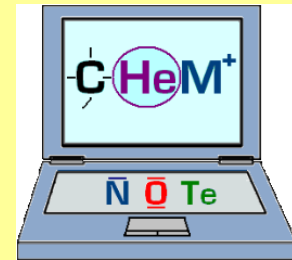


Metody separační

- **Techniky LC, SFC a elektromigrační metody**



Evropský sociální fond

Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

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“)** - RP

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 - $(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ NA POVRCHU ČÁSTIC
 - REAKCE S MODIFIKÁTOREM - TVORBA AMIDŮ

Kapalinová chromatografie

- **STACIONÁRNÍ FÁZE pro LLC**
 - chemicky vázaná stacionární fáze - nosič - **SILIKAGEL**
 - odstranění zbylých **-Si-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 matici 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
 - gradientová x isokratická eluce
 - **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

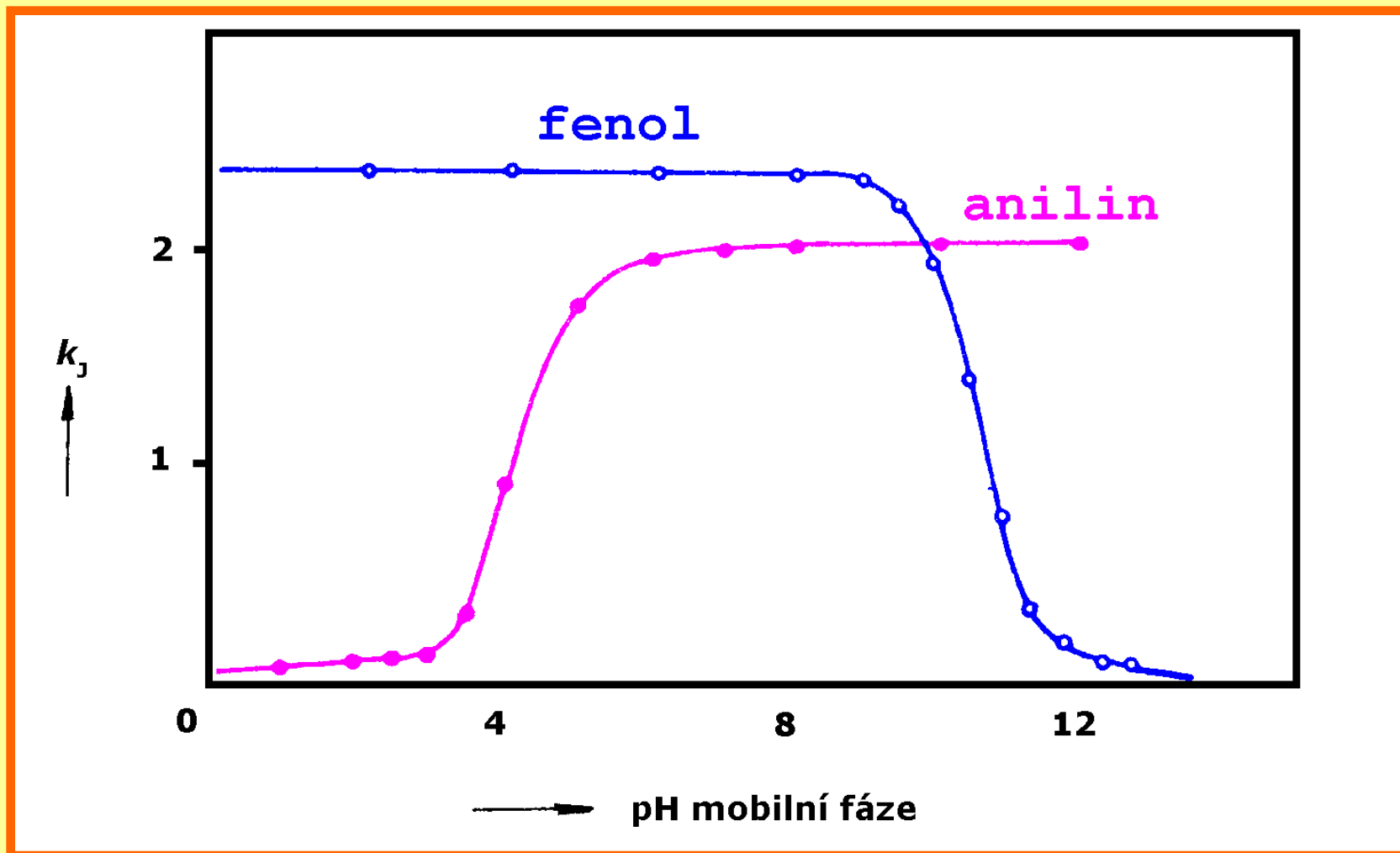
– vliv pH* na změnu kapacitních poměrů

