

### 4.2.3. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace je separační metoda užívaná pro separaci amfolytů, tedy látek obsahujících jak kyselou funkční skupinu, tak také zásaditou funkční skupinu. Velmi důležitým parametrem uplatňujícím se při této metodě je kromě elektroforetické pohyblivosti také pH prostředí. Hodnota pH, kdy je amfolyt přítomen v neutrální formě, se rovná izoelektrickému bodu sloučeniny. Při vyšší hodnotě pH převládá záporná forma sloučeniny, kladná převažuje při nižší hodnotě pH než je hodnota izoelektrického bodu.

Tato separační metoda existuje v uspořádání plošném i kapilárním. Dříve častěji používané plošné uspořádání využívalo skleněnou desku s agarovým či akrylamidovým pokrytím. Vrstva na skleněné desce byla napuštěna tlumivými roztoky s cílem rovnoměrné změny pH po celé ploše vrstvy. Ke každému konci se připojí elektroda – k nízkému pH anoda, k vyššímu katoda. Při migraci amfolyt dosáhne místa, kde pH odpovídá jeho izoelektrickému bodu, což je zároveň bod, kde se amfolyt stává elektroneutrální, čímž je zajištěna možnost kvalitativního určení amfolytu.

Kapilární uspořádání využívá proti plošnému uspořádání navíc ještě tlak. Tlak hraje důležitou roli při zastavení migrace po vyrovnání pH a izoelektrického bodu. Po tomto vyrovnání je analyt rozseparován a tlakem jednotlivé segmenty protlačeny přes pole detektoru. [22]