

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
 - systém otevřený – nízkotlaký
 - Low (Medium) Pressure Liquid Chromatography
 - systém 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 $-C\equiv N$, 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 - Ize ovlivnit volbou pH*

– retence iontových látek (solí) - prakticky nulová

- Ize ovlivnit volbou pH*

Kapalinová chromatografie

- **SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC**

- vliv pH* na změnu kapacitních poměrů

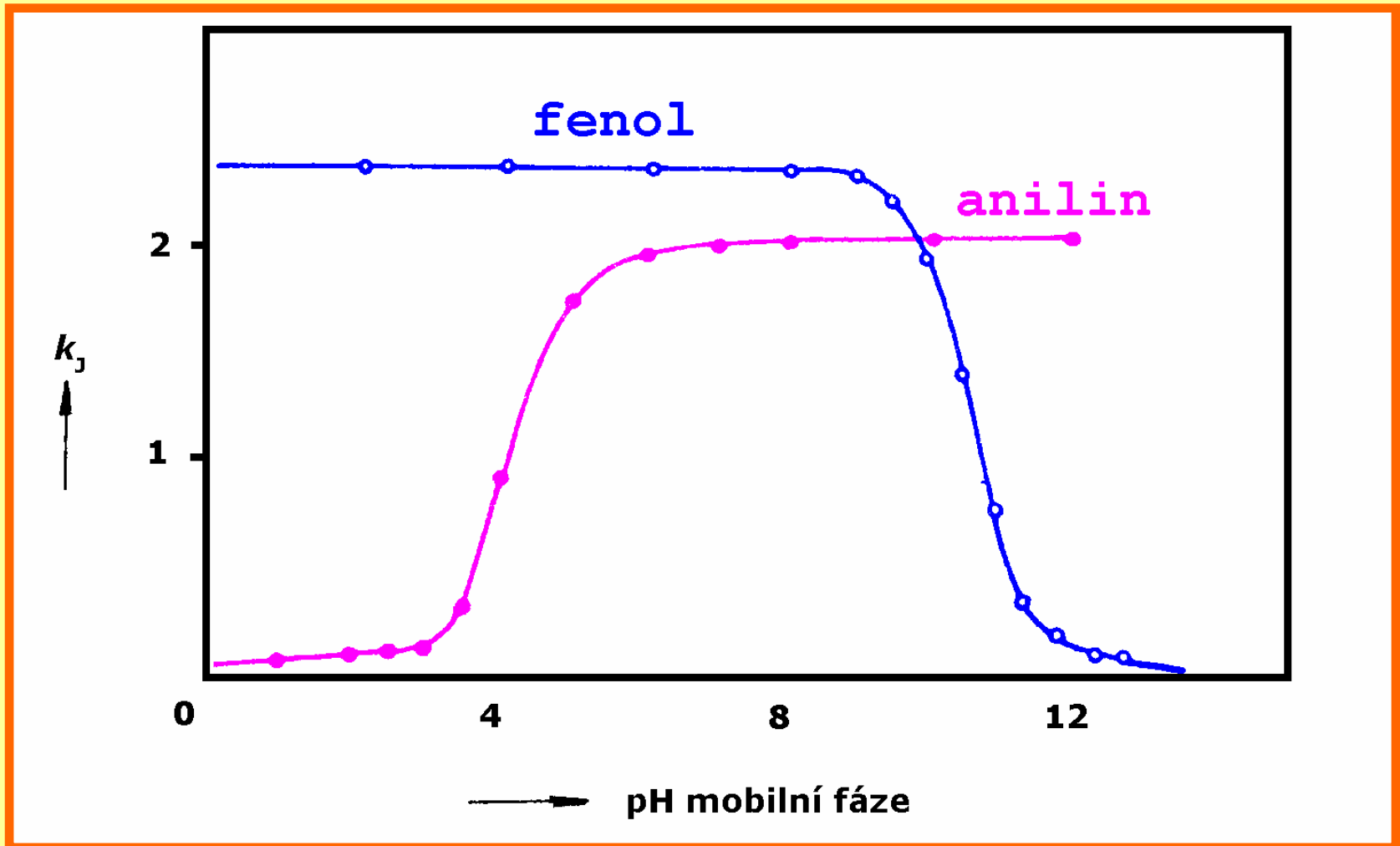
- **V ALKALICKÉM PROSTŘEDÍ POTLAČENA IONIZACE BAZÍ** - zvýšení jejich retence
 - **V ALKALICKÉM PROSTŘEDÍ ZNAČNÁ DISOCIACE KYSELIN** - omezení jejich retence

