

# Kapalinová chromatografie - LC

- Fyzikálně-chemická metoda dělení kapalin (roztoků) využívající rozdělávání 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 - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> 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  $\blacktriangle$  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**

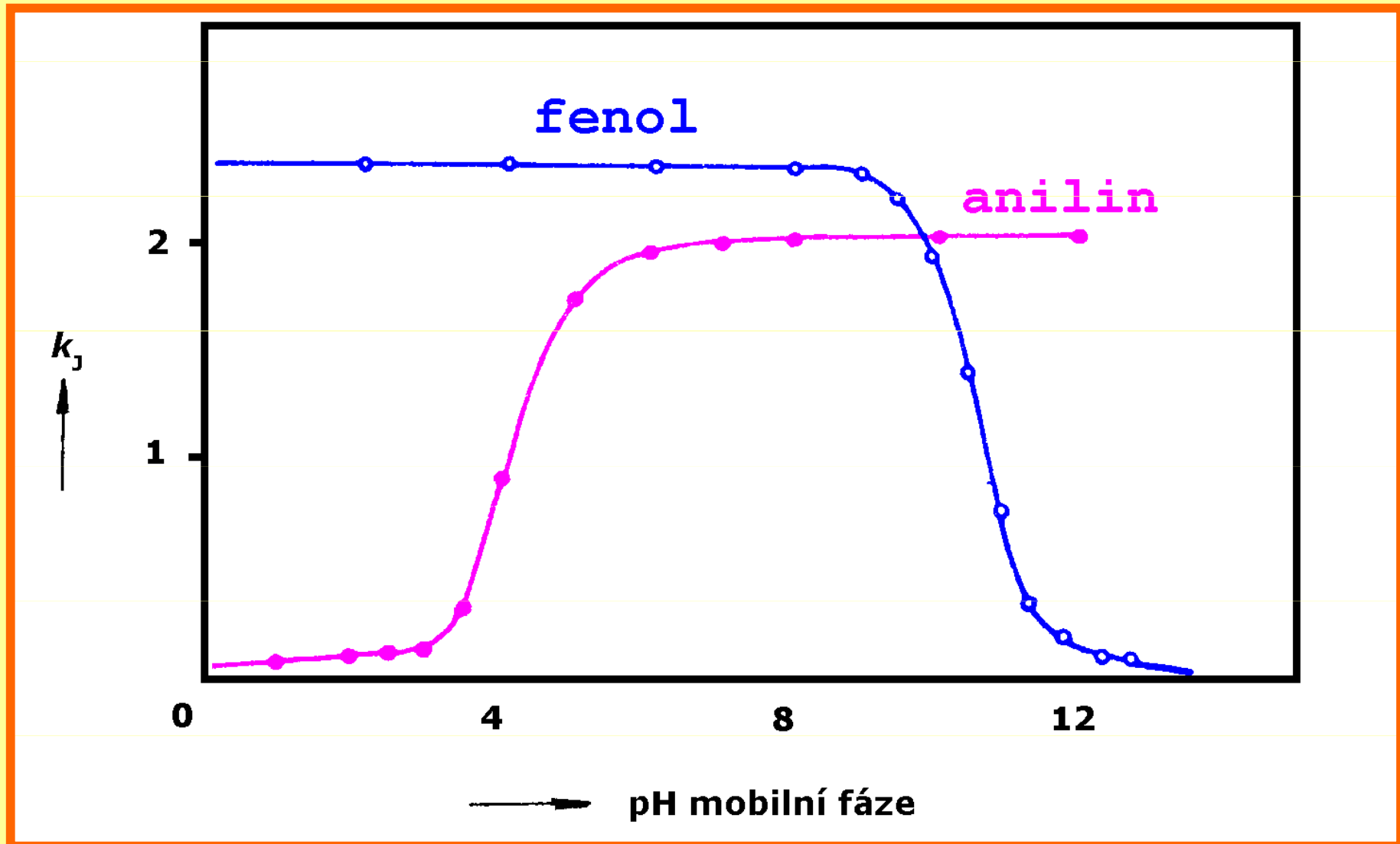
- vliv pH\* na změnu kapacitních poměrů

- **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

