
Kvarcüveg zéta-potenciáljának változása a pH függvényében kálium-nitrát vizes oldatában



	No pretreatment		5 min - MeOH, water, 1N NaOH, water 20 min run buffer	
Batch	EOF mm/s (mean; n=10)	%RSD	EOF mm/s (mean; n=10)	%RSD
QQT11A	0.2307	1.31	0.2837	0.86
QNR01	0.2353	1.18	0.2828	0.78
MNZ04B	0.2303	5.95	0.2811	1.48
KZG01A	0.1886	23.97	0.2580	1.71
MSZ01	0.1538	11.32	0.2195	0.95
KYL12	0.2185	13.80	0.2517	0.42
KYL05	0.1406	19.82	0.2900	0.97
All Data	0.1997	19.65	0.2667	9.47

# Kationos detergensek az eof megváltoztatására

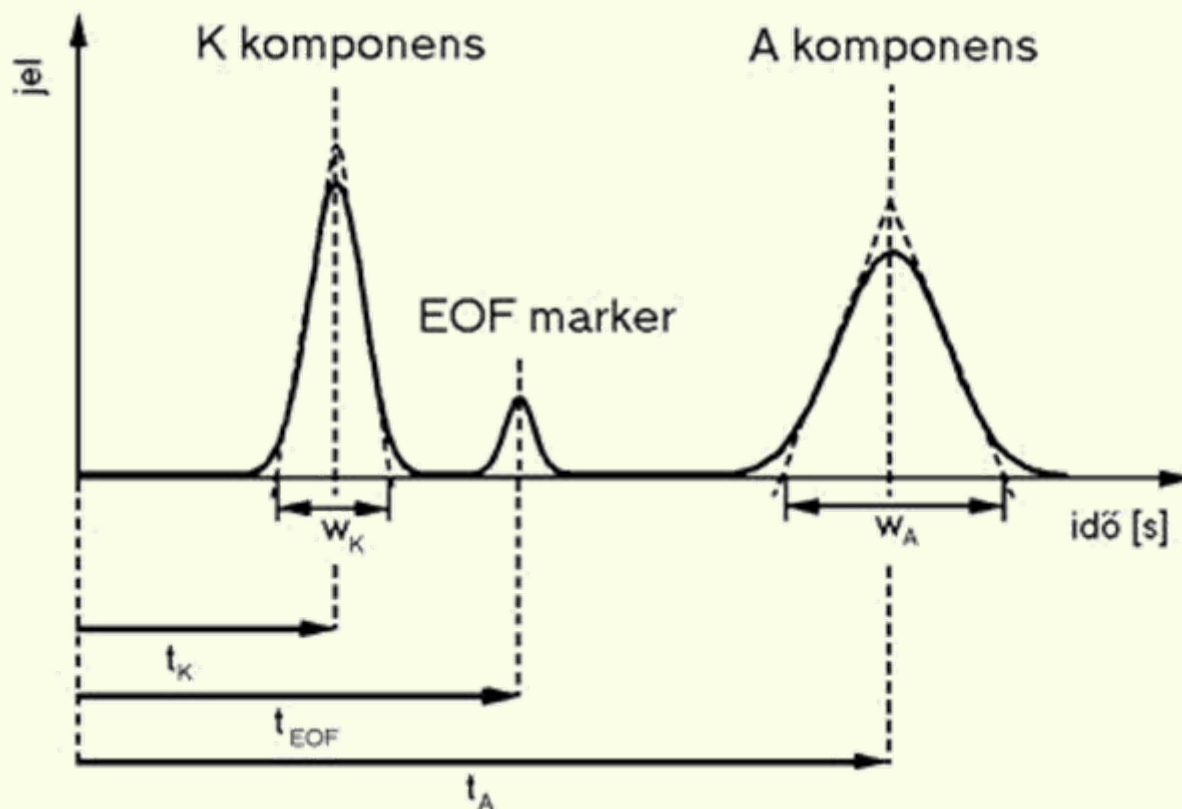




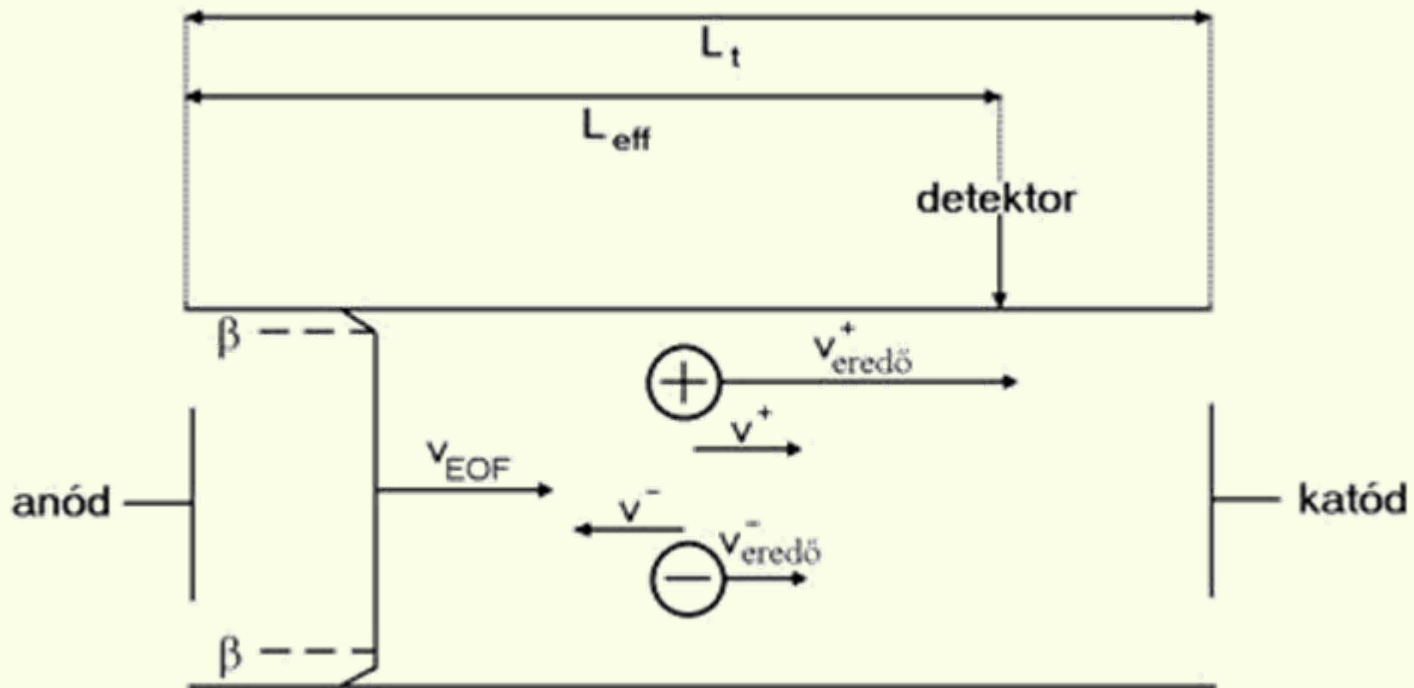
Kationos felületaktív anyagok, így a CTAB (a), és a DeTAB, DoTAB és TTAB (b) koncentrációjának hatása az elektroosmotikus mozgékonyásra.

Változó	Eredmény	Megjegyzés
<b>Elektromos tér</b>	Arányos változás az EOF-ben	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Csökkentésével az elválasztás hatékonysága és a felbontás csökkenhet</li> <li>• Növelésével jelentős Joule-hő fejlődhet</li> </ul>
<b>Puffer pH</b>	Az EOF kis pH-nál csökken, nagy pH-nál nő	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A legegyszerűbb és legeredményesebb módszer az EOF szabályzásához</li> <li>• Megváltoztathatja az elválasztandó részecskék töltését vagy szerkezetét</li> </ul>
<b>Ionerősség vagy puffer-koncentráció</b>	Növekedésével csökken a zéta potenciál és az EOF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nagy ionerősség nagyobb áramerősséget és Joule-hőt eredményez</li> <li>• Kis ionerősség problémákat jelenthet a minta adszorpciója miatt</li> <li>• A kapott jel alakja torzulhat, ha a vezetőképesség eltér a minta vezetőképességétől</li> </ul>
<b>Hőmérséklet</b>	A viszkozitás 2-3%-kal változik °C-ként	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Változtatása gyakran hasznos, mivel a hőmérsékletet a készülék maga képes szabályozni</li> </ul>
