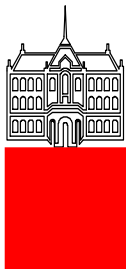


Univerza v Ljubljani

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo



Doktorski študijski program Kemija

## ***Nova področja v analizni kemiji***

Seminar 2011

**Nosilec predmeta: prof. dr. Boris Pihlar**

Seminarska naloga je izdelana v okviru študijskih obvez podiplomskega predmeta *Nova področja v analizni kemiji*. Delo ni lektorirano ali vsebinsko korigirano s strani predavateljev ali drugih univerzitetnih inštitucij. Avtor in inštitucija ne jamčita za pravilnost podatkov in navedb v objavljenem gradivu. Gradivo predstavljeno v tem delu je avtorska lastnina, oziroma last navedenih virov, iz katerih je bilo povzeto.

FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO  
UNIVERZA V LJUBLJANI

# Micelarna elektrokinetična kromatografija

Seminarska naloga pri predmetu  
Nova področja v analizni kemiji

**Polonca Nedeljko**

Junij, 2011

## KAZALO:

---

MICELARNA ELEKTROKINETIČNA KROMATOGRAFIJA (MEKC) .....	2
1 UVOD MEKC.....	2
2 TEORIJA: MEKC .....	3
3 TEORIJA: SURFAKTANTI in MICELE .....	8
3.1 Surfaktanti .....	8
3.2 Micele .....	9
4 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE OBČUTLJIVOSTI.....	12
4.1 »On-line« metode za pred-pripravo vzorca .....	12
5 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE LOČLJIVOSTI.....	17
5.1 Inkorporiranje aditivov v vodno fazo .....	17
5.2 Uporaba različnih micelnih faz .....	18
6 APLIKACIJE .....	19
6.1 Detekcijske tehnike .....	19
7 ZAKLJUČEK.....	21
8 REFERENCE .....	22

# MICELARNA ELEKTROKINETIČNA KROMATOGRAFIJA (MEKC)

## 1 UVOD

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska analizna metoda, pri kateri se komponente vzorca ločijo zaradi različne hitrosti potovanja v kapilari pod vplivom električnega polja. Uveljavlja se kot dobra alternativa tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC) in daje primerljive rezultate, hkrati pa za analizo porabi veliko manj vzorca in topil [1]. Kapilarna elektroforeza je doživela velik razvoj in nastalo je več podskupin te separacijske tehnike kot so:

- Kapilarna conska elektroforeza (CZE), kjer se molekule ločujejo na osnovi različnih mobilnosti;
- Micelna elektrokinetična kromatografija (MEKC), kjer se molekule ločujejo na osnovi interakcij z miceli;
- Kapilarna gelska elektroforeza (CGE), kjer se molekule ločujejo na osnovi velikosti in naboja;
- Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF), kjer se molekule ločujejo na osnovi različnih izoelektričnih točk;
- Kapilarna izotahoforeza (CITP);
- Kapilarna elektrokromatografija (CEC).

MEKC so prvič uporabili leta 1984 in je zelo hitro postala metoda za analizo majhnih nabitih in nevtralnih molekul, kjer se molekule ločujejo na osnovi interakcij z miceli. MEKC postaja vedno bolj novejša in inovativnejša glede same metodologije in instrumentalizacije za doseganje povečane občutljivosti in ločljivosti. Slabost MEKC je predvsem slaba občutljivost kompleksnih realnih vzorcev, zato se za obogatitev vzorca pri rutinskih preiskavah najpogosteje uporabljata dva »on-line« pristopa predpriprave vzorca in sicer »stacking« ter »sweeping« ali kombinacija obeh. Za še večjo izboljšanje občutljivosti se za odstranjevanje interferenc iz matriksa vzorca uporabljata »off-line« predkoncentracijski tehniki kot sta ekstrakcija na trdni fazi (SPE) in mikro-ekstrakcija na trdni fazi (SPME). Prav tako so bile narejene študije v smeri izboljšav različnih sklopitev (MEKC-MS, PE-MEKC-ESI-MS, PE-MEKC-APPI-MS, MEKC-LIF) [2,3].

## 2 TEORIJA: MEKC

MEKC omogoča separacijo majhnih nabitih in nevtralnih komponent vzorca. Ločitev analitov poteka ob priključitvi visoke napetosti v stekleni kapilari, ki je napolnjena z elektroforeznim pufrom. Posebnost MEKC je priprava pufra, ki mu dodamo površinsko aktivne snovi (PAS) oz. surfaktante, ki nad kritično micelno koncentracijo (CMC) tvorijo micelle, sferične agregate. Ko v pufer, ki vsebuje micelle, injiciramo vzorec, se začne vzpostavljati dinamično ravnotežje med komponentami vzorca zunaj in v notranjosti micel. Čim bolj so komponente vzorca napolarne, več časa bodo v micelah ( $t_{mc}$ ). Povprečni čas, ki ga komponente prebijejo v micelah, je od nekaj  $\mu\text{s}$  do  $250 \mu\text{s}$ , življenjska doba micel pa od  $100 \text{ ms}$  do  $1000 \text{ ms}$ . Odvisno od tipa površinsko aktivnega sredstva je lahko površina micel negativno ali pozitivno nabita, v primeru neionogenih površinskih sredstev pa nevtralna. Najpogosteje se uporabljajo anionska PAS. Komponente vzorca se porazdelijo med vodno fazo pufra in notranjostjo micel glede na njihovo hidrofobnost. Najbolj hidrofilne komponente bodo ves čas prebile v vodni fazi, najbolj hidrofobne pa v notranjosti micel. Komponente z vmesnimi lastnostmi se bodo zaradi dinamičnega ravnotežja porazdelile med vodno fazo pufra in fazo micel. Zaradi naboja, ki ga micelle nosijo na površini, nanje deluje sila električnega naboja. Rezultat je hiter EOF proti katodi in počasi se gibajoče micelle v isti smeri. Zaradi EOF v kapilari je pretok medija skozi kapilaro po celotnem preseku in dolžini kapilare enak in ne pride do padca tlaka. EOF omogoča gibanje skoraj vseh delcev v isto smer, ne glede na njihov naboj saj je EOF močnejši od elektroforezne mobilnosti molekul. Najhitreje se zato gibljejo majhni delci s pozitivnim nabojem, sledijo jim veliki delci, nato nevtralni delci in nazadnje še delci z negativnim nabojem [4]. Elektroforetska separacija temelji na razlikah v hitrosti potovanja nabitih delcev. Hitrost nabitega delca je podana kot:

$$v = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{V}{L} \quad (1)$$

pri čemer je  $v$  migracijska hitrost nabitih delcev ( $\text{cm sec}^{-1}$ ),  $\mu_{ep}$  elektroforetska mobilnost ( $\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ),  $E$  električno polje ( $\text{V cm}^{-1}$ ),  $V$  napetost (V) in  $L$  dolžina kapilare (cm). Elektroforetska mobilnost je podana z enačbo 2:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

kjer je  $q$  naboj iona,  $\eta$  viskoznost in  $r$  radij iona. Hitrost elektroosmotskega toka je premosorazmerna jakosti električnega polja:

$$v = \mu_{eo} E = \left( \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E \quad (3)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (4)$$

pri čemer je  $v$  elektroosmotska mobilnost,  $\varepsilon_0$  dielektrična konstanta vakuuma,  $\varepsilon$  dielektrična konstanta pufra,  $\zeta$  zeta potencial,  $\eta$  viskoznost in  $E$  električno polje. Enačba za

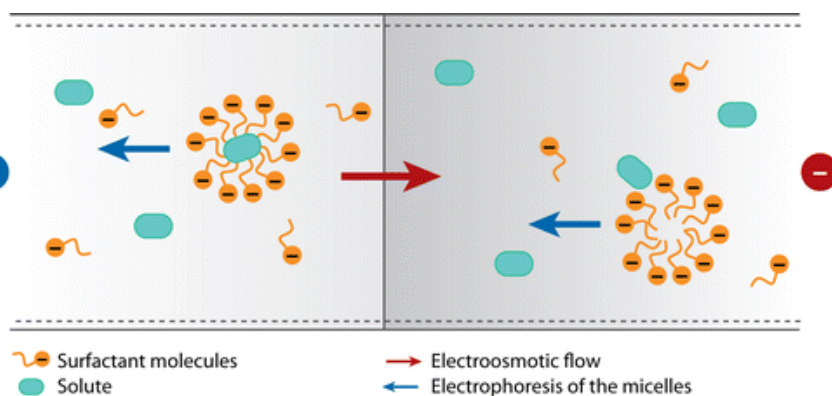
elektroosmotsko mobilnost  $\mu_{eo}$  (4) je podobna enačbi za elektroforetsko mobilnost, kar kaže, da obe temeljita na istih fizikalnih pojavih.

