

**KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ**  
**Metody**

**Jiří FAIMON**

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## **Metody studia koloidních systémů:**

- *Metody izolace koloidních částic*  
ultrafiltrace, ultrafiltry, membrány,  
chromatografické gely, kolonová chromatografie, gelová filtrace,  
gelová chromatografie
- *Studium koloidů po jejich separaci*  
elektronová mikroskopie,  
neutronová aktivační analýza,  
plynová chromatografie
- *Studium koloidů bez separace*  
Thyndalův jev, optické metody, spektrofotometrie

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## STUDIUM KOLOIDNÍ FÁZE *bez separace koloidní fáze,*

využívajících různých jevů - např.

- **rozptylu** resp. **difrakce světla** na částicích (např. Fitch a Watson 1979, Zollars 1980, Fedin 1983, Melik a Fogler 1983, Bowen et al. 1985, Gee et al. 1990, Penders et al. 1991, Schnablegger a Glatter 1993),
- **spekter** (Bottero et al. 1980, Cary et al. 1982, Browne a Driscoll 1992), nebo
- **pohyblivosti částic** (např. Asakava et al. 1992, Mangelsdorf a White 1992).

## KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Další používanou metodou je rozlišení jednoduchých látek od polymerních (koloidních) za pomoci **spektrofotometrických metod**:

**Jednoduché iony** jsou stanoveny spektrofotometricky (křemík - viz. napr. Truesdale a Smith 1976, Tler 1979, Otterstedt et al. 1986; hliník - viz. Hydes a Liss 1976, Yokoyama et al. 1987, 1991) a **celkový obsah** sledovaného prvku se stanoví některou instrumentální metodou (AAS, ICP). **Obsah vyšších polymerů a koloidů lze určit z rozdílu.**

Tato metoda je však vhodná spíše pro modelové experimenty s jedinou, jasně definovanou složkou. Při analýze složitých směsí, např. produktů zvětrávání, popř. přírodních vod, může docházet k chybám, protože reakce spektrofotometrických činidel jsou jen zřídka dostatečně selektivní.

## KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Druhou možností, je **separace koloidní faze** (bud' izolací koloidních částic nebo naopak odstraněním jednoduchých nízko-molekulárních látek z koloidních roztoků) a její zkoumání běžnými instrumentálními metodami –

- v roztoku (ICP, AAS)
- v tuhé formě (SEM, EDXR)

Kromě speciálních separačních metod, jako jsou **isotachoforéza, elektroforéza** (Puls et al. 1990, 1991, Puls a Powell 1992) a různých variant **ultracentrifugace** (Beckett et al. 1988, Li a Caldwell 1990, Hoffman 1991) se nejběžněji používá

- **ultrafiltrace**
- **různé formy vylučovací chromatografie**
- **„cross flow“ separace**

## Ultrafiltrace

K definování horní hranice rozměru koloidních částic bývá aplikována ultrafiltrace.

Tato metoda (napr. Sigleo a Helz 1981, Hunter 1982, Sigleo et al. 1982, Means a Wijayaradni 1982, VonGunten et al. 1987, Degueldre et al. 1988, Puls et al. 1990, 1991, Waber et al. 1990, Puls a Powell 1992) využívá k separaci **membránové filtry** s přesně **definovaným rozměrem póru**, kterými mohou procházet jen částice do určitého rozměru (oblast dělení, dělící hrana), resp. molekulových hmotností (dále jen MW).

Podrobný rozbor procesu a zdrojů chyb při ultrafiltraci lze nalézt v práci Danielsona (1982).

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

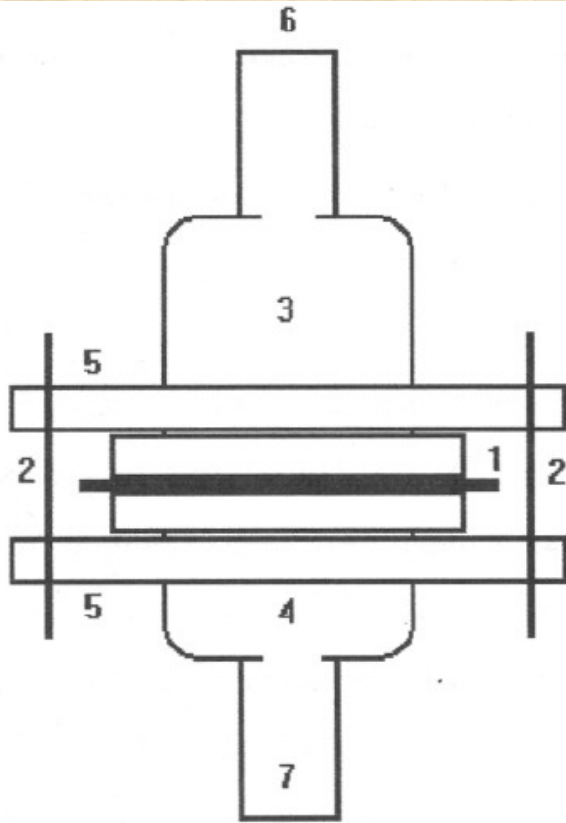
## Zařízení pro ultrafiltraci

Přípravek se skládá ze dvou skleněných protikusů se zabroušenými čely. V čele jednoho z nich je přitmelená frita, na niž je vkládána filtrační membrána. Obě části zařízení jsou spojeny přes pryžové podložky aluminiovou přírubou a čtyřmi šrouby.

Roztoky vzorku byly vpravovány do horní části zařízení injekční stříkačkou a pak, po připojení přívodu z tlakové lahve, filtrovány pod přetlakem 30kPa dusíku.

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## Ultrafiltrace – membránové filtry



**Obr.3.4. Přípravek pro ultrafiltraci**

*1 - membránový filtr*

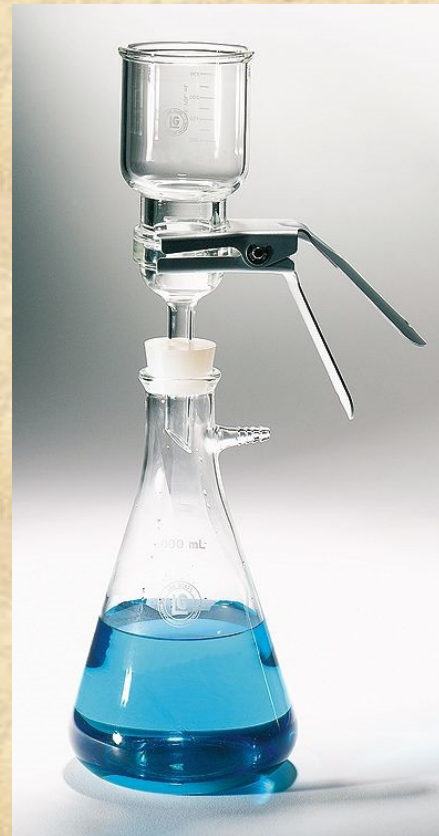
*2 - šrouby*

*3,4 - skleněné protikusy se  
zabroušeným čelem*

*5 - kovové příruby*

*6 - vsádka vzorku, resp. přívod  $N_2$*

*7 - odvod přefiltrovaného vzorku*





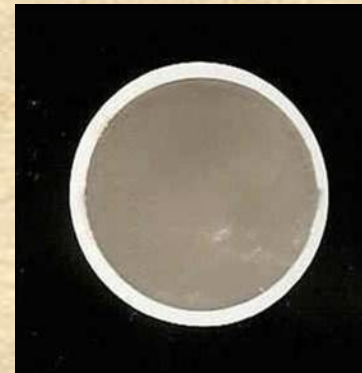
# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Separace částic aerosolu

Atmogeochemická aparatura



Filtrační koláč

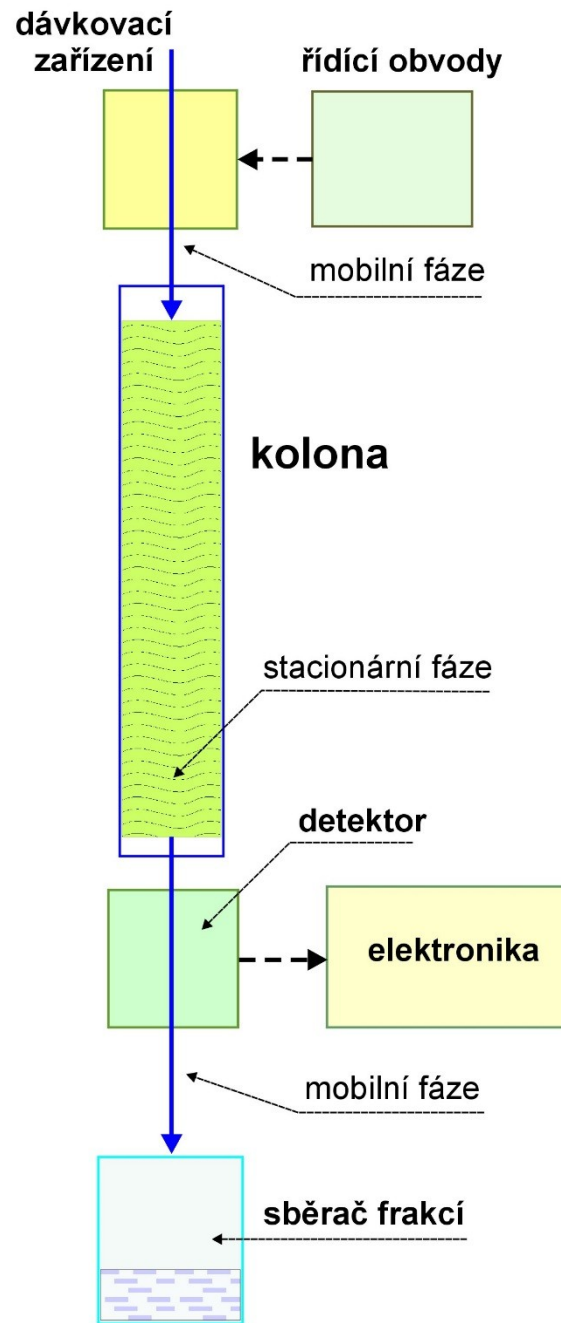


# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## Chromatografické metody

- kolona
- stacionární fáze
- mobilní fáze

Dělení na principu rozdílných afinit rozpuštěných látek (v mobilní fázi) ke stacionární fázi



## **Gelová filtrační chromatografie**

Chromatografická metoda, částice jsou separovány podle velikosti (hydrodynamického objemu)