<b>Szerves módosító adalék</b>	Megváltoztatja a zéta potenciált és a viszkozitást (általában csökken az EOF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplex változások, hatásukat legegyszerűbben kísérletesen lehet meghatározni</li> <li>• Megváltozhat a szelektivitás</li> </ul>
<b>Felületaktív anyag</b>	Hidrofób és/vagy ionos kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Felületaktív anionok növelhetik az EOF-t</li> <li>• Felületaktív kationok csökkenthetik az EOF-t vagy megfordíthatják annak irányát</li> <li>• Jelentősen megváltoztathatja a szelektivitást</li> </ul>
<b>Töltés nélküli, hidrofób polimerek</b>	Hidrofób kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Csökkenti az EOF-t a felületi töltések elfedésével és a viszkozitás növelésével</li> </ul>
<b>Kovalens kötéssel kötődő anyagok</b>	Kémiai kötés a kapilláris falához	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sokféle módosítás lehetséges (hidrofób jelleg mértéke vagy töltés)</li> <li>• A stabilitás gyakran problémákat okoz</li> </ul>

**eof marker:** töltésnélküli széles pH tartományban, vízoldható, ne adszorbeálódjon  
pl. acetone, benzilalkohol



$t_K$  a K komponens migrációs ideje,  $t_A$  az A komponens migrációs ideje,  $t_{EOF}$  az EOF-t jelző anyag migrációs ideje,  $w_K$  a K komponens csúcsszélessége,  $w_A$  az A komponens csúcsszélessége



$v_{eredő}^+$  a kation eredő sebessége,  $v_{eredő}^-$  az anion eredő sebessége,  $v_{EOF}$  az EOF sebessége,  $v^+$  a kation elektroforetikus sebessége,  $v^-$  az anion elektroforetikus sebessége,  $L_{eff}$  a kapilláris effektív hossza,  $L_t$  a kapilláris teljes hossza,  $\beta$  a diffúziós kettősréteg vastagsága

# Látszólagos (eredő) mozgékonyág

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{L_{\text{eff}} \cdot L_t}{t_{\text{EOF}} \cdot U}$$

$$v_i = v_{i(\text{eredő})} - v_{\text{EOF}} = \frac{L_{\text{eff}}}{t_i} - \frac{L_{\text{eff}}}{t_{\text{EOF}}}$$

