

8

ELEKTROFOREZA

Zagadnienia teoretyczne

Układy koloidalne. Podział zoli. Budowa cząstki koloidalnej (miceli) koloidu fazowego, cząsteczkowego i asocjacyjnego. Właściwości elektryczne zoli, potencjał elektrokinetyczny, ζ . Elektroforeza i inne efekty elektrokinetyczne (elektroosmoza, potencjał przepływu, potencjał sedymentacji). Wpływ różnych czynników na prędkość migracji elektroforetycznej i elektroosmotycznej. Wykorzystanie efektów elektrokinetycznych w procesie separacji. Dializa. Równowagi Donnana.

Sprawdzono w roku 2017 przez A.Klimek-Turek

Właściwości elektryczne koloidów

W roztworze koloidalnym na granicy fazy stałej i ciekłej, tzn. granicy występującej pomiędzy powierzchnią cząstki koloidalnej i roztworem ciekłym występuje strefa, która nazywana jest obszarem międzyfazowym (strefą międzyfazową). Ze skryptu dotyczącego Ćw. Nr 6 (Koloidy) można dowiedzieć się, że w takim obszarze ma miejsce proces adsorpcji składników roztworu. Dla zoli istotnym czynnikiem jest adsorpcja jonów na powierzchni cząstki koloidalnej. Adsorpcja ta jest odpowiedzialna za powstawanie ładunku na powierzchni cząstki i w wyniku tego istnieje podwójna warstwa elektryczna. Według Sterna w przypadku koloidów hydrofobowych podwójna warstwa elektryczna jest złożona z dwóch części. Jedną część stanowi warstwa jonów trwale z nią związanych. Oznacza to, że warstwa ta może przemieszczać się razem z cząstką koloidalną. Drugą część stanowi warstwa dyfuzyjna o znacznie większej grubości, w której znajdują się w przeważającej ilości jony o znaku przeciwnym do jonów z warstwy adsorpcyjnej (porównaj tekst Ćw. Nr 6). Warstwa dyfuzyjna nie przemieszcza się z razem cząstką koloidalną. Schematyczne przedstawienie modelu podwójnej warstwy elektrycznej jest uwidocznione na rys. 2, Ćw. Nr 6, na przykładzie zolu jodku srebra. Obecność podwójnej warstwy elektrycznej jest odpowiedzialna za powstawanie różnicy (skoku) potencjału pomiędzy powierzchnią cząstki koloidalnej i roztworem (jego głębią). Skok ten jest zilustrowany na rysunku jako funkcja odległości od powierzchni cząstki koloidalnej, rys. 5, Ćw. Nr 6. Wartość różnicy potencjału zmniejsza się w miarę oddalania się od powierzchni cząstki i spada do zera w głębi roztworu. Dla cząstki koloidalnej charakterystyczną wartością jest różnica potencjału (skok potencjału) występująca w warstwie dyfuzyjnej. Nazywana jest ona potencjałem elektrokinetycznym. Na rys. 5, Ćw. Nr 6, potencjał elektrokinetyczny jest zaznaczony

grecką literą zeta, ζ . Jego wartość rośnie z gęstością ładunku, σ , zgromadzonego na powierzchni cząstki i z grubością podwójnej warstwy elektrycznej, δ , a maleje ze wzrostem przenikalności elektrycznej ośrodka zgodnie z równaniem:

$$\zeta = \frac{\sigma \cdot \delta}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (1)$$

gdzie: ε_0 jest przenikalnością elektryczną próżni, ε_r jest stałą dielektryczną roztworu.

W odróżnieniu od potencjału elektrokinetycznego potencjał Nernsta, ψ , dotyczy wartości jego skoku pomiędzy powierzchnią fazy stałej i roztworem, dlatego jego wartość jest większa od potencjału elektrokinetycznego.

Podwójna warstwa elektryczna i wartość potencjału elektrokinetycznego są odpowiedzialne za występowanie wielu właściwości układów koloidalnych, związanych z przemieszczaniem się naładowanej cząstki koloidalnej w roztworze. Należą do nich: elektroforeza, elektroosmoza, potencjał przepływu, potencjał sedymentacji, równowaga Donnana. Niektóre z nich są poniżej bardziej szczegółowo przedstawione.

Elektroforeza

Ruch cząstek, obdarzonych ładunkiem elektrycznym, względem fazy ciekłej (roztworu) w polu elektrycznym, wytworzonym przez różnicę potencjału, nazywa się elektroforezą. Zatem w roztworze koloidalnym, w którym są zanurzone elektrody i między nimi występuje różnica potencjału, ma miejsce ruch cząstek naładowanych w kierunku do elektrody o przeciwnym ładunku. Jeżeli cząstki koloidalne posiadają ładunek ujemny, wtedy wędrują do elektrody dodatniej (anody) i proces nazywa się anaforezą. Natomiast w przypadku cząstek naładowanych dodatnio ich ruch jest skierowany w stronę katody, elektrody ujemnej, a proces ten nazywa się kataforezą. Cząstka poruszająca się w procesie elektroforezy niesie ze sobą warstwę trwale z nią związaną, a pozostała część, warstwa dyfuzyjna z nadmiarem jonów o znaku ładunku przeciwnym do jonów warstwy adsorpcyjnej, porusza się w kierunku przeciwnym. Stąd granica pomiędzy warstwą trwale związaną z cząstką koloidalną i warstwą dyfuzyjną nazywa się płaszczyzną poślizgu. Prędkość, v_{eof} , cząstek koloidalnych podczas procesu elektroforezy rośnie, gdy potencjał elektrokinetyczny, ζ , przenikalność elektryczna roztworu i natężenie pola elektrycznego, E , mają wyższe wartości. Natomiast, gdy lepkość roztworu rośnie to v_{eof} maleje. Zależność tę ilustruje równanie Smoluchowskiego:

$$v_{eof} = \frac{k \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot E \cdot \zeta}{\eta} \quad (2)$$

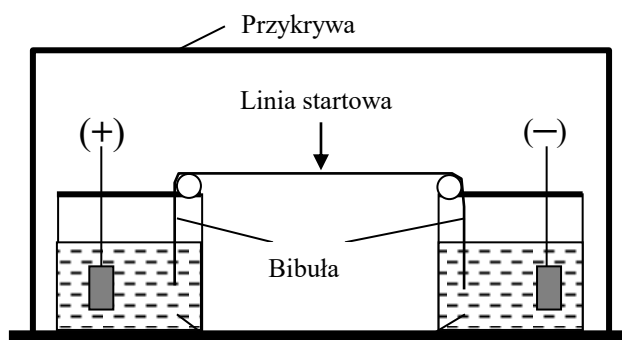
gdzie: k jest stałą zależną od kształtu cząstki.

Równanie to można przedstawić w nieco innej postaci:

$$\mu_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = \frac{k \cdot \epsilon_o \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \quad (3)$$

gdzie: μ_{eof} jest ruchliwością elektroforetyczną, tzn. prędkością cząstek koloidalnych w jednostkowym polu elektrycznym.