### **Size Exclusion Chromatography (SEC)**

- **Gel Permeation Chromatography (GPC)**

Mobilní fáze: organická rozpouštědla

Distribuce organických polymerů

- **Gel Filtration Chromatography (GFC)**

Mobilní fáze: vodné roztoky

Frakcionace proteinů a dalších ve vodě rozpustných polymerů

Dělení koloidních částic

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

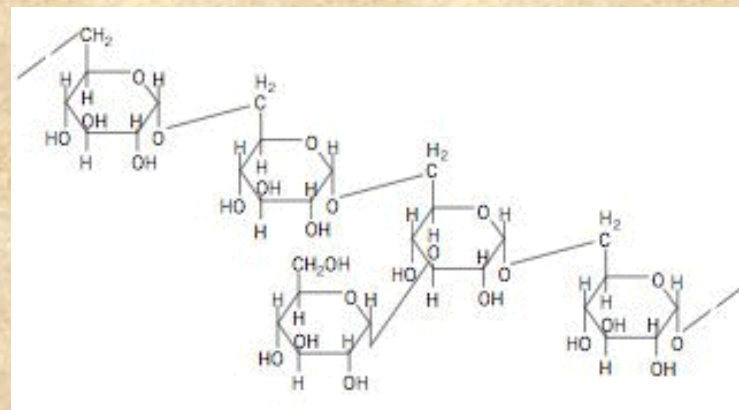
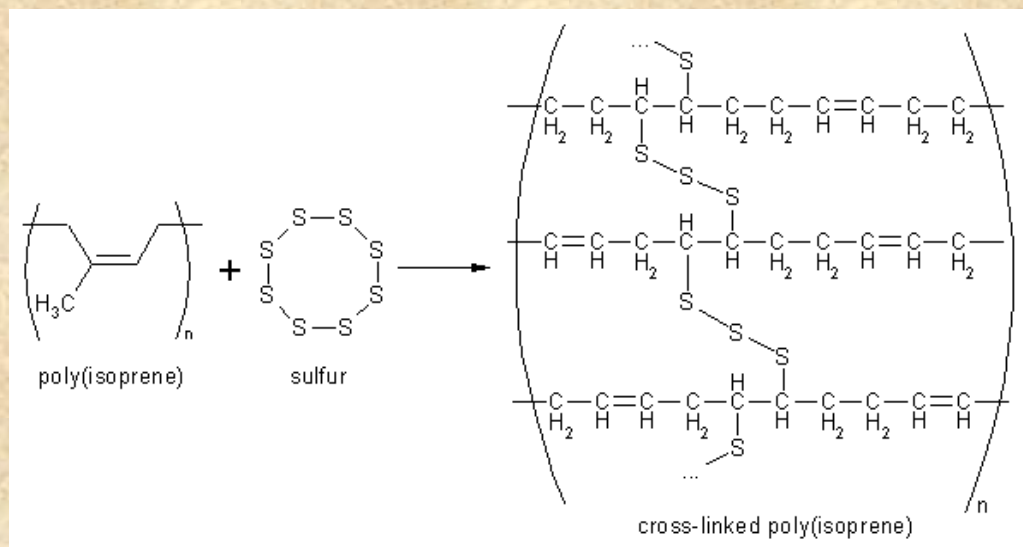
## Stacionární fáze: Dextranový gel

### Dextran

polysacharid – molekuly glukózy spojených do řetězců různé délky

### Sephadex

obchodní název pro „cross-linked“ dextranový gel



Křížem pospojované řetězce polymeru.

Polymerace do 3-rozměrné sítě - labyrint pórů

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## Sigma-Aldrich

Catalog Number	Description	Bead size ( $\mu$ )
<b>Sephadex Gel-Filtration Resins</b>		
<a href="#"><u>27,103-9</u></a>	Sephadex G-10	40-120
<a href="#"><u>27,104-7</u></a>	Sephadex G-15	40-120
<a href="#"><u>27,106-3</u></a>	Sephadex G-25	20-50
<a href="#"><u>27,107-1</u></a>	Sephadex G-25	20-80
<a href="#"><u>27,109-8</u></a>	Sephadex G-25	50-150
<a href="#"><u>27,110-1</u></a>	Sephadex G-25	100-300
<a href="#"><u>27,112-8</u></a>	Sephadex G-50	20-50
<a href="#"><u>27,113-6</u></a>	Sephadex G-50	20-80
<a href="#"><u>27,114-4</u></a>	Sephadex G-50	50-150
<a href="#"><u>27,115-2</u></a>	Sephadex G-50	100-300
<a href="#"><u>27,116-0</u></a>	Sephadex G-75	20-50
<a href="#"><u>27,117-9</u></a>	Sephadex G-75	40-120
<a href="#"><u>27,118-7</u></a>	Sephadex G-100	20-50
<a href="#"><u>27,119-5</u></a>	Sephadex G-100	40-120
<a href="#"><u>27,121-7</u></a>	Sephadex G-150	40-120
<a href="#"><u>27,123-3</u></a>	Sephadex G-200	40-120

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## Sephadex

- různý stupeň porozity
- průměr perel 20 až 300 $\mu$ .

### Sephadex® G-100

**for gel filtration, 20-50  $\mu$ m**

Replaced by G10050, Sephadex® G-100

©Pharmacia Biotech AB

Properties: **for gel filtration**

bead size: **20-50  $\mu$ m**

pore size: **1,000-100,000 fractionation range: M.W.**

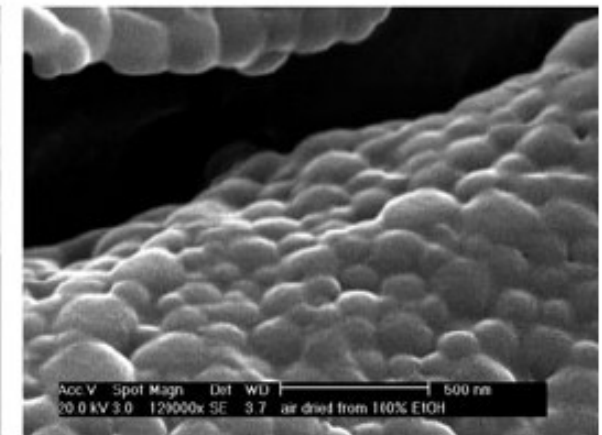
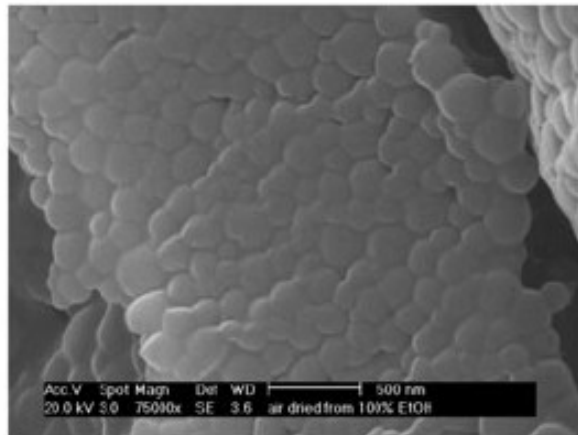
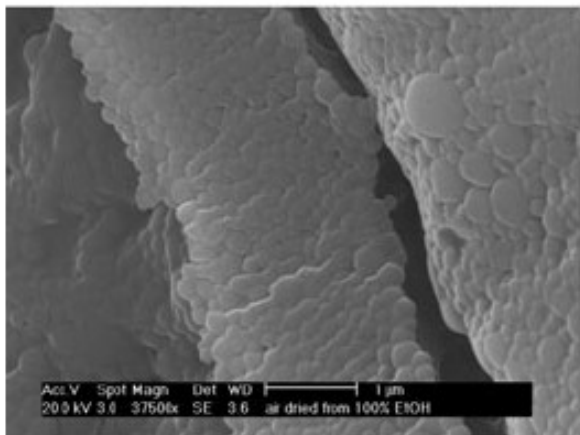
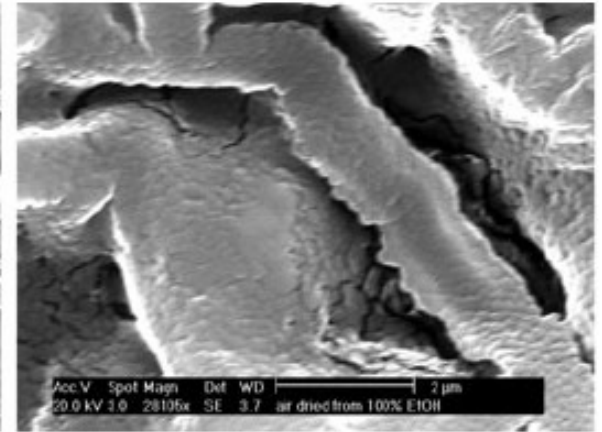
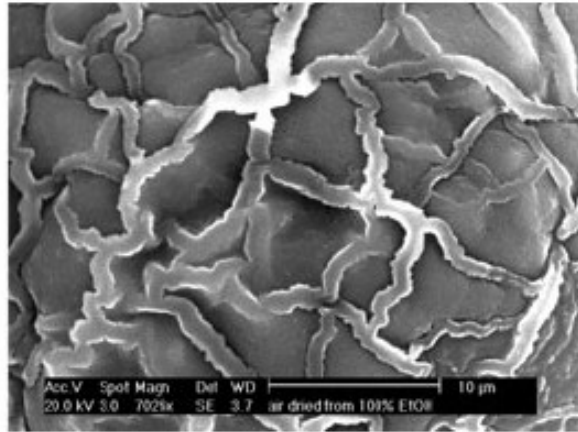
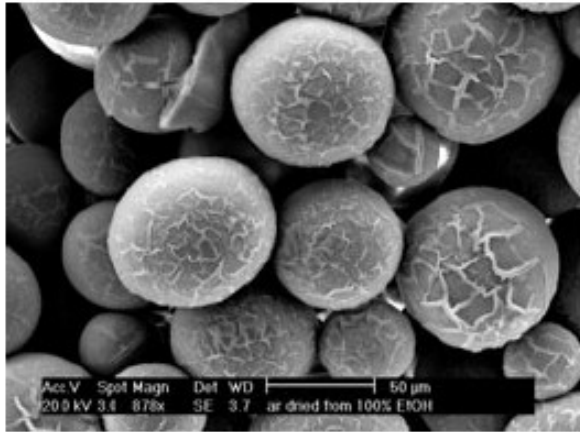
Sephadex is a registered trademark of Amersham Biosciences, Inc.

WGK Germany 3

### Průchod mobilní fáze kolonou:

- malé molekuly difundují do pórů gelu, jsou zadržovány
- velké částice se tam nevejdou a prochází přímo. Výsledek: velké částice jsou rychleji eluovány!

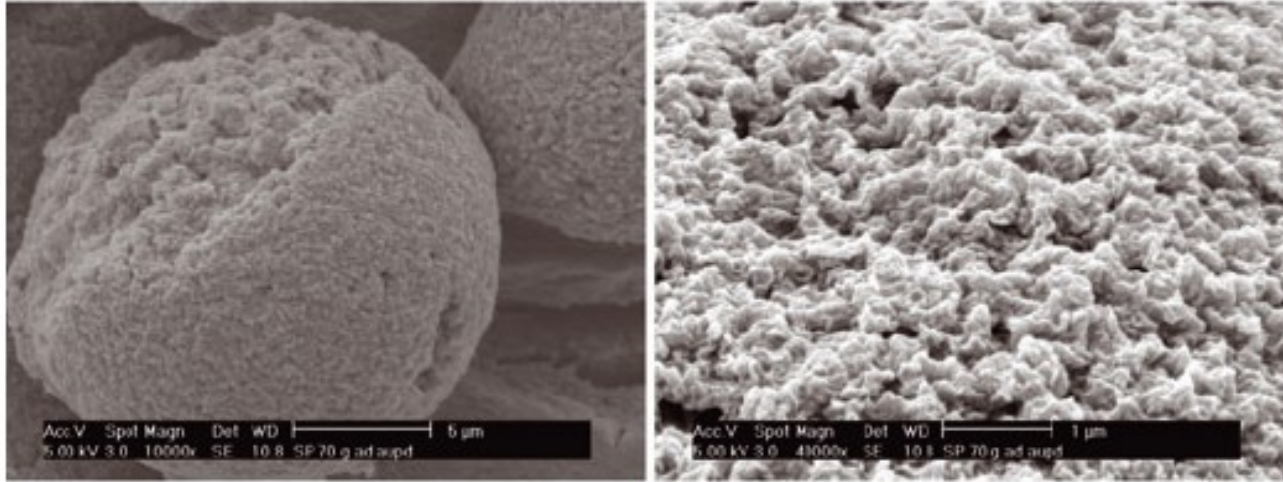
# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