$v_i$  az  $i$  komponens elektroforetikus sebessége [ $\text{cm s}^{-1}$ ]

$v_{i(\text{eredő})}$  az  $i$  komponens eredő sebessége [ $\text{cm s}^{-1}$ ]

$v_{\text{EOF}}$  az EOF sebessége [ $\text{cm s}^{-1}$ ]

$L_{\text{eff}}$  a kapillaris effektív hossza [cm]

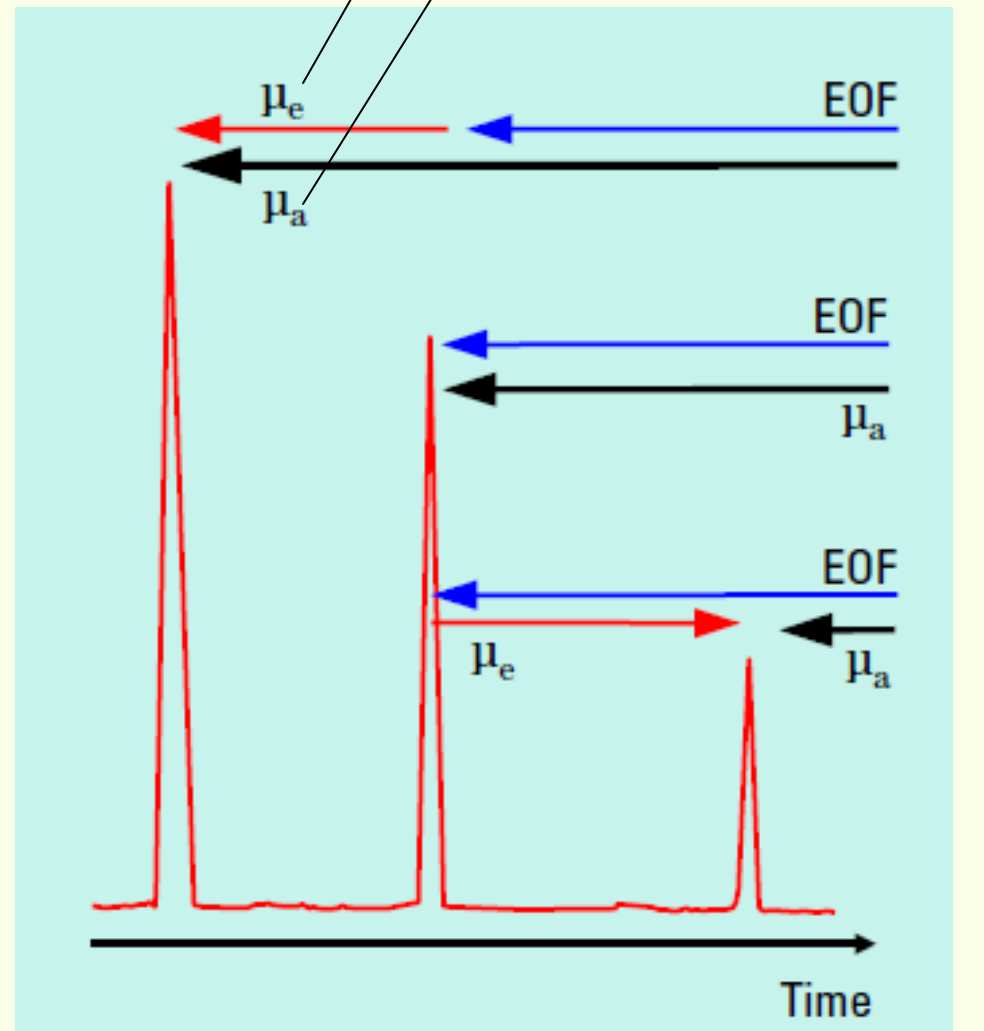
$t_i$  az  $i$  komponens migrációs ideje [s]

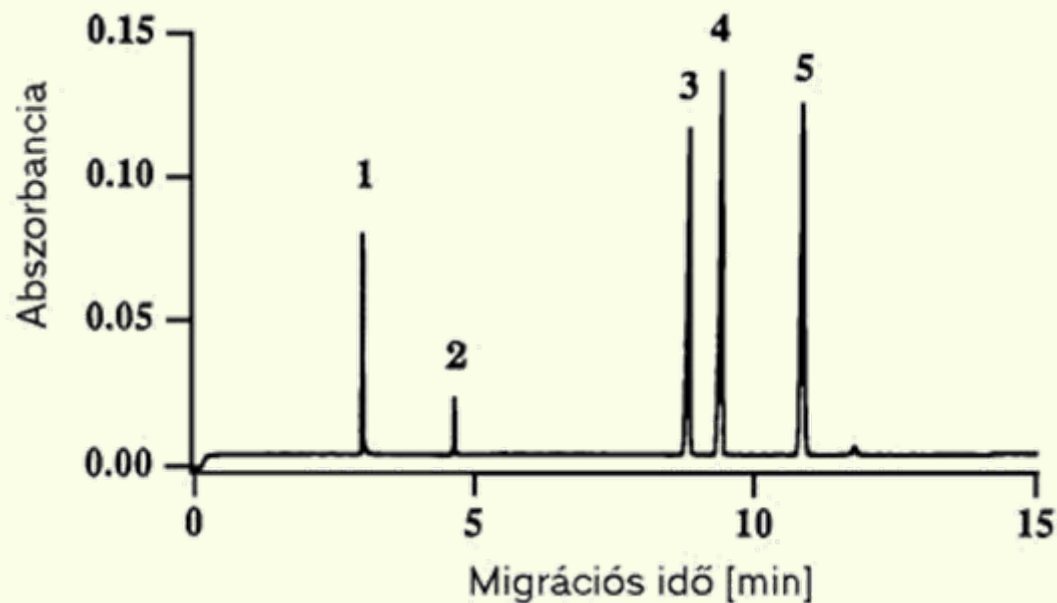
$t_{\text{EOF}}$  az EOF jelző anyagának (markerének) migrációs ideje [s]