Na povečanje oz. zmanjšanje EOF lahko vplivamo:

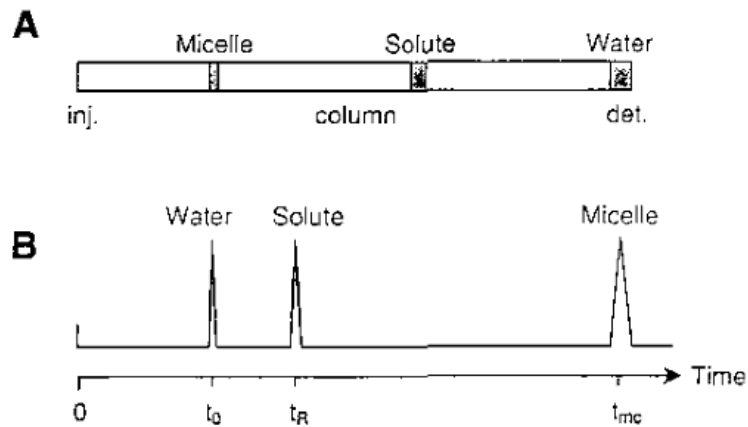
- z ionsko močjo ali koncentracijo pufra,
- z zmanjšanjem/večanjem pH pufra,
- z dodatkom organskih topil,
- z električnim poljem,
- z prevlekami sten kapilar,
- s površinsko aktivnimi snovmi,
- z nevtralnimi hidrofилnimi polimeri in
- s temperaturo.

Velikost in smer EOF je odvisna od sestave kapilare in narave raztopine v kapilari. Ko je silica v stiku z vodno raztopino, pride do hidrolize in nastanka silanolnih skupin na površini. Te skupine so lahko pozitivno nabite ( $\text{SiOH}_2^+$ ), nevtralne ( $\text{SiOH}$ ) ali negativno nabite ( $\text{SiO}^-$ ), odvisno od pH raztopine. EOF nastane zaradi negativnega naboja silanolnih skupin ( $\text{SiO}^-$ ) ob steni kapilare, ki privlači katione, predvsem oksonijeve ione  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Ko pride v kapilaro vzorec, se pozitivni delci vežejo na negativno steno kapilare in s tem nastane dvojna plast, v bližini kapilare pa se ustvari zeta potencial.

Prikaz potovanja micel in surfaktantov v kapilari pod vplivom EOF je prikazan na sliki 2.1. Slika 2.2 prikazuje shematski prikaz separacije v MEKC in kromatogram.



**Slika 2.1** Potovanje micel in molekul surfaktantov v kapilari pod vplivom EOF.



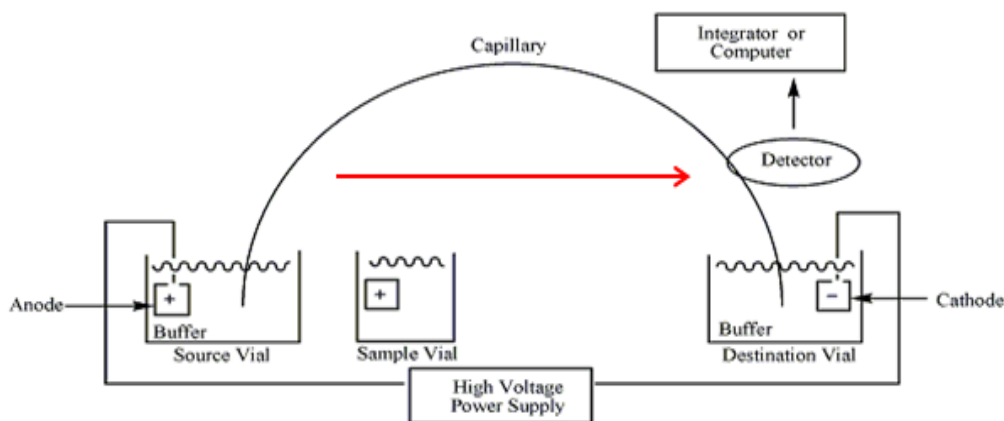
**Slika 1.2:** Shematski prikaz separacije v MEKC (a) in kromatograma (b) [1].

### ❖ Injiciranje

Injiciranje vpliva na disperzijo ločenih con in s tem na kvaliteto ločbe, zato moramo injicirati v čim ožjem območju. Volumen vnešenega vzorca je reda velikosti nekaj 10 nL. Pozorni moramo biti tudi na koncentracijo injiciranega vzorca. V primeru, da je koncentracija veliko večja od koncentracije pufru, pride do znižanja učinkovitosti ločbe zaradi motenj v jakosti električnega polja. Pri metodi MEKC obstajata dva glavna načina injiciranja:

- I. **Elektrokinetični** - Kapilaro napolnimo s pufrom in vanjo injiciramo nekaj nanolitrov vzorca. Za določen čas (0,5–30) s priključimo napetost, ki povzroči, da preide določena količina vzorca v kapilaro. Količina vzorca, ki vstopi v kapilaro je odvisna od višine in dviga vial z vzorcem nad kapilaro.
- II. **Hidrodinamski** - Vzorec vnesemo v kapilaro s pomočjo razlike tlakov med obema koncema kapilare (z nategom, nadtlakom ali s podtlakom). Nadtlak oz. podtlak vzpostavimo preko sistema ventilov, količina injiciranega vzorca je v tem primeru odvisna od tlačne razlike.

Ko je injiciranje končano, konec kapilare ponovno potopimo v pufer in priključimo visoko napetost ( $0 \pm 30$  kV). Tok, ki pri tem steče skozi kapilaro, navadno ne preseže  $200 \mu\text{A}$ , odvisen je od napetosti, koncentracije pufru, vrste pufru ter dolžine in premera kapilare [3]. Injiciranje vzorca v kapilaro prikazuje slika 2.3.



**Slika 2.3** Shematski prikaz injiciranja vzorca v kapilarno.

### ❖ Detekcija

Detekcija predstavlja enega glavnih problemov pri CE in MEKC, saj majhni volumski pretoki omogočajo uporabo klasičnih detektorjev, uporabnih za HPLC. Kot detektorsko celico uporabljamo del kapilare iz katere odstranimo poliamidno zaščito. Molekule, ki se ločijo na koncu kapilare pridejo skozi detektor, kar nam daje signale, ki se zapišejo na elektroferogramu. Najbolj običajna detekcija je v območju UV-VIS-spektra, njena pomanjkljivost pa je majhna občutljivost, zaradi nizke koncentracije vzorca. Razlog za to je kratka pot svetlobe skozi vzorec, ki ima dolžino notranjega premera kapilare. Obstajajo še drugi načini detekcije, kot so:

- fluorescenčna,
- kemiluminiscenčna,
- amperometrična,
- konduktometrična in potenciometrična detekcija in
- detekcija z masno spektrometrijo.

