

# TEORETICKÉ ZÁKLADY A SEPARAČNÍ PRINCIPY KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD

VÁCLAV KASIČKA

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, E-mail: kasicka@uochb.cas.cz

Došlo dne 15.I.1997

## Obsah

1. Úvod
2. Teoretické základy
  - 2.1. Elektroforetická pohyblivost
  - 2.2. Elektroosmotický tok
  - 2.3. Matematické modely a počítačové simulace
3. Separální principy a základní experimentální uspořádání
  - 3.1. Zónová elektroforéza
  - 3.2. Izotachoforéza
  - 3.3. Izoelektrická fokusace
  - 3.4. Elektroforéza v síťovacích prostředích
  - 3.5. Bioafinitní elektroforéza
  - 3.6. Elektrokinetická chromatografie
  - 3.7. Elektrochromatografie
4. Závěr

## 1. Úvod

Kapilární elektromigrační metody, v poslední době souhrnně označované jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (high-performance capillary electrophoresis - HPCE), jsou pro svou účinnost dosahující stovek tisíc až milionů

teoretických pater a citlivost na úrovni femtomol-zeptomol ( $10^{-15}$ – $10^{-21}$  mol) analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků považovány za neúčinnější, nejcitlivější a nejperspektivnější analytické separační metody. Stávají se stále více uznávaným protějškem resp. doplňkem dosud nejrozšířenějších separačních metod – různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Metody HPCE zahrnují všechny elektromigrační separační principy realizované v kapilárním instrumentálním formátu. Zatímco v sedmdesátých letech byl přívlástek „kapilární“ spojován pouze s izotachoforézou, v osmdesátých letech začaly být prováděny v kapilárním uspořádání i ostatní elektromigrační metody - zónová elektroforéza, izoelektrická fokusace, agarosová a polyakrylamidová gelová elektroforéza, SDS-elektroforéza bílkovin, bioafinitní elektroforéza a dále též kombinované elektromigrační a chromatografické techniky, elektrokinetická chromatografie a elektrochromatografie.

Omezený rozsah tohoto článku dovoluje pouze stručný popis teoretických základů a separačních principů jednotlivých elektromigračních metod. Pro podrobnější seznámení s metodami HPCE lze doporučit speciální monografie<sup>1,15</sup>, kapitoly v knihách<sup>16-17</sup> a přehledné články<sup>18,26</sup>.

## 2. Teoretické základy

### 2.1. Elektroforetická pohyblivost

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita),  $m$ , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

---

**RNDr. Václav Kašíčka, CSc.** (nar. 1952) absolvoval v r. 1977 Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, obor fyzikální chemie. V současné době je zaměstnán jako vedoucí Laboratoře elektromigračních metod v oddělení Biochemie peptidů v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky v Praze. Je autorem či spoluautorem více než 50 publikací, 6 kapitol v monografiích, skriptech a učebních textech a více než 80 příspěvků na mezinárodních i domácích vědeckých konferencích. Je naším předním odborníkem v oblasti výzkumu a vývoje elektromigračních separačních metod a jejich užití při analýze a preparaci biologicky aktivních látek, zejména peptidů a bílkovin. Od r. 1996 je předsedou Odborné skupiny chromatografie a elektroforézy České společnosti chemické.

---

$$m = v / E \quad (\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}), \quad (1)$$

kde  $v$  je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě  $E$ .

Intenzita pole v kapiláře je dána podílem napětí  $U$  připojeného ke koncům kapiláry a její délky  $L$  a je svázána Ohmovým zákonem s hustotou procházejícího elektrického proudu i prostředím o specifické vodivosti  $\kappa$ :

$$E = U / L = i / \kappa \quad (2)$$

Výsledný rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil. Ion s nábojem  $q$  je uváděn do pohybu silou elektrického pole  $F_e$ :

$$F_e = q \cdot E \quad (3)$$

Tento pohyb iontu o poloměru  $r$  je brzděn frikční silou prostředí,  $F_f$ , danou Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6\pi\eta r v, \quad (4)$$

kde  $v$  je rychlost pohybu iontu a  $\eta$  je viskozita prostředí.

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu, tj.  $F_e = -F_f$ , lze pro elektroforetickou pohyblivost  $m$  odvodit:

$$m = v / E = q / 6\pi\eta r. \quad (5)$$

Z rovnice (5) vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru (velikosti, relativní molekulové hmotnosti) a viskozitě roztoku.

Elektroforetické pohyblivosti jsou kvalitativními charakteristikami ionogenních látek pro dané prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost iontů silných elektrolytů vztahovaná k dané iontové síle a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost, elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečném zředění se nazývá limitní pohyblivost. Limitní pohyblivosti při teplotě 25 °C jsou tabelovány jako fyzikálně chemické konstanty iontů<sup>27-28</sup>.

V případě slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na stupni jejich disociace a tudíž na pH prostředí. Pohyblivost slabých elektrolytů vztahovaná k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí se nazývá efektivní pohyblivost. Závislosti pohyblivosti na pH se v praxi často využívá. Elektromigrační separace slabých elektrolytů a amfolytů (peptidů, bílkovin) se provádí při takovém pH, při kterém jsou rozdíly v efektivních pohyblivostech sepa-

rovaných látek maximální. Podrobnější rozbor závislosti pohyblivosti malých iontů i polyelektrolytů na jejich náboji, velikosti a prostorovém uspořádání lze nalézt v literatuře<sup>29,33</sup>.

## 2.2. Elektroosmotický tok

Kromě elektroforetického pohybu je častým transportním jevem v kapilárních elektromigračních metodách elektroosmotický tok. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry.

Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difuzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difuzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též *zeta* potenciál. Působením stejnosměrného pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difuzní část elektrické dvojvrstvy, ale prostřednictvím vnitřního tření v kapalině i veškerý roztok přítomný v kapiláře. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.

Pro rychlost elektroosmotického toku  $v_{eo}$  a pro její velikost vztahovanou na jednotkovou intenzitu elektrického pole, tzv. elektroosmotickou mobilitu,  $m_{eo}$ , platí následující vztahy:

$$v_{eo} = m_{eo} E \quad (6)$$

$$m_{eo} = \epsilon \zeta / \eta, \quad (7)$$

kde  $\zeta$  je elektrokinetický potenciál,  $\eta$  je viskozita roztoku a  $\epsilon$  je dielektrická konstanta roztoku.

Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je elektroosmotický tok v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu při elektromigračních separacích. Mezi pH 3-8 elektroosmo-

tický tok několikanásobně (4-5krát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů.

Elektrokinetický potenciál a tudíž i elektroosmotický tok lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry (kvalitní nebo dynamické povlaky) nebo též vnějším příčným elektrickým polem<sup>34,36</sup>.

Význačnou předností elektroosmotického toku ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravouhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón analytů při jejich elektromigrační separaci je zanedbatelný. Toho se využívá zejména v kombinovaných technikách elektrokinetické chromatografie a elektrochromatografie, kde elektroosmotický tok slouží jako hybná síla mobilních fází.

Podrobnější popis elektroosmotického toku a jeho role v kapilárních elektromigračních metodách je uveden v původní literatuře<sup>37-41</sup>.

### 2.3. Matematické modely a počítačové simulace

Matematické modely a z nich odvozené počítačové simulace kapilárních elektromigračních metod lze podle přístupu k teoretickému popisu elektromigrace<sup>42</sup> rozdělit do dvou skupin.

Jednodušší přístup vychází z popisu ustálených stavů elektromigračních separací a více či méně zanedbává další doprovodné jevy. Příkladem takového přístupu jsou např. různé modely ustáleného izotachoforetického stavu<sup>43,44</sup> nebo model teoretických pater<sup>45</sup> převzatý z chromatografie pro popis kapilární zónové elektroforézy<sup>46-51</sup> a elektrokinetické chromatografie<sup>52,55</sup>. I přes mnohá zjednodušení poskytují tyto modely o elektromigračních procesech cenné informace, jež mohou být využity při vývoji a optimalizaci experimentálních podmínek při elektromigrační separaci analytů, jejichž fyzikálně chemické parametry (mobility a disociační konstanty) jsou známy. Počítačový simulátor kapilární zónové elektroforézy<sup>50,51</sup> např. umožňuje provádět virtuální separace iontů v závislosti na mnoha parametrech experimentálních podmínek (složení nosného elektrolytu, pohyblivosti a disociační konstanty jeho složek, materiál a rozměry kapiláry, napětí, množství vzorku, teplota, způsob chlazení aj.).

Druhý, složitější a exaktnější přístup k modelování

kapilárních elektromigračních separací vychází z matematického popisu obecných zákonitostí transportních dějů v přítomnosti stejnosměrného elektrického pole. Tyto děje zahrnují elektromigraci, elektroosmózu, difuzi, konvekci a termokonvekci. Modely berou též v úvahu chemické (acidobazické, komplexotvorné) rovnováhy a závislost pohyblivosti na iontové síle a na teplotě. Tento popis vede k soustavě nelineárních parciálních diferenciálních rovnic, kterou lze dnes řešit i na stolních počítačích třídy PC. Výraznou předností tohoto přístupu je, že řeší problém separace od počátku připojení elektrického pole, tj. poskytuje i údaje o dynamice elektroseparatorace a přispívá tak k hlubšímu poznání elektromigračních metod<sup>56-62</sup>.

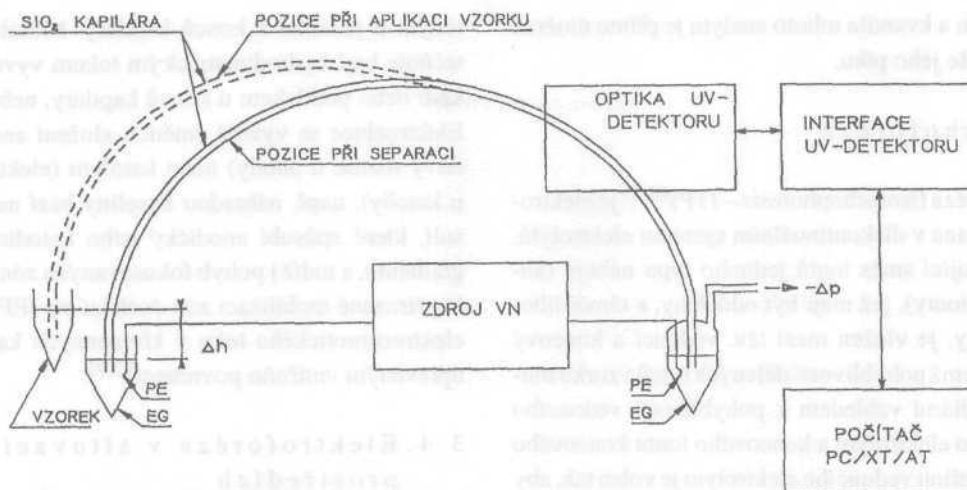
Častým předmětem teoretického studia je též vliv jednotlivých parametrů, např. teploty<sup>63,66</sup>, adsorpce<sup>67,70</sup>, elektromigrační disperze<sup>46,71</sup>, hydrodynamického toku<sup>72</sup>, viskozity<sup>73</sup> a stočení kapiláry do smyčky<sup>74</sup> na průběh a účinnost elektromigrační separace.

