

Isotachoforesa

Citation for published version (APA):

Everaerts, F. M. (1973). Isotachoforesa. *Chemicke Listy*, 67, 9-18.

Document status and date:

Published: 01/01/1973

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of Record (includes final page, issue and volume numbers)

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.tue.nl/taverne

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

openaccess@tue.nl

providing details and we will investigate your claim.

ISOTACHOFOROSA*

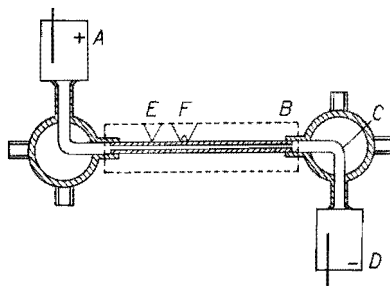
This article is devoted to a new modern analytical technique — isotachopheresis which is an electrophoretic technique with free moving zone boundaries. During an isotachopheretic analysis the ionic components of the sample are separated in consequence of different effective or net mobilities. The result of the separation is an equilibrium state in which all ions move with the same speed, individually separated into a number of consecutive zones of pure components in immediate contact with each other, and arranged in the order of their mobilities. In the article the instrumentation for the performance of this technique in capillaries is described, as well as the detection by means of thermocouples. Using this instrumentation analyses of ionic components may be carried out very rapidly both in aqueous and in non-aqueous medium.

Podobně jako v chromatografii lze v elektroforese rozlišit tři základní techniky: *Zonální elektroforesa* (zone electrophoresis) a jí příbuzné techniky, které mohou být přirovnávány k eluční technice v chromatografii.

Volná elektroforesa (Tiselius free boundary electrophoresis) je frontální technika. Tato technika byla první důkladněji propracovanou technikou.

Isotachoforesa (isotachopheresis, displacement electrophoresis) může být přirovnávána k vytěšňovací technice.

Obr. 1. Schéma elektroforetické aparatury
 A anodový prostor, B termostat,
 C dávkovací kohout, D katodový prostor,
 E integrální termočlánek, F diferenční termočlánek



Předložená práce pojednává o posledně zmíněné technice. Rovněž uvedená instrumentace byla vyvinuta pro isotachoforesu, i když jí lze použít pro všechny tři již zmíněné techniky.

Schéma elektroforetické aparatury je na obr. 1. Základem této aparatury je tenkostěnná trubice o malé světlosti, kapilára, vyrobená ze skla, teflonu nebo jiné vhodné

* Předneseno na 3. mezinárodním symposium o využití plynové chromatografie a podobných technik v ropném průmyslu 19—21. 5. 1971 v Bratislavě.

umělé hmoty. Světlost kapiláry volíme podle koncentrací použitých elektrolytů, velikosti užívaných proudů a teploty prostředí obklopujícího kapiláru. Při dále uvedených experimentech byly používány kapiláry o vnitřním průměru 0,4–0,6 mm a vnějším průměru 0,65–0,8 mm. Délku kapiláry určuje vlastní separační problém, kde základním požadavkem je délka dostatečná pro separaci dvojice nejobtížněji separovatelných iontů. Pro dělení proteinů stačí na příklad 10 cm, u slabých kyselin nebo kovů je potřeba 0,5–1 m, není-li použito protiproudého elektrolytu (counterflow of electrolyte)¹ a liší-li se pohyblivostí dělených komponent asi o 4%². Kapilára je připojena ke dvěma nádobkám, které fungují jako katodový a anodový prostor. Mezi anodovým a katodovým prostorem jsou umístěny dva čtyřcestné kohouty, sloužící pro vnášení vzorků v případě analýzy kationtů nebo aniontů. V případě, že se má provádět isotachoforesa aniontů, postupuje se následujícím způsobem:

– Anodový prostor a kapilára se naplní elektrolytem, jehož anion je velmi pohyblivý a kation je součástí pufru. Tento elektrolyt se nazývá vedoucí elektrolyt (leading electrolyte). Anion vedoucího elektrolytu musí mít větší efektivní pohyblivost než mají všechny ostatní anionty ve vzorku.