Občutljivost se lahko poveča z uporabo posebnih visokoenergetskih žarnic (lahko tudi laserji), natančno namestitvijo kapilar v optično pot žarka in pravilno izbiro reže na kapilari. Če komponente vzorca same ne absorbirajo svetlobe ali ne fluorescirajo, se nanje vežejo posebne kromoforne spojine, ki omogočajo detekcijo. V takem primeru se lahko uporabi tudi t.i. indirektna detekcija, pri kateri v delovni pufer dodamo snov, ki močno absorbira svetlobo ali fluorescira [3].

### ❖ Kapilare

Kapilare so osrednji element celotnega sistema, saj v njih poteka ločitev molekul. Znotraj kapilare imamo tako dve fazi, micelno - psevdo-stacionarno fazo in vodno - mobilno fazo, ki se giblje hitreje. Mehanizem ločitve pri MEKC temelji na hidrofobnih interakcijah med molekulami iz vzorca in miceli, če pa imajo molekule pri pH pufru naboj, je pomembna tudi elektroforezna mobilnost. Najpogosteje so izdelane iz kremenčevega stekla, ki prepušča UV-svetlobo in je obstojno v širokem območju pH ter nereaktivno. Zunanja stran je prevlečena s plastjo poliamida, ki zagotovi mehansko odpornost. Kapilare so lahko neobdelane, kar lahko



privede do adsorpcije komponent vzorca in s tem poslabšanja ponovljivosti ločbe, ali obdelane (uporabimo lahko metilcelulozo, ciklodekstrine, poliakrilamid in drugo), kar lahko povzroči obrat elektroosmotskega toka ob priklučitvi električne napetosti z obrnjeno polariteto na elektrodah. Kapilare so lahko obložene tudi v notranjosti. Njihov premer sega od (20–100)  $\mu\text{m}$ , dolžina pa od (25–122) cm [3].

#### ❖ Puffer

Vrsta in koncentracija delovnega pufrta sta velikega pomena za uspešno ločitev molekul. Najpogosteje gre za raztopine anorganskih soli v vodi, to sta na primer fosfatni (pH 7) in boratni (pH 9,3) puffer, ki jim lahko dodamo PAS, organske modifikatorje ali kiralne spojine. Zelo pomembna je pravilna uporaba pufrta (pH, ionska moč, temperatura). Prav tako je pomembno, da upoštevamo topnost in stabilnost molekul iz vzorca v pufrtu [3].

- pH - vpliva na EOF in elektroforetsko mobilnost šibkih kislin in baz;
- Ionska jakost - nizka ionska jakost povzroči, da se vzorec veže na kapilare, visoka pa, da se vzorec ne more vezati. Posledica tega je uporaba močnejše električne napetosti, kar povzroča segrevanje kapilare (Joule-ovo segrevanje);
- Temperatura - vpliva na ločitev pri MEKC iz več vzrokov. V splošnem povečanje temperature zmanjša koncentracijo prostih micel, saj se poveča CMC. S spremembo temperature se spremeni porazdelitveni koeficient.

Pri MEKC lahko z različnimi aditivi oz. modifikatorji modificiramo puferski sistem. Organski modifikatorji spremenijo polarnost vodne faze, povečajo viskoznost puferskega sistema in s tem upočasnijo EOF ali pa preprosto vplivajo na  $t_{mc}$  (retencijski čas analita, ki je popolnoma "raztopljen" v micelah). Delež organskega modifikatorja lahko gradientno spreminjamo, s tem skrajšamo retencijske čase in izboljšamo kakovost ločbe [4]. Retencijski čas in kapacitivni faktor (enačba 5) sta odvisna od pretoka mobilne faze in dolžine kolone. Vrednost kapacitivnega faktorja variira med nič (analit preide skozi kolono nezadržan) in neskončnostjo (analit se popolnoma veže in ga pri danih pogojih ni mogoče eluirati).

$$k' = (n_{mc} / n_{aq}) \quad (5)$$

pri čemer je  $n_{mc}$  analit inkorporiran v micela in  $n_{aq}$  analit v vodni raztopini.

V nekaterih primerih želimo EOF zmanjšati ali celo preprečiti. To lahko storimo tako, da pufrtu dodamo modifikator in s tem spremenimo površinske kapilare. Kationske PAS, kot npr. cetil-trimetil-amonijev bromid (CTAB), se vežejo na steno kapilare in spremenijo predznak površinskega naboja. Odvisno od koncentracije PAS se EOF upočasnijo ali se celo obrne njegova smer. EOF lahko zmanjšamo tudi, če uporabimo kapilare, napolnjene z gelom.

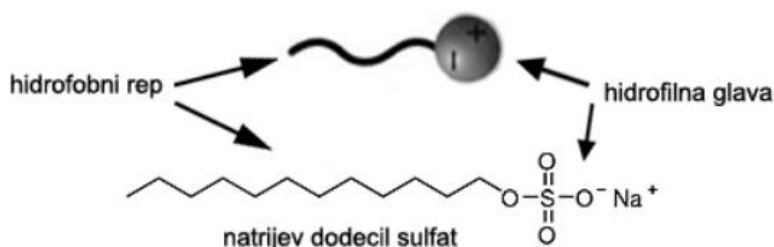
### 3 TEORIJA: SURFAKTANTI in MICELE

#### 3.1 Surfaktanti

Surfaktanti ali površinsko aktivne snovi so amfilili. To so molekule, ki so sestavljene iz polarnih in nepolarnih delov. V večini primerov so na dolge nepolarne, hidrofobne verige ali "repe" pritrjene polarne skupine ali "glave", kot je prikazano na sliki 3.1. Glede na zgradbo polarne glave, jih razdelimo med ionske (kationske, anionske, amfoterične) in neionske. Njihova zgradba jim omogoča zmanjšati površinsko napetost tekočine in omogočiti lažjo disperzijo, omočenje ali mešanje različnih tekočin. Topni so tako v polarnih topilih kot tudi v nepolarnih, vendar je njihova topnost omejena.

Kadar koncentracija surfaktanta pri določenih pogojih preseže neko določeno vrednost se začnejo tvoriti organizirane, sferične strukture, miceliji. To koncentracijo imenujemo kritična micelna koncentracija (CMC) in je definirana kot koncentracija surfaktanta, nad katero se miceliji spontano tvorijo. CMC za tvorbo micel je odvisna od temperature, ionske moči in pufra. Ker večina analitov interagira z micelami na njihovi površini, so pri določanju selektivnosti bolj pomembne hidrofilne ali ionske skupine kot hidrofobne [5]. Najpogosteje uporabljene PAS so:

- **SDS** – natrijev dodecil sulfat
- **STS** – natrijev tetradecil sulfat
- **CTAB** – cetil-trimetil-amonijev bromid
- **Žolčne kisline** – holna kislina, deoksiholna kislina



**Slika 3.1:** Primer anionskega surfaktanta (SDS) z nepolarnim "repom" in polarno "glavo" [4].

- **Anionsko površinsko aktivne snovi (SDS)**

V vodi disociirajo na amfililni anion in kation, ki je običajno predstavnik alkalijskih kovin ( $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$ ). Uporabljajo se kot mila, čistilna sredstva in detergenti, pa tudi kot topila, "wetting agents" za trdne snovi in kot emulzifikatorji.

- **Kationsko površinsko aktivne snovi (CTAB)**

V vodi disociirajo na amfililni kation in anion, ki je najpogosteje halogen. Osnova teh molekul je kationski naboj na kvartarnem N atomu. Najpogostejše so kvartarne amonijeve spojine z eno ali več verigami (do štiri) alkilnega tipa. Ta vrsta surfaktantov je veliko dražja od anionskega tipa površinsko aktivnih snovi. Predvsem zaradi dražjega sinteznega postopka (pod visokim tlakom), zato se uporabljajo le v namene, ko ni cenejše rešitve. Imajo velik

komercialni pomen na področju korozijske zaščite in so uspešni, kot inhibitorji korozijskih procesov.

