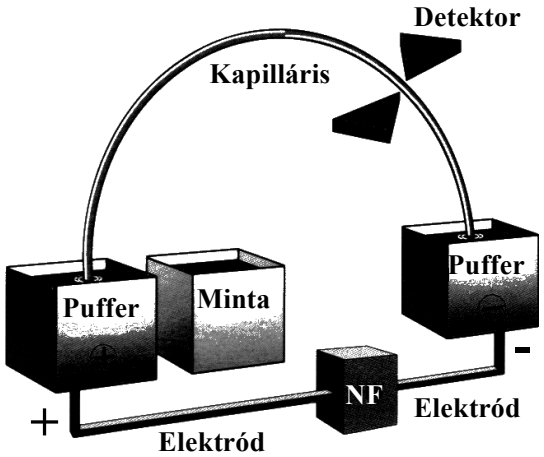
1. A MÓDSZER RÖVID ÁTTEKINTÉSE

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. A kapilláris elektroforézisnél (capillary electrophoresis, CE) az elektroforézis egy vékony, általában 25-75 μm belső átmérőjű, puffer oldattal töltött kapillárisban történik. A kapilláris alkalmazásának számos előnye van, így például az, hogy a kapilláris nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő (100-500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. Ezenkívül a fejlődött hő (Joule-hő) a kapilláris nagy felület/térfogat aránya miatt jól eloszlik. A nagy elektromos térerő használata rövid mérési időt, valamint nagy elválasztási hatékonyságot és felbontást biztosít. Az elméleti tányérszám a kapillárison belüli elektroozmotikus áramlás dugószerű profiljának köszönhetően sok esetben meghaladja a 10^5 értéket. Az elektroozmotikus áramlás lehetővé teszi valamennyi oldott részecske egyidejű vizsgálatát, tekintet nélkül a részecske töltésére. A CE minimális mintamennyiséget (1-10 nl) igényel, könnyen automatizálható. A módszer egyik legnagyobb előnye a lehetséges alkalmazások rendkívül széles köre. Míg a kapilláris elektroforézist eleinte csak biológiai makromolekulák vizsgálatához használták, ma már használják aminosavak, királis vegyületek, vitaminok, peszticidek, szervetlen ionok, szerves savak, peptidek és fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok és DNS részek, de még egész sejtek és vírusok elválasztásához és meghatározásához is. Mivel az elektroforézises, illetve a kromatográfiás elválasztások mechanizmusai eltérnek, így e vizsgálatok kölcsönösen kiegészíthetik egymást. Ezenkívül a CE egyszerűbb módszerfejlesztést, minimális oldat mennyiségekkel és gyakorlatilag szerves oldószerektől mentes munkát tesz lehetővé. Ezen előnyök és lehetőségek következtében a CE-nek jó esélye van arra, hogy rövid időn belül az elsőszámú elválasztási technikává váljon. Mindazonáltal, a CE még nem tekinthető teljes egészében kidolgozott módszernek (például a HPLC-hez képest) sem a módszer elmélete, sem az alkalmazási lehetőségek tekintetében.

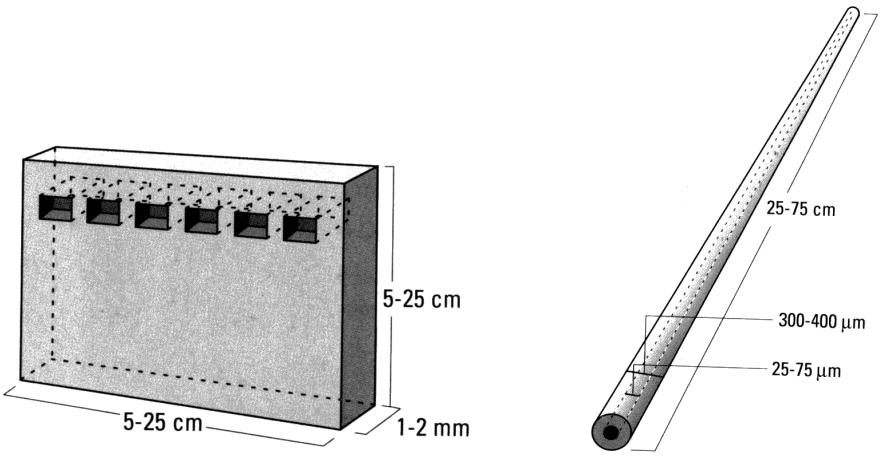


1. ábra A CE készülék vázlatos elrendezése

A CE egyik legfontosabb jellemzője a készülék felépítésének egyszerűsége. Az 1. ábrán egy tipikus kapilláris elektroforézis készülék vázlatos elrendezése látható. Egy vékony, puffer oldattal töltött kvarc kapilláris végei puffer oldatokba merülnek. A puffert tartalmazó edényekben találhatók a nagyfeszültségű tápegység és a kapilláris közötti elektromos vezetést biztosító elektródok is. A minta bevitele a kapillárisba egy (általában az anódnál lévő) pufferes edénynek a mintát tároló edénnyel való kicserélésével és ezt követően külső nyomás vagy elektromos tér egyidejű alkalmazásával történik. A pufferes edény visszahelyezése után elektromos tér alkalmazása miatt a minta egyes komponensei elválnak. A komponensek optikai detektálása leggyakrabban a kapilláris másik vége közelében, közvetlenül a kapilláris falán keresztül történik.

2. TÖRTÉNETI HÁTTÉR

Az elektroforézis a töltéssel rendelkező részecskéknek (ionoknak) az elektromos térben való vonzó és taszító kölcsönhatások által kiváltott különböző mértékű elmozdulásaiként határozható meg. Az elektroforézist, mint elválasztási technikát Tiselius 1937-ben vezette be. Amikor különböző fehérjéket tartalmazó oldatot helyezett egy, a végeinél puffer oldatokkal érintkező csőbe, és elektromos feszültséget kapcsolt a cső végeire, azt találta, hogy a minta komponensei töltésüktől és mozgékonyságuktól függően különböző sebességgel különböző irányokba vándoroltak. Munkájáért Tiseliusnak később Nobel-díjat adományoztak.
Amint azt Tiselius is tapasztalta, oldatokban az elválasztás hatékonyságát korlátozza a hődiffúzió és a hőátvitel. Ezért az elektroforézist többnyire rossz hőátvitelű közegben (pl. poliakrilamid vagy agaróz gélekben) hajtották végre. A lap vagy cső formájú géleket leginkább a biológiai makromolekulák (nukleinsavak, fehérjék) méretfüggő elválasztásához használták. Bár ez az egyik legszélesebb körben használatos elválasztási technika, a lap gélelektroforézis alkalmazásánál hosszú elemzési idővel, kis elválasztási hatékonysággal, nehézkes automatizálással és detektálással kell számolni. A 80-as évek elején végre elérhetővé váltak 75 μm belső átmérőjű kvarc kapillárisok. Ezek alkalmazásával készítette el Jorgenson és Lukacs az első kapilláris elektroforézis berendezést.



2. ábra A lap gélelektroforézis és a kapilláris elektroforézis méretbeli összehasonlítása

Az első CE-s nemzetközi konferenciát 1989-ben tartották. Azóta évről évre növekszik a módszerrel kapcsolatos közlemények, könyvek és konferenciák száma, és meredeken nő az eladott CE készülékek mennyisége.

3. A CE ELMÉLETE

3.1. Elektroforézis

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. Egy ion sebessége a következőképpen adható meg:

$$v = \mu_e E \tag{1}$$

ahol v = az ion sebessége
μ_e = az elektroforetikus mozgékonyság
E = az elektromos térerő

Az elektromos térerő (V/cm) az alkalmazott feszültség és a kapilláris hosszának hányadosa. Egy adott ion és közeg esetén a mozgékonyság állandó, és jellemző az adott ionra. Egy részecske mozgékonyságát a részecskére ható elektromos erő (F_e) és a közeg által kifejtett súrlódási erő (F_s) határozza meg.
Az elektromos erő a

$$F_e = q E \tag{2}$$

a súródási erő (ideális, gömb alakú ionokra) pedig a

$$F_s = - 6 \pi \eta r v \tag{3}$$

képletekkel adható meg,
ahol q = az ion töltése
η = az oldat viszkozitása
r = az ion sugara
v = az ion sebessége

Az elektroforézis során e két erő egymással egyenlő, irányuk ellentétes, így felírható, hogy

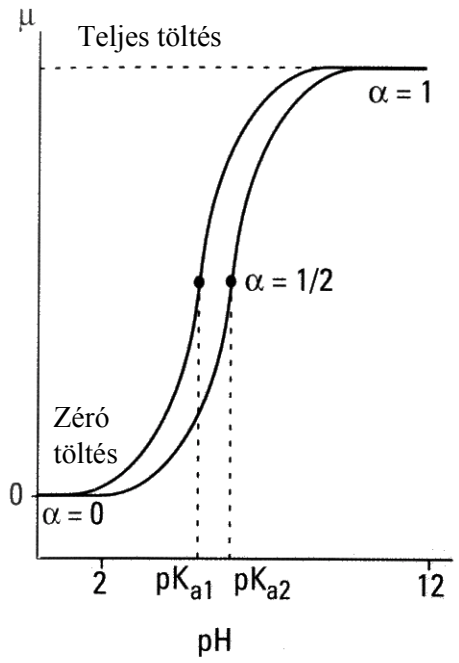
$$q E = 6 \pi \eta r v \tag{4}$$

A (4) egyenletből az ion sebességét kifejezve, s behelyettesítve az (1) egyenletbe kapjuk azt az egyenletet, mely a mozgékonyságot fizikai állandókkal írja le:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \tag{5}$$