## 3. Separační principy a základní experimentální uspořádání

### 3.1. Zónová elektroforéza

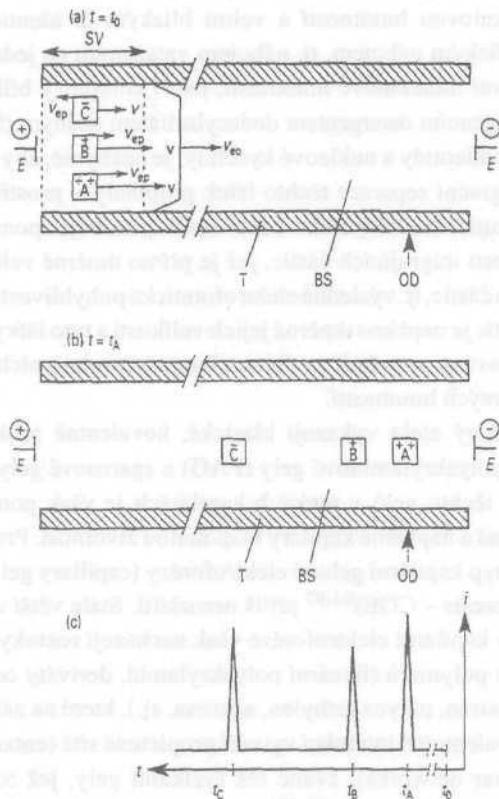
Nejjednodušší elektromigrační technikou je zónová elektroforéza, při které se jednotlivé ionogenní látky lišící se svými pohyblivostmi oddělují v homogenním prostředí základního (nosného) elektrolytu (background electrolyte - BGE). Základní experimentální sestava pro kapilární zónovou elektroforézu (capillary zone electrophoresis - CZE)<sup>75-79</sup>, která může být využita též pro ostatní HPCE techniky, je schematicky znázorněna na obr. 1. Oba konce tenké křemenné kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných základním elektrolytem, kterým je naplněna též kapilára. Vnitřní průměr křemenné kapiláry je obvykle menší než 100  $\mu\text{m}$  (typicky 50 resp. 75  $\mu\text{m}$ ) a její délka je většinou v rozsahu 30-80 cm. Kapilární formát separačního prostoru dovoluje relativně účinný odvod Jouleova tepla, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole (desítky  $\text{kV/m}$ ) a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace. Miniaturizace separačního prostoru (objem kapiláry o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 1 m je 2  $\mu\text{l}$ ) je též základem vysoké citlivosti HPCE.

Na počátku experimentu je velmi krátký úsek kapiláry (cca jednotky mm) naplněn roztokem vzorku (viz obr. 2a). Jeden ze způsobů aplikace vzorku je znázorněn na obr. 1. Vstupní konec kapiláry je umístěn do nádobky se vzorkem



Obr. 1. Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody;

EG - elektrodové nádoby, PE - platinové elektrody, VN - vysoké napětí,  $\Delta h$  - rozdíl výšky hladiny vzorku a elektrodového roztoku,  $-\Delta p$  - podtlak aplikovaný při plnění a promývání kapiláry



Obr. 2. Separáční princip kapilární zónové elektroforézy;

a - počáteční stav v čase  $t_0$ : do kapiláry (T) naplněné nosným elektrolytem (BS) je zavedena zóna vzorku (SV) obsahující směs iontů A, B, C pohybujících se různými elektroforetickými rychlostmi  $v_{ep}$ ;  $E$  - elektrody;  $v_{eo}$  - rychlost elektroosmotického toku,  $v$  - výsledná rychlost migrace, b - stav separace v čase  $t_A$ : ion A prochází optickým detektorem (OD), c - schematický záznam separace - elektroforegram,  $i$  - signál detektoru,  $t_A$ ,  $t_B$ ,  $t_C$  - migrační časy iontů A, B, C

a po určitou dobu je vytvořen rozdíl hladin mezi roztokem vzorku a roztokem nosného elektrolytu. Jakmile je zóna vzorku zavedena do kapiláry, je konec kapiláry obsahující vzorek ponořen zpět do elektrodové nádoby a k systému je připojeno stejnosměrné elektrické pole ze zdroje vysokého napětí schopného poskytovat konstantní napětí (až 30 kV), nebo konstantní proud (pracovní hodnoty v HPCE obvykle v řádu desítek  $\mu A$ ), nebo konstantní výkon (pracovní hodnoty v HPCE obvykle 1-5 W na metr délky kapiláry).

Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi,  $v_{ep}$ , směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem o rychlosti  $v_{eo}$ . V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je relativně vysoká (většinou vyšší než rychlost elektroforetická), takže výsledná rychlost pohybu kationtů i aniontů má stejný směr (katodický) a anionty i kationty mohou být analyzovány současně v průběhu jednoho experimentu (viz obr. 2b).

Pohyb zón vzorku v kapiláře je nejčastěji sledován pomocí „on-column“ UV-VIS-absorpčního detektoru, tj. v určitém místě kapiláry je při zvolené vlnové délce měřena absorpce záření pohybujícího se nosného elektrolytu a zón analytů. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce, tzv. elektroforegramu (viz obr. 2c), může být získána kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita daného analytu je dána migračním

časem jeho píku a kvantita tohoto analytu je přímo úměrná výšce resp. ploše jeho píku.