- **Amfoterično površinsko aktivne snovi (»zwitterioni«)**

Na isti molekuli se nahajata pozitivni in negativni naboj. V odvisnosti od pH so lahko v kationski, zwitterionski ali anionski obliki. Glavni predstavniki te vrste surfaktantov so betaini, in sulfobetaini, ki spadajo med sintetične produkte, ter aminokisljine in fosfolipidi, ki so naravnega izvora.

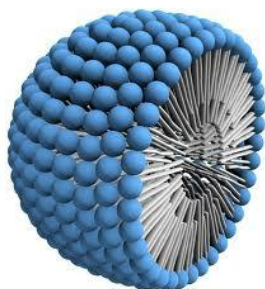
- **Neionizirano površinsko aktivne snovi**

Ne ionizirajo v vodnih raztopinah, zaradi neionizirajoče hidrofilne skupine, ki je običajno alkohol, fenol, eter, ester ali amid. Večji del neionskega surfaktanta deluje hidrofilno zaradi prisotne polietilen glikolne verige, dobljene z polikondenzacijo etilen oksida. Odlikuje jih nizka toksičnost in visoka stabilnost v bioloških sistemih. Uporabljajo jih kot stabilizatorje, "wetting agents", dispergante, detergente in emulzifikatorje. Neionske in zwitterionske PAS, kot npr. oktil glukozidi ali propan sulfonat, imajo nekaj prednosti pred ionskimi PAS. Manj vplivajo na velikost EOF in v višjih koncentracijah ne prispevajo k prevodnosti pufra ter s tem k električnemu toku in tvorbi toplote.

Poseben primer so žolčne soli, ki tvorijo spiralne micelle. Te se manj uporabljajo, vendar imajo zaradi posebne strukture in agregacijskih lastnosti precej prednosti pred PAS [5].

## 3.2 Micele

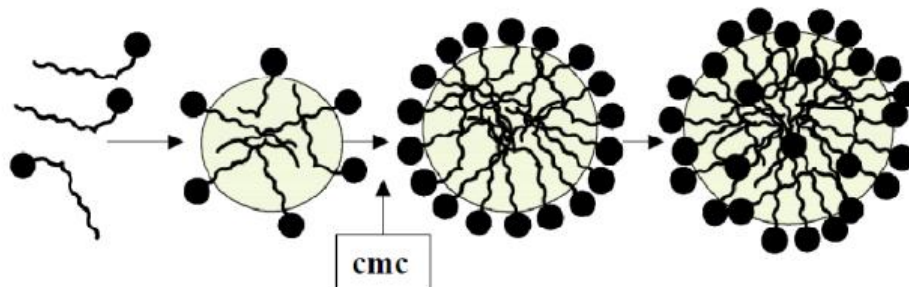
Micelle so molekularni agregati PAS. V notranjosti imajo hidrofobno jedro, na površini pa so hidrofilni deli PAS, ki so v stiku z vodno fazo pufra (slika 3.2).



**Slika 3.2:** Struktura micelle.

Zelo pomemben podatek, ki karakterizira obnašanje surfaktanta, je tako imenovana CMC. V vodnih raztopinah nizkih koncentracij so molekule PAS asociirane v monomere, dimere, trimere ali oligomere, odvisno od vrste PAS. Ko je koncentracija surfaktanta dovolj visoka, t.j. približno enak CMC, se molekule surfaktanta začno združevati v gruče - agregate, v tako imenovane 'micelije' kot je prikazano na sliki 3.3. Spontana agregacija nastane zaradi naraščajočih hidrofobnih interakcij PAS pri višjih koncentracijah. Hidrofobna interakcija je

pojav, ko so molekule PAS potisnjene skupaj s strani polarnega medija. S tem se zmanjša stopnja urejenosti v vodi (naraščanje entropije).

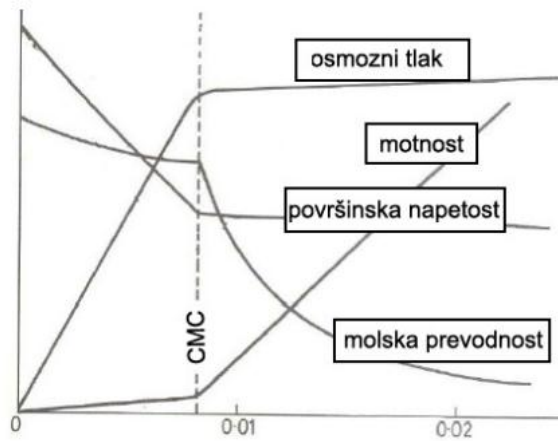


**Slika 3.3:** Potek micelizacije amfifila [4].

Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije surfaktantov v raztopini se povečuje le koncentracija micelijev, medtem ko ostane koncentracija monomerne oblike nespremenjena, enaka CMC. Da bi lažje razumeli tvorbo micelijev v vodnih raztopinah, moramo najprej poznati lastnosti vode. Voda ima predvsem tri pomembne lastnosti; sposobnost disociiranja v  $H^+$  in  $OH^-$  ione, polarnost in sposobnost tvorjenja vodikovih vezi (H-vezi). Za proces micelizacije je pomembna predvsem tvorba H-vezi, ki povzročata hidrofobni efekt. Vsaka molekula vode je v povprečju povezana s 3-4 sosednjimi molekulami vode. Vnos surfaktanta v raztopino poruši to organizacijo molekul. Napolarni hidrofobni deli v raztopini pomenijo zmanjšanje možnosti vodnih molekul povezati se med seboj. Te molekule bodo zaradi manjšega števila vezi imele manjšo entropijo. Težnja sistema je povečati entropijo, zato bodo molekule vode skušale izključiti nopolarne dele iz raztopine, kar poznamo kot hidrofobni efekt.

Strukturna različnost in velikost micelijev izhaja iz razmerja med površino in volumnom micelija. Ta lastnost je opisana z agregacijskim številom  $n^\circ$ , ki podaja povprečno število molekul surfaktanta v miceliju. V večini primerov se giblje med 50 in 100. Na tak način je vzpostavljeno ravnotežje, ki onemogoča stik vode in hidrofobnega jedra, hkrati pa ne ustvarja prevelikega odboja med polarnimi skupinami.

Surfaktanti z daljšimi ogljikovodikovimi verigami imajo nižjo vrednost CMC, predvsem zaradi nižje topnosti v vodi. Ionski surfaktanti, ki so za razliko od neionskih bolj topni v vodi, imajo posledično višjo vrednost CMC. Zaradi večjega elektrostatskega odboja med hidrofilnimi glavami (polarnimi skupinami) imajo ionski surfaktanti tudi večje agregacijsko število. Iz tega sledi, da je geometrija in velikost micelija odvisna od molekule surfaktanta in naboja, ki ga nosi. CMC lahko določimo z merjenjem površinske napetosti, molske prevodnosti, osmotskega tlaka, motnosti ali z drugimi metodami, saj se vrednosti le-teh bistveno spremenijo ob koncentraciji, ki je večja od CMC (slika 3.4).



**Slika 3.4:** Fizikalne lastnosti raztopine surfaktanta [4].

Z naraščanjem koncentracije PAS se število micel, njihova oblika, velikost in konformacija lahko precej spremenijo. Pri zelo visokih koncentracijah se tvorijo agregati, t.i. liotropne tekočinske-kristalne faze in končno trdni geli.