Ebből az egyenletből világosan látszik, hogy a kis méretű, nagy töltésű részecskék rendelkeznek a legnagyobb mozgékonysággal, míg a nagy méretű, de kis töltésű

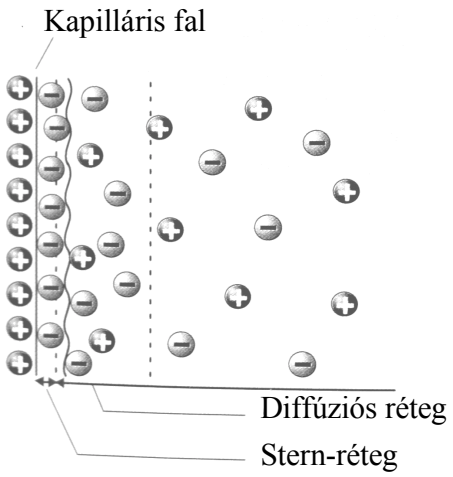
részecskék mozgékonysága csekély. Az abszolút (elektroforetikus) mozgékonysági adatok, melyek végtelen híg oldatra és teljes töltésű (α=1, lásd 3. ábra) részecskékre vonatkoznak, megtalálhatók a különböző fizikai állandókat tartalmazó táblázatokban. Az abszolút mozgékonysági értékektől a kísérleti úton kapott relatív (effektív) mozgékonysági értékek általában eltérnek, mivel ez utóbbi értékek függnek a pH-tól (az oldott anyag pK-jától) és a közeg (puffer) összetételétől.
Az abszolút és relatív mozgékonyság közötti különbséget mutatja be a 3. ábra. Ha két részecske abszolút mozgékonysága teljes töltés mellett megegyezik, elvileg nem választható el egymástól, holott valójában e részecskék különböző pK értékük, és pH-juk által megszabott töltésük miatt különböző mozgékonysággal rendelkeznek.



3. ábra Két gyenge sav mozgékonyságának pH-függése

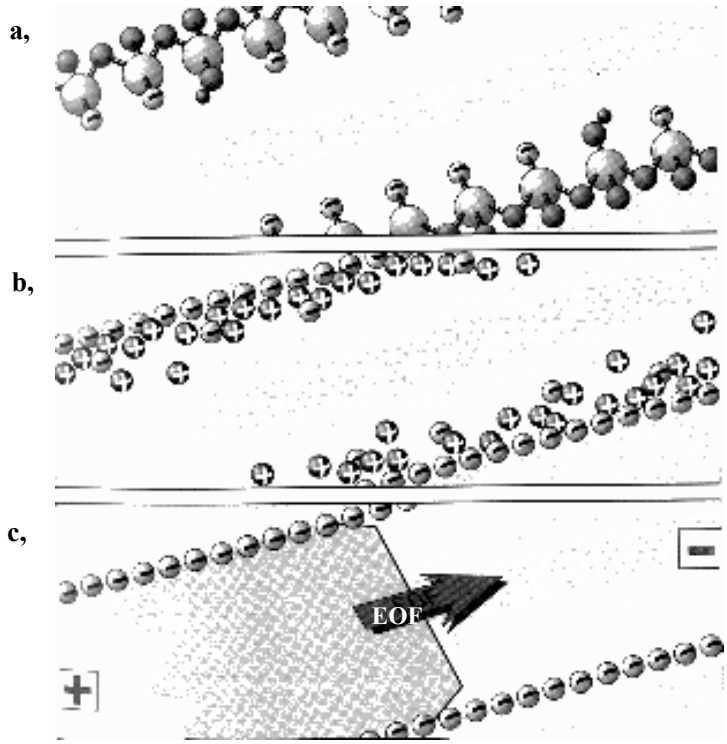
3.2. Az elektroozmotikus áramlás

A CE működésének alapja az elektroozmotikus áramlás (electroosmotic flow, EOF). Az EOF a folyadék kapillárisbeli tömegtranszportja, mely a kapilláris belső falán kialakult felületi töltések (kettős réteg) következménye (4. ábra). Az EOF hozzáadódik az oldott anyagok mozgékonyságán alapuló áramláshoz, de nincs hatása az elválasztás szelektivitására.
Vizes oldatok esetén a legtöbb szilárd felületnek fölös negatív töltése van. Ennek oka a felület ionossá válása sav-bázis egyensúly következtében és/vagy ionoknak a felületre való adszorpciója. Kvarc esetén mindkét folyamat végbemehet, bár az EOF-t leginkább a szilanol csoportok (SiOH) anionos SiO^- formája határozza meg (5.a ábra). Az EOF pH=4 fölött válik jelentőssé. Nemionos jellegű anyagok (pl.: teflon) szintén kialakíthatnak EOF-t a felületükre adszorbeálódó anionoknak köszönhetően.



4. ábra A kapilláris falán kialakuló kettős réteg ábrázolása

Az ellenionok (általában kationok) a töltésegyensúly fenntartása miatt a felület közelében helyezkednek el, és egy kettősréteget építenek ki, illetve a fal potenciáljához nagyon közeli potenciált (zéta potenciált) hoznak létre (5.b ábra). Ha feszültséget kapcsolunk a kapilláris végeire, a diffúziós kettős réteget alkotó kationok a katód felé mozdulnak el. Mivel e kationok szolvatáltak, mozgásukkal az oldószer részecskéket is a katód felé vonszolják (5.c ábra).



5. ábra Az elektroozmotikus áramlás kialakulása
a, negatív töltésű kvarc kapilláris belső felülete ($Si\text{-}O^-$)
b, hidratált kationok gyűlnek össze a felület közelében
c, tömegáramlás alakul ki az elektromos tér létrehozása miatt

Az EOF mértéke sebességi vagy mozgékonysági értékekkel fejezhető ki:

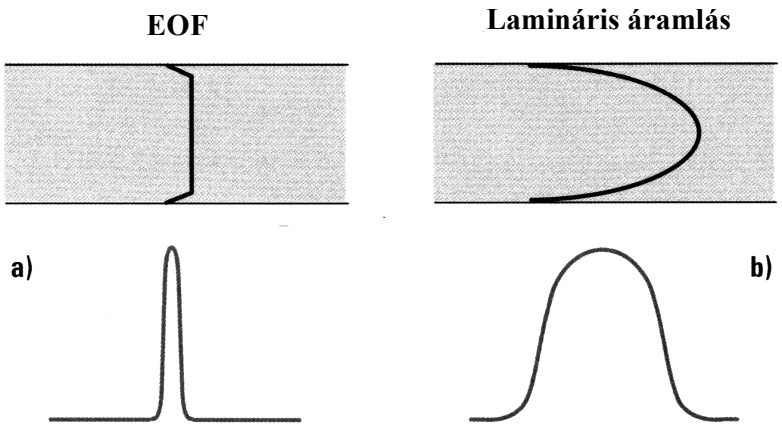
$$v_{EOF} = (\varepsilon\, \xi / \eta)\, E \qquad (6)$$

vagy

$$\mu_{EOF} = (\varepsilon\, \xi / \eta) \qquad (7)$$

ahol v_{EOF} = EOF sebessége
μ_{EOF} = EOF "mozgékonysága"
ξ = zéta potenciál
ε = dielektromos állandó

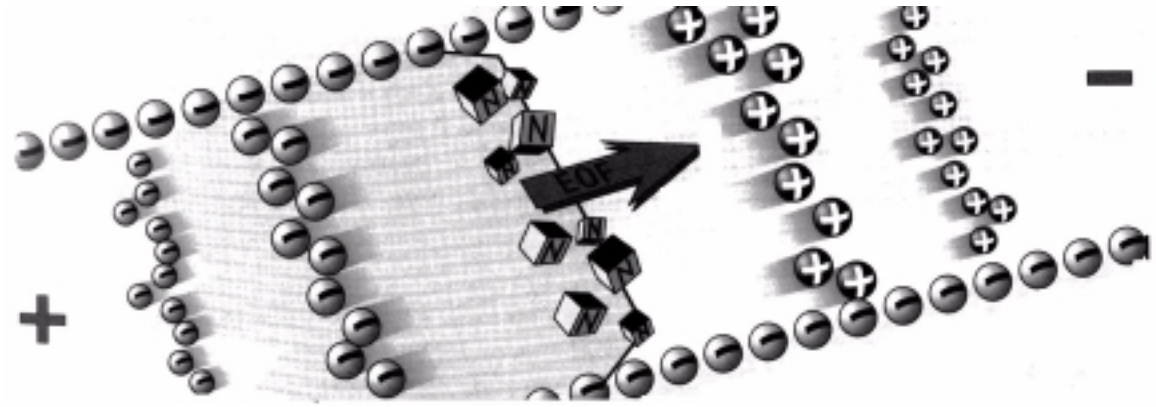
A zéta potenciált a kapilláris falának felületi töltése határozza meg. Mivel ez a töltés erősen pH-függő, az EOF nagysága a pH-val változik. Nagy pH értékeknél, ahol a szilanol csoportok túlnyomó részben deprotonáltak, az EOF mértéke jóval nagyobb, mint kisebb pH értékeknél, ahol e csoportok protonálódnak. Az EOF pH=2 és pH=12 között akár egy nagyságrendnél nagyobb mértékben is megváltozhat.
A kapillárisbeli EOF fontos jellemzője a lapos áramlási profil (6.a ábra). Mivel az áramlás hajtóereje egyenletesen oszlik el a kapillárisban, egyáltalán nincs nyomásesés a kapillárison belül, s így az áramlás teljesen egyenletesnek tekinthető. A 6.a. ábrán jól látszik, hogy az áramlási sebesség hirtelen csökken a falnál a súrlódás következtében. A lapos áramlási profil azért előnyös, mert a részecskék zónáinak diszperziója csak kis mértékű. Ennek ellenkezője igaz pumpákkal előállított lamináris vagy parabolikus áramlásokra a cső falánál fellépő deformáló erők miatt (6.b ábra). Az EOF sebessége és profilja általában független a kapilláris belső átmérőjétől, de ha az meghaladja a 200 μm-t, az előnyös áramlási profil megváltozik.