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{v_i \cdot L_t}{U}$$

$L_t$  a kapillaris teljes hossza [cm]

$U$  az alkalmazott feszültség [V]





Benziltrimetilammónium (1), benzil-alkohol (2), acetilszalicilát (3), 4-hidroxi-benzoát (4) és benzoát (5) elektroferogramja

Ion/vegyület	t [perc]	$v_{\text{eredő}}$ [cm/s]	$v$ [cm/s]	$\mu$ [cm <sup>2</sup> /Vs]
benziltrimetil-ammónium	3,00	0,278	0,098	$3,7 \cdot 10^{-4}$
benzil-alkohol	4,62	0,180	-	$6,8 \cdot 10^{-4}$
acetilszalicilát	8,84	0,094	-0,086	$-3,3 \cdot 10^{-4}$
4-hidroxi-benzoát	9,42	0,088	-0,092	$-3,5 \cdot 10^{-4}$
benzoát	10,84	0,077	-0,103	$-3,9 \cdot 10^{-4}$

elméleti tényérszám: 
$$N = 5.54 \left( \frac{t}{w_{1/2}} \right)^2$$
  $t$  az adott komponens migrációs ideje [s]  
 $w$  csúcsszélesség a csúcs félmagasságánál [s]

elméleti tényérmagasság: 
$$H = \frac{l_{eff}}{N}$$
  $l_{eff}$  effektív hossz [m]

felbontás: 
$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$
  $w$  csúcsszélesség a csúcs alapjánál [s]

A zónaszélesedéshez hozzájáruló különböző hatások additíven összegezhetők:

$$\sigma^2 = \sigma_{VO}^2 + \sigma_{MO}^2 + \sigma_{LD}^2 + \sigma_{DE}^2 + \sigma_{WA}^2 + \sigma_T^2 + \sigma_{\Delta\mu}^2$$

$\sigma^2$  a Gauss-görbe alakú csúcs szélességének szórásnégyzete

VO: térfogati túlterhelés

MO: anyagi túlterhelés

LD: hosszirányú diffúzió

DE: detektálás

WA: adszorpció a kapilláris falára

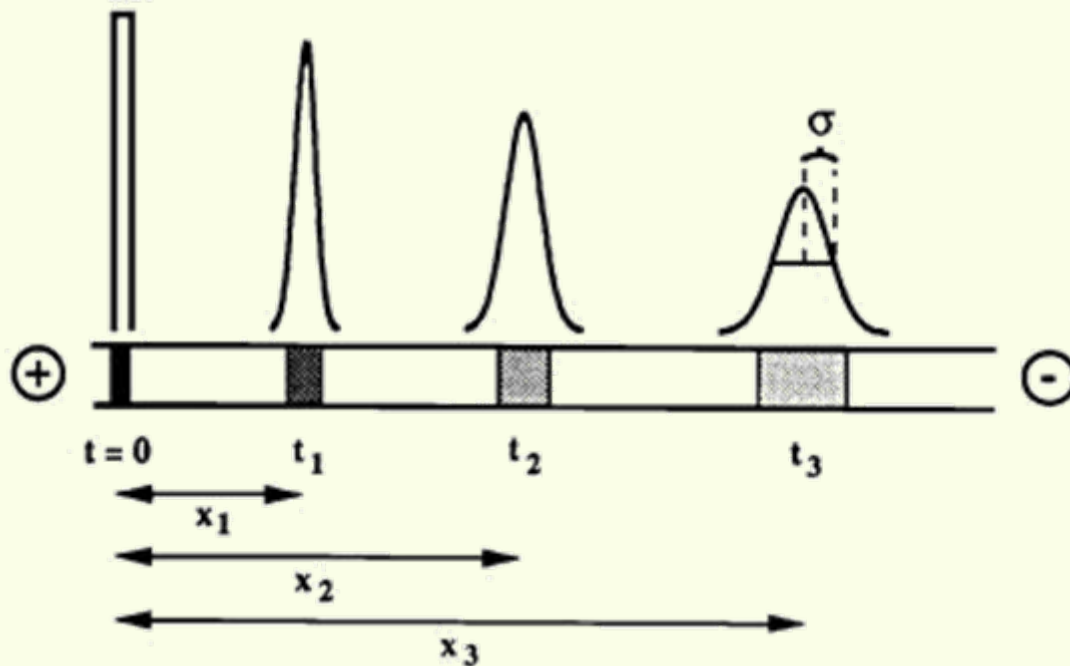
T: termikus hatások

$\Delta\mu$ : mozgékonyágbeli különbség a puffert és a minta részecskéi között

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DL}{\mu_e V}$$

$D$  = az adott részecske diffúziós koefficiense

$$N = \frac{\mu_e V l}{2DL} = \frac{\mu_e E l}{2D}$$



A koncentrációeloszlás megváltozásának időfüggése. A  $t_1 < t_2 < t_3$  a Gauss-görbe standard deviációjának időfüggését, az  $x_1, x_2, x_3$  az injektálási ponttól számított távolságot jelzik.

