

Kapalinová chromatografie - LC

- **Fyzikálně-chemická metoda dělení kapalin (roztoků) využívající rozdělování složky mezi dvě nestejnorodé fáze, nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní), přičemž pohyblivou fází je kapalina.**
 - **DIFUSNÍ KOEFICIENTY O 5 ŘÁDŮ MENŠÍ NEŽ V GC**
 - malý vliv molekulární difuze, velký význam odporu proti přenosu hmoty v mobilní fázi, **PROBLÉM TURBULENCÍ MOBILNÍ FÁZE**
 - **GIDDINGSOVA TEORIE**
- **LLC a LSC, dále GPC, IEC**
- **TECHNIKY SLOUPCOVÉ CHROMATOGRRAFIE**
 - **system otevřený – nízkotlaký**
 - **Low (Medium) Pressure Liquid Chromatography**
 - **system uzavřený – vysokotlaký**
 - **High Performance Liquid Chromatography**

Kapalinová chromatografie

- **TEORIE LLC (kapalinová rozdělovací)**
 - kapalná mobilní i stacionární fáze (zakotvená na tuhém nosiči)
 - **OBĚ KAPALINY NEMÍSITELNÉ**
 - obtížné splnit
 - řešení **CHEMICKY VÁZANÉ** stacionární fáze
 - poměr objemů V_m/V_s posunut ve prospěch mobilní fáze
 - pro retenci látek
 - **NUTNÁ ODLIŠNÁ POLARITA OBOU FÁZÍ**
 - **CHEMICKY VÁZANÉ** stacionární fáze
 - obvykle **NEPOLÁRNÍ**
 - **MOBILNÍ FÁZE - POLÁRNÍ**
 - » tzv. **OBRÁCENÉ FÁZE** („reversed-phase“)

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LLC**
 - chemicky vázaná stacionární fáze - nosič - **SILIKAGEL**
 - **PORÉZNÍ ČÁSTICE NEPRAVIDELNÉHO TVARU**
 - **PORÉZNÍ ČÁSTICE KULOVITÉHO TVARU**
 - komerčně dostupné silikagely s definovanou velikostí částic
 - **SILANOLOVÉ SKUPINY - Si-OH NA POVRCHU ČÁSTIC**
 - **REAKCE S MODIFIKÁTOREM**
 - » např. **OKTADECYLTRICHLORSILAN**
 - **AMINOPROPYLOVÉ SKUPINY - (CH₂)₃-NH₂ NA POVRCHU ČÁSTIC**
 - **REAKCE S MODIFIKÁTOREM - TVORBA AMIDŮ**

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LLC**
 - chemicky vázaná stacionární fáze - nosič - SILIKAGEL
 - odstranění zbylých -OH skupin trimethylsilylovými skupinami
 - funkční modifikace sorbentů
 - uhlovodíkové skupiny (řetězce) - oktadecyl, fenyl, oktyl atp.
 - nitrily -C≡N, dioly, aminy
 - účelové modifikace sorbentů - makrocyclické látky, opticky aktivní látky atp.
 - makroporézní gely organických látek - uhlovodíků
 - funkční skupiny přímo na matrici gelu

Kapalinová chromatografie

- **MOBILNÍ FÁZE pro LLC**

- v RP-LLC - obvykle polární

- **ALKOHOLY** - methanol, ethanol, propanol, isopropanol

- **NITRILY** - acetonitril

- **ETHERY** - tetrahydrofuran, dioxan, diethylether

- mnohdy ve směsi s vodou, směsi i více rozpouštědel

- **ŘADA DLE ELUČNÍ SÍLY**

- větší eluční síla ▲ kratší retenční časy

- voda - methanol - acetonitril - tetrahydrofuran - aceton

- **VHODNÁ NÍZKÁ VISKOSITA**

- **VHODNÁ TRANSPARENTNOST V UV OBLASTI**

Kapalinová chromatografie

- **SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC**

- na nepolárních stacionárních fázích - nejvíce zadržovány
n-ALKANY

- RETENCE ROSTE SE STOUPAJÍCÍ MOLEKULOVOU HMOTNOSTÍ

- méně zadržovány

- AROMÁTY, HALOGENOVANÉ UHLOVODÍKY

- ještě méně zadržovány (v řadě)

- ethery, nitroderiváty, estery, aminy, amidy,
karboxylové kyseliny, sulfokyseliny