– Katodový prostor obsahuje elektrolyt, jehož anion má efektivní pohyblivost menší než všechny ostatní složky analysované směsi. Tento elektrolyt se nazývá zakončující elektrolyt (terminating electrolyte) a jeho anion se nazývá terminátor. Hodnota pH zakončujícího elektrolytu musí být o něco nižší než pH vedoucího elektrolytu, aby nepřispíval navíc k vodivosti iontů OH^- . Hodnota pK aniontů sloužících jako terminátor musí být větší než pK aniontů vzorku a vedoucího elektrolytu. Tím se zabráňuje tomu, aby vznikaly stabilní směsné zony, anebo v horších případech, aby docházelo i ke ztrátám materiálu³.

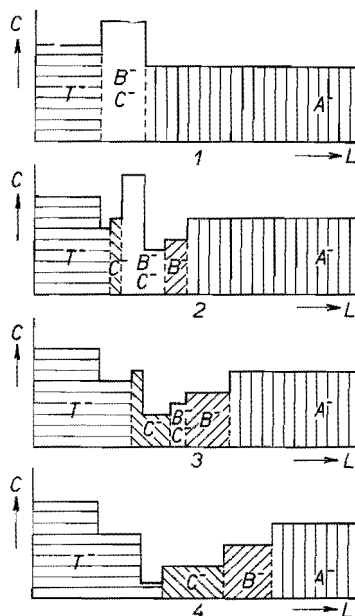
– Vzorek je vnesen dávkovacím kohoutem mezi vedoucí a zakončující elektrolyt.

– Na anodu a katodu se vloží napětí a systémem začne procházet elektrický proud. Všechny ionty se pohybují vlivem elektrického pole směrem k odpovídajícím elektrodám. Elektroendoosmosu uvnitř kapiláry vlivem potenciálu ζ lze zanedbat. Jako zábrana proti hydrodynamickému toku slouží membrána⁴, jež bude zmíněna později.

Jestliže jsou separovány malé ionty, není třeba užívat polymeru nebo jiného stabilizačního materiálu, neboť kapilára samotná má stabilizační schopnosti. Průběh popsaného procesu je na obr. 2. Nahoře, v první části obrázku, je vidět vedoucí elektrolyt, vzorek a zakončující elektrolyt. Na svislé ose je udávána koncentrace a na vodorovné ose poloha uvnitř kapiláry. Jednotlivé části obrázku směrem dolů znázorňují stav separace v určitých časových intervalech. Na druhé části je vidět, že zona vedoucího elektrolytu se posunula o něco směrem do kapiláry. Koncentrace B se již upravila na hodnotu, která odpovídá podle Kohlrauschova vztahu koncentraci vedoucího elektrolytu. Koncentraci B v této zóně lze spočítat je-li známa koncentrace vedoucí zony a hodnoty pohyblivosti a pK jak vedoucí tak i zony B⁵. Směrem dozadu lze vidět, že směsná zóna B a C má koncentraci již také upravenou vzhledem k zóně, jež jí předchází. Koncentrace zon za vzorkem jsou upravené vzhledem ke

koncentraci vzorku samotného. Třetí část obrázku ukazuje další stav separace. Lze zřetelně vidět, že zona čisté látky B se zvětšila. Dále vznikla zona čisté látky C o koncentraci upravené na předcházející směsnou zonu. Jak vypadají tyto jevy při detekci lze vidět na obr. 5. Čtvrtá část obrázku 2 představuje rovnovážný stav.

Obr. 2. Průběh separace během isotachoforetické analýzy

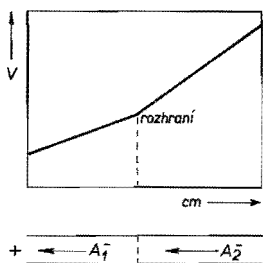


Každou zonu uvnitř kapiláry tvoří jediný druh iontů a koncentrace v těchto zónách jsou v rovnováze s koncentrací vedoucího elektrolytu. Při konstantním průměru kapiláry a složení vedoucího elektrolytu se délky jednotlivých zón již dále nemění. Při praktickém provádění analýzy může docházet k narušení zón některými méně významnými faktory, např. změnami pH v důsledku membránových neb elektrodo- vých reakcí, změnami teploty, pronikáním CO₂ teflonovou stěnou kapiláry, elektro- endosmosou a hydrodynamickým tokem (zejména u protiproudých experimentů).

