

Kapilární Izotachoforéza

$$v = \mu \cdot E$$

v - rychlost iontu v elektickém poli

E - intenzita elektrického pole

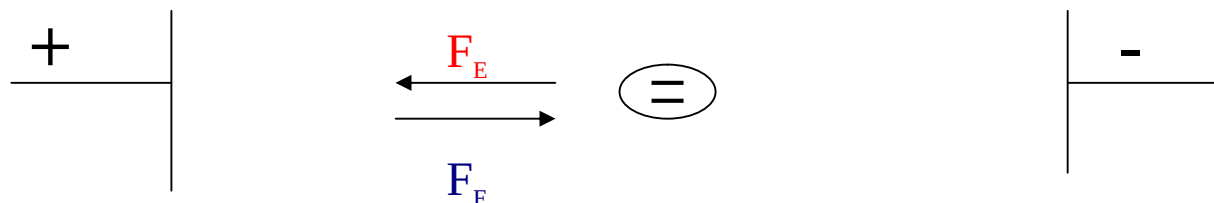
μ - elektroforetická pohyblivost

$$v = \mu \cdot E$$

v - rychlost iontu v elektrickém poli

E - intenzita elektrického pole

μ - elektroforetická pohyblivost



F_E - elektrická síla

$$F_E = Q \cdot E$$

Q - náboj iontu

E - intenzita elektrického pole

F_F - frikční síla

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

η - viskozita roztoku

r - poloměr iontu

v - rychlost iontu

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

$$F_E = F_F$$



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

$$v = \mu \cdot E$$



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

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 $\sim 10^{-8}$

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

Iontové pohyblivosti a pK_a vybraných látek (25 °C)

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

přepočet z dostupnějších limitních iontových vodivostí

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

λ - molární iontová vodivost

F - Faradayova konstanta (96487 C mol⁻¹)

|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

Skutečná pohyblivost - vliv vnějšího prostředí

vliv iontové síly - Onsagerova rovnice

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

$ \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%

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 μ :

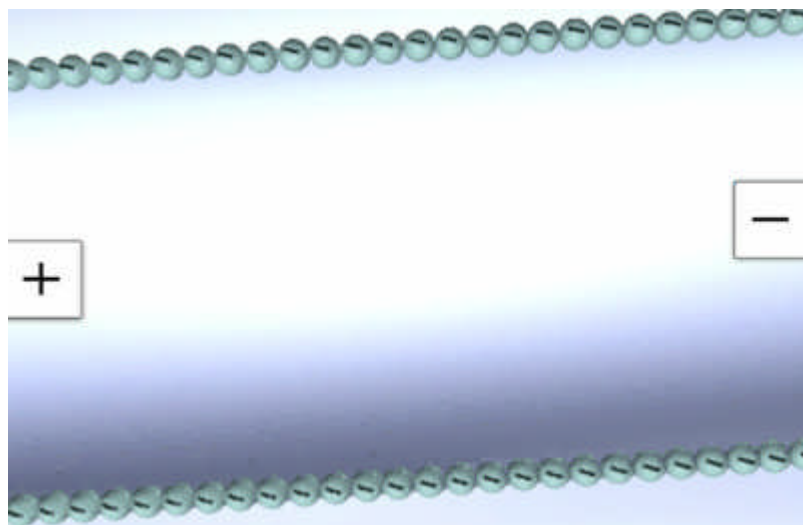
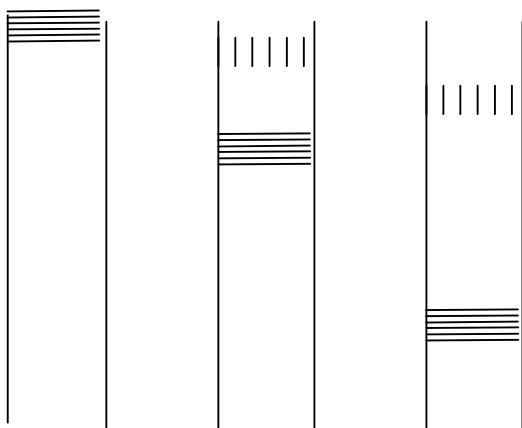
$$\bar{\mu} = \sum_i x_i \mu_i$$

x_i - molární zlomky jednotlivých forem látky

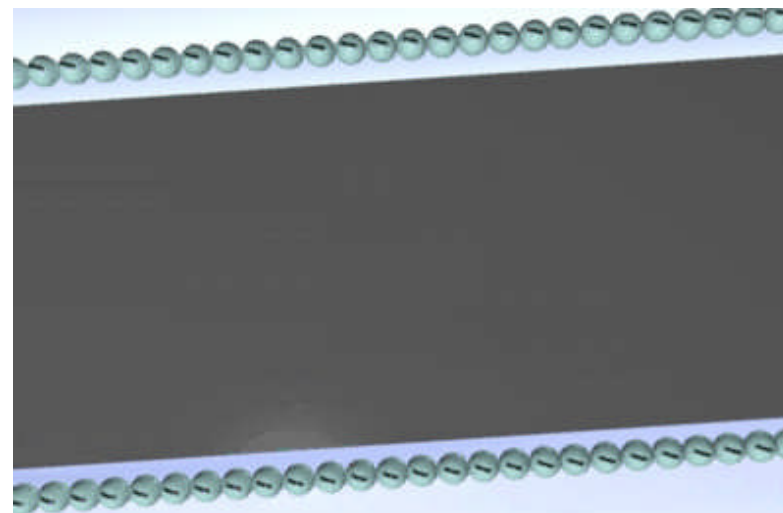
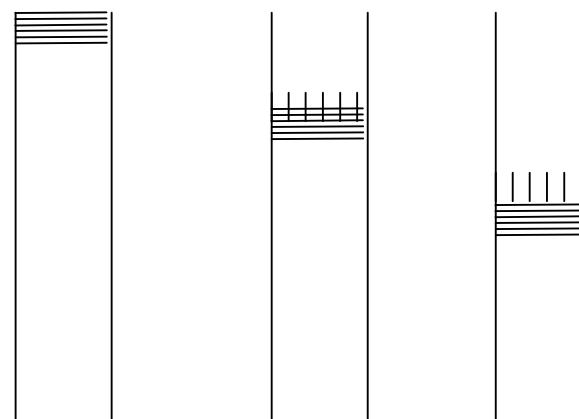
μ_i - iontové pohyblivosti jednotlivých forem látky