- retence polárních látek velmi malá - lze ovlivnit volbou pH*

- retence iontových látek (solí) - prakticky nulová

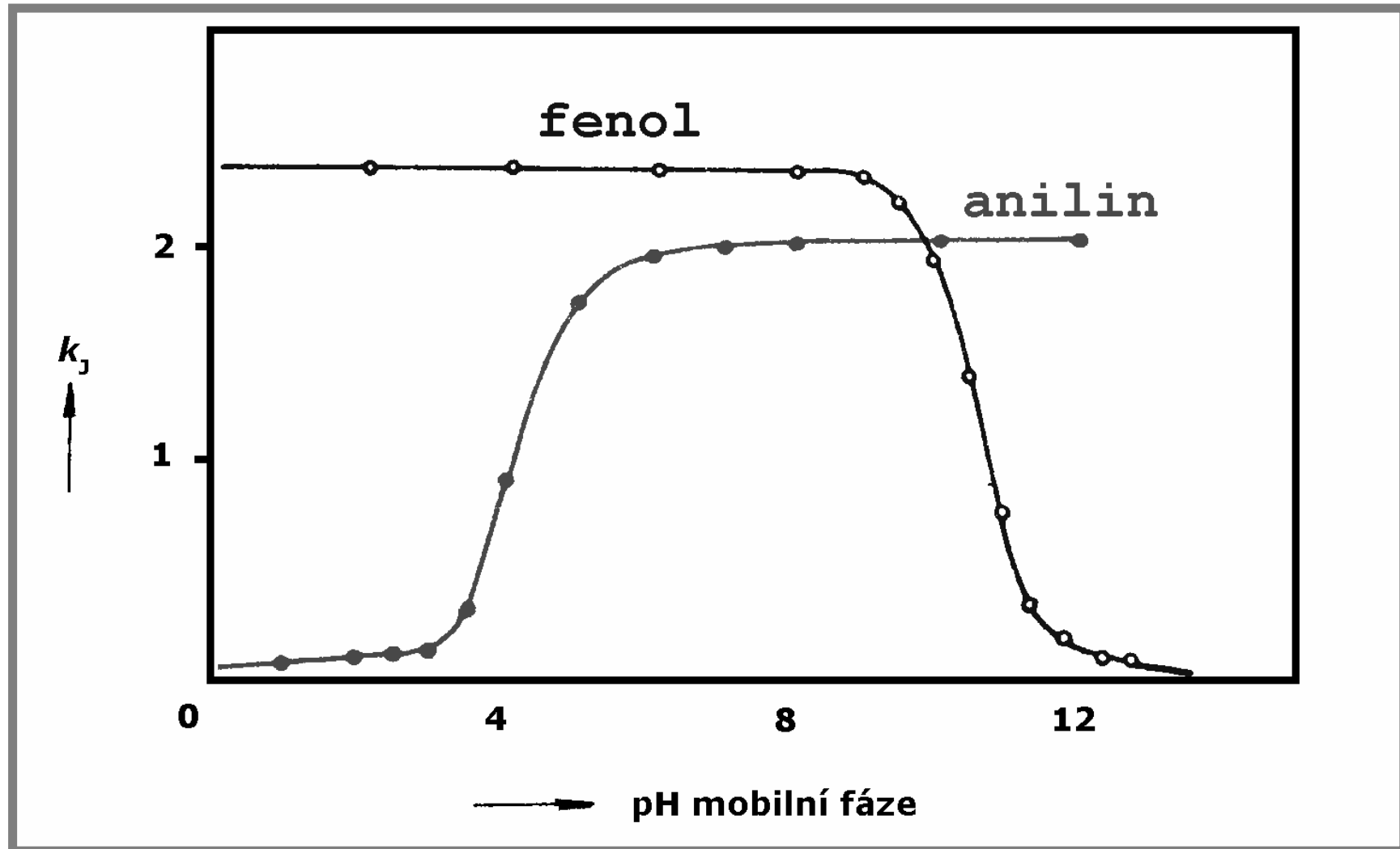
- lze ovlivnit volbou pH*

Kapalinová chromatografie

- **SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC**
 - vliv pH* na změnu kapacitních poměrů
 - V ALKALICKÉM PROSTŘEDÍ POTLAČENA IONIZACE BAZÍ - zvýšení jejich retence
 - V ALKALICKÉM PROSTŘEDÍ ZNAČNÁ DISOCIACE KYSELIN - omezení jejich retence
 - V KYSELÉM PROSTŘEDÍ POTLAČENA DISOCIACE SLABÝCH KYSELIN - zvýšení jejich retence
 - V KYSELÉM PROSTŘEDÍ PROTONACE BAZÍ - omezení jejich retence

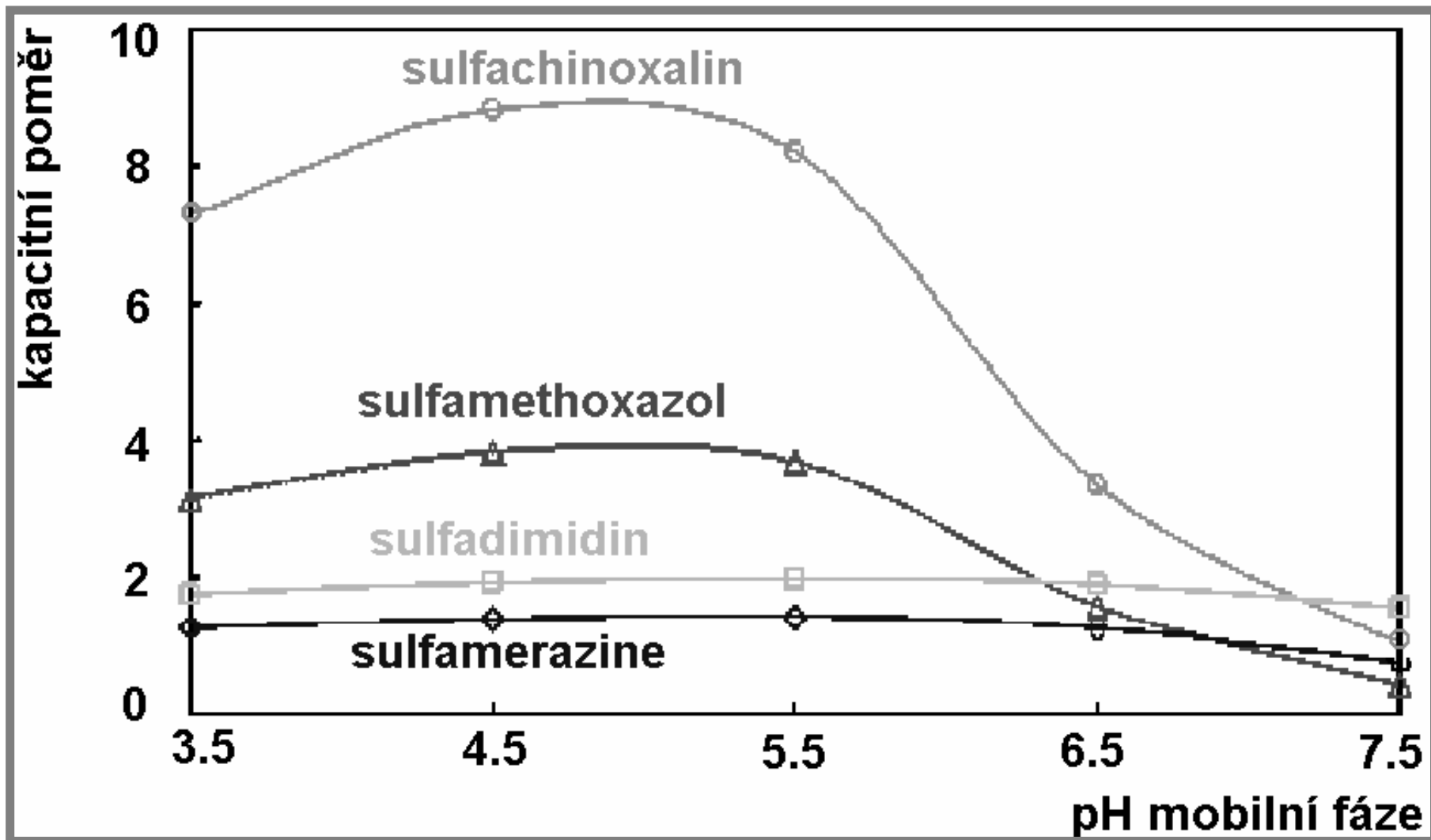
Kapalinová chromatografie

- SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC
 - vliv pH* na změnu kapacitních poměrů



Kapalinová chromatografie

- SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC
 - vliv pH* na změnu kapacitních poměrů



Kapalinová chromatografie

- **TEORIE LSC (kapalinová adsorpční)**
 - interakce složek vzorku v mobilní fázi s adsorbentem (tuhou stacionární fází)
 - **ADSORBENT - kulovité částice - $\varnothing \sim 10 \mu\text{m}$**
 - **adsorpční distribuční konstanty**
 - obsah složky J ve stacionární fázi - mol.g^{-1}
 - obsah složky J v mobilní fázi - mol.cm^{-3}
 - **MECHANISMUS ADSORPCE**
 - **POVRCH ADSORBENTU OBSAZEN ELUENTEM**
 - **SILNĚJI SE ADSORBUJÍCÍ SLOŽKA VYTĚSŇUJE ELUENT**