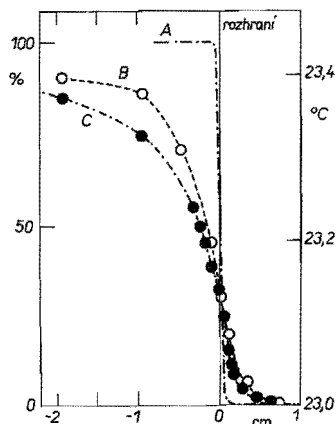
Po dosažení rovnovážného stavu a při konstantním elektrickém proudu se všechny zony pohybují stejnou rychlostí. Tomu odpovídá název isotachoforesa, což znamená elektroforesa, při níž se všechny zony pohybují stejnou rychlostí. V zóně zakončující elektrolytu se za předpokladu ideálních podmínek koncentrace nemění. Souhrnem lze říci, že isotachoforesa je frontální technika s volně pohyblivými hranicemi zón, jejímž výsledkem je rovnovážný stav, kdy všechny zony se pohybují stejnou rychlostí. Zony následují těsně jedna druhou, neboť za všech podmínek musí být splněna podmínka elektroneutality. Pohyb opačně nabitých iontů směrem k odpovídající elektrodě je nutno kompenzovat elektricky.

Vzhledem k tomu, že všechny zony se pohybují stejnou rychlostí a zároveň jednotlivé druhy iontů mají různé efektivní pohyblivosti, má každá zóna svůj vlastní poten-

ciální gradient, který jí udílí stejnou rychlost. Potenciální gradient v každé jednotlivé zóně je konstantní, ale vzrůstá do jedné zóny ke druhé. Průběh potenciálu při pohybu zón iontů A_1 a A_2 je znázorněn na obr. 3. Všechny zóny jsou seřazeny podle svých efektivních pohyblivostí. Přírůstek potenciálního gradientu v sobě automaticky zahrnuje snížení koncentrace příslušného druhu iontů v uvažované zóně. Tuto koncentraci lze, jak již bylo řečeno dříve, vypočítat. Hranice zón při této technice jsou podivuhodně ostré. Jestliže např. ion A_2 pronikne do zóny A_1 , bude se v této zóně pohy-



Obr. 3. Průběh potenciálu na hranici dvou zón v kapilární trubici, kde ion A_2 vytěsňuje ion A_1

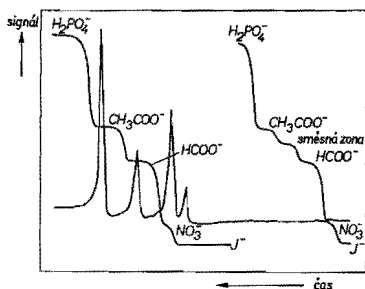


Obr. 4. Koncentrační a teplotní profil na hranici zóny. A koncentrační profil, B teoretický teplotní profil, C skutečný teplotní profil

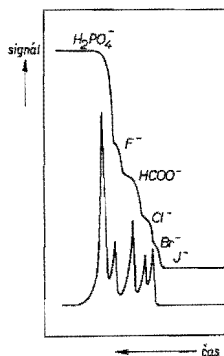
bovat pomaleji, neboť potenciální spád uvnitř zóny A_1 je menší než v zóně A_2 . To znamená, že rychlost A_2 je potom menší než rychlost zón a ion A_2 se automaticky vrátí do své vlastní zóny. Na druhé straně, jestliže se ion A_1 dostane difusí do zóny A_2 , bude vrácen do své vlastní zóny vyšším potenciálním gradientem.