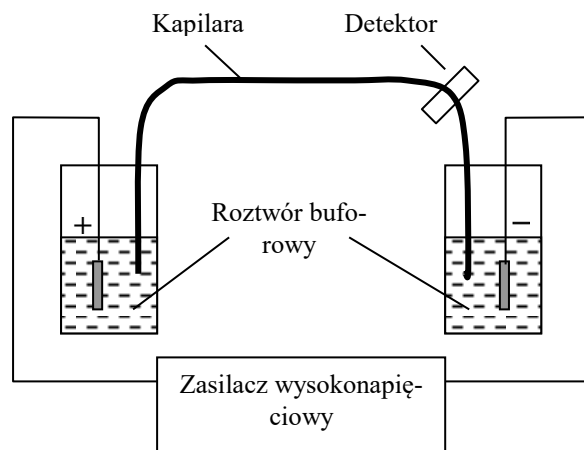
Elektroforeza znalazła olbrzymie zastosowanie w analizie biomedycznej, szczególnie do rozdzielania i określania składu ilościowego i jakościowego próbek zawierających aminokwasy, peptydy, białka, nukleotydy, kwasy nukleinowe itp., a więc substancje, które mogą występować w roztworze jako jony. Pierwsze badania nad rozdzielaniem białek przeprowadził Tiselius w aparacie do elektroforezy swobodnej w kształcie U-rurki. Rurka była wypełniana strefami roztworów koloidalnego i buforu. Po przyłożeniu różnicy potencjału do elektrod można było obserwować przemieszczanie się cząstek koloidalnych w zależności od wielkości ich ładunku i kształtu. Jednakże elektroforeza prowadzona w roztworze swobodnym charakteryzuje się bardzo małą efektywnością rozdzielania z powodu dużego udziału w rozszerzeniu stref substancji dyfuzji termicznej i konwekcji. Znaczny postęp w efektywności rozdzielania został osiągnięty, gdy do prowadzenia procesu elektroforezy została zastosowana bibuła jako nośnik. Po zwilżeniu paska bibuły odpowiednim buforem nanoszono na linię startową próbkę rozdzielanych substancji i pasek wkładano do komory do elektroforezy. Na rys. 1 jest przedstawiony uproszczony wygląd aparatu do elektroforezy bibułowej. Do niedawna elektroforeza bibułowa była często stosowana do określania profilu białek surowicy krwi. Obecnie coraz częściej stosuje się elektroforezę żelową, w której nośnikiem fazy ciekłej, buforu, jest żel elektroforetyczny, wykonany z agaru, poliakrylamidów lub skrobi (obecnie bardzo rzadko stosowana). Ciekłą próbkę mieszaniny składników umieszcza się we wgłębieniu w warstwie żelu zwilżonej odpowiednim



Rys. 1. Schemat urządzenia do elektroforezy bibułowej.
Roztwory buforowe

roztworem buforowym. Następnie umieszcza się całość w polu elektrycznym wytworzonym pomiędzy elektrodami, do których przyłożone jest napięcie polaryzujące od 50 do 2000 V. Zastosowanie elektroforezy żelowej pozwoliło na znaczne zwiększenie efektywności rozdzielania w stosunku do elektroforezy na bibule.

Od przełomu lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku obserwuje się rozwój elektroforezy kapilarnej. Rozdzielanie prowadzi się w rurce kapilarnej o średnicy od 25 do 100 μm i długości od 0,2 do 1 m wypełnionej odpowiednim buforem. Do końców rurki, po wprowadzeniu próbki rozdzielanej, przykładane jest napięcie polaryzujące o wartości do 30 kV, które wytwarza pole elektryczne generujące migrację składników próbki obdarzonych ładunkiem. Przy jednym końcu rurki umieszczony jest detektor, który wykrywa i rejestruje rozdzielone składniki. Schematyczny wygląd urządzenia, prezentującego zasadę działania elektroforezy kapilarnej, jest przedstawiony na Rys. 2.



Rys. 2. Schemat urządzenia do elektroforezy kapilarnej.

Zaletą elektroforezy kapilarnej jest bardzo krótki czas analizy, bardzo małe zużycie roztworów i możliwość automatyzacji procesu.

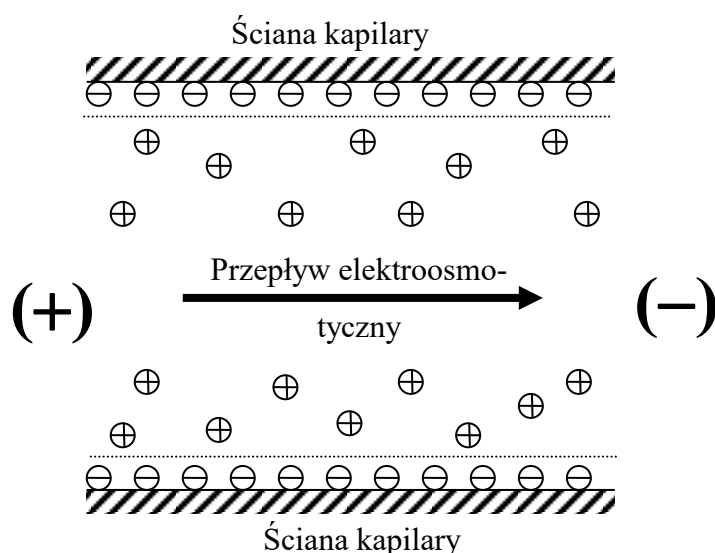
Od ostatniej dekady ubiegłego wieku bardzo szybko rozwija się zastosowanie elektroforezy w układach miniaturowych (mikroczipach), w których długość drogi rozdzielania może wynosić nawet kilka mm, przy zastosowaniu wysokich wartości natężenia pola elektrycznego. Proces rozdzielania mieszanin w mikroczipach trwa bardzo krótko, nawet w niektórych przypadkach ułamek sekundy. Dzięki temu możliwe są do osiągnięcia wydajności 100 000, a nawet i więcej, analiz w ciągu dnia. Takie

wydajności stwarzają olbrzymie możliwości w badaniach biomedycznych i biofarmaceutycznych związanych np. z ustalaniem sekwencji białek i DNA.

Zjawisko elektroforezy znalazło również zastosowanie w technice do pokrywania powierzchni metali powłokami nie przewodzącymi prądu, np. tlenkami metali, lakierami.

Elektroosmoza

Elektroosmoza to ruch ośrodka ciekłego (roztworu) względem nieruchomej fazy stałej w wyniku działania pola elektrycznego. Jak wynika z definicji w elektroosmozie faza ciekła porusza się względem fazy stałej, a więc odwrotnie niż w elektroforezie. Powstawanie efektu elektroosmozy można wytłumaczyć na przykładzie kapilary ze stopionej krzemionki wypełnionej roztworem wodnym i umieszczonej pomiędzy elektrodami wytwarzającymi pole elektryczne, tak jak na rys. 3.