Kapalinová chromatografie

- **MECHANISMUS ADSORPCE**

- adsorpční rovnováha

- popis - ADSORPČNÍ ISOTERMY

- LANGMUIROVA ISOTERMA - tvorba monovrstvy

$$(c_J)_s = \frac{k_1 k_2 (c_J)_m}{1 + k_2 (c_J)_m}$$

- » lineární v oboru nízkých koncentrací

- tvar isotermy ovlivňuje tvar chromatografického píku

- » Gaussův profil pro lineární isotermu

- » „protažené píky“ („chvostování“) - nelineární část isotermy (příliš vysoké koncentrace)

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LSC**
 - **ADSORBENT - kulovité částice - $\varnothing \sim 10 \mu\text{m}$**
 - **obvykle silně polární**
 - **plně porézní**
 - **silikagel - hydratované SiO_2 - KYSELOST POVRCHU**
 - » **NUTNÁ AKTIVACE - „přiměřené“ vysušení**
 - » **SILNÁ RETENCE BAZICKÝCH LÁTEK**
 - » **silikagel s velkými póry**
 - » **s malými póry - pod 10 nm**
 - **alumina - OXID HLINITÝ**
 - **hydroxylové skupiny na povrchu**
 - **silné elektrostatické pole u povrchu**
 - **Florisil - křemičitan hořečnatý**

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LSC**
 - **ADSORBENT - kulovité částice - $\varnothing \sim 10 \mu\text{m}$**
 - alumina - OXID HLINITÝ
 - » BAZICITA POVRCHU - DĚLENÍ SLABĚ KYSELÝCH SLOŽEK
 - silné kyseliny - CHEMISORPCE
 - » silné elektrostatické pole u povrchu
 - » při přiblížení adsorbátu
 - v molekule indukovaný dipól-moment
 - » vliv geometrie adsorbátu - (ne)planarita
 - » AKTIVACE - podobná jako u silikagelu
 - Florisil - křemičitan hořečnatý

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LSC**
 - **ADSORBENT - kulovité částice - \varnothing ~ 10 μm**
 - **Florisil - křemičitan hořečnatý**
 - » **polární adsorbent**
 - » **vlastnosti - mezi silikagelem a aluminou**
 - » **84% SiO_2 , 15,5% MgO , 0,5% Na_2SO_4**
 - » **ENVIRONMENTÁLNÍ ANALÝZY**
 - » **SEPARACE POLÁRNÍCH LÁTEK z nepolárních matric**
 - » **separace chlorovaných pesticidů a PCB**
 - » **analýza organofosfátů**
 - » **separace steroidů**
 - » **separace dusíkatých látek od uhlovodíků**

Kapalinová chromatografie

- **MOBILNÍ FÁZE pro LSC**

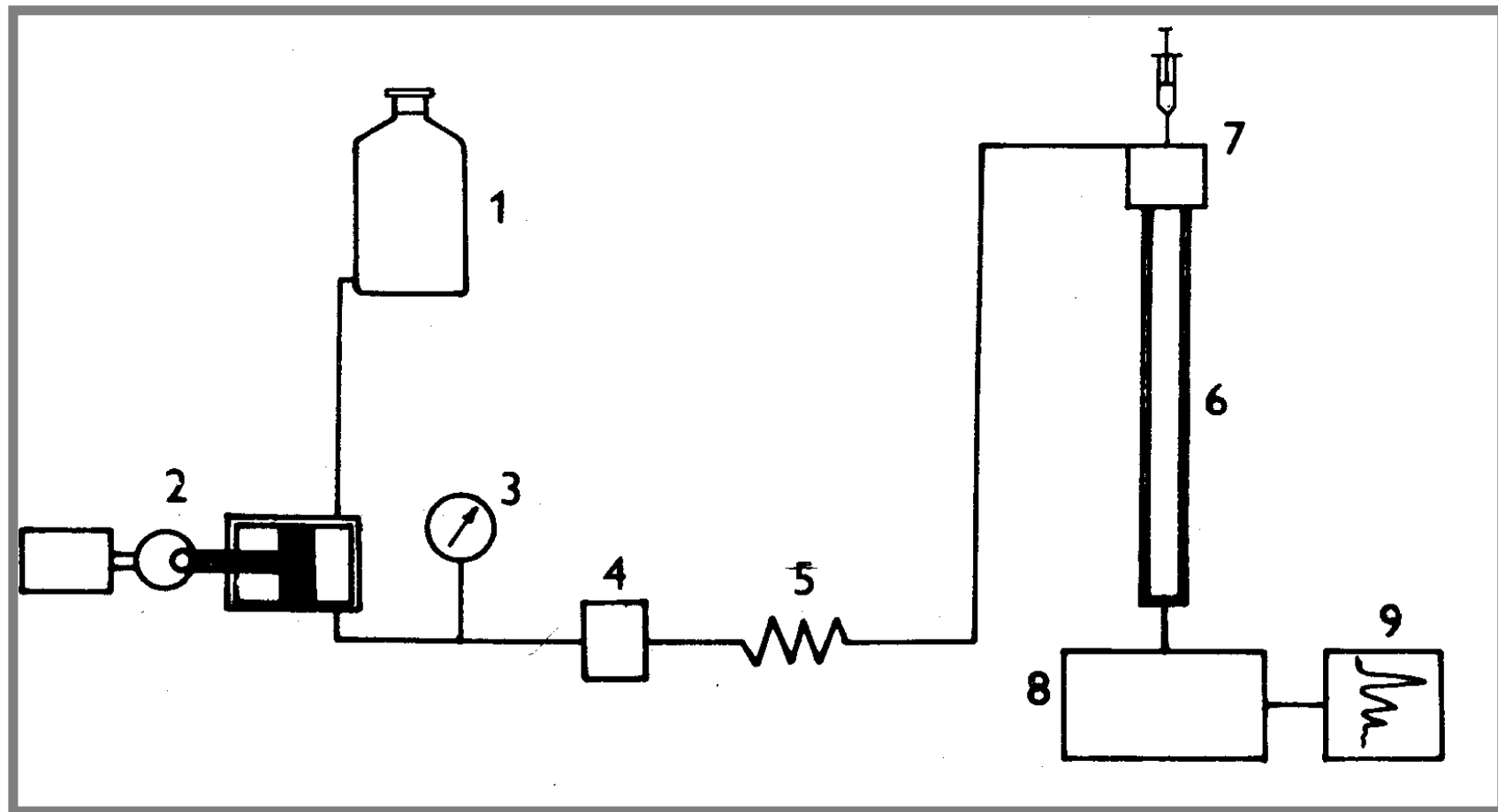
- odplyněná, zbavená prachových částic
- nepolární mobilní fáze (polární jsou adsorbenty)
- stupnice dle eluční síly (empirický parametr)
 - větší eluční síla - eluent pevněji sorbován
 - pentan - cyklohexan - benzen - diethylether - dichlormethan - aceton - isopropanol - voda
 - **BĚŽNĚ POUŽÍVÁNY BINÁRNÍ ELUENTY**
 - např. HEXAN + diethylether
 - **GRADIENTOVÁ ELUČNÍ CHROMATOGRRAFIE**
 - » **PLYNULÉ ČI „SKOKOVÉ“ ZMĚNY SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE**

Kapalinová chromatografie

- **SEPAROVANÉ SLOŽKY v LSC**

- polární sorbent ▲ více zadržovány polární látky, látky s větší molekulovou hmotností
- málo zadržovány - nepolární uhlovodíky
- na kyselém sorbentu - více zadržovány bazické látky
- na bazickém sorbentu - více zadržovány kyseliny

• Kapalinová chromatografie - LC



Uzavřený systém pro HPLC

1. Zásobník mobilní fáze

3. Měřidlo tlaku

6. Kolona

8. Detektor(y)

4. Filtr

2. Vysokotlaká čerpadla

5. Tlumič tlakových pulsů

7. Dávkovač vzorku - pomocí ventilů

9. Vyhodnocovací zařízení

- **Kapalinová chromatografie - LC**

- **Typy kolon pro HPLC - dle vnitřního průměru**
 - **KAPILÁRNÍ KOLONY** ~ desítky až stovky mikrometrů
 - **MIKROKOLONY** ~ 1 mm
 - **„NARROW-BORE“ KOLONY** ~ 2 mm
 - **ANALYTICKÉ KOLONY** ~ 2 - 10 mm
 - **SEMIPREPARATIVNÍ KOLONY** ~ 10 - 25 mm
 - **PREPARATIVNÍ KOLONY** - nad 25 mm
- **délky - běžně - 10 - 100 cm**
- **MATERIÁLY**
 - **nerozová ocel**
 - **tvrzené sklo**
 - **Ti-Zr**
 - **PEEK** - poly(ether-ether-ketone), /poly(arylether-ether-ketone)

- **Kapalinová chromatografie - LC**
- **Detektory pro LC**
 - **CHYBÍ UNIVERZÁLNÍ**
 - **OBTÍŽNÁ PREDIKCE ZÁVISLOSTI ODEZVY NA KONCENTRACI JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK**
 - **SLOŽITÉ KALIBRACE PRO KVANTITATIVNÍ ANALÝZU - NEPŘENOSNÉ MEZI PŘÍSTROJI**

 - **OPTICKÉ, ELEKTROCHEMICKÉ**
 - **„POMLČKOVÉ TECHNIKY“ - LC-MS, LC-FTIR atd.**

• **Kapalinová chromatografie - LC**

• **Typy detektorů pro LC -**

– OPTICKÉ

- **fotometrický - nejvíce rozšířen v kolonové chromatografii**
 - » UV-vis-fotometr
- **fluorometrický - řádově vyšší citlivost a nižší mez detekce než pro fotometrický detektor**
- **refraktometrický - měření indexu lomu a jeho změn, pro jakýkoli typ látky, - NELZE PŘI GRADIENTOVÉ ELUCI**

– ELEKTROCHEMICKÉ

- **voltametrický resp. amperometrický - nutnou podmínkou dobrá vodivost samotné mobilní fáze**
- **vodivostní - iontové formy složek vzorku, omezené použití**

• **Kapalinová chromatografie - LC**

• **Typy detektorů pro LC -**

– **fotometrický/spektrofotometrický -**

- **průtočná cela - objem 5 - 10 μ l, optická dráha - 10 mm**
- **deuteriová výbojka pro UV oblast, halogenová žárovka pro viditelnou oblast**
- **různé vlnové délky - nastavitelné - jednokanálová detekce**
- **měření širšího spektrálního úseku - mnohakanálová detekce - diodová pole (CCD)**
- **problém eluentů absorbujících v UV oblasti**
- **problémy při gradientové eluci**

• **Kapalinová chromatografie - LC**

• **Typy detektorů pro LC -**

– **fluorimetrický/spektrofluorimetrický -**

- **průtočná cela - objem 5 - 10 μ l,**
- **deuteriová výbojka pro UV oblast, halogenová žárovka pro viditelnou oblast**
- **EXCITAČNÍ MONOCHROMÁTOR**
- **různé vlnové délky EMITOVANÉHO záření - nastavitelné -
jedenkanálová detekce**
- **měření širšího spektrálního úseku - mnohakanálová
detekce - diodová pole (CCD)**
- **VYSOKÁ CITLIVOST, MOŽNOST DETEKCE NIŽŠÍCH
KONCENTRACÍ NEŽ FOTOMETRICKY**
- **složky musí fluoreskovat, nebo je možné je snadno
převést na fluoreskující látky**

- **Kapalinová chromatografie - LC**

- **Typy detektorů pro LC -**

- **diferenciální refraktometrický -**

- **kontinuální záznam ROZDÍLU indexů lomu mezi výtokem z kolony a čistým elučním činidlem**
 - **použitelné pro jakýkoli typ látky**
 - **NELZE POUŽÍT PRO GRADIENTOVOU ELUCI**
 - **INDEX LOMU SE MĚNÍ S TEPLOTOU**
 - **NUTNO TERMOSTATOVAT**
 - **málo citlivé**
 - **POUŽITÍ TAM, KDE NELZE POUŽÍT PŘEDCHOZÍ UVÁDĚNÉ DETEKTORY**

• **Kapalinová chromatografie - LC**

• **Typy detektorů pro LC -**

– **voltametrický/amperometrický -**

- **vhodný pro organické depolarizátory (látky oxidovatelné či látky redukovatelné)**
- **obvykle měření při konstantním potenciálu**
- **průtočné uspořádání**
- **jedna polarizovatelná elektroda**
 - **dvou- či tří- elektrodové zapojení**
- **využití oxidační reakce - fenoly, aromatické aminy, thioly, peroxidy**
- **využití redukční reakce - ketony, aldehydy, nitrosloučeniny, konjugované estery, konjugované nitrily**
- **NUTNÁ DOSTATEČNÁ VODIVOST MOBILNÍ FÁZE**

- **GELOVÁ PERMEAČNÍ chromatografie - GPC**
- **DĚLENÍ DLE ROZDÍLŮ VE VELIKOSTI MOLEKUL**
 - **STACIONÁRNÍ FÁZE** - póry o definované velikosti
 - **MOBILNÍ FÁZE** - teoreticky pouze transport látek
 - dělení složek podle **HYDRODYNAMICKÉHO PRŮMĚRU MOLEKUL**
 - **MENŠÍ MOLEKULY VSTUPUJÍ DO PÓRŮ**
 - čím menší molekuly, tím více času stráví v pórech
 - otázka velikosti pórů, jejich uniformity a tvaru
 - sekundární efekt - adsorpce
 - $V_{R,J} = A - B \log M_r(J)$
 - použitelné pro homologické řady látek
 - problém strukturně odlišných látek

- **GELOVÁ PERMEAČNÍ chromatografie - GPC**
- **DĚLENÍ DLE ROZDÍLŮ VE VELIKOSTI MOLEKUL**
 - **STACIONÁRNÍ FÁZE**
 - **univerzální - silikagely a skelné materiály - Porasil, Spherosil, Bio-Glass**
 - **pro vodné mobilní fáze (tlumivé roztoky)**
 - **dělení polypeptidů, proteinů a dalších biomakromolekul - Sephadexy - dextran zesíťovaný epichlorhydrinem**
 - **pro organické eluenty (jako eluent běžně THF)**
 - **divinylbenzenem zesíťovaný polystyren - Styragel**
 - **PRÁCE ZA BĚŽNÉ ČI ZVÝŠENÉ TEPLoty**

- **IONTOVÁ chromatografie - IEC**
- **IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE**
 - **SEPARACE NABITÝCH ČÁSTIC - IONTŮ**
 - **nenabité částice teoreticky procházejí bez zadržení**
 - **ZÁKLAD STACIONÁRNÍ FÁZE**
 - **MĚNIČE IONTŮ - IONTOMĚNIČE**
 - **nosič - zesíťovaný polystyren, porézní silikagel**
 - **na stacionární fázi chemicky navázané ionty, k nim elektrostaticky fixovány opačně nabité protiionty**
 - **protiionty shodné s jedním z iontů mobilní fáze**
 - **PŘI SEPARACI protiiontů ZAMĚNĚN ZA STEJNĚ NABITÝ ION SEPAROVANÉ SLOŽKY, zpětná záměna přebytkem iontů z mobilní fáze**
 - » **DOBA SETRVÁNÍ IONTU SLOŽKY NA POVRCHU**

- **IONTOVÁ chromatografie - IEC**
- **IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE**
 - **AFINITA POHYBUJÍCÍCH SE IONTŮ K FIXOVANÉMU IONTOVÉMU MÍSTU**
 - **OBVYKLE VE VODNÉM PROSTŘEDÍ**
 - **KATEXY - VÝMĚNA KATIONTŮ - silně a slabě kyselé**
 - » **CHEMICKY VÁZANÉ ANIONTY - SULFONOVÉ SKUPINY**
 - **KARBOXYLOVÉ SKUPINY**
 - » **VÝMĚNA PROTONŮ, SODÍKOVÝCH IONTŮ, DRASELNÝCH**
 - **ANEXY - VÝMĚNA ANIONTŮ - silně a slabě bazické**
 - » **KVARTÉRNÍ DUSÍKATÉ BÁZE**
 - » **PRIMÁRNÍ ČI SEKUNDÁRNÍ AMINY**

- **IONTOVÁ chromatografie - IEC**
- **IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE**
 - **DOBA SETRVÁNÍ IONTU SLOŽKY NA POVRCHU**
 - **IONTY S VĚTŠÍM NÁBOJEM ZADRŽOVÁNY VÍCE**
 - **IONTY S VĚTŠÍ HMOTNOSTÍ ZADRŽOVÁNY VÍCE**
 - **otázka disociačních rovnováh - nutná podpora disociace slabých protolytů**
 - **DETEKCE**
 - **VODIVOSTNÍ DETEKTOR - nutno předem potlačit velkou vodivost H^+ nebo OH^- (potlačovací kolona před detektorem)**
 - **pro některé anionty - FOTOMETRICKÝ DETEKTOR**

- **chromatografie**

S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU - SFC

- **MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN - (CO₂)**
 - kolona má vyšší teplotu než je kritická teplota zkapalněného plynu
 - pracovní tlak značně vyšší než tlak kritický
 - v koloně „velmi hustý plyn“
 - **klíčová rozpouštěcí schopnost SF mobilních fází**
 - pro SF CO₂ - podobná hexanu
 - **nízká viskozita proti kapalinám**
 - **vyšší difusní koeficienty než v kapalinách**
 - **VHODNÉ PRO VYSOKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY**

• chromatografie
S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU -
SFC

- **MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN - (CO₂)**
 - **VHODNÉ PRO VYSOKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY**
 - **látky, které nelze převést do plynné fáze (hmotnost, termolabilita) - NEPOUŽITELNÁ GC**
 - **látky nelze detegovat běžnými detektory kapalinové chromatografie - NEPOUŽITELNÁ LC**
 - **CHROMATOGRAF PODOBNÝ JAKO PRO GC**
 - **doplněno DÁVKOVAČEM zkapalněného plynu**
 - **preferovány KAPILÁRNÍ kolony**
 - **kolony o menším průměru (0,05 - 0,1 mm)**
a kratší délce (5 - 10 m) než v GC

- **chromatografie**

S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU - SFC

- **MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN - (CO₂)**
 - **CHROMATOGRAF PODOBNÝ JAKO PRO GC**
 - **DETEKTOR - obvykle PLAMENOVÝ IONIZAČNÍ**
 - **Ize kombinovat s MS detekcí**
 - **namísto gradientu složení mobilní fáze (LC) nebo
teplotního programu (GC) - programově řízený TLAK
v SFC**

- **chromatografie**

S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU - SFC

- **MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN -**
 - **CO₂** - nejběžnější, pro polární látky přídavek methanolu
 - **SF₆**, - vyšší kritická teplota, nižší kritický tlak,
problém koroze FID
 - **xenon** - nízká kritická teplota ,
NEABSORBUJE V UV-oblasti - použitelná
fotometrická detekce

• ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

• POHYB NABITÝCH ČÁSTIC VLIVEM STEJNOSMĚRNÉHO ELEKTRICKÉHO POLE

• dělení v kapalně fázi („kapalně fázi“)

• polární prostředí (mnohdy vodné)

• síla působící na nabitou částici

– $F_1 = Q E = z e E$, E - intenzita pole

- uvedení iontů do pohybu

• síla brzděná - odpor prostředí

– $F_2 = -k v = -6\pi \eta r v$, v - rychlost pohybu částice,

η - dynamická viskozita

r - poloměr iontu

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**
- **POHYB NABITÝCH ČÁSTIC VLIVEM STEJNOSMĚRNÉHO ELEKTRICKÉHO POLE**
 - $Q E = k v$
 - $v = Q E / k = u E$, u - pohyblivost částice
 - pohyblivost částice - ovlivněna
 - viskozitou prostředí
 - rozměrem a tvarem iontů
 - nábojem iontů
 - mírou disociace dané látky
- **DĚLĚNÍ DLE ODLIŠNÝCH POHYBLIVOSTÍ**
- $u = v / E$, konstantní E - ELEKTROFORÉZA
konstantní v - IZOTACHOFORÉZA

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**
- **DĚLĚNÍ DLE ODLIŠNÝCH POHYBLIVOSTÍ**
 - $u = v / E,$
 - konstantní E - **ELEKTROFORÉZA**
 - **1892 - POHYB ANORGANICKÝCH ČÁSTIC V KOLOIDNÍM ROZTOKU**
 - **1937 - METODA POHYBLIVÉHO ROZHRAŇÍ -**
Arne Thiselius - dělení proteinů krevního séra
(1948 - Nobelova cena)
 - **1949 - ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA -** Pauling (papírový nosič)
 - **1955 - GELOVÁ ELEKTROFORÉZA -** Smithies (škrobový gel)
 - **1981 - KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA -** Jorgenson a Lukacsová
 - **současnost - ELEKTROFORÉZA**
NA CHEMICKÝCH MIKROČIPECH

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **ELEKTROFORÉZA - ELFO**

- **KAPILÁRNÍ**

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
 - Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

- **GELOVÁ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA**

- **VERTIKÁLNÍ, HORIZONTÁLNÍ, VÍCEROZMĚRNÁ**
 - **ŠKROB** - **SGE („STARCH“)**
 - **POLYAKRYLAMID** - **PAGE („POLYACRYLAMIDE“)**
 - **ACETYLCELULOZA** - **CAGE („Cellulose Acetate“)**
 - **AGAROSA (agar)** - **AGE („AGAROSE“)**

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**
- **2D - ELEKTROFORÉZA**



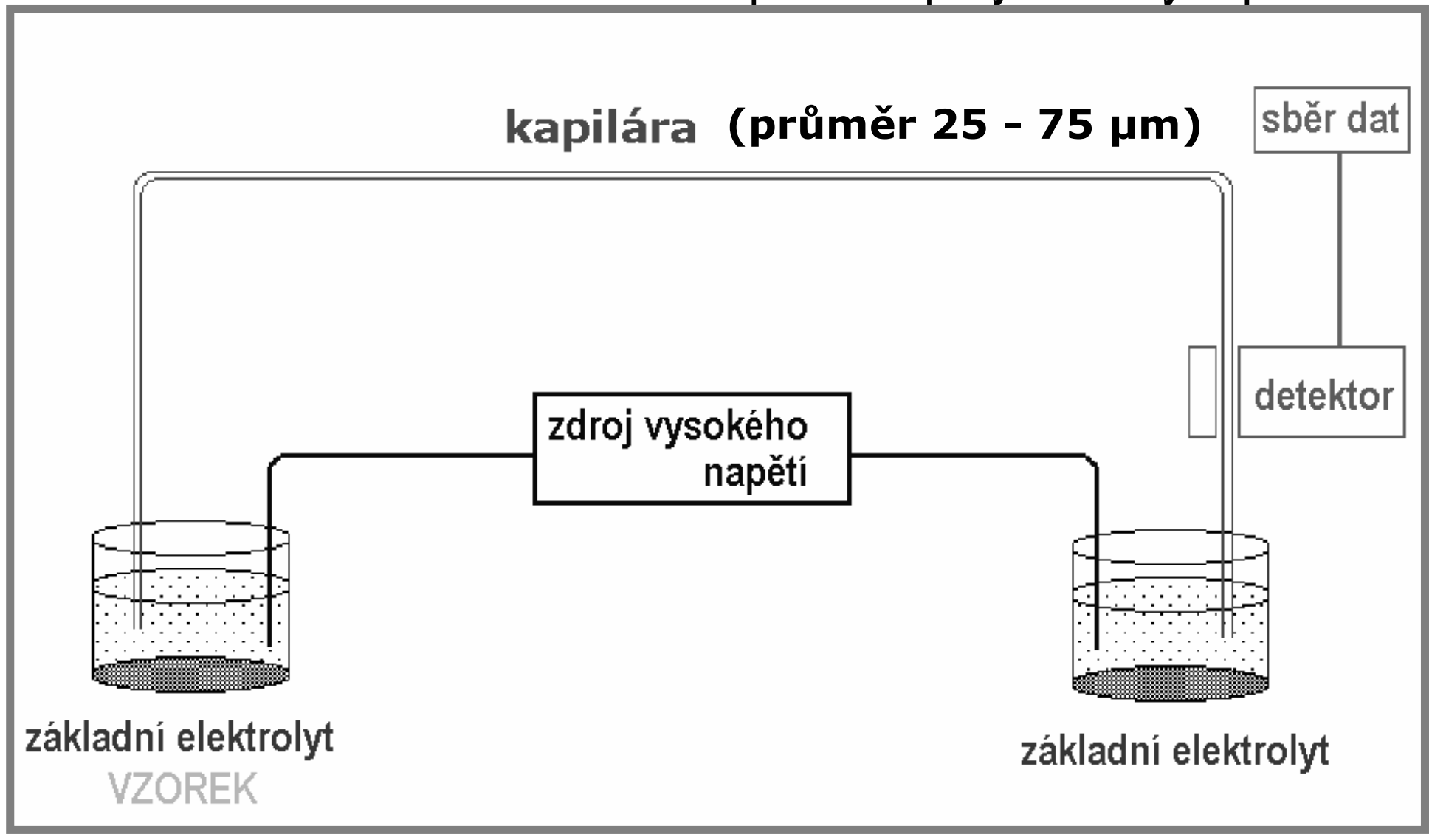
například:

- **jeden směr IFE**
 - **separace dle pI**
- **druhý směr SDS-PAGE**
(SDS - dodecylsulfát sodný)
 - **dělení dle molekulové hmotnosti**

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **ELEKTROFORÉZA - ELFO**

- **KAPILÁRNÍ** - křemenná kapilára s polyimidovým povlakem



- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

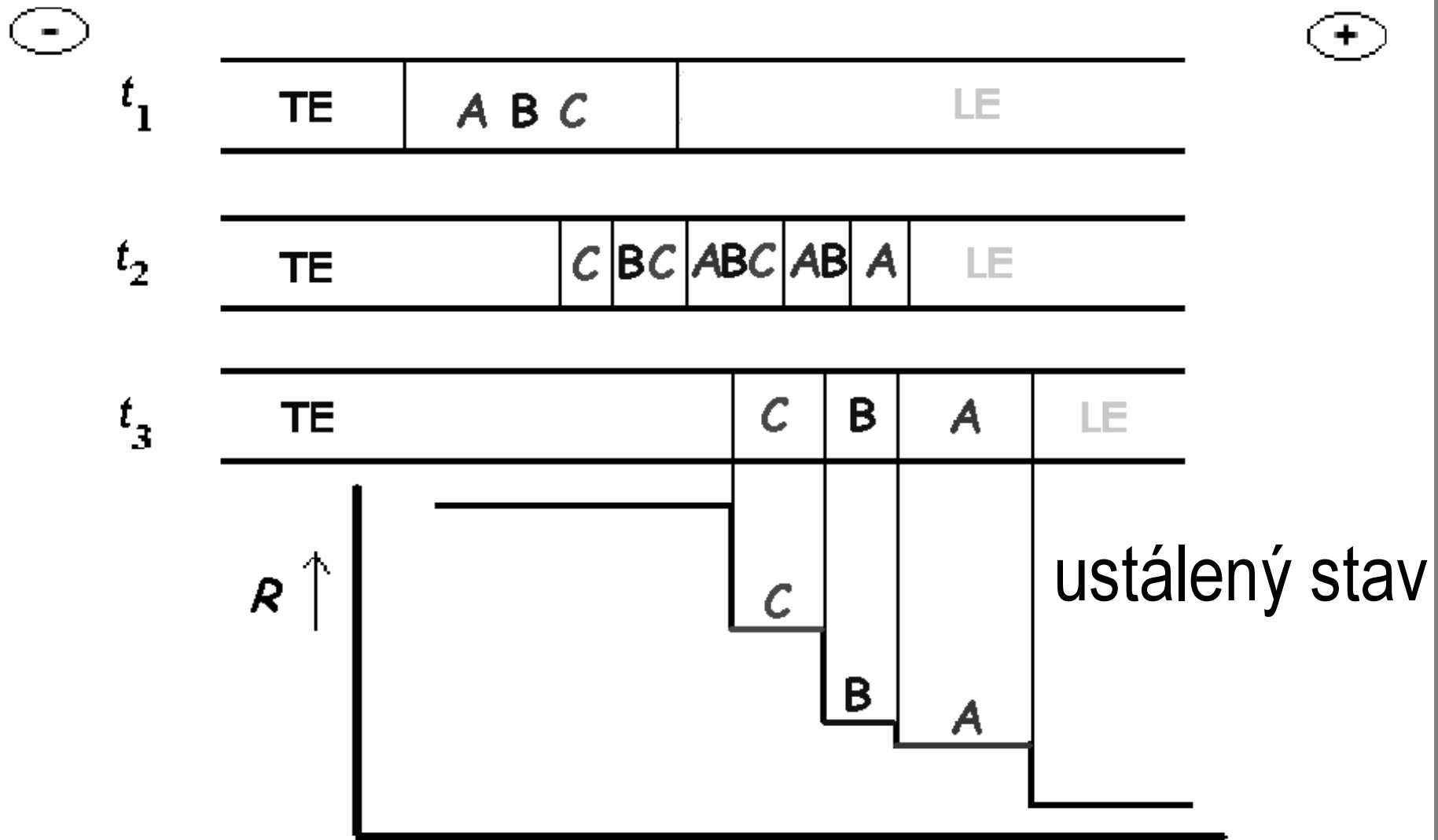
- **ELEKTROFORÉZA - ELFO**

- **KAPILÁRNÍ** - křemenná kapilára s polyimidovým povlakem

- objem kapiláry - méně než 10 μ l
 - kapilára obvykle vyplněna pufrem, gelem - zlepšení separace makromolekul
 - dávka vzorku - 10 nl
 - napětí 10 - 30 kV
 - obvykle spektrofotometrická detekce v „okénku“
v místě bez polyimidového povlaku
 - detekce fluorescenční - LIF - laserem indukovaná fluorescence
 - doba separace - do 10 min
 - peptidy, proteiny, nukleové kyseliny
 - anorganické kationty a anionty
 - iontová farmaka, huminové kyseliny, analýza potravin

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**
- **DĚLENÍ DLE ODLIŠNÝCH POHYBLIVOSTÍ**
 - $u = v / E$,
 - **konstantní v - IZOTACHOFORÉZA**
 - kapilární - objev v 60. letech 20.století
 - dva elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů
 - elektrolyt s **VELKOU** pohyblivostí - **VEDOUCÍ**
 - elektrolyt s **MALOU** pohyblivostí - **KONCOVÝ**
 - **VZOREK VNÁŠEN NA ROZHRANÍ ELEKTROLYTŮ**
 - **VZOREK SE DĚLÍ DLE POHYBLIVOSTI IONTŮ V NĚM OBSAŽENÝCH**
 - vytváří zóny mezi vedoucím a koncovým elektrolytem - **SAMOZAOSTŘUJÍCÍ EFEKT**
 - všechny zóny se pohybují stejnou rychlostí

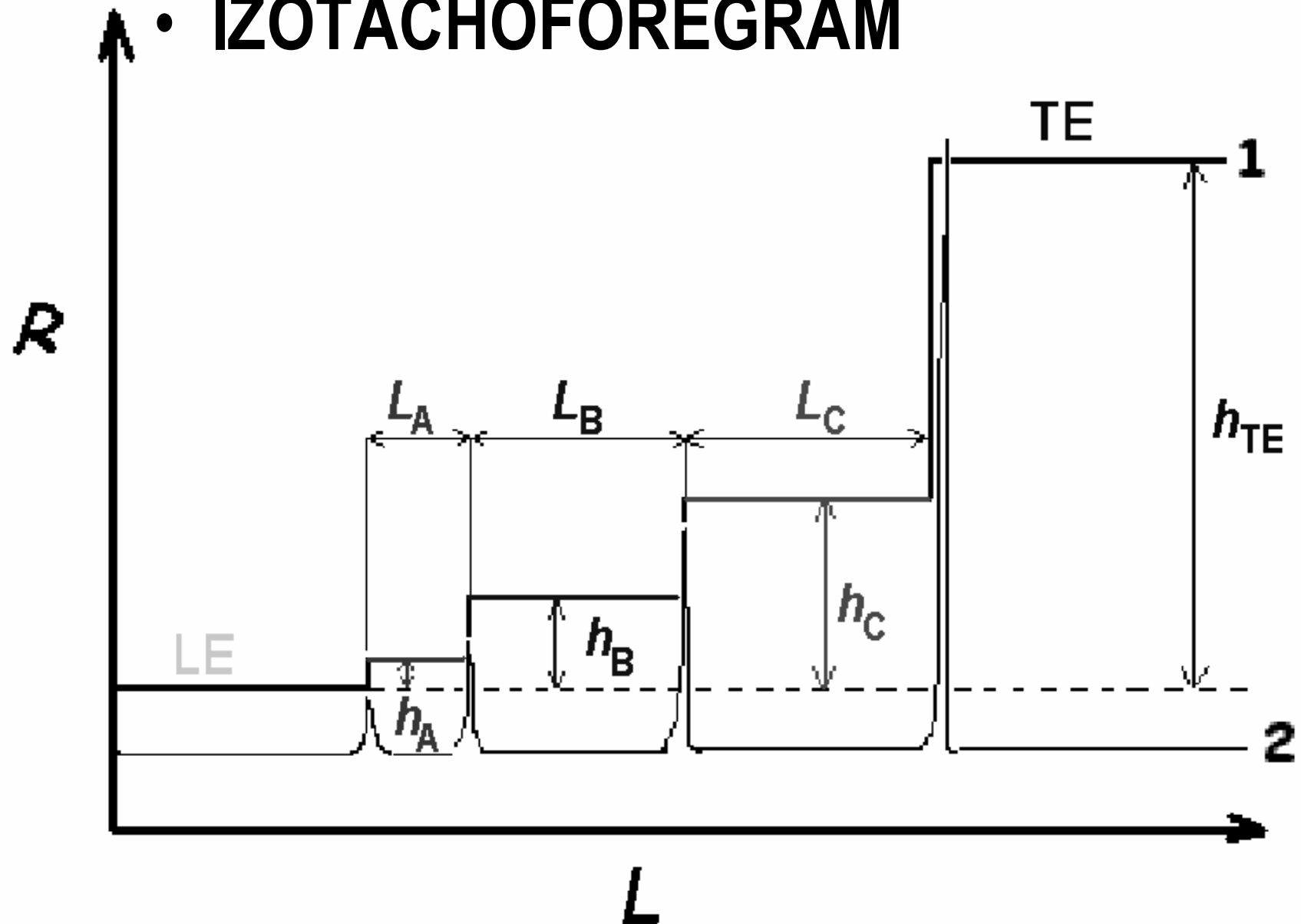
- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**



- **IZOTACHOFORÉZA - pohyb aniontů**

- ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

- IZOTACHOFOREGRAM



- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **IZOTACHOFOREGRAM**

- **VÝŠKA ZÓNY - kvalitativní informace o iontech**

- souvisí s vodivostí dané zóny - s pohyblivostí iontů

- **DÉLKA ZÓNY - KVANTITATIVNÍ INFORMACE**

- koncentrace látek v zónách dána složením a koncentrací vedoucího elektrolytu (všemi zónami protéká stejný proud) - pro danou látku konstantní přes celou zónu - délkou zóny tak dáno celkové látkové množství daného iontu

- **DÉLKA ZÓNY - vzdálenost maxim na derivačním záznamu**

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **konstantní v - IZOTACHOFORÉZA**

- intenzita elektrického pole charakteristická pro zónu

- **KATIONTOVÁ** - DĚLENÍ DLE POHYBLIVOSTI KATIONTŮ

- **ANIONTOVÁ** - DĚLENÍ DLE POHYBLIVOSTI ANIONTŮ

- **INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ**

- **separační kapilára** - průměr 0,5 mm, délka až 50 cm, PTFE, FEP - perfluorovaný PE + PP

- **objem vzorky - mikrolitry** - kohout či stříkačka

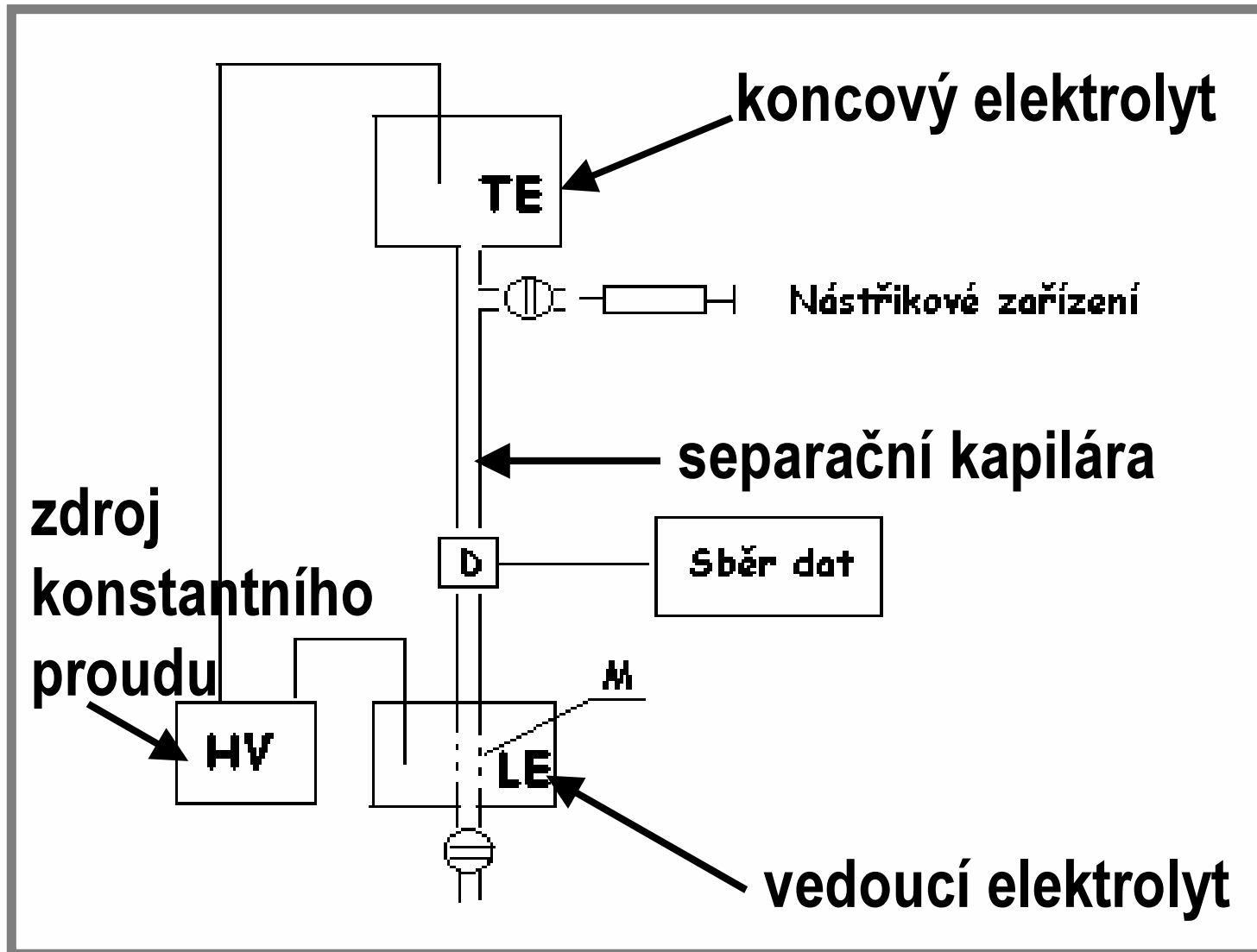
- **používané napětí - řádově kV**

- **STABILIZOVANÝ PROUD - STOVKY MIKROAMPÉR**

- **vodivostní detektor, teplotní detektor, UV-detektor**

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **konstantní v - IZOTACHOFORÉZA**
– **INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ**



- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**
- **konstantní v - IZOTACHOFORÉZA**
 - **aplikace**
 - **ANALÝZA IONOGENNÍCH LÁTEK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ**
 - **ANALÝZA POTRAVIN**
 - **BIOCHEMICKÁ ANALÝZA**
 - **KOMBINACE IZOTACHOFORÉZY A ELEKTROFORÉZY**
 - **IZOTACHOFORÉZA - ZAKONCENTROVÁNÍ SLOŽEK DO ZÓN**
 - **ELEKTROFORÉZA - VYSOKÉ ROZLIŠENÍ SLOŽEK**