Je-li během analýsy udržován konstantní proud, potom v důsledku různých potenciálních gradientů mají jednotlivé zóny různé teploty. Je-li na kapiláru upevněn termočlánek z tenkých drátů⁶, signály poskytované tímto termočlánkem charakterizují zóny. Tento případ lze vidět na obr. 4. Derivováním těchto signálů elektronicky nebo užitím diferenčního termočlánku⁶ mohou být takto velmi lehce určovány hranice jednotlivých zón. I když isotachoforegram vypadá podobně jako chromatogram, jeho interpretace je zcela odlišná. Výšky vln jsou zde zdrojem informací o druhu iontů (kvalitativní informace), zatímco vzdálenost mezi vlnami udává délku zóny a tím i informaci o množství daného iontu v systému (kvantitativní informace). Detekce termočlánkem je metodou universální, ale její rozlišovací schopnost je malá, což vyplývá ze srovnání koncentračního a teplotního profilu na hranici zóny, viz obr. 4. Avšak nehledě na to, pokud nejsou množství ve vzorku příliš malá, je detekce

termočlánkem dostačující, abychom mohli daný system studovat. Komponenty přítomné ve vzorku musí být řádově μg . Na obr. 5 je skutečný elektroforegram separace dusičnanů, mravenčanů a octanů. Vedoucím elektrolytem je Tris-jodid a jako terminátor je užit fosforečnan. První detekce byla provedena po 15 cm, druhá potom



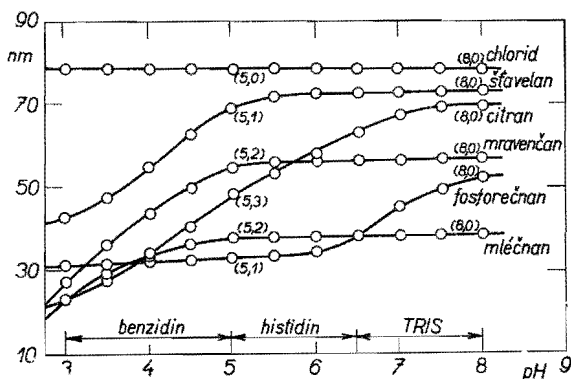
Obr. 5. Isotachogram smísi dusičnanů, mravenčanů a octanů. Vedoucím elektrolytem je Tris-jodid, terminátorem je fosforečnan



Obr. 6. Isotachogram smísi halidů
Kyselina mravenčí byla přidána jako referenční látka

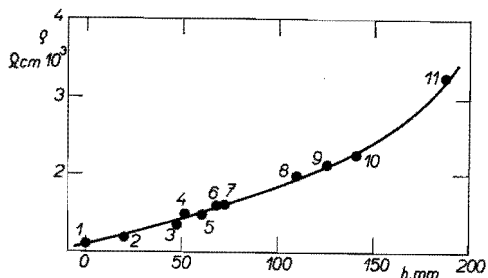
po 30 cm od startu. Diferenciální záznam byl proveden diferenčním termočlánkem, který je upevněn 30 cm od startu. Čas analýzy byl 30 minut a hodnota stabilizovaného proudu $70 \mu\text{A}$. Na tomto obrázku je jasně vidět, jak směsná zóna detegovaná po 15 cm během dalších 15 cm zmizí. Na obr. 6. je separace halidů, k nimž byla přidána kyselina mravenčí jako referenční látka. Z výšky vln této známé látky a z výšek ostatních vln lze potom identifikovat ostatní přítomné ionty.