- 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

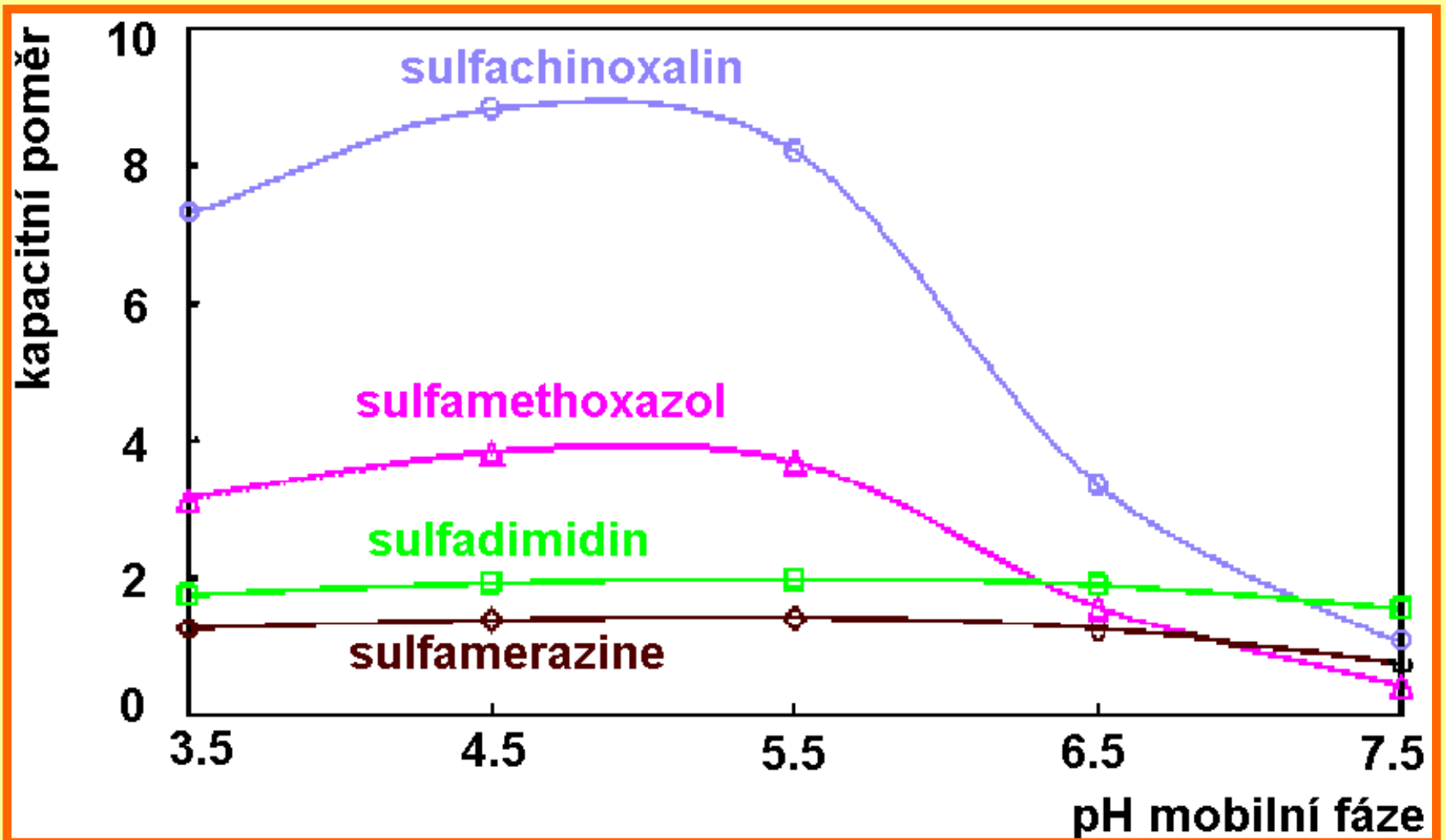
– vliv pH* na změnu kapacitních poměrů



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**

- **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

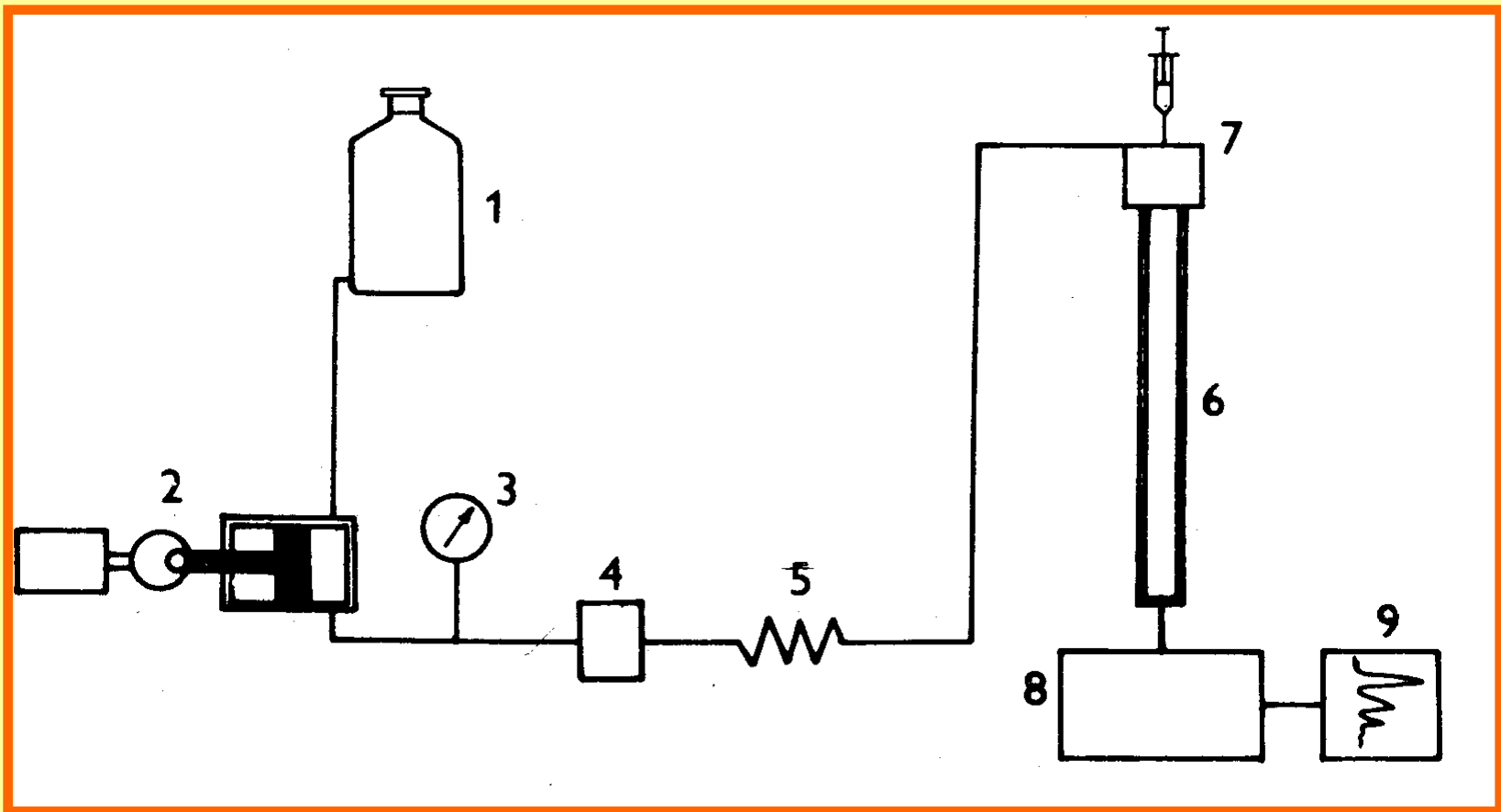
Kapalinová chromatografie

- **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**

- **Čerpadla pro HPLC -konstantní průtok mobilní fáze**
 - regulovatelná hodnota toku
 - vyloučení kontaminace mobilní fáze
 - vyloučení koroze prvků čerpadel, která jsou ve styku s mobilní fází - rubín, safír, titan, teflon
 - vyloučení pulsace mobilní fáze
 - to vše při vysokých pracovních tlacích - nad 10 MPa
 - zdvojená pístová čerpadla s programovaným pohybem pístu
 - kombinace se zařízeními na TVORBU GRADIENTU
 - elektronické řízení více čerpadel
 - elektronicky řízený trojcestný ventil umístěný před sáním čerpadel