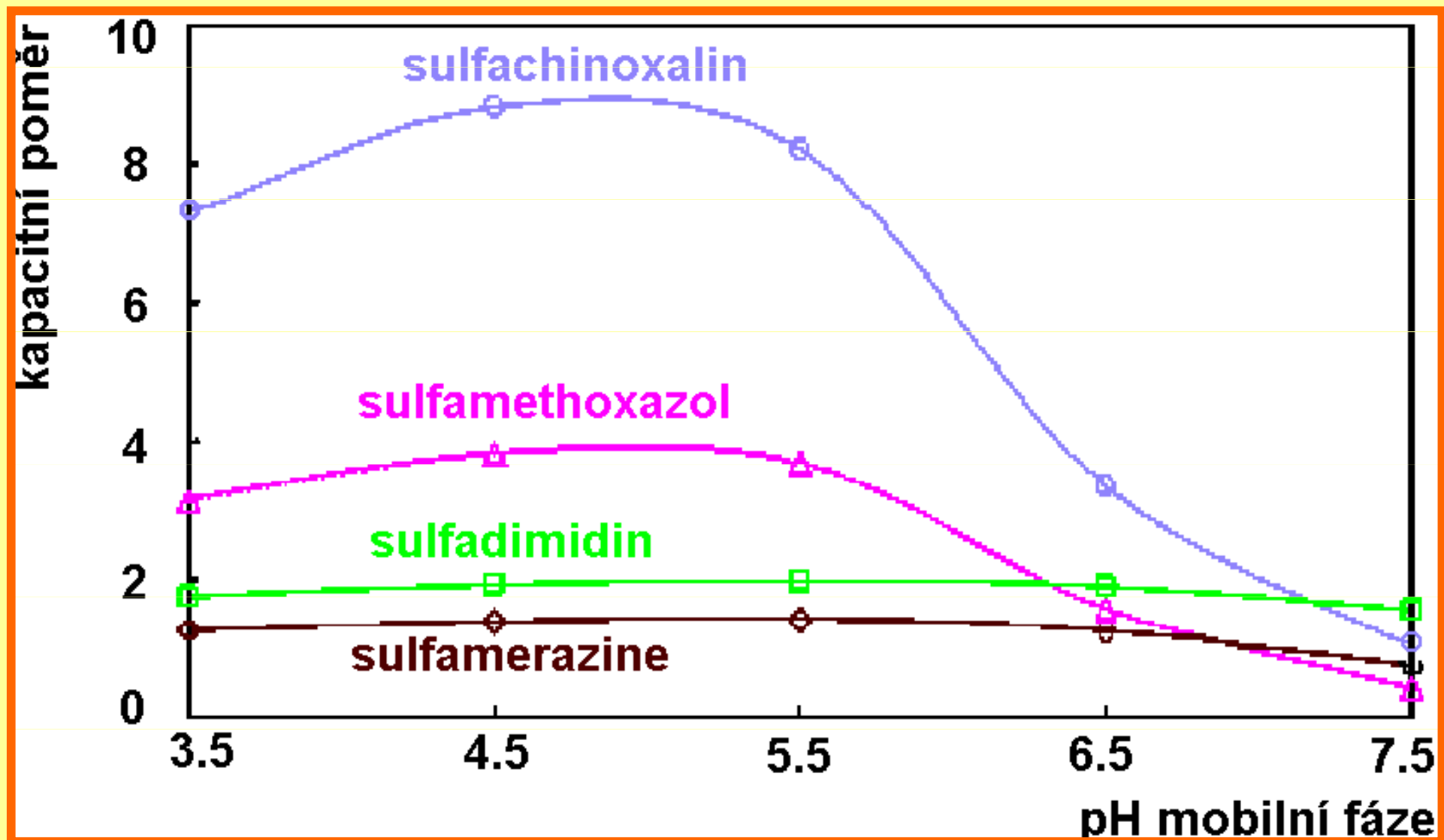




# Kapalinová chromatografie

- 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 -  $\text{mol.g}^{-1}$
      - obsah složky J v mobilní fázi -  $\text{mol.cm}^{-3}$
    - **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  $\text{SiO}_2$  - **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%  $\text{SiO}_2$ , 15,5%  $\text{MgO}$ , 0,5%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
      - » **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**