### 3.2. Izotachoforéza

Izotachoforéza (isotachopheresis - ITP)<sup>80-85</sup> je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů. Vzorek, obsahující směs iontů jednoho typu náboje (anionty, nebo kationty), jež mají být odděleny, a téměř libovolné protiionty, je vložen mezi tzv. vedoucí a koncový elektrolyt, přičemž pohyblivost dělených iontů vzorku musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu koncového elektrolytu. Protiion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace, protiion koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Pokud k takto definovanému systému připojíme stejnosměrné elektrické pole, dojde po určitém čase k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí (odtud název metody) v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními, jejichž ostrost se díky samozaostřujícímu efektu s časem nemění. V důsledku koncentračního efektu diskontinuálního elektrolytového systému je koncentrace separované látky v ITP zóně nezávislá na původní koncentraci ve vzorku, ustavuje se podle Kohlrauschovy regulační funkce a je konstantní v celém objemu zóny. Záznam ITP separace (izotachogram) získávaný nejčastěji univerzálním vodivostním detektorem má charakteristický stupňovitý průběh, ve kterém výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka stupně je přímo úměrná její kvantitě.

### 3.3. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing - IEF)<sup>86</sup> umožňuje dělení amfoterních látek (bílkovin a peptidů) podle jejich izoelektrických bodů, tj. podle distribuce kladných a záporných nábojů v jejich molekulách. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi amfolytů, jež tvoří nosný elektrolyt této metody. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Na rozdíl od plošných gelových uspořádání IEF, je třeba v kapilární IEF<sup>87,91</sup> (prováděné nejčastěji v kapilárách s potlačeným elektroosmotickým tokem) po dosažení ustáleného stavu fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detegovány UV-detektorem pevně umís-

těným u jednoho z konců kapiláry. Mobilizace se uskutečňuje buď hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry, nebo elektroelucí. Elektroeluce se vyvolá změnou složení anolytu (elektrodový roztok u anody) nebo katolytu (elektrodový roztok u katody), např. náhradou kyseliny bází nebo přidávkem solí, které způsobí anodický nebo katodický pohyb pH gradientu, a tudíž i pohyb fokusovaných zón k detektoru<sup>87</sup>. K přirozené mobilizaci zón dochází při IEF v přítomnosti elektroosmotického toku v křemenných kapilárách s neupraveným vnitřním povrchem<sup>92,93</sup>.

### 3.4. Elektroforéza v síťovacích prostředích

Kapilární elektroforéza se nejčastěji provádí ve volném roztoku. Mají-li však být děleny látky s rozdílnou relativní molekulovou hmotností a velmi blízkým či identickým specifickým nábojem, tj. nábojem vztaheným na jednotku relativní molekulové hmotnosti, např. komplexy bílkovin s ionogenním detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS), polynukleotidy a nukleové kyseliny, je nezbytné, aby elektromigrační separace těchto látek probíhaly v prostředích vykazujících síťový efekt. Tento efekt způsobuje zpomalení rychlosti migrujících částic, jež je přímo úměrné velikosti těchto částic, tj. výsledná elektroforetická pohyblivost těchto částic je nepřímo úměrná jejich velikosti a tyto látky jsou oddělovány v pořadí podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností.

Síťový efekt vykazují klasické, kovalentně prokřížované polyakrylamidové gely (PAG) a agarosové gely. Příprava těchto gelů v tenkých kapilárách je však poměrně náročná a naplněné kapiláry mají malou životnost. Proto se tento typ kapilární gelové elektroforézy (capillary gel electrophoresis - CGE)<sup>94-97</sup> příliš nerozšířil. Stále větší uplatnění v kapilární elektroforéze však nacházejí roztoky lineárních polymerů (lineární polyakrylamid, deriváty celulósy, dextran, polyoxyethylen, agarosa, aj.), které na základě nekovalentních interakcí vytváří propletené sítě (entangled polymer networks), zvané též fyzikální gely, jež rovněž vykazují síťový efekt<sup>98,101</sup>. Jejich předností je, že jimi tvořené separační prostředí kapiláry lze snadno obnovit pouhým promytím a naplněním kapiláry jejich roztokem.

Nedávno byla popsána separace DNA dokonce i v prostředí ultrazředěných, nepropletených polymerů, např. hydroxyethylcelulósy<sup>102</sup>, jež je vysvětlována brzdícím efektem vláken polymeru interagujících s migrujícími molekulami DNA<sup>103</sup>.

Pro separaci obřích molekul DNA a polysacharidů v prostředí polymerních sítí i ultrazředěných roztoků polymerů se využívá relativně nová metoda - elektroforéza s pulsním (invertujícím) elektrickým polem (pulsed-field resp. field inversion capillary electrophoresis - PFCE, resp. FICE)<sup>104-107</sup>. Změnám směru a intenzity elektrického pole se snáze přizpůsobují relativně menší makromolekuly než makromolekuly větší, což vede k jejich dělení v pořadí vzrůstajících relativních molekulových hmotností.

### 3.5. Bioafinitní elektroforéza

Klasické polyakrylamidové gely se využívají též k imobilizaci ligandů, jež selektivně zpomalují vybrané složky směsi analyzovaných látek, ke kterým vykazují biospecifickou afinitu. Např. imobilizovaný konkanavalin A zpomaluje až zastavuje migraci některých glykoproteinů a glykopeptidů a umožňuje tak jejich specifickou identifikaci v komplexních směsích peptidů a bílkovin. Na kombinaci těchto biospecifických interakcí (interakce typu enzym-inhibitor, antigen-protilátka, hormon-receptor, lektin-sacharid) s elektroforetickou migrací analyzovaných látek je založena bioafinitní elektroforéza<sup>108,109</sup>, jež je v poslední době též stále častěji prováděna v kapilárním uspořádání (bioaffinity capillary electrophoresis - BACE)<sup>110-114</sup>.

