



VILLA LABECO s.r.o.
Chrapčiakova 1
052 01 Spišská Nová Ves

IZOTACHOFORÉZA

APLIKAČNÝ LIST č. 5

"SPACERY" A ICH VYUŽITIE V ITP S POUŽITÍM UV - DETEKČIE (pH = 3,25)

CHARAKTERISTIKA :

V analýze vzoriek (napr. moč, sérum, rastlinné extrakty) vyznačujúcich sa bohatou maticou látok absorbujúcich v UV oblasti (v ITP najčastejšie 254, 280, 206, 365, 405 nm) sa stretávame s problémami obtiažnej identifikácie, systematickej chyby stanovenia a celkovo zníženej interpretability izotachoforeogramu.

Napriek tomu, že látky sú vzájomne separovateľné, tým, že tvoria sled tesne za sebou idúcich zón minimálnej dĺžky, alebo migrujú v hraničných zónach medzi zložkami, ktoré tvoria korektné zóny, fotometrickým detektorom nemusia byť rozlíšiteľné.

Tento problém sa dá riešiť dvomi prístupmi :

1. Ku vzorke sa pridá syntetická zmes amfolytov (Ampholine, Servalyt, Pharmalyt, Biolyt), ktoré obsahujú veľký počet individuál migrujúcich izotachoforeticky v pohyblivostnom intervale medzi vodiacim a zakončujúcim iónom. Tieto zložky (neabsorbujúce žiarenie v danej vlnovej dĺžke) vytvoria rad zón, pričom svetlo absorbujúce zložky zo vzorky zaujmú v takto rozdelenej zmesi pozíciu podľa svojich pohyblivostí. Tým sa podstatne zvýši počet fotometrickým detektorom rozlíšiteľných komponent v analyzovanej vzorke. V izotachoforetickej terminológii sa syntetické amfolyty často nazývajú "spojitý pohyblivostný gradient", z angl. continuous mobility gradient, a často sa používajú napr. v analýze proteínov.

2. Ku vzorke sa pridá zmes iónogenných látok, pripravená z individuál, ktoré majú nasledujúce vlastnosti :

a, zložky migrujú v pohyblivostnom intervale vodiaci-zakončujúci ión

b, zložky neabsorbujú žiarenie o danej vlnovej dĺžke

c, zložky sa zmiešajú v zrovnateľných koncentráciách, len o málo vyšších než je potrebné na vytvorenie ich vlastných zón. Za takýchto podmienok pri analýze vzorky s prídavkom zmesi uvedených vlastností môžeme cielene (na rozdiel od "spojitého pohyblivého gradientu") zvýšiť analytické parametre stanovenia fotometrickým detektorom. Zmesi iónogenných látok, používané pre tento účel sa nazývajú "diskrétné spacery".

Zrovnanie oboch typov (spacerov) pri využití fotometrického detektora veľmi jasne ilustrujú záznamy na obrázkoch č.3-5. Prednosti " diskrétnych spacerov " pre analyzovaný materiál (moč) sú zrejmé. V praktických aplikáciách pre dané zloženie (pH) vodiaceho elektrolytu, je tieto zmesi potrebné pripraviť z experimentálnych meraní (istou pomôckou pri výbere môžu byť údaje tabelované Hirokawom a spol., J. Chromatogr., 271/1983/, 1-106). Je veľmi pravdepodobné, že pre vodiace elektrolyty najfrekvencovanejšieho použitia budú vhodné zmesi diskretných spacerov komerčne dostupné.