Princip metody

Zónová elektroforéza

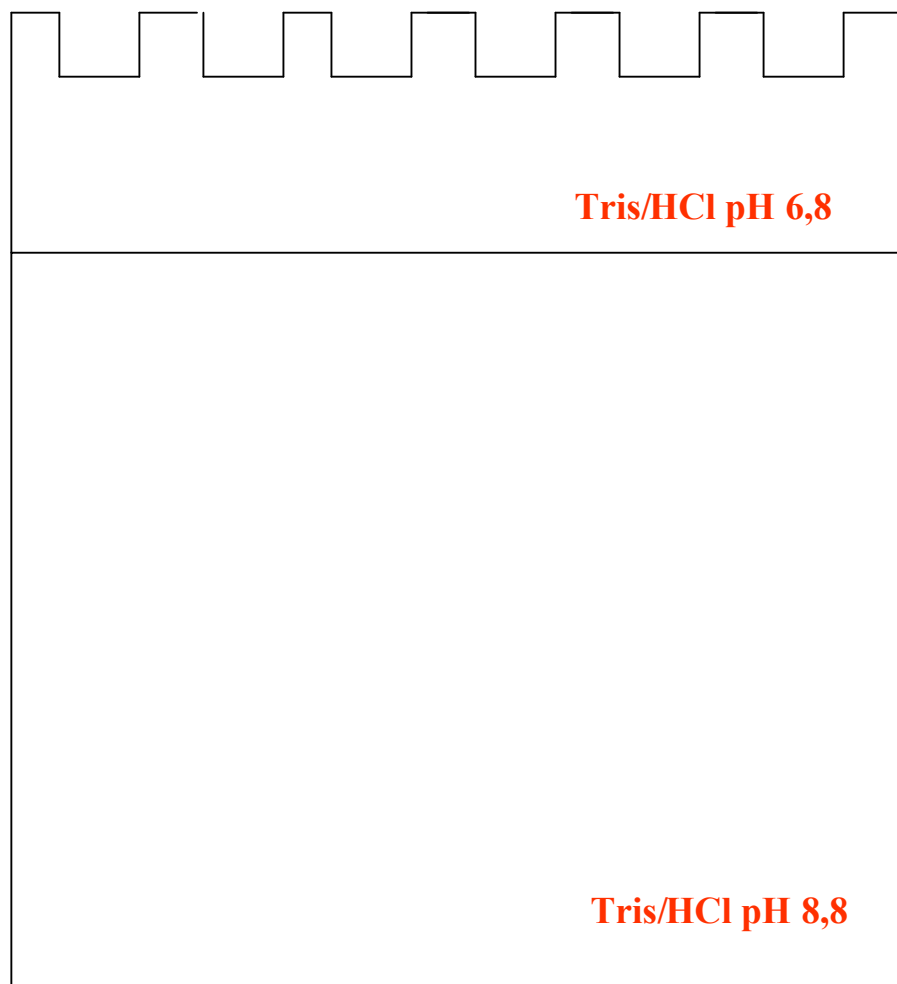


Izotachoforéza



Diskontinuální elektroforéza

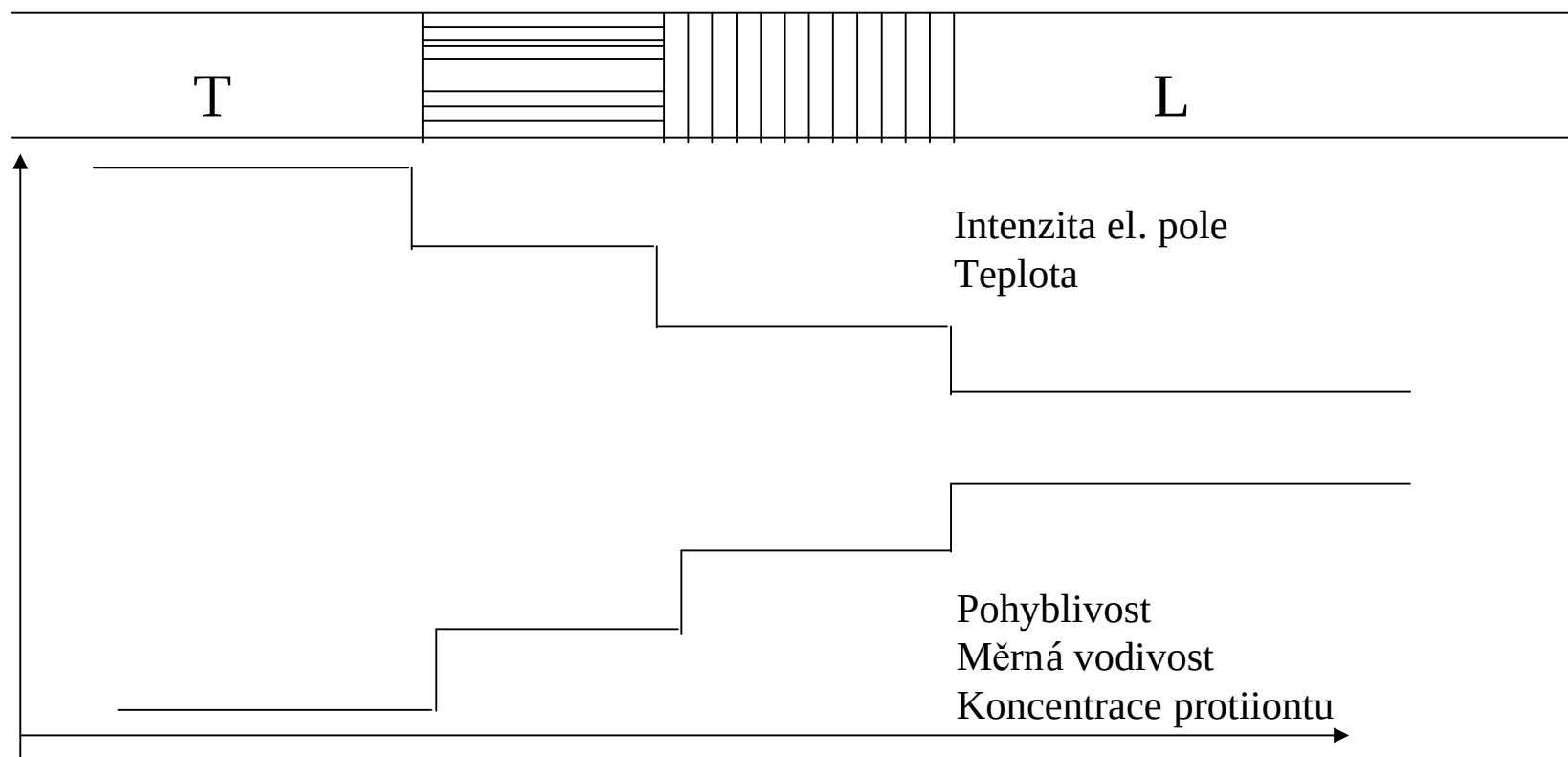
Tris/gly pH 8,8



Tris/gly pH 8,8

Vlastnosti izotachforetických 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

Historie

1897 – *Kohlrausch* - teoretické základy metody

1923 – *Kendall* - první pokusy separace látek na izotachforetickém 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

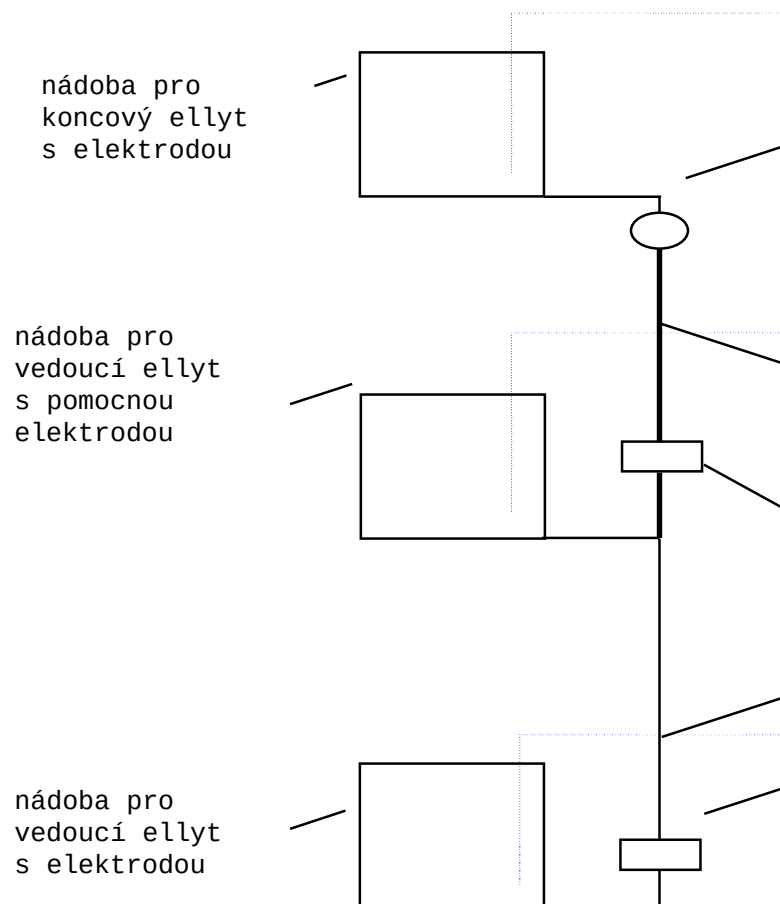
Další výrobci:

ITABA, Švédsko (**Tachophor Delta**)

JZD Odra Krmelín (**Agrofor**)

EA 100

Instrumentace



Villa LABECO, Spišská nová ves, Slovensko

Detektory

Vodivostní

Rozsah 30 k Ω - 20 M Ω

Detekční limit 1 x 10⁻¹⁰ M

Fotometrický

254, 289 nm (405)

detekční limit 5 x 10⁻¹² 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 μ l)