Rys. 3. Ilustracja efektu elektroosmotycznego.

Na granicy faz ścianka kapilary – roztwór wodny powstaje podwójna warstwa elektryczna z ładunkiem o znaku ujemnym na powierzchni krzemionki, powstałym w wyniku dysocjacji powierzchniowych grup silanolowych ($\equiv\text{SiOH} \leftrightarrow \equiv\text{SiO}^- + \text{H}^+$). Dysocjacja ta jest całkowita, gdy pH roztworu jest większe od 3. Natomiast roztwór graniczący z powierzchnią kapilary posiada w nadmiarze jony o znaku ładunku przeciwnym (w przykładzie z rys. 3 dodatnim) do ładunku powierzchni kapilary. Jeżeli taki układ zostanie poddany działaniu pola elektrycznego, to jony roztworu przy po-

wierzchni kapilary będą migrować w stronę elektrody ujemnej „ciągnąc” ze sobą roztwór znajdujący się w całej objętości kapilary (zdysocjowane grupy silanolowe o ujemnym ładunku są „zakotwiczone” do powierzchni krzemionki, więc nie mogą się przemieszczać w polu elektrycznym). W ten to sposób powstaje przepływ elektroosmotyczny roztworu w kapilarze. Wielkość liniowej prędkości, v_{eos} , tego przepływu jest określana przez równanie Smoluchowskiego, podane wcześniej dla określania prędkości migracji cząstek koloidalnych w procesie elektroforezy:

$$v_{eos} = \frac{\varepsilon_o \cdot \varepsilon_r \cdot E \cdot \zeta}{\eta} \quad (4)$$

Analogicznie do ruchliwości elektroforetycznej została wprowadzona ruchliwość elektroosmotyczna, która jest podana wyrażeniem:

$$\mu_{eos} = \frac{v_{eos}}{E} = \frac{\varepsilon_o \cdot \varepsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \quad (5)$$

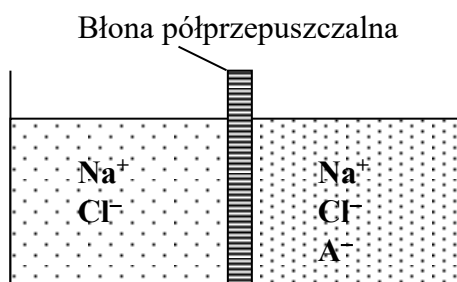
Ostatnie równania pozwalają na wyznaczenie potencjału elektrokinetycznego na podstawie zmierzonego przepływu elektroosmotycznego.

Efekt elektroosmotyczny jest wykorzystywany w stosunkowo młodej metodzie rozdzielania i analizy mieszanin substancji szczególnie leków i pochodzenia biologicznego. Metoda ta to elektrochromatografia kapilarna. Posiada bardzo dużo podobieństwa do wysokosprawnej chromatografii cieczowej, HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Zasadnicza różnica między tymi metodami polega na tym, że w HPLC przepływ eluentu jest powodowany mechanicznie – tłoczeniem fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną za pomocą pompy wysokociśnieniowej. Natomiast w elektrochromatografii kapilarnej przepływ fazy ruchomej jest wywołany poprzez efekt elektroosmotyczny. Zestaw do elektrochromatografii kapilarnej jest praktycznie identyczny z zestawem do elektroforezy kapilarnej, rys. 2. Konstrukcyjna różnica polega na zastosowaniu innej kolumny rozdzielczej, która powinna zawierać odpowiednią fazę stacjonarną sprzyjającą wywoływaniu efektu elektroosmotycznego. Należy też zaznaczyć, że metodę tę można zastosować do rozdzielania zarówno substancji jonowych jak i obojętnych.

Ponadto efekt elektroosmozy znalazł zastosowanie do usuwania wody tam gdzie jest niepożądana, np. z zagrzybionych ścian budynków, z torfu, z drzewa przeznaczanego na meble itp.

Równowaga Donnana

Donnan, brytyjski chemik był pierwszym, który zajmował się (1911r.) badaniem równowagi jaka występuje pomiędzy dwoma roztworami zawierającymi składniki jonowe i przedzielonymi półprzepuszczalną membraną. W sytuacji gdy wszystkie składniki roztworu mogą swobodnie przechodzić przez taką membranę, to po pewnym czasie w wyniku dyfuzji wyrównają się ich stężenia po obu jej stronach. Jednakże proces jest bardziej skomplikowany, gdy jeden ze składników, z uwagi na swoje rozmiary, nie może przez taką membranę przenikać. Wtedy składniki jonowe roztworów ulegają niejednakowemu podziałowi po obu stronach błony półprzepuszczalnej.



Rys. 4. Układ do ilustracji równowagi Donnana; roztwór po lewej stronie błony półprzepuszczalnej zawiera tylko jony Na^+ i Cl^- , a po prawej stronie jony Na^+ i Cl^- oraz substancję wielkocząsteczkową, która dysocjuje na jony A^- i Na^+ .

Na rys. 4. jest przedstawione naczynie, które jest przedzielone półprzepuszczalną membraną. Po obu jej stronach znajduje się roztwór wodny chlorku sodu. Jony tego elektrolitu mogą swobodnie przenikać przez membranę. W takim układzie dojdzie do wyrównania potencjałów chemicznych NaCl w obu roztworach i w konsekwencji do wyrównania stężenia. Jednakże gdy do naczynia po prawej stronie membrany wprowadzona zostanie substancja wielkocząsteczkowa, która dysocjuje na anion A^- , nie przechodzący przez membranę, i jon Na^+ , to dochodzi do zakłócenia wcześniej ustalonej równowagi pomiędzy jonami chlorku sodu po obu stronach błony półprzepuszczalnej. Po pewnym czasie dojdzie do ponownego wyrównania potencjału chemicznego chlorku sodu w dwóch roztworach i tym samym ustalenia nowej równowagi, określonej też przez warunek skompensowania ładunków jonów wszystkich składników w roztworach oddzielnie po obu stronach.