Obr. 7. Závislost pohyblivosti některých kyselin na pH

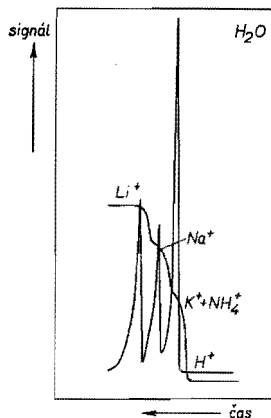


Někdy bývá diference v efektivních pohyblivostech analyzovaných látek příliš malá, aby se úplně rozdělily na dané 1 m dlouhé kapiláře. Není-li k dispozici zařízení s protiproudým systémem je pro separaci nutné vybrat jiný pufovací systém. Na obr. 7. jsou pohyblivosti některých kyselin jako funkce pH. Hodnoty v závorkách

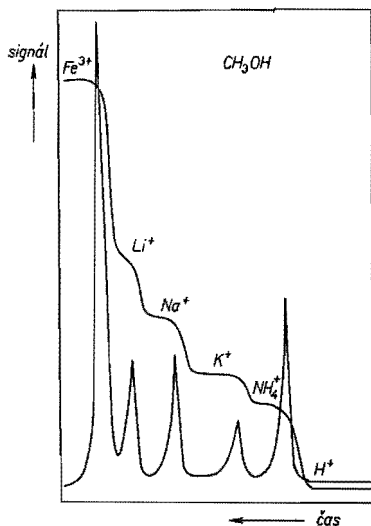
udávají pH zon. Při neutrálním pH se fosforečnan bude pohybovat před mléčnanem a obě kyseliny lze lehce separovat. Při pH v rozmezí 4–6 bude mléčnan putovat před fosforečnanem. Při pH = 4 lze očekávat stabilní směšnou zonu. Při pH nižším



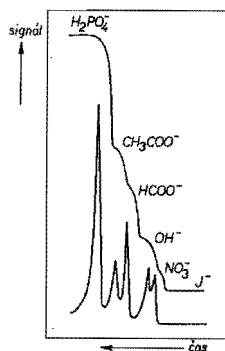
Obr. 8. Vztah mezi výškami vln a teoretickými vodivostmi



Obr. 9. Isotachogram směsi kationtů ve vodném prostředí



Obr. 10. Isotachogram směsi kationtů (viz obr. 9) v prostředí methanolu



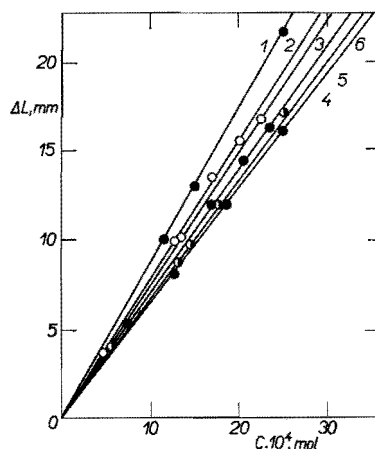
Obr. 11. Isotachogram směsi obsahující OH⁻ v prostředí methanolu

než 4 bude fosforečnan putovat opět před mléčnanem. Na obr. 8 je závislost mezi výškou vln a teoretickou vodivostí. Výšky vln byly určeny experimentálně z integračních křivek, teoretické vodivosti byly počítány z hodnot pK a pohyblivosti. Korekce podle Onsagerova vztahu a na teplotu byly při výpočtech zanedbány. Získané závis-

losti lze užít pro stanovení pohyblivosti látek, jejichž výšku vlny naměříme za stejných podmínek. Přesnost stanovení pohyblivosti je asi 2%.