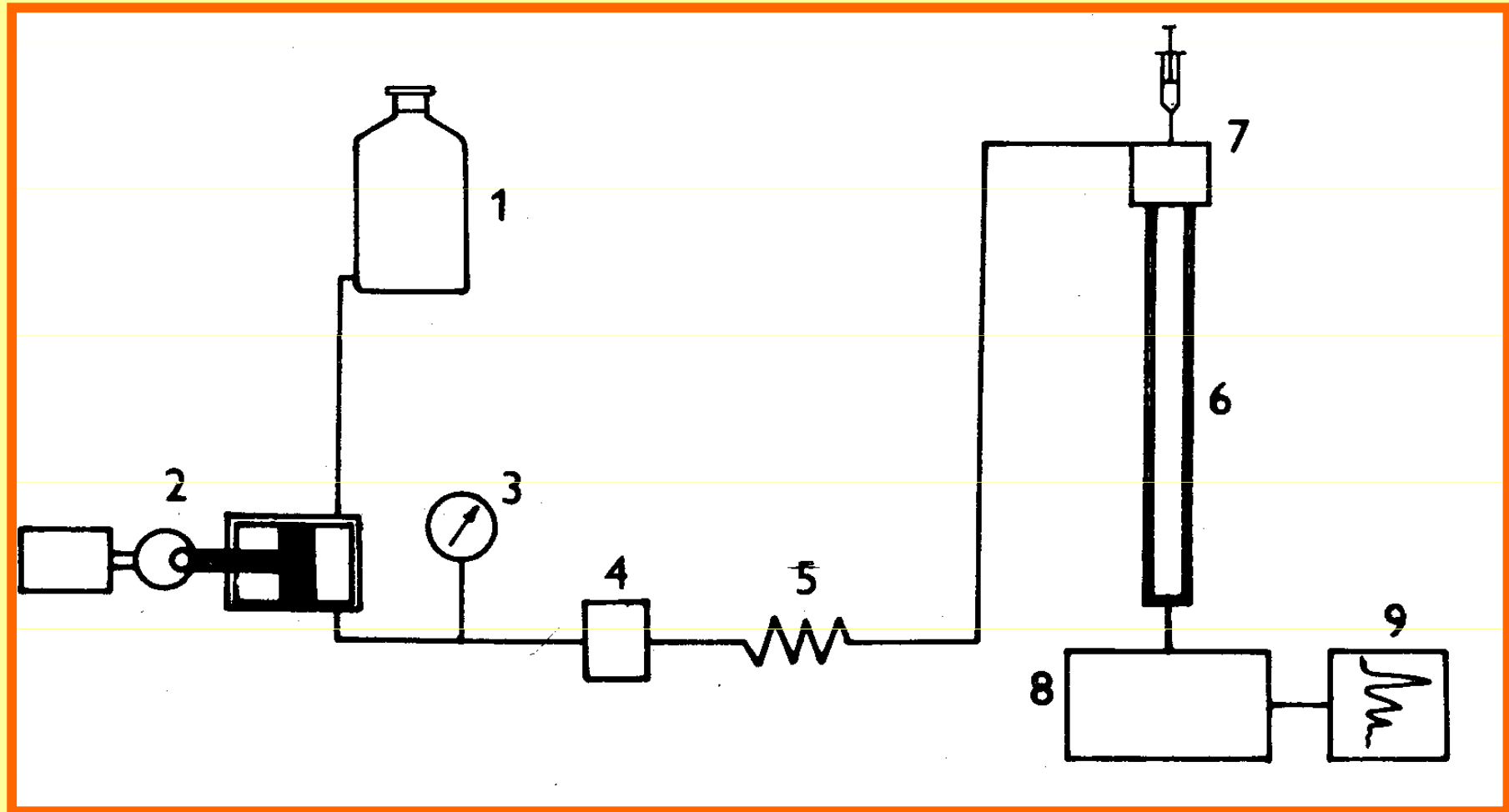
# Kapalinová chromatografie

- **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

7. Dávkovač vzorku - pomocí ventilů

9. Vyhodnocovací zařízení

2. Vysokotlaká čerpadla

5. Tlumič tlakových pulsů

# • **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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sub>2</sub>)**
  - 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<sub>2</sub> - 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 - (CO<sub>2</sub>)**
  - **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 - (CO<sub>2</sub>)**
  - 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 -**
  - **CO<sub>2</sub>** - nejběžnější, pro polární látky přídavek methanolu
  - **SF<sub>6</sub>**, - 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