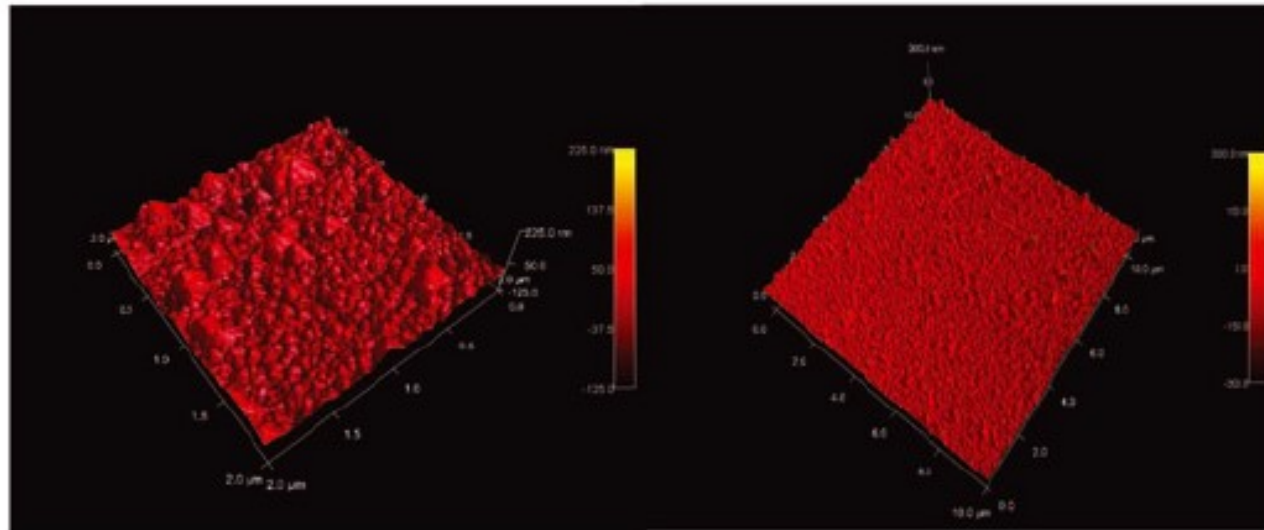
SEM images of air dried LH-20 resin beads coated with AuPd. (Magnifications: Top row: Left 878X, middle 7000×, right 28100×. Bottom row: Left 37500×, middle 75000×, right 120000×)

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

A



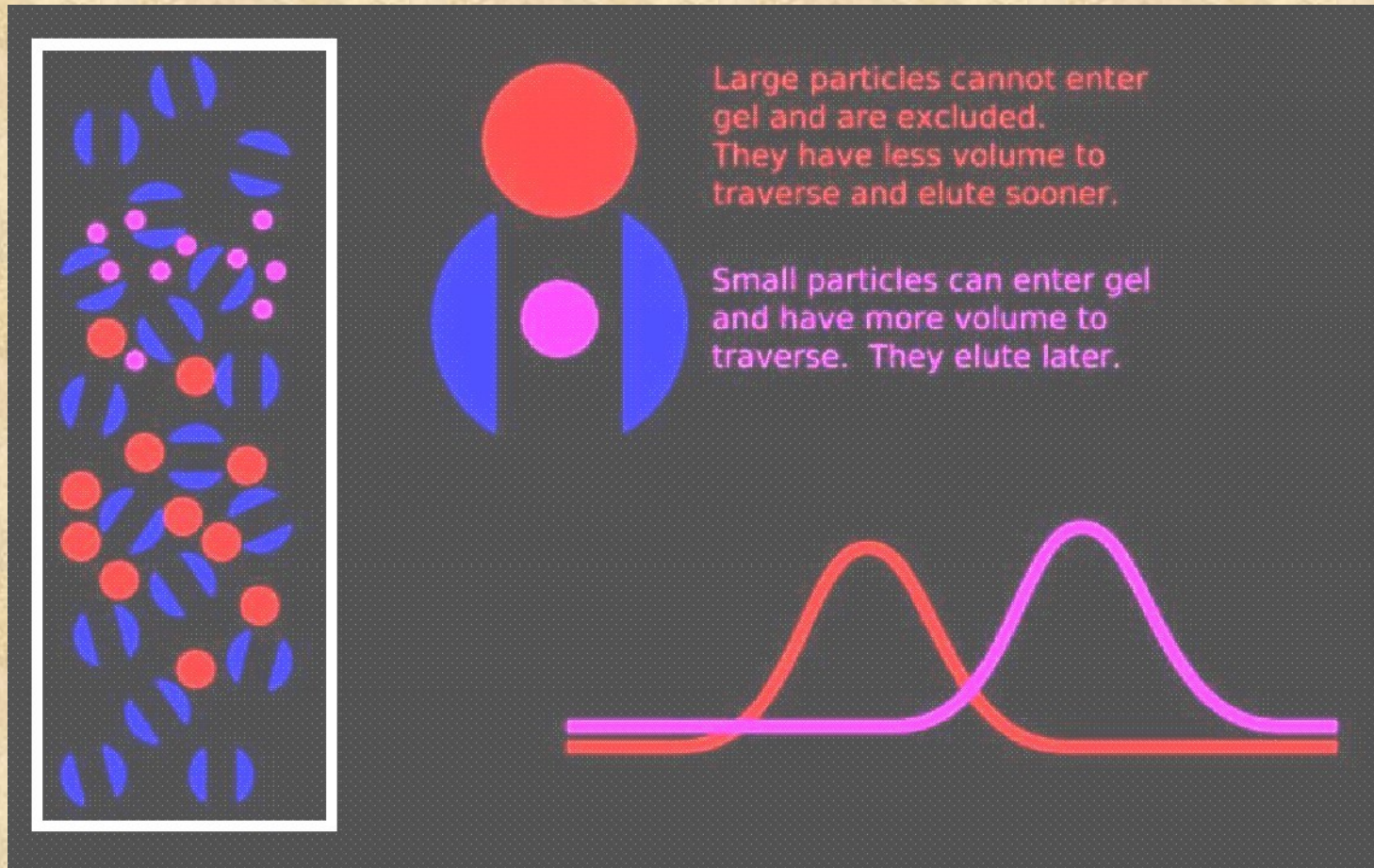
B



(a) SEM images of the SP-30 resin coated with AuPd at different magnifications (10000× on the left and 40000× on the right). (b) AFM images of SP-30 resin with different scan sizes (2 μm on the left and 10 μm on the right).



# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



Princip gelové permeční chromatografie

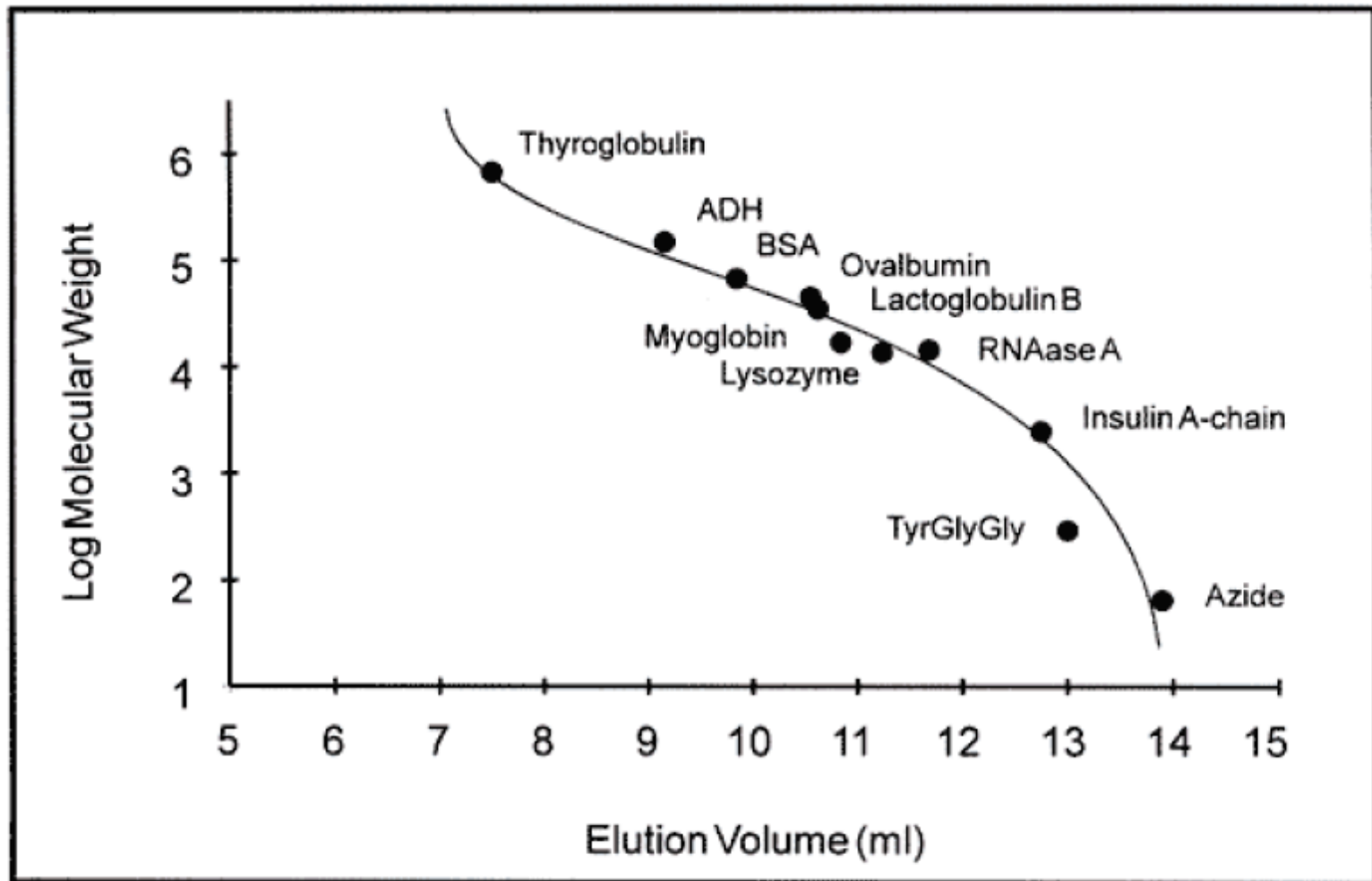
## KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



Zařízení pro **gelovou permeační chromatografii**.

Analyzovaný roztok je tlačěn přes kolonu naplněnou gelem

# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



Eluční křivka: látky z nejvyšší MW jsou vylučovány nejdříve  
– v nejmenším elučním objemu

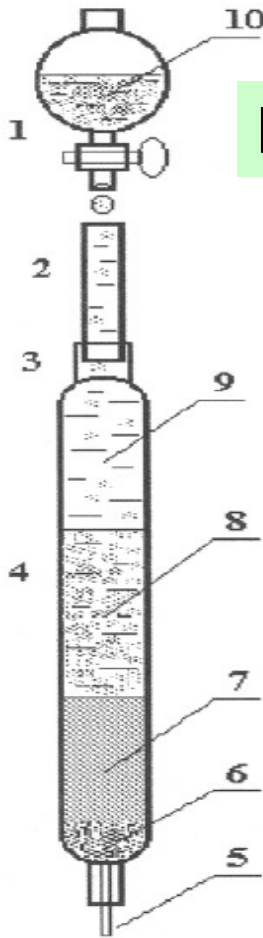
## Gelová filtrace

Koloidní fáze lze z roztoku separovat **gelovou filtrací** (dále jen **GF**), - speciální varianta **gelové filtrační/permeační chromatografie** (dále jen **GFC**), (podrobně viz. např. Determann 1967, Kirkland 1979, Yau et al. 1979, Ragel a Janson 1992, Faimon a Ondracek 1993).