6. ábra Áramlási profilok és részecske zónák

Az EOF egy másik fontos előnye, hogy az gyakorlatilag az összes részecskét, függetlenül azok töltésétől, azonos irányú mozgásban tartja. A szokásos körülmények mellett (vagyis amikor a kapilláris belső felülete negatív töltésű) az

áramlás az anódtól a katód irányába történik. A katód felé nemcsak a kationok vándorolnak, de az anionok is, mivel az EOF akár egy nagyságrenddel is nagyobb lehet az anionok sebességénél. Így a kationok, töltés nélküli részecskék és anionok akár egyetlen CE-s futtatással is elemezhetők. A folyamatot a 7. ábra mutatja be. A kationok vándorolnak a leggyorsabban a katód felé az elektroforetikus vonzóerő és az EOF miatt; a töltés nélküli részecskéket kizárólag az EOF szállítja, így a különböző töltés nélküli részecskék itt nem szeparálódnak; a leglassabban pedig az anionok vándorolnak a katód felé (az EOF-nek köszönhetően), mivel ezekre az anód az EOF irányával ellentétes vonzóerőt fejt ki. Kis méretű ionok (pl. K^+, Na^+, Cl^-) vizsgálata esetén az EOF nagysága általában nem nagyobb ezen ionok mozgékonyságánál. Ezenkívül a kapilláris felületi töltésének módosításával elérhető az EOF csökkentése, s így a kationok és anionok akár ellentétes irányba is vándorolhatnak.



7. ábra Különböző részecskéknek az EOF-val szuperponált vándorlása a kapilláris zónaelektroforézisnél

3.3 Az EOF szabályzása

Bár a meghatározásoknál az EOF általában előnyös, gyakran szükséges annak szabályzása. Nagy pH értékeknél az EOF akár olyan gyors is lehet, hogy az még az elválasztás megtörténte előtt a részecskék elúcióját okozza. Kis pH értékeknél viszont a negatív töltésű fal kationos részecskék adszorpcióját okozhatja (ez különösen a bázikus fehérjék elválasztásánál jelenthet problémákat). Az EOF szabályzásához elsősorban a kapilláris felületi töltésének vagy a puffer viszkozitásának megváltoztatása szükséges. Ezek lehetséges módozatait az 1. táblázat foglalja össze.

Az EOF sebességének csökkentése legegyszerűbben az elektromos tér csökkentésével lehetséges a (6) egyenletnek megfelelően. Ennek az alkalmazásnak azonban számos hátránya van az elemzés időtartama, hatékonysága és a felbontás tekintetében. A gyakorlatban a legdrámaibb változás az EOF-ben a puffer pH-jának megváltoztatásával érhető el. A pH változása azonban hatással lehet az oldott részecskék töltésére és mozgékonyságára is. Kis pH-jú pufferek mind a kapilláris felületét, mind az oldott részecskéket protonálhatják, míg nagy pH-jú pufferek

mindezeket deprotonálják. A különböző részecskék izoelektromos pontjának ismerete gyakran hasznos lehet a megfelelő pH-jú puffer kiválasztásához. Az EOF szabályozható a puffer ionerősségének és koncentrációjának megváltoztatásával is. A pufferek szokásos koncentrációtartománya 1-500 mM, nagyobb koncentrációk alkalmazását korlátozza a kapilláris belsejében jelentkező hőfejlődés. Ezenkívül az EOF változtatható a kapilláris falának módosításával (stabil réteg kialakításával vagy speciális adalékokkal) is.

1. táblázat Az EOF szabályzásának módszerei

Változó	Eredmény	Megjegyzés
Elektromos tér	Arányos változás az EOF-ben	• Csökkentésével az elválasztás hatékonysága és a felbontás csökkenhet • Növelésével jelentős Joule-hő fejlődhet
Puffer pH	Az EOF kis pH-nál csökken, nagy pH-nál nő	• A legegyszerűbb és legeredményesebb módszer az EOF szabályzásához • Megváltoztathatja az elválasztandó részecskék töltését vagy szerkezetét
Ionerősség vagy puffer-koncentráció	Növekedésével csökken a zéta potenciál és az EOF	• Nagy ionerősség nagyobb áramerősséget és Joule-hőt eredményez • Kis ionerősség problémákat jelenthet a minta adszorpciója miatt • A kapott jel alakja torzulhat, ha a vezetőképesség eltér a minta vezetőképességétől
Hőmérséklet	A viszkozitás 2-3%-kal változik °C-ként	• Változtatása gyakran hasznos, mivel a hőmérsékletet a készülék maga képes szabályozni
Szerves módosító adalék	Megváltoztatja a zéta potenciált és a viszkozitást (általában csökken az EOF)	• Komplex változások, hatásukat legegyszerűbben kísérletesen lehet meghatározni • Megváltozhat a szelektivitás
Felületaktív anyag	Hidrofób és/vagy ionos kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	• Felületaktív anionok növelhetik az EOF-t • Felületaktív kationok csökkenthetik az EOF-t vagy megfordíthatják annak irányát • Jelentősen megváltoztathatja a szelektivitást
Töltés nélküli, hidrofób polimerek	Hidrofób kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	• Csökkenti az EOF-t a felületi töltések elfedésével és a viszkozitás növelésével
Kovalens kötéssel kötődő anyagok	Kémiai kötés a kapilláris falához	• Sokféle módosítás lehetséges (hidrofób jelleg mértéke vagy töltés) • A stabilitás gyakran problémákat okoz

3.4 Analitikai paraméterek

Mozgékonyság és migrációs idő
A migrációs idő az az időtartam, ami az adott részecskének a detektálás helyéig való vándorlásához szükséges, s ami megadható a migrációs távolság és a részecske sebességének hányadosaként. A migrációs idő és más kísérleti paraméterek alapján számítható ki a látszólagos mozgékonyság (μ_l):

$$\mu_l = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \tag{8}$$

ahol $\mu_l = \mu_e + \mu_{EOF}$
V = feszültség
l = a kapilláris effektív hossza (a kapilláris hossza a detektorig)
L = a kapilláris teljes hossza
t = migrációs idő
E = elektromos térerő

Diszperzió
Az elektroforézisnél az elválasztás a részecskék mozgékonyságbeli különbségén alapszik. A zónák jó elválásához rövid zónák előnyösek. A zónák hosszát azonban a különböző tényezők, diszperziós folyamatok (hosszirányú diffúzió, Joule-hő fejlődés, hosszú injektálás, minta adszorpciója a kapilláris falára, a minta és a puffer jelentősen eltérő vezetőképessége, stb.) növelik. Így, a diszperzió forrása a zónán belüli részecskék eltérő sebessége. A diszperzió az alapvonal csúcsszélességével (w_a) jellemezhető, mely Gauss-görbe alakú jel esetén

$$w_a = 4\,\sigma \tag{9}$$

ahol σ = a jel standard deviációja (időben, hosszúságban vagy térfogatban).

Az elválasztás hatékonyságát az elméleti tányérszámmal (N) fejezik ki:

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \tag{10}$$

ahol l = a kapilláris effektív hossza,
és fordítottan arányos egy elméleti tányérnak megfelelő magassággal (H):

$$H = \frac{l}{N} \tag{11}$$

Ideális körülmények között (vagyis amikor kicsi az injektált minta hossza, nincs kölcsönhatás a részecskék és a fal között, stb.) a hosszirányú diffúzió az egyedüli forrása a részecskék zónakiszélesedésének, mivel a keresztirányú diffúzió a dugószerű áramlási profil miatt általában nem okoz problémát. Így a hatékonyság arányos a kromatográfiában használatos molekuláris diffúzió kifejezéssel, vagyis:

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DlL}{\mu_e V} \tag{12}$$

ahol D = az adott részecske diffúziós koefficiense.
A (12) egyenletet behelyettesítve a (10) egyenletbe megkapjuk a tányérszám elektroforetikus kifejezését:

$$N = \frac{\mu_e Vl}{2DL} = \frac{\mu_e El}{2D} \tag{13}$$

Az elméleti tányérszám meghatározható közvetlenül a kapott elektroferogram alapján is:

$$N = 5.54\left(\frac{t}{w_{1/2}}\right)^2 \tag{14}$$

ahol t = a migrációs idő
$w_{1/2}$ = a kapott csúcs félértékszélessége

Felbontás
Az elválasztástechnikában a végső cél a mintának komponenseire való bontása. A felbontás a legegyszerűbben a következőképpen adható meg:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \tag{15}$$