 - **V KYSELÉM PROSTŘEDÍ POTLAČENA DISOCIACE SLABÝCH KYSELIN** - zvýšení jejich retence
 - **V KYSELÉM PROSTŘEDÍ PROTONACE BAZÍ** - omezení jejich retence

Kapalinová chromatografie

SEPAROVANÉ SLOŽKY v LLC

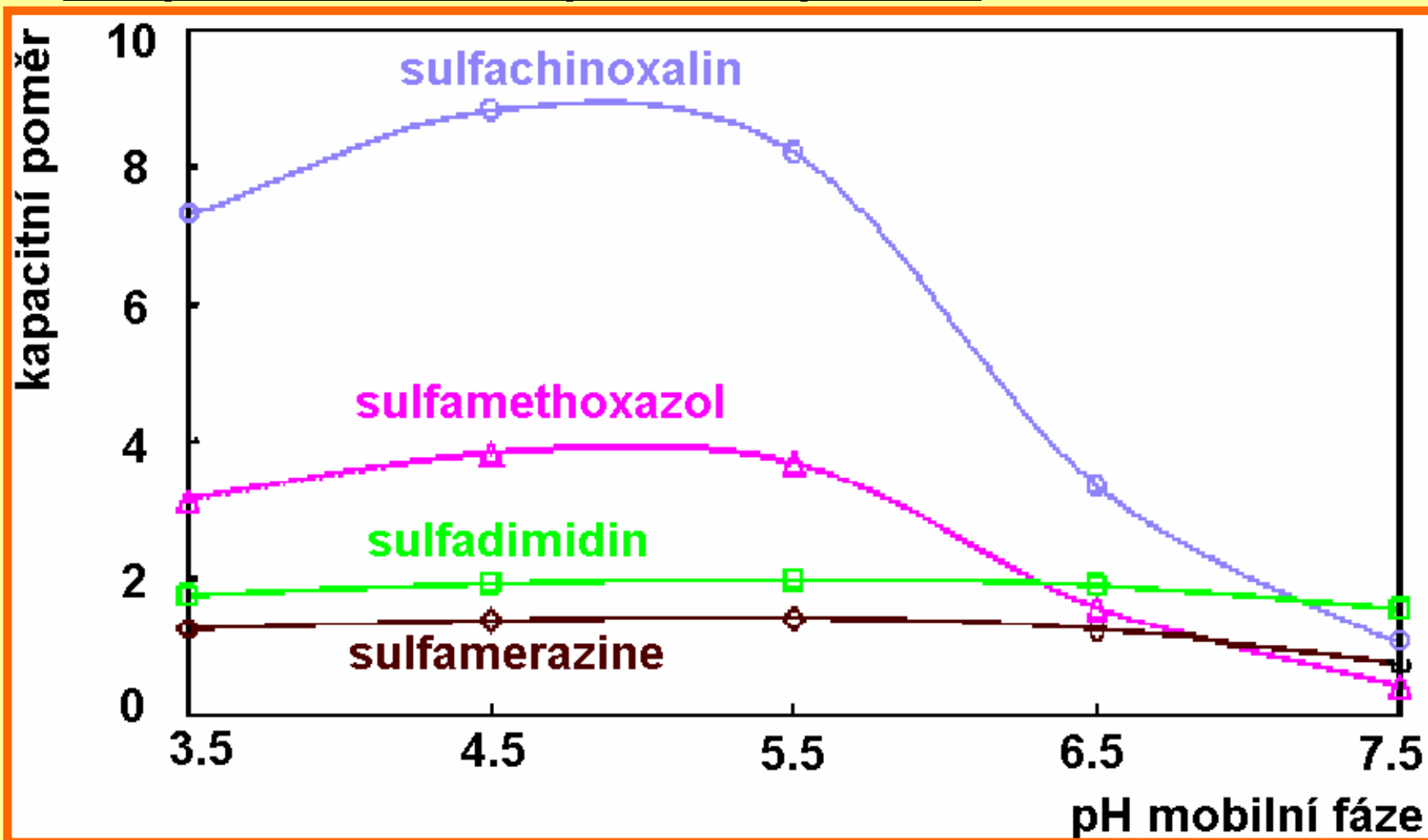
– vliv pH* na změnu kapacitních poměrů



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**

- **tvár 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 - $\varnothing \sim 10 \mu\text{m}$**
 - **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