• Kapalinová chromatografie - LC

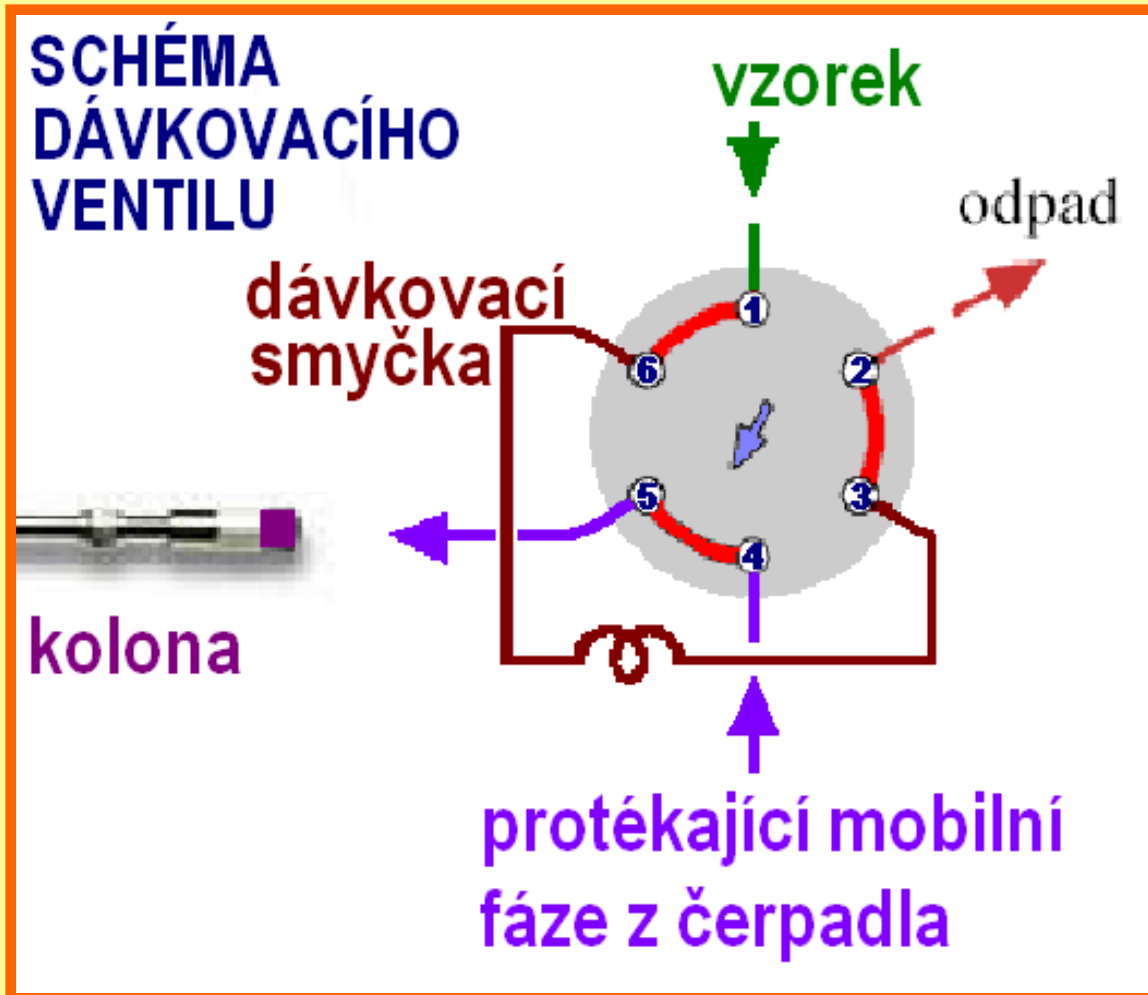
• Dávkování vzorku pro HPLC

– šesticestný kohout s dávkovací smyčkou

• naplnění smyčky vzorkem - mikrostríkačky, VENTILY

• promytí smyčky eluentem

– tlaky až 40 MPa



• 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 μl ,
- 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

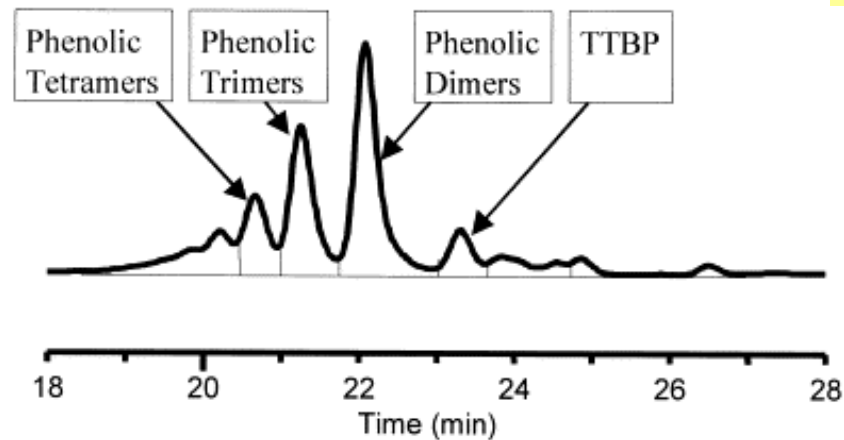
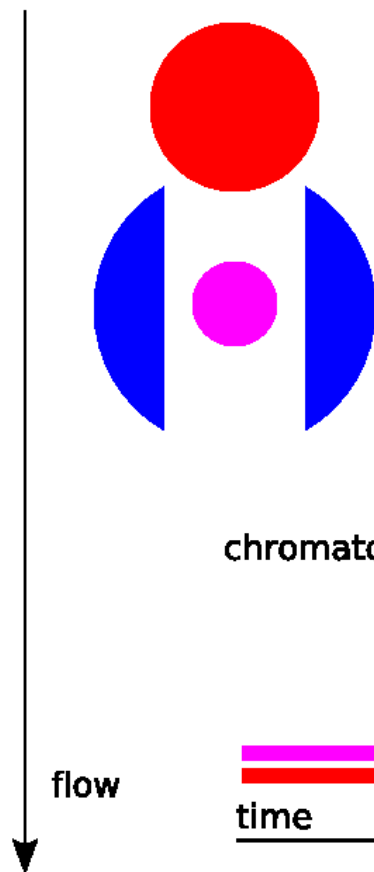
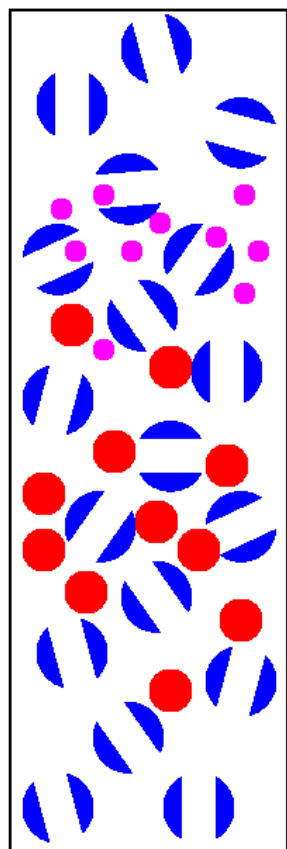
• Typy detektorů pro LC -

– voltametrický/amperometrický -

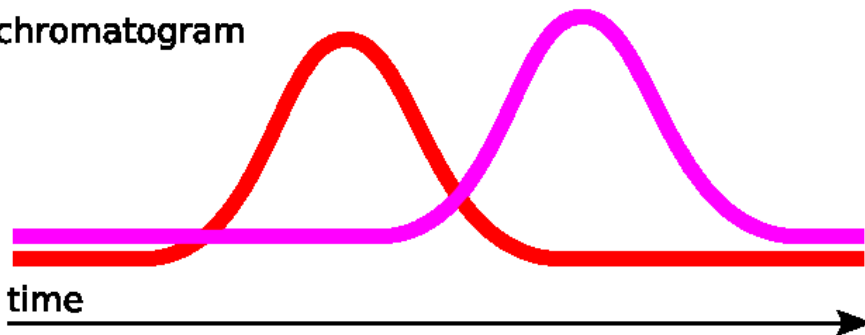
- vhodný pro organické depolarizátory (látky oxidovatelné či látky redukovatelné)
- obvykle měření při konstantním potenciálu
- průtočné uspořádání
- jedna polarizovatelná elektroda
 - dvou- či tří- elektrodové zapojení
- využití oxidační reakce - fenoly, aromatické aminy, thioly, peroxidy
- využití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