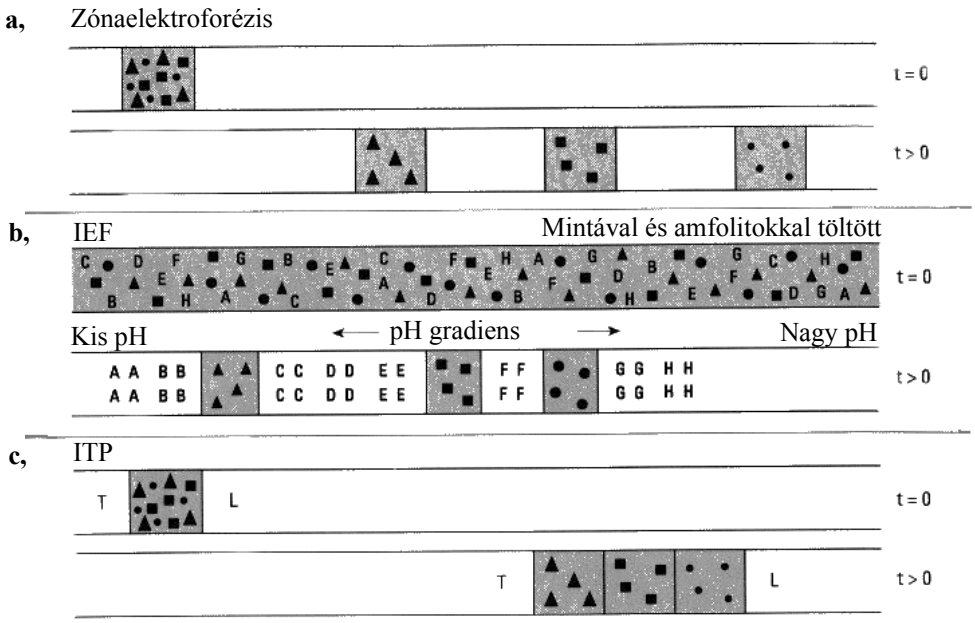
Az egyenlet számlálójában szereplő tagok az elválasztási folyamatot, a nevezőbeli tagok pedig az ez ellen ható diszperziós folyamatokat jellemzik.

4. A CE MÓDSZEREI

A CE alapvető módszerei a *kapilláris zónaelektroforézis* (CZE), a *micelláris elektrokinetikus kromatográfia* (MEKC), a *kapilláris gélelektroforézis* (CGE), a *kapilláris izoelektromos fókuszálás* (CIEF) és a *kapilláris izotachoforézis* (CITP). E különböző elválasztási módszerek mechanizmusait foglalja össze a 2. táblázat és a 8. ábra. Az egyes módszerek használatához többnyire egyszerűen csak a puffer összetételét szükséges megváltoztatni. A felsorolt módszerek közül csak a CZE-t tárgyaljuk részletesebben.

2. Táblázat A CE módszerei

Módszer	Az elválasztás alapja
Kapilláris zónaelektroforézis	Szabad részecskék mozgékonysága
Micelláris elektrokinetikus kromatográfia	Hidrofób/ionos kölcsönhatások micellákkal
Kapilláris gélelektroforézis	Méret és töltés
Kapilláris izoelektromos fókuszálás	Izoelektromos pont
Kapilláris izotachoforézis	Határfelületek mozgása

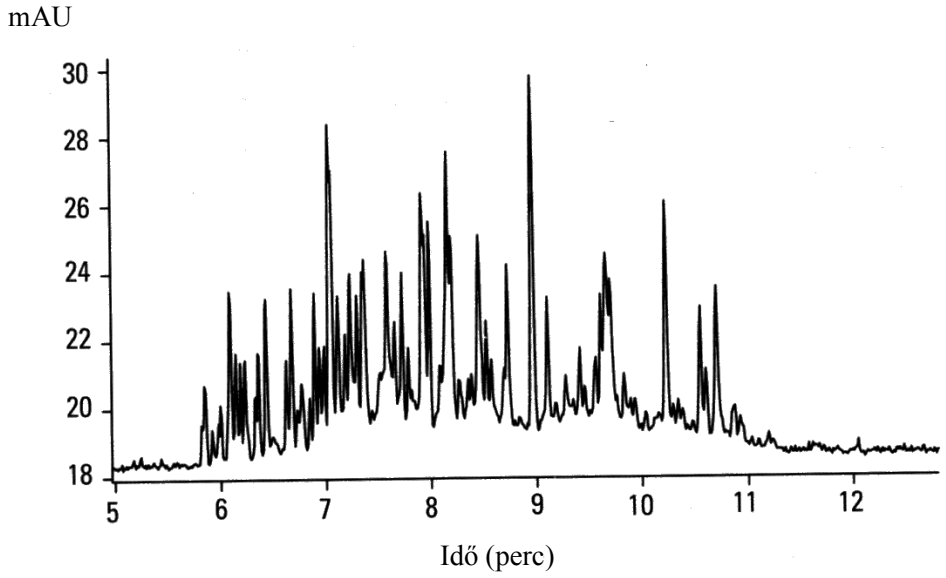


8. ábra A CZE, CIEF és CITP illusztrálása

A CZE egyszerűsége és sokoldalúsága miatt a leggyakrabban használatos CE módszer. A kapilláris csupán a pufferrel van töltve, az elválasztás alapja az, hogy a különböző részecskék diszkrét zónákban más-más sebességgel mozognak. Kationok és anionok elválasztása egyaránt lehetséges az EOF-nek köszönhetően, de az EOF a töltés nélküli részecskéket is mozgatja (eluálja) (7. és a 8.a ábra).

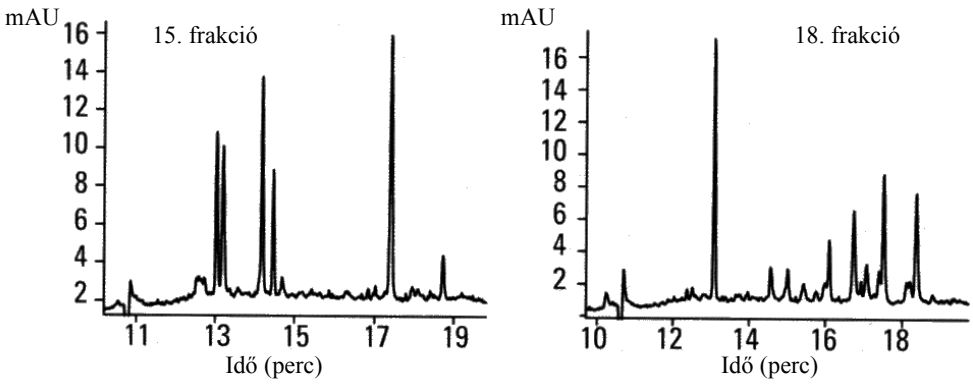
5. A KAPILLÁRIS ZÓNAELEKTROFORÉZIS (CZE) ALKALMAZÁSI TERÜLETEI

Bár a CZE alig tízéves technika, a megismert alkalmazások köre egyre szélesebb, a közlemények száma jelenleg, a 90-es évek végén exponenciálisan nő. A CZE-nek eddigi rövid "élete" során is már olyan sok alkalmazási területét tárták fel, hogy ezek közül csupán néhány fontosabb terület felvillantására van itt lehetőség.
A CZE-t gyakran alkalmazzák biológiai kutatásoknál, elsősorban peptidek és fehérjék meghatározásánál. Például a cukorfehérjék tipikusan azok a vegyületek, melyeket a hagyományos gélelektroforézis vagy folyadékkromatográfiás módszerekkel nehéz elemezni, ugyanakkor a CZE itt előnyösen használható. Jelentős sikereket értek el a "peptid-térképek" CZE-s felvételénél is. A "peptid-térkép" készítésénél a fehérjéket enzimekkel vagy vegyszerekkel kis peptidrészekre tördelik szét, majd a peptidek e keverékét elemzik. E vizsgálat elsősorban minőségi jellegű és a fehérjék közti finom különbségek feltárására jó. Egy, CZE-vel kapott peptid-térkép a 9. ábrán látható.



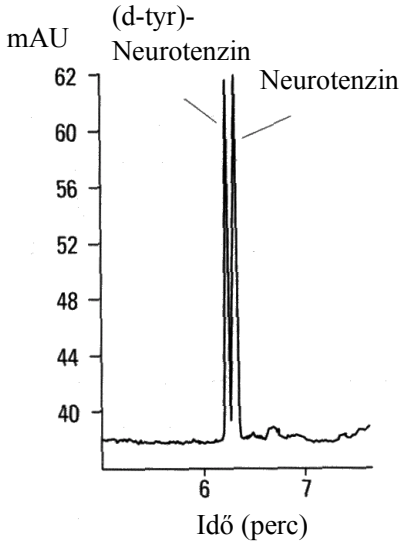
9. ábra Peptid-térkép
Körülmények: minta: BSA standard, puffer: 20 mM foszfát, pH=7, V=25 kV, l=50 cm, belső átmérő: 50 μm, λ=200 nm

A CZE ugyancsak jól hasznosítható a nagynyomású folyadékkromatográfiásan (HPLC) tisztított fehérjék második dimenziós elemzéséhez (10. ábra).