- $F_1 = Q E = ze E$ ,  $E$  - intenzita pole

- uvedení iontů do pohybu

- síla brzdná - odpor prostředí

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

- viskositou 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**



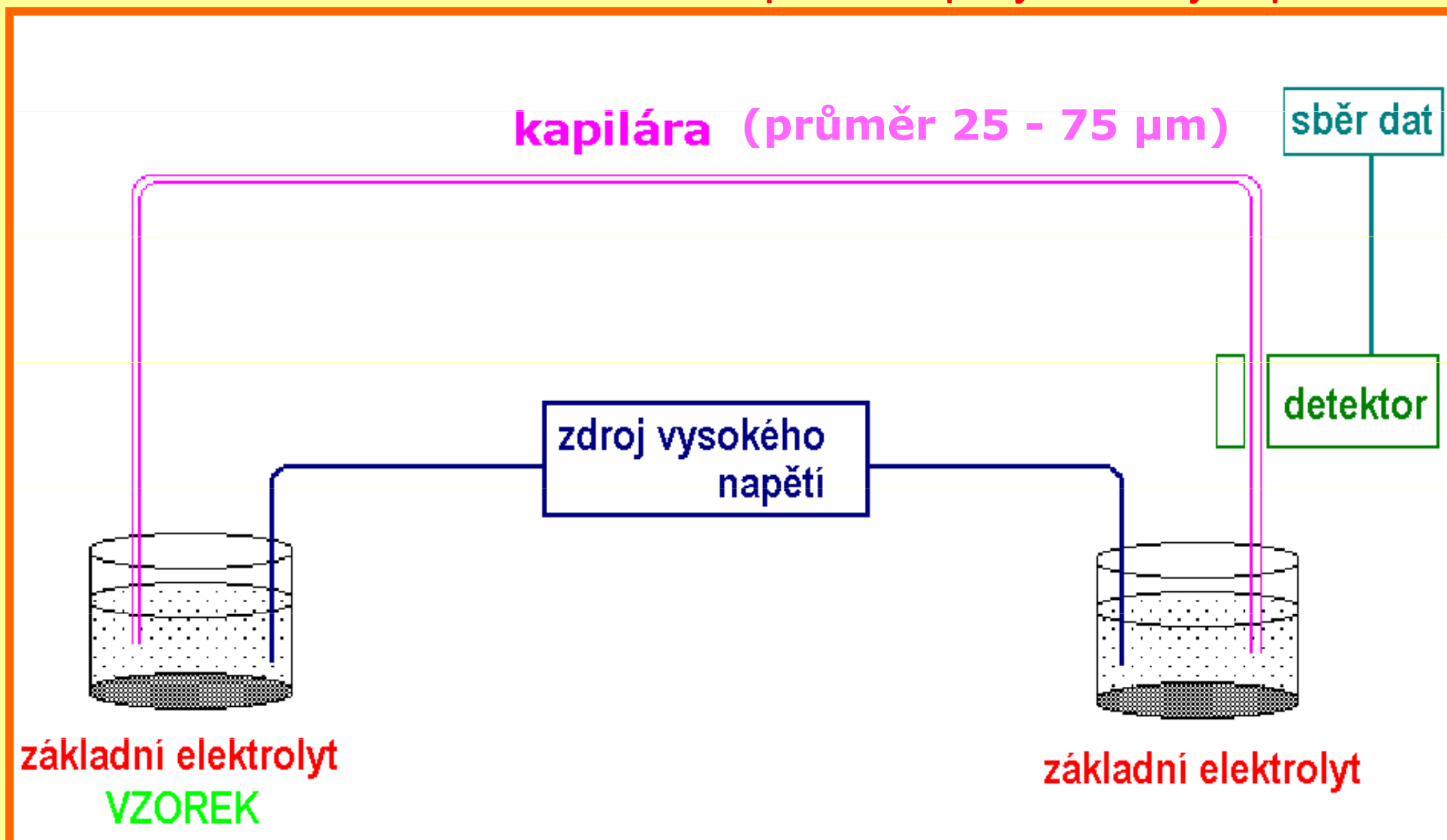
například:

- **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

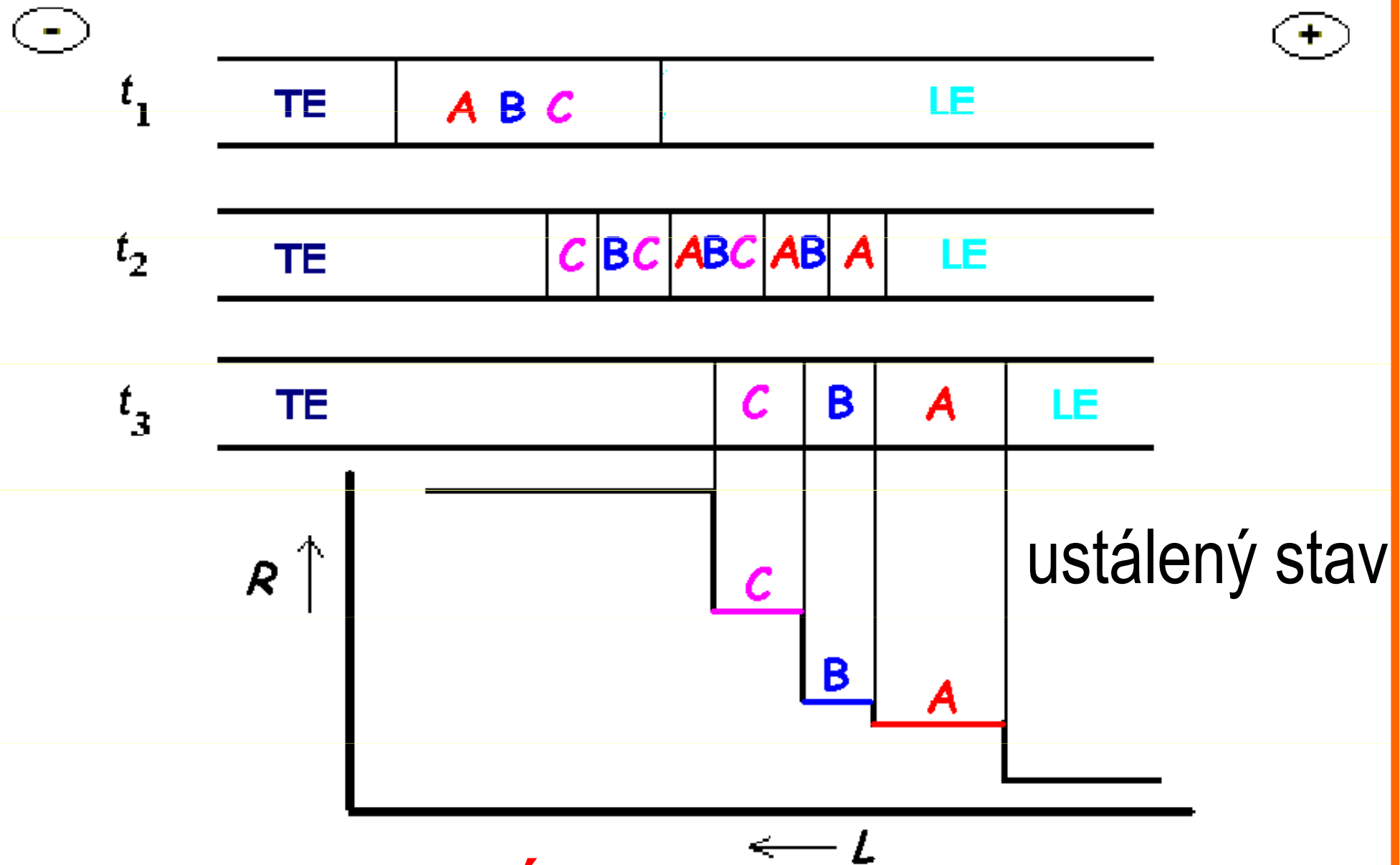
### – KAPILÁRNÍ - křemenná kapilára s polyimidovým povlakem

- objem kapiláry - méně než 10  $\mu$ 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

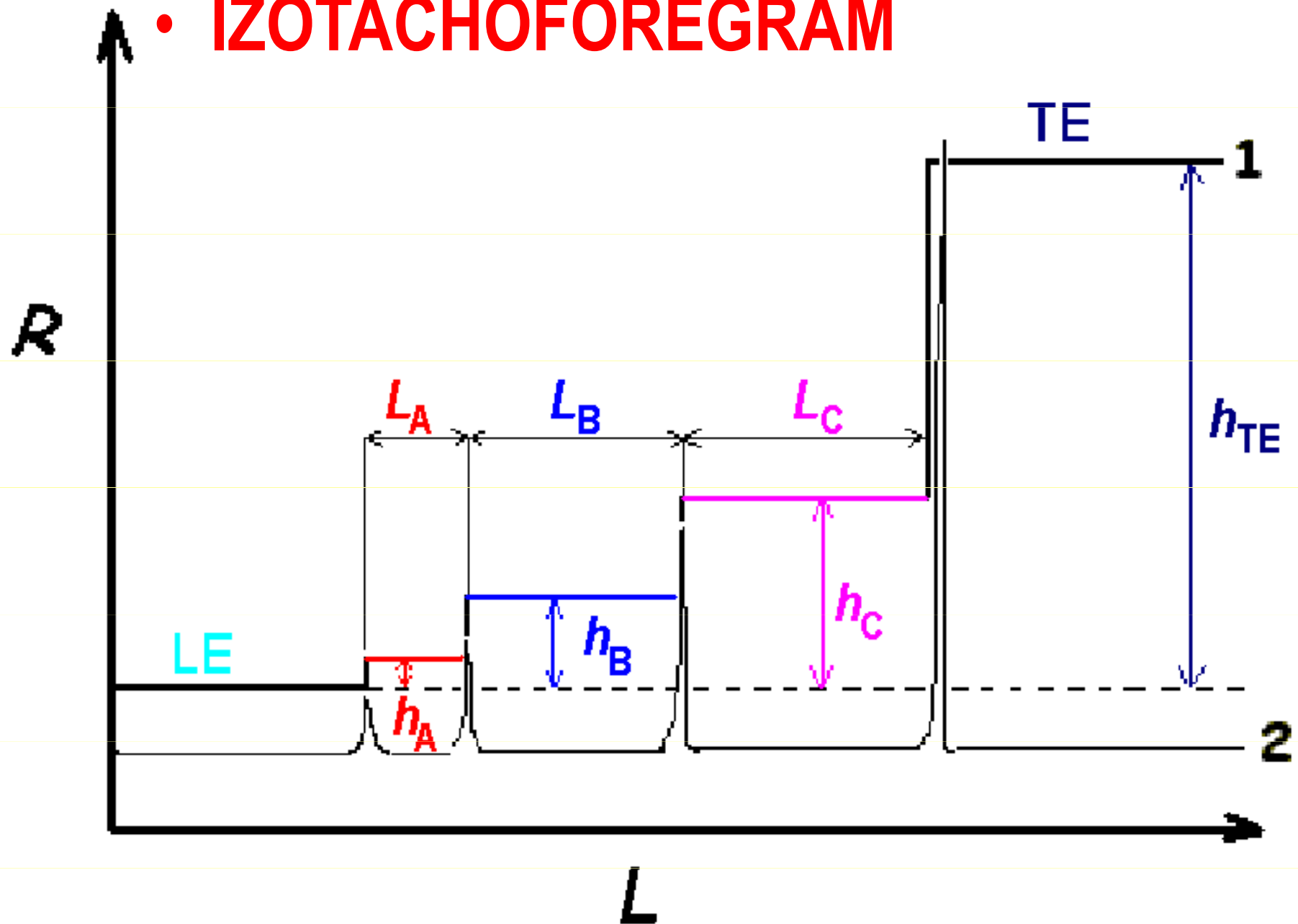
# • ELEKTROMIGRAČNÍ METODY