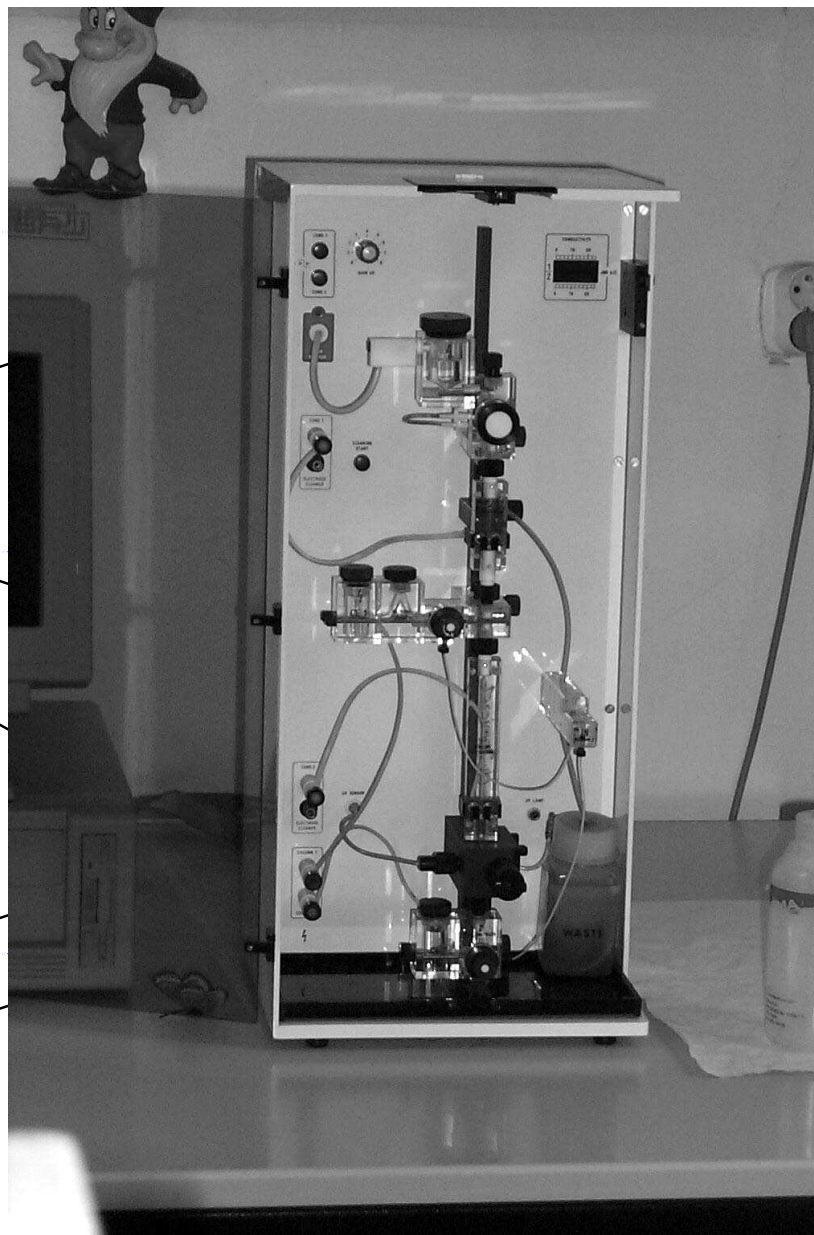
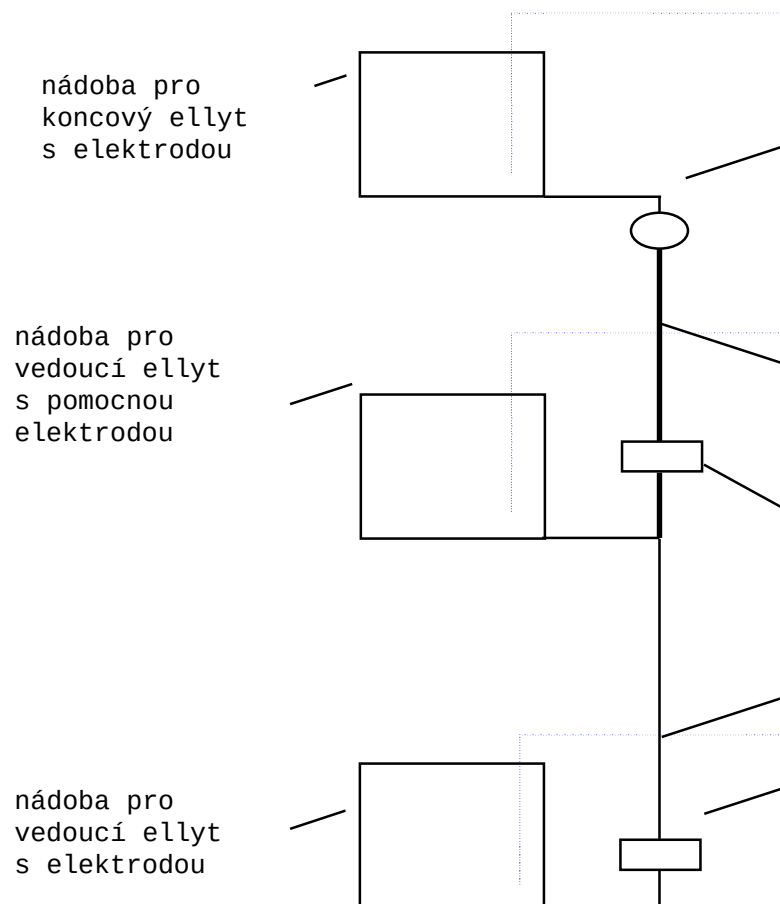
Možnost práce v roztocích s metanolem (do 30%)