- **GELOVÁ PERMEAČNÍ chromatografie – GPC (SEC)**
- **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 (SEC)
- DĚLENÍ DLE ROZDÍLŮ VE VELIKOSTI MOLEKUL



chromatogram



- **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

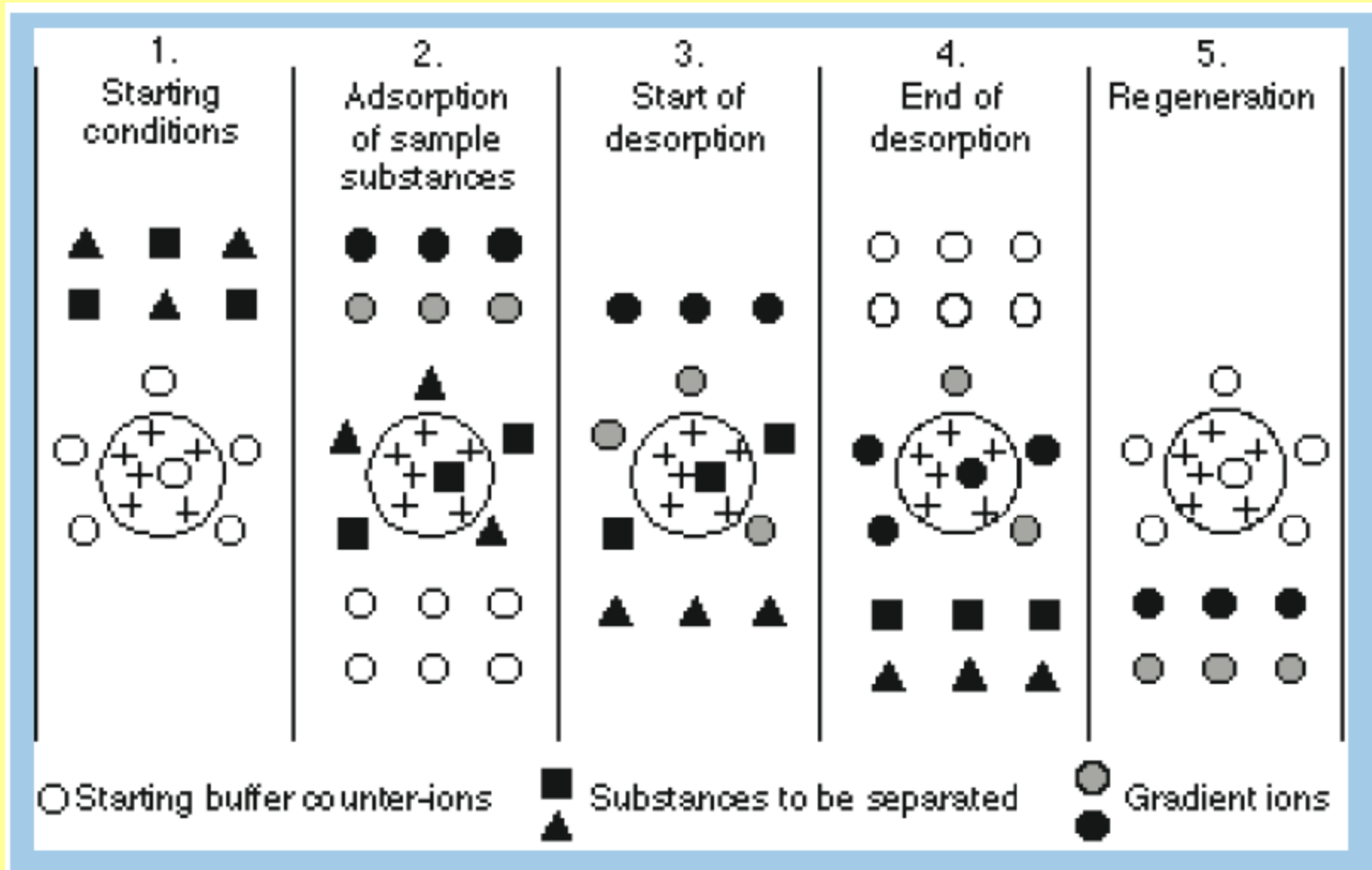
– PŘI SEPARACI protiiontů ZAMĚNĚN ZA STEJNĚ NABITÝ ION SEPAROVANÉ SLOŽKY, zpětná záměna přebytkem iontů z mobilní fáze

» DOBA SETRVÁNÍ IONTU SLOŽKY NA POVRCHU

• IONTOVÁ chromatografie - IEC

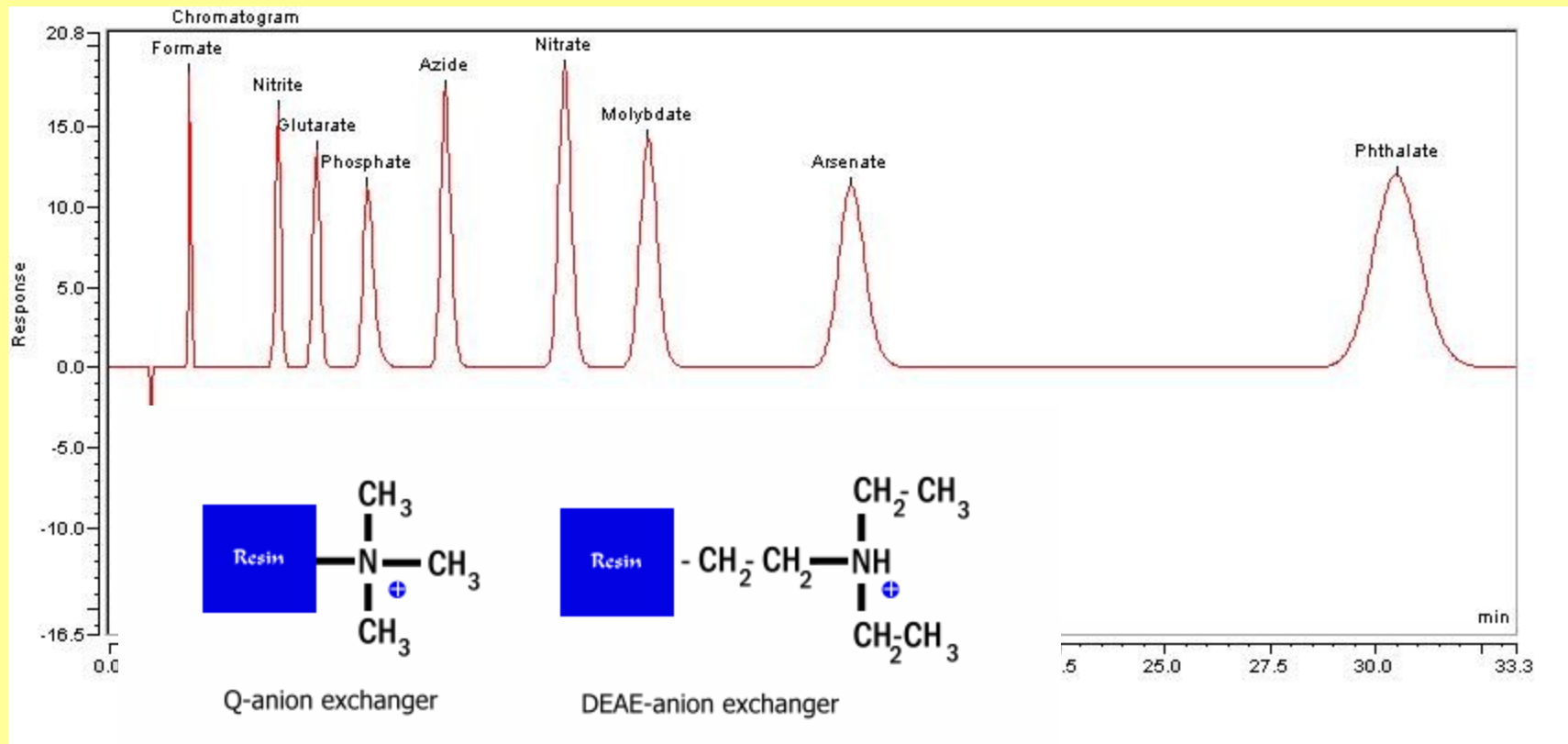
• IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE

– SEPARACE NABITÝCH ČÁSTIC - IONTŮ



• IONTOVÁ chromatografie - IEC

• IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE – SEPARACE NABITÝCH ČÁSTIC - IONTŮ



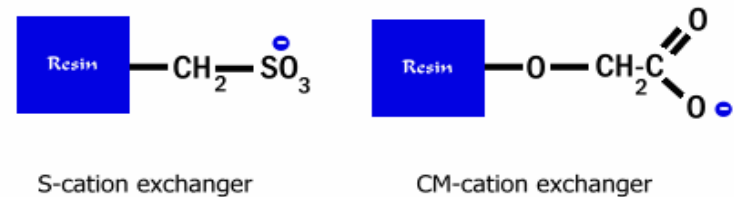
• IONTOVÁ chromatografie - IEC

- 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**



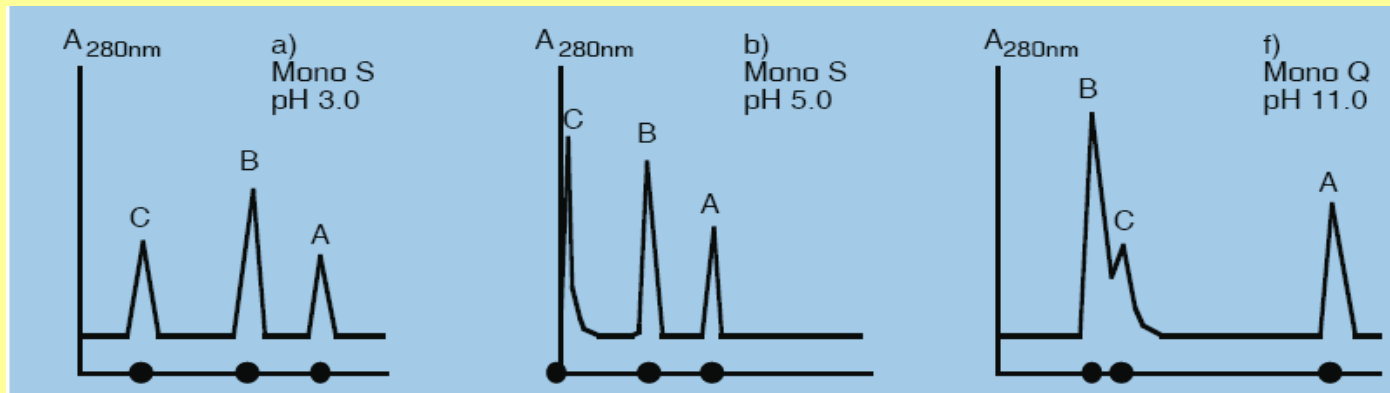
- **ANEXY** - VÝMĚNA ANIONTŮ - silně a slabě bazické

- » **KVARTÉRNÍ DUSÍKATÉ BÁZE**
- » **PRIMÁRNÍ ČI SEKUNDÁRNÍ AMINY**

• IONTOVÁ chromatografie - IEC

– 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, např. otázka volby pH
- **gradientová eluce (lineární, konvexní, konkávní, ...)**
 - **gradient pH**
 - **gradient iontové síly**



• IONTOVÁ chromatografie - IEC

– DETEKCE

- **VODIVOSTNÍ DETEKTOR** - nutno předem potlačit velkou vodivost H^+ nebo OH^- (potlačovací kolona před detektorem)
- **AMPEROMETRICKÝ DETEKTOR** – ionty jako depolarizátory
- především pro některé anionty - **FOTOMETRICKÝ DETEKTOR** – absorpce záření v UV či viditelné oblasti

- **AFINITNÍ chromatografie -**

- **SPECIFICKÁ REVERSIBILNÍ REAKCE**

- antigen-protilátka, enzym-kofaktor, lektin-cukr, párování bazí v nukleových kyselinách, ...

- (bio)specifický sorbent – ireverzibilní imobilizace vhodné látky – záchyt „komplexu“ jeho disociace

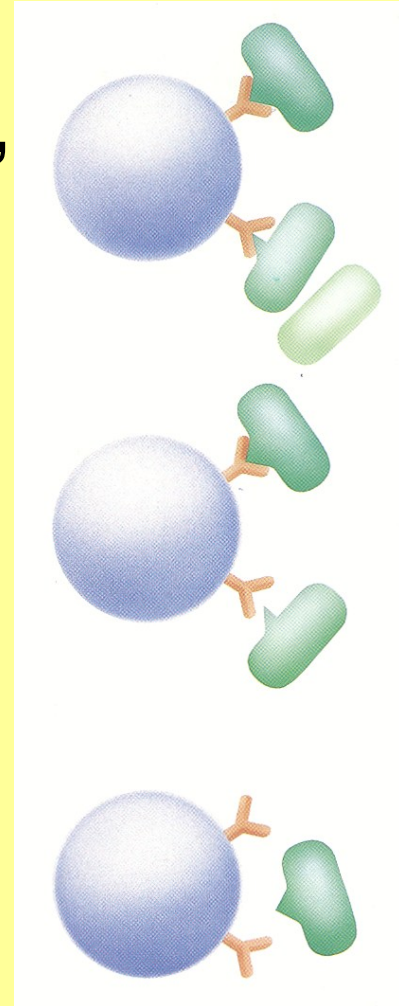
- preparace, purifikace, bioanalytika

- **DETEKCE**

- spektrofotometrická

- UV oblast

- jednokanálová, mnohokanálová (DAD)



- **superkritická FLUIDNÍ 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**

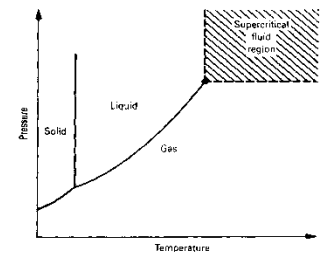
- pro SF CO₂ - podobná hexanu

- **nízká viskozita proti kapalinám**

- **vyšší difusní koeficienty než v kapalinách**

- **VHODNÉ PRO VYSOKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY**

Phase Diagram for a Pure Substance



- **FLUIDNÍ 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**

- **polymery, oligomery, termolabilní pesticidy**

- **látky nelze detegovat běžnými detektory kapalinové chromatografie - NEPOUŽITELNÁ LC**

- **CHROMATOGRAM PODOBNÝ JAKO PRO GC**

- **FLUIDNÍ chromatografie**
S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU

- **MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN - (CO₂)**

- **CHROMATOGRAF PODOBNÝ JAKO PRO GC**

- doplněno **DÁVKOVAČEM** zkapalněného plynu

- preferovány **KAPILÁRNÍ kolony**

- kolony o menším průměru (0,05 - 0,1 mm)
kratší délce (5 - 10 m) než v GC



- **DETEKTOR - obvykle PLAMENOVÝ IONIZAČNÍ – FID**

- lze kombinovat s MS detekcí

- namísto gradientu složení mobilní fáze (LC) nebo teplotního programu (GC) - programově řízený TLAK v SFC

• FLUIDNÍ chromatografie

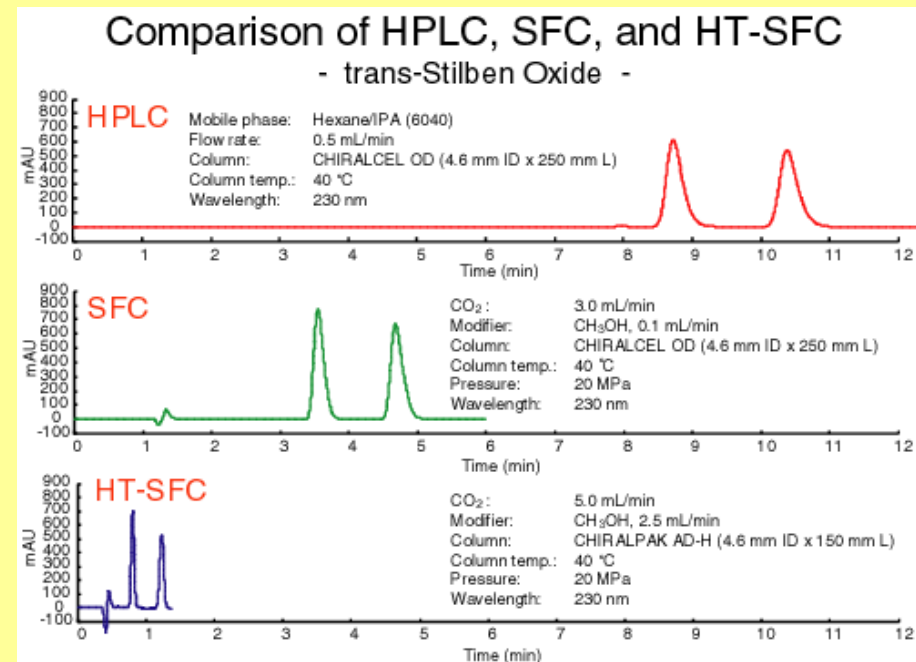
S MOBILNÍ FÁZÍ V NADKRITICKÉM STAVU - SFC

• MOBILNÍ FÁZE - ZKAPALNĚNÝ PLYN -

– CO₂ - nejběžnější, pro polární látky přídavek methanolu

– SF₆, - vyšší kritická teplota, nižší kritický tlak,
problém koroze FID

– Xe - 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

$$- F_1 = Q E = z e E, \quad E - \text{intenzita pole}$$

- uvedení iontů do pohybu

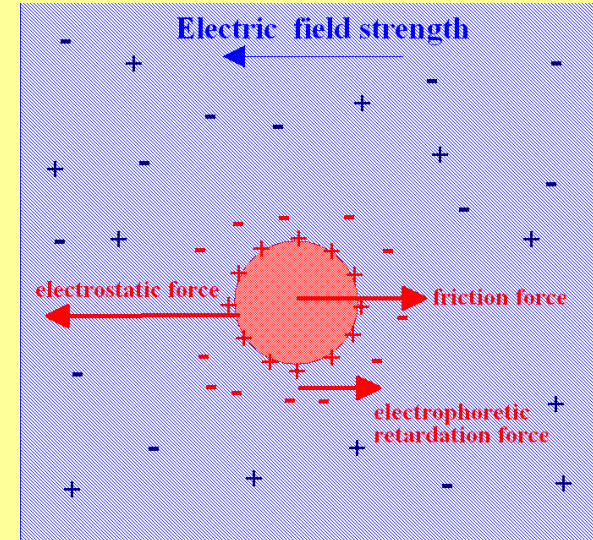
• (hlavní) síla brzděná - odpor prostředí

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

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 ROZHŘANÍ -

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

• ELEKTROFORÉZA - ELFO

– dvě elektrody (oddělené diafragmou)

- propojené vodivým elektrolytem - v kapiláře, v porézním materiálu - „konstantní elektrické pole v systému

Vlastnost	SGE	PAGE	CAGE	AGE
odděluje podle náboje	ano	ano	ano	ano
odděluje podle velikosti	ano	ano	ne	ne
počet řezů z jednoho gelu	až >6	většinou 1	1	1
Toxický	ne	ano	ne	ne
délka elektroforetické migrace	3-24h	0,5-6h	0,3-3h	0,5-4h
minimální množství vzorku	2 μ l	2 μ l	0,5 μ l	1 μ l
maximální možné množství jednoho vzorku na gelu	>50 μ l	>50 μ l	5 μ l	>50 μ l
nezbytné množství barvicího roztoku	5-50ml	10-50ml	1-3ml	10-50ml
použité napětí (V/cm)	1-10	5-10	<3	20
nutné chlazení	ano	někdy	ne	ano
snadná manipulace s gely	obvykle	většinou ne	ano	ano

• ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

• ELEKTROFORÉZA - ELFO

– kontinuální

- stejný pufr v elektrodových prostorech jako v gelu
- odlišný pufr u elektrod a v gelu

– multifázická -

- 1) koncentrující gel - s většími póry
- 2) rozdělující gel - s malými póry

– izoelektrická fokusace (IFE)-

PAGE - nosné amfolyty, směs polyamino a polykarboxylových skupin - gradient pH v gelu - od anody ke katodě - (silná kyselina u anody, silná zásada u katody)