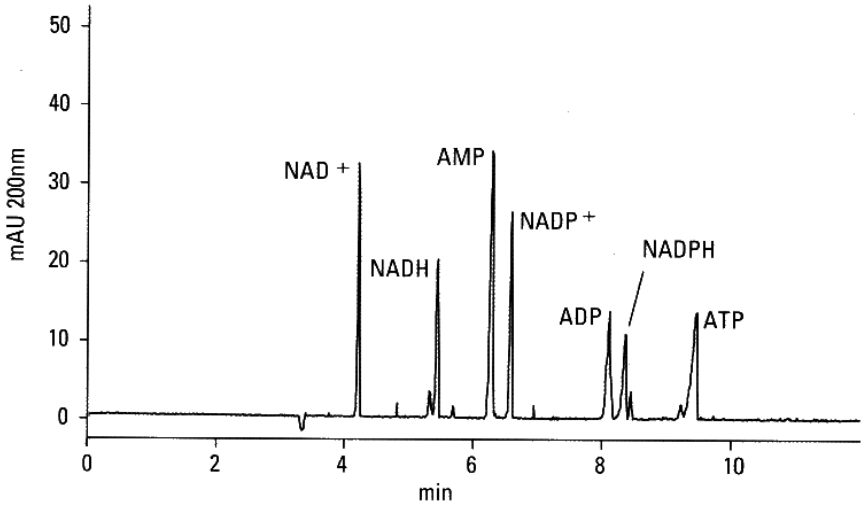
10. ábra Fordított fázisú HPLC-s technikával elválasztott peptidek CZE elemzése
Körülmények: puffer: 30 mM borát, 17 mM foszfát, pH=8.2, V=25 kV, l=70 cm, belső átmérő: 50 μm, λ=200 nm

Optimált feltételek mellett, a CZE esetén elérhető nagy elválasztási hatékonyság elegendő lehet két anyag közötti egészen kis szerkezeti külöbségek felismeréséhez is. A 11. ábrán látható, hogy még két, olyan 8 aminosav hosszúságú peptid is elválasztható, mely csupán egy aminosav konformációjában (D-tirozin, L-tirozin) különbözik. Ez a példa azt is jelzi, hogy még a konformációs különbségeknek is hatásuk van az anyagok elektroforetikus mozgékonyságára.



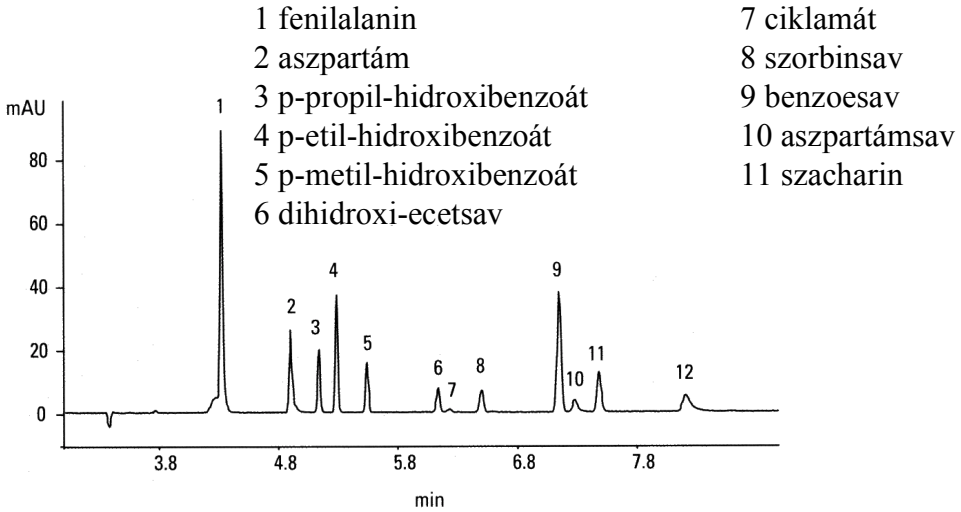
11. ábra Neurotenzin izomerek CZE elemzése (A neurotenzin aminosav-sorrendje: pGlu-Leu-Try-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-***Tyr***-Ile-Leu és pGlu-Leu-Try-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-***D-Tyr***-Ile-Leu)
Körülmények: minta: 0.025 mM mindkét izomer, puffer: 30 mM borát, pH=8.3, V=18 kV, l=65 cm, belső átmérő: 50 μm, λ=200 nm

Anionos vegyületek gyakran elemezhetők a szokásos polaritás mellett is, ha a nagy EOF ellensúlyozza ezek negatív elektroforetikus mozgékonyságát. Nukleotidok esetén a CZE elválasztás gyorsabb, mintha gradiens elúciós HPLC-s módszert használnánk (12. ábra).



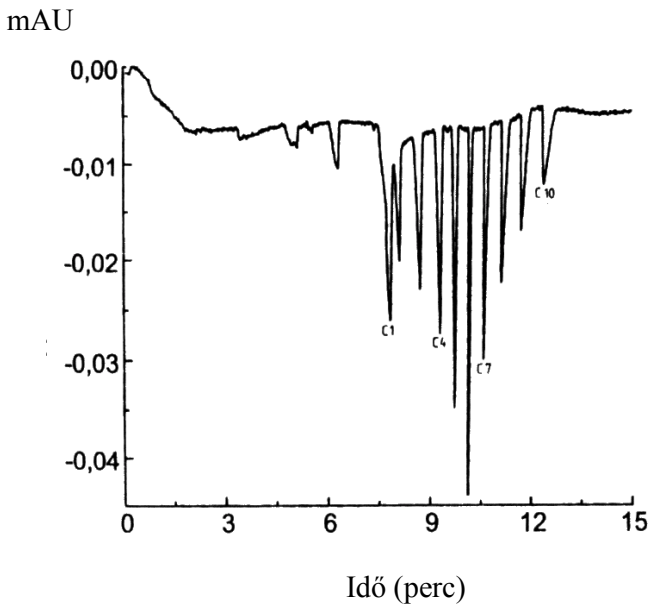
12. ábra Nukleotidok és koenzimjeik CZE elemzése
Körülmények: puffer: 20 mM foszfát, pH=7.5, V=25 kV, l=56 cm, belső átmérő: 75 μm, λ=200 nm

A CZE-vel könnyen azonosíthatók és mennyiségileg is meghatározhatók élelmiszerekhez adalékolt tartósítószerek, édesítőszerek (13. ábra), szintetikus festékek, vitaminok.



13. ábra Mesterséges édesítő- és tartósítószerek CZE elemzése
Körülmények: puffer: 20 mM borát, pH=9.4, V=30 kV, l=56 cm, belső átmérő: 50 μm, λ=192 nm

A CZE használható szervetlen kationok, anionok és szerves savak meghatározására is, melyeket hagyományosan ionkromatográfiás módszerekkel szoktak elemezni. Mivel ezekben az anyagokban többnyire nincs megfelelő kromofor (színhordozó) csoport, indirekt UV detektálást kell alkalmazni. Indirekt detektálásnál a puffer az adott hullámhossz-tartományban erősen elnyelő anyagot (pl. kromátot vagy imidazolt) tartalmaz és a detektálás ezen anyagok abszorpciós maximumán történik (pl.: kromát esetén 254 nm-en). Amikor a minta zónái áthaladnak a detektálás helyén, abszorbancia csökkenés következik be, mivel a minta nem kromofor komponensei kiszorítják ("hígítják") a kromofor puffert. A kis méretű kationok nagy mozgékonysága miatt az EOF nem elég nagy az ellenkező irányba vándorló ionok (anionok) szállításához, így a kationok és anionok egyszerre általában nem vizsgálhatók. A 14. ábrán 1-10 szénatomszámú alifás karbonsavak elektroferogramja látható.

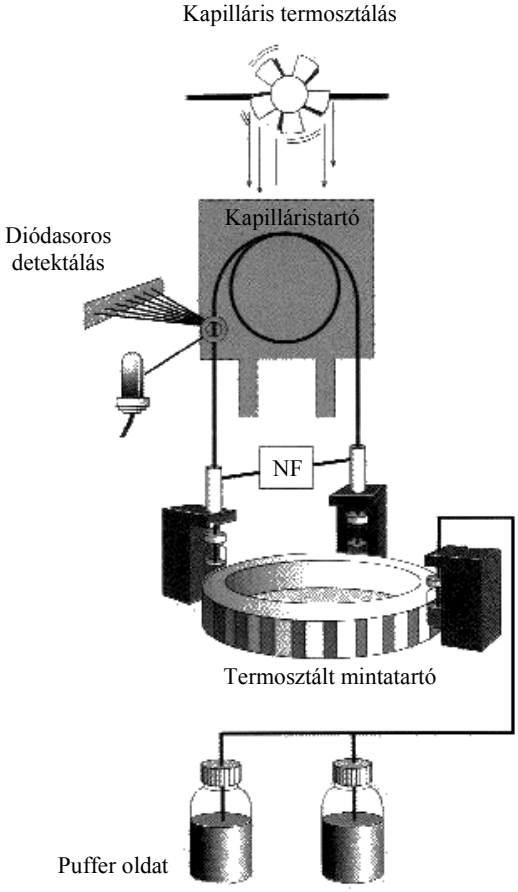


14. ábra Kis szénatomszámú alifás karbonsavak CZE elemzése
Körülmények: minta: C_1-C_{10} alifás karbonsavak (mindegyik 25 μg/ml), puffer: 5 mM dinitro-benzoesav, 0.5 mM CTAB, pH=9.0, 40% aceton; V=25 kV fordított polaritás; l=50 cm, belső átmérő: 75 μm, λ=214 nm

6. A CE KÉSZÜLÉK FELÉPÍTÉSE

A CE készülék felépítését a 15. ábra mutatja be. Egy CE készülékkel történő mérés 4 egymást követő lépésből áll:
1. bemeneti puffeedénye cseréje a mintát tartalmazó edénykével,
2. a minta bejuttatása a kapillárisba kis nyomás vagy feszültség alkalmazásával,
3. a bemeneti puffeedénye visszahelyezése,
4. feszültség alkalmazása az elválasztáshoz.

Ezt követően a minta elváló komponenseinek zónái elérik az optikai ablakot, ahol a spektrometriás detektálás történik. A következőkben a minta injektálásához, elválasztásához, detektálásához és a folyadékok kezeléséhez szükséges részegységekről, módszerekről lesz szó.