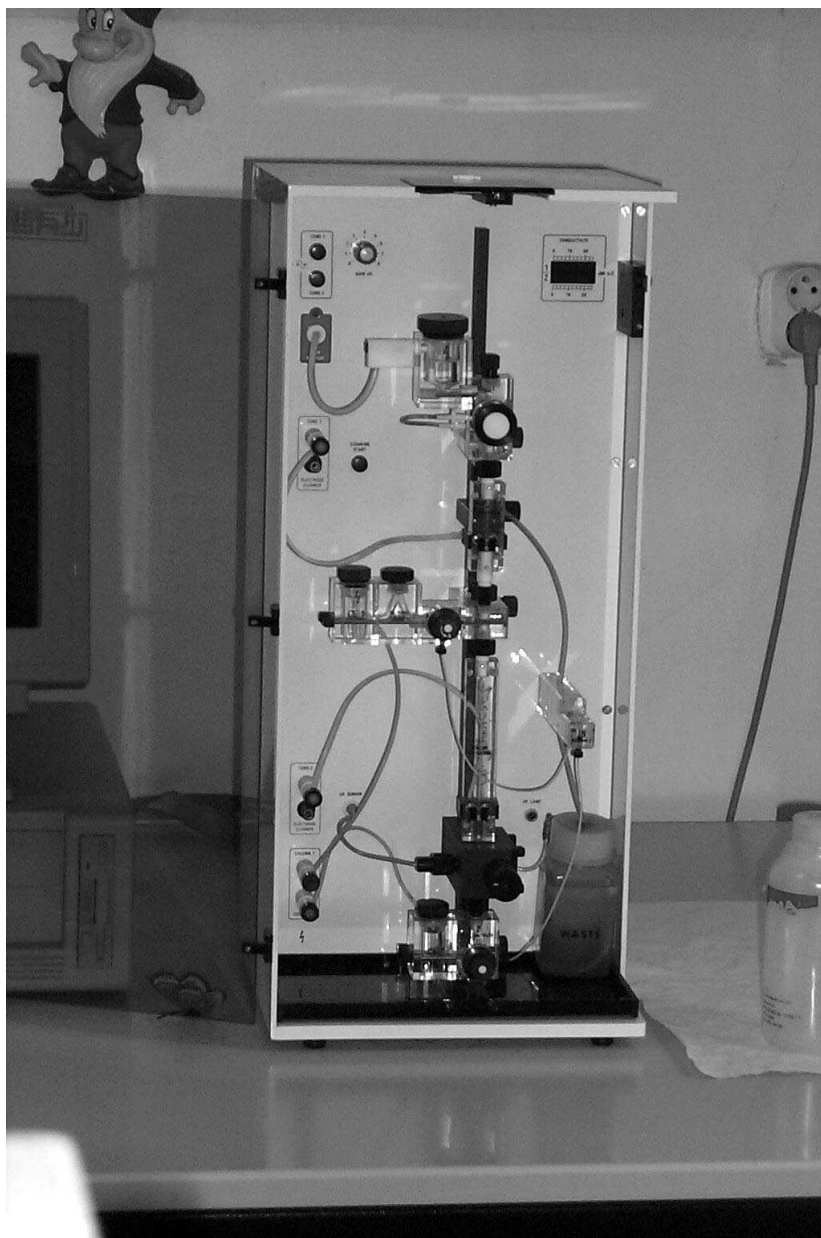
Maximální napětí 15 KV

Maximální proud 500 μ A

EA 100

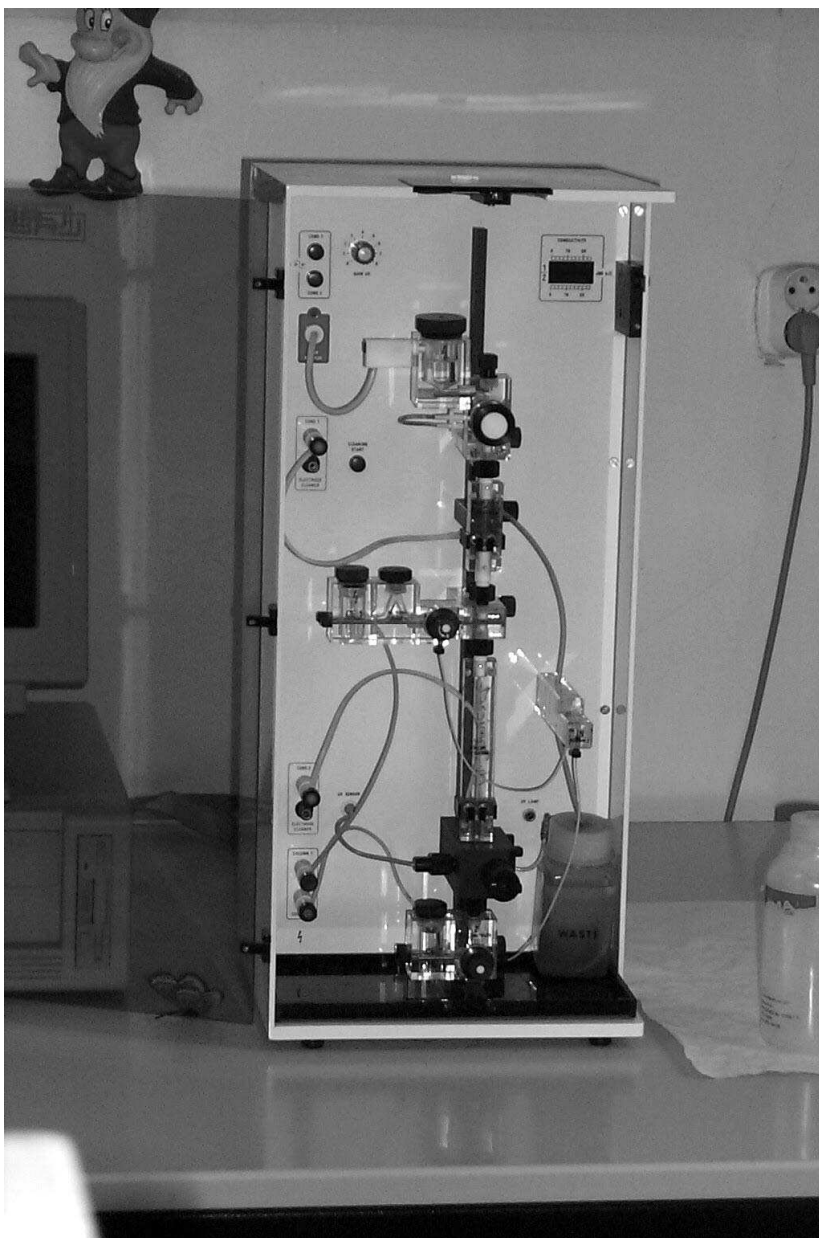
Instrumentace





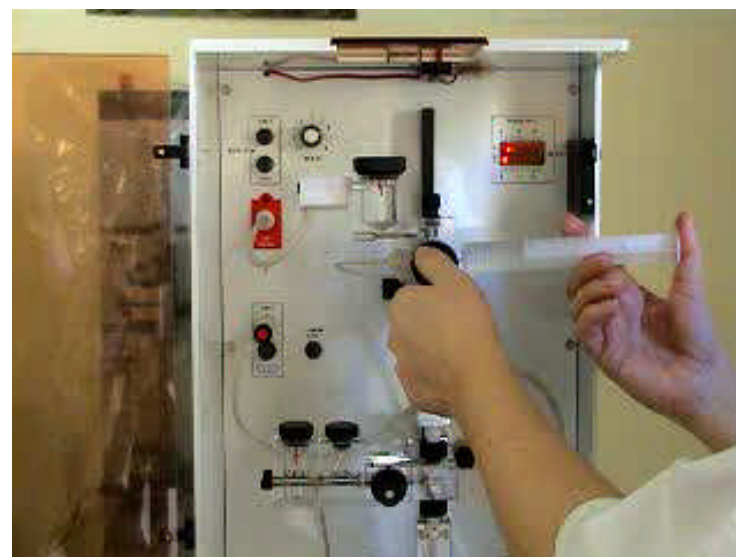
Promytí systému vodícím ellytem

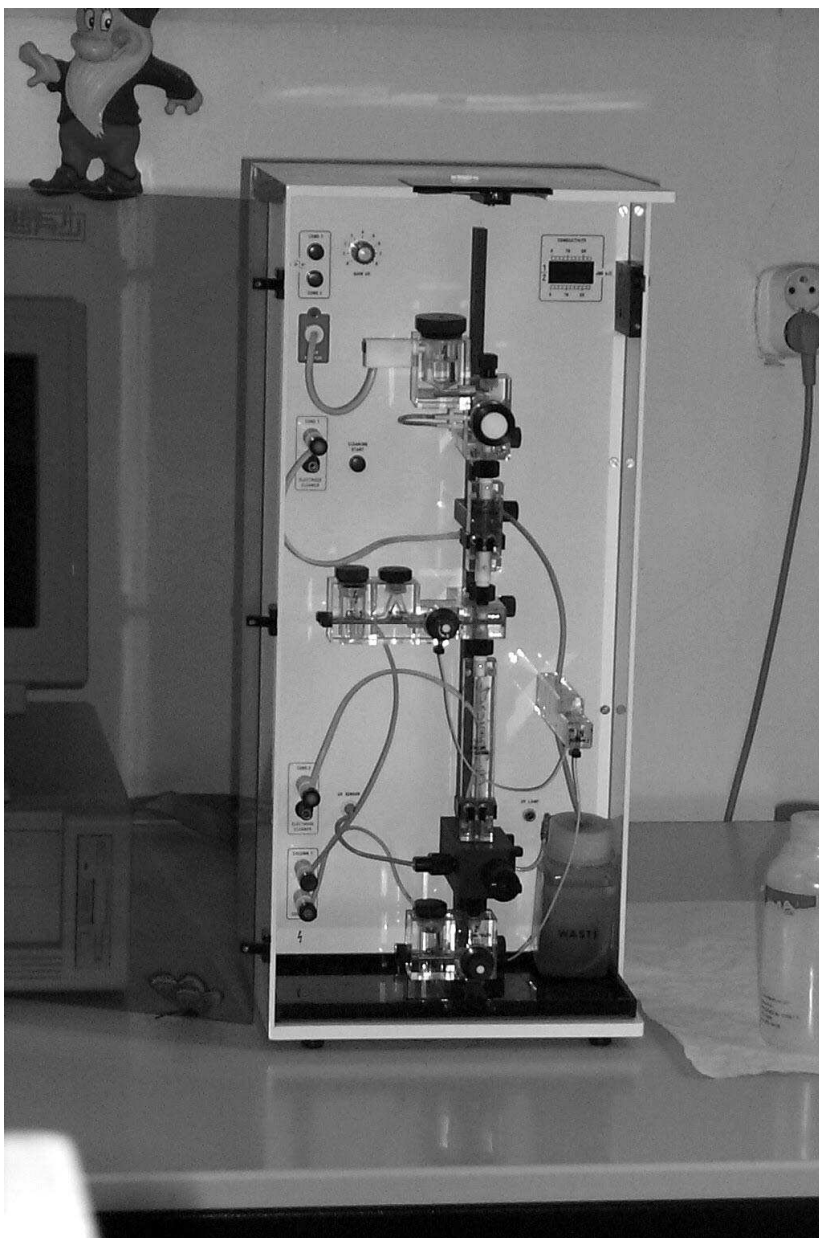




Promytí systému vodícím ellytem

Promytí nanášecího ventilu a prostoru pro koncový ellyt



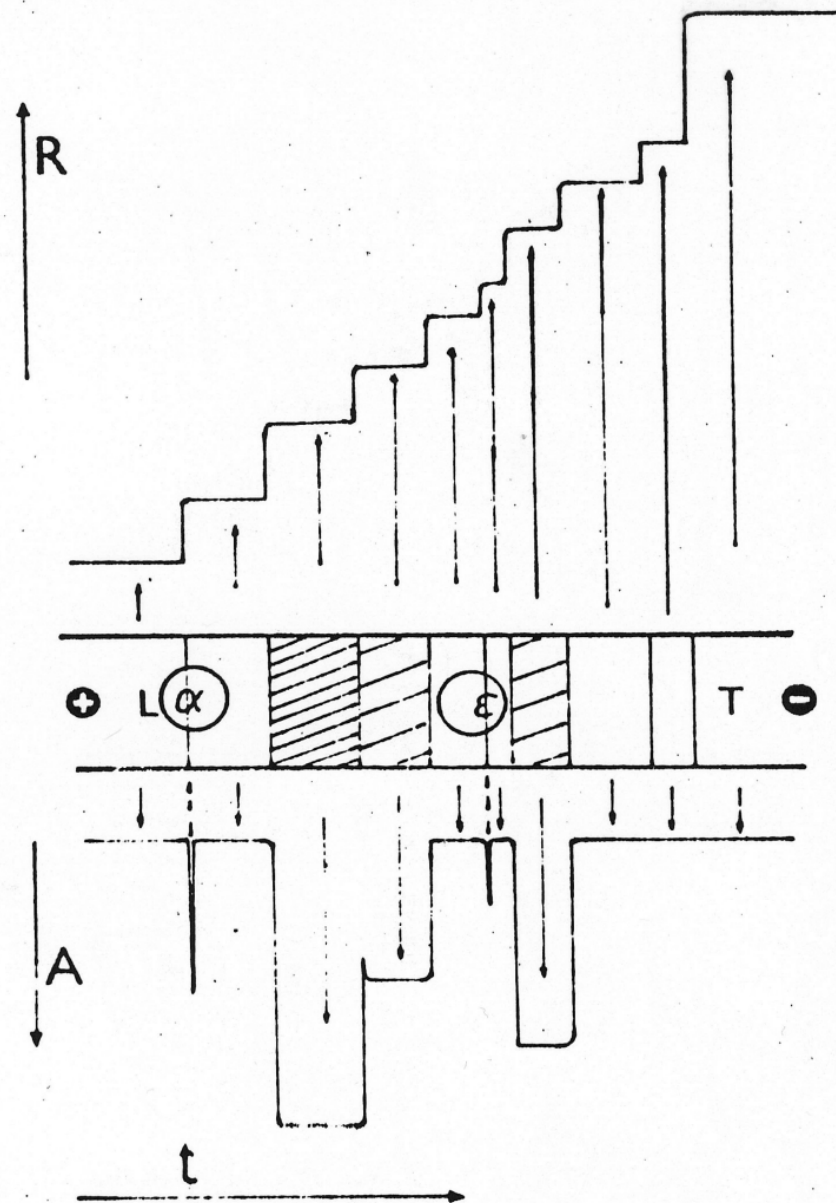
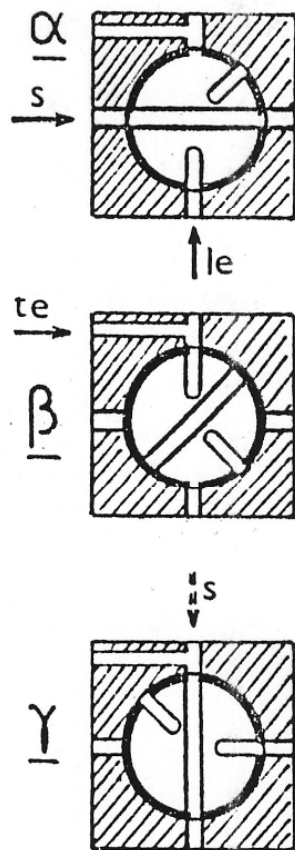
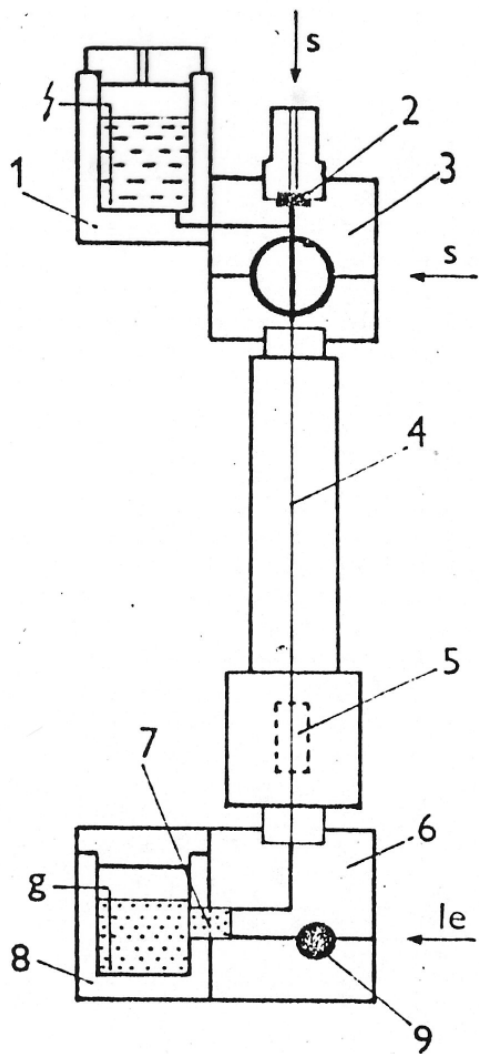


Promytí systému vodícím ellytem

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 Pb^{2+} či Ag^+ x 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

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

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

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

Analogická situace je u slabých bazí:

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