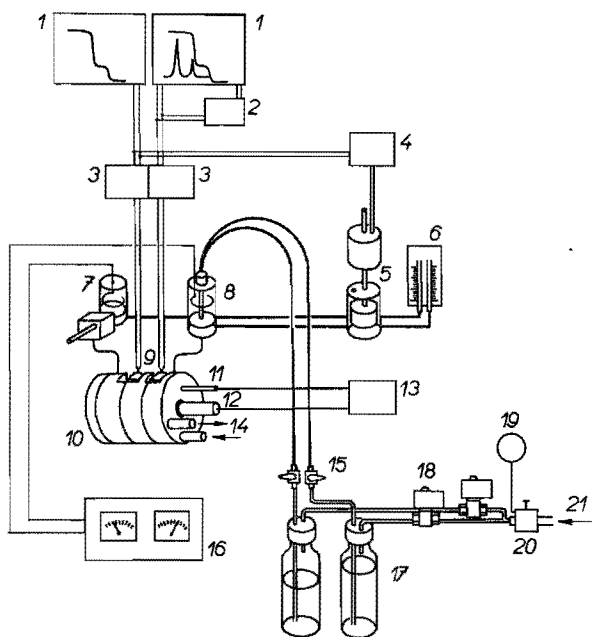
Jak již bylo zmíněno, lze separaci analysovaných látek ovlivňovat změnami pH. Avšak někdy jsou fyzikální vlastnosti a hodnoty pK analysovaných látek tak podobné, že jejich separace je zdánlivě nemožná. Příkladem může být analýza směsi kationtů obsahujících K^+ a NH_4^+ , viz obr. 9. V takovém případě je nutné hledat řešení problému změnami jiných parametrů systému. Tím je např. výběr jiného rozpouštědla. V případě K^+ a NH_4^+ je vhodným prostředím methanol, což dokazuje úspěšná analýza zmíněné směsi, viz obr. 10. Diference v chování K^+ a NH_4^+ v methanolicím prostředí je skutečně pozoruhodná⁷. Tento jev potvrzuje důležitost vlivu solvatace iontů na separaci. Obecně lze říci, že separaci iontů kovů lze mnohem snadněji provádět v methanolu než ve vodě. Z tohoto hlediska je velmi zajímavým isotachofogram na obr. 11. Zatímco ve vodě je OH^- velmi pohyblivý, v methanolu je iontem pohybujícím se mezi zónou dusičnanů a mravenčanů.

Obr. 12. Vztah mezi vzdáleností dvou po sobě následujících píků a koncentrací příslušné komponenty v původním vzorku
1 kys. 2-keto-1-gulonová, 2 kys. tartronová,
3 kys. mravenčí, 4 kys. levulová,
5 kys. glukonová, 6 kys. glykolová

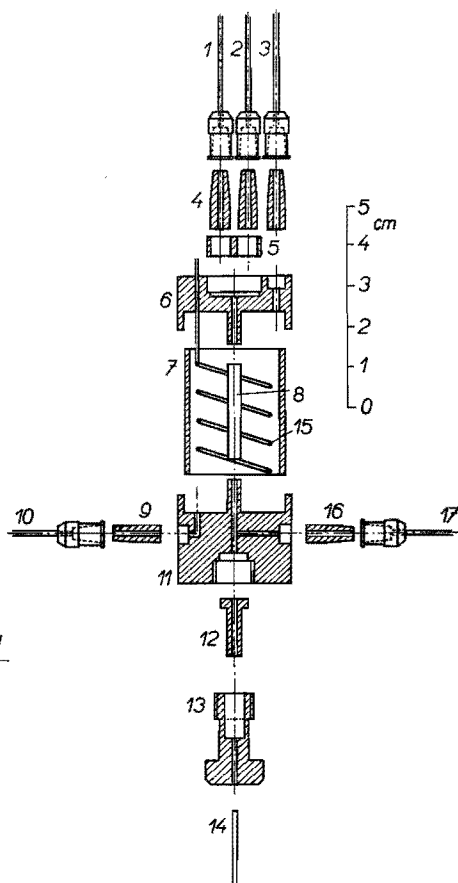


Jak již bylo řečeno dříve, v rovnovážném stavu se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí. Koncentrace v těchto zónách odpovídají koncentraci vedoucího elektrolytu podle Kohlrauschova vztahu. Jestliže je do systému vneseno více iontů jednoho druhu, vzdálenost mezi dvěma příslušnými následujícími maximy vzrůstá neboť vnesením více iontů se prodlužuje délka zóny. A tedy, víceméně naopak k plynové chromatografii, vzdálenost mezi dvěma následujícími píky je informací o množství nastříknuté látky. Kvalitativní informace podává výška vlny integrálního záznamu. Na obr. 12. jsou závislosti mezi koncentrací jednotlivých druhů iontů a vzdáleností nalezenou mezi příslušnými dvěma píky isotachoforegramu. Vliv terminátoru je zanedbatelný. Nastříkovány byly konstantní objemy vzorků dávkovacím kohoutem. Pokud není dávkováno příliš velké množství daného iontu a je-li kapilára dostatečně dlouhá pro dosažení rovnovážného stavu, jsou zmíněné závislosti přímkové. Tyto přímky lze také vypočítat.

