



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

230517

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 28 05 82
(21) (PV 3954-82)

(40) Zveřejněno 30 12 83

(45) Vydáno 15 05 86

(51) Int. Cl.³

G 01 N 27/26

(75)

Autor vynálezu

RYŠLAVÝ ZBYNĚK RNDr., LIBEREC

(54) Způsob fotometrické nebo spektrofotometrické detekce složek rozdělovaných kapilární elektroforézou, zejména kapilární vytěšňovací elektroforézou

1

Vynález se týká způsobu fotometrické nebo spektrofotometrické detekce složek rozdělovaných kapilární elektroforézou, speciálně pak kapilární vytěšňovací elektroforézou, který umožňuje sledování rozdělovaných složek neabsorbujících nebo nedostatečně absorbujících světlo v požadovaném oboru vlnových délek po převedení těchto složek na složky absorbující světlo v dostatečné míře.

Elektroforéza v kapilárách různých tvarů průřezů, zvláště pak kapilární vytěšňovací elektroforéza, tj. isotechoforéza, nabývá v posledních letech stále většího významu, neboť - oproti ostatním způsobům provádění elektroforetických separací - probíhá separace v kapiláře rychle a s malou spotřebou vzorku a činidel. Elektroforetické kapilární techniky pronikají do nejrozličnějších oborů analytické kontroly průmyslových procesů a výrobků. Jednou z nejdůležitějších a přitom kritickou součástí instrumentace je detektor, sledující koncentrace rozdělovaných složek.

K monitorování koncentrací složek se používá v podstatě dvou skupin detektorů: detektorů univerzálních a detektorů specifických. Univerzální detektor snímá v kapiláře signál, který fyzikálně souvisí s vodivostí v příslušné zóně a tím i poskytuje informace o bezprostředně souvisejících elektroforetických pohyblivostech složek v zónách. Jako příklady univerzálních detektorů lze uvést detektory vodivostní a termocentrický.

Neproto tomu detektor specificky snímá signály, které jsou funkcí nějaké jiné vlastnosti zóny, která bezprostředně nesouvisí s elektroforetickou pohyblivostí. Příkladem takového detektoru je fotometrický, resp. spektrofotometrický detektor, který sleduje absorpci světelného záření v zónách.

230517

Pro většinu případů dostačuje jen univerzální detektor. Je-li však součástí kolony ještě nějaký detektor specifický, je kupříkladu možné stanovit pomocí dvojice univerzálního a specifického detektoru stopová množství látek, rovnoměrně rozptýlených v nějaké směsné zóně. Ze specifických detektorů je fotometrický detektor používán velmi často.

Jeho výhodou je rovněž to, že je detektorem nekontaktním, nenarušujícím tudíž složky v zónách. Přitom konstrukce tohoto detektoru je poměrně jednoduchá. Omezení detektoru založeného na snímání absorpce světla tkví v tom, že stanovované složky musejí světlo absorbovat v oblasti, v níž tento detektor pracuje.

Většina látek však absorbuje světlo pouze v ultrafialové oblasti, proto je použití tohoto detektoru pro většinu látek, zvláště pak látek anorganických, možné jen ve speciálních případech. Bylo hledáno a posléze nalezeno východisko z této situace, spočívající v použití barevného protiiontu v isotachoforéze nebo barevného iontu tvořícího součást základního elektrolytu v ostatních elektroforetických technikách (Svoboda M. a Vacík J. AO 180 293).

Fotometrický nebo spektrofotometrický detektor pak zaznamenává signál odpovídající absorpci světla přidaným barevným iontem v kapiláře. Jelikož se koncentrace přidaného barevného iontu mění od zóny k zóně, mění se rovněž odpovídajícím způsobem i odezva detektoru. Toto řešení má však některé nevýhody, z nichž nejdůležitější je ta, že nemůže být použito pro stanovování stopových složek rovnoměrně rozptýlených ve směsné zóně, tzv. zředovací technikou.

Další nevýhodou je i to, že rozdíly absorpce světla v jednotlivých zónách nedosahují často dostatečně velkých hodnot. I když jsou pak rozdíly efektivních pohyblivostí dostatečné k oddělení složek vzorku, nemusejí být rozdíly v absorpci světla přidaným barevným iontem dostatečně výrazné.