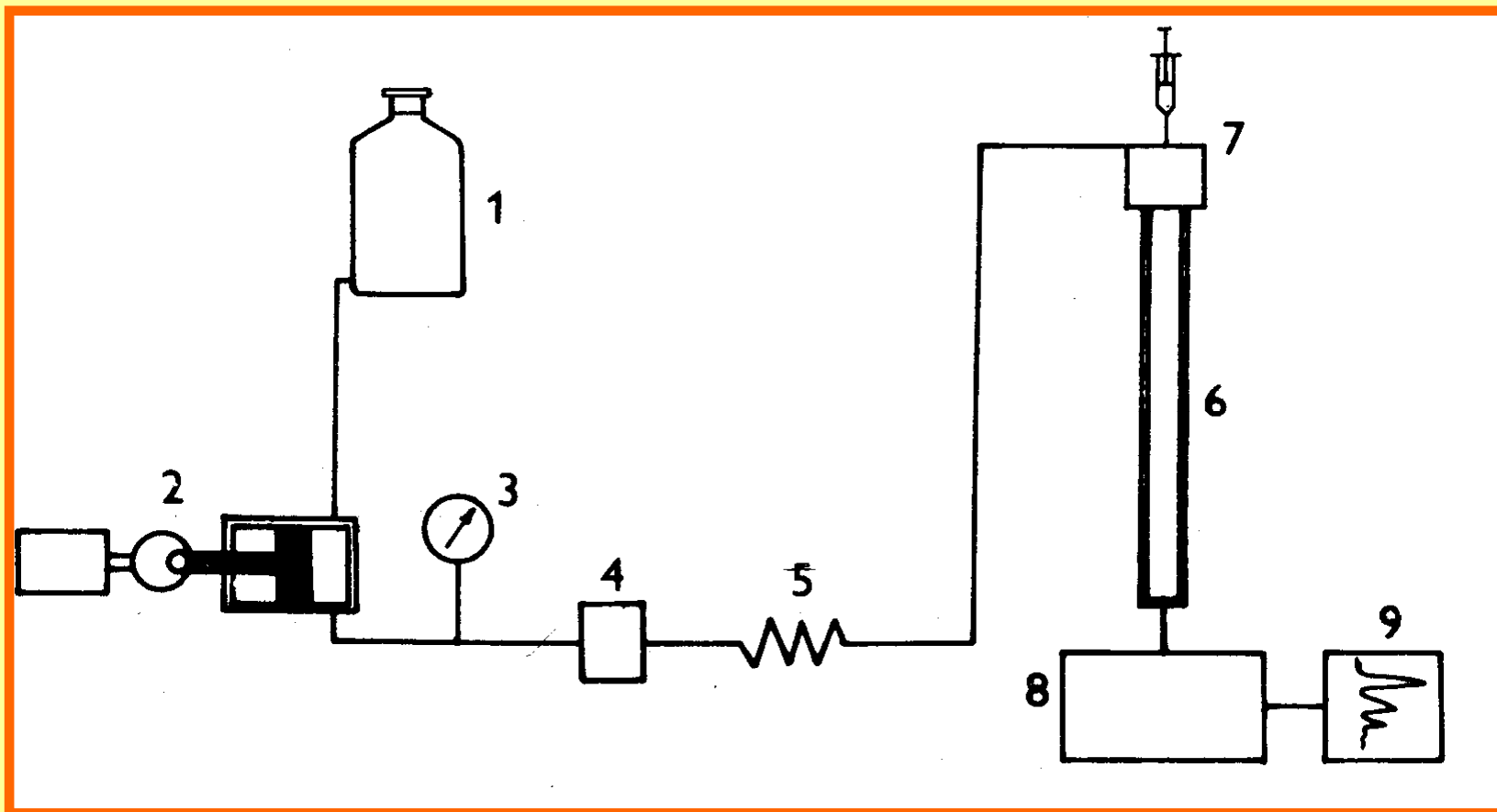
Kapalinová chromatografie

- **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**
 - nerezová 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 μl , 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 -
jednokanálová 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