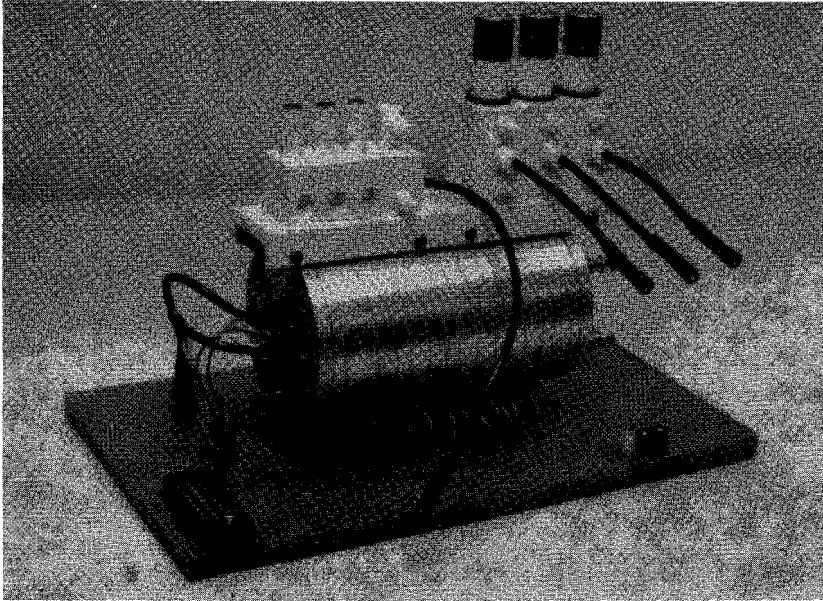
Blokové schéma zařízení je na obr. 13., protielektroda s membránou, která eliminuje hydrodynamický tok mezi elektrodovými prostory (8) je na obr. 14. a na



Obr. 13. Blokové schéma zařízení
 1 zapisovače, 2 elektronický derivační článek,
 3 operační zesilovače, 4 regulátor toku
 protiproudného elektrolytu,
 5 zařízení pro protiproud, 6 ukazatel hladiny,
 7 dávkovací blok, 8 protielektroda,
 9 termočlánky, 10 hliníkový blok s kapilárou,
 11 platínové čidlo pro termostatování
 hliníkového bloku, 12 topný odpor,
 13 regulátor teploty hliníkového bloku,
 14 termostatovaná voda, 15 ventil vyložený
 teflonem, užíváný pro odpojování kapiláry od
 zásobníku s elektrolytem a od zásobníku
 s vodou na vyplachování kapiláry,
 16 zdroj stabilizovaného proudu,
 17 zásobníky naplněné vedoucím
 elektrolytem a vyplachovací vodou,
 18 magnetické ventily, 19 manometr,
 20 regulátor tlaku, 21 vzduch (2 atm.)



Obr. 14. Schéma protielektrody
 1 teflonová trubice spojená se zásobníkem
 vody, 2 teflonová trubice spojená se
 zásobníkem elektrolytu, 3 teflonová trubice
 spojená s odpadem, 4 a 5 spojovací mezikusy
 z plexiskla, 6 víko elektrodové komůrky,
 7 elektrodová komůrka, 8 membrána,
 9 plexisklový spojovací mezikus,
 10 teflonová trubice spojená se zásobníkem
 elektrolytu, 11 dno elektrodové komůrky,
 12 plexisklový mezikus pro připojení kapiláry
 13 šroub pro upevnění kapiláry,
 14 kapilára, 15 platínové elektrody,
 16 plexisklový spojovací mezikus,
 17 teflonová trubice připojená k zásobníku
 protiproudného elektrolytu