Na rozdíl od běžné **GFC**, při které dochází k rozdělení makromolekul s rozdílnou molekulovou hmotností (MW) do řady objemových frakcí (např. Crerar a Axtmann 1981), se v **GF** rozděluje vzorek pouze na dvě frakce:

- (1) *makromolekulární (koloidní, obsahující vyšší polymery, resp. koloidy*
- (2) *nízkomolekulární (monomerní, obsahující jednoduché molekuly, ionty, popř. polymery s nízkou MW.*

## Kolona pro gelovou filtraci



**Obr.3.6. Plnění GFC kolony**

1. zásobník
2. plnicí trubice
3. zábrus
4. kolona
5. výtoková kapilára
6. polyetylenová vata
7. kompaktní gelová vrstva
8. koncentrovaná suspenze
9. rozpouštědlo
10. koncentrovaná suspenze

### Kalibrace kolony:

#### (1) Vysokomolekulární látka

Blue dextran: Vysokomolekulární dextran obsahující modré barvivo chlorotriazin (Cibacron Blue)

Blue Dextran: Void volume marker for gel filtration columns

Descriptions:

**Average mol. wt. of 2,000,000 D**

Extent of labeling:

~ 0.1 mmol Reactive Blue 2 per g dextran

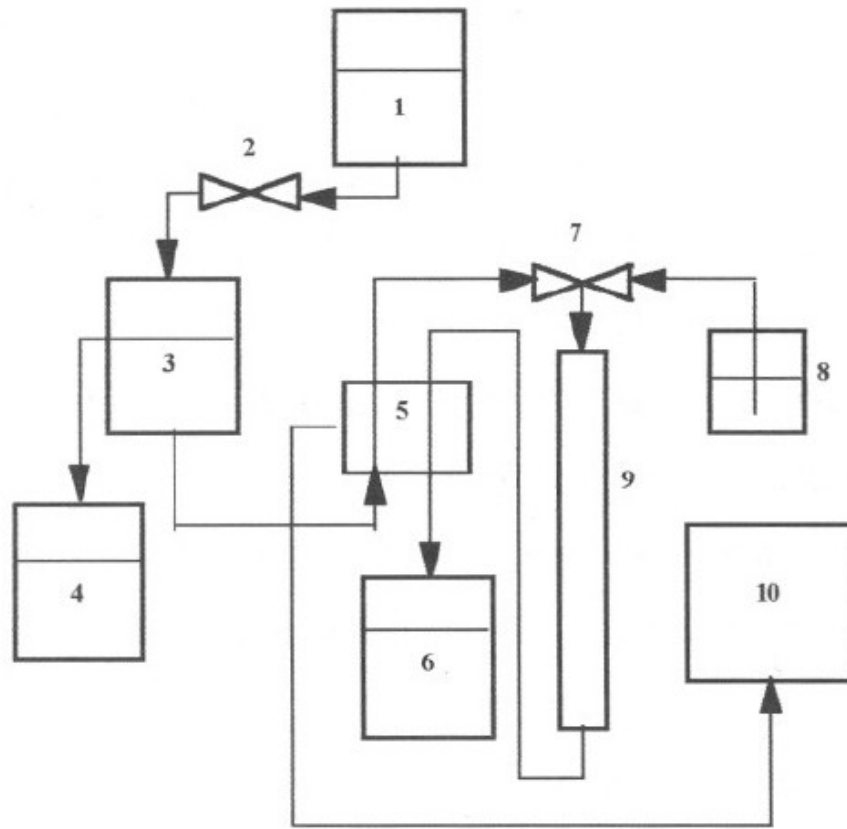
WGK Germany

#### (2) Nízkomolekulární látka

- rhodanid železa
- metyloranž

## KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

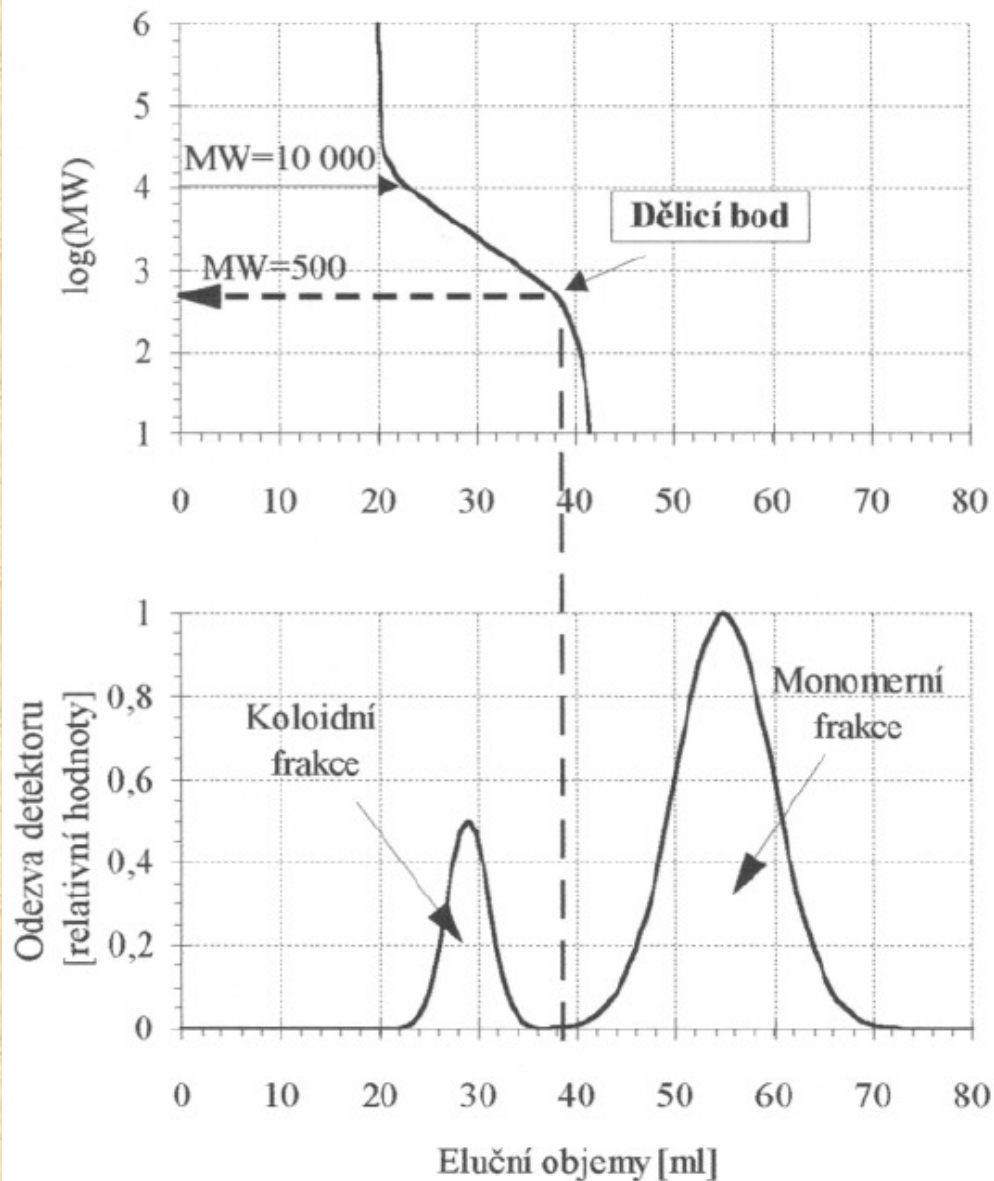
Zařízení pro gelovou  
chromatografii



**Obr.3.5. Schema zařízení pro gelovou filtraci**

- 1,4 - pomocné rezervoáry eluentu*
- 2 - regulátor eluentu*
- 3 - hlavní rezervoár eluentu*
- 5 - detektor*
- 6 - sběrač frakcí*
- 7 - třícestný ventil*
- 8 - zásobník vzorku*
- 9 - skleněná kolona s gelovou náplní*
- 10 - zapisovač*

## KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



Dělení koloidních částic  
gelovu filtrací

**Obr.3.7. Dělicí charakteristika GF a eluční objemy pro kolonu  $V=50\text{ml}$  a gel  $G-50-150$ .**

Objem koloidní frakce  $V_0 = 22$  až  $38$  ml

Objem monomerní frakce  $V_1 = 38$  až  $70$  ml

## **(Asymmetric) Field-Flow Fractionation, FFF** **(Dělení v systému pole-tok)**

**Princip: rychlost laminárního proudění u stěny kanálu se blíží nule!**

Pohyb rozpuštěných molekul/koloidních částic je v tomto regionu zpomalován ve srovnání se středem kanálu

**Molekuly/částice jsou tlačeny ke stěně kanálu externím polem aplikovaným kolmo k ose toku v kanálu. Různé částice/molekuly jsou zadržovány různou silou, podle intenzity interakce s polem.**

### **Aplikovaná pole**

- Teplotní gradient (thermal FFF)
- Elektrické pole
- Sedimentační/gravitační pole (SFFF)
- Flow/průtokový gradient (FFFF)

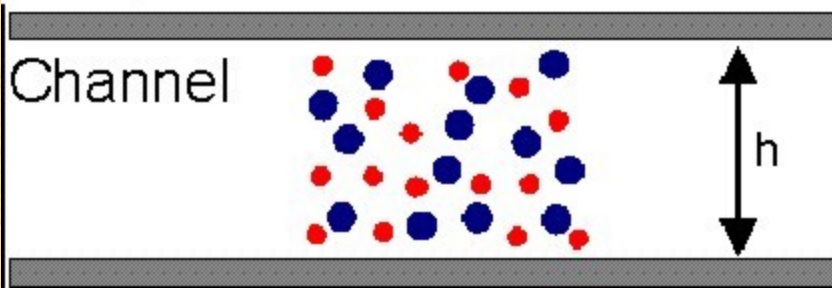
### **Výhody oproti ostatním konvenčním metodám separace částic:**

- Vysoké rozlišení srovnatelné s ultracentrifugací
- Flexibilní separace nehomogenních/polydisperzních vzorků
- Velký rozsah od několika nanometrů k několika mikrometrům



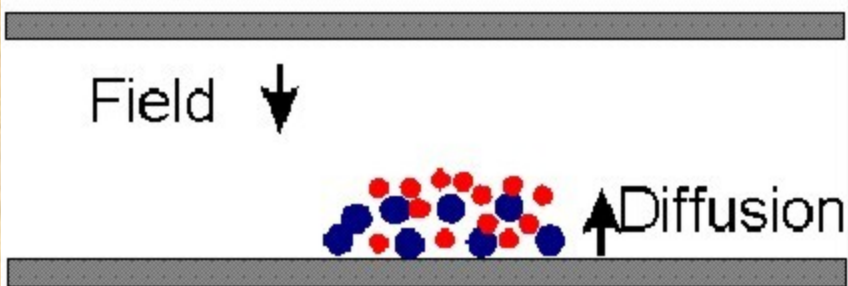
# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## A. Injection



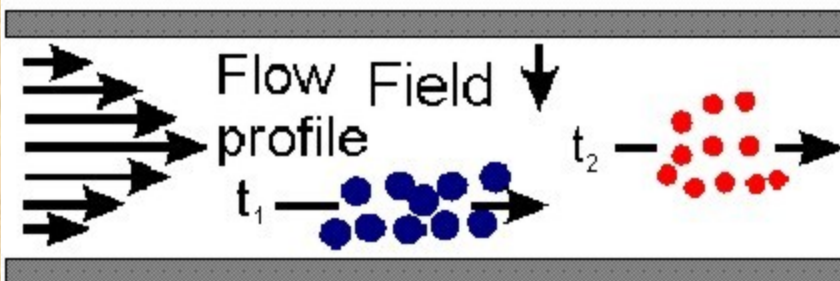
Směs velkých a malých částic na počátku dělení