Jeżeli przyjmiemy, że objętości roztworów po obu stronach są jednakowe i ma miejsce wspomniany powyżej nowy stan równowagi (po dodaniu substancji wielkocząsteczkowej), który opisany jest przez poniższe równanie:

$$a_{L,Na^+} \cdot a_{L,Cl^-} = a_{P,Na^+} \cdot a_{P,Cl^-} \quad (6)$$

gdzie a oznacza aktywność jonów Na^+ i Cl^- po lewej, L , i prawej, P , stronie membrany. W przypadku roztworów rozcieńczonych w ostatnim równaniu aktywności można zamienić stężeniami, c , wtedy:

$$c_{L,Na^+} \cdot c_{L,Cl^-} = c_{P,Na^+} \cdot c_{P,Cl^-} \quad (7)$$

Wspomniany powyżej warunek, skompensowania ładunków jonów po obu stronach membrany, musi być spełniony, co pozwala napisać równanie dla roztworu po lewej stronie:

$$c_{L,Na^+} = c_{L,Cl^-} \quad (8)$$

i roztworu po prawej stronie:

$$c_{P,Na^+} = c_{P,Cl^-} + c_{P,A^-} \quad (9)$$

Po podstawieniu ostatnich dwóch równań do równania (7) otrzymujemy zależność:

$$c_{L,Cl^-}^2 = (c_{P,Cl^-} + c_{P,A^-}) \cdot c_{P,Cl^-} = c_{P,Cl^-}^2 \cdot \left(1 + \frac{c_{P,A^-}}{c_{P,Cl^-}}\right) \quad (10)$$

lub:

$$\frac{c_{L,Cl^-}}{c_{P,Cl^-}} = \sqrt{1 + \frac{c_{P,A^-}}{c_{P,Cl^-}}} \quad (11)$$

Z ostatniego równania można wyznaczyć stosunek stężeń jonów dyfundujących przez membranę po ustaleniu się równowagi w obecności wielkocząsteczkowych jonów lub cząstek koloidalnych posiadających taki sam znak ładunku. Jeżeli w roztworze koloidalnym stężenie koloidu jest bardzo duże w porównaniu do stężenia jonów Cl^- , to stosunek stężeń jonów chlorowych ($c_{L,Cl^-} / c_{P,Cl^-}$) po obu stronach membrany jest w przybliżeniu równy pierwiastkowi z wartości stężenia anionu koloidu, $\sqrt{c_{P,A^-}}$. Zatem stężenie jonów chlorkowych po lewej stronie membrany jest tym większe im większe jest stężenie anionów koloidu po prawej stronie membrany. W przypadku gdy stężenie jonów koloidu jest bardzo małe, to stosunek stężeń jonów chlorkowych jest zbliżony do 1. To oznacza, że stężenia tych jonów po obu stronach błony półprzepuszczalnej są praktycznie jednakowe. Z tych rozważań wynika, że zmieniając stężenie

roztworu koloidu można wpływać na stosunek stężenia jonów elektrolitu dyfundujących przez membranę wtedy, gdy znaki ładunku jonu i cząstki koloidu są takie same. Przedstawiony efekt równowagi Donnana występuje w wielu procesach przebiegających w organizmach żywych. Membranami półprzepuszczalnymi są błony komórkowe, przez które dyfundują elektrolity małocząsteczkowe, ale nie dyfundują duże cząsteczki np. białka. Przykładem działania efektu równowagi Donnana jest proces oczyszczania krwi w nerce, gdzie na zewnątrz są usuwane produkty przemiany materii, a wielkie cząsteczki białka pozostają w przepływającej krwi. Innym przykładem może być wchłanianie leku. Proces ten można znacznie zwiększyć przez podawanie leku z roztworem koloidu. Np. absorpcja benzylopenicyliny w postaci soli sodowej znacznie zwiększa się w obecności anionu wielkocząsteczkowego np. soli sodowej karboksymetylocelulozy. Efekt ten można przewidzieć na podstawie prostych obliczeń. W równaniu (11) opisującym równowagę Donnana stężenie jonów chlorkowych należy zastąpić stężeniem $[L^-]$ anionowej formy leku, a stężenie koloidu stężeniem anionu karboksymetylocelulozy $[R^-]$. Wtedy równanie równowagi Donnana dla tego przypadku można napisać:

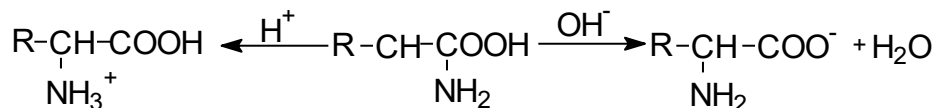
$$\frac{[L^-]_o}{[L^-]_p} = \sqrt{1 + \frac{[R^-]_p}{[L^-]_p}} \quad (12)$$

gdzie indeksy o i p oznaczają kolejno osocze i przewód pokarmowy. Jeżeli $[R^-]_p/[L^-]_p = 3$, wtedy $[L^-]_o/[L^-]_p = 2$. Natomiast gdy $[R^-]_p/[L^-]_p = 80$ to $[L^-]_o/[L^-]_p = 9$. Z tych prostych obliczeń wynika, że jeżeli zwiększy się stężenie wielkocząsteczkowego anionu w przewodzie pokarmowym w obecności leku w formie anionu, to wzrośnie stopień jego absorpcji do osocza.

Elektroforeza białek

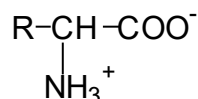
Jak wiadomo, zarówno koloidy hydrofilowe, jak i hydrofobowe mają dodatni lub ujemny ładunek elektryczny, mogą więc poruszać się w polu elektrycznym do katody lub anody.

Białka posiadają zarówno grupy o charakterze kwasowym —COOH, jak i zasadowym —NH₂. W zależności od pH środowiska występują one w formie jonu o ładunku ujemnym lub dodatnim. Rozpatrzmy ten problem na przykładzie aminokwasu będącego składnikiem białka.



Jak wynika z reakcji, w środowisku kwaśnym białka wykazują ładunek dodatni dzięki jonizacji grupy —NH₂ do —NH₃⁺ i cofniętej dysocjacji grupy —COOH, natomiast w środowisku zasadowym uzyskują ładunek ujemny dzięki dysocjacji grupy —COOH.

Z równania wynika również, że musi istnieć takie pH przy którym obydwie grupy funkcyjne —COOH i —NH₂ są w jednakowym stopniu zjonizowane. Przy takim pH, nazywanym punktem izoelektrycznym, tworzą się sole wewnętrzne, to znaczy cząsteczki, które mają jednocześnie ładunek dodatni i ujemny:

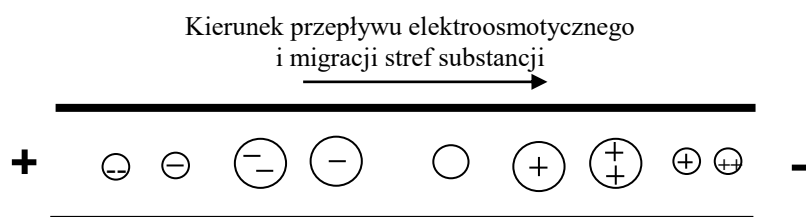


Należy podkreślić, że w punkcie izoelektrycznym wypadkowy ładunek aminokwasu lub białka jest równy zero. Punkt izoelektryczny niektórych białek wynosi:

Białko	Punkt izoelektryczny (pH)
Lecytyna	2,60
Albumina jaja kurzego	4,55
Żelatyna	4,85
Hemoglobina	7,00
Cytochrom C	9,70