	Kationtová ITP	Aniontová ITP
vedoucí ion	K^+, NH_4^+, Na^+	Cl^-
terminátor	Slabá báze	Slabá kyselina
Protiion	Slabá kyselina	Slabá báze
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 ₃
β -alanin	9,8 – 10,8	NH ₃ , 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) ₂ Asparagin + Ba(OH) ₂
Ammediol	8,3 – 9,3	Glycin + Ba(OH) ₂ EACA + Ba(OH) ₂
ethanolamin	9,0 – 10,0	EACA + Ba(OH) ₂

Jevy provázející separaci

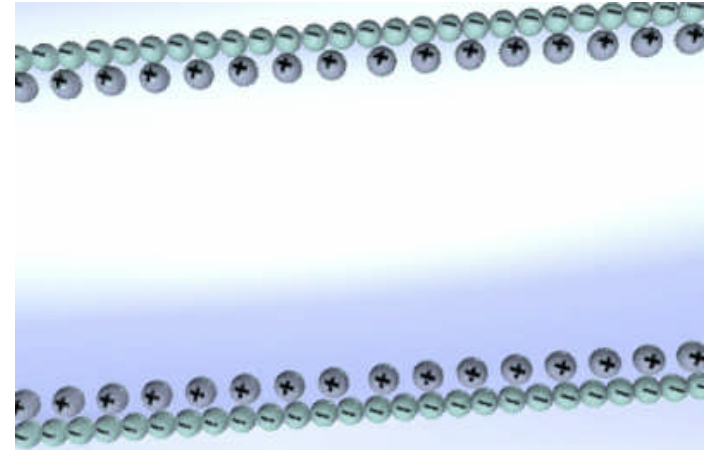
Elektroosmotický tok

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

ε - permitivita roztoku

η - viskozita roztoku

ξ - elektrokinetický potenciál (zeta potenciál)



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, polyetylenglykol, 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 μ 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_0 – termostatovací teplota

Kvociet 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) $q = 1,36 \text{ KmW}^{-1}$