Tento způsob detekce sice přibližuje fotometrickou nebo spektrofotometrickou detekci k detekci univerzálním detektorem, avšak mnohdy snižuje citlivost. Poněkud odlišné řešení, popsané pro detekci v ultrafialové oblasti, spočívá v použití protiiontu, jehož absorpce se v této oblasti mění silně s pH v zónách (Arlinger L. a Lundin H., *Protides Biol. Fluids*, sv. 21, str. 661 až 71, 1973). Ani tento způsob však nemůže být použit pro stanovování stopových složek zředovací technikou a je omezen jen na některé speciální případy.

Nevýhody výše popsaných způsobů detekce, jsou odstraněny při použití způsobu fotometrické nebo spektrofotometrické detekce složek rozdělovaných kapilární elektroforézou, speciálně kapilární vytěsňovací elektroforézou, podle vynálezu. Podstatou vynálezu je to, že na rozdělované složky vzorku se v separační kapiláře působí během separace alespoň jednou barvotvornou složkou.

Tato barvotvorná složka, organická nebo anorganická, je charakterizována tím, že tvoří s jedním iontem nebo s více ionty vzorku sloučeninu nebo sloučeniny, které absorbují světelné záření rozdílně od absorpce světla samotnou barvotvornou složkou. Je-li náboj barvotvorné složky opačný k náboji stanovovaných iontů, může být s výhodou přidána k vedoucímu elektrolytu jako protiiont.

Při volbě barvotvorné složky je třeba dbát na to, aby vznikající sloučenina byla v používaném rozpouštědlovém systému rozpustná a aby nedocházelo k nepříznivým reakcím se vzorkem, které by vzorek porušovaly, nebo které by porušovaly barvotvornou složku tak, že by nemohly být některé součásti vzorku stanoveny.

Výhodou způsobu podle vynálezu je to, že vhodnou volbou podmínek separace, zvláště pak výběrem barvotvorné složky, lze učinit detekci specifickou pro vybranou skupinu iontů.

Pak je možno použít zřetřovací techniky pro stanovení stopových složek po jejich rovnoměrném rozptýlení ve směsné zóně s druhou složkou, která s barvotvornou složkou nesmí reagovat, nebo s ní může reagovat pouze za vzniku dostatečně odlišné absorbující sloučeniny. Při způsobu detekce podle vynálezu, dojde vlastně k oddělení jednotlivých separených iontů a k jejich reakci s barvotvornou složkou. Jelikož tato složka reaguje v dané zóně většinou pouze s jedním typem iontů, je tato detekce vysoce specifická. Vzhledem k takto dosažené specifičnosti stanovení analyzovaných složek je i citlivost pro vybrané ionty vyšší.

Jako možné konkrétní příklady způsobu podle vynálezu lze uvést použití 1,10-fenantrolinu pro detekci iontu dvojmocného železa, neboť vzniká intenzivně červeně zbarvený chelát; s trojmocným kationtem železa pak vzniká chelát modrý. Dalším příkladem může být použití bezbarvého rhodaninu smonného ve vedoucím elektrolytu. Rhodanidový anion působí při separaci kationtů jako protilion, vytvářející s řadou z nich barevné komplexy. Výhodně lze na místě barvotvorné složky používat metalometrické indikátory a činidla, používaná běžně ke spektrofotometrickým stanovením prvků.

Výhodou způsobu detekce podle vynálezu, je i to, že přidávaná barvotvorná složka může vhodně pozměňovat efektivní pohyblivostí separených iontů. Tudiž vhodnou volbou koncentrací a složení roztoků lze docílit odseparování složek, jejichž efektivní pohyblivostí byly původně nevhodné pro rozdělení.

Kapilární elektroforéza, zejména pak isotechoforéza, s fotometrickou nebo spektrofotometrickou detekcí, aplikovanou způsobem podle vynálezu, může být využívána při provozních kontrolách, při rutinních analýzách, sledujících technologické postupy a výrobky, při analýzách širokého spektra vzorků od silikátových materiálů přes odpadní vody až po vzorky biologického původu.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob fotometrické nebo spektrofotometrické detekce složek rozdělovaných kapilární elektroforézou, zejména kapilární vytěsňovací elektroforézou měřením absorpce procházejícího světla, vyznačený tím, že se na rozdělované složky vzorku působí v separační kapiláře během separačního procesu barvotvornou složkou, tvořící se složkami vzorku sloučeniny, jejichž absorpce světla se liší od absorpce světla samotnou barvotvornou složkou.