- nenabitě 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 nabitě protiionty

- protiionty shodné s jedním z iontů mobilní fáze

- **PŘI SEPARACI protiion 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 - (CO_2)
 - 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 CO_2 - 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
 - lze 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

• DĚLENÍ 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**



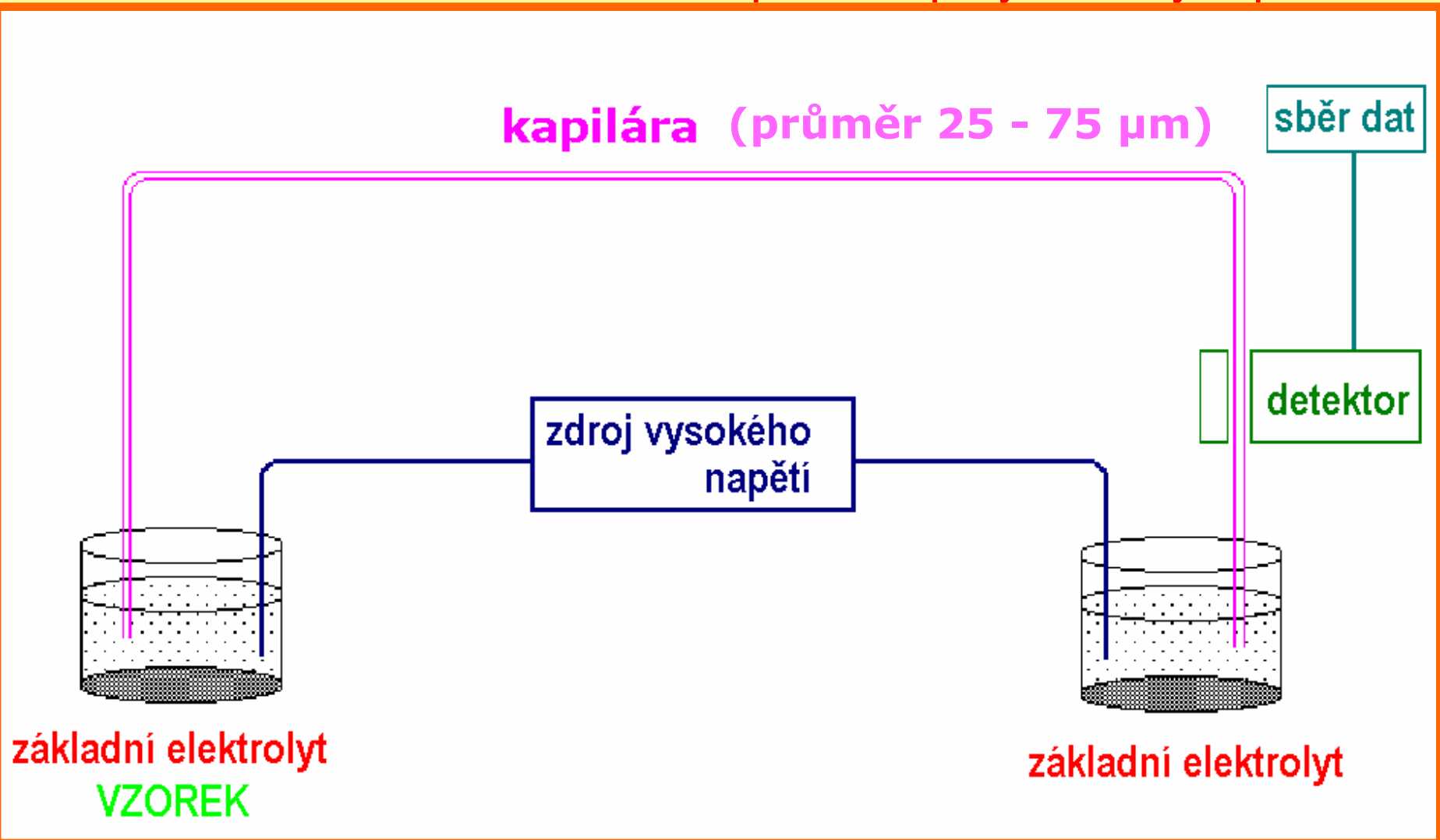
například:

- **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 ROZHHRANÍ ELEKTROLYTŮ**

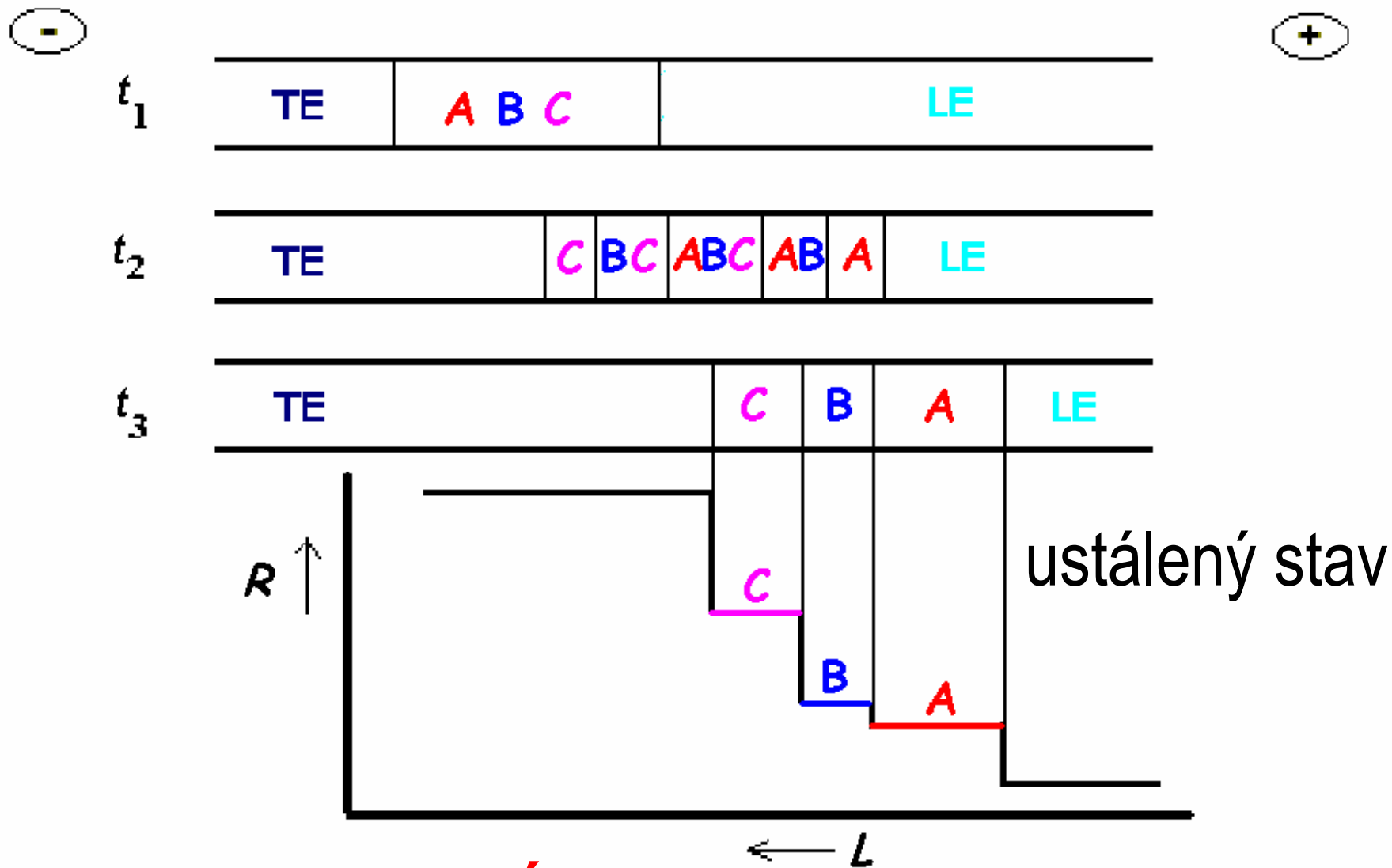
- VZOREK SE DĚLÍ DLE POHYBLIVOSTI IONTŮ
V NĚM OBSAŽENÝCH