### 3.6. Elektrokinetická chromatografie

Elektrokinetická chromatografie (electrokinetic chromatography - EKC)<sup>115-117</sup> je z kapilárních elektromigračních technik nejmladší. Byla vynalezena Terabem a spol. v roce 1984 (cit. <sup>118</sup>). Jde o kombinovanou separační techniku, která využívá jevy elektrokinetické (elektroforézu a elektroosmózu) i princip chromatografický, tj. distribuci analyzovaných látek mezi dvě fáze a relativní pohyb těchto fází vůči sobě. V EKC je separace založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází tvořenou např. micelami ionogenního detergentu (sodium dodecylsulfátu - SDS) a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu, ve které je pseudofáze homogenně rozptýlena (viz obr. 3). Relativní pohyb těchto (pseudo)fází vůči sobě, nezbytná podmínka pro převedení jednorázové distribuce na kontinuální separační proces, je vyvolán elektroosmotickým tokem dvoufázového systému jako celku, který se pohybuje rychlostí  $v_{eo}$ , a elektroforetickým pohybem nabitých micelárních pseudofáze, jež se pohybuje rychlostí  $v_{ep}$  ve směru opačném. Jelikož absolutní hodnota rychlosti  $v_{eo}$  je vyšší než elektroforetická rychlost  $v_{ep}$ , výsledný směr pohybu

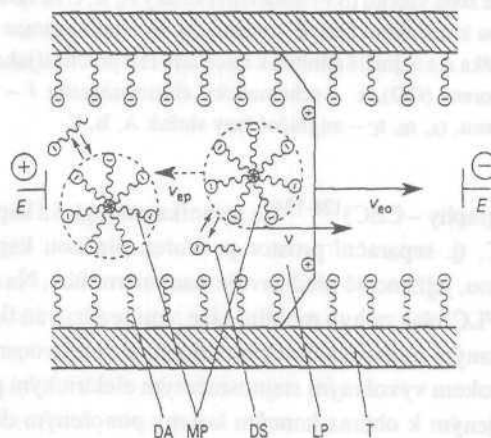
obou fází je stejný, ale jejich rychlosti jsou různé (viz obr. 3). Vodnou fází nosného elektrolytu je tedy možno považovat za fázi mobilní a micelární fázi za fázi pseudostacionární.

V důsledku různých afinit složek vzorku k micelární pseudofázi jsou tyto složky rozdílně zpomalovány zpětným pohybem micel, což vede k jejich rozdílné migrační rychlosti, a tudíž i k jejich separaci v pořadí zvyšující se afinity k micelární fázi (viz. obr. 4).

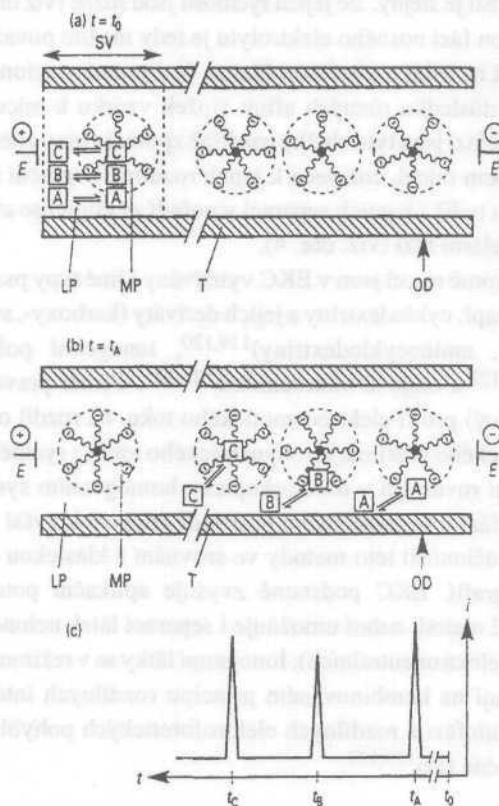
Kromě micel jsou v EKC využívány i jiné typy pseudofáze, např. cyklohextriny a jejich deriváty (karboxy-, sulfo-, alkyl-, aminocyklohextriny)<sup>119,120</sup>, ionogenní polymery<sup>121,122</sup> a olejové mikroemulze<sup>123-125</sup>. Téměř pravouhlý (pístový) profil elektroosmotického toku, na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku, a rychlé ustavení rovnováh v makroskopicky homogenním systému dvou fází v beznosičovém prostředí přispívá k vyšší separační účinnosti této metody ve srovnání s klasickou chromatografií. EKC podstatně zvyšuje aplikační potenciál HPCE metod, neboť umožňuje i separaci látek neionogenních (elektroneutrálních). Ionogenní látky se v režimu EKC separují na kombinovaném principu rozdílných interakcí s pseudofází a rozdílných elektroforetických pohyblivostí ve vodné fázi<sup>126,127</sup>.