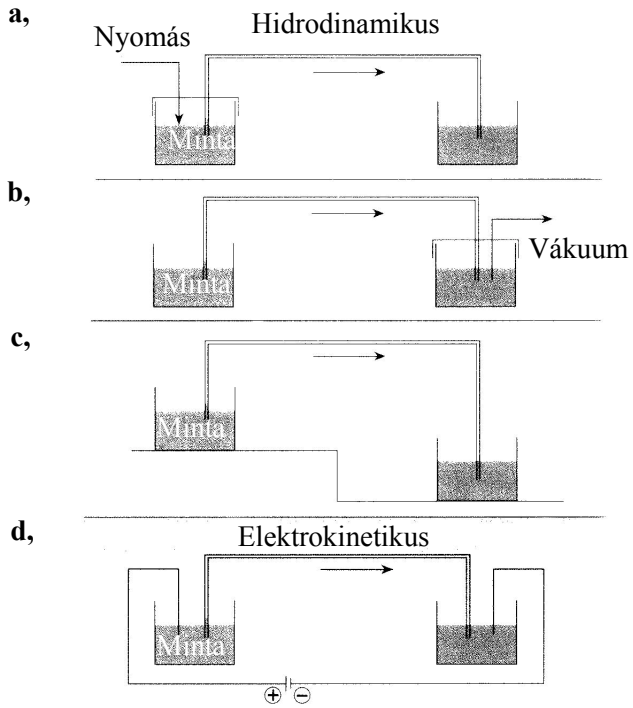


15. ábra A CE készülék vázlatos felépítése

6.1. Injektálás

A nagy elválasztási hatékonyság elérése céljából csak nagyon kis minta mennyiséget szabad a kapillárisba juttatni. A kapillárisba bejuttatott minta (injekciós dugó) hosszának kisebbnek kell lennie a kapilláris hosszának 1-2%-ánál. Ez azt jelenti, hogy az injekciós hossz a kapilláris hosszától és belső átmérőjétől függően csupán néhány mm, vagyis a minta térfogata nem több 1-50 nl-nél. Így, elméletileg egyetlen

5 μl-nyi mintaoldatból már akár egy sorozatmérésre is lehetőség van. Nagyobb mintatérfogatok alkalmazásának két lényeges hatása van, de mindkettő hátrányos a felbontásra nézve. Egyrészt a diffúzió által megszabott zónaszélességnél nagyobb injekciós hossz arányosan szélesebb csúcsokat eredményez. Másrészt növelheti az elektromos tér inhomogenitását és eltorzult formájú csúcsokat okozhat a minta zónái és a puffer eltérő vezetőképessége miatt.
A két leggyakrabban használt CE minta beviteli módszer a hidrodinamikai és az elektrokinetikus injektálás (16. ábra). Az injektált minta mennyisége egyik esetben sem ismert pontosan, de könnyen kiszámolható. Mintatérfogat helyett, hidrodinamikus injektálásnál a nyomás-idő, elektrokinetikus injektálásnál pedig a feszültség-idő paramétereket szokás megadni.



16. ábra A minta injektálásának módszerei a CE-nél

Hidrodinamikus injektálás
A hidrodinamikus injektálás a legáltalánosabban használatos CE mintabeviteli módszer. Végrehajtható, ha a kapilláris injekciós végénél nyomást, vagy a kapilláris másik végénél vákuumot alkalmazunk, vagy pedig ha az injekciós edénykét megemeljük a kapilláris másik végéhez képest (hidrosztatikus injektálás) (16. a, b, c ábrák).
Az injektált minta térfogata a Hagen-Poisuille egyenlet alapján számítható:

$$\text{térfogat} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \qquad (16)$$

ahol ΔP = nyomáskülönbség a kapillárisban
d = a kapilláris belső átmérője
t = idő
η = a puffer viszkozitása
L = a kapilláris hossza

A szokásos injekciós nyomás és idő paraméterek 25-100 mbar, illetve 0.5-5 s. A hidrosztatikus injektálásnál a ΔP nyomáskülönbség a (17) képletből számolható. Általában 5-10 cm-re emelik a mintafiolát a kapilláris másik végéhez képest 10-30 másodpercig.

$$\Delta P = \delta\, g\, \Delta h \tag{17}$$

ahol δ = a puffer oldat sűrűsége
g = gravitációs állandó
Δh = az edények közötti magasságkülönbség

Ha az érzékenység nem különösebben fontos az elemzésnél, akkor a lehető legkisebb injekciós hosszt érdemes használni. Az injekció ismételhetősége azonban romlik nagyon rövid injekciós idők esetén. Bár a készülékek injekciós ismételhetősége általában 1-2 %-nál is jobb, a csúcsterületbeli ismételhetőséget számos tényező ronthatja (pl.: a kapilláris hőmérsékletének változása, a minta kölcsönhatásai a kapilláris falával, a csúcsok integrálása kis jel/zaj viszonynál stb.). A kapilláris hőmérsékletének pontos szabályzása (± 0.1°C) fontos az állandó injekciós térfogat biztosításához is, mivel a migrációs idő, illetve a kapillárisban a puffer viszkozitása, s így az injektált mennyiség 2-3 %-kal változik °C-onként. Annak érdekében, hogy elkerüljük a minta oldat nem kívánt felszívódását a kapillárisba, az injektálásnak olyan rövid időtartamúnak kell lennie, amilyen rövid csak lehet.

Elektrokinetikus injektálás
Az elektrokinetikus (vagy más néven elektromigrációs) injektálás esetén a kapilláris bemeneti végét a mintatartó edénykébe helyezik és feszültséget kapcsolnak rá (16.d ábra). Ilyenkor a térerősség 3-5-ször kisebb, mint amilyet elválasztáskor szokás használni. Elektrokinetikus injektálásnál a részecskék migráció, illetve az EOF szívó hatása révén jutnak be a kapillárisba. Az elektrokinetikus injektálás sajátsága, hogy a kapillárisba juttatott mennyiség függ az egyes részecskék elektroforetikus mozgékonyságától. Egyfajta pozitív diszkrimináció történik az ionos részecskéket illetően, mivel a mozgékonyabb ionok nagyobb mennyiségben jutnak a kapillárisba, mint a kevésbé mozgékonyabb ionok és más részecskék. Az injektált mennyiség (Q) (g vagy mol) a következőképpen számolható ki:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) V \pi r^2 C t}{L} \tag{18}$$

ahol μ_e = a részecske elektroforetikus mozgékonysága
μ_{EOF} = az EOF mozgékonysága
V = feszültség
r = kapilláris sugara
C = a részecske koncentrációja
t = idő
L = a kapilláris teljes hossza

A (18) egyenlet alapján az injektált minta mennyisége az EOF-től, a minta koncentrációjától és mozgékonyságától függ. A vezetőképességben bekövetkező változások, melyek okai elsősorban a mátrix hatások (nagy mennyiségű nem detektált ion, például Na^+ vagy Cl^-), különböző feszültségeséseket, és így különböző injektált mennyiségeket eredményeznek. Emiatt az elektrokinetikus injektálás általában kevésbé reprodukálható méréseket tesz lehetővé, mint amilyen a hidrodinamikus injektálással elérhető. Emellett azonban az elektrokinetikus injektálásnak is vannak pozitív oldalai: nagyon egyszerű, nem igényel külön műszerezettséget, előnyösen alkalmazható viszkózus minták, gélek elemzésénél, amikor a hidrodinamikus injektálás nem használható.

6.2 Elválasztás

Az elválasztási folyamatnál a kapillárist, a CE készüléknek a kapilláris termosztálását végző rendszerét és elektromos tápegységét használjuk.

6.2.1 Kapilláris

A kapilláris anyagának kémiailag és elektromosan inertnek, UV és látható fényt áteresztőnek, hajlékonynak, de ugyanakkor kellően szilárdnak és nem túl drágának kell lennie. Ezen követelményeket jelenlegi ismereteink szerint a kvarc elégíti ki leginkább. A kvarcot már régóta használják optikai cellák és gázkromatográfiás (GC) kolonnák anyagául. A GC-s kolonnákhoz hasonlóan, a CE kapillárisokat is poliimid védőréteggel borítják a kapilláris erősítése és könnyebb kezelhetősége miatt. A detektálás helyén, az optikai ablakban ez a műanyag réteg könnyen leégethető, vagy lekaparható. A kapilláris lecsupaszított néhány mm-es szakasza azonban igen törékennyé válik, így óvatosan kell vele bánni. Általában 25-75 μm belső, és 350-400 μm külső átmérőjű kvarc kapillárisok használatosak. A meghatározás idejét tekintve a rövid kapillárisok alkalmazása előnyös. A leggyakrabban használatos effektív kapillárishosszúság 50-75 cm. Ennél 5-15 cm-rel nagyobb a kapilláris teljes hossza, vagyis a detektor és a kapilláris kimeneti vége közötti távolság. Az előnyös, ha az effektív hosszúság a kapilláris teljes hosszának lehető legnagyobb részét kiteszi a nagy elektromos térerő használata, és a kapilláris kondícionálásához, illetve az elemzéshez szükséges idő csökkentése miatt.

6.2.2 A kapilláris kondícionálása

A jó mérési reprodukálhatóság eléréséhez nagyon fontos a kapilláris kondícionálása, a reprodukálható kapilláris felület kialakítása. Kondícionálásnál a cél a kapilláris

belső felületére adszorbeált anyagok eltávolítása és a felület felújítása a szilanol csoportok deprotonálásával. A kondícionálás a kapilláris mosatását jelenti előbb 1 M NaOH-val, majd 0.1 M NaOH-val, ezt követően pedig a pufferrel. A meghatározások előtt csak az utóbbi egy vagy két lépést kell végrehajtani. Más mosási eljárások is ismeretesek (pl.: erős savval, metanollal, dimetil-szulfoxiddal vagy különböző detergensekkel). Az állandó felületi töltés kialakítása történhet a puffer komponenseinek a kapilláris felületére való adszorbciójával is (pl.: foszfát pufferek esetén).