Micele iz ionskih PAS zaradi naboja elektroforetsko potujejo, npr. negativne micelle proti anodi in pozitivne micelle proti katodi. V večini primerov je elektroosmotska hitrost višja od elektroforetske hitrosti micel, zato tudi negativno nabite micelle potujejo proti katodi.

Če analit uvedemo v micelarni sistem, se le-ta porazdeli med hidrofobno micelarno fazo in vodno fazo. Porazdelitev opisuje porazdelitveni koeficient  $P$ , ki je odvisen od polarnosti analita [4-5].

## 4 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE OBČUTLJIVOSTI

### 4.1 »On-line« metode za pred-pripravo vzorca

Največjo slabost CE in posledično MEKC metode predstavlja majhna občutljivost v primeru uporabe fotometrične detekcije. Za obogatitev vzorca se pri rutinskih preiskavah najpogosteje uporabljata dva »on-line« pristopa predpriprave vzorca:

- I. »stacking« in
- II. »sweeping«.

Vse pogostejše so tudi kombinacije »on-line« in »off-line« pristopov. Nekoliko manj se uporabljajo »off-line« metode, med katerimi sta najpogosteje uporabljeni SPE in SPME.

#### I. »Stacking« pristop

Princip »stracking« pristopa temelji na zbiranju ionov vzorca na meji, ki se ustvari zaradi razlik v prevodnosti med raztopino vzorca (nizka prevodnost) in raztopino pufr (visoka prevodnosti). Obstaja več vrst "stacking" pristopov in s tem pogojev uporabe. Nekateri so navedeni v tabeli 4.1 [7]:

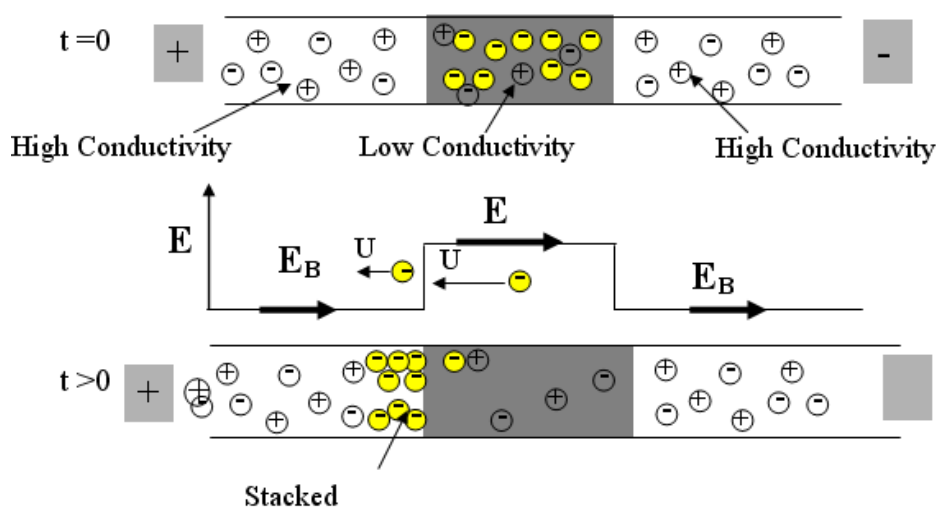
- a) Obstoječi "normalen" pristop (*Normal stacking mode, NSM*)
- b) Sistem na osnovi zamenjave polaritete elektrod (*Reversed electrode polarity stacking mode, REPSM*)
- c) Pristop z migracijo reverzних micel (*Stacking with reverse migrating micelles, SRMM*)
- d) Območje izboljšanja injiciranja vzorca (*Field-enhanced sample injection, FESI*)
- e) Območje izboljšanja injiciranja vzorca z migracijo reverzних micel (*Field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles, FESI-RMM*).

**Tabela 4.1:** Pogoji uporabe različnih »stacking« pristopov v MEKC z dodatkom anionskih PAS (SDS) [7].

Pristop	Matriks vzorca	pH pufr	EOF
<b>Hidrodinamično injiciranje</b>			
NSM	Nizka prevodnost (ni micel)	Bazičen, nevtralen	Katodni (močen)
REPSM	Nizka prevodnost (ni micel)	Bazičen, nevtralen	Katodni (močen)
SRMM	Nizka prevodnost (ni micel)	Kisel	Katodni (šibek)
<b>Elektrokinetično injiciranje</b>			
FESI	Nizka prevodnost (micele)	Bazičen, nevtralen	Katodni (močen)
FESI-RMM	Nizka prevodnost (micele)	Kisel	Katodni (šibek)

Kapilara je napolnjena s pufrom (visoka prevodnost, pH 9.6) v katerega so dodane PAS, ki so potrebne za tvorbo micel. Vzorčna raztopina z nizkim pH matriksom se injicira v kapilaro. Po celotnem območju kapilare se uporabi napetost, kar omogoči, da se raztopina vzorca vsrka v kapilaro pod vplivom EOF. S spreminjanjem elektroforezne hitrosti ionov vzorca v različnih območjih, se ti začnejo v določenem območju nalagati, s tem se poveča koncentracijsko območje, kar vpliva na izboljšanje in povečanje signala intenzivnosti. Vzpostavi se dinamično ravnovesje, ki je lahko vzpostavljeno precej dolgo časa, kar omogoča injiciranje velikih količin vzorca. Po injiciranju vzorca, se vijala za vzorec zamenja z

raztopino pufra pri čemer se spet uporabi napetost. Ta pristop je mogoče izvesti na komercialnih instrumentih brez kakršnih koli sprememb kapilare ali instrumenta [2,7]. Prikaz »stacking« pristopa je prikazan na sliki 4.1.



Slika 4.1: Shematski prikaz »stacking« pristopa [6].

Pri optimalnih pogojih, se občutljivost v smislu površine vrhov v primerjavi z običajnimi hidrodinamičnimi injiciranjmi brez uporabe »stacking« pristopa predkoncentriranja vzorca izboljša do 1400-krat. Čeprav je čas injiciranja vzorca daljši, se hitrost analize zmanjša. Za doseganje še boljših rezultatov so **Zhu in sodelavci** predlagali uporabo dveh novejših »stacking« metod, ki omogočata dodatno povečanje razlike v prevodnosti med območjema raztopine pufra in raztopine vzorca [8].

- I. **Uporaba visoko-prevodne cone**, ki je vstavljena med območje vzorca in ločevalnega pufra, da bi se vzpostavila enka gradientna prevodnost;
- II. **Nizko-temperaturno kopel** za zmanjšanje Joulove toplote, ki so povezane z uporabo visoke koncentracije ločevalnega pufra in s tem negativni vpliv na elektroforezno ločevanje.

Uporaba teh dveh novejših pristopov zagotavljata boljše učinkovitost z boljšo mejo detekcije ( $\mu\text{g/L}$ ). Prav tako so želeli izboljšati občutljivosti določanja kiralnih aminokislin. **Chiu in Chang** sta poročala 100-kratnem izboljšanju občutljivosti z uporabo metode MEKC in LIF detekcije [9].

Metodi kot sta SPE in SPME uvršamo med »off-line« metode predkoncentriranja vzorca in služijo predvsem za odstranjevanje interferenc iz matriksa vzorca, ki je običajno potrebna pred analizo vzorca za doseganje čistejših elektroferogramov. Omenjene metode so bile uporabljene za določanje velikega števila različnih analitov kot so: ertapenem in njegove nečistoče v farmacevtskih pripravkih, albumin in transferin v človeškem urinu, salbutamol, guaifenesin in diflin v oralnih oblikah, nesteroidna protivnetna zdravila v slini, ostanki pesticidov v rdečem vinu in paradižniku ter nonilfenol etoksilat v odpadnih vodah. Meja zaznavnosti pri določanju teh snovi je bila (50-500)-krat nižja kot pri konvencionalnem načinu injiciranja vzorca.