### 3.7. Elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography - CEC)



Obr. 3. Schéma vzniku relativního pohybu vodné a micelární fáze v elektrokinetické chromatografii; T - kapilára, E - elektrody, LP - vodná fáze, MP - micelární pseudofáze iontového detergentu (např. SDS), DS - monomerní detergentu ve vodné fázi, DA - detergent adsorbovaný na vnitřní stěnu kapiláry,  $v_{ep}$  - elektroforetická rychlost micelární fáze,  $v_{eo}$  - rychlost elektroosmotického toku roztoku v kapiláře,  $v$  - výsledná rychlost micelární fáze



**Obr. 4. Separací princip elektrokinetické chromatografie;**  
 a - počáteční stav v čase  $t_0$ : do kapiláry (T) naplněné roztokem skládajícím se z vodné fáze (LP) a micelární fáze (MP) je zavedena zóna vzorku (SV) obsahující složky A, B, C se vzrůstající afinitou k micelární fázi; E - elektrody, b - stav separace v čase  $t_A$ : složka A s nejnižší afinitou k micelární fázi prochází jako první detektorem (OD), c - schematický chromatogram:  $i$  - signál detektoru,  $t_A, t_B, t_C$  - migrační časy složek A, B, C

matography - CEC)<sup>128-134</sup> je technika analogická kapilární HPLC, tj. separační prostor je tvořen plněnou kapilární kolonou, jejíž nosič představuje stacionární fázi. Na rozdíl od HPLC však pohyb mobilní fáze není realizován tlakově vyvolaným hydrodynamickým tokem, ale elektroosmotickým tokem vyvolaným stejnosměrným elektrickým polem připojeným k oběma koncům kolony ponořeným do roztoku mobilní fáze v elektrodových nádobkách. Podobně jako v EKC, hlavní předností je pravouhlý profil elektroosmotického toku na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku. Kromě toho v CEC lze díky absenci zpětného tlaku kolony užít menší částice sorbentu než v HPLC, což též zvyšuje účinnost separace. V některých případech může k separaci přispívat též elektrodosorpce<sup>135,136</sup>.

## 4. Závěr

Kapilární elektromigrační metody se v uplynulých 15 letech vyvinuly ve vysokoúčinné a vysoce citlivé separační techniky, jež jsou vzhledem ke své komplementaritě k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) a ke klasické polyakrylamidové gelové elektroforéze (PAGE) stále cennějším a rozšířenějším nástrojem moderní analytické laboratoře.

V nejbližší budoucnosti lze očekávat další prudký rozvoj kapilárních elektromigračních metod. Perspektivní je zejména jejich on-line spojení s hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí při určování struktury biologicky aktivních látek separovaných z komplexních směsí biomateriálu. Lze očekávat další vývoj nových separačních medií zvyšujících účinnost a selektivitu separací, zdokonalování detekčních metod a další miniaturizaci (směrem ke kapilárně elektroforetickým mikročipům) zvyšující citlivost elektromigračních metod a vývoj jejich nových aplikačních možností.

## LITERATURA

1. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis - Principles, Practice, Applications*. Elsevier, Amsterdam 1992.
2. Grossman P. D., Colburn J. C. (Eds.): *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*. Academic Press, San Diego 1992.
3. Wiktorowicz J. E. (Ed.): *Capillary Electrophoresis*. Academic Press, New York 1992.
4. Foret F., Křivánková L., Boček P.: *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH, Weinheim 1993.
5. Weinberger R.: *Practical Capillary Electrophoresis*. Academic Press, Boston 1993.
6. Kuhn R., Hofstetter-Kuhn S.: *Capillary Electrophoresis. Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York 1993.
7. Guzman N. A. (Ed.): *Capillary Electrophoresis Technology*. Marcel Dekker, New York 1993.
8. Jandik P., Bonn G.: *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*. VCH, Cambridge 1993.
9. Camilleri P. (Ed.): *Capillary Electrophoresis - Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton 1994.
10. Hartwick R. A.: *Introduction to Capillary Electrophoresis*. CRC Press, Boca Raton 1994.
11. Landers J. P. (Ed.): *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC Press, Boca Raton 1994.