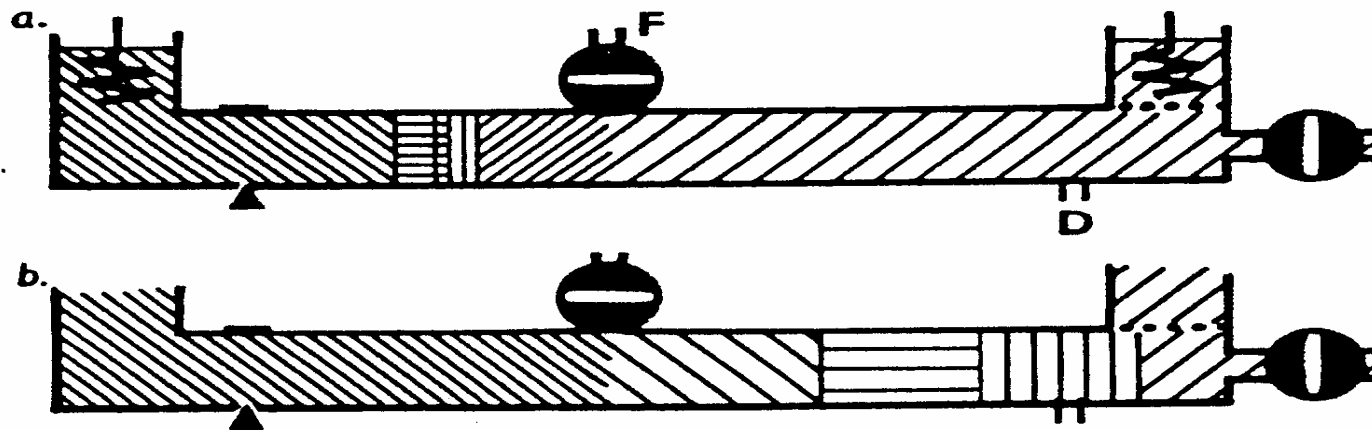
Gravitace

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

Koncentrační kaskáda

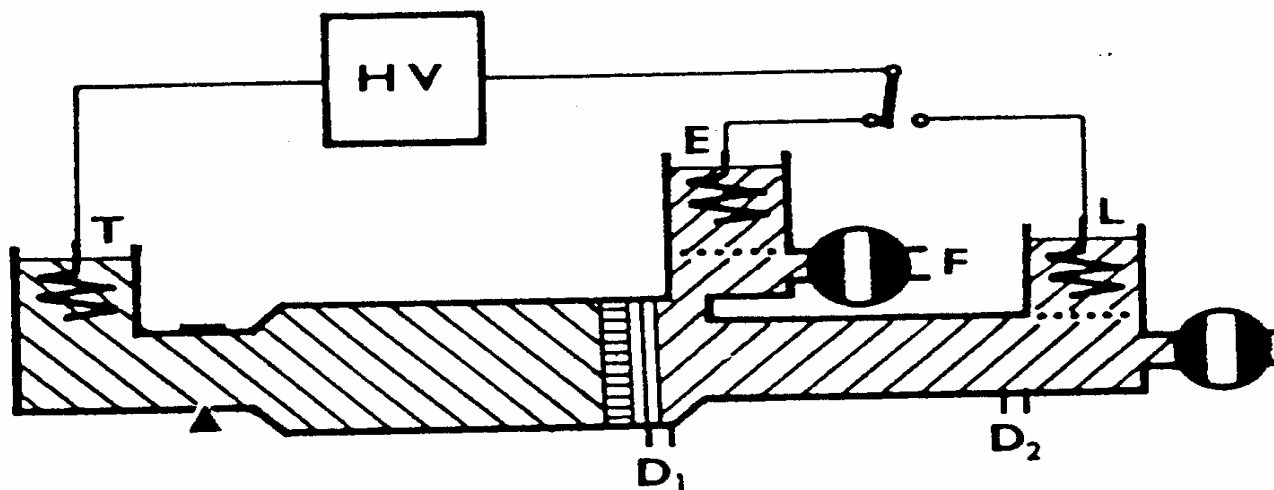


$$c_X = c_L \cdot \frac{\mu_X}{\mu_X + |\mu_R|} \cdot \frac{\mu_L + |\mu_R|}{\mu_L}$$

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

Technika spojování kolon



metoda pro eliminaci balastních složek vzorku
možná kombinace s koncentrační kaskádou

Villa LABECO:

Předseparační kolona

Délka 90 a 160 mm

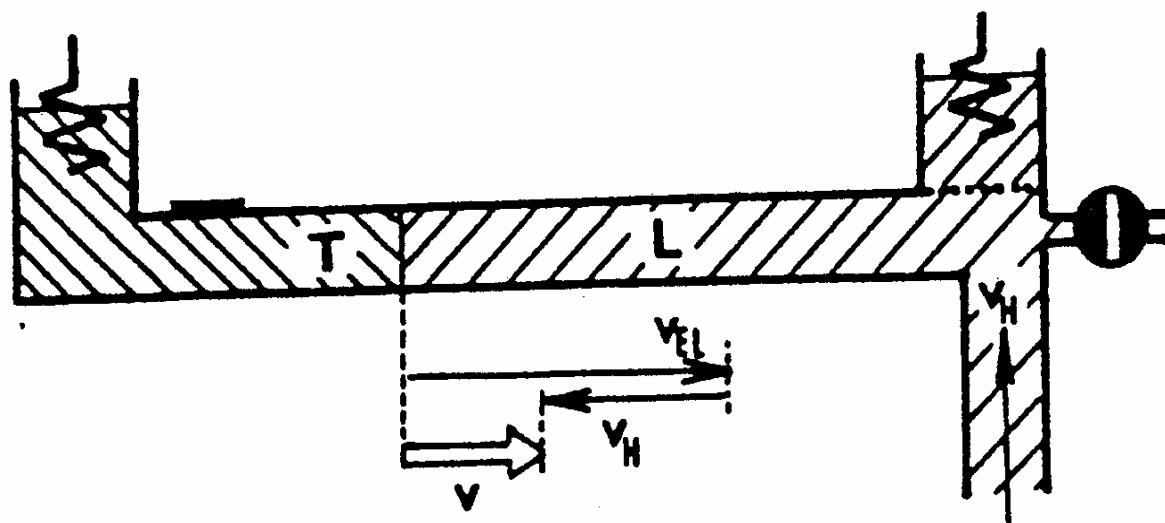
Průměr 0.8 mm

Separační kolona

Délka 90 a 160 mm

Průměr 0.3 mm

Izotachoforesa s protiproudem vedoucího elektrolytu

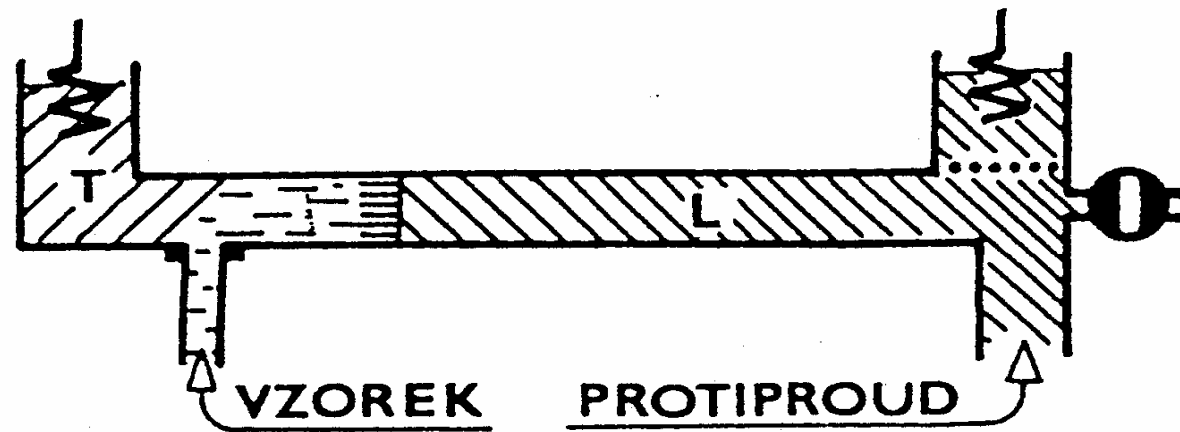


původní rychlost v_{EL} se snižuje o rychlost toku protiproudu v_H na rychlost v

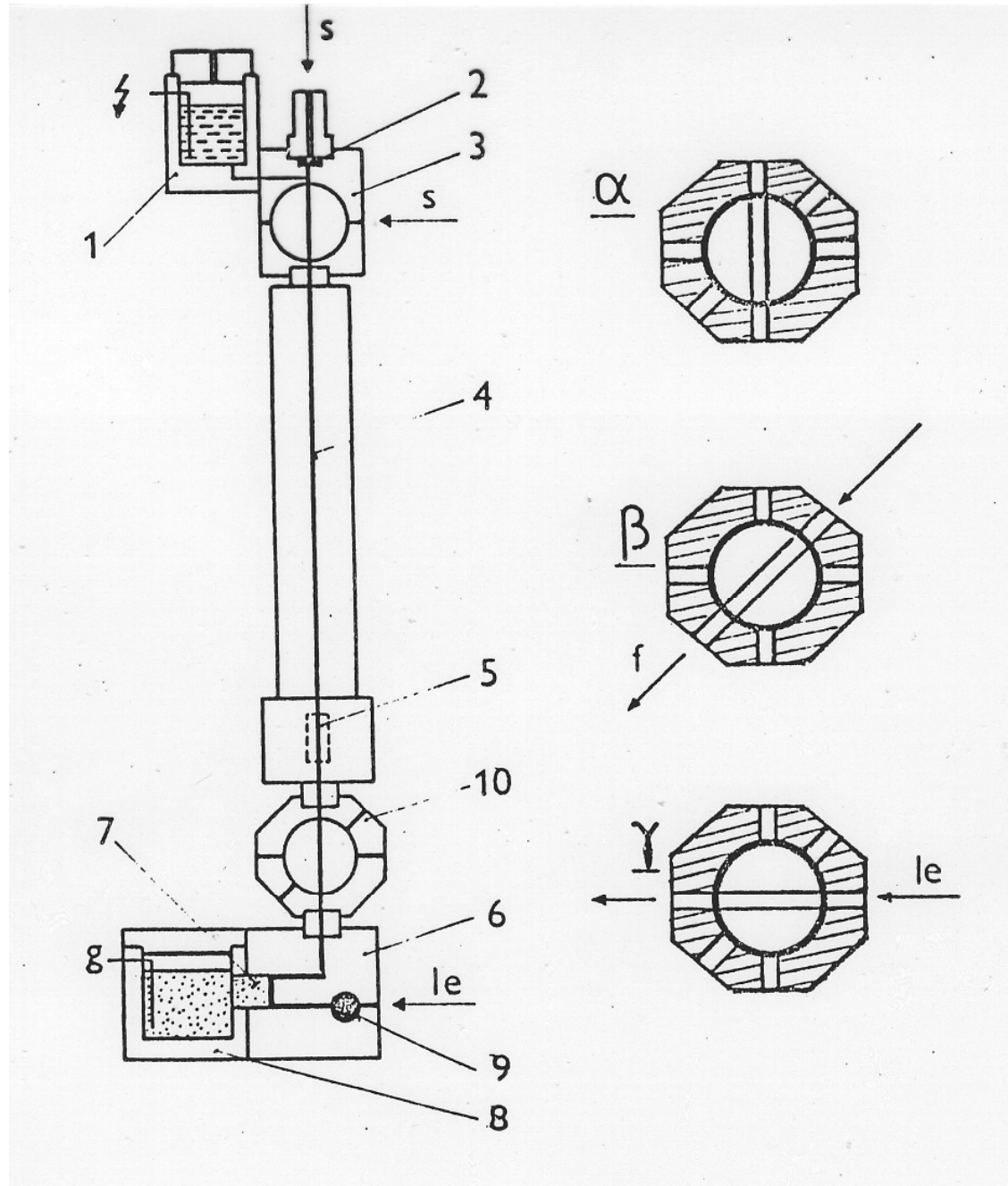
metoda zvyšuje migrační dráhu zón (separační kapacitu)