## II. »Sweeping« pristop

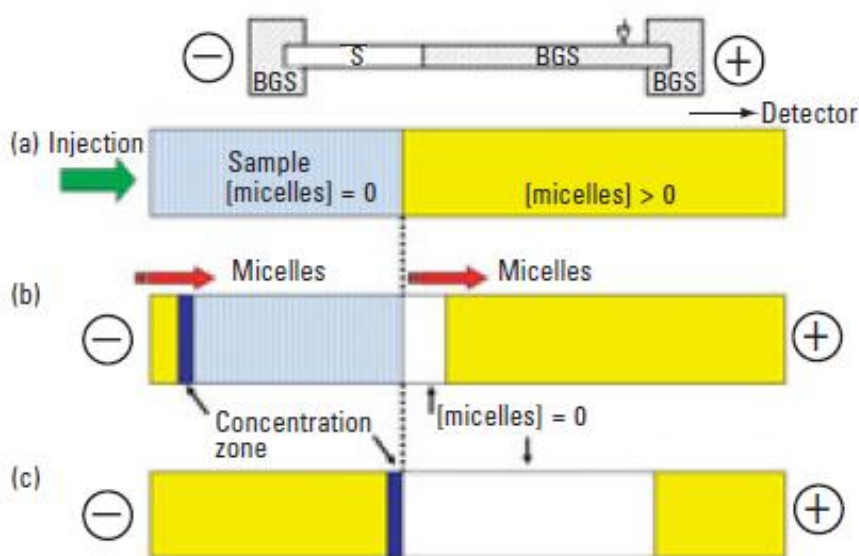
»Sweeping« pristop je druga oblika »on-line« predkoncentriranja vzorca za izboljšanje občutljivosti. Pristop temelji na predkoncentriranju analitov z micelno PSP, ki prodira v območje vzorca (ki ne vsebuje micel). Temeljni pogoji »sweeping« pristopa so:

- I. Matriks vzorca brez PSP
- II. Prevodnost raztopine vzorca je podobna oz. blizu prevodnosti pufru za zagotavljanje homogenega električnega polja v kapilari.

Tako kot pri »stacking« pristopu, obstaja več pristopov tudi pri »sweeping« pristopu.

- a) Kationsko selektivna ionizacija z elektroni (*Cation selective exhaustive injection sweepin, CSEI*)
- b) Anionsko selektivna ionizacija z elektroni (*Anion selective exhaustive injection sweepin, ASEI*)

Pri »sweeping« pristopu je kapilara napolnjena z raztopino ločevalnega pufru, ki se ji dodajo površinsko aktivne snovi, ki tvorijo micelle. Sledi injiciranje vzorčne raztopine. Micelle v puferni raztopini vstopajo v območje vzorca, zaradi česar pride do zbiranja oz. koncentriranja analitov v določenem območju. Proces zbiranja analitov poteka tako dolgo, da puferna raztopina z micelami preide celotno območje vzorca. Shematski prikaz »sweeping« pristopa prikazuje slika 4.2.



Slika 4.2: Shematski prikaz »sweeping« pristopa [6].

Pri številnih analitskih določitvah se za določevanje občutljivosti pogosto uporablja klasičen »sweeping« pristop. **Cao in sodelavci** so poročali o razvoju novih »on-line« tehnik predkoncentriranja vzorca, ki temeljijo na dvojnem »sweeping« pristopu. O dvojnem »sweeping« pristopu govorimo takrat, ko vzorec ne vsebuje micel in ima za razliko od »klasičnega« pristopa, različno viskoznost kot raztopina ločevalnega pufru [10].



### ❖ Kombinacija »stacking« in »sweeping« pristopa

Z uporabo »sweeping« pristopa se meja detekcije v MEKC za kationske analite zmanjša do (10-1000)-krat v primerjavi z normalnim injiciranjem. V primeru združitve »sweeping« in »stacking« pristopa pa se lahko za kationske analite doseže milijon-krat večja občutljivost.

#### • CSEI-sweeping

**Quirino in Terabe** so bili med prvimi, ki so poročali o CSEI-sweeping pristopu, ki temelji na osnovi selektivnega elektrokinetičnega injiciranja z dodajanjem kationskih surfaktantov oz. PAS. Prispevki glede uporabe pristopa CSEI-sweeping so bili osredotočeni predvsem na določanje drog in njihovih metabolitov v bioloških vzorcih. Meje detekcije, ki so bile dosežene v urinu so se gibale v  $\mu\text{g/L}$ , pri čemer so za zmanjšanje interferenc matriksa vzorca uporabili »off-line« SPE metode. CSEI-sweeping pristop se je uporabil tudi za izboljšanje občutljivosti v analizah posameznih antidepressivov v človeški plazmi, kjer se je izkazal za bolj občutljivega od ostalih konvencionalnih metod [11].

#### • LVSS-sweeping

**Chen in sodelavci** so uvedli enostavno, preprosto in zelo učinkovito metodo predkoncentriranja vzorca, ki kombinira dve »on-line« predkoncentracijski tehniki kot sta LVSS in »sweeping« brez preklapljanja polarnosti elektrod ali zmanjševanja EOF z hidrodinamičnim načinom injiciranja velikih volumnov vzorca [12].

#### • PF-MEKC z UV in ESI-MS detekcijo

Unčikovitost se lahko poveča z injicirane večjega volumna vzorca, kar vpliva na izboljšanje višine vrhov. K izboljšanju unčikovitosti prispeva tudi koncentracija surfaktantov micel v vzorcu, ki mora biti nizka in malo nad CMC ter razmerje prevodnosti (pufer/vzorec). To mora biti dovolj majhno za uspešen razpad micel. Omenjena strategija se je uporabila za določevanje alkil fenilketonov in dialkil ftalatov z metodo PF-MEKC z UV in ESI-MS detekcijo pri kateri gre za sklopitev MS z ESI vmesnikom, ki omogoča ionizacijo z razprševanjem v električnem polju. Rezultati so potrdili, da ta strategija lahko omogoča boljše (vplivne faktorje) za manj hidrofobne analite, kot v primeru uporabe »sweeping« pristopa [13].

#### • Kapilarna derivatizacija

Derivatizacija v kapilari (in-capillary) je zaradi svojih izjemnih prednosti kot so: nizka uporaba reagentov in vzorca, kratek reakcijski čas in možnost avtomatizacije brez posebne dodatne opreme še vedno učinkovita izbira v primerjavi z običajnimi konvencionalnimi pre- in post-kapilarnimi derivatizacijami. **Hu in sodelavci** so razvili hiter avtomatiziran pristop za derivatizacijo v kapilari, namenjeno za določanje alkaloidov efedrina in derivatov s pomočjo MEKC in detekcijo z lasersko inducirano fluorescenco (LIF) [14]. Pri postopku derivatizacije v kapilari, sta derivatizirani pufer kot vzorec in reagenčna raztopina injicirana direktno v kapilaro. Ob prisotnosti električne napetosti (5kV, 15s) se poveča unčikovitosti mešanja analitov in reagenčnih raztopin. Metoda kaže nekatere pomembne prednosti v primerjavi z obstoječimi alternativami, kot so: v celoti avtomatiziran derivatizacijski postopek, kratek čas analize, nizka meja zaznavnosti (1,6–4,8) mg/L in majhna poraba vzorca ter reagenta.