12. Coleman D. (Ed.): *Directory of Capillary Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdam 1994.
13. Baker D. R.: *Capillary Electrophoresis*. Wiley, New York 1995.
14. Altria K. D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Instrumentation, Operation and Applications*. Humana Press, Totowa 1995.
15. Righetti P. G. (Ed.): *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton 1995.
16. Boček P., v knize: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod* (Churáček J. a kol., ed.), str. 100. Academia, Praha 1993.
17. Kašíčka V., Prusík Z., v knize: *Encyclopedia of Analytical Science* (Townshend A. et al., ed.), str. 1096. Academic Press, London 1995.
18. Kuhr W. G., Monnig C. A.: *Anal. Chem.* **64**, 389R (1992).
19. Reijenga J. C.: *J. Radioanal. Nuclear Chem.* **163**, 155 (1992).
20. Landers J. P., Oda R. P., Spelsberg T. C., Nolan J. A., Ulfelder K. J.: *BioTechniques* **14**, 98 (1993).
21. Monnig C. A., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* **66**, 280R (1994).
22. Knox J. H.: *J. Chromatogr. A* **680**, 3 (1994).
23. Issaq H. J., Janini G. M., Chan K. C., El Rassi Z.: *Adv. Chromatogr.* **55**, 101 (1995).
24. St. Claire R. L.: *Anal. Chem.* **68**, 569R (1996).
25. Camilleri P.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 1851.
26. Hjertén S.: *Methods Enzymol.* **270**, 296 (1996).
27. Bernstein L.: *Zahlenwerte und Funktionen*, Bd. 2, Teil 7. Springer Verlag, Berlin 1960.
28. Hirokawa T., Nishino N., Aoki N., Kiso Y., Sawamoto Z., Yagi T., Akiyama J. L.: *J. Chromatogr.* **277**, D1 (1983).
29. Rickard E. C., Strohl M. M., Nielsen R. G.: *Anal. Biochem.* **797**, 197 (1991). *Dynamics of*
30. Basak S. K., Ladisch M. R.: *Anal. Biochem.* **226**, 51 (1995).
31. Chae K. S., Lenhoff A. M.: *Biophys. J.* **68**, 1120 (1995).
32. Han S. P., Yang S. M.: *J. Colloid Interface Sci.* **777**, 132 (1996).
33. Micinski S., Gronvald M., Compton B. J.: *Methods Enzymol.* **270**, 342 (1996).
34. Lee C. S., Wu C. T., Lopes T., Patel B.: *J. Chromatogr.* **559**, 133 (1991).
35. Ghowasi K., Gale R. J.: *J. Chromatogr.* **559**, 95 (1991).
36. Poppe H., Cifuentes A., Kok W. T.: *Anal. Chem.* **68**, 888 (1996).
37. Coufal P., Štulík K., Claessens H. A., Cramers C. A.: *J. High Resol. Chromatogr.* **77**, 325 (1994).
38. Gaš B., Štědrý M., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* **709**, 63 (1995).
39. Potoček B., Gaš B., Kenndler E., Štědrý M.: *J. Chromatogr. A* **709**, 51 (1995).
40. Thormann W., Caslavská J., Mosher R. A.: *Electrophoresis* **16**, 2016, (1995).
41. Tavares M. F. M., McGuffin V. L.: *Anal. Chem.* **67**, 3687 (1995).
42. Vacík J., v knize: *Electrophoresis - A Survey of Techniques and Applications*, part A - Techniques (Deyl Z., ed.), str. 1. Elsevier, Amsterdam 1979.
43. Beckers J. L.: *Electrophoresis* **16**, 1987 (1995).
44. Gebauer P., Boček P.: *Electrophoresis* **16**, 1999 (1995).
45. Giddings J. C.: *Separ. Sci.* **4**, 181 (1969).
46. Hjertén S.: *Electrophoresis* **11**, 665 (1990).
47. Beckers J. L.: *J. Chromatogr. A* **693**, 347 (1995).
48. Beckers J. L.: *J. Chromatogr. A* **696**, 285 (1995).
49. Beckers J. L.: *J. Chromatogr. A* **741**, 265 (1996).
50. Reijenga J. C., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* **659**, 403 (1994).
51. Reijenga J. C., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* **659**, 417 (1994).
52. Terabe S., Otsuka K., Ando T.: *Anal. Chem.* **57**, 834 (1985).
53. Reijenga J. C., Hutta M.: *J. Chromatogr. A* **709**, 21 (1994).
54. Quang C., Strasters J. K., Khaledi M. G.: *Anal. Chem.* **66**, 1646 (1994).
55. Yu L., Davis J. M.: *Electrophoresis* **16**, 2104 (1995).
56. Bier M., Palusinski O. A., Mosher R. A., Saville D. A.: *Science* **219**, 1281, (1983).
57. Dose E. V., Guichon G. A.: *Anal. Chem.* **63**, 1063 (1991).
58. Gaš B., Vacík J., Zelenský I.: *J. Chromatogr.* **545**, 225 (1991).
59. Mosher R. A., Saville D. A., Thormann W.: *The Electrophoresis*. VCH, Weinheim 1992.
60. Heinrich J., Wagner H.: *Electrophoresis* **13**, 44 (1992).
61. Ermakov S. V., Righetti P. G.: *J. Chromatogr. A* **667**, 257 (1994).
62. Mosher R. A., Zhang C. X., Caslavská J., Thormann W.: *J. Chromatogr. A* **776**, 17 (1995).
63. Grushka E., Mc Cormick R. M., Kirkland J. J.: *Anal. Chem.* **67**, 249 (1989).
64. Gaš B., *J. Chromatogr.* **644**, 161 (1993).
65. Bello M. S., Levin E. I., Righetti P. G.: *J. Chromatogr. A* **652**, 329 (1993).
66. Knox J. H., McCormack K. A.: *Chromatographia* **38**, 207 (1994).
67. Schure M. R., Lenhoff A. M.: *Anal. Chem.* **65**, 3024 (1993).