6.2.3 A kapilláris termosztálása

A reprodukálható mérések végrehajtásához elengedhetetlen a kapilláris hőmérsékletének állandó értéken tartása. ± 0.1 °C pontosságú hőmérsékletszabályzás elsősorban a migrációs idő és a mintainjektálás viszkozitásfüggése miatt szükséges. Ezenkívül a kapillárist el kell szigetelni a környezet hőmérsékleti változásaitól. Bár a folyadéktermosztálás elméletileg hatékonyabb, a légtermosztálás (≅ 10 m/s sebességű levegő áramoltatása) általában elegendő a CE-nél képződő viszonylag kis mennyiségű hő elvezetéséhez. A légtermosztálásos rendszerek előnye az egyszerű felépítésük és használatuk.

6.2.4 Nagyfeszültségű tápegység

A CE-nél a maximálisan körülbelül 30 kV feszültségű és 200-300 μA áramerősségű elektromos áram előállításához egyenáramú tápegység használatos. A migrációs idők nagyfokú reprodukálhatóságához (± 0.1 %) jól szabályozott feszültség szükséges. A CE-nél használatos tápegységeknél a polaritás általában megváltoztatható. A szokásos körülmények mellett az EOF a katód felé mozdul. Ebben az esetben az injektálás az anódnál történik. Azonban, ha az EOF-t csökkenteni vagy megfordítani akarjuk, szükség lehet az elektródok polaritásának megfordítására. Bár az állandó feszültségen történő elemzések a leggyakoribbak, néha az állandó áramerősséggel, vagy az állandó teljesítménnyel való munka az előnyös (pl.: izotachoforetikus elemzések). A CE-s tápegység másik sajátsága, hogy alkalmas feszültség, áramerősség vagy teljesítmény gradiens megvalósítására a meghatározás időtartama alatt. Ezt a fajta elektromos tér programozást használják a mérések elején esetleg bekövetkező gyors hőtermelés, vagy a bonyolultabb minták meghatározásához szükséges hosszabb mérési idő csökkentése érdekében.

6.3 Detektálás

A CE technikáknál a detektálás egyfajta kihívásnak számít a kapilláris kis átmérője és a felhasznált, csupán nanoliternyi térfogatú minta miatt. Bár a CE egyike a legkevesebb mintamennyiséget felhasználó módszereknek, mégsem tekinthető "nyomanalitikai" módszernek, mivel nagyon kis koncentrációk meghatározására nem alkalmas, vagy pedig elődúsítási eljárás alkalmazása szükséges. Számos, a HPLC-s technikákhoz korábban már alkalmazott detektálási módszert próbáltak ki a CE esetére is, de leggyakrabban az UV-látható fényabszorpciós detektálás használatos.

A 3. táblázat a legfontosabb, CE-vel alkalmazható detektálási módszereket, azok alkalmazásának előnyeit és hátrányait foglalja össze.

3. táblázat Detektálási módszerek

Módszer	Kimutatási határ abszolút (mol)	Kimutatási határ koncentráció (M)	Előnyök/hátrányok
UV-látható fény elnyelés	10^{-13}-10^{-16}	10^{-5}-10^{-8}	• univerzális • a diódasor spektrális információkat nyújt
Fluoreszcencia	10^{-15}-10^{-17}	10^{-7}-10^{-9}	• érzékeny • általában származékképzés szükséges a mintából
Lézer indukált fluoreszcencia	10^{-18}-10^{-20}	10^{-14}-10^{-16}	• nagyon érzékeny • általában a minta származékképzése szükséges • drága
Amperometria	10^{-18}-10^{-19}	10^{-10}-10^{-11}	• érzékeny • szelektív, de csak elektroaktív részecskékre jó • speciális elektronikai egyszég és módosított kapilláris szükséges
Vezetőképesség-mérés	10^{-15}-10^{-16}	10^{-7}-10^{-8}	• univerzális • speciális elektronikai egység és módosított kapilláris szükséges
Tömeg-spektrometria	10^{-16}-10^{-17}	10^{-8}-10^{-9}	• érzékeny és szerkezeti információkat is nyújt • a CE és MS illesztése problematikus
Indirekt UV, fluoreszcencia, amperometria	10-100-szor kisebb mint a direkt módszerek esetén		• univerzális • jobb érzékenység mint a direkt módszerek esetén

6.3.1 UV-látható fény abszorpciója

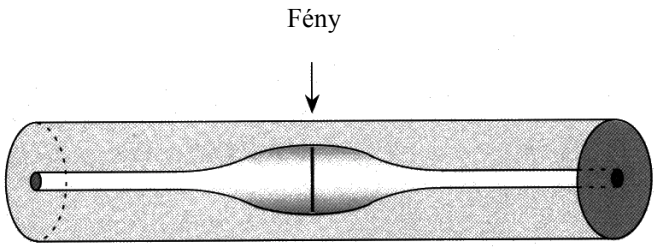
Az UV-látható fény abszorpció elsősorban univerzális detektálási jellege miatt a legszélesebb körben használatos detektálási módszer. Kvarc kapillárisok esetén a detektálás történhet 200 nm-től kezdve a látható fény tartományát felölelve. Nagy hatékonyságú detektálásról azért beszélhetünk, mert a detektálás magán a kapillárison ("on-capillary") történik. Így a detektálási lépés nem okoz zóna kiszélesedést.

Mint minden optikai detektornál, a nagy felbontás érdekében a detektálási hely szélességének a részecskék zónaszélességéhez viszonyítva kicsinek kell lennie. Ez a sajátos kapilláris méretekhez tervezett rés alkalmazásával érhető el. Mivel a CE-nél a

csúcsok 2-5 mm szélesek, a réshossz ezen érték legfeljebb egyharmada lehet. A detektor tervezésénél figyelemmel kellett lenni a rövid optikai úthosszra. A fényt közvetlenül a kapilláris belsejébe kell fókuszálni, hogy a résnél maximális áthatolás legyen elérhető, és hogy a lehető legkisebb mértékben jusson a detektorba szórt fény. Mindezek természetesen hatással vannak mind az érzékenységre, mind a lineáris kimutatási tartományra.
Az érzékenység a kalibrációs görbe (egyenes) meredekségeként definiálható. Nagyobb meredekség tehát jobb érzékenységgel egyenlő. Az abszorpciós detektálásnál a részecske abszorbanciája a *b* abszorpciós úthossztól, a részecske *C* koncentrációjától és az ε moláris abszorpciós együtthatójától függ (Lambert-Beer törvény):

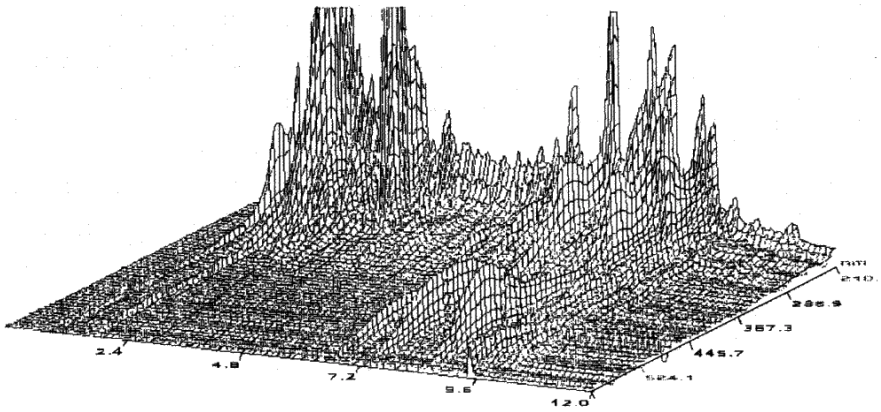
$$A = b\,C\,\varepsilon \qquad (19)$$

A CE-nál az érzékenységet elsősorban a rövid úthossz korlátozza. A kapilláris görbülete miatt, a tényleges úthossz kisebb, mint a kapilláris belső átmérője, mivel a fénynek csak egy kis része halad át pontosan a kapilláris közepén.
Nagyobb érzékenység gyakran úgy érhető el, ha kis UV-tartományú hullámhosszt használunk a detektáláshoz. Például a peptidek és szénhidrátok nem erős színhordozók (kromoforok), de jól detektálhatók 200 nm-en, vagy az alatti hullámhosszakon. Az ilyen kis hullámhosszaknál történő detektálásnál csak rendkívül kis mértékben elnyelő puffereket szabad használni, mivel a nagy háttérabszorbancia növeli az alapvonal zaját és csökkenti a jelet. E tekintetben a foszfát és borát pufferek használata előnyös, viszont sajnos a legtöbb biológiai puffer (HEPES, CAPS, vagy Tris) használata gyenge eredményekhez vezet 215 nm alatt. A lineáris kimutatási tartományt nagyban korlátozza a detektorba jutó szórt fény. Ideális esetben a teljes fény a kapilláris közepén, és nem a falon keresztül hatol át. A CE-nél a lineáris kimutatási tartomány a kapilláris kis mérete és görbülete miatt általában alacsonyabban van, mint a folyadékkromatográfiás technikáknál (0.4 - 0.7 AU a CE-nél, 1.2-1.5 AU a LC-nél).
Az érzékenység és a lineáris kimutatási tartomány ugyan javítható a kapilláris belső átmérőjének növelésével, ezt azonban korlátozza az a tény, hogy nagyobb áramerősségek alkalmazása a kapilláris jelentős felmelegedését vonja maga után. A kapillárisátmérő kétszeres növelése például a jelabszorbancia kétszeres, de az áramerősség négyszeres növekedéséhez vezet. A túlzott áramfelhasználás (és így hőtermelődés) elkerülése érdekében olyan speciális kapillárisokat állítottak elő, melyek átmérőjét csupán az optikai fényút helyén növelték meg. Ilyen kapilláristípust képviselnek a "buborékcellás" (17. ábra) vagy a "Z-cellás" kapillárisok.



