



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

## IZOTACHOFORÉZA

### APLIKAČNÝ LIST č. 6

#### "SPACERY" A ICH VYUŽITIE V ITP S POUŽITÍM UV - DETEKcie ( pH = 6,0 )

##### 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 celkovej 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 ( v štrbine detektora sa môžu nachádzať súčasne 2 i viac absorbujúcich zložiek ).

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 vodivostný gradient", z angl. continuous mobility gradient, a často sa používajú napr. v analýze proteínov.

2. Ku vzorke sa pridá zmes iónogénnych 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 miešajú 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 pohyblivostného gradientu" ) zvýšiť analytické parametre stanovenia fotometrickým detektorom. Zmesi iónogénnych látok, používané pre tento účel sa nazývajú "diskrétné spacers".

Zrovnanie oboch typov ( spacerov ) pri využití fotometrického detektora veľmi jasne ilustrujú záznamy na obr.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.

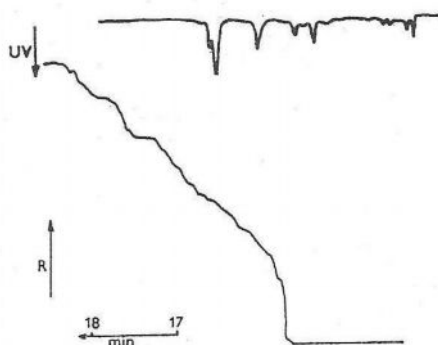
##### Podmienky : vodiaci elektrolyt :

$10^{-2}$  M Cl<sup>-</sup> +  $2 \cdot 10^{-2}$  M Histidín + 0,1 % hydroxyetylcelulóza ( HEC ) ; pH = 6,0

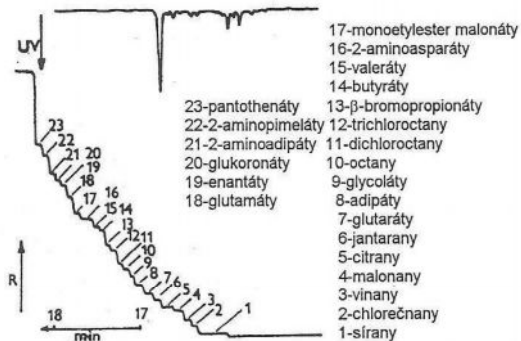
##### zakončujúci elektrolyt :

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

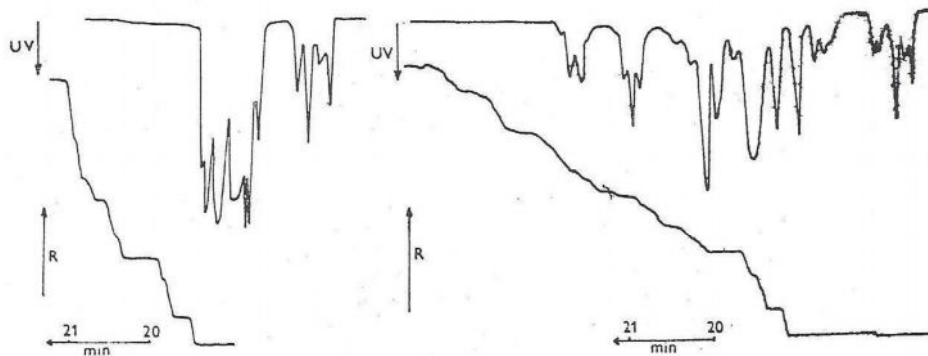
Analýzy boli robené v dvojkolónovom usporiadaní prístroja ( priemery kapilár  $\Phi = 0,8$ mm,  $I_1 = 250$   $\mu$ A;  $\Phi = 0,3$ mm,  $I_2 = 50$   $\mu$ A ). Izotachoforeogramy sú záznamy z analytickej kolóny, ktorá bola vybavená vodivostným aj UV detektorom (  $\lambda = 254$ nm ).



Obr. 1. Spojitý spacer "SERVALYT"  
(1  $\mu$ l, riedenie 1 : 10)

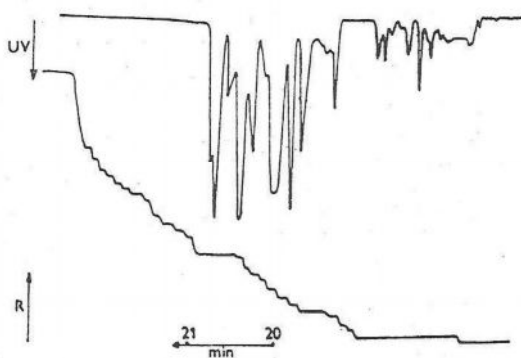


Obr. 2. Zmes diskrétnych spacerov  
(30  $\mu$ l,  $c_{inj} = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l)



Obr. 3. Moč (5  $\mu$ l, riedenie 1 : 10)

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



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

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