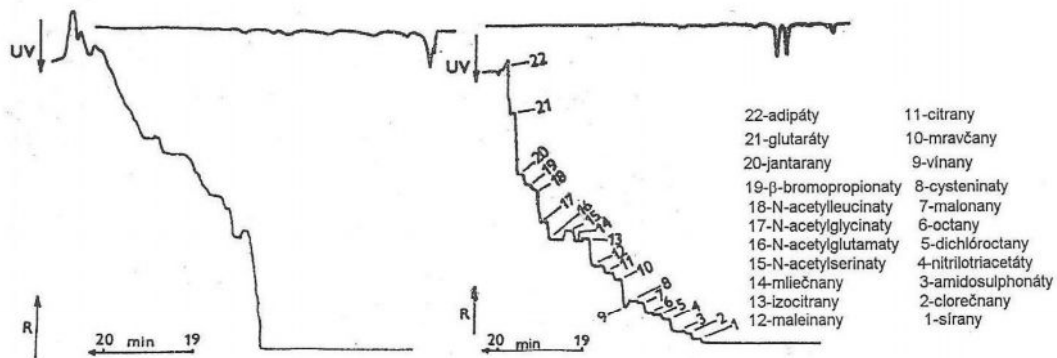
Podmienky : vodiaci elektrolyt :

10^{-2} M HCl + β -alanín + 0,1% hydroxyetylcelulóza (HEC), pH = 3,25

zakončujúci elektrolyt :

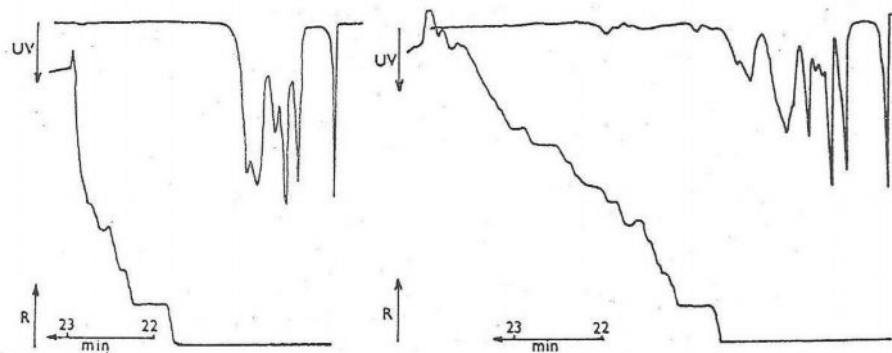
$5 \cdot 10^{-3}$ M kyselina octová + TRIS

Analýzy boli robené v dvojkolónovom usporiadaní prístroja (priemery kapilár $\Phi = 0,8\text{mm}$ a $\Phi = 0,3\text{mm}$). Izotachoforeogramy sú záznamy z analytickej kolóny, ktorá bola vybavená vodivostným aj UV detektorom ($\lambda = 254\text{nm}$).



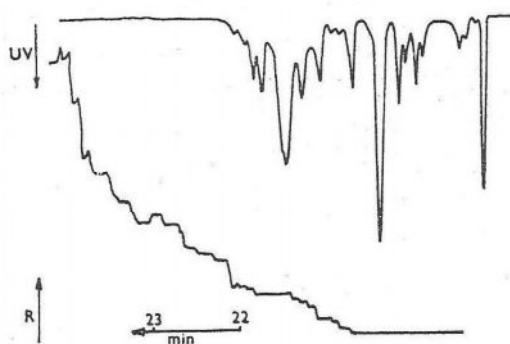
Obr. 1. Spojitý spacer "SERVALYT"
(1 μl, riedenie 1 : 10)

Obr. 2. Zmes diskretných spacerov
(30 μl, $c_{inj} = 5.10^{-5}$ mol/l)



Obr. 3. Moč (5 μl, riedenie 1 : 10)

Obr. 4. "SERVALYT" (1 μl, riedenie 1 : 10) +
moč (5 μl, riedenie 1 : 10), vyšší počet
a kvalitnejšie rozlíšenie jednotlivých
komponent oproti obrázku č. 3



Obr. 5. Zmes diskretných spacerov (30 μl,
 $c_{inj} = 5.10^{-5}$ mol/l + moč /5 μl, riedenie
1 : 10), vyšší počet a kvalitnejšie
rozlíšenie oproti obrázku č. 4.

Pristroje pre izotachofórezu vyrába :
VILLA Labeco s.r.o., Chrapčiakova 1, 052 01 Spišská Nová Ves