- vytváří zóny mezi vedoucím a koncovým

- elektrolytem - SAMOZAOSTŘUJÍCÍ EFEKT

- všechny zóny se pohybují stejnou rychlostí

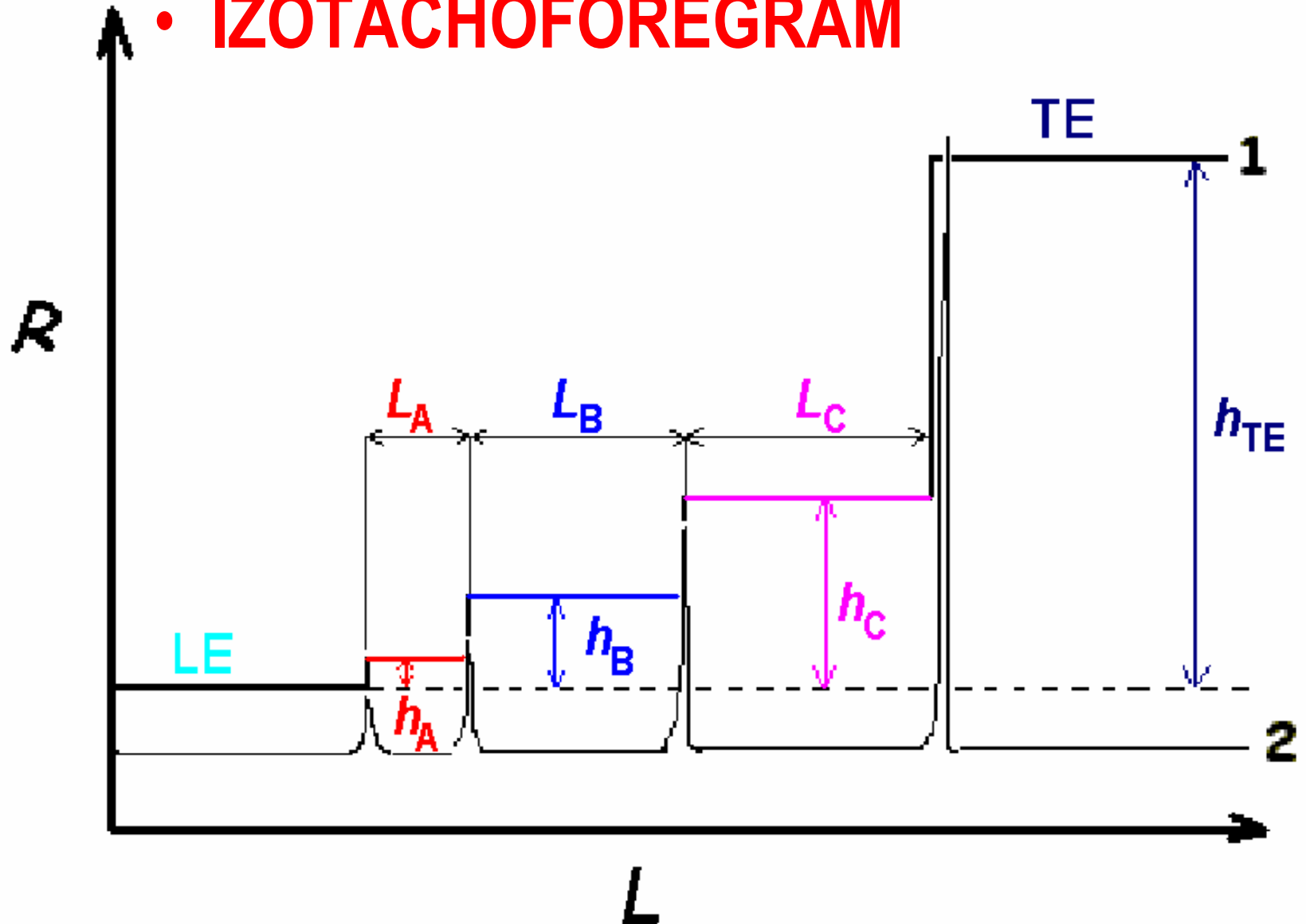
• ELEKTROMIGRAČNÍ METODY