68. Bello M. S., Zhukov M. Y., Righetti P. G.: *J. Chromatogr. A* 693, 113 (1995).
69. Gaš B., Kenndler E., Rizzi A., Štědrý M.: *Electrophoresis* 7(5), 958 (1995).
70. Štědrý M., Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 16, 2027 (1995).
71. Xu X., Kok W. T., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 742, 211 (1996).
72. Grushka E.: *J. Chromatogr.* 559, 81 (1991).
73. Schure M. R., Murphy R. E.: *Electrophoresis* 16, 2074 (1995).
74. Kašička V., Prusík Z., Gaš B., Štědrý M.: *Electrophoresis* 16, 2034 (1995).
75. Hjertén S.: *Chromatogr. Rev.* 9, 122 (1967).
76. Virtanen R.: *Acta Polytech. Scand. Chem.* 123, 1 (1974).
77. Mikkers F. E. P., Everaerts F. M., Verheggen T. P. E. M.: *J. Chromatogr.* 769, 11 (1979).
78. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
79. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Science* 222, 266 (1983).
80. Everaerts F. M., Beckers T. L., Verheggen T. P. E. M.: *Isoataphoresis, Theory, Instrumentation and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
81. Vacík J., v knize: *Nové směry v analytické chemii* (Zýka J. a kol., ed.), str. 9. SNTL, Praha 1983.
82. Boček P., Deml M., Gebauer P., Dolník V.: *Analytická kapilární izotachografie*. Academia, Praha 1987.
83. Boček P., Deml M., Gebauer P., Dolník V.: *Analytical Isotachophoresis*. VCH, Weinheim 1988.
84. Oshurkova O. V., Gorshkov A. I.: *Russ. Chem. Reviews* 62, 729 (1993).
85. Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: *Methods Enzymol.* 270, 375 (1996).
86. Garfin D. E.: *Methods Enzymol.* 182, 459 (1990).
87. Hjertén S., Zhu M.: *J. Chromatogr.* 347, 265 (1985).
88. Hjertén S., Liao J. L., Yao K.: *J. Chromatogr.* 387, 127 (1987).
89. Schwer C.: *Electrophoresis* 16, 2121 (1995).
90. Pritchett T. J.: *Electrophoresis* 77, 1195 (1996).
91. Wehr T., Zhu M., Rodriguez-Diaz R.: *Methods Enzymol.* 270, 358 (1996).
92. Mazzeo J. R., Krull I. S.: *Anal. Chem.* 63, 2852 (1991).
93. Thormann W., Caslavská J., Molteni S., Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 589, 321 (1992).
94. Hjertén S.: *J. Chromatogr.* 270, 1 (1983).
95. Cohen A. S., Karger B. L.: *J. Chromatogr.* 397, 409 (1987).
96. Cohen A. S., Najarian D., Guttman A., Smith J. A., Karger B. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9660 (1988).
97. Baba Y., Matsuura T., Wakamoto K., Morita Z., Nishitsu Z., Tshako M.: *Anal. Chem.* 64, 1221 (1992).
98. Grossman P. D., Soane D. S.: *Biopolymers* 31, 1221 (1991).
99. Boček P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 73, 31 (1992).
100. Ganzler K., Greve K. S., Cohen A. S., Karger B. L., Guttman A., Cooke N.: *Anal. Chem.* 64, 2665 (1992).
101. Guttman A.: *Electrophoresis* 17, 1333 (1996).
102. Barron A. E., Blanch. H. W., Soane D. S.: *Electrophoresis* 75, 597 (1994).
103. Hubert S. J., Slater G. W., Viovy J. L.: *Macromolecules* 29, 1006 (1996).
104. Sudor J., Novotny M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9451 (1993).
105. Sudor J., Novotny M.: *Anal. Chem.* 66, 2446 (1994).
106. Heller C., Pakleza C., Viovy J. L.: *Electrophoresis* 16, 1423 (1995).
107. Kim Y., Morris M. D.: *Electrophoresis* 17, 152 (1996).
108. Hořejší V., Tichá M.: *J. Chromatogr.* 576, 49 (1986).
109. Breborowicz J., Mackiewicz A. (Eds.): *Affinity Electrophoresis: Principle and Application*. CRC Press, Boca Raton 1992.
110. Guttman A., Cooke N.: *Anal. Chem.* 63, 2038 (1991).
111. Shimura K., Kasai K.: *Anal. Biochem.* 227, 186 (1995).
112. Haupt K., Roy F., Vijayalakshmi M. A.: *Anal. Biochem.* 234, 149 (1996).
113. Mammen M., Gomez F. A., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 67, 3526 (1996).
114. Chu Y. H., Dunayevskiy Y. M., Kirby D. P., Vouros P., Karger B. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7827 (1996).
115. Terabe S.: *Trends Anal. Chem.* 8, 129 (1989).
116. Vindevogel J., Sandra P.: *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*. Hüthig, Heidelberg 1992.
117. Matsubara N., Terabe S.: *Methods Enzymol.* 270, 296 (1996).
118. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchia A., Ando T.: *Anal. Chem.* 56, 111 (1984).
119. Terabe S., Ozaki H., Otsuka K., Ando T.: *J. Chromatogr.* 322, 211 (1985).
120. Nishi H., Fukuyama T., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 553, 503 (1991).
121. Tanaka N., Fukutome T., Hosoya K., Kimata K., Araki T.: *J. Chromatogr. A* 716, 57 (1995).
122. Ozaki H., Ito N., Terabe S., Takada Y., Sakairi M., Koizumi H.: *J. Chromatogr. A* 716, 69 (1995).
123. Watarai H.: *Chem. Lett.* 7997, 391.
124. Terabe S., Matsubara N., Ishihama Y., Okada Y.: *J. Chromatogr.* 608, 23 (1992).

125. Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., Asakawa N.: Anal. Chem. 67, 1588 (1995).
126. Khaledi M. G., Smith S. C., Strasters J. K.: Anal. Chem. 63, 1820(1991).
127. Strasters J. K., Khaledi M. G.: Anal. Chem. 63, 2503 (1991).
128. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: J. Chromatogr. 218, 209 (1981).
129. Tsuda T., Nomura K., Nakagawa G.: J. Chromatogr. 248, 241 (1982).
130. Knox J. H., Grant H. I.: Chromatographia 24, 135 (1987).
131. Knox J. H., Grant H. I.: Chromatographia 32, 317 (1991).
132. Dittmann M. M., Wienand K., Bek F., Rozing G. P.: LC-GC 13, 800 (1995).
133. Tsuda T. (Ed.): *Electric Field Applications in Electrochromatography, Industrial and Chemical Processes*. VCH, Weinheim 1995.
134. Ross G., Dittmann M., Bek F., Rozing G.: Int. Lab. 10A, May 1996.
135. Kašička V., Prusík Z.: J. Chromatogr. 273 (1983) 117.
136. Prusík Z., Kašička V.: J. Chromatogr. 390 (1987) 39.

V. Kašička (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Theoretical Bases and Separation Principles of Capillary Electromigration Methods**

Theoretical bases of electromigration, electrophoretic mobility, and electroosmotic flow are presented, as well as mathematical modelling and computer simulation of electromigration methods. The principles of capillary electromigration separation techniques, zone electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, electrophoresis in sieving media, bioaffinity electrophoresis, electrokinetic chromatography, and electrochromatography are described.