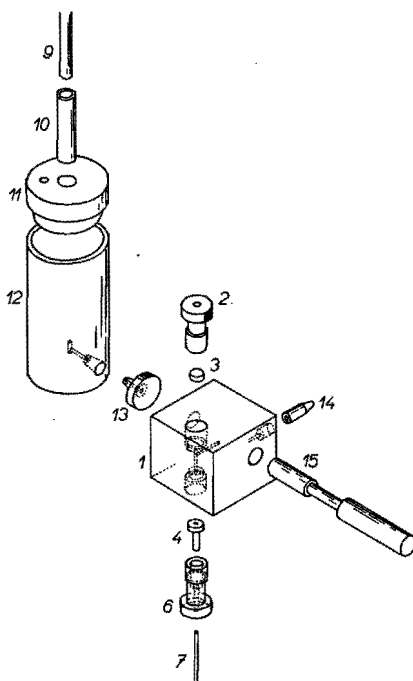
Obr. 16. Multikapilární aparatura

obr. 15. je dávkovací blok a elektrodová komůrka naplněná zakončujícím elektrolytem.

Na obr. 16. je elektroforetická multikapilární aparatura, na níž se mohou současně provádět tři nezávislé analýsy. K tomu slouží tři kapiláry umístěné na hliníkovém termostatu, v nichž je elektrický proud udržován konstantní, navzájem nezávisle, pomocí fotoodporů⁹, i když je užit jenom jeden zdroj. Jako detekční zařízení slouží sada termočlánků. Použití plochých membrán a arnitu (nízkoteplotný polymer kys. tereftalové) místo plexiskla umožňuje použití nevodných rozpouštědel.

Obr. 15. Dávkovací blok a elektrodová komůrka

1 injekční blok, 2 matice pro utažení septa, 3 septum, 4 plexisklový mezikus pro připojení kapiláry, 6 šroub pro připojení kapiláry, 7 kapilára, 9 kabel vysokého napětí, 10 plexisklový mezikus pro upevnění kabelu vysokého napětí, 11 víčko elektrodové komůrky, 12 elektrodová komůrka, 13 spojka mezi elektrodovou komůrkou a komůrkou pístu, 14 přípojka odpadu, 15 píst pokrytý teflonem



Předložená práce pojednává o současném stavu vývoje isotachoforesy se zvláštním zřetelem na instrumentační aspekty provádění této techniky v kapilárách. Práce není kompletním přehledem prací v daném oboru. Uvedená technika umožňuje provádět snadno analýsy slabých kyselin a kovů. Bez velkých obtíží lze také analysovat slabé base. Velmi perspektivní je užití isotachoforesy pro analýsy aminokyselin a proteinů, čemuž je v současné době věnováno mnoho pozornosti na mateřském pracovišti autora práce. Analysovat lze rovněž iontové sloučeniny nerozpustné ve vodě, použitím nevodných rozpouštědel. Perspektivním polem stále zůstává vývoj vhodných detektorů, které by umožňovaly detekci zon kratších než 0,3 mm a tím i provádění analýs mnohasložkových směsí.

Literatura

1. F. M. Everaerts, J. Vacík, Th. P. E. M. Verheggen, J. Zuska: *J. Chromatog.* **49**, 262 (1970).
2. F. M. Everaerts, J. Vacík, Th. P. E. M. Verheggen, J. Zuska: *J. Chromatog.* **60**, 397 (1971).
3. A. J. P. Martin, F. M. Everaerts: *Proc. Roy. Soc. (London) A* **316**, 493 (1970).
4. F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen: *J. Chromatog.* **53**, 315 (1970).
5. F. M. Everaerts, R. J. Routs: *J. Chromatog.* **58**, 181 (1971).
6. F. M. Everaerts: *Thesis*, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, Holland 1968.
7. J. L. Beckers, F. M. Everaerts: *J. Chromatog.* **51**, 339 (1970).
8. F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen, *Sci. Tools* **17**, 17 (1970).
9. L. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatog.*, in press.

Přeložil: Petr Boček