Zastosowanie w elektroforezie odpowiedniego pH fazy rozpraszającej (dyspersyjnej) powoduje, że w środowisku zasadowym białka mają ładunek ujemny i wędrują do anody (**anforeza**), w środowisku kwaśnym ładunek dodatni i wędrują do katody (**kataforeza**), natomiast w punkcie izoelektrycznym - zerowy i **nie wykazują** ruchliwości elektroforetycznej. Można sformułować regułę, która określa kolejność, w jakiej rozdzielane podczas elektroforezy cząstki lub cząsteczki docierają do katody. Pierwsze docierają do katody małe obdarzone dużym ładunkiem kationy, następnie większe kationy o mniejszym ładunku, potem cząsteczki obojętne. Kolejność wędrowki stref substancji obdarzonych ładunkiem ujemnym do anody jest analogiczna, małe aniony posiadające duży ładunek elektryczny migrują najszybciej, a duże aniony o małym ładunku najwolniej. Należy pamiętać, że procesowi elektroforezy prak-

tycznie zawsze towarzyszy proces elektroosmozy. Zwykle ruchliwość elektroforetyczna przyjmuje mniejsze wartości od ruchliwości elektroosmotycznej w kapilarach krzemionkowych. Dlatego podczas procesu elektroforezy w kapilarach krzemionkowych wszystkie składniki analizowanej próbki wędrują do katody. Najszybciej poruszają się strefy substancji o cząsteczkach najmniejszych i obdarzone największym ładunkiem dodatnim, a najwolniej pasma substancji o cząsteczkach najmniejszych i największym ładunku ujemnym. Schematycznie kolejność migracji substancji, różniących się ładunkiem i wielkością cząsteczek/cząstek, podczas procesu elektroforezy w kapilarze krzemionkowej jest przedstawiona na poniższym rysunku, rys. 6.



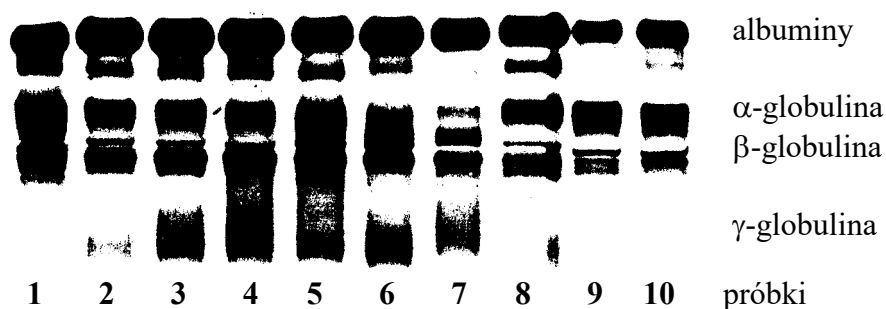
Rys. 6. Kolejność migracji cząstek/cząsteczek do katody podczas procesu elektroforezy w kapilarze krzemionkowej.

Należy jednak pamiętać, że opisana kolejność migracji składników próbki w procesie kapilarnej elektroforezy jest regułą, która może mieć wyjątki.

Elektroforezę bibułową prowadzi się w aparacie, którego schemat przedstawia rys.1. Przeprowadza się ją w sposób następujący: pasek bibuły nasycy się buforem o odpowiednim pH i nanosi roztwór białka np. w buforze mrówczanowym o pH = 2. Pasek bibuły z naniesionym białkiem umieszcza się w komorze zanurzając końce paska w buforze. Naczynie przykrywa się pokrywą i włącza prąd. Po upływie 1 - 2 godz. wyjmuje się pasek bibuły z rozdzielonymi frakcjami białka, suszy i wywołuje barwnikiem np. błękitem bromotymolowym, który wiąże się ilościowo z albuminami.

Podczas elektroforezy bibułowej zachodzą również inne zjawiska, które zakłócają prawidłowy przebieg rozdzielania np. adsorpcja białek na bibule, dyfuzja cząstek koloidu wzdłuż paska bibuły oraz wydzielania się ciepła w wyniku przepływu prądu przez elektrolit.

Z tego powodu elektroforezę przeprowadza się na żelach: agarowym, skrobiowym lub poliakryloamidowym. Elektroforeza na żelach pozwala na uzyskanie lepszych wyników rozdzielania białek. Żele charakteryzują się większą zdolnością rozdzielczą, gdyż oprócz różnic w ruchliwości elektroforetycznej, cząstki koloidalne podlegają „przesiewaniu molekularnemu”. Rolę „sita” spełniają pory w sieci żelu, których średnica zależy od sposobu przygotowania żelu. Na rys.5 przedstawiono elektroforegram frakcji białkowych surowicy.



Rys. 5. Przykład elektroforegramu białek surowicy krwi.

Podsumowanie informacji o wykorzystaniu elektroforezy w analizie farmaceutycznej i biomedycznej

Metoda elektroforezy znalazła szerokie zastosowanie w farmacji i biomedycynie jako narzędzie do rozdzielania, izolowania i analizy ilościowej oraz jakościowej składników próbek szczególnie leków i pochodzenia biologicznego. Proces elektroforezy może być przeprowadzony różnymi technikami, jako elektroforeza na bibule, w żelu, kolumnie, kapilarze.

Obecnie elektroforeza jako metoda analizy chemicznej jest najczęściej realizowana w żelu akrylamidowym lub agarze. Metodą tą poddaje się analizie materiał biologiczny (surowica, mocz, różne tkanki, a nawet pojedyncze komórki) pod względem poznania profilu frakcji białkowych czy DNA i RNA. W przypadku sekwencjonowania DNA (odczytywania kolejności par nukleotydów) elektroforeza jest kluczowym elementem tej analizy. Wyniki takiej analizy pomagają przy ustaleniu rodzaju schorzenia i postępów leczenia, cech genetycznych. Elektroforeza żelowa jest też wykorzystywana do analizy rozkładu chemicznego leków jako pojedynczych substancji chemicznych, złożonych mieszanek oraz ich zanieczyszczeń (np. nieorganicznych takich jak ołów, cynk, miedź, żelazo oraz organicznych będących produktami rozkładu związku aktywnego, lub pozostałością po syntezie tego związku).

Od przełomu lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku obserwuje się stały rozwój elektroforezy prowadzonej w kapilarach (średnica wewnętrzna 0,05 – 0,15 mm, długość 20 – 100 cm, napięcie polaryzujące 0 – 30 kV). Po okresie początkowej fascynacji tą metodą (dzięki uzyskiwanej bardzo wysokiej sprawności układów rozdzielczych), obecnie obserwuje się jej ustabilizowany rozwój. Bardzo duże możliwości separacyjne i analityczne pozwoliły na zastosowanie tej metody we współczesnej analizie farmaceutycznej, a szczególnie biomedycznej. Poza korzystną cechą tej metody związaną ze wspomnianą wysoką sprawnością, innymi jej zaletami są prosta procedura, bardzo mała objętość (nanolitry) próbki analizowanej, bardzo małe zużycie reagentów i rozpuszczalników, stosunkowo łatwe zastosowanie

automatyzacji procesu separacji oraz krótki czas przygotowania próbki i prowadzenia separacji. Etapy te są żmudne i czasochłonne do wykonania w klasycznej metodzie elektroforezy żelowej. Przykłady prowadzenia analiz tą metoda można mnożyć. Znane są próby rozdzielania i analizowania praktycznie wszystkich grup substancji stosowanych w farmacji i biomedycynie. Dla porządku należy podać, że są to substancje małowczątkowe i o wielkich (makro-) cząsteczkach, jony nieorganiczne i organiczne, substancje o cząsteczkach obojętnych oraz enancjomery. Świadczą o tym niezmiernie liczne publikacje w czasopismach specjalistycznych i monografiach. Wiele instytucji (w tym wydawnictwa farmakopealne w różnych krajach) potwierdziły oficjalnie przydatność tej metody w analizie farmaceutycznej.