17. ábra Megnövelt fényutas (buborékcellás) kapilláris

A diódasoros detektálás lehetővé teszi, hogy csupán egyetlen, vagy egyszerre több hullámhosszon történjen a detektálás. A diódasoros detektor egy olyan akromatikus lencserendszerből áll, mely a fényt a kapillárisba fókuszálja, a fénysugarat ezután diffrakciós rács bontja fel különböző hullámhosszúságú összetevőire, majd ezek a megfelelő elrendezésben lévő fotodiódákra esnek. A fotodiódák száma akár több száz is lehet, és mindegyikük egy keskeny színképtartományt ölel fel. A diódasoros detektálás jól használható arra, hogy egy minta összes komponensére megkapjuk, milyen hullámhosszakon érhetők el abszorpciós maximumai. Egy megfelelő szoftver automatikusan kiszámolhatja ezen abszorpciós maximumokat és szükség esetén három dimenziós ábrázolásban is képes bemutatni az elemzési idő, hullámhossz és abszorbancia kapcsolatát (18. ábra).



18. ábra Diódasoros detektálás: 3 dimenziós adatanalízis

7. AZ ELEKTROFEROGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE

Minden analitikai elválasztási folyamat célja, hogy választ tudjunk adni a következő kérdésekre:
1. Milyen összetevőkből áll a minta?
2. Milyen koncentrációban vannak jelen az összetevők a mintában?

Míg az első kérdés megválaszolásával a minőségi (kvalitatív) analízis foglalkozik, a második kérdésre a mennyiségi (kvantitatív) analízis ad választ.

7.1 Minőségi analízis

A CE-nél a minőségi analízis az elektroferogramon található csúcsok azonosítását jelenti. Ez egy adott csúcs migrációs idejének vagy mozgékonyságának egy ismert vegyület kísérletileg kapott megfelelő eredményeivel való összehasonlításával történhet. Ha ugyanazokat a migrációs időket, illetve mozgékonysági adatokat kapjuk, akkor lehet, hogy a két vegyület azonos. A csúcsok nagy biztonsággal való azonosításának eljárása az alábbi:

- Az injektálást megelőzően adjunk a kérdéses vegyületből a mintához. Az elektroferogramon így kapott csúcsnak nagyobbnak kell lennie az eredeti csúcsnál, méghozzá váll kialakulása nélkül.
- Hajtsuk végre az előző eljárást más elválasztási módszerekkel is (pl.: MEKC, HPLC). Ha nem kapunk más csúcsokat is, akkor a csúcs azonosítását már szinte biztosra vehetjük.
- Teljes bizonyossággal azonosíthatunk egy kérdéses csúcsot, ha kémiai szerkezeti információkat is nyerünk a vegyületről (pl.: CZE-MS technikával).

A csúcsoknak a migrációs idejük alapján történő összehasonlítása állandó kísérleti körülményeket feltételez. A működési paraméterek (pl.: hőmérséklet, puffer pH, puffer ionerőssége, stb.) kis mértékű megváltozása is hatással lehet a részecskék mozgékonyságára, és így megbízhatatlanná válhat a csúcs azonosítása.

7.2 Mennyiségi analízis

A mennyiségi analízis információt nyújt a minta egy összetevőjének mennyiségéről vagy koncentrációjáról az elektroferogram egy csúcsának magassága, vagy területe alapján. Míg a csúcsmagasság közvetlenül leolvasható az elektroferogramról, a csúcsterület meghatározásához egy integráló egység (számítógépes szoftver) szükséges. Az anyag ismeretlen mennyisége vagy c_x koncentrációja az a_x csúcsterület és az ismert koncentrációjú standard minták $a_{1...n}$ csúcsterületeinek korrelációja alapján számolható ki. Ehhez két fő eljárás, a külső standard és a belső standard módszerek ismeretesek. Mindkét módszer széles körben használatos az analitikai kémiában.

8. GYAKORLATOK A CZE ALKALMAZÁSÁHOZ

A készülék bekapcsolása és üzemképes állapotba hozása után a kapillárist 10-10 percig 0.1 M NaOH-oldattal, majd a puffer oldattal kell mosatni (kondícionálni). Ezek a szűrt oldatok a gyakorlaton rendelkezésre állnak. A kondícionálási eljárás időtartama alatt kell viszont elkészíteni és 0.45 μm-es szűrőn átszűrni az elemzésre váró oldatokat. A gyakorlat során az alábbi feladatok közül egyet kell végrehajtani.

8.1 Alkálifém és alkáliföldfém ionok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 5 mM imidazol, pH=4.5 kénsavval beállítva
Kapilláris: l_{eff}= 56 cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 25 kV
Detektálás: 214 nm, indirekt ("negatív csúcsok")
Minták: 1. K^+, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Na^+, Li^+ tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 10, 30, 50 μg/ml Ca^{2+}-tartalmú oldatok
3. ivóvíz

Feladat:

1. Ca^{2+} migrációs idejének megadása
2. A többi ion migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonysági adatok alapján (K: 0.68, Na: 0.48, Ca: 0.45, Ba: 0.42 cm^2/kVs)
3. A Ca^{2+} ismeretlen koncentrációjának meghatározása
4. Az ivóvíz fő fémion-tartalmának kvalitatív meghatározása

8.2 Alkilaminok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 5 mM imidazol, pH=4.5 kénsavval beállítva
Kapilláris: l_{eff}= 56 cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 25 kV
Detektálás: 214 nm, indirekt ("negatív csúcsok")
Minták:

1. trimetil-ammónium, tetrametil-ammónium, tetraetil-ammónium és tetrabutil-ammónium ion tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM tetrabutil-ammónium ion tartalmú oldatok

Feladat:

1. A tetrabutil-ammónium ion migrációs idejének megadása
2. A többi kation migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonysági megfontolások alapján
3. A tetrabutil-ammónium ion ismeretlen koncentrációjának meghatározása

8.3 Nukleotidok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 20 mM foszfát, pH=7.5
Kapilláris: l_{eff}= 56 cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 25 kV
Detektálás: 200 nm

Minták:

1. NADH, AMP, ADP, ATP tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM ADP tartalmú oldatok

Feladat:

1. Az ADP migrációs idejének megadása
2. A többi nukleotid migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonysági megfontolások alapján
3. Az ADP ismeretlen koncentrációjának meghatározása

8.4 Tartósítószer anyagok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 20 mM borát, pH=9.4
Kapilláris: l_{eff}= 56 cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 30 kV
Detektálás: 192 nm

Minták:

1. Benzoesav, szorbinsav és szalicilsav tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM benzoesav tartalmú oldatok

Feladat:

1. A benzoesav migrációs idejének megadása
2. A benzoesav ismeretlen koncentrációjának meghatátrozása
3. "Coca Cola" konzerválószerének meghatározása

9. A SEGÉDANYAGBAN SZEREPLŐ RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

CE	Capillary electrophoresis	Kapilláris elektroforézis
CGE	Capillary gel electrophoresis	Kapilláris gélelektroforézis
CIEF	Capillary isoelectric focusing	Kapilláris izoelektromos fókuszálás
CITP	Capillary isotachophoresis	Kapilláris izotakoforézis
CZE	Capillary zone electrophoresis	Kapilláris zónaelektroforézis
EOF	Electroosmotic flow	Elektroozmotikus áramlás
GC	Gas chromatography	Gázkromatográfia
HPCE	High performance capillary electrophoresis	Nagyteljesítőképességű kapilláris elektroforézis
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagynyomású (nagyteljesítő-képességű) folyadékkromatográfia
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography	Micelláris elektrokinetikus kromatográfia
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
NF		Nagyfeszültség
RSD	Relative standard deviation	Relatív standard deviáció
UV	Ultra-violet	Ibolyántúli (fény)

ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK

1. Ismertesse a következő fogalmak illetve analitikai paraméterek jelentését: elektroforézis, elektroozmotikus áramlás
migrációs idő, elméleti tányérszám, diszperzió, felbontás

2. Adja meg az elektroozmotikus áramlás szabályozásának lehetőségeit.

3. Ismertesse a kapilláris elektroforézis készülék felépítését.

4. Jellemezze a kapilláris elektroforézisnél használatos két legfontosabb minta injektálási módszert.

5. Mik az UV-látható fényabszorpciós detektálás sajátosságai és problémái kapilláris elektroforézisnél?

6. Ismertesse az elektroferogramok kiértékelésének fontosabb módszereit, lépéseit.

IRODALOM

- H.Engelhardt, W.Beck, T.Schmitt: *Capillary electrophoresis*, Friedr.Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1996 (ISBN 3-528-06668-7)
- R.Kuhn, S.Hoffstetter-Kuhn: *Capillary electrophoresis,* Springer-Verlag, New York, 1993 (ISBN 0-387-56434-9)
- D.N.Heiger: *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, 1992 (ISBN 12-5091-6199E)