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

Technika kontinuálního dávkování



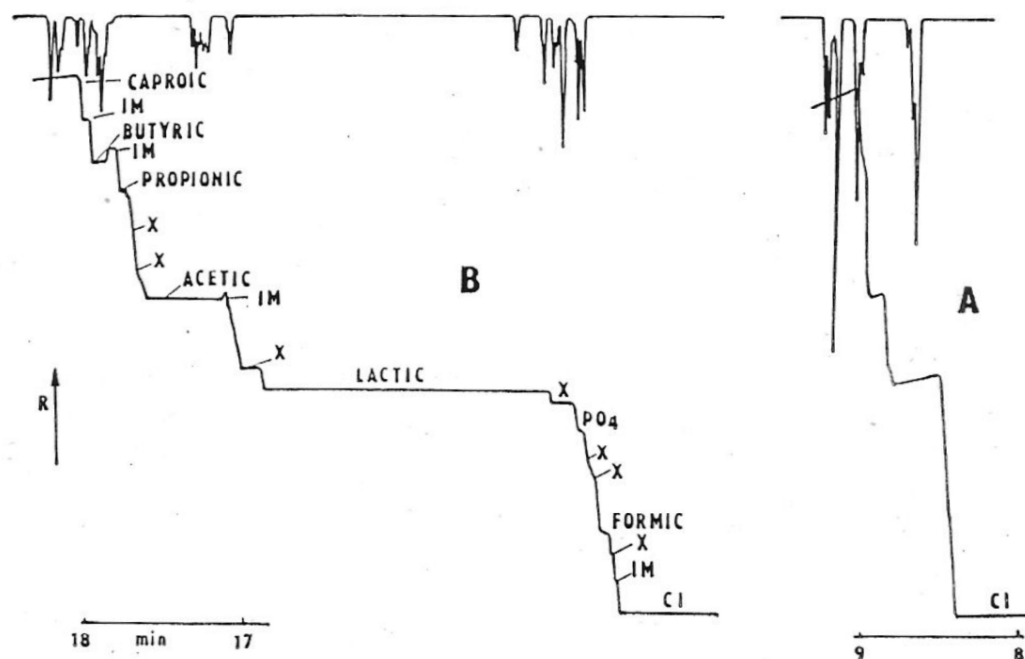
protiproud nastaven tak, aby vykompenzoval elektromigrační pohyb zón
metoda slouží k zakoncentrování velkých objemů naředěných vzorků
vlastní separace pak probíhá bez protiproudu



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.



Isotachopherogram of silage extract

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

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

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 ϵ -aminocaproic acid + 0,1% methylhydroxyethylcellulose /MHEC/

terminating electrolyte :

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

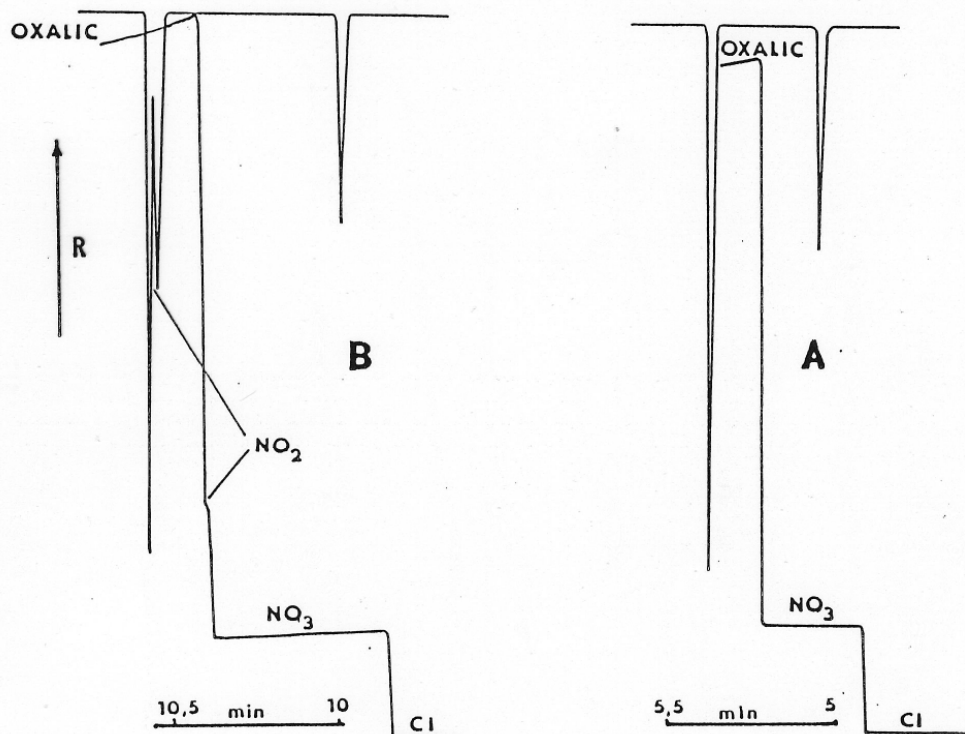
Sample : 100 g of silage extracted in 900 ml of water / 16 hour / , diluted 1: 250

V = 30 μl

DETERMINATION of NITRATES and NITRITES in VEGETABLES

MAIN FEATURES :

Isotachophoresis 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 NaNO₃ and 3.7 mg NaNO₂ in 1 kg of the sample
 A - preseparation column B - analytical column

Operational conditions :

leading electrolyte :

preseparation column : 8×10^{-3} M Cl⁻ + 1.5×10^{-3} M Ba²⁺ + β -alanine + 0.1% HEC ; pH = 4.0
 analytical column : 4×10^{-3} M Cl⁻ + 1×10^{-3} M Ba²⁺ + β -alanine ; pH=4.0

terminating electrolyte :

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

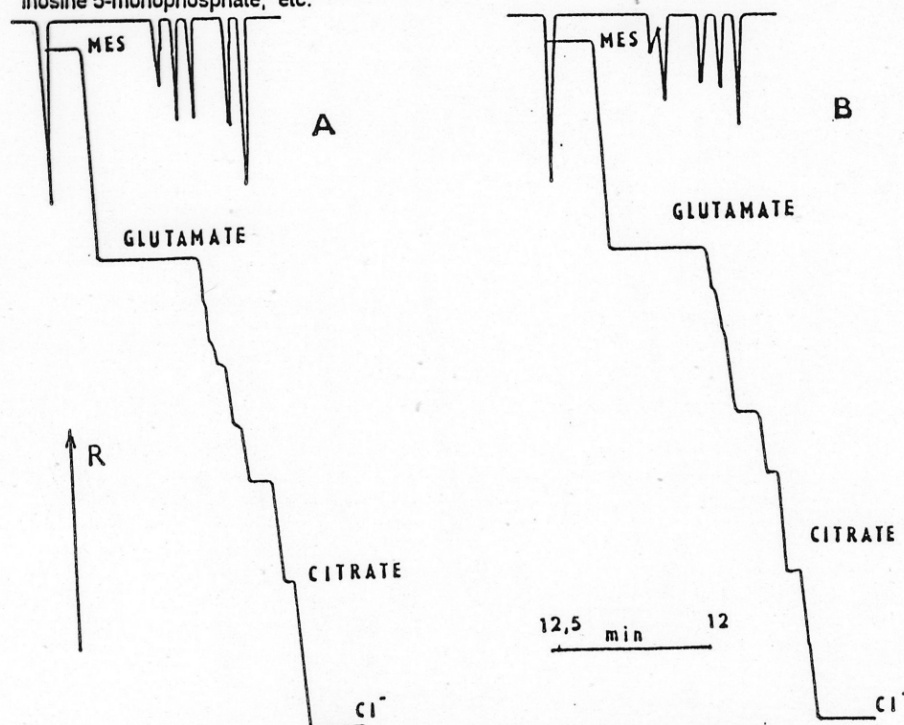
V = 30 μ l ; I₁ = 200 μ A ; I₂ = 15 μ A

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.