– proteiny putují do míst, kde pH odpovídá jejich pI

- **ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**

- **2D - ELEKTROFORÉZA**



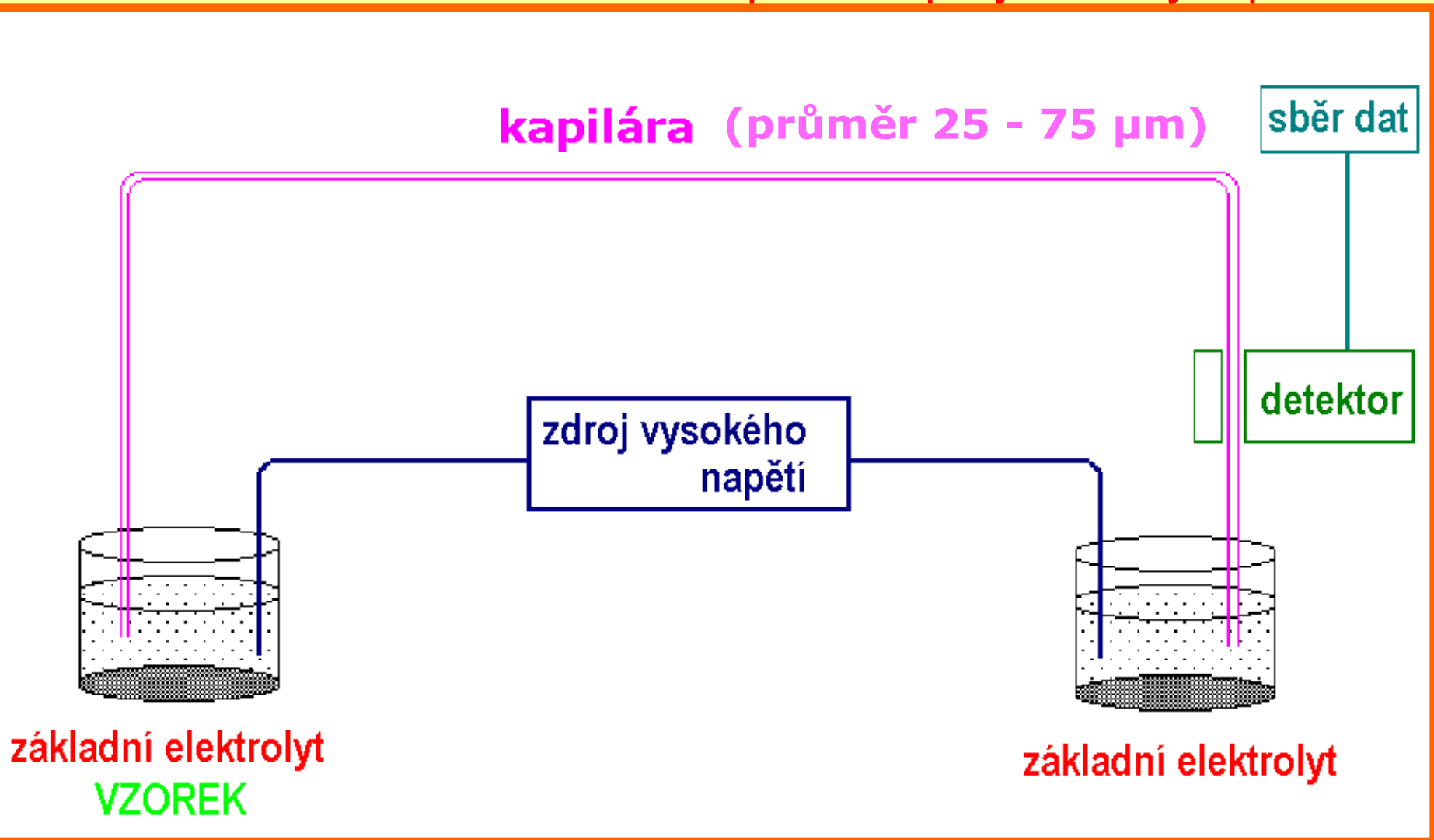
například:

- **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 – cca 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**

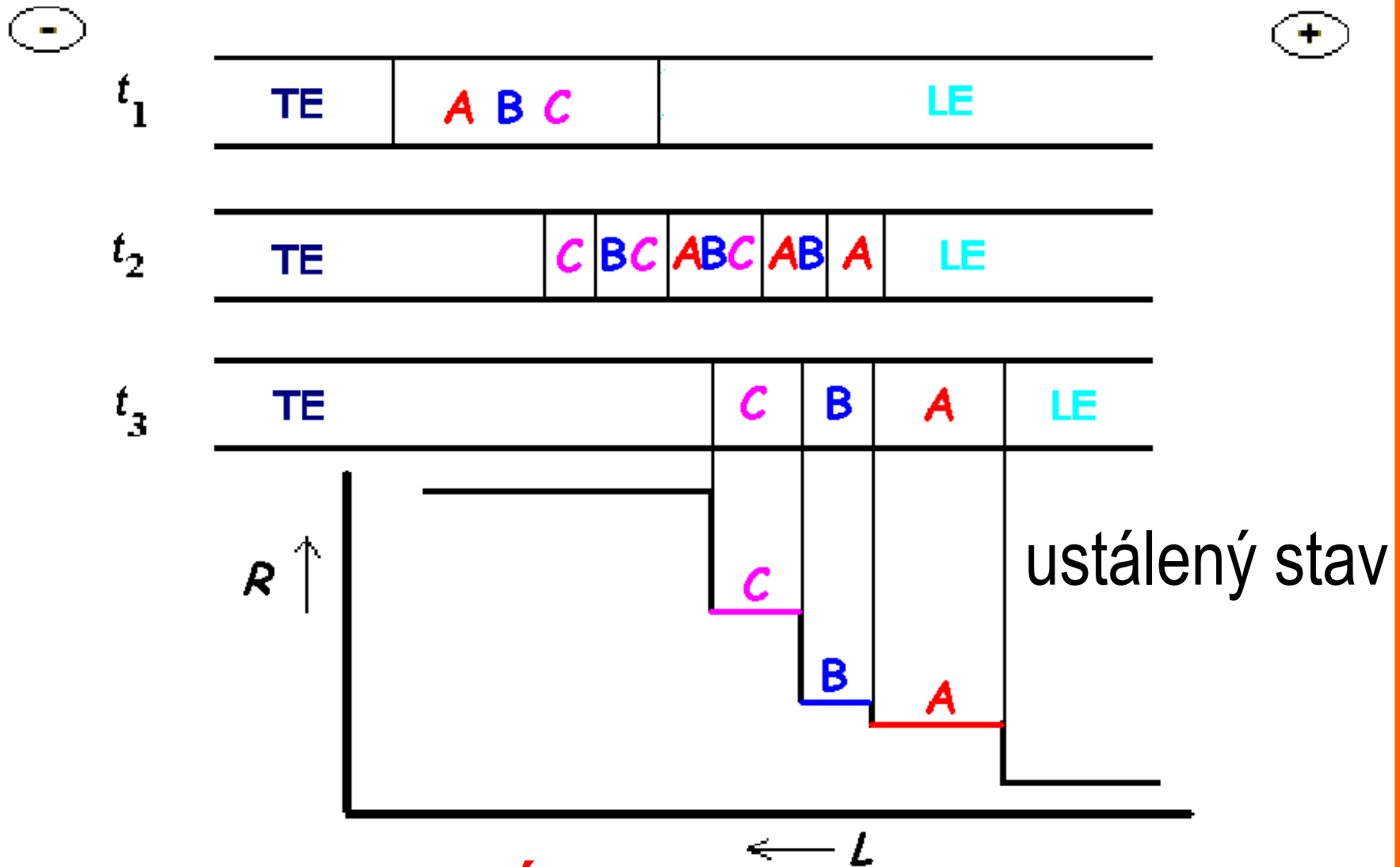
- **VZOREK VNÁŠEN NA ROZHHRANÍ ELEKTROLYTŮ**