Od 1990 roku obserwuje się wykorzystanie elektroforezy w układach miniaturowych tzw. mikroczipach. Rozwój tego rodzaju techniki elektroforetycznej jest stymulowany głównie zastosowaniami w analizie biomedycznej i farmaceutycznej, szczególnie do rozdzielania białek, peptydów, DNA oraz jego fragmentów (ustalenie sekwencji).

Wykonanie ćwiczenia

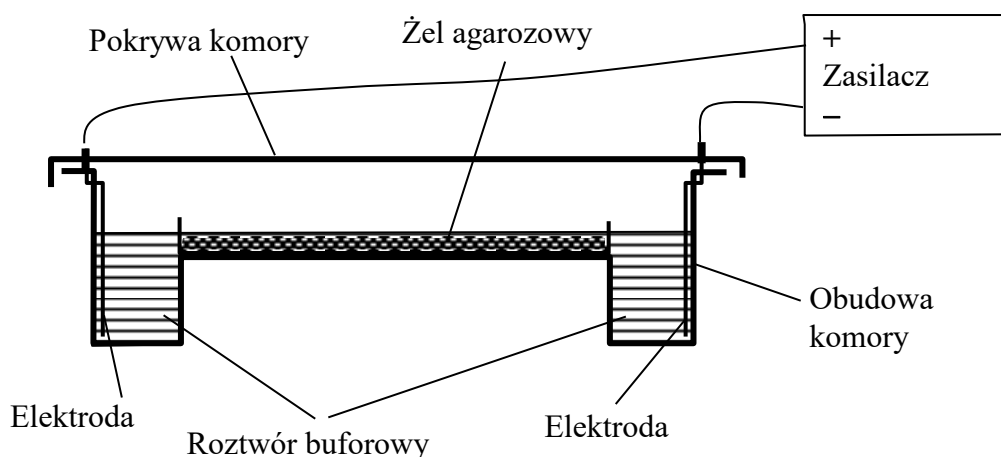
8. ELEKTROFOREZA BARWNIKÓW W ŻELU AGAROWYM

- Zadania:**
1. Wykonać elektroforezę poziomą wybranych barwników w żelu agarozowym przy trzech różnych wartościach pH roztworów buforowych.
 2. Dokonać analizy otrzymanych wyników z uwzględnieniem właściwości strukturalnych badanych barwników i pH roztworów buforowych zastosowanych do elektroforezy.
 3. Wskazać, które składniki znajdowały się w próbce stanowiącej mieszaninę barwników.

Wykonanie ćwiczenia:

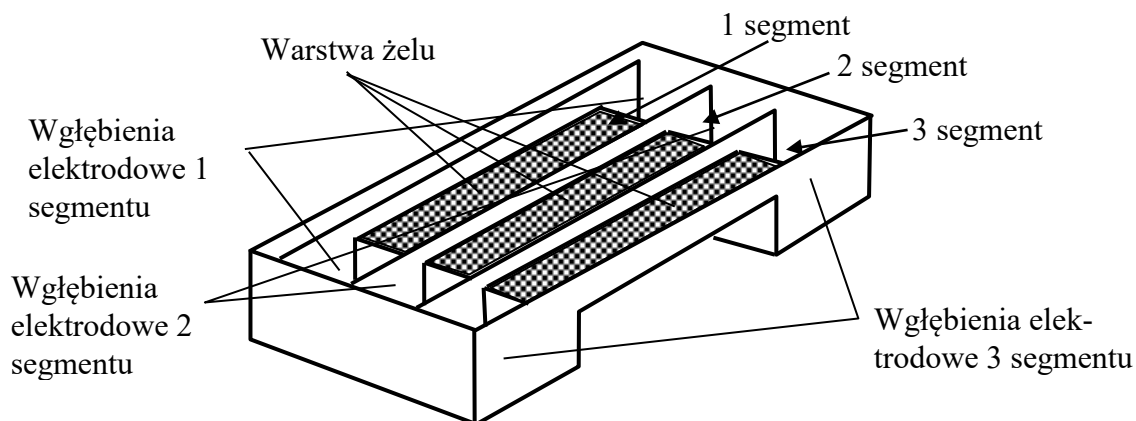
Budowa zestawu do elektroforezy

Doświadczenia wykonuje się w komorze do elektroforezy poziomej, której schematyczny wygląd w przekroju wzdłużnym jest przedstawiony na rys. 6. Na rysunku uwidocznił jest również zasilacz prądu stałego.



Rys. 6. Schematyczny wygląd przekroju wzdłużnego komory do elektroforezy poziomej.

Wygląd przestrzenny komory jest przedstawiony na rysunku 7. Na rysunku nie zostały uwidocznione elektrody, pokrywa komory i roztwory buforowe. Natomiast uwidocznione są warstwy żelu agarozowego w trzech segmentach komory.

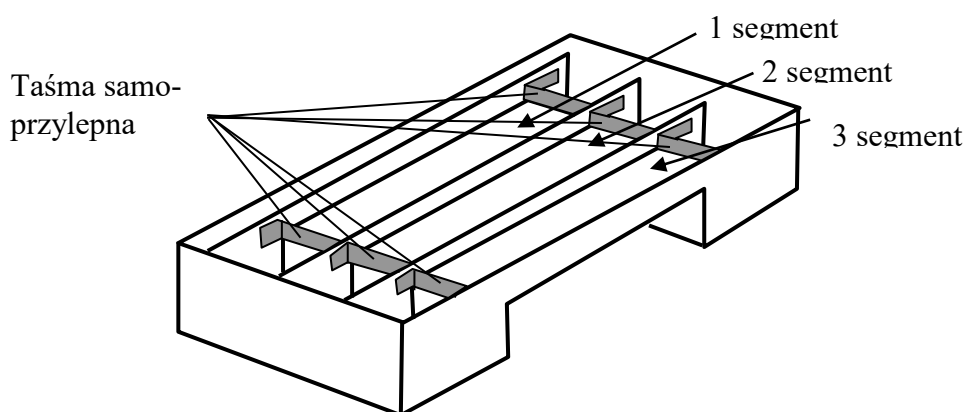


Rys. 7. Widok przestrzenny komory do elektroforezy poziomej (bez pokrywy i elektrod).