• **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

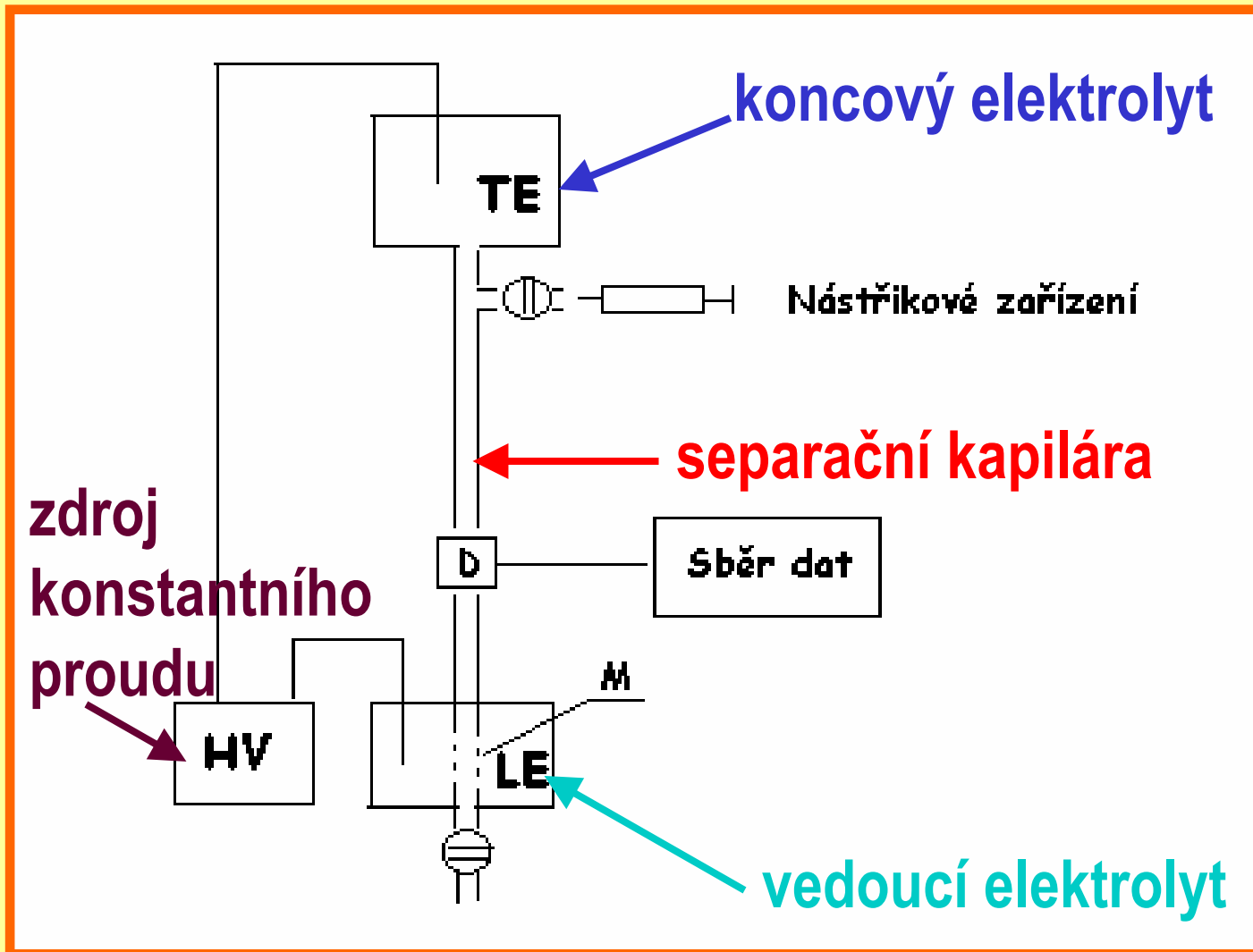
• ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

• 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**