- **VZOREK SE DĚLÍ DLE POHYBLIVOSTI IONTŮ
V NĚM OBSAŽENÝCH**

- vytváří zóny mezi vedoucím a koncovým
elektrolytem - **SAMOZAOSTŘUJÍCÍ EFEKT**

- všechny zóny se pohybují stejnou rychlostí

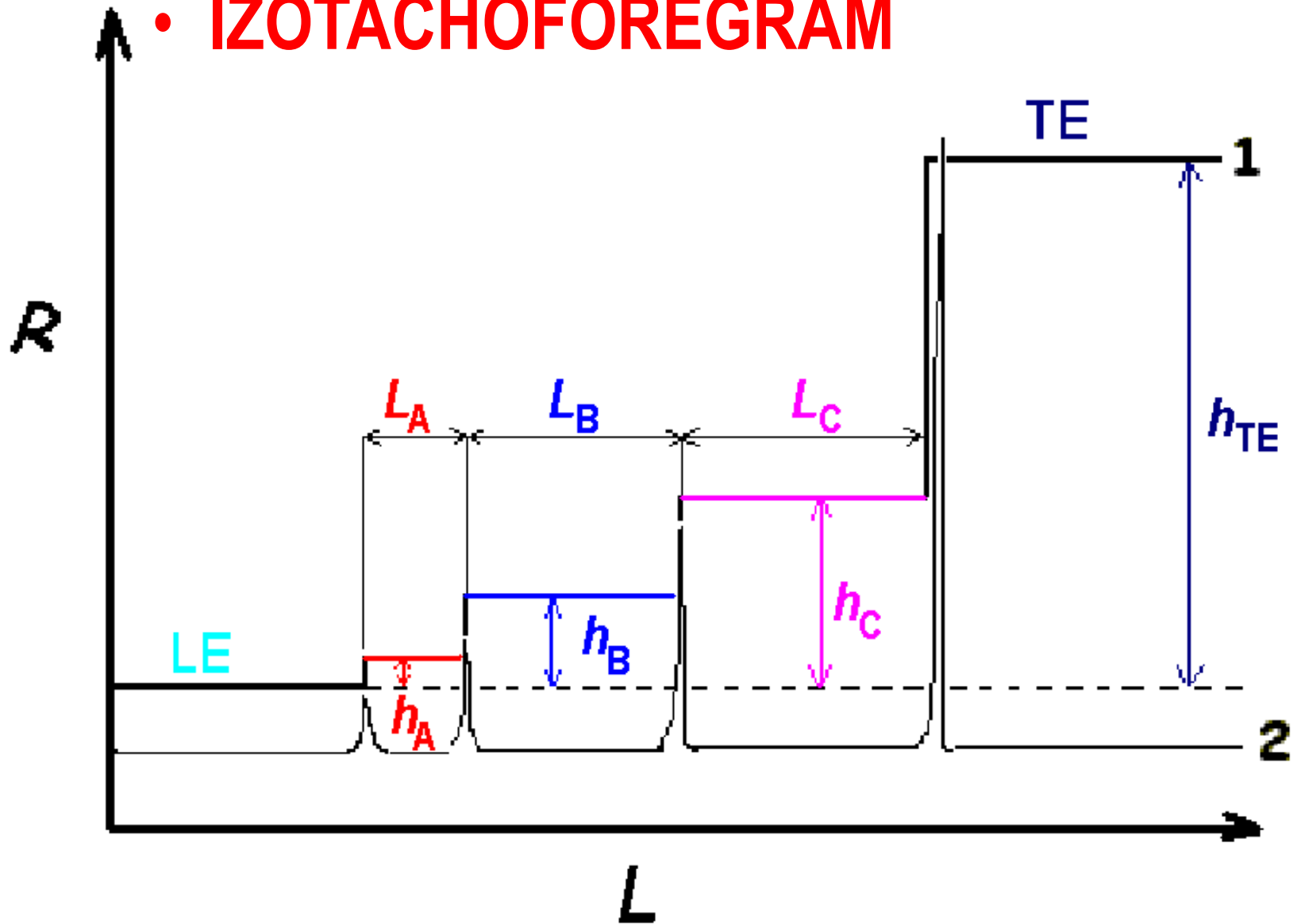
• ELEKTROMIGRAČNÍ METODY



• **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

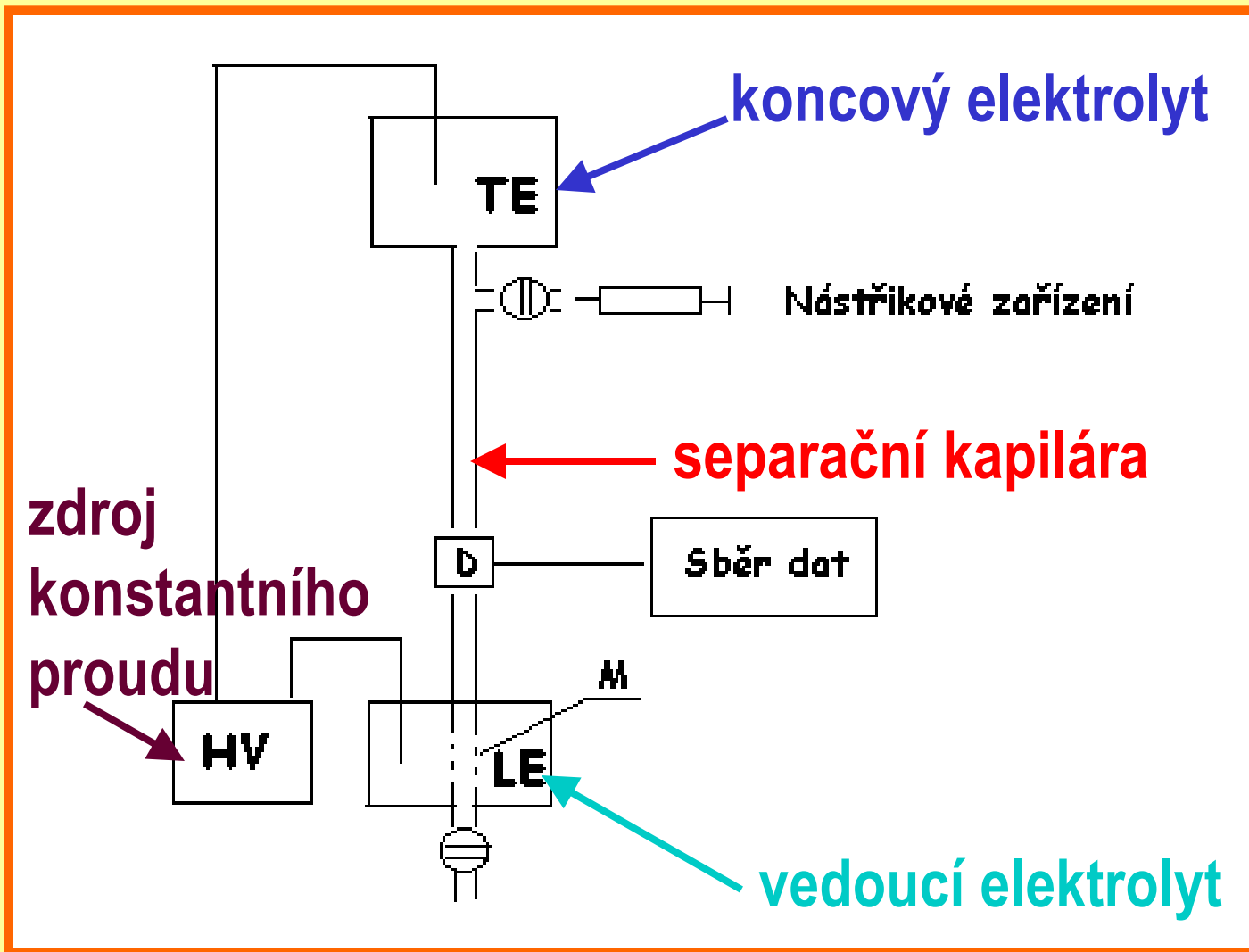
• konstantní v - **IZOTACHOFORÉZA**

- 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

1. IZOTACHOFORÉZA - ZAKONCENTROVÁNÍ SLOŽEK DO ZÓN
2. ELEKTROFORÉZA - VYSOKÉ ROZLIŠENÍ SLOŽEK