Za določanje ionov živega srebra na osnovi kolonske derivatizacije z nefluorescentnim derivatizacijskim reagentom rodamin-om, ki tvori močno fluorescentni produkt sta **Ma in**

**Kang** razvila enostavno in avtomatizirano metodo [15]. Derivatizacijski reagent je bil na hidrodinamičen način injiciran (0.5 psi, 5s) v kapilarno. Po izstopu iz kapilare je bil očiščen z namakanjem v viali, ki vsebuje metanol. Sledilo je injiciranje ionov živega srebra pod vplivom tlaka (0.5 psi, 50 s). Ob izstopu iz kapilare je sledilo namakanje v vodi. Reagent in ioni živega srebra so se zmešali pri napetosti 5 kV za 40 s. Nastali derivati so se analizirali z MEKC metodo, pri čemer so dosegli mejo detekcije  $5 \times 10^{-8}$  M in čas analize 10 minut.

- **SPME in MEKC**

Glavni cilj vseh pristopov je, da omogočajo visoko občutljivost določevanja analitov in enostavnost metode (avtomatizacija). Z določanjem parabens-ov v kozmetičnih produktih so **He in sodelavci** razvili izboljšan vmesnik »split-flow« za združitev z MEKC, s katerim bi lahko odpravili kontaminacijo pufra in zmanjšali porabo pufra, še posebej dragih reagentov [16]. Ta način omogoča pretok večih vzorcev na uro, in mejo detekcije (0,07-0,1) µg/ml. Za obogatitev vzorcev se pri MEKC uporabljajo tudi monolitni polimeri o katerih so poročali tudi **Rodríguez Gonzalo in sodelavci**, ki so uporabili metodologijo predkoncentriranja na monolitnem polimeru sintetiziranem oz. vgrajenem v silikonski kapilari CE inštrumenta [17]. Z uporabo kapilarne modifikacije z monolitnim nosilcem so omogočili obogatitev vzorca in zbiranje elucijskih volumnov v različne mikroviale. Ta metoda je primerna za določanje karbamatnih pesticidov z visoko občutljivostjo in mejo zaznavnosti (1-16) µg/L.

## 5 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE LOČLJIVOSTI

Zadrževanje oz. zadrževalni čas v MEKC je odvisen od porazdelitve analita med polarno vodno fazo in micelno psevdostacionarno fazo (PSP). Porazdelitveni čas in ločljivost sta odvisni od porazdelitve komponent analita med ti dve fazi. V tem ločevalnem procesu, igrajo pomembno vlogo kemijske kompozicije PSP in aditivi. Kljub mnogim poročanj o aplikacijah glede MEKC, obstaja še vedno pomanjkanje razumevanja glede učinkov PSP in aditivov na čas zadrževanja in ločevanje pri MEKC, zato izbira le-teh še vedno predstavlja glavni razlog za napake pri samem procesu. Za karakterizacijo in klasifikacijo kemijske selektivnosti PSP v MEKC se pogosto uporablja LSER metodologija.

O sami karakterizaciji in klasifikaciji kemijske selektivnosti PSP in kontroliranju lastnosti selektivnosti micel v MEKC so poročali številni znanstveniki [18-21]. Ti so LSER metodologijo uporabili za karakterizacijo in klasifikacijo širokega obsega PSP (micele, polimeri, liposomi, vezikli, mešani sistemi micel, mešani polimer-surfaktant in organski modifikatorji), ki lahko služi kot vodilo za ustrezno izbiro PSP in modifikatorjev, kar vpliva na izboljšanje ločljivosti v MEKC.

### 5.1 Inkorporiranje aditivov v vodno fazo

Pri MEKC lahko z različnimi aditivi (ciklodekstrini, urea, organski modifikatorji, "ion-pair" reagenti, kovinske soli) modificiramo puferski sistem. Organski modifikatorji spremenijo polarnost vodne vaze, povečajo viskoznost puferskega sistema in s tem upočasnijo EOF ali pa preprosto vplivajo na  $t_{mc}$  (retencijski čas analita, ki je popolnoma "raztopljen" v micelah). Delež organskega modifikatorja lahko gradientno spreminjamo, s tem skrajšamo retencijske čase in izboljšamo kakovost ločbe. Izbira aditivov za vodno fazo je enako pomembna kot izbira surfaktanta.

#### ❖ Organski modifikatorji

Za izboljšanje selektivnosti se pri MEKC rutinsko uporabljajo različni organski modifikatorji. Organski modifikatorji so izjemno uporabni za dokazovanje ločitev zelo hidrofobnih analitov, prav tako vplivajo na pomik porazdelitvenega ravnotežja v smeri mobilne faze. Najbolj pogosto uporabljeni organski modifikatorji so: propanol, etanol, tetrahidrofuran, dimetilformid in urea. Ti organski modifikatorji so pogosto dodani v raztopino pufra v zelo nizkih koncentracijah (20-30)%, ker lahko pri visokih koncentracijah pride do uničenja micel.

#### ❖ Ciklodekstrini (CD)

Unčikovito izbiro za povečanje ločljivosti v MEKC predstavlja uporaba CD aditivov v vodni fazi. CD je popularen aditiv oz. stacionarna faza v kromatografiji. Najpogosteje uporabljeni kiralni-CD aditivi v zadnjih dveh letih, ki se uporabljajo za izboljšanje občutljivosti v MEKC so:  $\beta$ -CD in HP- $\beta$ -CD in HP- $\gamma$ -CD. Uporaba CD je uspešna za ločevanje aromatskih izomer in aromatskih enantiomer, ki imajo kiralni center blizu aromatskega obroča. CD je elektronsko nevtralen in ne vpliva na elektroforezo. Površina CD je hidrofilna, zato ni inkorporiran v micele. CD migrira z enako hitrostjo kot EOF, kot tudi molekula analita (nevtralna). V primeru, da je molekula analita inkorporirana v ionsko micelo, potuje z različno hitrostjo. CD

se največkrat uporabljajo za določanje analitov v farmaciji, medicini, hrani in okoljevarstvenih analizah.

#### ❖ Urea

Urea se uporablja za zvišanje topnosti hidrofobnih komponent v vodi. Z dodajanjem uree v micelno raztopino, se elektroosmotska hitrost zmanjšuje, zmanjša se tudi hitrost micel, kar pa vpliva na zmanjšanje faktorja kapacitivnosti.

## 5.2 Uporaba različnih micelnih faz

V separacijskih procesih igra kemijska kompozicija PSP v MEKC pomembno vlogo. Na voljo je veliko sintetičnih surfaktantov, ki se lahko uporabijo kot PSP. Najpogosteje uporabljen surfaktant je SDS in to zaradi svoje aplikativnosti v širokem krogu analitov. Glede ločljivosti ima SDS-MEKC nekaj slabosti oz. omejitev. Za odpravljanje teh omejitev se morajo spremeniti nekatere fizikalno-kemijske lastnosti PSP z namenom, da se optimizira ločljivost z uporabo drugih surfaktantov kot alternativa SDS. Ena izmed dobrih izbir je uporaba žolčnih soli (žolčne kisline), ki so manj hidrofobne kot SDS.

Kationske PAS se v primerjavi z anionsko PAS redkeje uporabljajo, saj zagotavljajo manjša območja migracije. Druga slabost je pomanjkanje raznolikosti komercialno dostopnih kationsko PAS. Najpogostejša predstavnika klasičnih kationskih PAS sta cetil-trimetil-amonijev bromid in dodecil-trimetil-amonijev klorid.

## 6 APLIKACIJE

Najpomembnejše prednosti CE pred drugimi analiznimi metodami so: širok spekter vzorcev, ki jih lahko analiziramo (peptidi, proteini, oligonukleotidi, DNA, aminokislina, ogljikovi hidrati, flavonoidi, vitamini, kiralne spojine, pesticidi), majhna poraba vzorcev in pufrov, hiter čas analize ter avtomatizacija. Glavna omejitev CE in MEKC je majhna občutljivost, saj zaradi majhnega premera kapilare in posledično nizkega volumskega pretoka ne moremo uporabljati klasičnih detektorjev, primernih za HPLC. Izboljšanje občutljivosti je prinesel razvoj sistemov CE z združenimi metodami, kot sta na primer HPLC in masna spektrometrija (MS) ter lasersko inducirana fluorescenca (LIF).