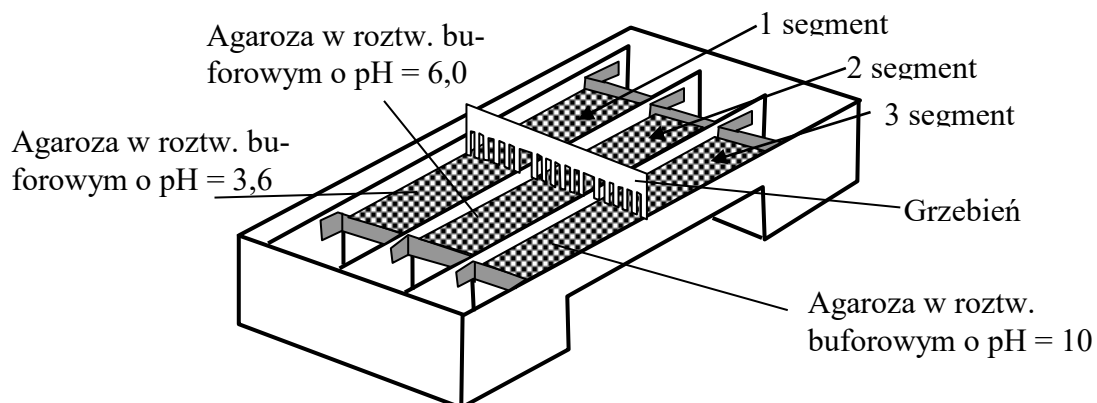
Jak widać na rys. 6, zestaw do elektroforezy składa się z komory z przykrywą i zasilacza prądu stałego. W komorze, po obu jej stronach, są umieszczone elektrody. Aby przeprowadzić proces elektroforezy w komorze umieszcza się warstwę żelu agarozowego i nalewa roztwór buforowy do wgłębień z elektrodami, tak jak na rys. 6. Włączenie napięcia polaryzującego z zasilacza, w celu prowadzenia procesu elektroforezy, dokonuje się po uprzednim naniesieniu próbek rozdzielanych substancji na warstwę żelu agarozowego. Aparat do elektroforezy używany podczas doświadczeń w laboratorium chemii fizycznej został wyposażony w trzy-segmentową komorę, która pozwala na przeprowadzenie procesu elektroforezy w żelu agarozowym w trzech różnych roztworach buforowych, np. o różnych pH, jednocześnie. Na rys. 7, przedstawiającym widok przestrzenny komory, są widoczne te trzy segmenty z warstwami żelu w każdym z nich.

Przygotowanie żelu agarozowego

1. Odważyć 1,11 g agarozy, wsypać do zlewki o pojemności 250 ml i dodać 110 cm³ roztworu buforowego o pH = 3,6. Podobnie należy przygotować dwa roztwory buforowe agarozy w buforach o pH = 6,0 i pH = 10 .
2. Każdy z otrzymanych trzech roztworów agarozy należy doprowadzić do zagotowania na płycie grzejnej i pozostawić do lekkiego ochłodzenia.
3. Do każdego segmentu komory należy po obu ich (segmentów) stronach przykleić taśmę samoprzylepną. Rys. 8 prezentuje sposób przyklejania taśmy w segmentach komory. Należy zwrócić uwagę na to, by powierzchnie, do których będą przyklejane paski taśmy, były suche i czyste. Dzięki temu, po przyklejeniu taśmy samoprzylepnej, zostaną utworzone korytka w każdym z trzech segmentów komory.
4. Przed nalaniem roztworów agarozy do korytek należy w nich umieścić grzebień plastikowy, w celu utworzenia sześciu wgłębień w środkowej części warstwy żelu, rys. 9.
5. Roztwory agarozy należy wprowadzić do korytek, po ich ostygnięciu do temperatury pokojowej, utworzą się warstwy żelu agarozowego o grubości 5 – 6 mm.



Rys. 8. Prezentacja sposobu przyklejania taśmy samoprzylepnej w celu utworzenia korytek na roztwory agarozy.



Rys. 9. Widok komory z trzema roztworami agarozy w korytkach utworzonych z pasków taśmy samoprzylepnej i ścianek komory oraz grzebień plastikowym służącym do wykonania wgłębień na próbki badanych barwników w warstwie żelu.

Wypełnienie komory roztworami buforowymi

6. Umieścić w komorze elektrody.

7. Po usunięciu taśm samoprzylepnych należy nalać ostrożnie do wgłębień komory z elektrodami odpowiednie roztwory buforowe, tak by poziom roztworu minimalnie przykrywał (ok. 1 mm) warstwę żelu w każdym segmencie – wystarcza 380 ml roztworu buforowego do dwóch wgłębień elektrodowych jednego segmentu.

Należy pamiętać aby do wgłębień elektrodowych 1 segmentu nalać roztwór buforowy o pH = 3,6, zgodnym (takim samym) z pH roztworu stosowanego do przygotowania warstwy żelu w tym segmencie (pH = 3,6). Analogicznie należy wypełnić roztworami buforowymi o odpowiednim pH (6,0 i 10,0) wgłębienia elektrodowe 2 segmentu i 3 segmentu.

8. Usunąć grzebień.

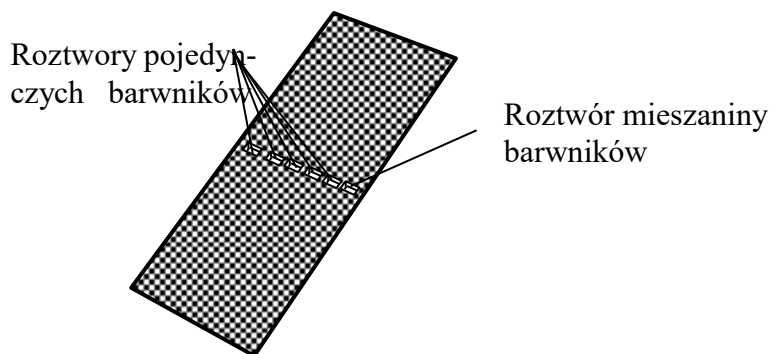
Nanoszenie próbek barwników na żel agarozowy

9. Do utworzonych sześciu wgłębień w środkowej części każdej warstwy żelu agarozowego wprowadzić kolejno, za pomocą strzykawki, niewielkie ilości sześciu roztworów barwników. Przy czym do pięciu wgłębień nanieść roztwory pojedynczych barwników, a do szóstego wgłębienia roztwór mieszaniny barwników wskazany przez asystenta. Podczas nanoszenia należy zwrócić uwagę na to, by roztwór barwnika przykrył całą powierzchnię dna wgłębienia na wysokość około 1 mm. Nanoszone roztwory barwników to:

1. Zieleń malachitowa
2. Rodamina 6G
3. PAR, 4-(2-pirydyloazo)rezorcynol
4. Czerwień Kongo
5. Azorubina

Wzory strukturalne badanych barwników są umieszczone na końcu niniejszego opracowania.