Vizes oldatokban lévő molekulák molekulatömegei és diffúziós együtthatói

<b>Anyag</b>	<b>Molekulatömeg</b> [g mol <sup>-1</sup> ]	<b>Diffúziós együttható</b> [cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> 10 <sup>5</sup> ]
nátrium ion	23	1,25
etanol	46	1,08
valin	117	0,74
triptofán	204	0,61
glükóz	180	0,56
citokróm C	13 400	0,11
szérum albumin (humán)	68 500	0,069
fibrinogén (humán)	340 000	0,019
dohánymozaik vírus	4 059 000	0,0046

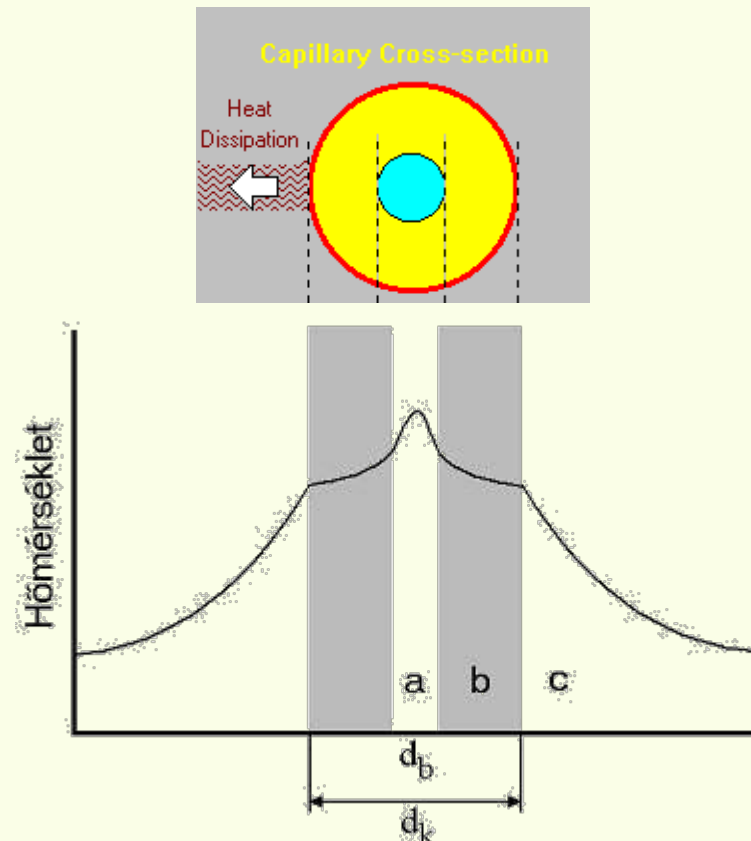
$$P = U \cdot I = R \cdot I^2 = U^2 \cdot d^2 \cdot \frac{\pi \cdot \kappa}{2 \cdot L}$$

P teljesítmény [W]

d a kapilláris belső átmérője [cm]

L a kapilláris hossza [cm]

$\kappa$  a puffer fajlagos vezetőképessége [ $S \text{ cm}^{-1}$ ]

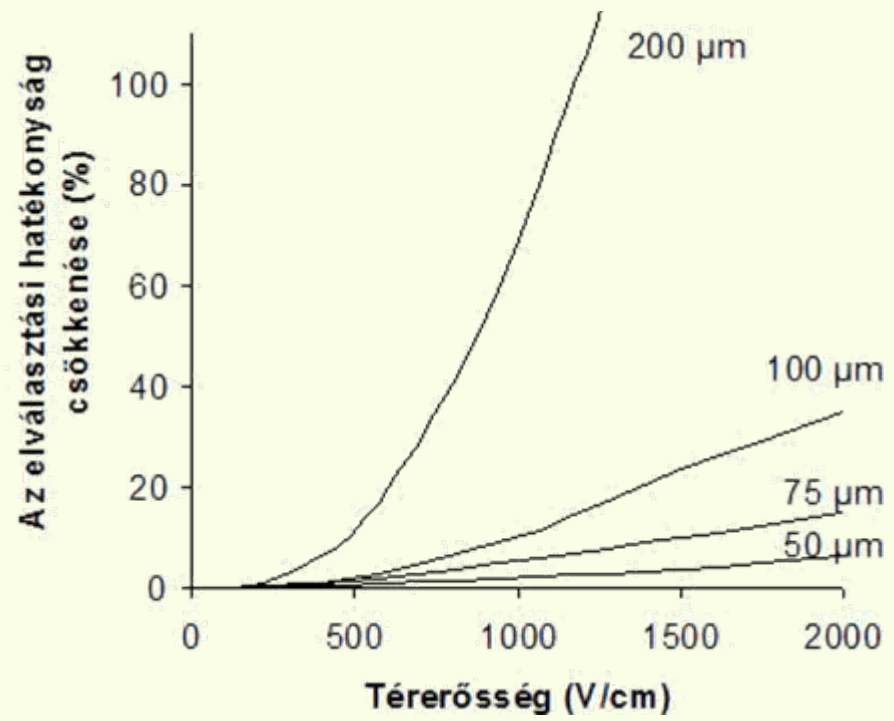
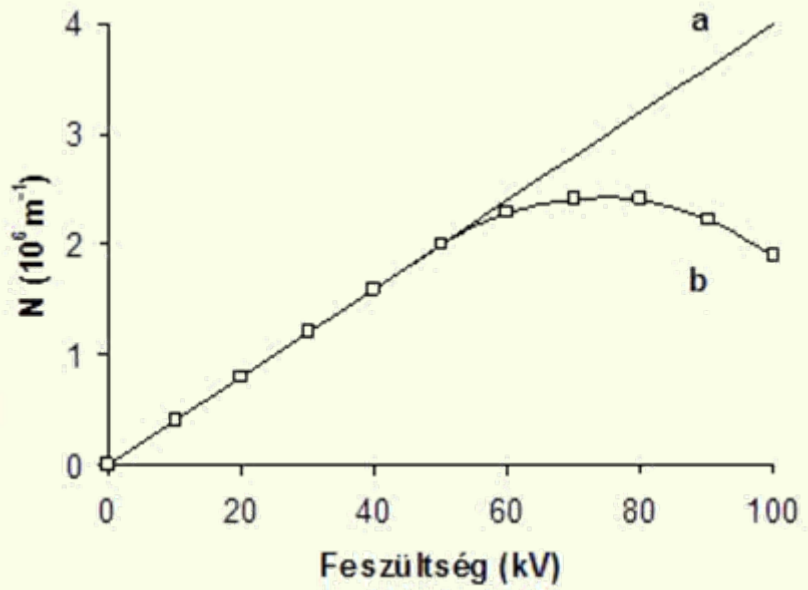


A pufferben és a kapilláris falában mutató hőmérsékletgradiens

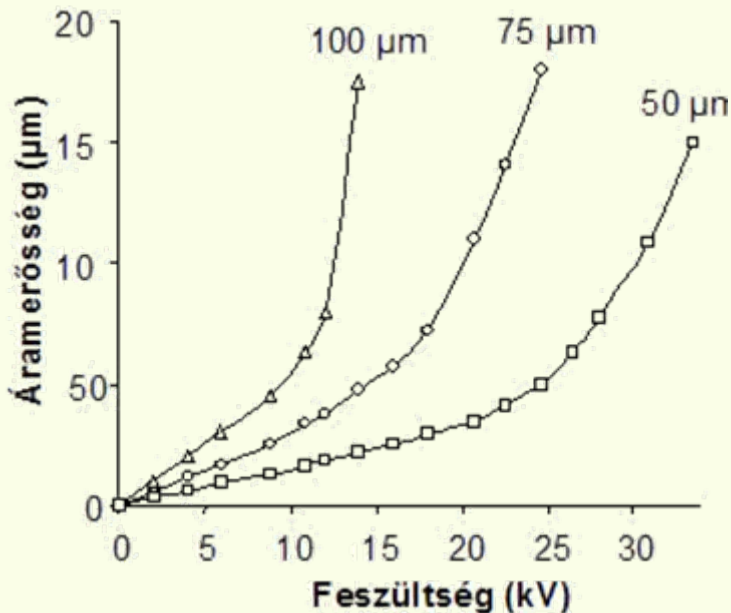
**a:** parabola-alakú hőmérsékletcsökkenés a pufferben, **b** és **c:** exponenciális hőmérsékletcsökkenés a kvarcban (kapilláris falában) és a hűtőközegben.

( $d_b$ : belső átmérő,  $d_k$ : külső átmérő)

