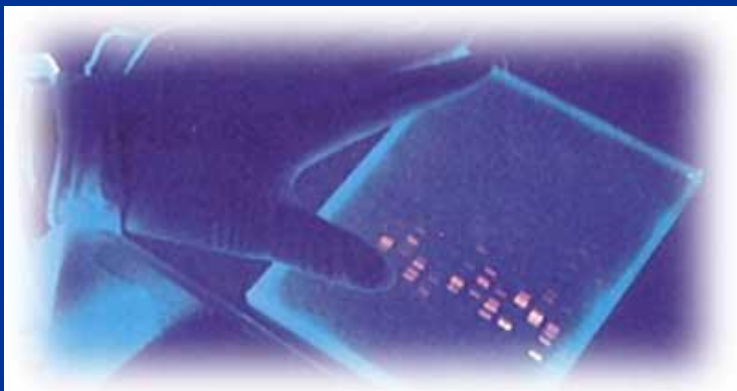


# CZEŚĆ III

## METODY ROZDZIELCZE

*Współczesne metody chromatograficzne*

### 4. Elektroforeza



# INNE METODY ROZDZIELCZE: ELEKTROFOREZA

- Technika instrumentalna wykorzystująca zjawisko migracji się cząstek koloidalnych - pod działaniem pola elektrycznego – w stosunku do nieruchomego ośrodka. Ruch ten można zaobserwować bezpośrednio (w przypadku barwnych koloidów) lub pośrednio, np. dokonując pomiarów współczynnika załamania światła czystego rozpuszczalnika i roztworu koloidalnego.
- Pierwszy raz elektroforeza została zastosowana do rozdziału mieszaniny białek przez szwedzkiego uczonego Tiseliusa, w 1930 roku, a jego prace uhonorowane zostały Nagrodą Nobla.
- Po wypełnieniu rurki (rurka w kształcie litery U) roztworem białek i umieszczeniu w jej obu końcach elektrod, połączonych z zewnętrznym źródłem napięcia, stwierdził on iż białka wędrują w kierunku elektrod z różnymi prędkościami.
- Początkowo eksperymenty prowadzone były w roztworach buforów w specjalnych U-rurkach. Jednak ze względu na znaczną konwekcję i dyfuzję, spowodowaną wydzielaniem się ciepła, osiągnano małe sprawności rozdzielania. Dopiero zastosowanie stabilizujących wypełnień, takich jak: agar, żel poliakryloamidowy, proszek celulozowy, wata szklana pozwoliło zmniejszyć niekorzystne efekty. Do dzisiaj elektroforeza planarna bibułowa i żelowa jest często stosowana do rozdzielania biomolekuł.
- Prawdziwy przełom w rozwoju elektroforezy kapilarnej nastąpił w 1981 roku, kiedy ukazały się prace Jorgensona i Lukacsa. Datę tę uznaje się za początek wysoko sprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE). Zastosowanie kapilar o średnicach 75  $\mu\text{m}$  znacznie ograniczyło wpływ wydzielanego ciepła nawet przy stosowaniu napięcia rzędu 30 kV i pozwoliło uzyskać wysokie sprawności.

## Podział metod elektroforetycznych:

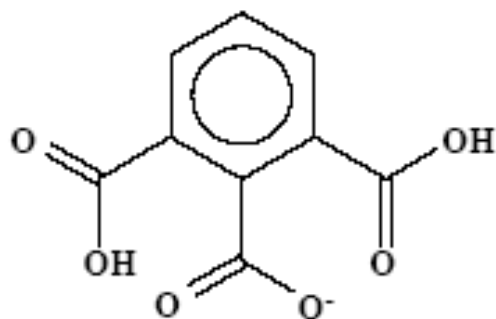
- **Objętościowa** – historyczna
- **Planarna (bibułowa, żelowa)** – cienka warstwa o długości 2-10cm, raczej powolna, prosta lecz trudna w automatyzacji, mało dokładna, duże objętości rozdzielane (mikro litry)
- **Kapilarna** – cienkie kapilary o średnicach 25-75 mikro metrów długości 40-100 cm, wypełnione buforem elektrolitycznym, bardzo szybkie, skomplikowana technologia lecz łatwe w automatyzacji, bardzo dobra rozdzielczość, małe objętości rozdzielana ( nano litry)
- **Elektroosmotyczna** – ruch całej objętości roztworu wzdłuż naładowanej powierzchni pod wpływem pola elektrycznego

## PODSTAWY FIZYCZNE

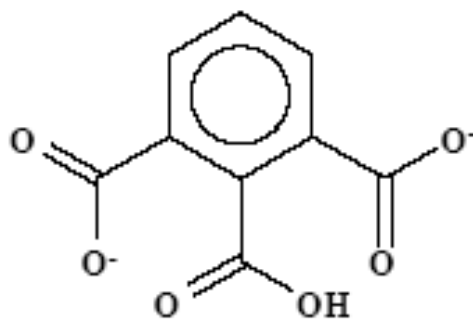
Podstawowa charakterystyka: ruchliwość elektroforetyczna określająca prędkość przemieszczania się cząstek na jednostkę natężenia pola:

$$V = \mu_{ef} E$$

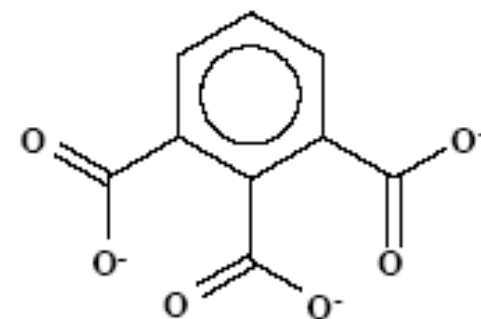
$\mu_{ef}$  - ruchliwość elektroforetyczna (C·s/kg)  
V - prędkość cząstki (m/s)  
E - natężenie pola elektrycznego (N/C)



$$\mu_{ep} = -2.54 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$$



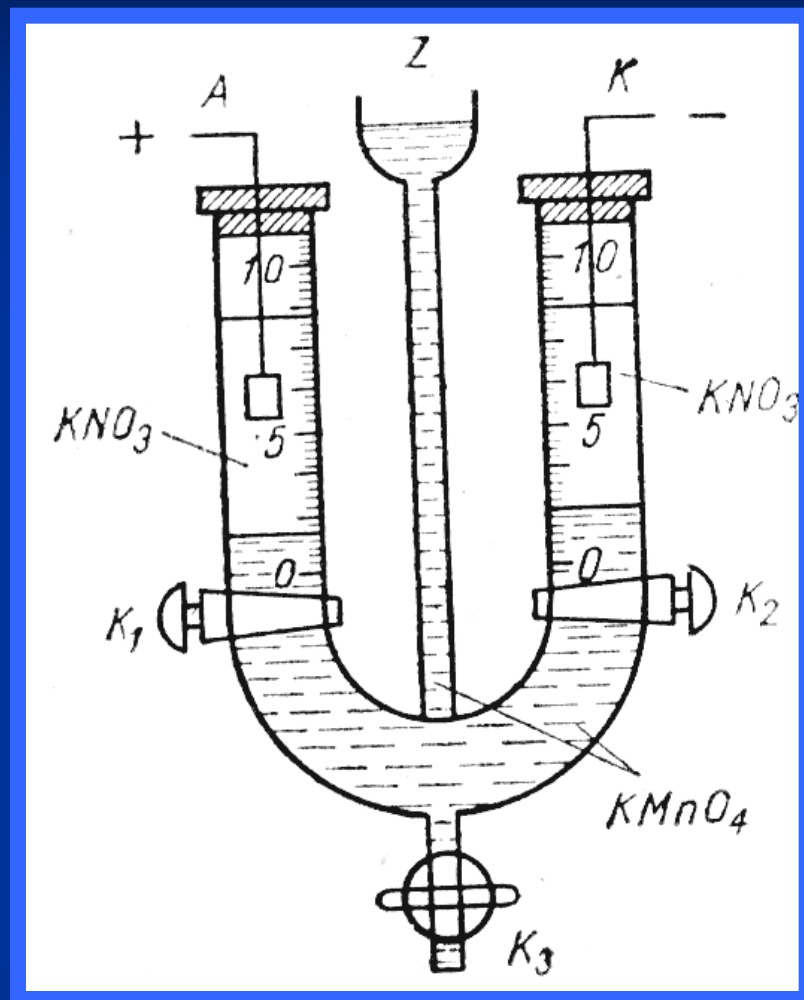
$$\mu_{ep} = -4.69 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$$



$$\mu_{ep} = -5.95 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$$

## Aparat Cohena

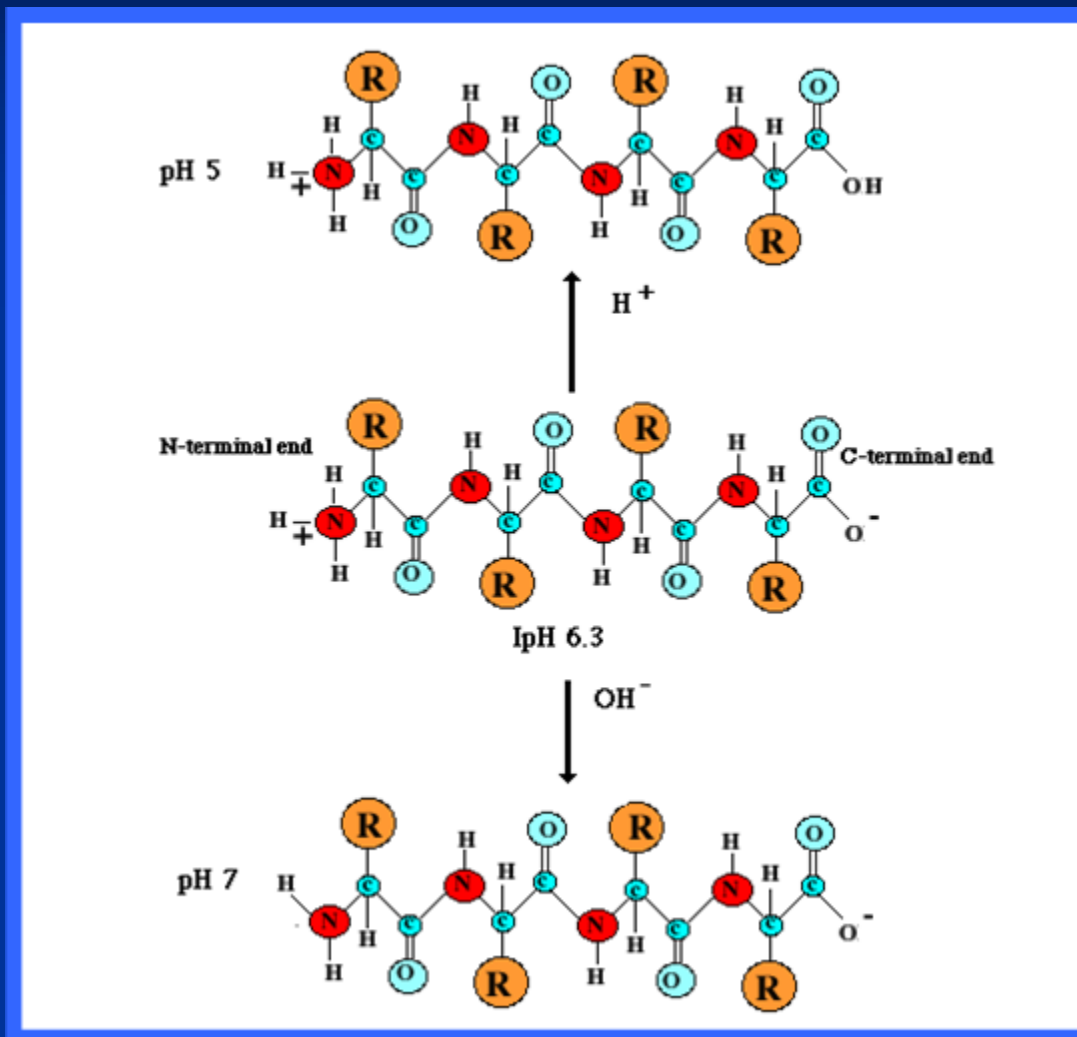
Jeśli w dolnej części U-rurki aparatu Cohena znajdzie się pewna objętość roztworu nadmanganianu potasowego, a nad tym roztworem umieści się bardzo ostrożnie bezbarwny roztwór azotanu potasowego, w którym zanurzy się elektrody i połączy je ze źródłem prądu stałego, to łatwo wówczas zauważyć, że granica między jedną cieczą a drugą ulegnie przesunięciu. W kierunku anody (A) poruszają się barwne jony  $MnO_4^-$  mające ładunek ujemny, a do katody wędrują (niewidoczne oczywiście) dodatnio naładowane jony potasowe. Za pomocą opisanego aparatu można zmierzyć prędkość z K poruszania się jonów  $MnO_4^-$  w elektrolicie, jakim jest w tym przykładzie roztwór  $KNO_3$ .

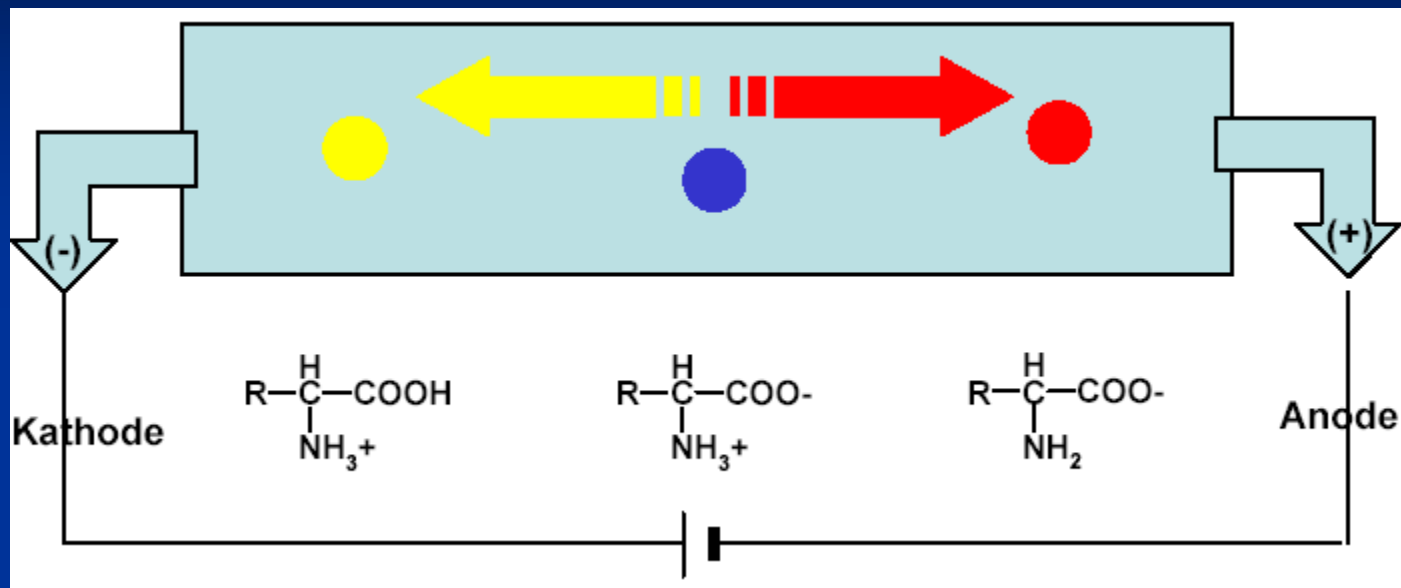


## Najważniejsze czynniki wpływające na rozdział elektroforetyczny

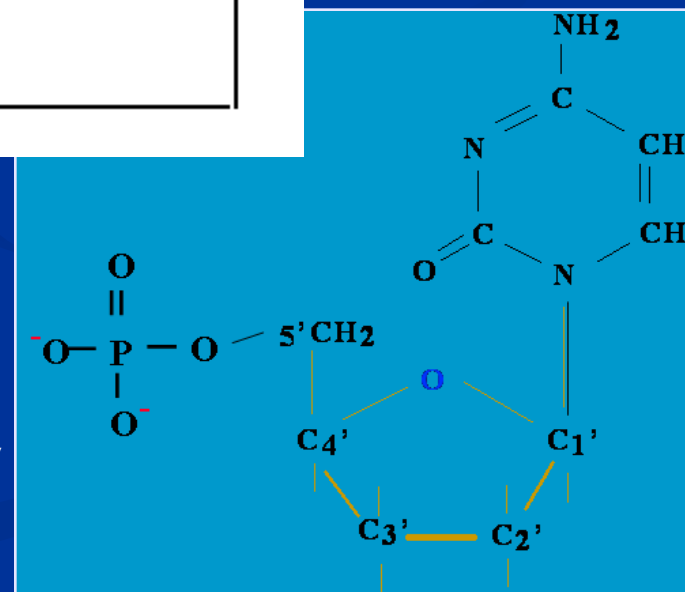
- Masa cząsteczkowa
- Ładunek
- Wielkość pola elektrycznego

Ładunki  
na  
cząsteczce  
białka

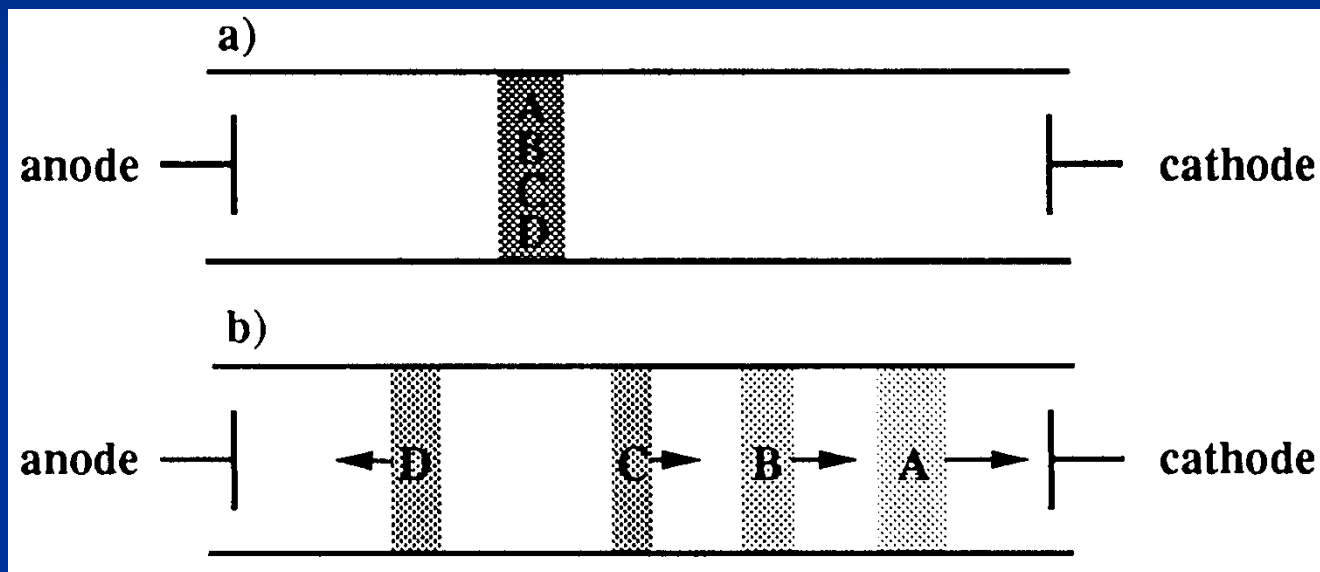




Również fragmenty DNA:  
np. CMP- monofosforan cytozyny



Jakie indywidua chemiczne mogły zostać poddane rozdziałowi elektroforetycznemu?

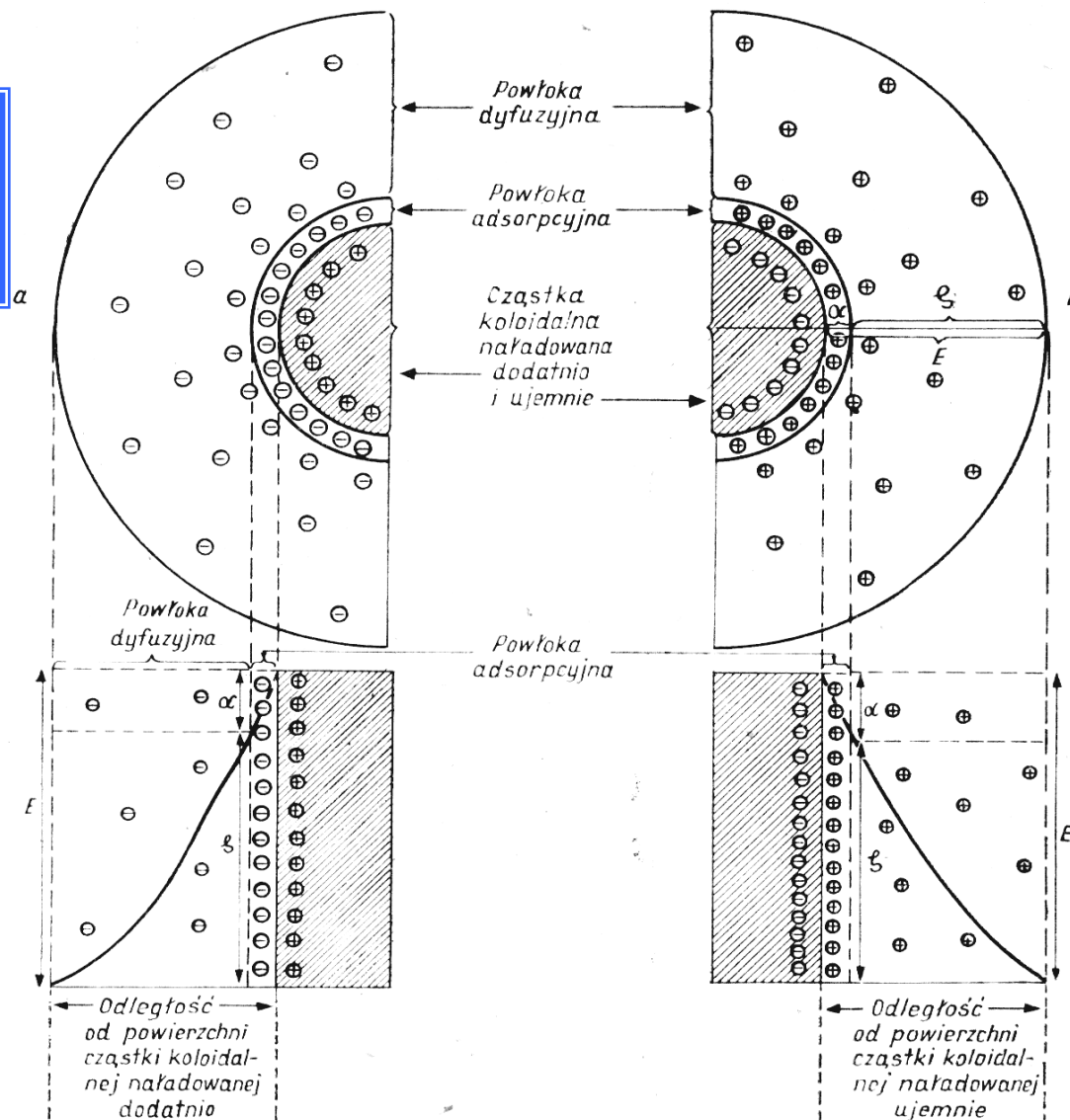




## Schemat budowy podwójnej warstwy elektrycznej

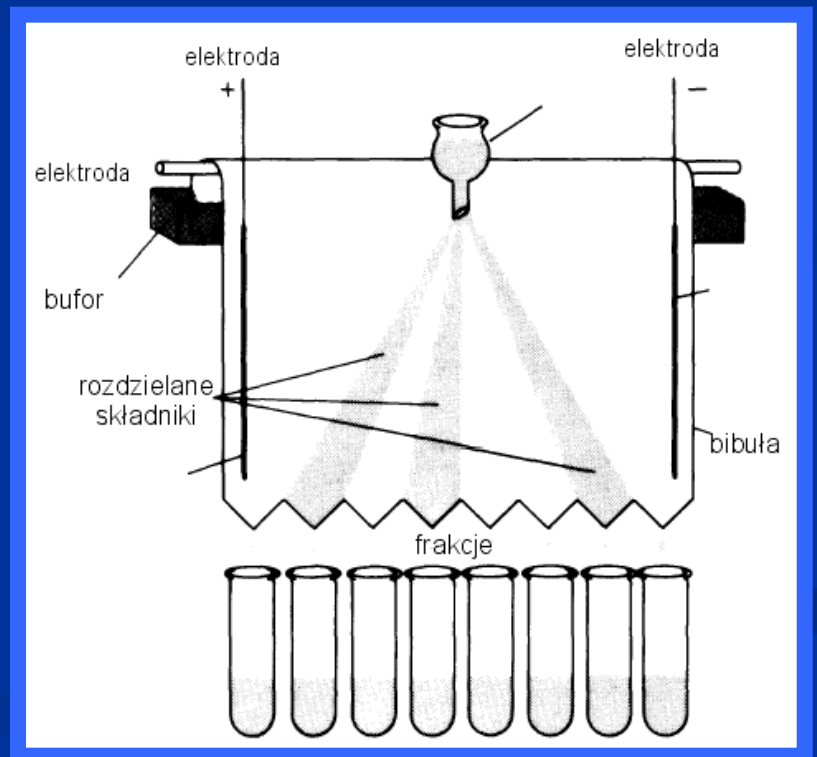
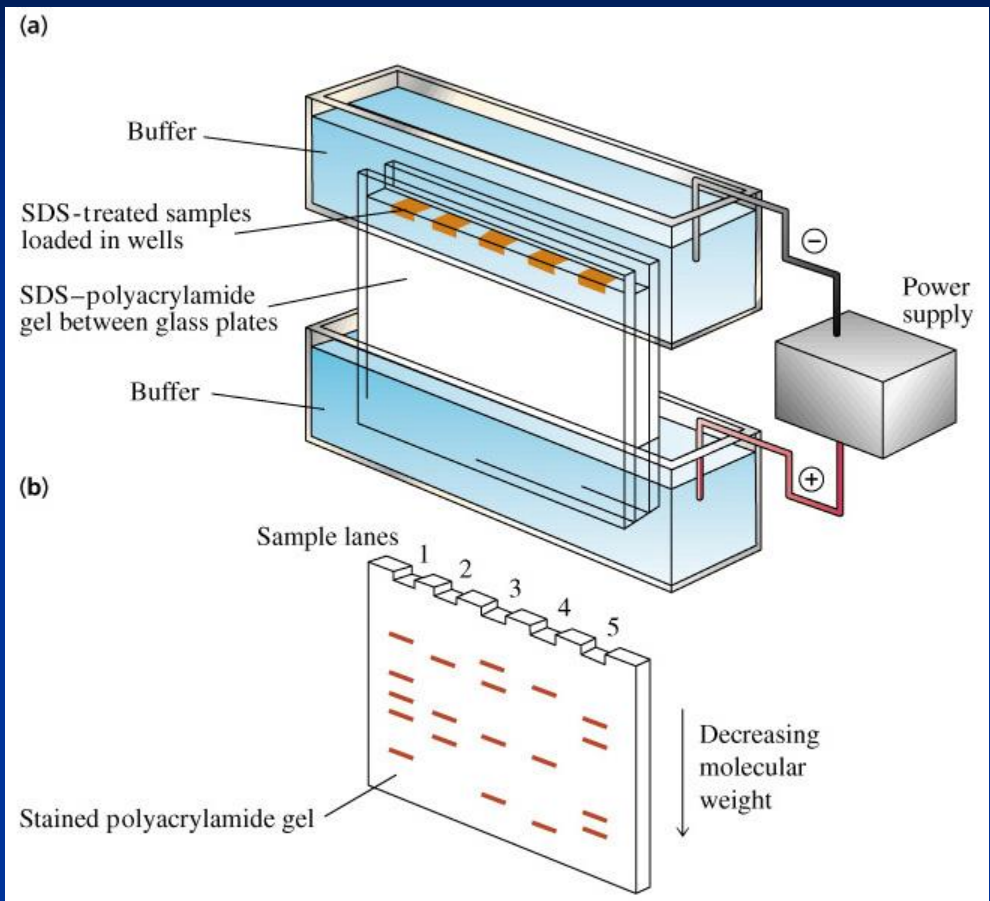
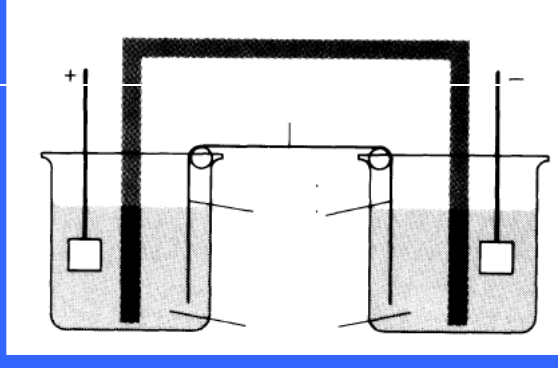
Rozkład potencjału dla cząstki koloidalnej:

a)  
naładowanej  
dodatnio



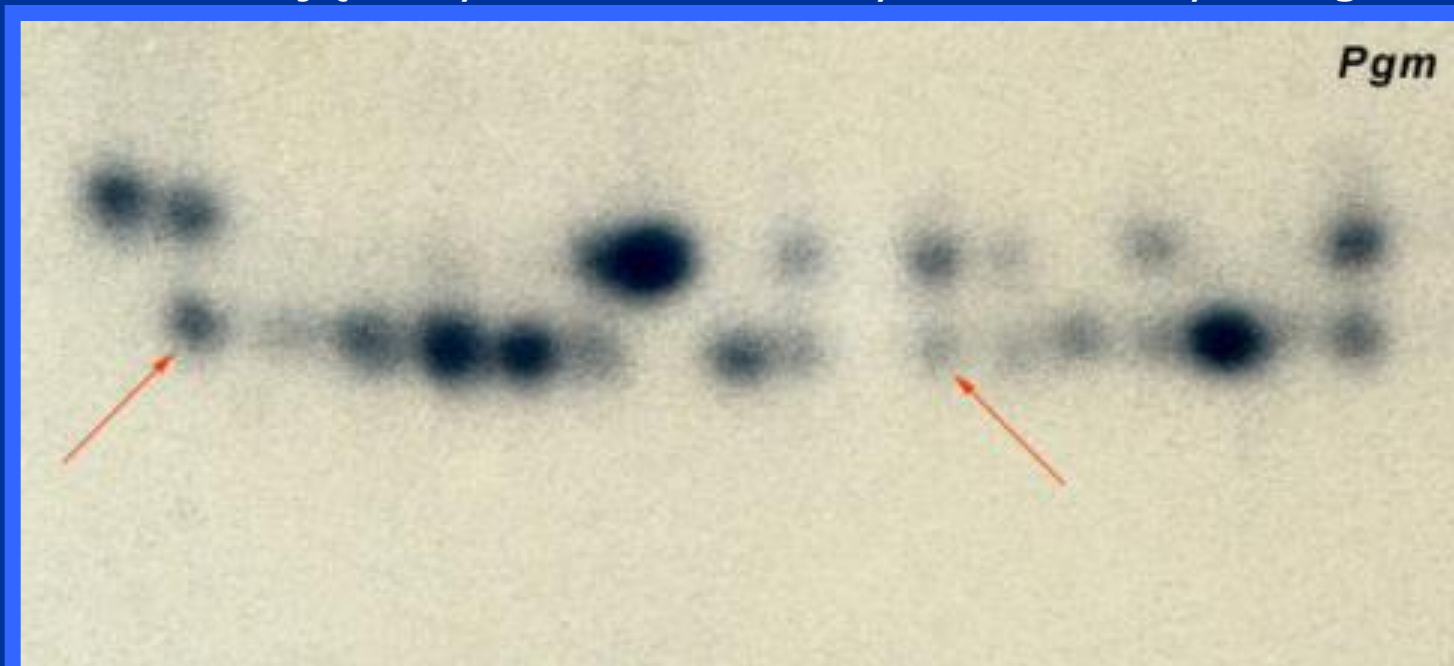
b)  
naładowanej  
ujemnie

## Elektroforeza planarna (cienkowarstwowa)

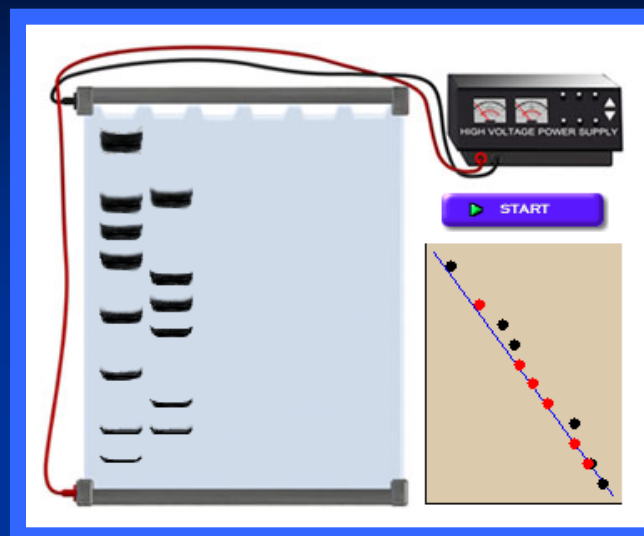
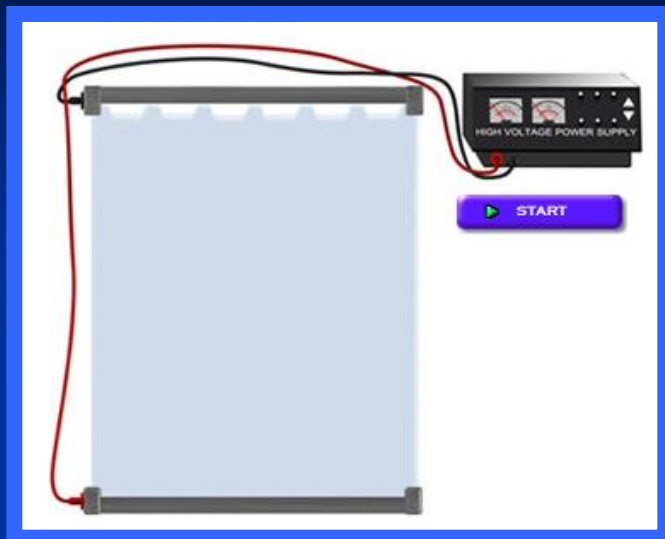


## Przykład 1

Obraz elektroforetycznego rozdziału białek w żelu skrobiowym. Rozdzielono białka pochodzące od 17 osobników motyli modraszków (*Maculinea nausithous*); na fragmencie żelu zastosowano test barwny dla enzymu - fosfoglukomutazy (*Pgm*). U osobników będących homozygotami enzym ten występuje w postaci pojedynczych prążków, u heterozygot (np. te wskazane strzałkami) tworzy dwa prążki (enzym ten jest monomerem) odpowiadające dwóm formom tego enzymu (formie wolniej i szybciej migrującej). W badanej populacji istnieją dwa allele warunkujące wykształcenie różnych form enzymu *Pgm*.



## Przykład 2 - Elektroforeza DNA

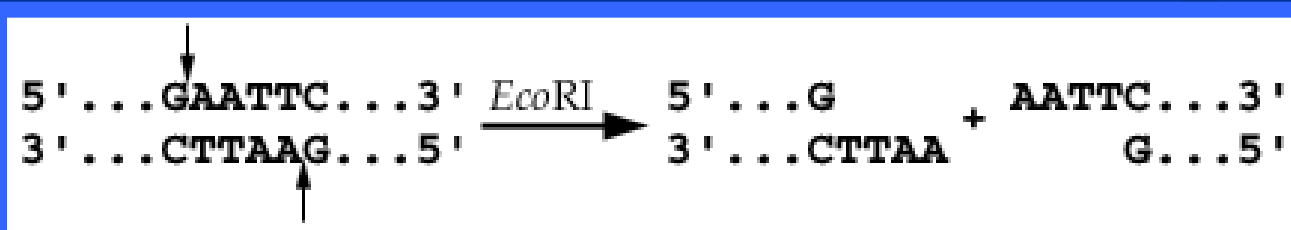


### Część I – kontrolowana hydroliza DNA

**Cel** – uzyskanie fragmentów DNA o określonej sekwencji

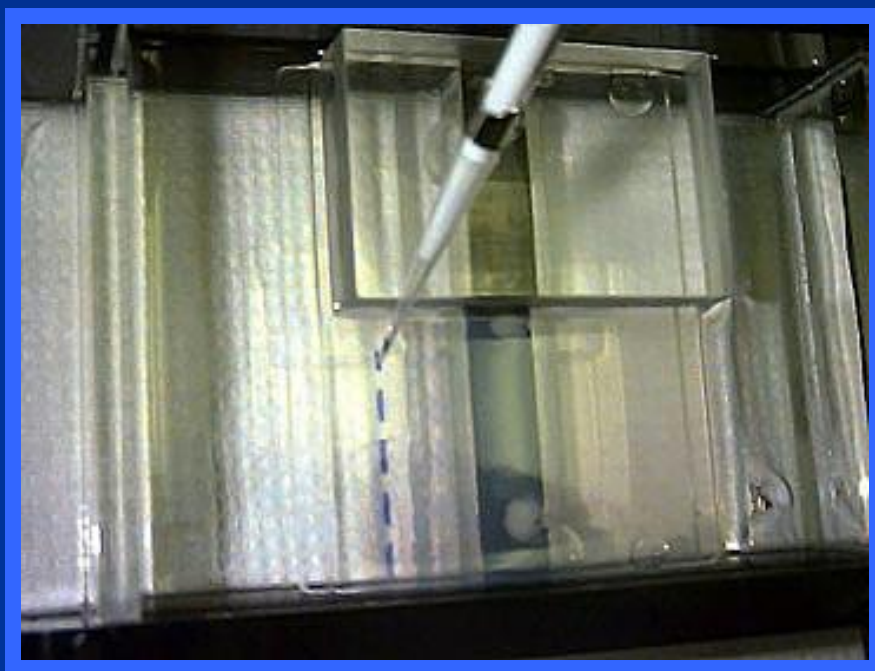
**Metoda** – hydroliza enzymatyczna w kontrolowanych warunkach: enzymy restrykcyjne, temperatura, stężenie roztworu NaCl lub MgCl<sub>2</sub>, pH (bufor)

Enzym wyszukuje fragment DNA o określonej sekwencji, przykładowo



## Część II – rozdział elektroforetyczny

Nanoszenie próbki



Rozdział: ok. 30 minut 100V

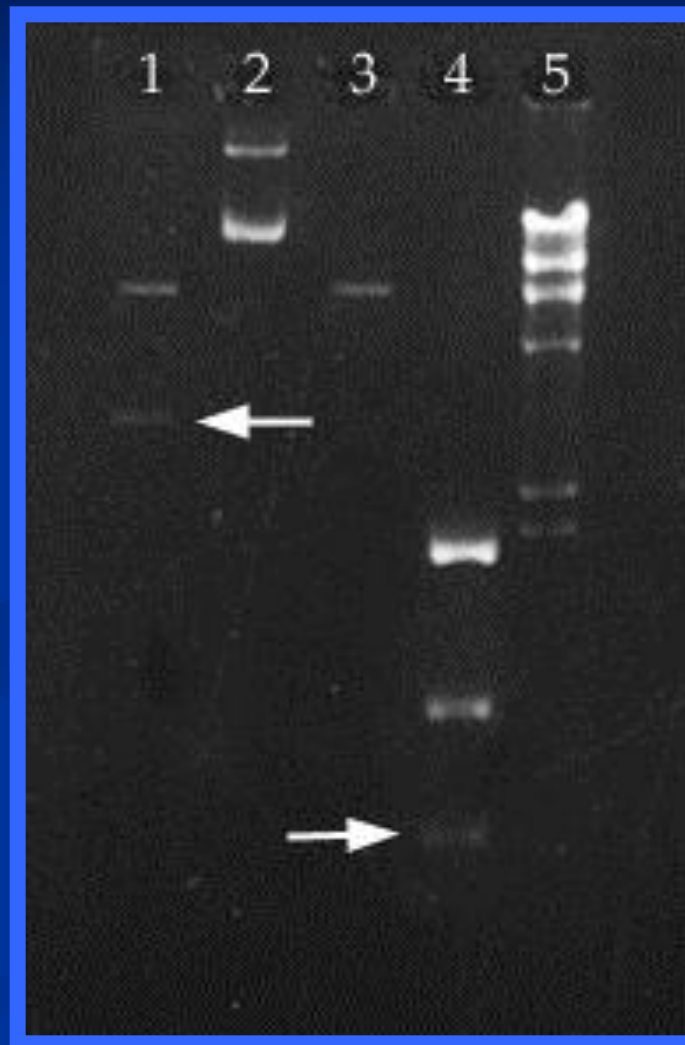


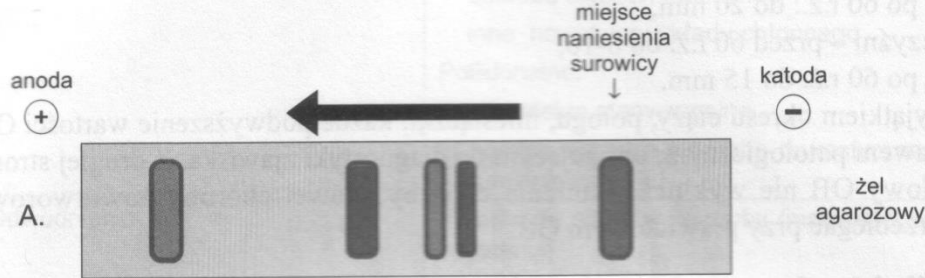
## Identyfikacja:

Naświetlanie UV w obecności interkalatora **Ethidium Bromide** (EtBr), który silnie oddziałuje z fragmentami DNA (minor groove). EtBr naświetlany wykazuje silną fluorescencję



## Interpretacja:

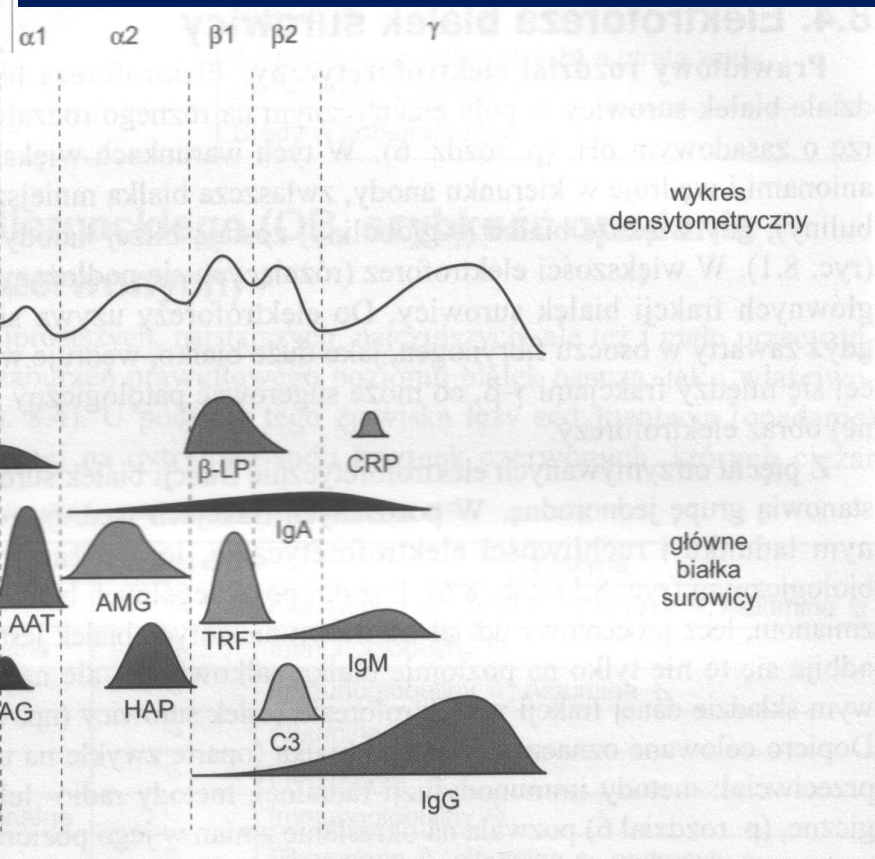




### Przykład 3:

Rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi:

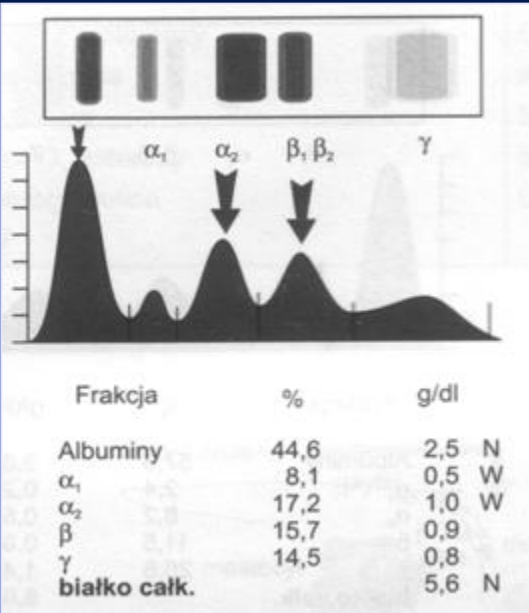
- a/ odczyt densytometryczny, pozwalający na określenie składu ilościowego frakcji
- b/ diagram rozmieszczenia poszczególnych białek we frakcjach



ALB - Albuminy  
 $\alpha$ -LP -  $\alpha$ -lipoproteiny  
 $\beta$ -LP -  $\beta$ -lipoproteiny  
 AAT -  $\alpha$ -antytrypsyna  
 AAG -  $\alpha$ -kwaśna glikoproteina  
 AMG -  $\alpha$ -makroglobulina  
 HAP - haptoglobina

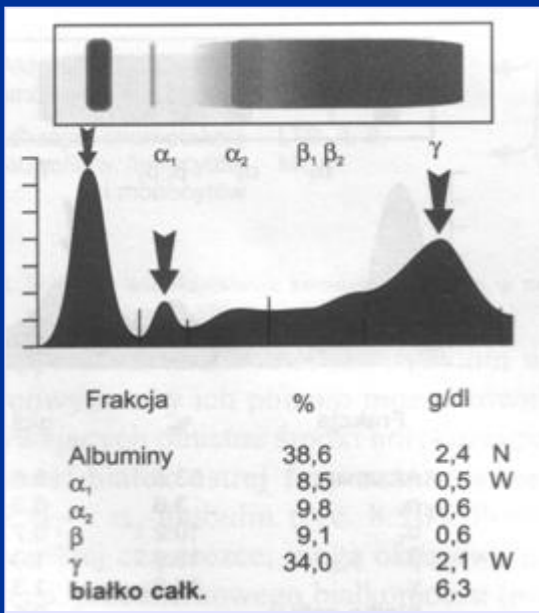
TRF - transferyna  
 IgA - immunoglobuliny klasy A  
 IgM - immunoglobuliny klasy M  
 IgG - immunoglobuliny klasy G  
 C3 - składnik komplementu  
 CRP - białko C-reaktywne

## Przykłady patologicznych proteinogramów

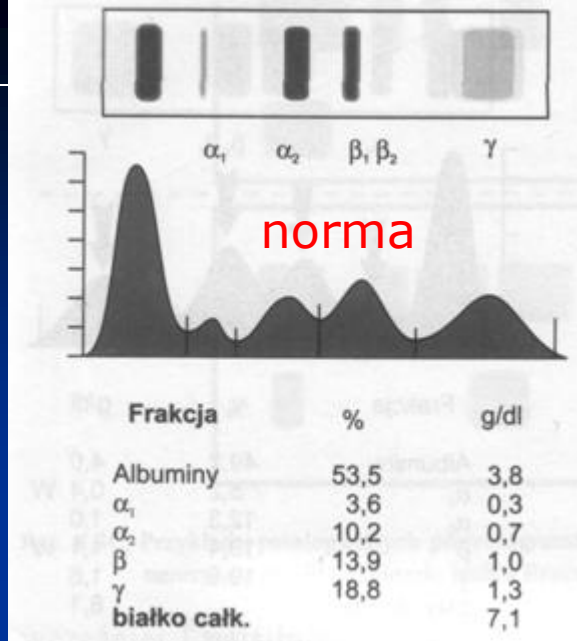
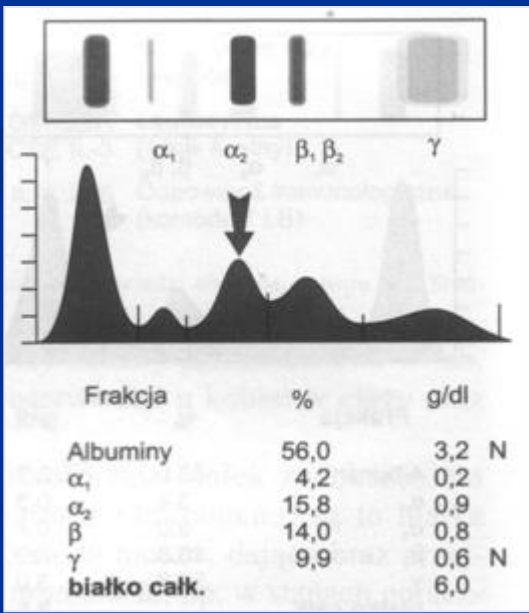


Ostry stan zapalny

Marskość wątroby



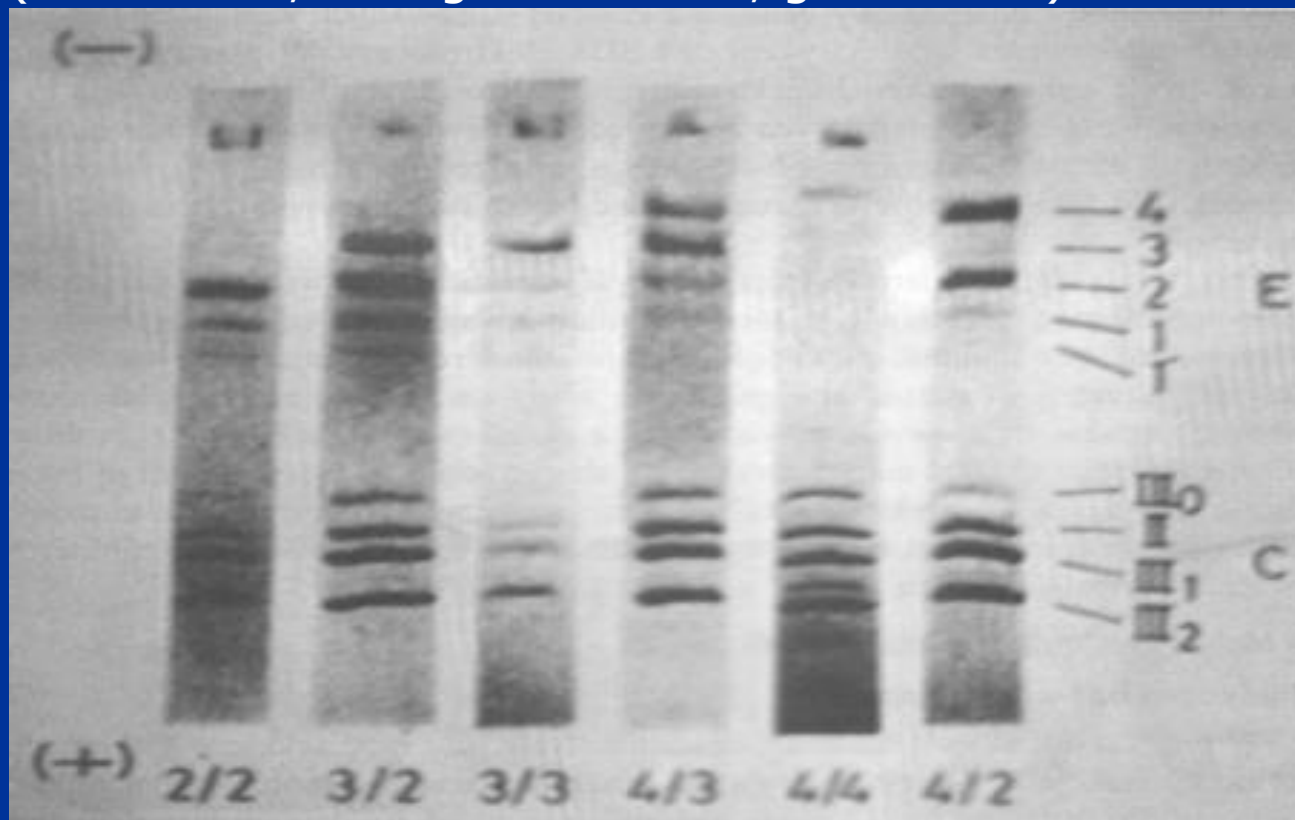
Zespół nerczycowy





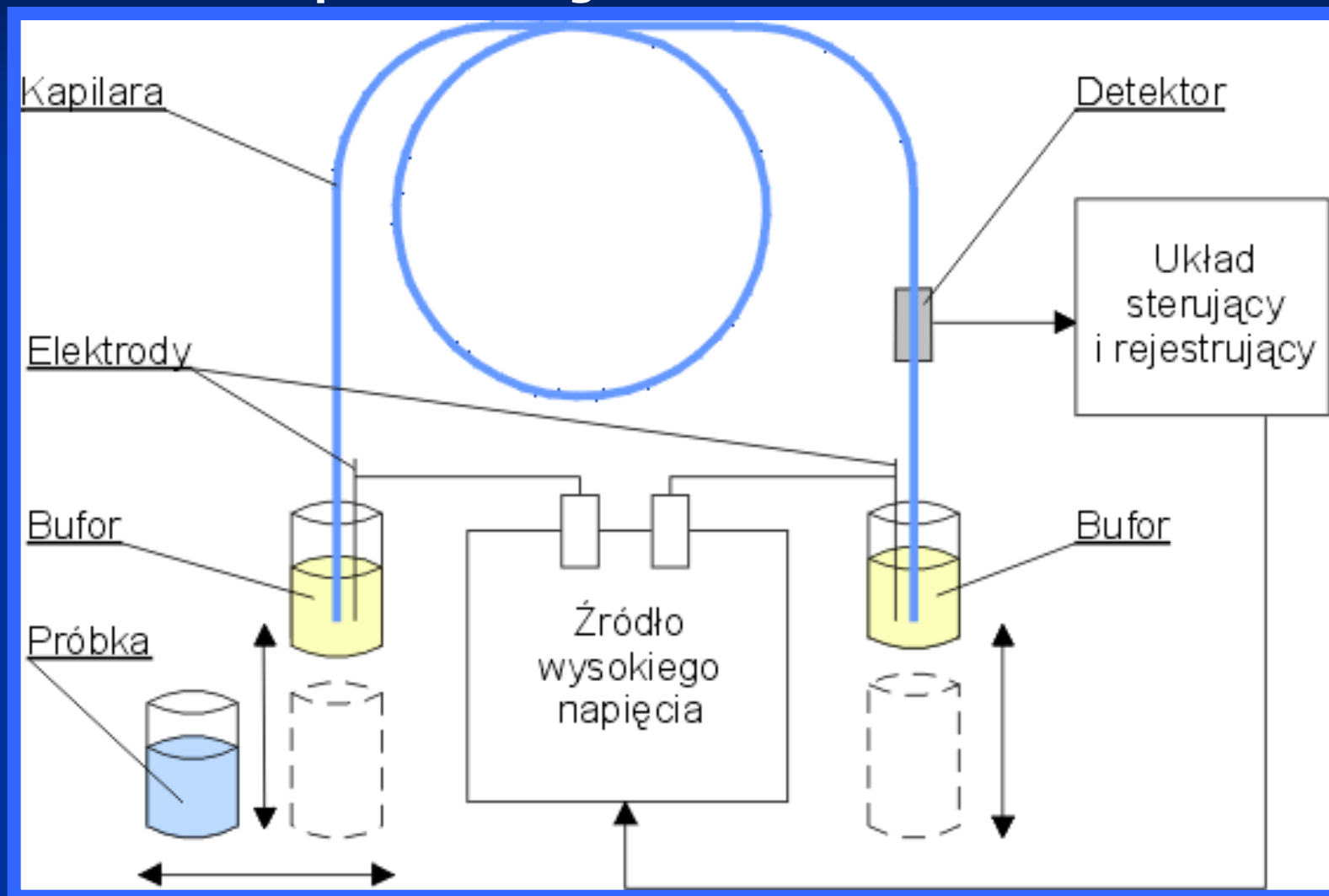
## Ogniskowanie izoelektryczne

Jest techniką o wysokiej rozdzielczości pozwalająca na rozdział białek o złożonej budowie (rozdzielenie wariantów genetycznych tego samego białka np: lipoprotein E i C, oznaczenie białka Hirschvelda GC). Służy do analizy i rozdzielenia enzymów czerwonych (Esteraza D, fosfoglukomutaza, glioksalaza)



## Elektroforeza kapilarna

### Schemat układu pomiarowego



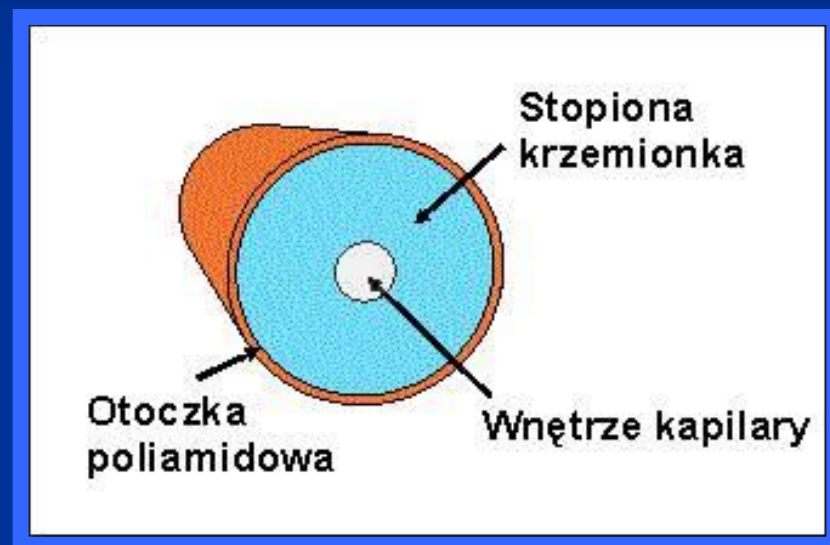
**1. Kapilary** - najczęściej stosowane są kapilary ze stopionej krzemionki, pokryte poliimidową warstwą ochronną, o średnicy wewnętrznej 10-100  $\mu\text{m}$  (350-400  $\mu\text{m}$  średnica zewnętrzna) i długości od 20 do 100 cm. Końce kapilary umieszczone są w pojemnikach (o objętości kilku ml) wypełnionych odpowiednim buforem.

Kapilara termostatowana jest za pomocą obiegu powietrza lub płynu chłodzącego.

**2. Zasilacze wysokiego napięcia** - wysokie napięcie rzędu 5-30 kV przykładane jest do końców kapilary za pomocą dwóch elektrod platynowych umieszczonych w pojemnikach z buforem.

**3. System do wprowadzania próbek**

**4. Detektor**



Przekrój poprzeczny kapilary ze stopionej krzemionki

Całkowita objętość stosowanych kapilar wynosi kilka mikrolitrów. Aby uniknąć przeładowania, długość strefy próbki nie może być większa niż 1-2% całkowitej długości kapilary, co odpowiada objętości 1-50 nl.

## Podstawy fizyczne rozdziału

- Podstawą rozdziału w elektroforezie kapilarnej są różnice w ruchliwościach elektroforetycznych oznaczanych analitów - jony w polu elektrycznym poruszają się z różną prędkością  $v_e$

$$v_e = \mu_e E$$

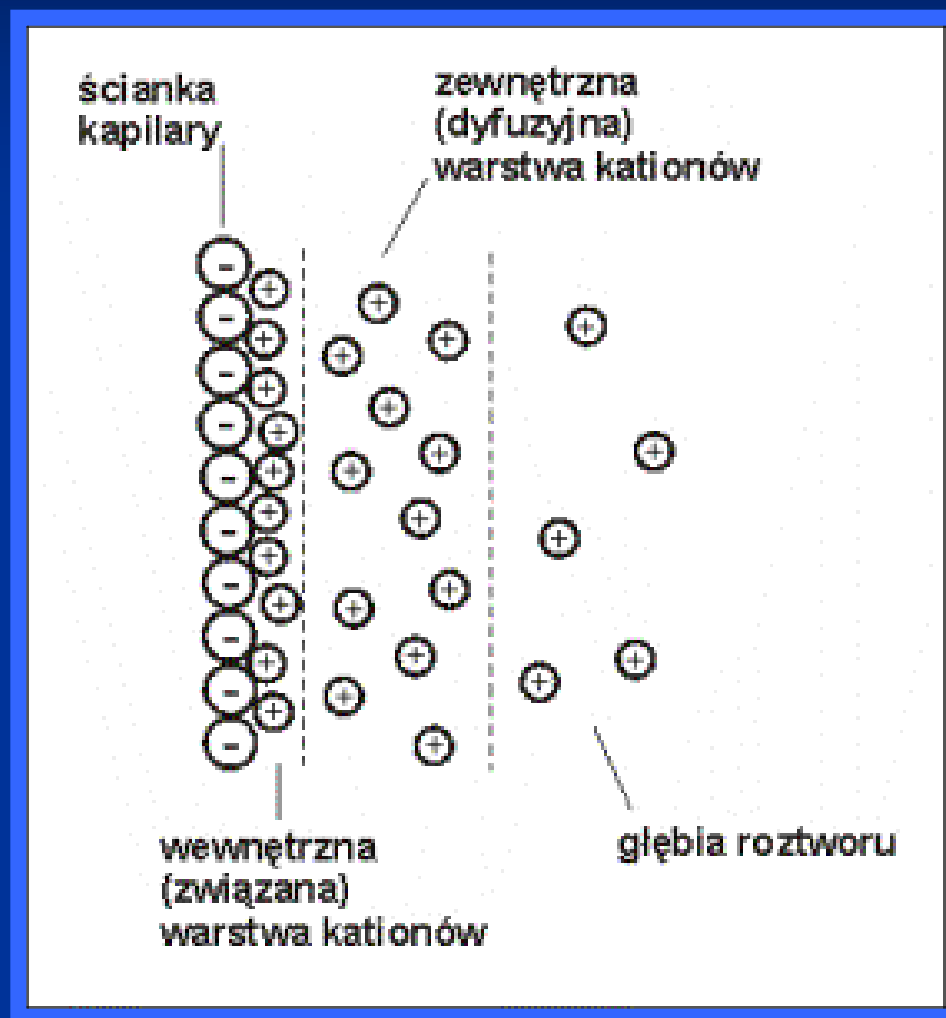
$\mu_e$  - ruchliwość elektroforetyczna  
E - natężenie pola elektrycznego, które jest funkcją przyłożonego napięcia i długości kapilary.

- Ruchliwość elektroforetyczna w danym roztworze jest wielkością charakterystyczną dla danego jonu i zależy od jego ładunku, promienia i właściwości buforu (pH, lepkości i siły jonowej oraz składu)

- Dobierając odpowiedni skład buforu, możliwe jest kontrolowanie selektywności rozdzielania przez zmianę ruchliwości analitów. Wzrost stężenia i siły jonowej buforu powoduje zmniejszenie ruchliwości jonów, a dodatek organicznych rozpuszczalników (np. metanolu) zmienia lepkość.

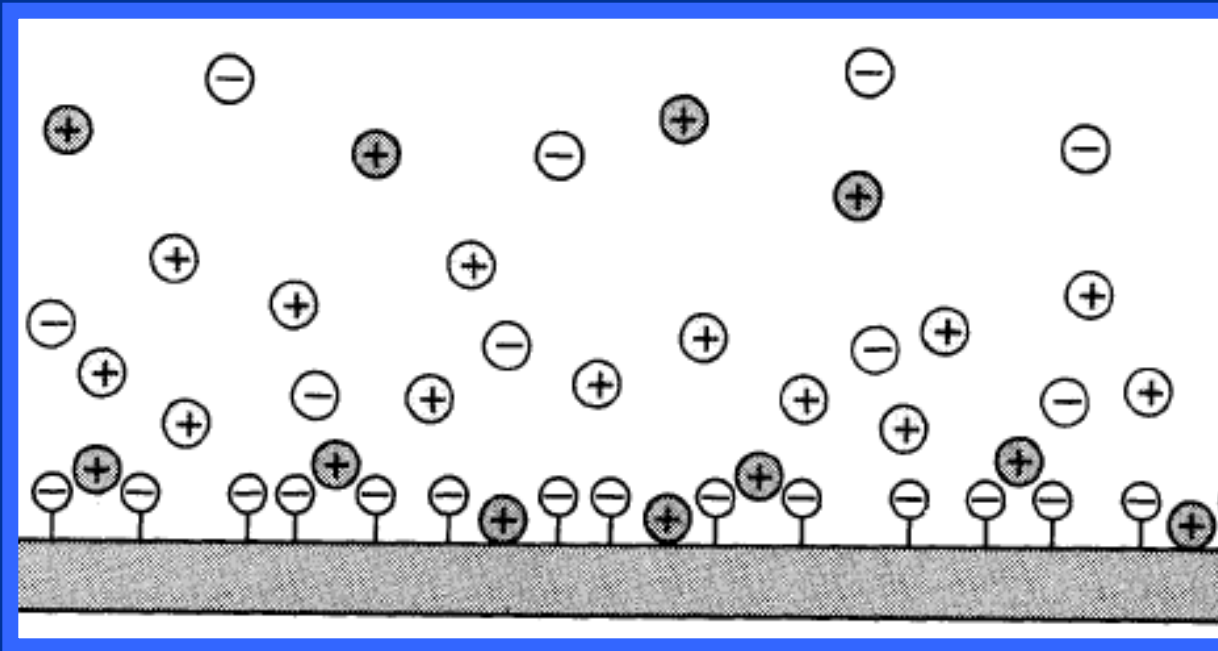
## Migracja jonów w kapilarze

Schemat podwójnej warstwy elektrycznej powstającej przy ścianie kapilary.



## Elektroosmoza

Początek procesu rozdzielczego

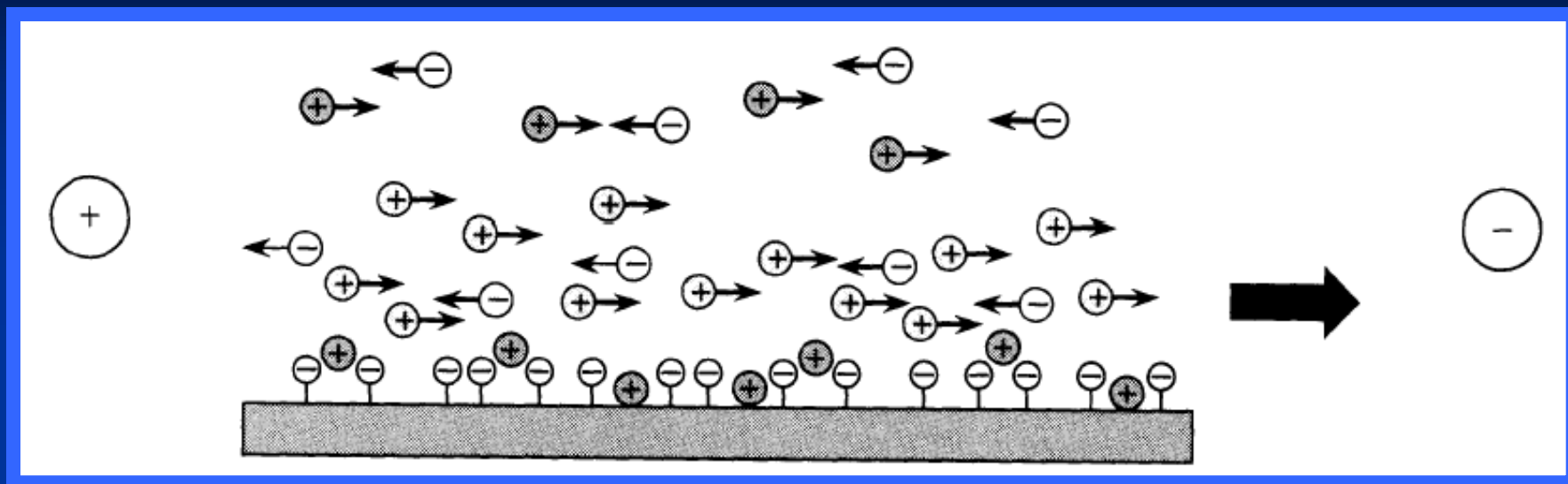


Faza objętościowa  
(jednakowe stężenie  
kationów i anionów)

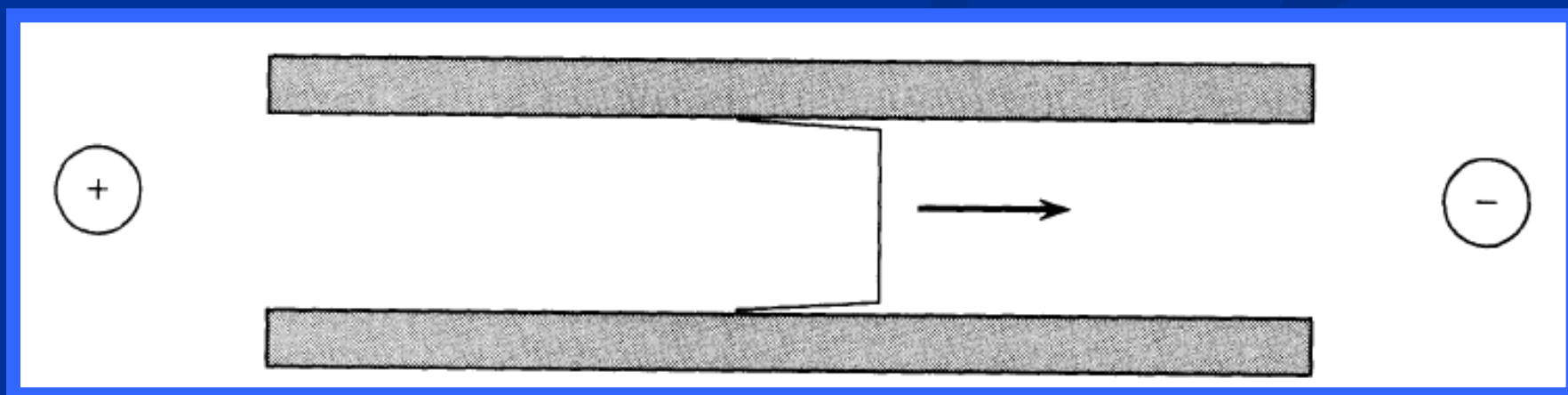
Warstwa podwójna  
wzbogacona o jeden  
rodzaj jonów  
(np. kationy)

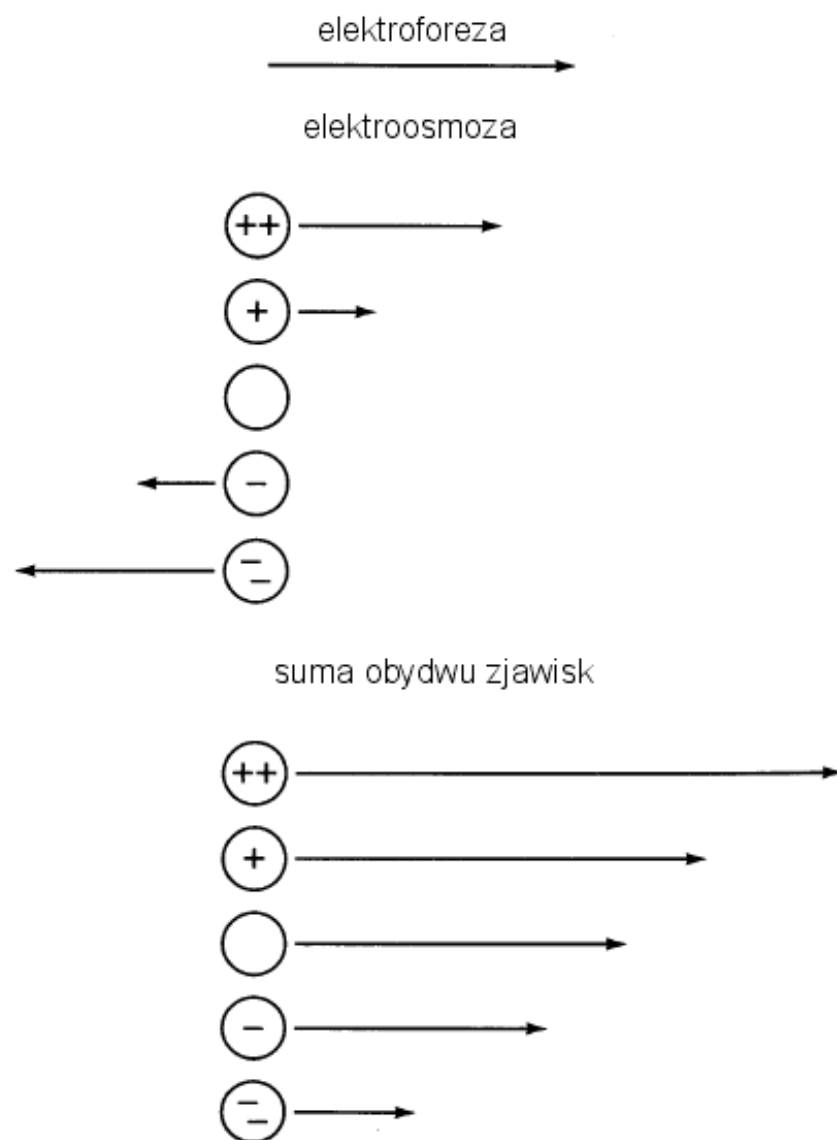
Warstwa jonitowa (żel  
z aktywnymi grupami  
np. anionowymi)

Rozdział elektroosmotyczny:



profil prędkości w trakcie elektroosmozy:

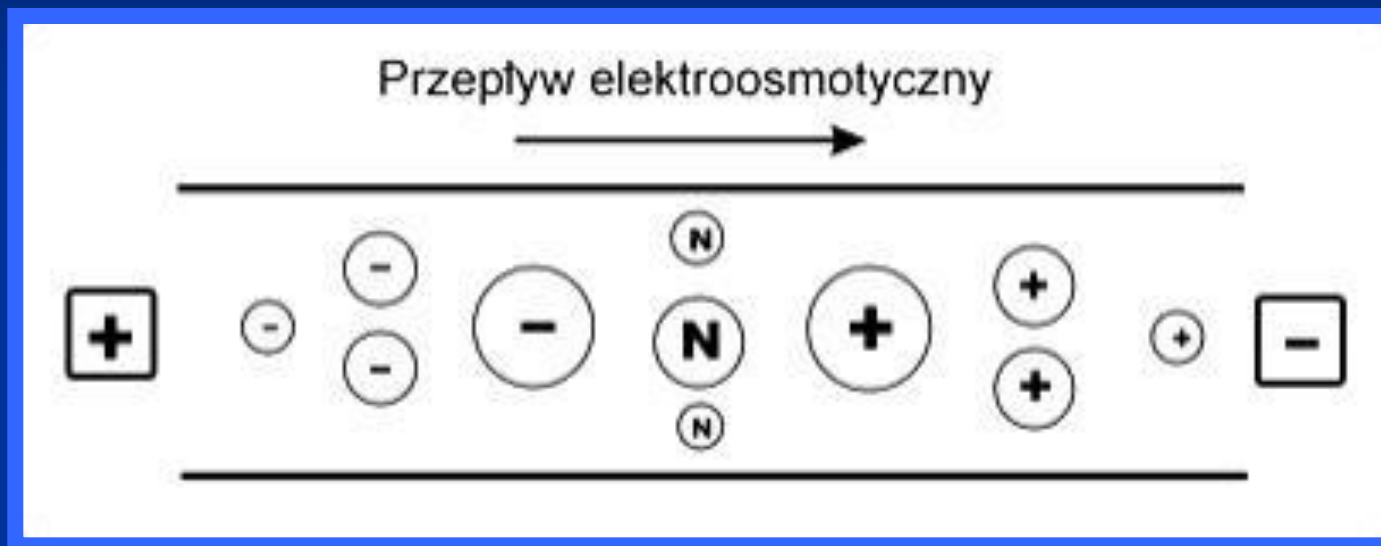




**Istota rozdziału w metodach elektroosmotycznych**



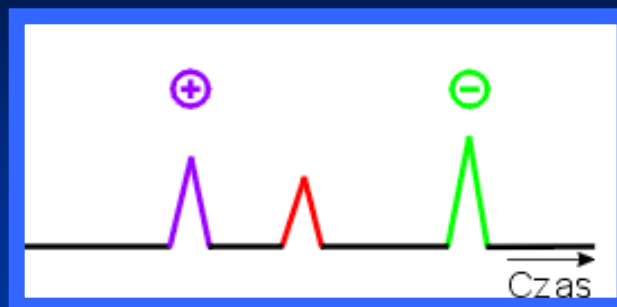
Kolejność w jakiej rozdzielane cząsteczki poruszają się w kierunku katody.



Najpierw małe obdarzone dużym ładunkiem kationy, następnie większe kationy o mniejszym ładunku, dalej nierozdzielone cząsteczki obojętne, duże aniony o małym ładunku na koniec małe aniony posiadające duży ładunek elektryczny

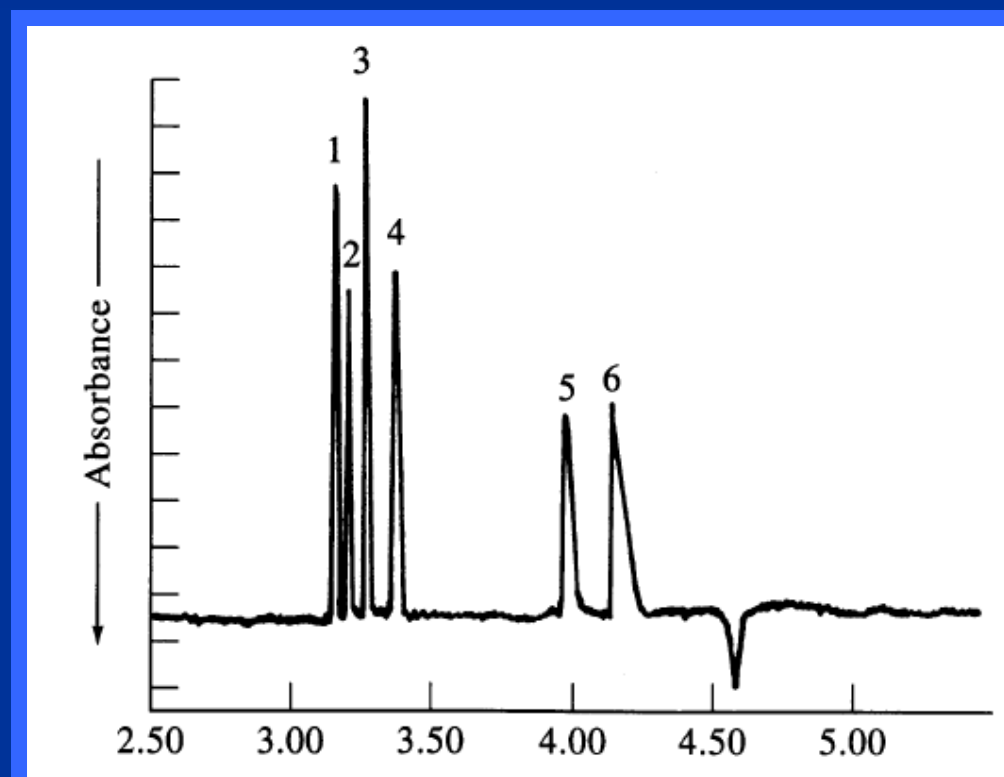
## Rejestrowany sygnał

Anoda



Katoda

## Elektroforogram



## PARAMETRY ANALITYCZNE OPISUJĄCE ROZDZIELENIE

Poszczególne składniki próbki poruszają się w kapilarze wypełnionej jednorodnym buforem z różną prędkością w postaci wąskich stref. Czas, w jakim oznaczany składnik próbki dociera do detektora, nazywany jest czasem migracji:

$$t_m = I L / \mu V$$

gdzie:  $\mu = \mu_e + \mu_{EOF}$

I - efektywna długość kapilary (do detektora)

L - całkowita długość kapilary

Sprawność rozdzielania podobnie jak w chromatografii opisywana jest liczbą pól teoretycznych:

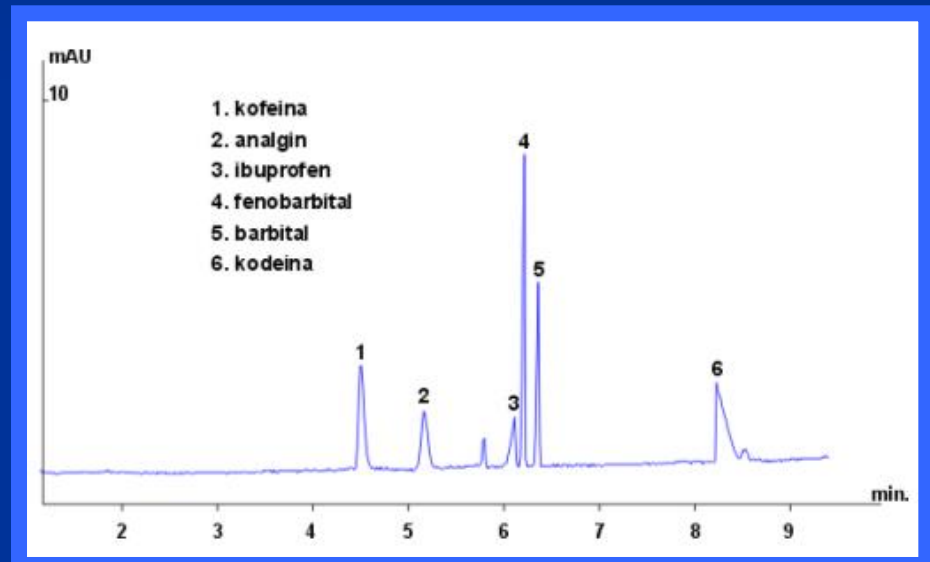
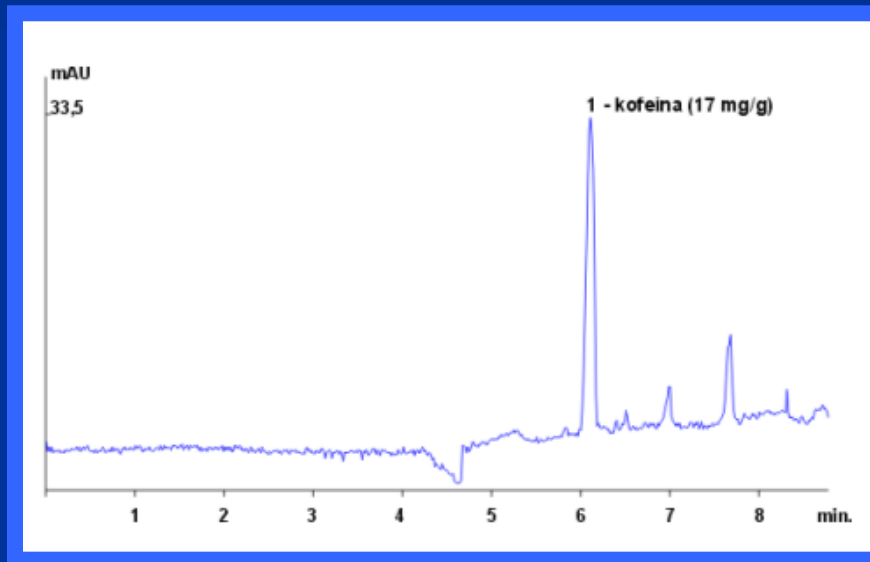
$$N = \mu V / 2D$$

## Główne zalety elektroforezy kapilarnej

- **Niezwykłe wysokie sprawności;**
- **Małe zużycie odczynników i rozpuszczalników organicznych;**
- **Małe objętości próbek;**
- **Krótkie czasy analiz;**
- **Możliwość prowadzenia pomiarów w szerokim zakresie pH;**
- **Możliwość jednoczesnego oznaczania kationów i anionów;**
- **Niskie koszty;**
- **Małe objętości powstających ścieków;**
- **Szerokie zastosowanie.**

## Przykłady zastosowań

### Przykład 1 Oznaczanie kofeiny w kawie rozpuszczalnej



## Przykład 2: Oznaczanie anionów w wodzie