### 6.1 Detekcijske tehnike

Detekcija predstavlja enega glavnih problemov pri MEKC. Najbolj običajna detekcija je v območju UV-VIS-spektra, njena pomanjkljivost je majhna občutljivost, zaradi kratke poti svetlobe skozi vzorec, ki je enaka notranjemu premeru kapilare. Pomanjkljivosti bi lahko odpravili z uporabo daljših kapilar, visoko občutljivih detekcijskih metod (fluorescenca, elektrokemijske in masna spektrometrija) in samo pripravo vzorca. Za povečanje občutljivosti se uporabljajo še posebne visokoenergetske žarnice, natančna namestitvev kapilare v optično pot žarka in pravilna izbira reže na kapilari. Če komponente vzorca same ne absorbirajo svetlobe ali ne fluorescirajo, nanje vežemo posebne kromoforne spojine, ki omogočajo detekcijo. V takem primeru lahko uporabimo tudi t.i. indirektno detekcijo, pri kateri v delovni pufer dodamo snov, ki močno absorbira svetlobo ali fluorescira.

#### ❖ MS

»On-line« metoda MEKC z ESI-MS detektorjem je kombinacija, ki je zelo zaželjena, saj zagotavlja visoke učinkovitosti ločevanja in vsestranskost MS detektorja. Največ prispevkov temelji na pristopu delnega polnjena kapilare z ločevalnim pufrom (PF). Izbira te metode velja za najbolj priljubljen način odpravljanja omejitev (zaviranje ionizacije, virov kontaminacije in visokega ozadja signala) v zvezi z konstantnim uvajanjem nehlapnih surfaktantov v »on-line« MEKC-ESI-MS. Pristopi uporabe PF so bili narejeni za določevanje aktivnih bioloških komponent (steroidi in njihovi metaboliti) v vzorcih urina.

PF-MEKC-ESI-MS pristop je zanimiv za direktno združitvev MEKC z MS, z uporabo SDS ali drugega nehlapnega surfaktanta. Glavna pomanjkljivost tega pristopa je omejitev učinkovitosti ločevanja. Za odpravljanje te pomanjkljivosti, se k ločevalnemu pufri namesto SDS micel dodajo hlapni surfaktanti, polimeri in nanodelci. To pa zato, ker je kemija teh PSP bolj kompatibilna z ESI-MS detektorjem. Objavljeni so bili tudi prispevki o uporabi hlapnih surfaktantov v MEKC z uporabo kvadrupolnega detektorja (TOF) za določanje inzulina in njegovih sintetičnih analogov z mejo zaznavnosti 10 mg/ml o čemer so poročali **Ortner in sodelavci** [22].

**He in Shamsi** sta predlagala uporabo mešanice polimernih surfaktantov v MEKC-ESI-MS za hkratno analizo dveh kiralnih komponent. Novi multivariantni pristop je bil predlagan za optimizacijo parametrov separacije, da bi dosegli maksimalno ločljivost in maksimalno razmerje S/N za oba analita [23]. Druga strategija sklopitve MEKC-MS se nanaša na

uporabo alternativnih ionizacijskih tehnik, kot je ESI, ki kažejo boljše kompatibilnosti z PSP. APPI je ena izmed najbolj obetavnih izbir do sedaj, čeprav še vedno ne zagotavljajo zadovoljivih občutljivosti, ki so potrebne za analize realnih vzorcev. **Hommerson in sodelavci** so primerjali metodi ESI in APPI za direktno sklopitev z MEKC. Izkazalo se je, da je uporaba ESI za polarne komponente (20 mM SDS) ugodnejša od APPI, medtem ko je APPI ugodnejša v primeru, ko je koncentracija SDS več kot 20 mM [24]. **Liu in sodelavci** so skušali izboljšati občutljivost v MEKC-ESI-MS z novim vmesnikom »liquid-junction/low-flow«, kar bi omogočilo zmanjšanje zatiranja ionov, ki jih povzročajo nehlapni surfaktanti [25].

## 7 ZAKLJUČEK

Kljub ogromnemu znanju glede metode MEKC izpred 25-ih let, se še vedno pojavljajo zanimive izboljšave na področju metodologije in instrumentaizacije za doseganje boljše občutljivosti in ločljivosti.

Najbolj pogosto uporabljena pristopa za izboljšanje občutljivosti analitov v realnih vzorcih z metodo MEKC sta »stacking« in »sweeping« pristop, ponekod tudi kombinacija obeh. Področje raziskav za izboljšanje občutljivosti in ločljivosti v MEKC so še vedno kombinacije »off-line« in »on-line« pred-priprave vzorcev. Za najbolj pogosto uporabljen surfaktant v MEKC se je izkazal anionski SDS, čeprav so bile testirane tudi druge alternative (neionski surfaktanti podobni SDS, kationske micide, neionske in zwitterionski surfaktanti, mešane micide, ind.).

Čeprav je bilo veliko poročanj o različnih pristopih neposredne povezave med MEKC-MS z uporabo vmesnika ESI, še vedno obstajajo slabosti glede detekcije z MS. To slabost so skušali odpraviti z zamenjavo ESI vmesnika z APPI, čeprav tudi ta pristop ne zagotavlja zadovoljive občutljivosti.

## 8 REFERENCE

- [1] Otsuka, K., Terabe, S., *Methods in Molecular Biology*, 1996, 52, Part II, 125-155.
- [2] Silva, M., *Electrophoresis*, 2010, 32, 149-165.
- [3] Kočevar Glavač, N., *Razvoj metod za aciliranje proteinov in njihovo analizo ter vrednotenje njihovih bioloških aktivnosti*, 2010.
- [4] Razpotnik, P., *Kapilarna elektroforeza*, 2001.
- [5] Živko, D., *Vpliv temperature na kritično miceljno koncentracijo nekaterih surfaktantov*, 2010.
- [6] Terabe, S., *Anal. Chem.*, 2004, 240-246.
- [7] Kim, J-B., Terabe S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 30, 1625-1643.
- [8] Zhu, J., Qi, S., Li, J., Chen, X., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1212, 137–144.
- [9] Chiu, T. C., Chang, H. T., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1146, 118–124.
- [10] Cao, J., Li, B., Chang, Y. X., Li, P., *Electrophoresis*, 2009, 30, 1372–1379.
- [11] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1023–1030.
- [12] Zhang, H., Zhou, L., Chen, X., *Electrophoresis*, 2008, 29, 1556–1564.
- [13] Quirino, J. P., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1214, 171–177.
- [14] Zhou, L., Zhou, X., Luo, Z., Wang, W., Yan, N., Hu, Z., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1190, 383–389.
- [15] Ma, L., Kang, J., *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 888–892.
- [16] Han, F., He, Y. Z., Yu, C. Z., *Talanta*, 2008, 74, 1371–1377.
- [17] Rodríguez-Gonzalo, E., Ruano-Miguel, L., CarabiasMartínez, R., *Electrophoresis*, 2009, 30, 1913–1922.
- [18] Fu, C., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 1891–1900.
- [19] Fu, C., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 1901–1907.
- [20] Varga, A., Huszar, M., Dobos, Z., Kiss, E., Horvath, A., Idei, M., *Electrophoresis*, 2009, 30, 1923–1928.
- [21] Tellez, A., Weiss, V. U., Kenndler, E., *Electrophoresis*, 2008, 29, 3916–3923.
- [22] Ortner, K., Buchberger, W., Himmelsbach, M., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 2953–2957.
- [23] He, J., Shamsi, S. A., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 845–856.
- [24] Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1204, 197–203.
- [25] Liu, Y. L., Wang, N. H., Li, F. A., Her, G. R., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 8671–8675.