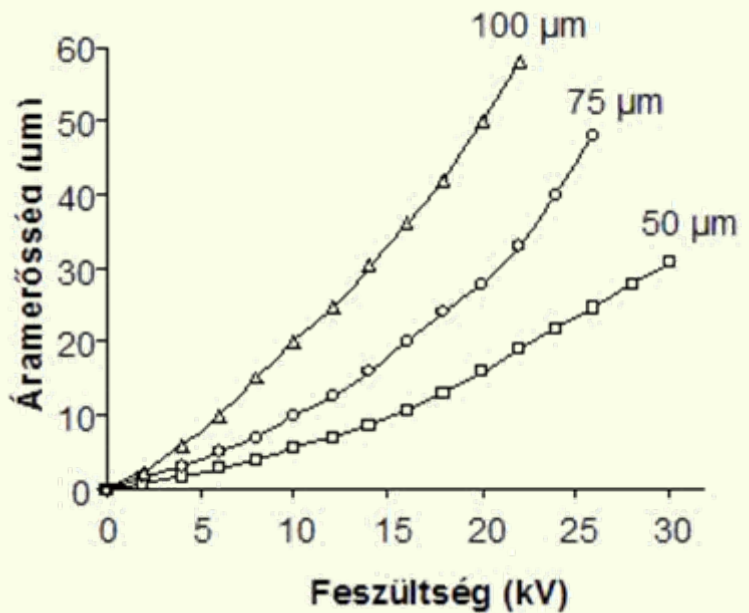
# Termikus hatások



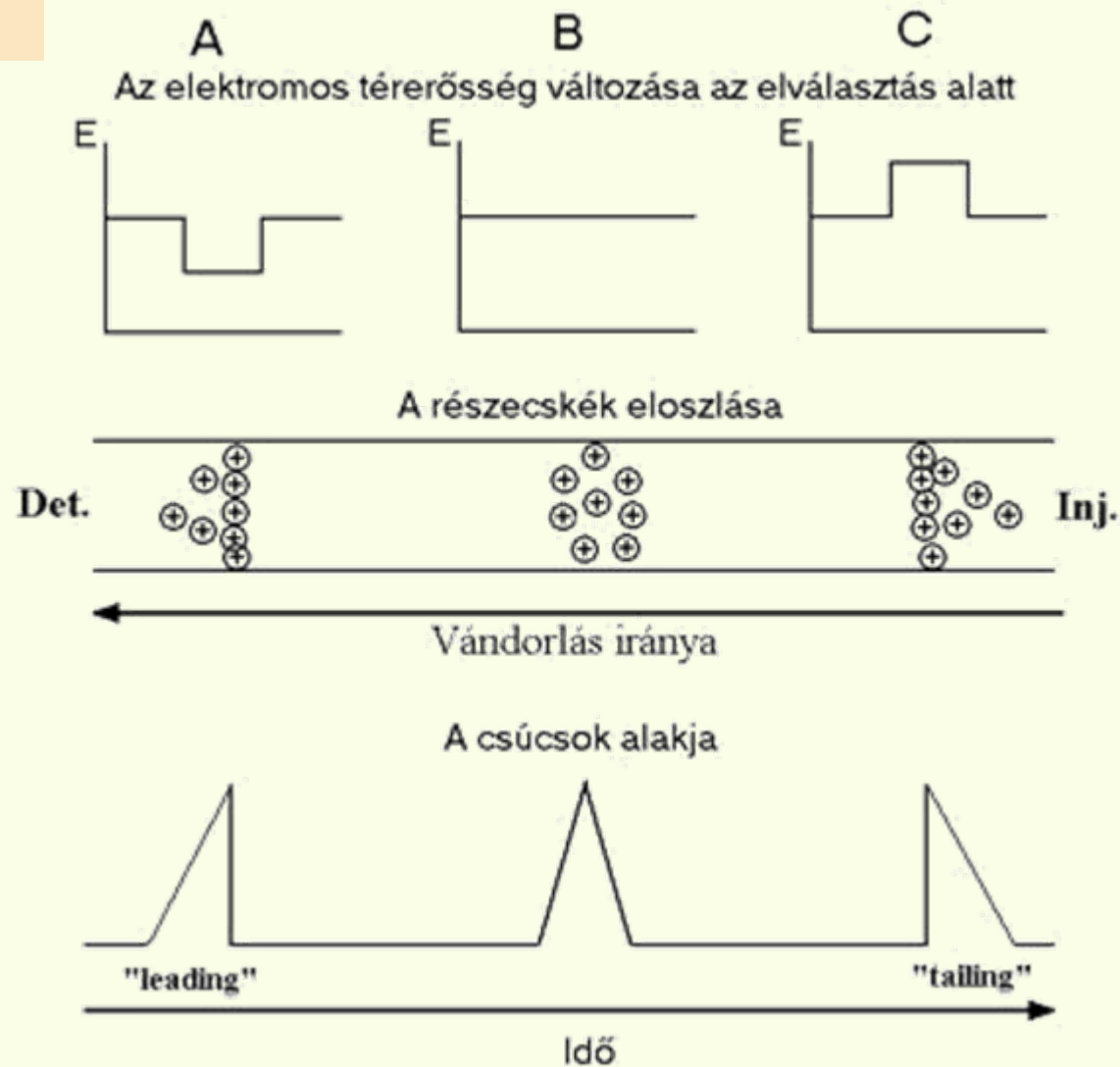
a, Ideális eset, pusztán hosszirányú diffúzióval számolva  
b, A hosszirányú diffúzióon kívül termikus hatásokkal is számolva



szervetlen puffer (borát)



szerves puffer (CAPS)

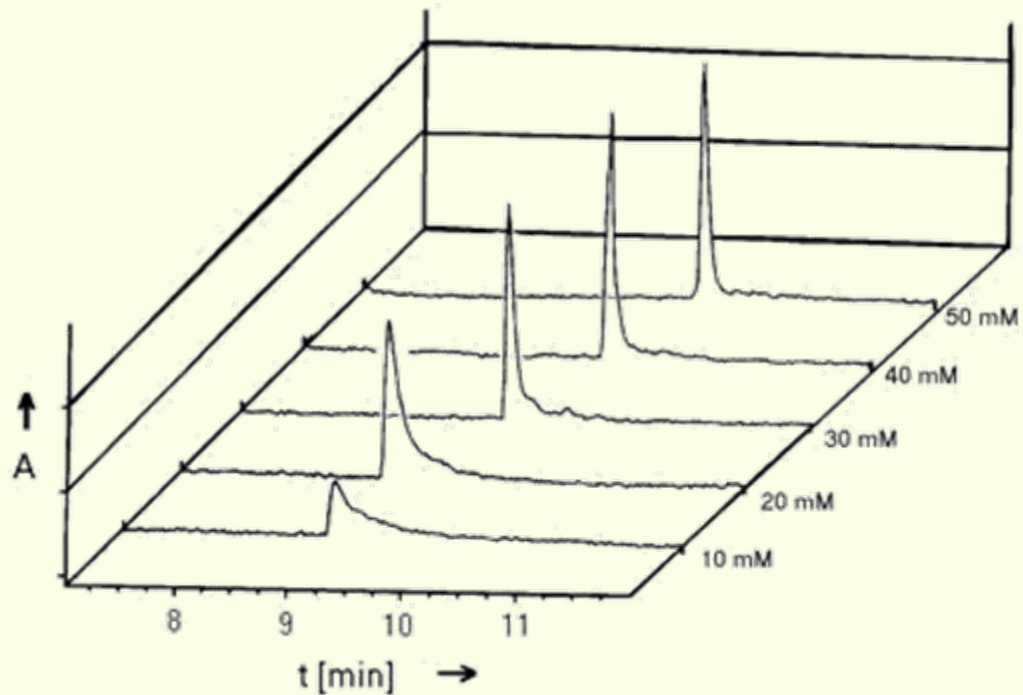


Az elektrodiszperzió okozta zónaszélesedés magyarázata: a térerősség, a minta koncentrációeloszlása és a csúcsalak megváltozása a zónában.