• **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

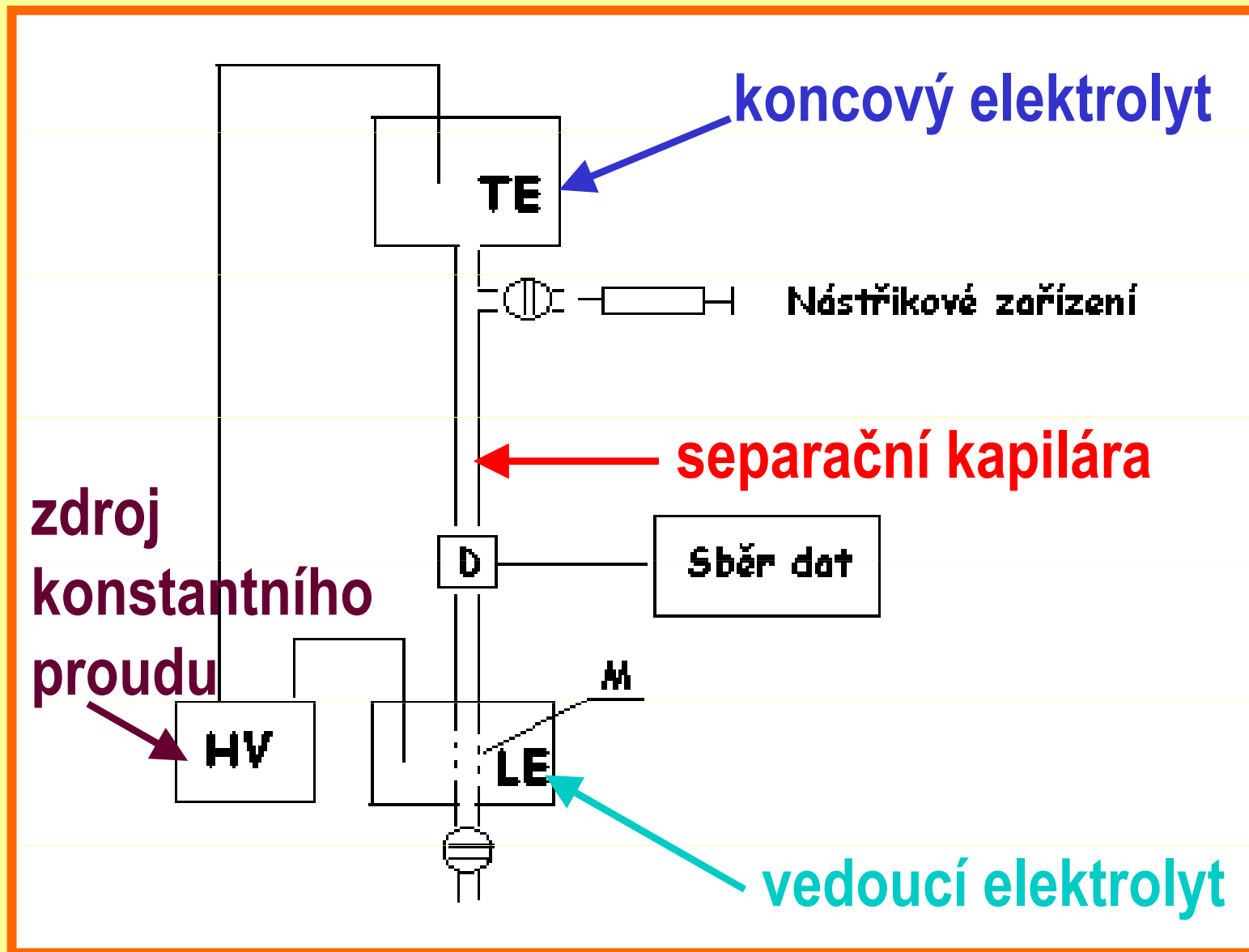
# • ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

## • 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**