## B. Relaxation



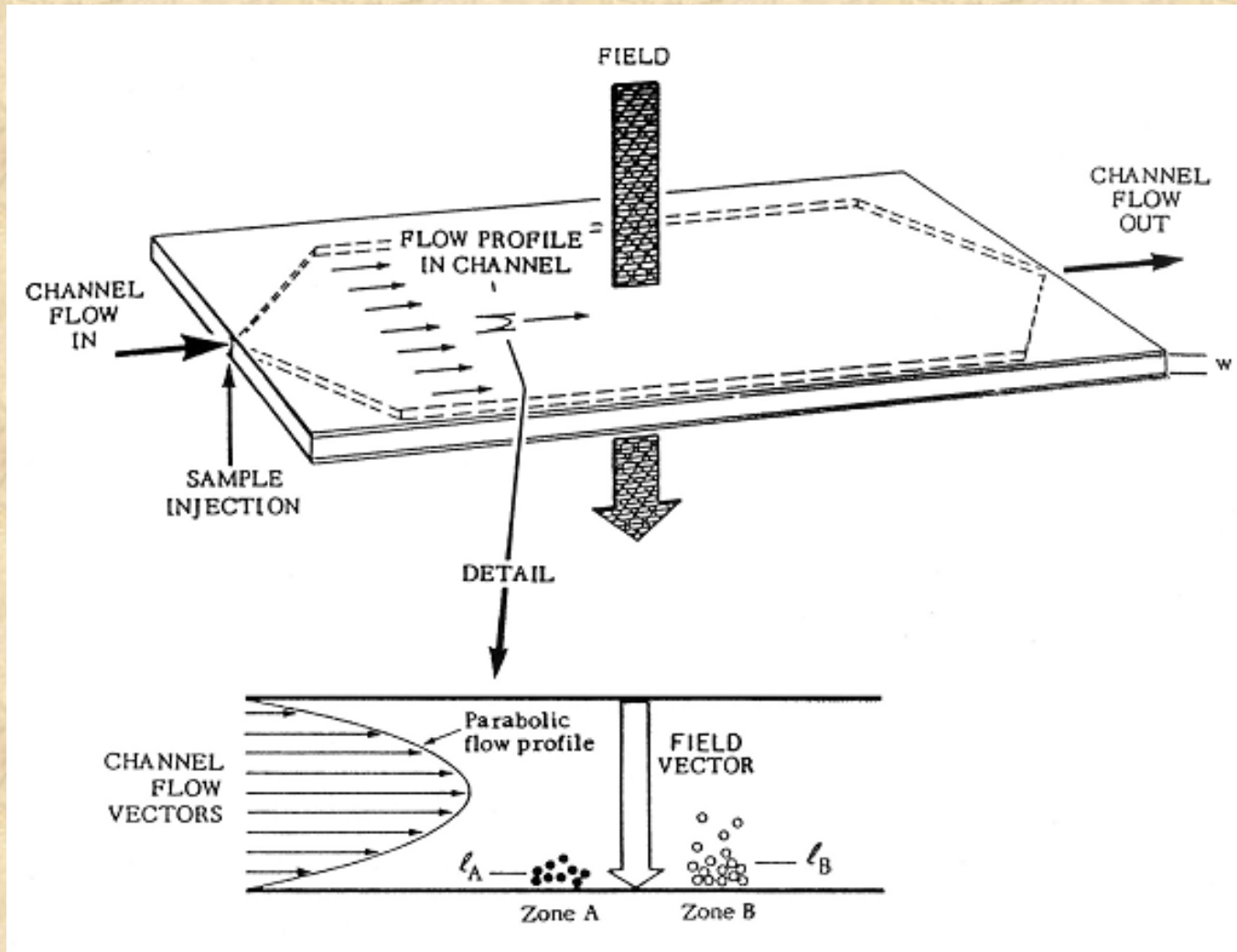
Aplikace „příčného“ pole tlačí částice ke stěně kanálu

## C. Separation



Velké částice jsou přitlačeny větší silou – jsou blíže stěny, menší rychlost transportu, zpomalení průchodu kanálem

## Koloidy v životním prostředí

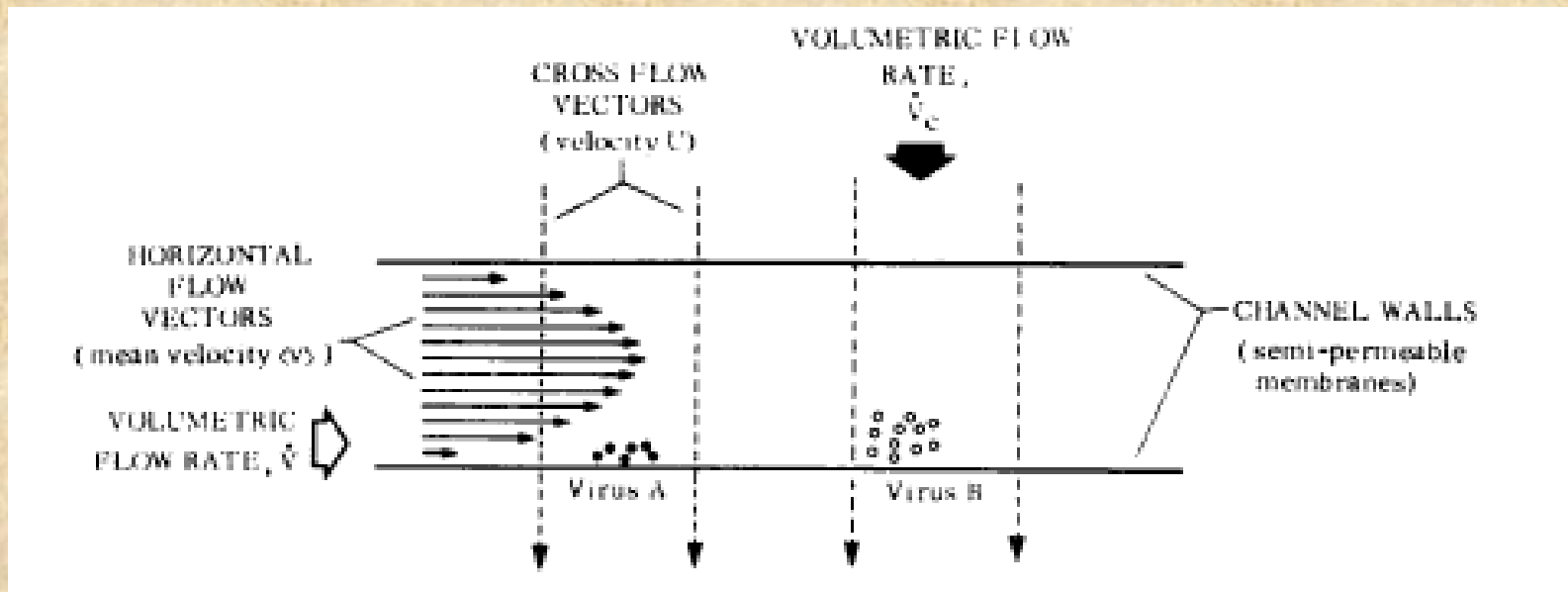


**Field-flow fractionation channel** showing laminar flow profile and field perpendicular to flow (Chittleborough et al. 2004)

## Flow Field-Flow Fractionation (FFFF / 4 F) (dělení v systému „tokové pole“ - tok)

Metoda byla vyvinuta pro separaci makromolukul a koloidních částic.

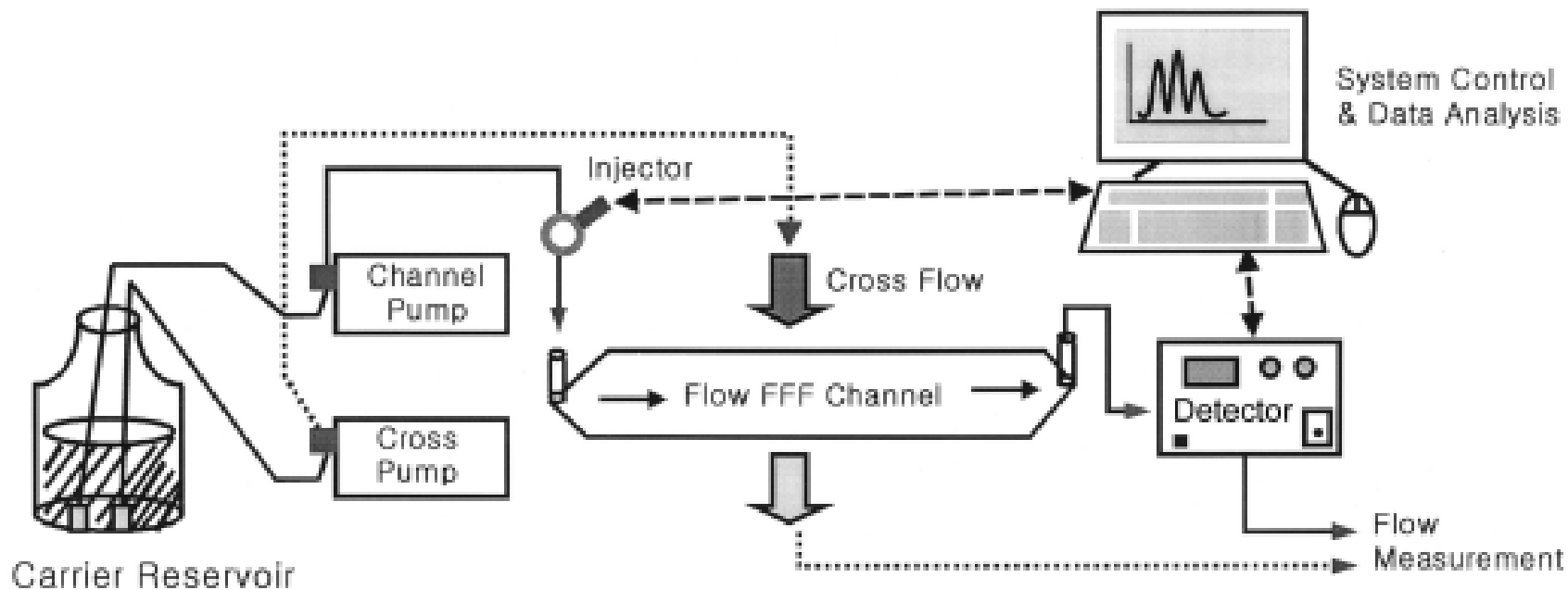
Roli příčného pole přebírá příčné proudění média/rozpouštědla. Příčné proudění prochází semipropustnou membránou (nepropustná pro dělené molekuly/částice)



# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

## List of Membranes (ConSensus):

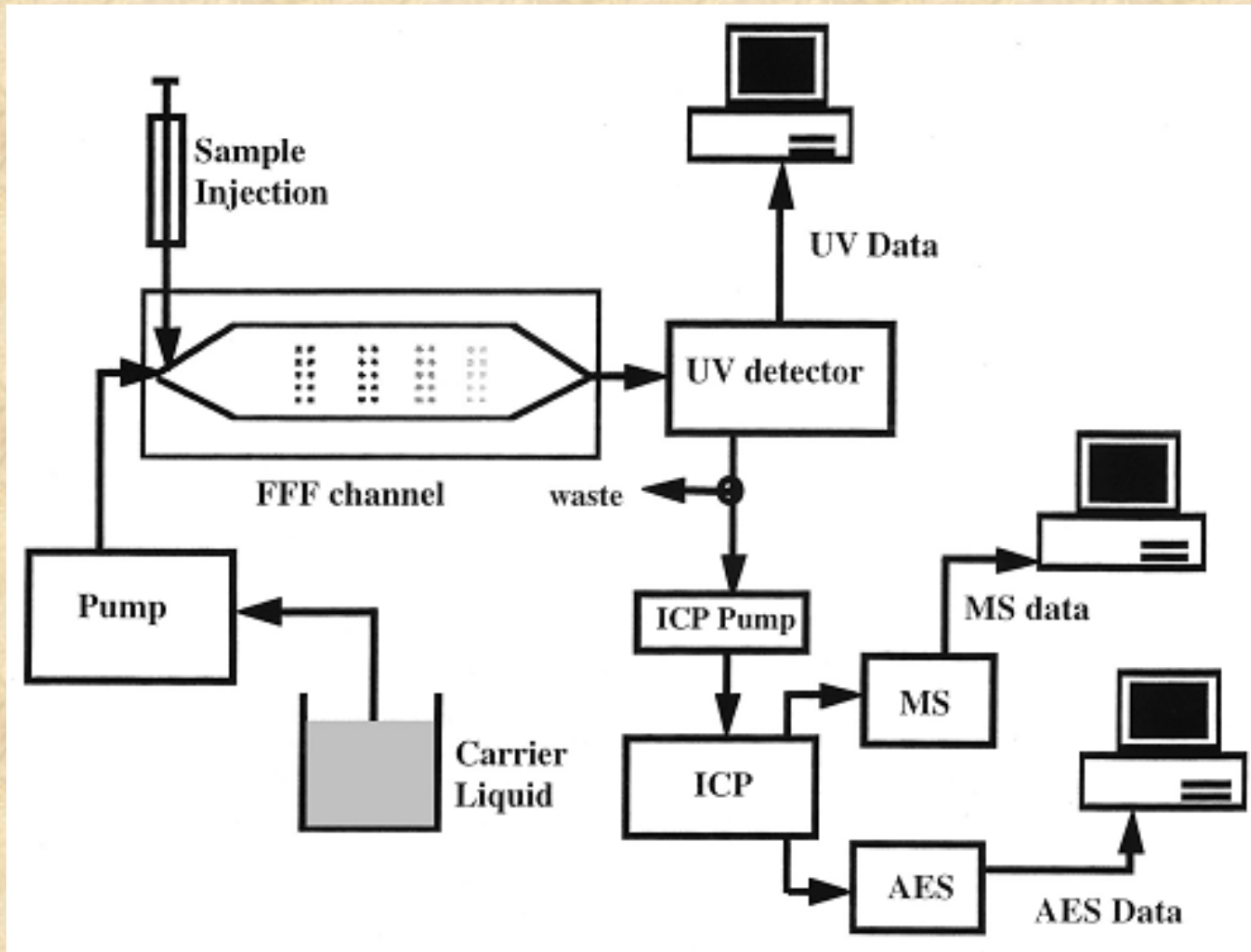
Order-No:.	Type	Cut off	Quantity
CM 01 Y	Reg. Cellulose	1.000	1
CM 01 Y A4	Reg. Cellulose	1.000	DIN A4
CM 02Y	Reg. Cellulose	3.000	1
CM 02 Y A4	Reg. Cellulose	3.000	DIN A4
CM 03Y	Reg. Cellulose	10.000	1
CM 03Y A4	Reg. Cellulose	10.000	DIN A4
CM 04C	Reg. Cellulose	5.000	1
CM 04C A4	Reg. Cellulose	5.000	DIN A4
CM 05C	Reg. Cellulose	10.000	1
CM 05C A4	Reg. Cellulose	10.000	DIN A4
CM 06C	PES	5.000	1
CM 06C A4	PES	5.000	DIN A4
CM 07C	PES	10.000	1
CM 07C A4	PES	10.000	DIN A4
CM 08S	Polysulfon	5.000	1
CM 08 S A4	Polysulfon	5.000	DIN A4
CM 09S	Polysulfon	10.000	1
CM 09S A4	Polysulfon	10.000	DIN A4



**Schematic diagram of AFFFF system.**

*Song et al., 1999. (Bull. Korean Chem. Soc., 20(10), 1159-1164)*

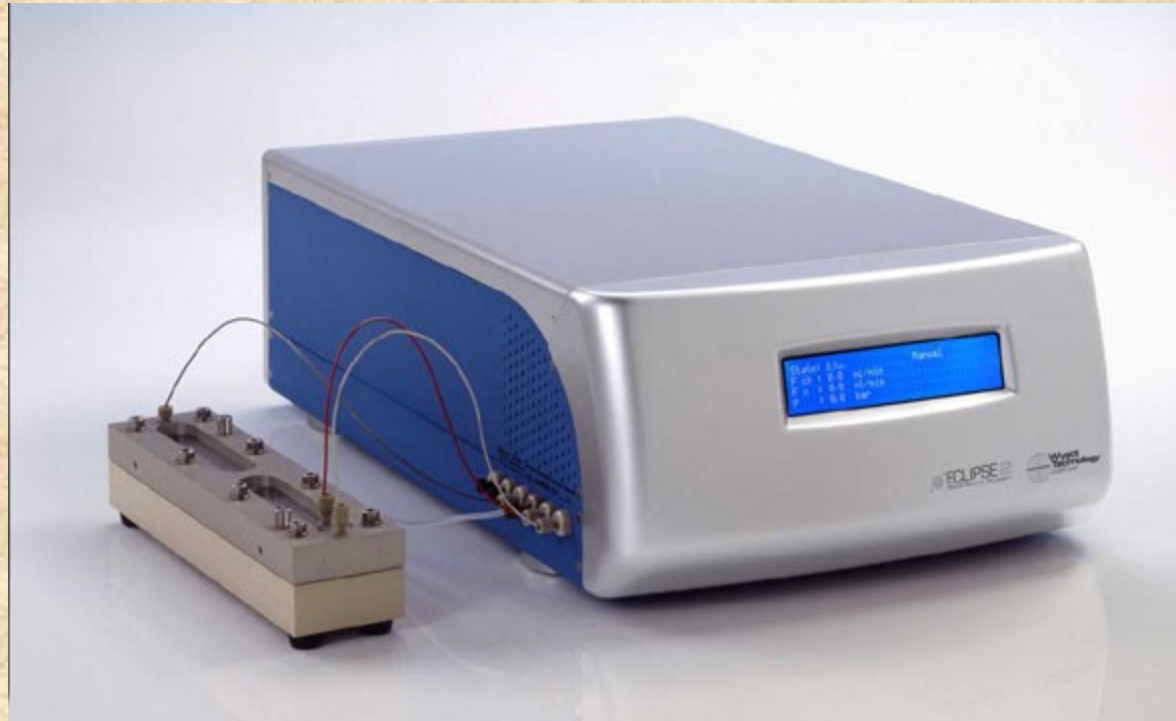
## Koloidy v životním prostředí



General setup of the Flow FFF channel for elemental analysis by ICP-AES and ICP-MS (Chittleborough et al. 2004)

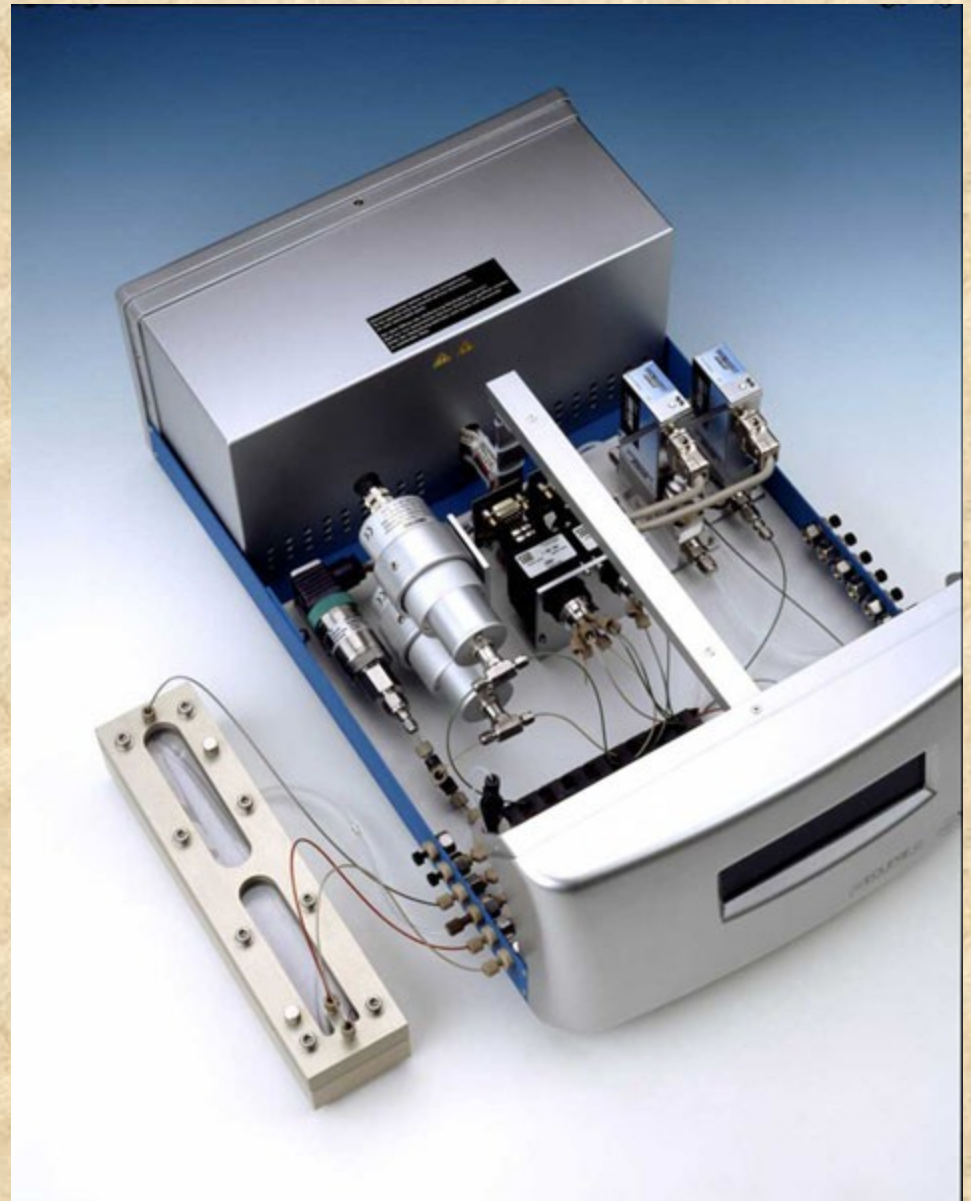
## Koloidy v životním prostředí

The Eclipse is a state-of-the-art separation system using the Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (**AFFFF**) technique.



## Koloidy v životním prostředí

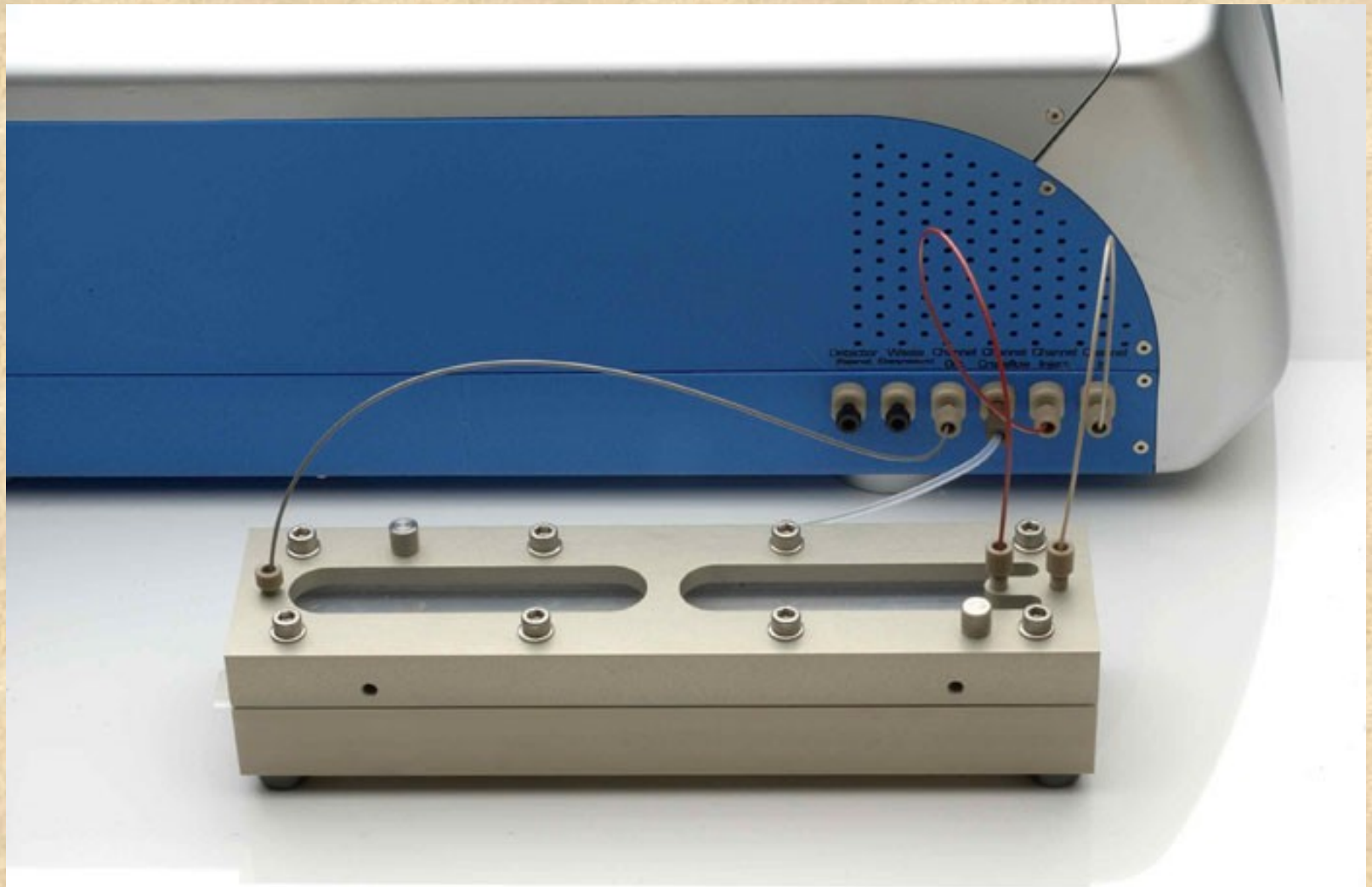
The Eclipse is a state-of-the-art separation system using the Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (**AFFFF**) technique.





## Koloidy v životním prostředí

The Eclipse is a state-of-the-art separation system using the Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (**AFFFF**) technique.



## Koloidy v životním prostředí

### Fractograms of three protein standards with

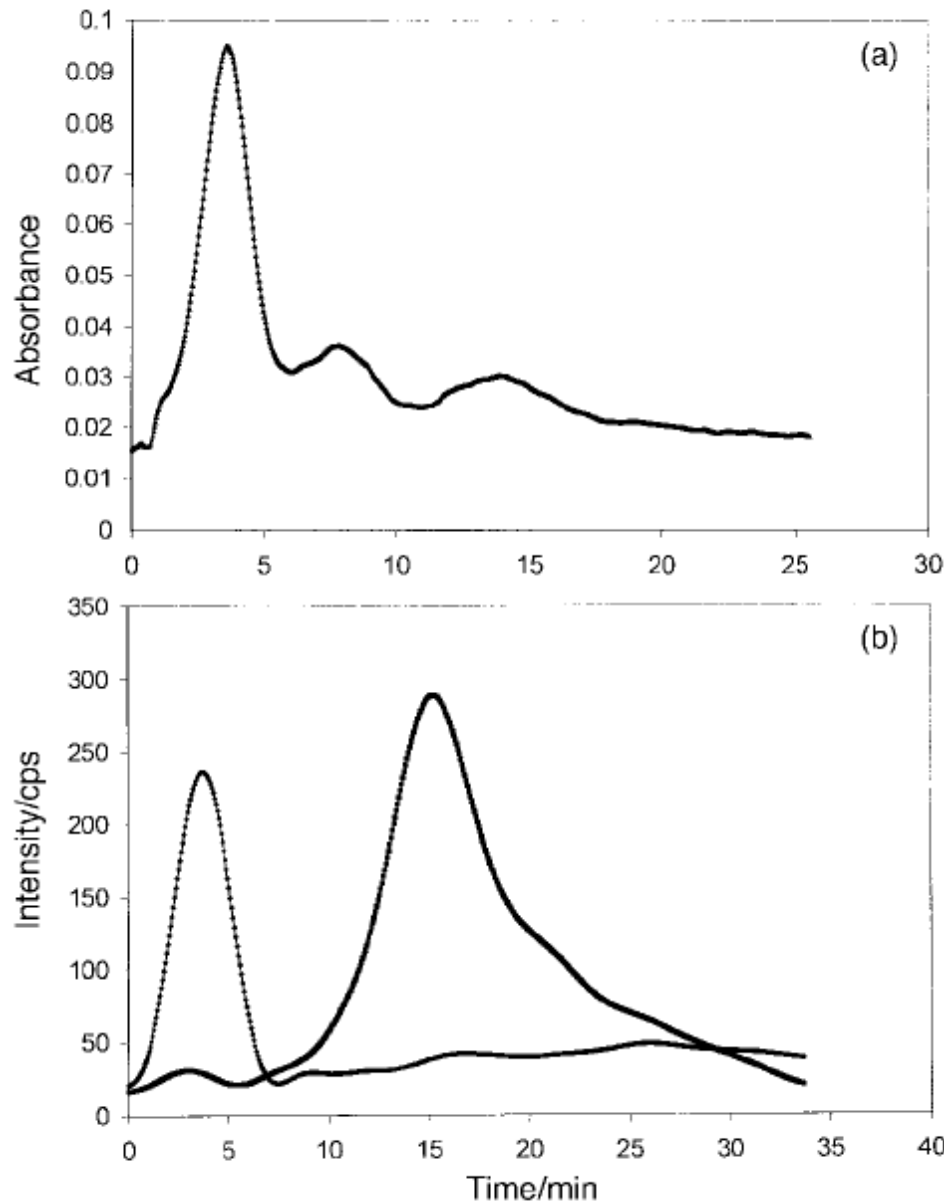
(a) UV detection

(b) ICP-MS detection

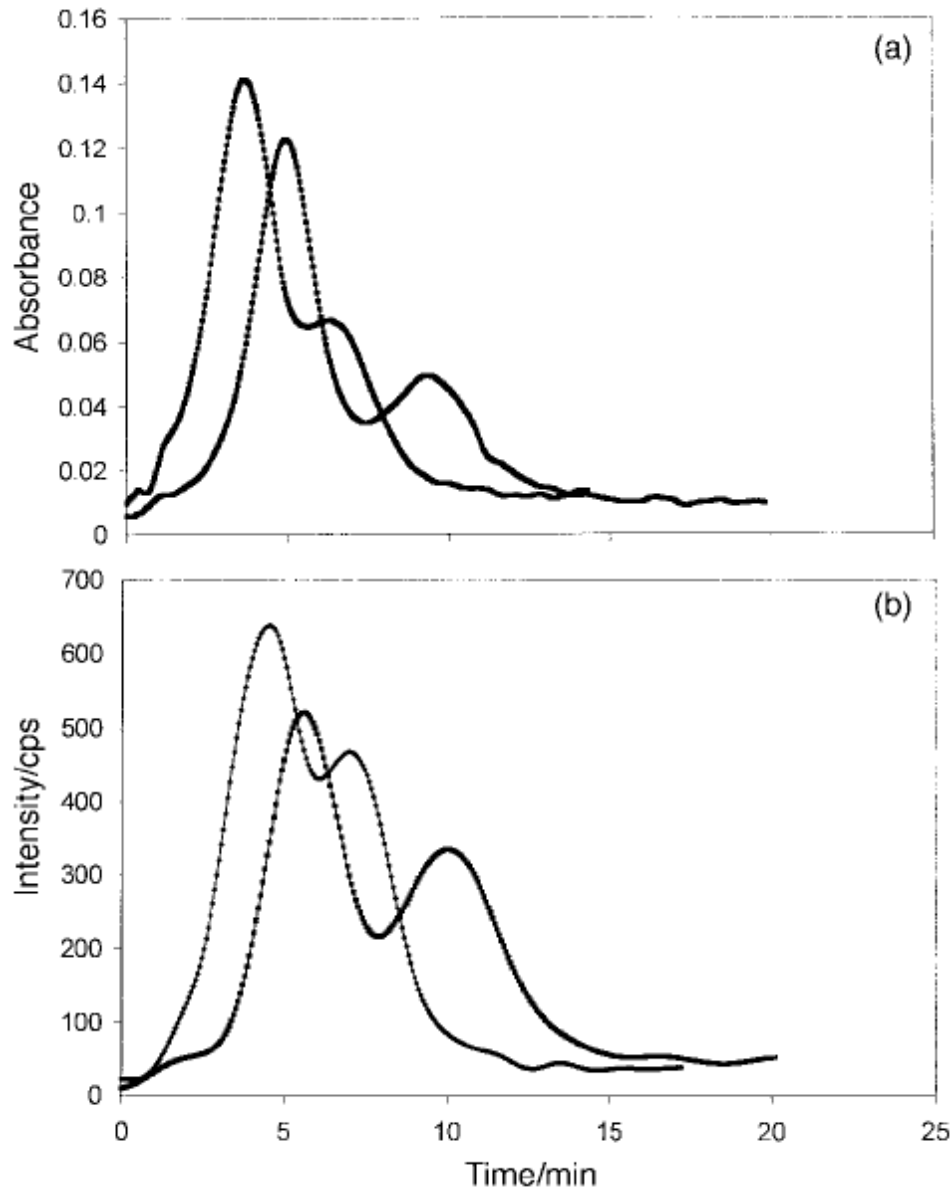
Channel flow and cross flow rates were 1.0 and 2.0 ml min<sup>-1</sup>, respectively.

The ICP-MS fractogram shows <sup>64</sup>Zn and <sup>127</sup>I signals obtained.

Siripinyanond and Barnes, 1999. (*J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1999, 14, 1527–1531)



# KOLOIDY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ



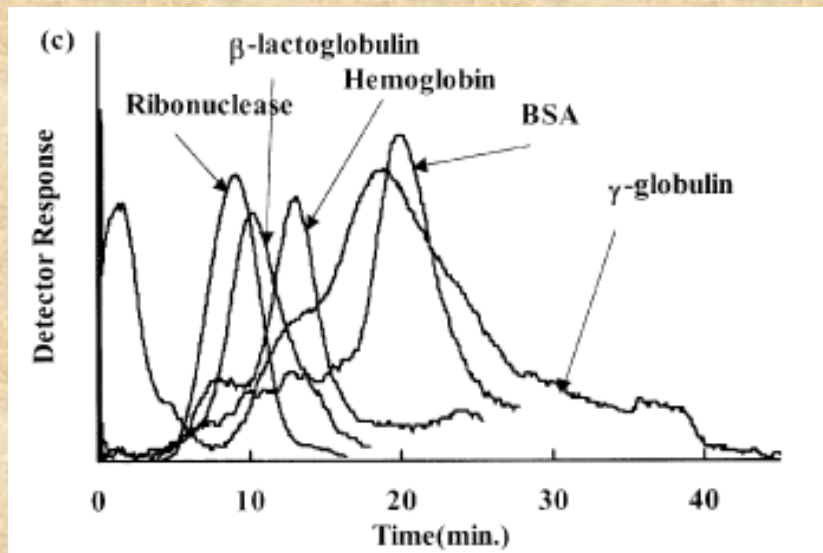
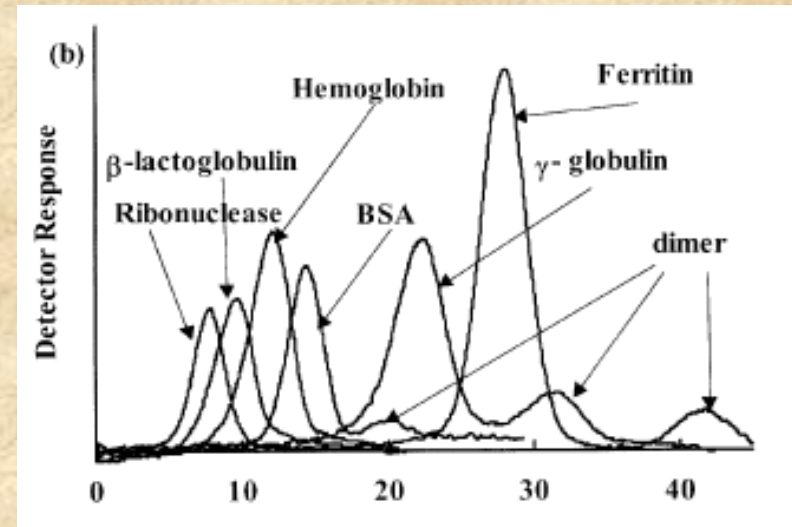
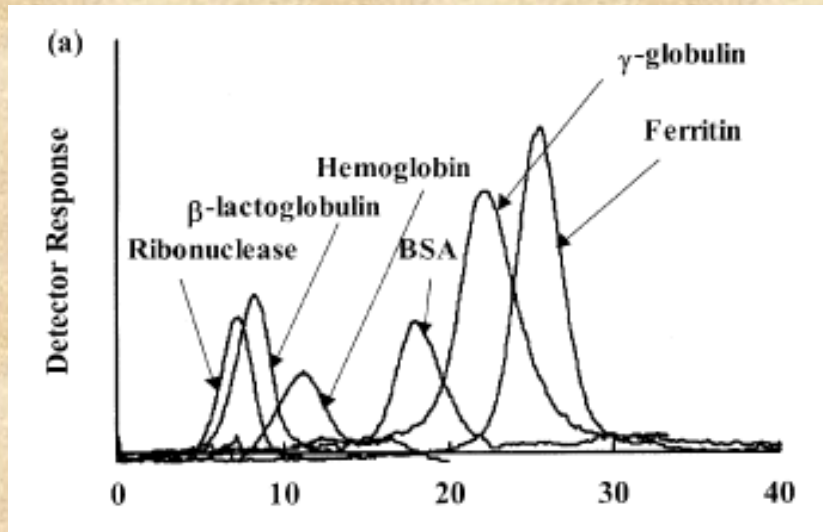
## Fractograms of a mixture of carbonic anhydrase and alcohol dehydrogenase

- cross flow rates of 2.0 (first curve) and 3.0 (second curve)  $\text{ml min}^{-1}$

(a) UV detection

(b) ICP-MS detection

Siripinyanond and Barnes, 1999.  
(*J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1999, 14, 1527–1531)



## AFFF fractograms of proteins

(a) at pH = 3

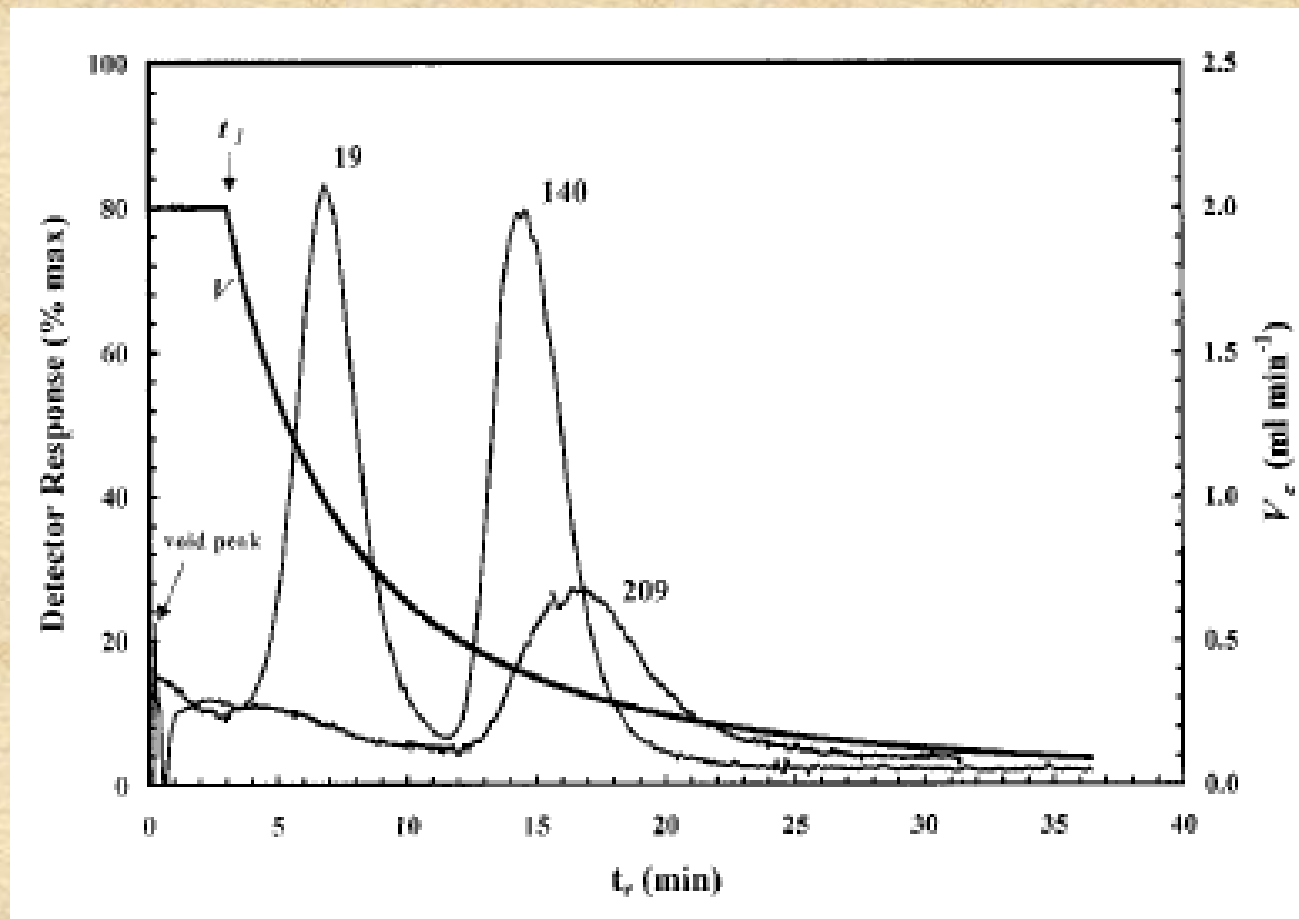
(b) at pH = 7

(c) at pH = 13

Flow conditions are  $V_{dot} = 1.01$  mL/min and  $V_c = 3.41$  mL/min ( $\pm 0.05$  mL).

Carrier is tris buffer solution of  $I = 0.053$  M.

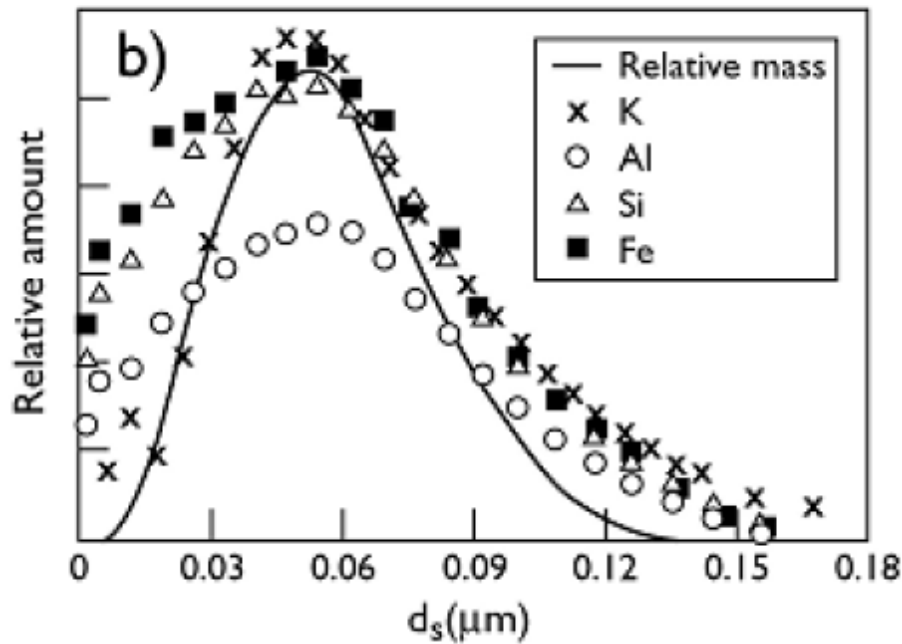
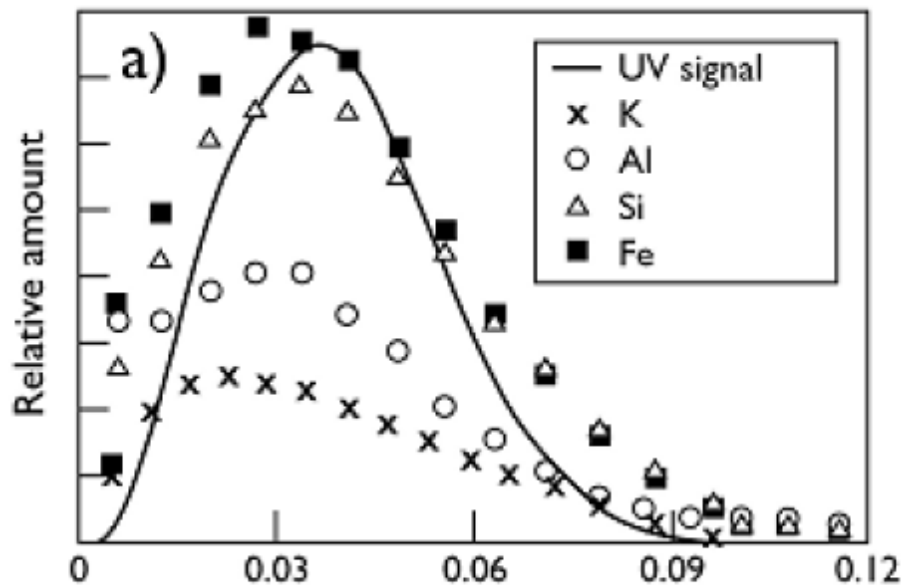
Song et al., 1999 (*Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 10, 1159-1164).



**A sample fractogram showing the size distributions for suspensions of three different size beads**

Eluted with a power-programmed cross-flow field.

Vaillancourt and Balch, 2000. (*Limnol. Oceanogr.*, 45(2), 485–492.



**Element based size distribution of the 0.06-0.08  $\mu\text{m}$  and <0.06  $\mu\text{m}$  fractions of the Willalooka illite.**

Separation in a FFFF channel and on-line analysis by ICP-MS and ICP-AES (Chittleborough et al. 2004)