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

Operational conditions :

leading electrolyte :

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

terminating electrolyte :

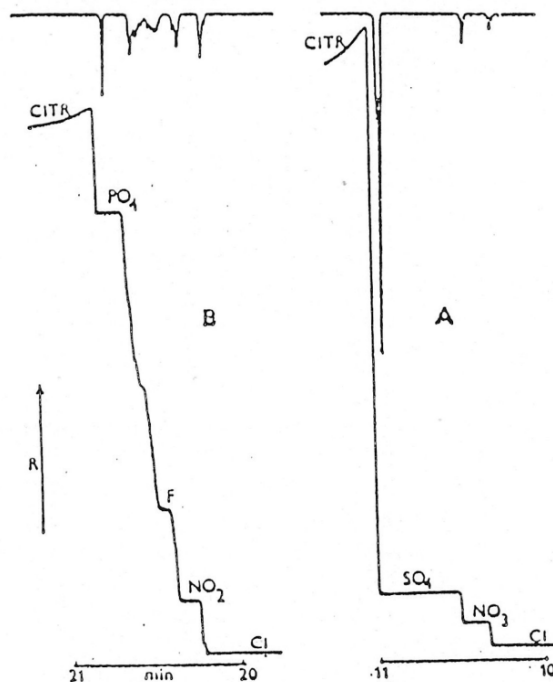
$5 \cdot 10^{-3}$ M morpholinethanesulfonic acid

V = 30 μ l

ANALYSIS of DRINKING and SURFACE WATER

MAIN FEATURES :

Isotachophoresis was applied to identify and quantify simultaneously the most frequently determined macrocomponents (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) and microcomponents (NO_2^- , F^- , PO_4^{3-}) in water. It is possible to determine another ionogenic components. Precision and accuracy of results are better than classical methods.



Isotachopherograms 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 / : Cl^- - 41,9; NO_3^- - 38,7; SO_4^{2-} - 93,7

NO_2^- - 0,89; F^- - 0,16; PO_4^{3-} - 1,01

Conditions : leading electrolyte :

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

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

terminating electrolyte :

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

$V = 30 \mu\text{l}$

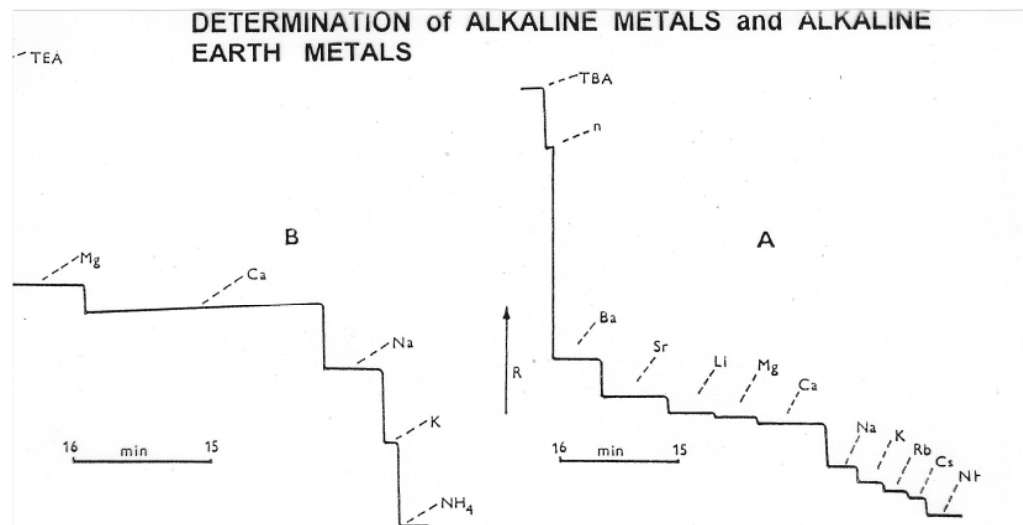


Fig. 1. Isotachophoreograms of analysis from analytical column :

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 NH₄⁺ + acetic acid, pH=5; dissolution : H₂O : PEG 55 : 45 /vol./ + 0,2% HEC

terminating electrolyte :

$3 \cdot 10^{-2}$ M TBAClO₄, dissolution : H₂O, resp. /B/ $3 \cdot 10^{-3}$ M TEAClO₄, dissolution : H₂O

$I_1 = 250 \mu A$, $I_2 = 50 \mu A$, $V = 30 \mu l$

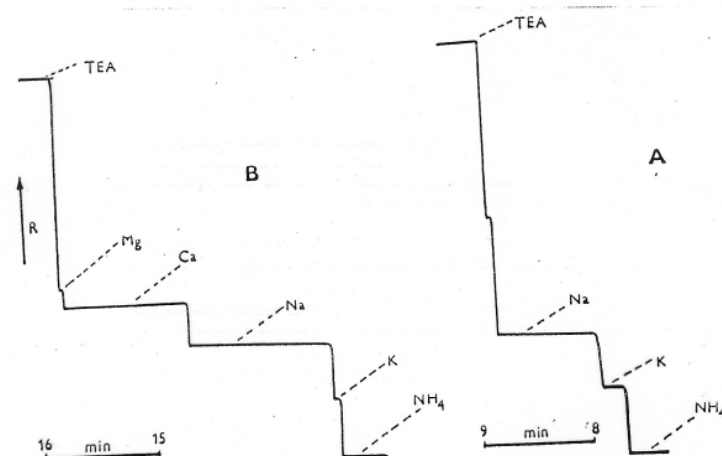


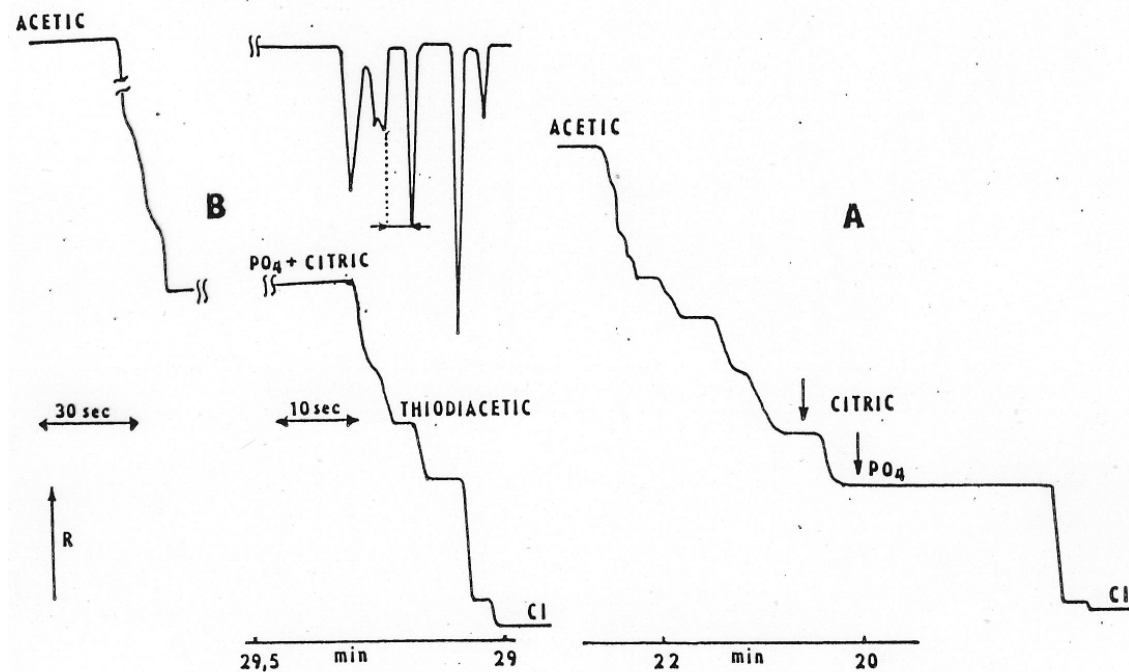
Fig. 2. Isotachophoreogram of urine analysis :

A - preseparation 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.



Isotachopherograms 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 :

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

$V = 5 \mu l$ (urine)