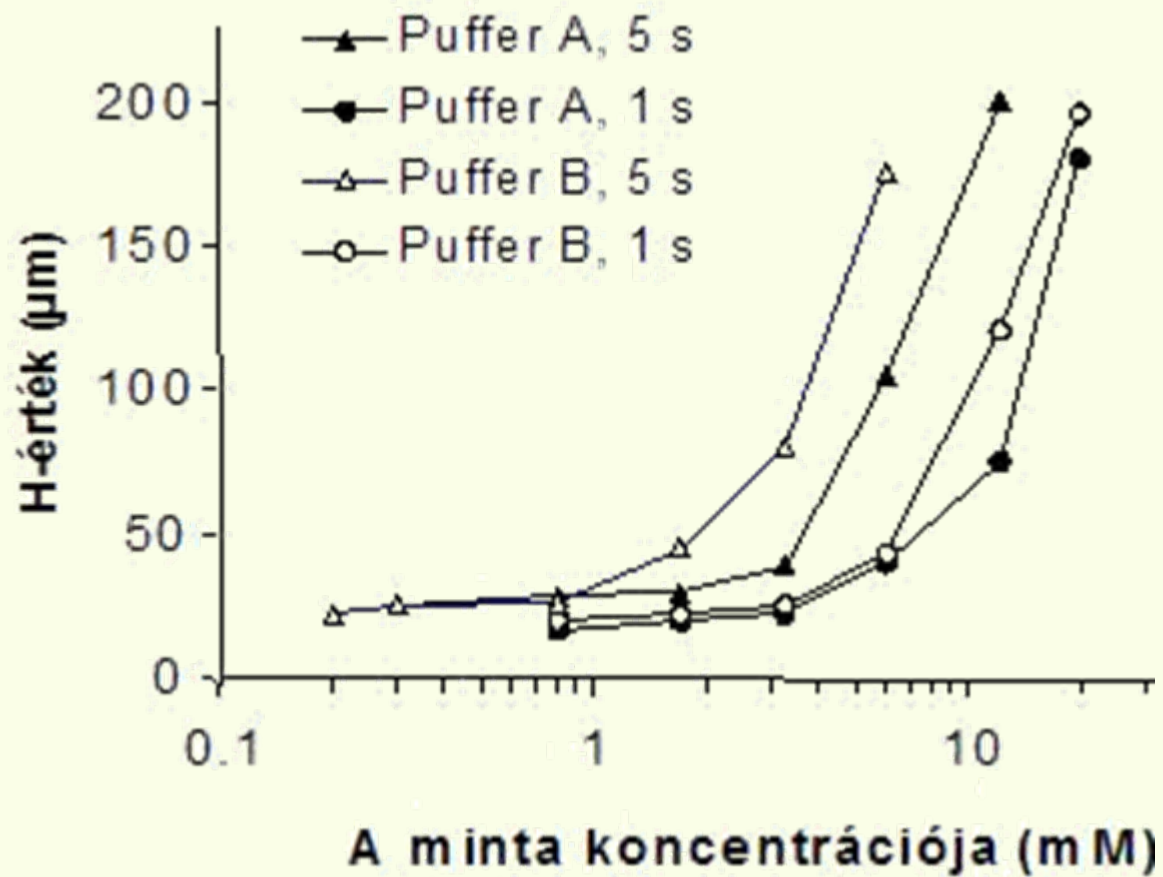
A, A mintazóna ionjainak mozgékonyasága nagyobb, mint a pufferelektrolit

B, A mintazóna és a pufferelektrolit ionjainak mozgékonyasága megegyezik

C, A mintazóna ionjainak mozgékonyasága kisebb, mint a pufferelektrolit 23



Diaminopropán adalék koncentrációjának hatása a faladszorpció miatt kialakuló zónaszélesedésre



A zónaszélesedés oka	Megjegyzés
Hosszirányú diffúzió	A meghatározás időtartamával és a diffúziós együtthatóval egyenes arányban, a molekulatömeggel fordított arányban nő.
Termikus hatások	Hőáramláshoz és a puffer viszkozitásának helyi megváltozásához vezet.
Injektálás hossza	Kisebbnek kell lennie a diffúzió által létrehozott zónánál; az injektálás hosszúságának növelésével a kimutatási határ javítható.
A mintakomponensek adszorpciója a falhoz	Lassan süllyedő csúcsalakokat (tailing) okoz, a migrációs idők reprodukálhatósága romlik.
Elektrodiszperzió (mozgékonyágbeli különbségek)	Háromszög-alakú csúcsokat okoz.
Magasságkülönbség a folyadékok szintjében	Lamináris áramlás parabolyszerű áramlási profillal.