Rys. 10 pokazuje przykładowe rozmieszczenie wgłębień w warstwie żelu. Można powiedzieć, że wgłębienia te stanowią linię startową dla badanych substancji.



Rys. 10. Warstwa żelu agarozowego z jednego segmentu z sześcioma wgłębieniami na próbki pojedynczych barwników oraz ich mieszaniny.

Zapoczątkowanie procesu elektroforezy i jego przebieg

10. Przykryć komorę pokrywą i podłączyć przewodami elektrycznymi komorę do zasilacza. Włączyć wtyczkę przewodu zasilającego do gniazda sieciowego. Włączyć napięcie polaryzujące o wartości 130 V i prowadzić proces elektroforezy w ciągu jednej godziny. W tym czasie obserwować zmiany zachodzące w komorze do elektroforezy i notować co 10 min wartości natężenia prądu.
11. Wyłączyć zasilacz po 1 godz. Wyjąć wtyczkę zasilacza z gniazda sieciowego. Zdjąć pokrywę komory. Zmierzyć dystans migracji stref (plamek) poszczególnych barwników i dane te zamieścić w tabelach poniżej.
12. Po zakończeniu pomiarów przenieść za pomocą strzykawki o pojemności 100 ml roztwory buforowe z wgłębień elektrodowych do odpowiednich butelek.
13. Usunąć zużyty żel agarozowy z komory, a komorę umyć i wytrzeć do sucha ręcznikiem papierowym.
14. Uzyskane dane przedstawić w tabelach .

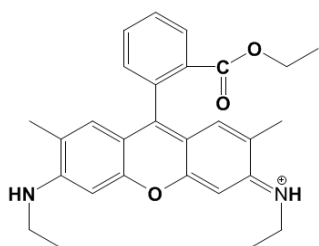
Tabela 1. Wartości natężenia prądu i czasu prowadzenia procesu elektroforezy.

Czas (t) [min]	Natężenie prądu (I) [mA]
0 (start)
10
20
30
40
50
60

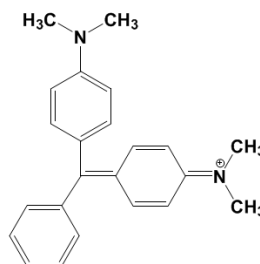
Tabela 2. Dystanse migracji (S) stref (plamek) barwników podczas elektroforezy w żelu agarozowym z roztworami buforowymi o różnych wartościach pH, napięcie polaryzujące V, czas trwania elektroforezy min.

Substancja	Dystans migracji (S) w mm pH = 3,6		Dystans migracji (S) w mm pH = 6,0		Dystans migracji (S) w mm pH = 10,0	
	do anody	do katody	do anody	do katody	do anody	do katody
Zieleń malachitowa						
Rodamina 6G						
PAR						
Czerwień Kongo						
Azorubina						
Mieszanka barwników Składnik 1 Składnik 2						

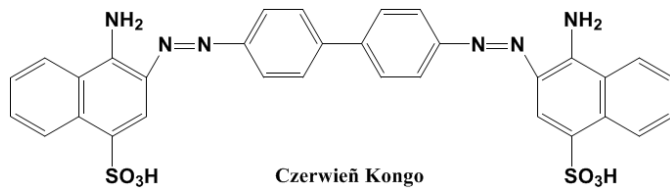
Wzory strukturalne barwników stosowanych jako substancje testowe w procesie elektroforezy:



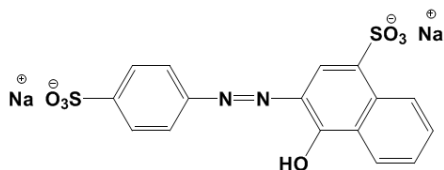
Rodamina 6G



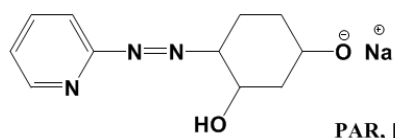
Zieleń malachitowa



Czerwień Kongo



Azorubina



PAR, [4-(2-pirydyloazo)rezorcynol]

8. ELEKTROFOREZA BARWNIKÓW W ŻELU AGAROWYM

(formularz opracowania wyników ćwiczenia)

Data wykonania ćwiczenia:

Imię i nazwisko studenta:

GS:

Imię i nazwisko asystenta:

1. Zadania do wykonania

- 1.1. Wykonanie elektroforezy poziomej wybranych barwników w żelu agarowym przy trzech różnych wartościach pH roztworów buforowych
- 1.2. Obserwowanie zmian natężenia prądu w trakcie trwania elektroforezy
- 1.3. Dokonanie analizy otrzymanych wyników z uwzględnieniem właściwości strukturalnych badanych barwników i pH roztworów buforowych zastosowanych do elektroforezy
- 1.4. Wskazanie, które składniki znajdowały się w próbce stanowiącej mieszaninę barwników

2. Wielkości stosowane

- dystans migracji, s , [mm]
- czas, t , [min]
- napięcie polaryzujące, U , [V]
- natężenie, I , [mA]

3. Równania stosowane do obliczeń

-

4. Wyniki

- 4.1. Zależność natężenia prądu od czasu trwania elektroforezy.

Tabela 1. Wartości natężenia prądu i czasu prowadzenia procesu elektroforezy.

Czas (t) [min]	Natężenie prądu (I) [mA]
0 (start)
10
20
30
40
50
60

4.2. Elektroforeza pozioma wybranych barwników w żelu agarozowym przy trzech różnych wartościach pH roztworów buforowych

Tabela 2. Dystanse migracji (S) stref (plamek) barwników podczas elektroforezy w żelu agarozowym z roztworami buforowymi o różnych wartościach pH, napięcie polaryzujące V, czas trwania elektroforezy min.

Substancja	Dystans migracji (S) w mm pH = 3,6		Dystans migracji (S) w mm pH = 6,0		Dystans migracji (S) w mm pH = 10,0	
	do anody	do katody	do anody	do katody	do anody	do katody
Zieleń malachitowa						
Rodamina 6G						
PAR						
Czerwień Kongo						
Azorubina						
Mieszanka barwników Składnik 1 Składnik 2						

5. Do opracowania należy dołączyć następujące załączniki:

5.1. Obliczenia (przykłady stosowanych obliczeń z wykorzystaniem równań przedstawionych w punkcie 3, obliczenia powinny zawierać zastosowane jednostki).

5.2. Omówienie wyników i wnioski

5.3. Wykresy

Wykres 1: Zależność dystansu migracji poszczególnych stref barwników od pH roztworu buforowego: $S = f(\text{pH})$

Wykres 2: Zależność natężenia prądu od czasu trwania elektroforezy: $I = f(t)$

Podpis studenta:

Podpis opiekuna:

Data: